

3 Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung von Nanoemulsionen zur kosmetischen Anwendung

Ein Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung phytosphingosin- und ceramidhaltiger O/W-Nanoemulsion als eine neue Zubereitung für die Anwendung in der pflegenden Hautkosmetik. Das Hauptproblem bei der Herstellung dieser Nanoemulsionen war die geringe physikalische Stabilität und die sehr schlechte Löslichkeit der Ceramide. Demzufolge war es wichtig, die optimalen Prozess- und Formulierungsbedingungen zu bestimmen, um Nanoemulsionen mit hoher physikalischer Stabilität und gelöst vorliegenden Ceramiden zu erhalten.

3.1.1 Optimierung der Prozessparameter

Die lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNSC) wurden nach Vorhomogenisation mit Hilfe eines Ultra Turrax unter Verwendung eines Hochdruckhomogenisators hergestellt (siehe 5.2).

3.1.1.1 Homogenisationstemperatur

Bei einer Homogenisationstemperatur von 50 °C wurde die mittlere Teilchengröße der PPNSC auf 210 ± 18 nm maximal reduziert (Abb. 3.1.1.1). Eine Verminderung der Energiezufuhr durch Temperaturerniedrigung auf 25 °C, führte zu einer Zunahme der Viskosität der dispergierten Ölphase von 19 ± 5 mPa·s auf 52 ± 11 mPa·s. Diese Viskositätserhöhung sowie die geringere Energiezufuhr während des Homogenisationsprozesses führten zu einer Zunahme des mittleren Tröpfchendurchmessers und des Polydispersitätsindex (PI), die sofort nach der Herstellung gemessen wurden, jeweils von 210 ± 18 nm auf 299 ± 29 nm und von $0,105 \pm 0,019$ auf $0,260 \pm 0,032$. Diese Tendenzen wurden ebenfalls von Müller et al. [1998] beschrieben. Der hohe PI bei einer Homogenisationstemperatur von 25 °C bedeutete eine breite Teilchengrößenverteilung, die zur verstärkten Ostwald-Reifung führte [Higuchi und Misra 1962,

Antonietti und Landfester 2002] und folglich die Stabilität der PPNSC nach zweiwöchiger Lagerung bei 50 °C senkte (Abb. 3.1.1.1).

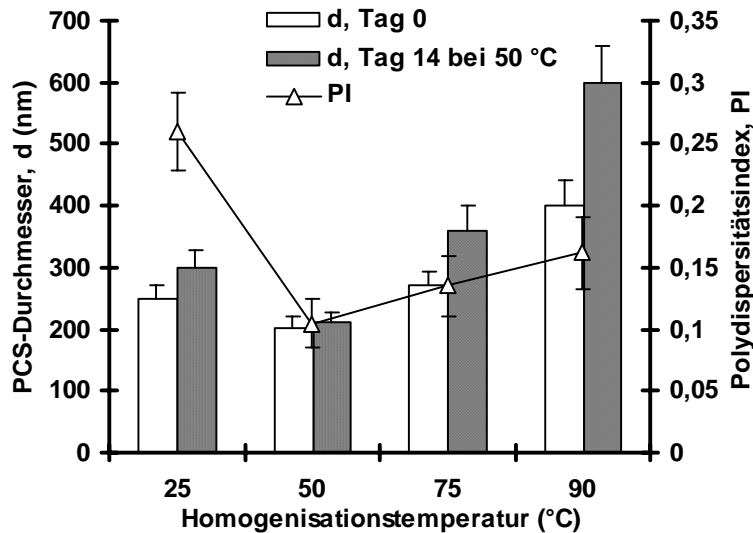


Abb. 3.1.1.1: Einfluss der Homogenisationstemperatur auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), den Polydispersitätsindex und die Stabilität der lipidhaltigen, durch Phytosphingoin positiv geladenen Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

Der Trübungspunkt von Tween 80[®] in Wasser beträgt ca. 70 °C [Jumaa und Müller1998)]. Folglich führte die Homogenisation bei 75 °C zur verstärkten Dehydratation und damit verringerten Löslichkeit des hydrophilen Emulgators, so dass weniger Emulgator zur Adsorption in der O/W-Grenzfläche zur Verfügung stand. Zusätzlich nahmen durch höhere Energiezufuhr die Grenzflächen und damit die Grenzflächenenergie zu. Diese Vorgänge dürften nach der Zerreißung der Ölphase durch Kavitation in nanometergroße Tröpfchen und vor der Besetzung ihrer Grenzflächen mit Emulgatoren zu einer verstärkten Koaleszenz der Öltröpfchen führen [Müller et al. 1998], die die Ursache für die Erhöhung der Teilchengröße bei 75 °C und viel deutlicher bei 90 °C im Vergleich zu 50 °C war (Abb. 3.1.1.1).

3.1.1.2 Homogenisationsdruck und –zyklenzahl

Die Homogenisationszyklenzahl und der Homogenisationsdruck hatten ebenfalls einen Einfluss auf die Tröpfchengröße (Abb. 3.1.1.2). Es ist häufig nötig, mehrere Homogenisationszyklen zu

fahren, da zum Erhalt kleiner Tropfen die neu gebildeten Grenzflächen erst durch Emulgatormoleküle neu besetzt werden müssen. Durch Erhöhung des Homogenisationsdruckes von 300 bar auf 500 bar und der Homogenisationszyklenzahl von eins auf acht, nahm der mittlere Tröpfchendurchmesser und der PI bei 50 °C jeweils von 315 ± 25 nm auf 201 ± 17 nm und von $0,281 \pm 0,013$ auf $0,105 \pm 0,019$ ab. Jedoch führte eine weitere Erhöhung auf 700 bar und zehn Zyklen nur noch zu einer geringfügigen Erhöhung der mittleren Tröpfchengröße auf 217 ± 19 nm, wahrscheinlich aufgrund der Zunahme der Grenzflächen und somit der Grenzflächenenergie. Diese Erhöhung der Grenzflächenenergie konnte durch die Zusammensetzung und die Konzentration der Emulgatoren an der O/W-Grenzfläche nicht kompensiert werden, was zu einer Koaleszenz der Tröpfchen führte [Coulaloglou und Tavlarides 1977, Murahlidhar und Ramkrisham 1986, Trotta et al. 2002].

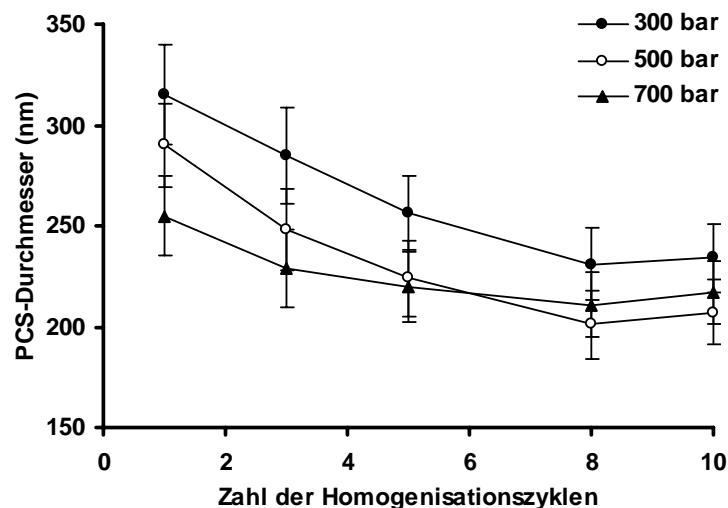


Abb. 3.1.1.2: Einfluss der Zahl an Homogenisationszyklen und des Homogenisationsdruckes auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen bei einer Homogenisationstemperatur von 50 °C ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

3.1.2 Optimierung der Formulierungsparameter

Die Nanoemulsionen wurden im Folgenden unter den optimierten Prozessbedingungen (50°C, 500 bar und acht Homogenisationszyklen) hergestellt.

3.1.2.1 Auswahl der Ölphase

Um die geeignete Ölphase für die schwerlöslichen Sphingolipide Phytosphingosin, Ceramid 3 und Ceramid 3B, zu finden, wurden deren Rekristallisationstemperaturen aus kosmetischen Ölen, die kommerziell erhältlich sind, mit Hilfe der DSC untersucht (Tab. 3.1.2.1).

Tab. 3.1.2.1: Rekristallisationstemperatur der 0,5 %igen Sphingolipide Phytosphingosin, Ceramide 3 und 3B aus kosmetischen Ölen

Kosmetisches Öl	Rekristallisationstemperatur (°C)		
	Phytosphingosin	Ceramid 3	Ceramid 3B
Tegosoft® DC	90 ± 2	90 ± 2	50 ± 2
Miglyol 812	80 ± 2	80 ± 2	45 ± 2
Tegosoft® TN	85 ± 2	70 ± 2	40 ± 1
Varonic® APM	40 ± 1	60 ± 2	20 ± 1
Eutanol G	< 20	23 ± 1	< 20

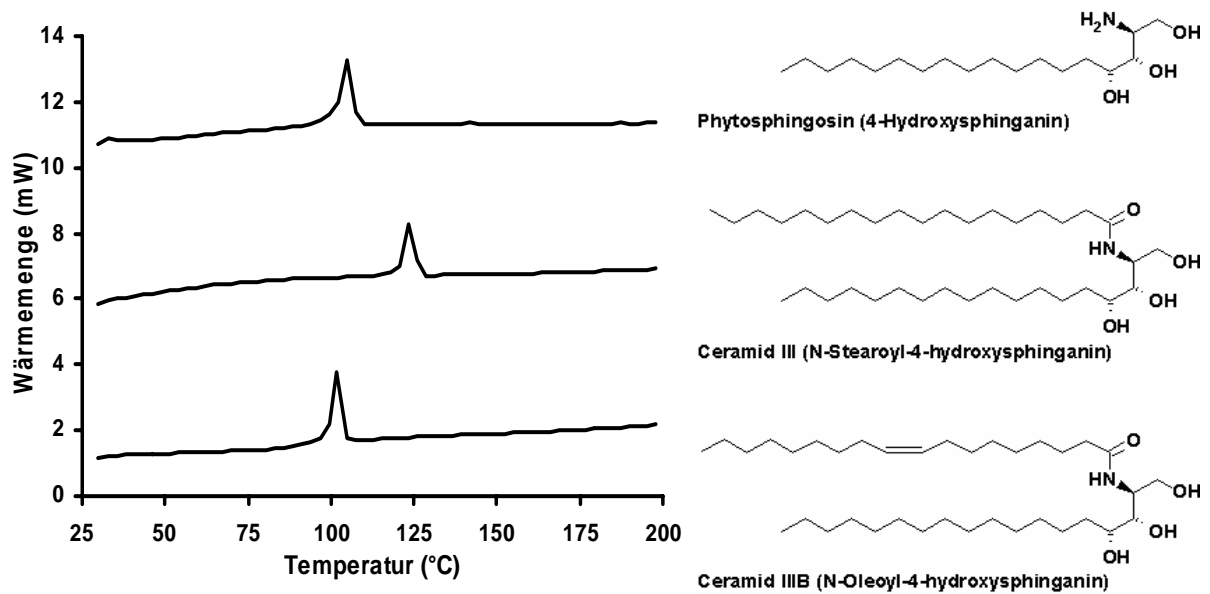


Abb. 3.1.2.1.1: DSC- Thermogramm (links) und Strukturformeln (rechts) der Sphingolipide Phytosphingosin, Ceramid 3 und Ceramid 3B

Alle untersuchten kosmetischen Öle außer Eutanol G und Varonic[®] APM waren sehr schlechte Lösungsmittel, da die Sphingolipide bereits zwischen 40 °C und 90 °C rekristallisierten. Nur im Eutanol G und Varonic[®] APM blieb Ceramid 3B bei Raumtemperatur (20 °C) gelöst. Die Löslichkeit des Ceramid 3B wurde im Vergleich zu Ceramid 3 durch die ungesättigte Fettsäure Ölsäure verbessert [Shaikh et al. 2003]. Diese sorgte auch für eine Verschiebung des endothermen Schmelzpeaks von 123 °C (Ceramid 3) auf 100 °C (Ceramid 3B) (Abb 3.1.2.1.1).

Zur Erklärung dieser verbesserten Löslichkeit kann man den Vorgang der Fetthärtung heranziehen. Flüssige Fette enthalten vorwiegend ungesättigte Fettsäuren wie im Ceramid 3B. Durch die cis-Anordnung der Kohlenstoff-Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren treten starre Knicke im Molekül auf, die eine parallele Kettenanordnung der Fettmoleküle erschweren und dadurch die van-der-Waals-Kräfte reduzieren. Aufgrund der geringen Interaktion zwischen den Fettsäuremolekülen wird der Schmelzpunkt gesenkt. Bei flüssigen Fetten liegt er dann unterhalb der Raumtemperatur. Durch Hydrierung werden die starren Knicke aufgehoben und die Fettmoleküle ordnen sich verstärkt parallel an. Diese zunehmende parallele Anordnung sorgt für verstärkte van-der-Waals-Wechselwirkungen, die wie beim Ceramid 3 zu einem Anstieg der Schmelztemperatur führen, der bei festen Fetten oberhalb der Raumtemperatur liegt. Jedoch war das hydrophilere Varonic[®] APM im Gegensatz zum Eutanol G ein schlechtes Lösungsmittel für Ceramid 3 und Phytosphingosin, denn diese kristallisierten jeweils bei 60 ± 2 °C und 40 ± 1 °C aus.

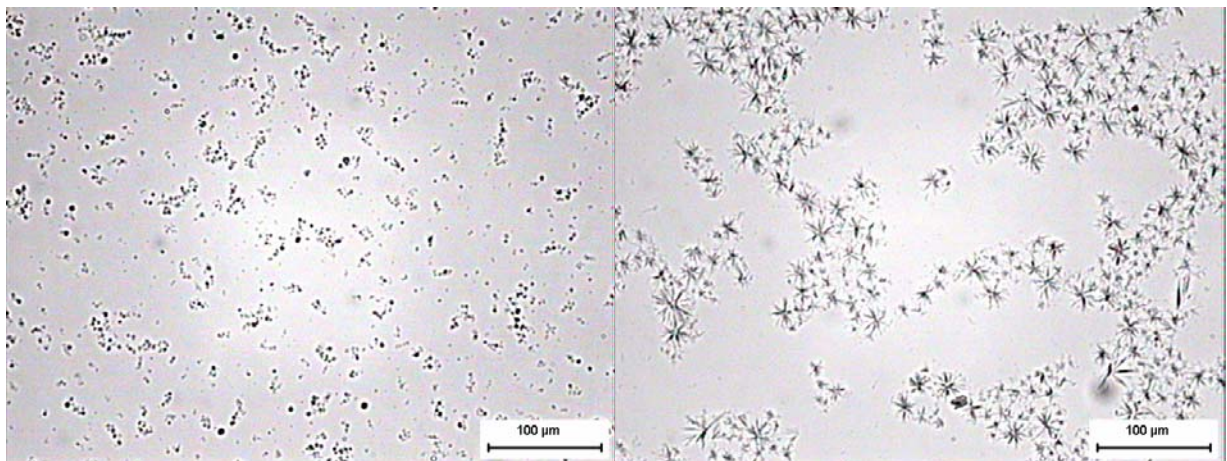


Abb. 3.1.2.1.2: Punktförmige Phytosphingosin- (links) und sternenförmige Ceramid 3-Kristalle (rechts) nach Rekristallisation aus dem kosmetischen Öl Varonic[®] APM

Hierbei war interessant zu beobachten, dass die Lipide aus dem Öl unterschiedlich auskristallisierten. Phytosphingosin-Moleküle fielen als punktförmige Kristalle aus, während Ceramid-3-Moleküle durch Assoziation Mesoformen einnahmen und daher in hydrophileren Systemen aus der invers hexagonalen Phase [Sha et al. 1995a, 1995b] sternenförmig auskristallisierten (Abb. 3.1.2.1.2). Diese Anordnung des Ceramid-3-Moleküls ging aus der Modifikation mit V-förmiger Konformation hervor, in der die beiden Alkylketten einen Winkel einschließen, dessen Spitze die Ceramid-Kopfgruppe bildete (Abb. 3.1.2.1.3) [Dahlen et al. 1972].

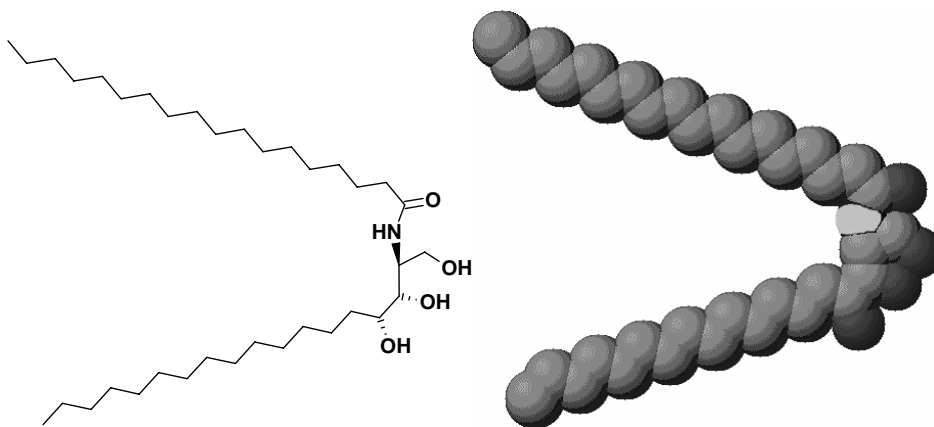


Abb. 3.1.2.1.3: Strukturformel (links) und 3D-Raumstruktur (rechts) von Ceramid 3

Da die hydrophilen Kopfgruppen der Ceramid-3-Moleküle aufgrund von Wasserstoffbrücken sehr stark untereinander interagierten und der Einfluss des Varonic[®] APM auf diese Kopfgruppen aus sterischen Gründen sehr gering war [Raudenkolb 2002], fielen diese sternenförmig aus. Dagegen könnte Varonic[®] APM aufgrund der leichten Zugänglichkeit die intermolekularen Wechselwirkungen der Phytosphingosin-Moleküle, die durch Wasserstoffbrückenbindungen der hydrophilen Kopfgruppen verursacht werden, reduzieren. Diese verminderte Interaktion der Phytosphingosin-Moleküle untereinander könnte für eine vermehrt individuelle, separate Lokalisation der Moleküle sorgen, aus der sie punktförmig ausfielen.

Im Eutanol G kristallisierten alle drei Sphingolipide bei einer Konzentration von 0,5 % nach Abkühlung auf Temperaturen über 26 °C nicht aus. Dies verdeutlichte die guten Lösungseigenschaften dieses Öles für die schwerlöslichen Ceramide und Phytosphingosin im

Gegensatz zu den anderen kosmetischen Ölen. Ceramid 3 bildete im Eutanol G bei Temperaturen um 25 °C aus der invers-hexagonalen Mesoform Emulsionen (Abb. 3.1.2.1.4 , links oben), bei der die hydrophilen Köpfe der Ceramid-3-Moleküle nach innen gestülpt waren und die lipophilen Ketten, im Gegensatz zu den Ceramid-3-Molekülen im hydrophilen Varonic[®] APM, solvatisiert in das lipophile Öl ragten.

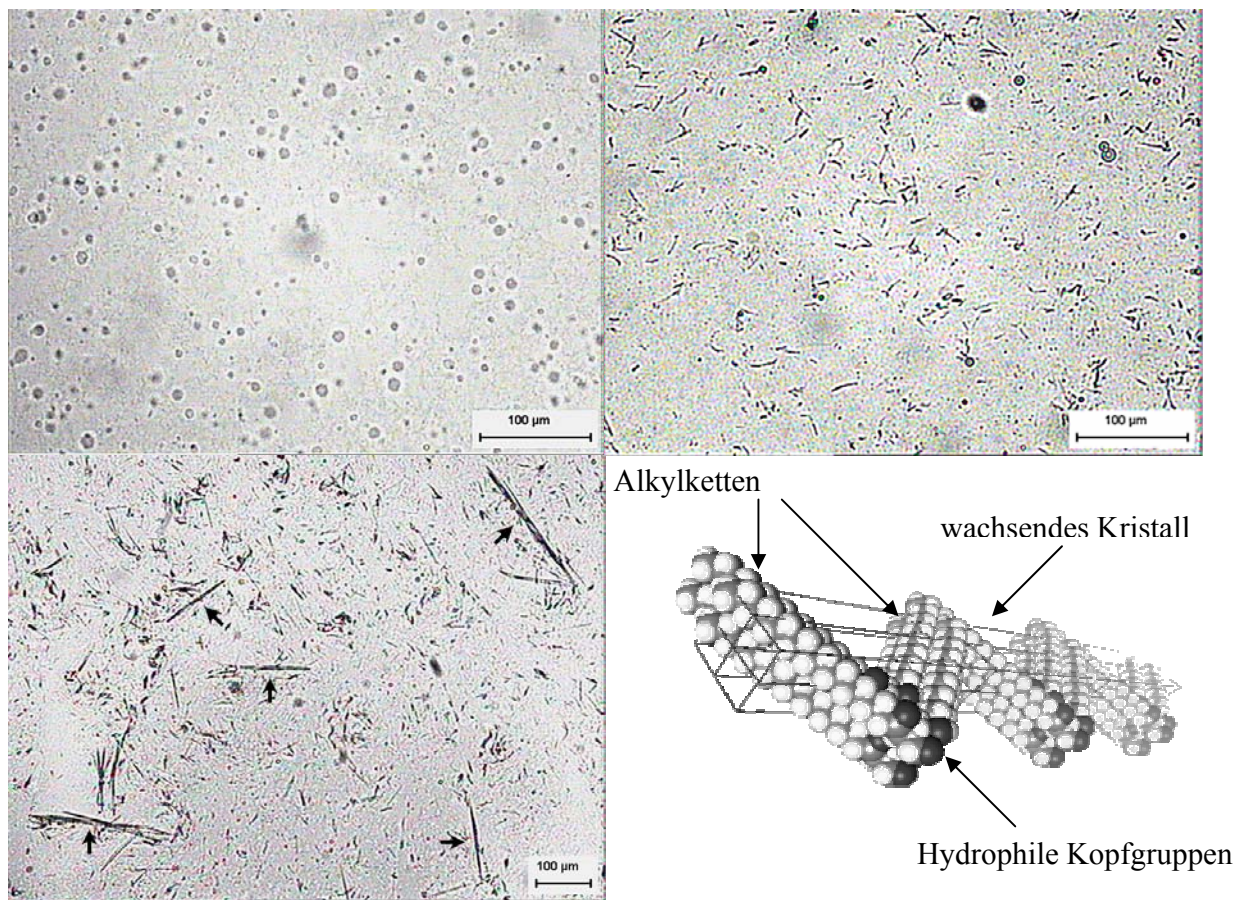


Abb. 3.1.2.1.4: Ceramid 3 in Eutanol G bei Temperaturen um 25°C (links oben), bei Temperaturen unter 24°C nach einem Tag (rechts oben) und nach einer Woche (links unten); rechts unten: 3D-Struktur vom wachsenden Ceramid-3-Kristall; drei Ceramid-3-Moleküle sind miteinander assoziiert, wobei die Alkylketten in Form trikliner Subzellen mit paralleler Ausrichtung der Ketten angeordnet sind [Raudenkolb 2002]

Jedoch fielen bei Temperaturen unter 24 °C die Ceramid-Moleküle lamellar in Form dünner faserartiger Nadeln aus (Abb. 3.1.2.1.4, rechts oben), die die stabile α -Modifikationen darstellten [Raudenkolb 2002]. Hier interagierten die lipophilen Kettenenden der Ceramid-3-Moleküle so

miteinander (Abb. 3.1.2.1.4, rechts unten), dass sie zu den nadelförmigen, mit der Zeit wachsenden Kristallen führten (Abb. 3.1.2.1.4, links unten). In den Nanoemulsionen wurden diese Kristalle bei Überschreiten der Sättigungskonzentration ebenfalls beobachtet. Deshalb wurden sie als Indikatoren für die Löslichkeitsgrenze herangezogen.

Somit wurde Eutanol G zwar als kosmetisches Öl zur Verwendung als disperse Phase für die Herstellung der PPNSC verwendet, doch die Sättigungskonzentration der Ceramide, speziell des Stratum-corneum-Lipids Ceramid 3, wurde durch Zusatz von lipophilen Emulgatoren optimiert, was in den Abschnitten 3.1.2.2 und 3.1.2.5 diskutiert wird.

3.1.2.2 Auswahl des lipophilen Emulgators

Sojaphospholipide mit relativ hohem Anteil an Phosphatidylcholin wie Lipoid S-100[®] sorgten im Gegensatz zu Sojaphospholipiden mit geringem Phosphatidylcholin-Anteil, wie Lyso- α -Phosphatidylcholin und Lipoid S-75[®] für stabilere positiv geladene Nanoemulsionen (Abb. 3.1.2.2.1).

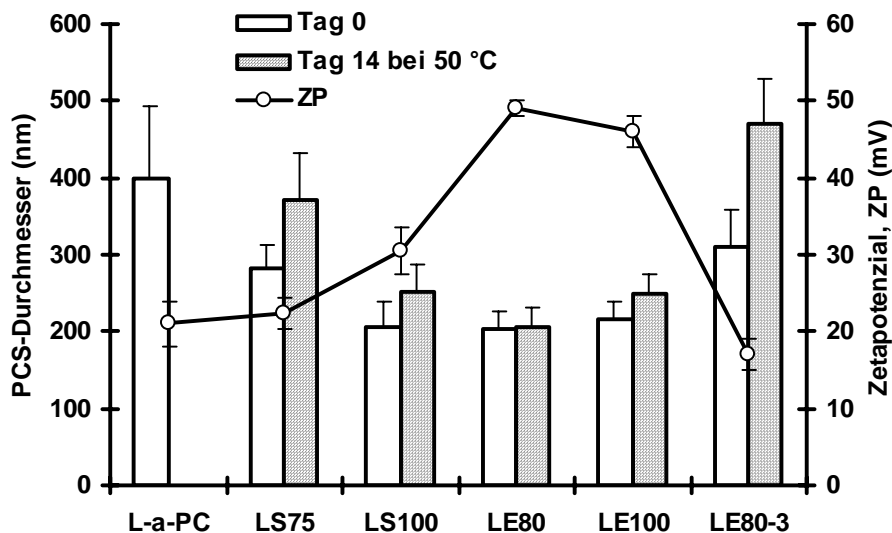


Abb. 3.1.2.2.1: Einfluss von verschiedenen Phospholipiden (2 % m/m) auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), das Zetapotenzial und die Stabilität der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen; sind keine Balken abgebildet, erfolgte Phasenseparation ($\bar{x} \pm s$; $n = 5$); L-a-PC: L- α -Phosphatidylcholin; LS75, LS100: Lipoid S 75[®] bzw. S 100[®]; LE80, LE100, LE80-3: Lipoid E 80[®], E 100[®] bzw. E 80-3[®]

Erst bei einem Phosphatidylcholin-Anteil von über 90 % (Lipoid S 100[®]) waren die Nanoemulsionen relativ stabil, denn die mittlere Tröpfchengröße von 205 ± 34 nm wurde nach zweiwöchiger Lagerung bei 50 °C auf Werte von 251 ± 37 nm erhöht. Mbela et al. [1998] zeigten ebenfalls, dass eine bestimmte Konzentration des Phosphatidylcholin an der enorm großen O/W-Grenzfläche von Nanoemulsionen notwendig war, um diese maximal zu besetzen und dadurch zu stabilisieren.

Die Lipoid E-80[®]- und Lipoid E-100[®]-haltigen PPNSC zeigten gute physikalische Stabilitäten, die auf die hohen Zetapotenziale von jeweils 49 ± 1 mV und 46 ± 2 mV zurückzuführen waren. Diese positive Aufladung der Öltröpfchenoberfläche über +30 mV, die durch protonierte Phytosphingosin-Moleküle verursacht wurde, unterstützte aufgrund elektrostatischer Abstoßung die physikalische Stabilität (siehe Abschnitt 3.1.2.4 und 3.1.2.5). Im Gegensatz dazu wiesen die Sojalphospholipid (L- α -Phosphatidylcholin, Lipoid S 75[®] und Lipoid S 100[®])-stabilisierten Nanoemulsionen, deren Zetapotenzialwerte höchstens +30 mV betragen, eine schlechte physikalische Stabilität auf. Der Grund für die erniedrigten Zetapotenzialwerte bei den Sojaphospholipid-stabilisierten Nanoemulsionen war die Anwesenheit von geringen Mengen an negativ geladenen Phosphatidsäuren und Phosphatidylinositolen in Sojabohnenphospholipiden, deren Konzentration mit abnehmendem Phosphatidylcholinanteil ansteigt. Diese Komponenten bildeten entweder Komplexe mit den protonierten Aminogruppen des Phytosphingosins oder neutralisierten diese partiell an der Oberfläche der dispergierten Ölphase und verminderten dadurch die elektrostatische Stabilität der Nanoemulsionen [Mbela et al. 1998], die nach zweiwöchiger Lagerung bei 50 °C zu signifikanten Erhöhungen der Teilchengrößen führte (Abb. 3.1.2.2.1). Korner et al [1994] zeigten ebenfalls, dass Sojabohnenphospholipid-stabilisierte Nanoemulsionen aufgrund des Vorhandenseins von Phosphatidsäure und Phosphatidylinositol negative Ladungen auf der Oberfläche trugen und dass diese Bestandteile eine Schlüsselrolle bei der Bindung von Elektrolyten und gewissen kationischen Aminen übernahmen. Diese partielle Neutralisation oder Komplexierung fand bei den eiphospholipid (Lipoid E 80[®] und Lipoid E 100[®])- stabilisierten Nanoemulsionen nicht statt, da sie keine negativ geladenen Bestandteile sondern geringe Mengen an Phosphatidylethanolamin enthalten, die elektrisch neutral sind und demzufolge nicht mit den protonierten Aminogruppen des Phytosphingosins an der Oberfläche der Öltröpfchen interagierten.

Reine Eiphospholipide mit hohem Phosphatidylcholin-Anteil waren zur Stabilisierung von Nanoemulsionen schlechter geeignet als Eiphospholipide, die aus inhomogenen Gemischen mit Phosphatidylcholin-Anteilen von höchstens 80 % bestanden, denn die Stabilität der Lipoid E 100[®]-stabilisierten Nanoemulsionen war nach zweiwöchiger Lagerung bei 50 °C geringer als die der Lipoid E 80[®]-stabilisierten Nanoemulsionen (Abb. 3.1.2.2.1). Yamaguchi et al. [1995], Mbela und Verschuere[n] [1997] stellten ebenfalls fest, dass inhomogene Gemische von Eiphospholipiden zur Erhaltung der Stabilität von Emulsionen geeigneter waren als reine Phospholipide. Lipoid E 80[®] enthält Koemulgatoren wie Phosphatidylethanolamin und Lysophosphatidylcholin, die zusammen mit Phosphatidylcholin als Mischemulgatorsysteme die Grenzfläche optimal besetzten und so für eine hohe physikalische Stabilität sorgten.

Beim Vergleich von dem hydrierten Lipoid E 80-3[®] und Lipoid E 80[®]-stabilisierten Nanoemulsionen wird deutlich, dass ungesättigte Fettsäuren, die nur im Lipoid E 80[®] vorhanden sind, für kleinere Tröpfchen mit hoher physikalischer Stabilität sorgten (Abb. 3.1.2.2.1). Dieses war zurückzuführen auf die stärkere Interaktion des Lipoid E 80[®] mit den Lipiden Phytosphingosin, Ceramid 3, Ceramid 3B, Palmitinsäure und Cholesterol in der Ölphase der PPNSC. Bei der thermoanalytischen Untersuchung der Lipide im Eutanol G zeigte das Thermogramm einen endothermen Übergang der Stratum corneum-Lipide bei etwa 80 °C (Abb. 3.1.2.2.2), der als Phasenübergang Gel → flüssigkristallin innerhalb der Lipide interpretiert wird [Golden et al. 1986].

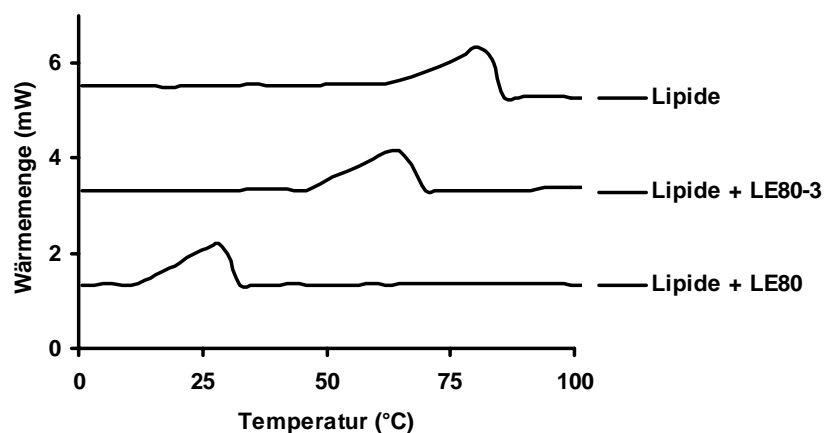


Abb. 3.1.2.2.2: DSC-Thermogramm äquimolarer Mengen der Lipide Phytosphingosin, Ceramid 3, Ceramid 3B, Palmitinsäure und Cholesterol mit Lipoid E 80-3[®] (Lipide + LE80-3) oder Lipoid E 80[®] (Lipide + LE80) im Eutanol G

Im Gelzustand kam es durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Lipiden zur Ausbildung von hochgeordneten, lamellaren Bereichen im Eutanol G, die die Beweglichkeit der einzelnen Lipide stark beeinträchtigten. Diese eingeschränkte Beweglichkeit wurde mit Hilfe der durch ESR-Spektroskopie ermittelten Rotationskorrelationszeit des spingelabelten Modelllipids Doxylpalmitinsäure (Tab 3.1.2.2.1), die in die lamellare Struktur der Lipide eingebaut wurde, verdeutlicht. Dabei war die Rotationskorrelationszeit der Doxylpalmitinsäure im Eutanol G bei 25 °C mit 0,05 ns im Vergleich zu der im lipidhaltigen Öl mit 16,41 ns signifikant vermindert. Gleichzeitig sorgte die „Oleogel“-Bildung durch die Lipide für eine Viskositätserhöhung der Ölphase von 40 ± 9 mPa·s auf 150 ± 46 mPa·s.

Tab.3.1.2.2.1 : Einfluss äquimolarer Mengen der Lipide Phytosphingosin, Ceramid 3, Ceramid 3B, Palmitinsäure und Cholesterol ohne und mit Lipoid E 80[®] (LE80) oder Lipoid E 80-3[®] (LE80-3) auf die Viskosität und die mit Hilfe der ESR-Spektroskopie ermittelte Rotationskorrelationszeit der Doxylpalmitinsäure im Eutanol G ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Ölphase	Viskosität (mPa·s)		Rotationskorrelationszeit (ns)*	
	25 °C	50 °C	25 °C	50 °C
Eutanol G	40 ± 9	10 ± 3	0,05	0,01
Eutanol G + Lipide	150 ± 46	134 ± 31	16,41	17,74
Eutanol G + Lipide + LE80	60 ± 15	20 ± 7	0,82	0,15
Eutanol G + Lipide + LE80-3	100 ± 37	91 ± 25	8,32	8,06

* alle Werte einer Temperatur unterscheiden sich signifikant voneinander (t-Test; $\alpha < 0,05$).

Diese Interaktion wurde durch die ungesättigten Fettsäuren im Lipoid E 80[®] so abgeschwächt, dass es zur Erniedrigung des endothermen Überganges von 80 °C auf 28 °C kam (Abb. 3.1.2.2.2). Somit wurde das Gelgerüst bei einer Homogenisationstemperatur von 50 °C zerstört und es bildete sich der flüssigkristalline Zustand der Lipide, der für die Abnahme der Viskosität der Ölphase von 134 ± 31 mPa·s auf 20 ± 7 mPa·s verantwortlich war (Tab. 3.1.2.2.1). Diese niedrige Viskosität sorgte nach der Homogenisation der Rohemulsion zur Nanoemulsion für Tröpfchengrößen von 207 ± 26 nm (Abb. 3.1.2.2.1). Zusätzlich gelangte das amphiphile Lipid Phytosphingosin aufgrund der erhöhten Beweglichkeit der Lipide im hohen Ausmaß an die nach

Kavitation neu entstandenen Grenzflächen der Nanoemulsion und unterstützt durch elektrostatische Abstoßung den Schutz der neu gebildeten feinen Tröpfchen vor Koaleszenz. Dagegen führte Lipoid E 80-3[®] bei einer Temperatur von 50 °C aufgrund seines geringeren Einflusses auf die Glasübergangstemperatur der Stratum-corneum-Lipide (Abb. 3.1.2.2.2) im Vergleich zu Lipoid E 80[®] zu einer viskoserer gelartigen Ölphase, die durch hoch geordnete, stark miteinander interagierende Lipide mit geringerer Beweglichkeit gekennzeichnet war (Tab. 3.1.2.2.1), aus dem sich das amphiphile Phytosphingosin nur schwer löste und die O/W-Grenzfläche besetzte. Folglich waren bei gleichem Energieeintrag aufgrund der erhöhten Viskosität die Tröpfchen bei Lipoid E 80-3[®] größer als bei Lipoid E 80[®] (Abb. 3.1.2.2.1). Zusätzlich wurde die Grenzfläche unvollständig mit Phytosphingosin-Molekülen belegt, was mangels elektrostatischer Abstoßung ($+17 \pm 2$ mV) zu einer raschen Abnahme ihrer Stabilität nach zweiwöchiger Lagerung bei 50 °C führte. Daher wurde zur optimalen Stabilisierung der Nanoemulsion das lipophile Emulgatormischung Lipoid E 80[®] eingesetzt.

Eine Zunahme der Lipoid E 80[®]-Konzentration von 0,5 % auf 2 % führte zu einer Abnahme der mittleren Tröpfchengröße von 256 ± 23 nm auf 201 ± 20 nm (Abb. 3.1.2.2.3).

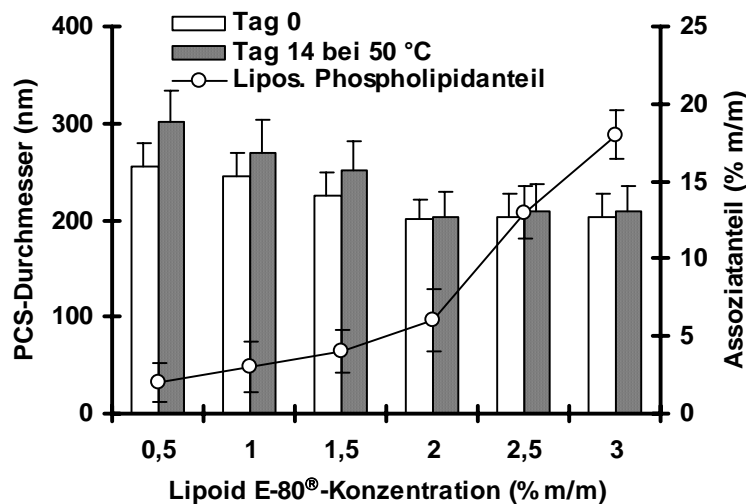


Abb. 3.1.2.2.3: Einfluss von Lipoid E-80[®] auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), die Stabilität und den nach Ultrazentrifugation ermittelten phospholipidhaltigen Assoziatanteil der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm s$; $n = 5$)

Weitere Erhöhung der Lipoid E 80[®]-Konzentration änderte die Tröpfchengröße nicht, was verdeutlichte, dass bei 2 % Lipoid E 80[®] die O/W-Grenzfläche mit dem lipophilen Emulgatormischung maximal abgesättigt war. Der Stresstest (Lagerung bei 50 °C für zwei Wochen) zeigte ebenfalls, dass mindestens 2 % Lipoid E 80[®] notwendig waren, um stabile Nanoemulsionen zu erhalten (Abb. 3.1.2.2.3).

Neben den überwiegenden Anteil an phospholipidhaltigen Nanoemulsionströpfchen befinden sich auch phospholipidhaltige Assoziate wie Mizellen oder Liposomen in den Formulierungen. Die quantitative Erfassung dieser Assoziate in den intakten Nanoemulsionen ist sehr schwierig. Um die Anwesenheit dieser Assoziate zu belegen und den Einfluss der Lipoid E 80[®]-Konzentration auf die Assoziatbildung aufzuzeigen, wurden die Nanoemulsionen einer Ultrazentrifugation unterzogen und anschließend der phospholipidhaltige Assoziatanteil in der Wasserphase ermittelt. Erwartungsgemäß nahm der Anteil an phospholipidhaltigen Assoziaten mit zunehmender Konzentration an Lipoid E 80[®] zu, denn eine Erhöhung von 0,5 % auf 3 % führte zu einem Anstieg des nach Ultrazentrifugation ermittelten Assoziatanteils in den Nanoemulsionen von $2 \pm 1,3$ % auf $18 \pm 1,6$ %.

3.1.2.3 Auswahl des hydrophilen Emulgators

Der Vergleich der sterisch stabilisierenden, hydrophilen Emulgatoren Tween 80[®] und Poloxamer 188[®] zeigte, dass sich die physikalische Stabilität der Nanoemulsionen durch beide Emulgatoren nicht signifikant veränderte (Tab. 3.1.2.3).

Tab. 3.1.2.3: Einfluss von Tween 80[®] und Poloxamer 188[®] auf die mittlere Tröpfchengröße und die Stabilität der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNSC) ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

PPNSC mit	mittlere Tröpfchengröße (nm)	
	Tag 0	Tag 14 bei 50 °C
Tween 80 [®]	203 ± 20	205 ± 26
Poloxamer 188 [®]	201 ± 27	213 ± 23

Dennoch war nach zweiwöchiger Lagerung bei 50 °C die Tröpfchengröße bei Tween 80[®]-stabilisierten Emulsionen konstanter als bei Poloxamer 188[®]-stabilisierten, weshalb Tween 80[®] als hydrophiler Emulgator eingesetzt wurde.

Eine Erhöhung der Tween 80[®]-Konzentration von 0,5 % auf 3 % sorgte für eine Abnahme der Tröpfchengröße von 348 ± 31 nm auf 202 ± 22 nm (Abb. 3.1.2.3). Auch hier waren mindestens 2 % Tween 80[®] für eine maximale Besetzung der O/W-Grenzfläche nötig, um stabile Nanoemulsionen zu erhalten. Bei weniger als 2 % Tween 80[®] waren die Nanoemulsionen instabil, welches zur Koaleszenz und Phasentrennung führte. Diese Ergebnisse zeigten auch, dass der sterische Emulgator Tween 80[®] einen größeren Einfluss auf die Stabilität hatte als Lipoid E 80[®], weil bei geringen Tween 80[®]-Konzentrationen im Vergleich zu geringen Lipoid E 80[®]-Konzentrationen die Emulsionen koaleszierten und folglich in die beiden Phasen brachen.

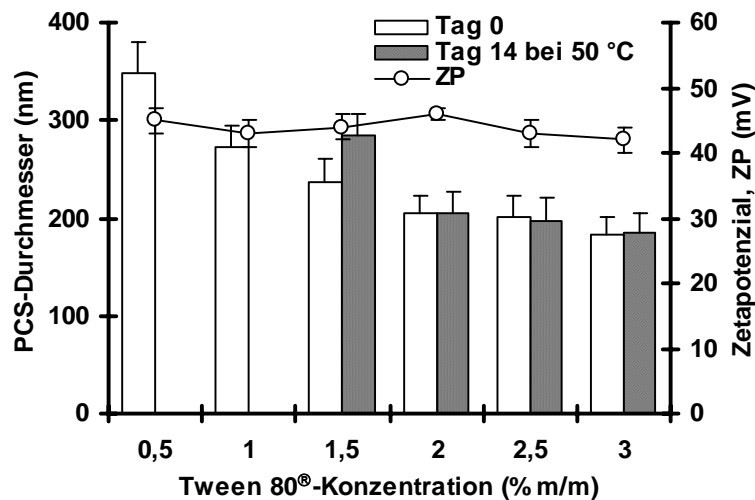


Abb. 3.1.2.3: Einfluss von Tween 80[®] auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), das Zetapotenzial und die Stabilität der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsionen; sind keine Balken abgebildet, erfolgte Phasenseparation ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

3.1.2.4 pH-Wert

Der pH-Wert der äußeren, wässrigen Phase beeinflusste die Stabilität und die Oberflächenladung, die durch Zetapotenzialmessungen bestimmt wurde (Abb. 3.1.2.4). Die PPNSC waren nach dem

Stresstest nur stabil, wenn das Zetapotenzial nach Herstellung mindestens einen Wert von +40 mV annahm. Als der pH-Wert von 8 auf 5 gesenkt wurde, nahm das Zetapotenzial von $+13 \pm 2$ mV auf $+49 \pm 1$ mV zu, weil die Aminogruppen der an der O/W-Grenzfläche befindlichen Phytosphingosin-Moleküle vermehrt protoniert wurden. Somit führten physiologische pH-Werte der Haut von 5 und 5,5 zu maximalen Zetapotenzialwerten von jeweils $+49 \pm 1$ mV und $+47 \pm 1$ mV, die aufgrund elektrostatischer Abstoßung der positiv geladenen Öltröpfchen zur Erhaltung der hohen physikalische Stabilität der Nanoemulsionen nach thermischer Belastung beitragen.

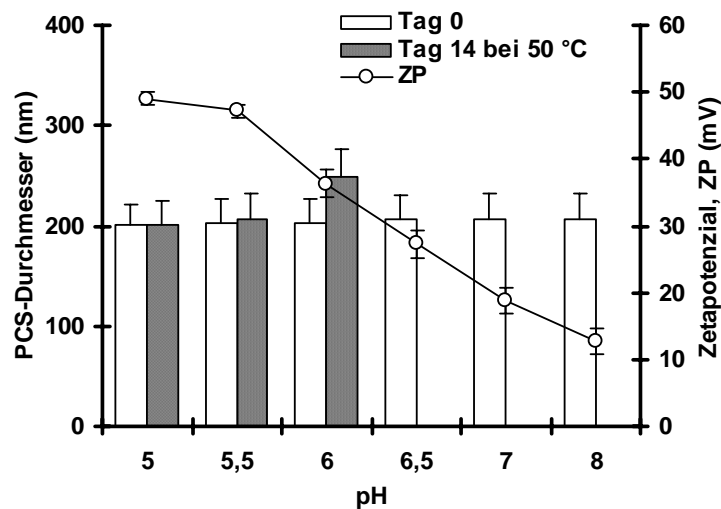


Abb. 3.1.2.4: Einfluss des pH-Wertes auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), das Zetapotenzial und die Stabilität der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen; sind keine Balken abgebildet, erfolgte Phasenseparation ($\bar{x} \pm s$; $n = 5$)

3.1.2.5 Phytosphingosin und Ceramide

Die Phytosphingosin-Konzentration beeinflusste die Oberflächenladung (Abb. 3.1.2.5.1). Denn eine Erhöhung von 0,2 % auf 0,6 % führte bei einem pH-Wert von 5,5 zu einem Anstieg des Zetapotenzials von jeweils $+13 \pm 1$ mV auf $+47 \pm 1$ mV. Dies zeigte deutlich, dass Phytosphingosin-Moleküle vermehrt die O/W-Grenzfläche besetzten und durch Protonierung ihrer Aminogruppen ($pK_b \approx 9$) die Öltröpfchen verstärkt positiv aufluden (Abb. 3.1.2.5.2). Somit unterstützte Phytosphingosin durch elektrostatische Abstoßung die Stabilität der Nanoemulsionen, die auch nach thermischer Belastung gewährleistet war.

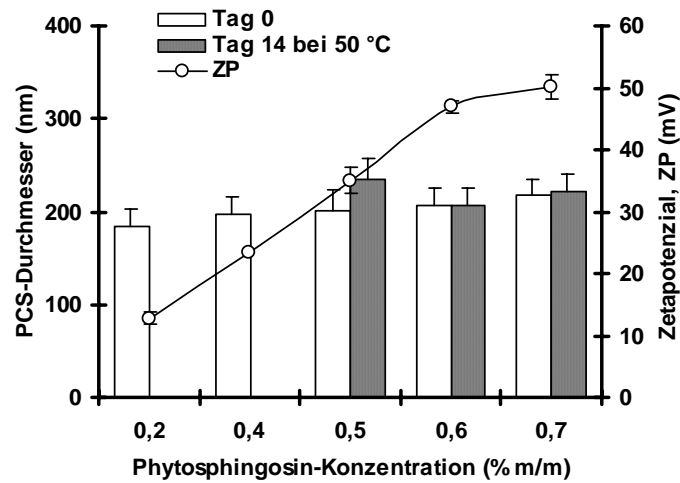


Abb. 3.1.2.5.1: Einfluss von Phytosphingosin auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), das Zetapotenzial und die Stabilität der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen; sind keine Balken abgebildet, erfolgte Phasenseparation ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

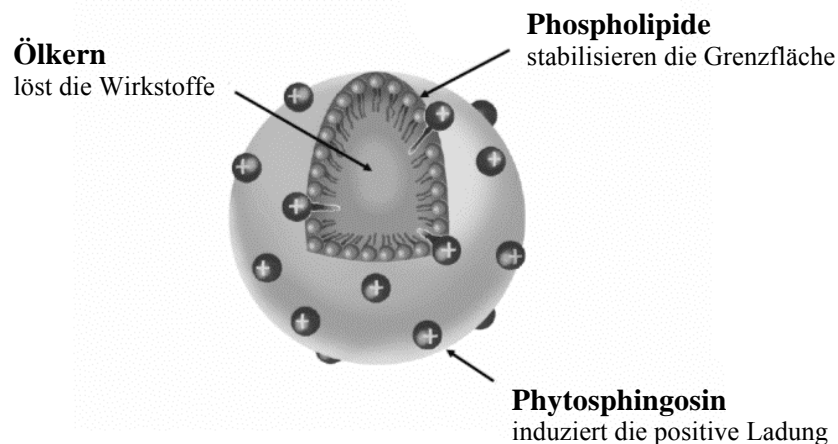


Abb. 3.1.2.5.2: Aufbau (vereinfacht) eines durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionströpfchens

Die Löslichkeit des Phytosphingosins in der Ölphase der PPNSC ohne Ceramid 3B und Stratumcorneum-Lipide beträgt ungefähr 0,6 %. Oberhalb dieser Konzentration wurden nach einwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur Kristalle detektiert (Abb. 3.1.2.5.3), die die Sättigungslöslichkeit des Phytosphingosins in dieser Ölphase verdeutlichen (Abb. 3.1.2.5.1). Die Phytosphingosin-Moleküle fielen im Eutanol G ährenförmig angeordnet aus. Dies könnte daran

liegen, dass die hydrophilen Köpfe der Phytosphingosin-Moleküle im lipophilen Eutanol G so interagierten, dass diese assoziiert ausfielen.



Abb. 3.1.2.5.3. Mikroskopisches Bild der Ölphase der positiv geladenen Nanoemulsion mit 0,8 % Phytosphingosin und ohne die Lipide Ceramid 3, Ceramid 3B, Palmitinsäure und Cholesterol nach einwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur (20fache Vergrößerung)

Die nachfolgenden Untersuchungen fokussierten sich auf das natürlich vorkommende Lipid Ceramid 3 und das Stratum-corneum-Lipid-ähnliche Ceramid 3B, denn es konnte gezeigt werden, dass beide Ceramide nach topischer Applikation in der Lage waren, die Hautbarriere in Bezug auf Wassergehalt und Rauigkeit zu verbessern [Lambers und Roehl 1999, De Paepe 2002, Seki et al. 2003]. Ceramid 3B und die Stratum-corneum-Lipide, wie Ceramid 3, Cholesterol und Palmitinsäure, wurden in äquimolaren Mengen in die Ölphase der Nanoemulsionen eingearbeitet, da einige Studien gezeigt hatten, dass die topische Applikation von nur einem oder zwei Lipiden auf verletzte Haut die Barrierefunktion der Haut verschlechterten [Mao-Qiang et al. 1993b, 1995, Park et al. 2001b]. Dagegen führte die Applikation aller drei Lipide zusammen zu einer normalen Barrieregeneration, die für eine Abnahme des TEWL sorgte.

Zur Löslichkeitsverbesserung von Ceramid 3 und Ceramid 3B in der Ölphase der PPNSC wurde Lipoid E 80[®] verwendet, das die Löslichkeiten der Ceramide in der Ölphase der PPNSC von jeweils 0,25 % (m/m) auf ungefähr 1 % (m/m) ohne jegliche Rekristallisation erhöhte.

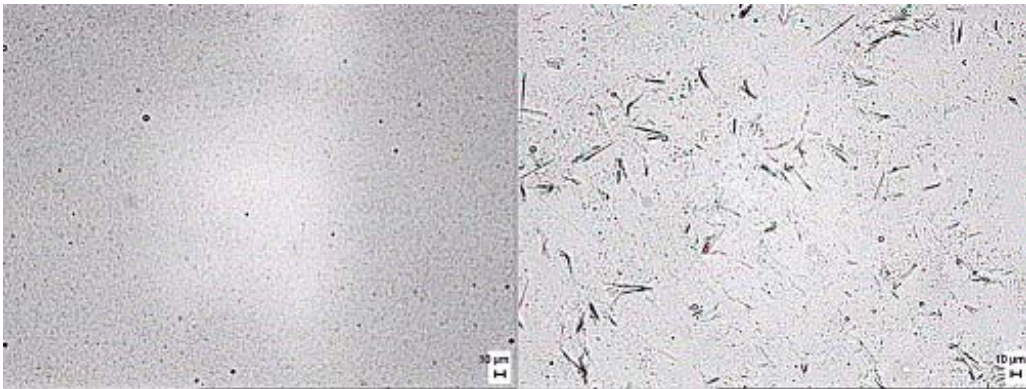


Abb. 3.1.2.5.4: Mikroskopische Bilder der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen, die jeweils 0,2 % (linke Bildhälfte) und 0,3 % (rechte Bildhälfte) Ceramid 3, Ceramid 3B, Palmitinsäure und Cholesterol enthalten und nach drei Tagen Lagerung bei Raumtemperatur aufgenommen wurden (Balken entspricht 10µm).

Dadurch konnten jeweils bis zu 0,2 % des Ceramid 3B und der Stratum-corneum-Lipide, wie Ceramid 3, Palmitinsäure und Cholesterol, in die PPNSC eingearbeitet werden, die mindestens zwei Wochen bei 50°C stabil blieben (Abb. 3.1.2.5.4 links und 3.1.2.5.5). Über 0,2 % wurden nach drei Tagen Nadeln oder feine fadenförmige Kristalle beobachtet (Abb. 3.1.2.5.4, rechts), die auf das Überschreiten der Sättigungskonzentration der Ceramide zurückzuführen waren.

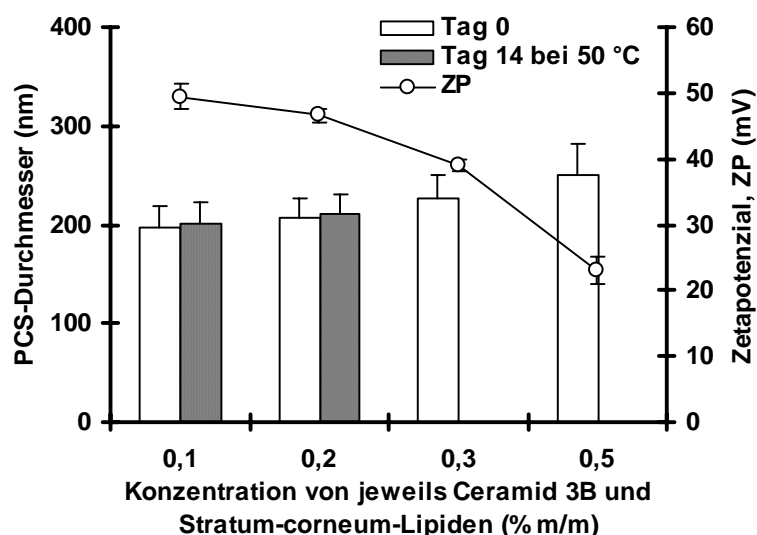


Abb. 3.1.2.5.5: Einfluss von Ceramid 3B und Stratum-corneum-Lipiden Phytosphingosin, Ceramid 3, Palmitinsäure und Cholesterol auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) und das Zetapotenzial; sind keine Balken abgebildet, erfolgte Phasenseparation ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

Zusätzlich sorgte eine Erhöhung der Lipidkonzentration von 0,1 % auf 0,5 % für eine Abnahme des Zetapotenzials von 50 ± 2 mV zu 23 ± 2 mV (Abb. 3.1.2.5.5), denn Ceramid 3B und die Stratum-corneum-Lipide, die auch amphiphile Strukturen besitzen, könnten Phytosphingosin von der O/W-Grenzfläche verstärkt verdrängen, welches die Abnahme des Zetapotenzials erklären könnte.

3.1.2.6 Langzeitstabilität

Somit wurde eine Nanoemulsion mit in der Tabelle 3.1.2.6 aufgeführten Zusammensetzung entwickelt. Der mittlere PCS-Tröpfchendurchmesser von 207 ± 19 nm, der PI-Wert von $0,100 \pm 0,013$ (in der Abbildung nicht gezeigt), der LD-Durchmesser d99 % von 308 ± 35 nm und der Zetapotenzialwert von $+47 \pm 1$ mV veränderten sich über einen Zeitraum von sechs Monaten nicht signifikant (t-Test; $\alpha < 0,05$) (Abb. 3.1.2.6). Diese Ergebnisse verdeutlichten die gute Resistenz dieser neu entwickelten ceramidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion gegen Flockung, Aufrahmung, Ostwald-Reifung, Koaleszenz und Rekristallisation.

Tab. 3.1.2.6: Zusammensetzung der optimierten lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion

Bestandteil	Konzentration (m/m %)
<i>Ölphase</i>	
Eutanol G	20
Lipoid E-80 [®]	2
Phytosphingosin	0,6
Ceramid 3	0,2
Ceramid 3B	0,2
Palmitinsäure	0,2
Cholesterol	0,2
Vitamin E	0,03
<i>Wasserphase</i>	
Tween 80 [®]	2
Glycerol	2,5
Kaliumsorbat	0,1
Wasser zu	100
PH	5,5

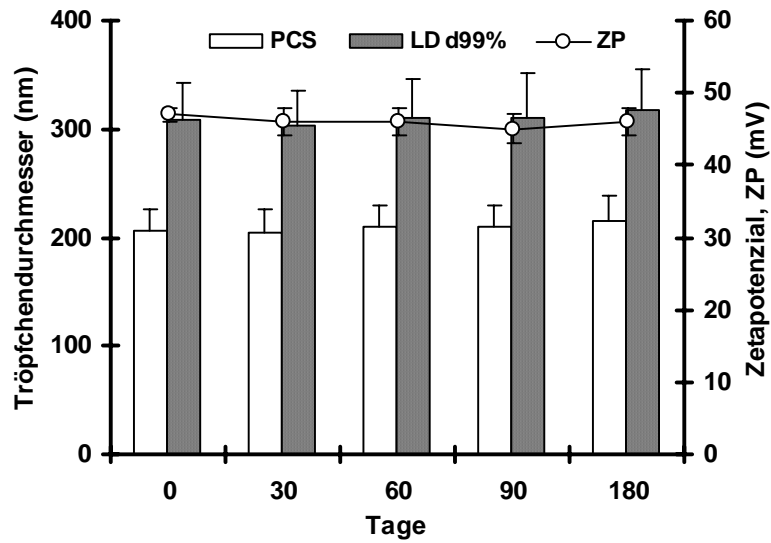


Abb. 3.1.2.6: Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie (LD d99 %) und Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) und Zetapotenziale der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen nach Lagerung über einen Zeitraum von sechs Monaten ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

3.1.3 Kryo-Elektronenmikroskopie

Um die Nanoemulsionen sichtbar zu machen, wurde ein elektronenmikroskopisches Bild aufgenommen (Abb. 3.1.3).

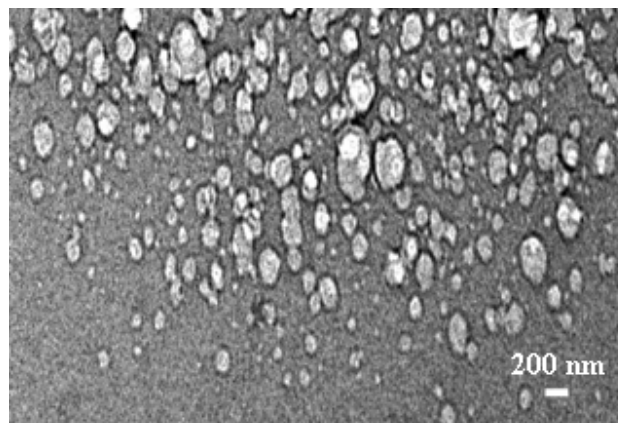


Abb. 3.1.3: Elektronenmikroskopische Struktur der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion

Hier erkennt man, dass die Tröpfchen nicht einheitlich rund, sondern eher leicht deformiert waren. Teixeira et al. [2000] zeigten ebenfalls deformierte, „Handtaschen“-ähnliche Strukturen

einer positiv geladenen Nanoemulsion. Diese Strukturen wurden wahrscheinlich durch Wechselwirkungen des Phytosphingosins mit Lipoid E 80[®] an der O/W-Grenzfläche verursacht. Es wurde gezeigt, dass die polare Phosphatidylcholinkopfgruppe des Lipoid E 80[®] sehr stark mit der positiv geladenen Stearylaminokopfgruppe in der elektrischen Doppelschicht an der O/W-Grenzfläche interagiert [Korner et al. 1994]. Diese Wechselwirkung zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Komponenten begünstigte eine molekulare Neuordnung an der Grenzfläche, die die deformierte, „Handtaschen“-ähnliche Struktur verursachte.

3.1.4 In-vivo-Hautstudie

Drei in-vivo-Hautstudien an gesunden weiblichen Probanden sollen den Einfluss von PPNSC, die in halb feste Zubereitungen, den PPNSC-Cremes, überführt werden, auf Hauteigenschaften, wie Hautfeuchtigkeit, -elastizität und -rötung aufzeigen, da bei kosmetischen Pflegeprodukten ein Wirk- und Unbedenklichkeitsnachweis verlangt wird. Da die Ceramide 3 und 3B in einigen Studien gezeigt hatten, dass sie den Wassergehalt nach Penetration in die Haut durch Verminderung des TEWL erhöhten [Lambers und Roehl 1999, De Paepe 2002, Park et al. 2001b], wurden die Hautfeuchtigkeit und die -elastizität als Parameter ausgewählt, um das Ausmaß der Penetration der Ceramide in die Haut zu verdeutlichen. Die Messungen der Hautrötung sollen Aufschluss über die Hautverträglichkeit der Formulierungen geben. In einer ex-vivo-Spreitfähigkeitsuntersuchung wird schließlich der Einfluss der physikochemischen Eigenschaften der Nanoemulsionströpfchen auf die Wechselwirkung mit der Haut aufgezeigt, die bei der Hautpenetration von Arzneistoffen entscheidend mitwirkt [Piemi et al 1999].

Diese Hauteigenschaften wurden in den vorliegenden Studien mit validierten Hautmessgeräten untersucht. In diesem Zusammenhang wurde die lipidhaltige, positiv geladene PPNSC-Creme gegen folgende Zubereitungen verglichen: 1. gegen die auf dem Markt befindliche Physiogel[®]-Creme, um den Effekt der PPNSC-Cremes auf die Hauteigenschaften einzuordnen; 2. gegen eine halb feste Zubereitung aus positiv geladener Nanoemulsion ohne Stratum-corneum-Lipide (PPN-Creme), um die Wichtigkeit der Stratum-corneum-Lipide auf die Hautfeuchtigkeit und -elastizität aufzuzeigen; 3. gegen eine halb feste Zubereitung aus negativ geladener

Nanoemulsion mit Stratum-corneum-Lipiden (MNNSC-Creme), um den Einfluss des Phytosphingosins und der Oberflächenladung auf die Penetration zu verdeutlichen.

3.1.4.1 Physikochemische Eigenschaften der Formulierungen

Die Einarbeitung von 0,3 % Carbopol 940 in die PPNSC führte zur Bildung von halbfesten Zubereitungen mit einer Viskosität von 17000 ± 2500 mPa·s, deren Teilchengröße sich mit 200 ± 38 nm gegenüber den flüssigen Nanoemulsionen nicht signifikant änderte (t-Test; $\alpha < 0,05$). Neben der hohen Viskosität unterstützte das hohe Zetapotenzial dieser Cremes ($+35 \pm 4$ mV) durch elektrostatische Abstoßung den Schutz der Öltröpfchen vor Flockung, Aggregation und schließlich vor Koaleszenz, denn die Teilchengröße änderte sich nach vierwöchiger Lagerung bei 4 °C nicht signifikant. Die Oberflächenladung der halbfesten PPNSC war jedoch kleiner als die der flüssigen PPNSC ($+47$ mV). Dies könnte an einer geringen Interaktion der positiv geladenen Öltröpfchen mit dem Gelbildner liegen, die im Folgenden erläutert wird

Tab. 3.1.4.1.1: Physikochemische Eigenschaften der Formulierungen ($\bar{x} \pm s$; n = 14)

Formulierung	PPNSC-Cremes	Physiogel [®] Cremes	PPN-Cremes	MNNSC-Cremes
Typ	Nanoemulsion	Derma-Membran-Struktur	Nanoemulsion	Nanoemulsion
Zetapotenzial (mV)	$+35 \pm 4$	-	$+38 \pm 5$	-43 ± 5
PCS-Tröpfchen-durchmesser (nm)*	200 ± 38	-	180 ± 34	187 ± 34
Gelbildner	Carbopol 940	u.a. Carbopol 940	Carbopol 940	Carbopol 940
pH-Wert	$5,0 \pm 0,2$	-	$5,3 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,2$
Viskosität (mPa·s)	17000 ± 2500	22000 ± 2800	17000 ± 1900	19000 ± 2000

* bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

PPNSC: lipidhaltige, durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsion; PPN: lipidfreie, durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsion; MNNSC: lipidhaltige, durch Myristinsäure negativ geladene Nanoemulsion

Da Carbopol 940 ein anionisches Polymer ist, ist es normalerweise mit kationischen Zusätzen nicht kompatibel. Jedoch, wenn der kationische Zusatz sterisch geschützt wird, kann die Interaktion in der Mikrostruktur des Gelbildners sehr stark vermindert werden, so dass keine Inkompatibilitäten auftreten [Vondruska 2004]. Bei den PPN- und PPNSC-Cremes wurden die an der O/W-Grenzfläche der Nanoemulsionströpfchen befindlichen, in der Ölphase gut löslichen, positiv geladenen Phytosphingosin-Moleküle durch den sterisch stabilisierenden Emulgator Tween 80[®] und den lipophilen Emulgator Lipoid E 80[®] geschützt. Über die Wasserphase schirmte Tween 80[®], das sich mit seinem lipophilen Teil in die flüssige, lipophile Phase der Nanoemulsion verankerte und mit seinem hydrophilen Teil in die Wasserphase ragte, die O/W-Grenzfläche ab. Der lipophile Emulgator Lipoid E 80[®] unterstützte mit seinem Phospholipid-Anteil, der Wasserstoffbrückenbindungen mit den positiv geladenen Phytosphingosin-Moleküle bildete, die Abschirmung der O/W-Grenzfläche [Mbela und Verschueren 1997]. Positiv geladene Stoffe können nur in die Mikrostruktur des polymeren Gelbildners Carbopol eindringen und nach elektrostatischer Anziehung durch Protonenaustausch an die deprotonierten Carbonsäure-Gruppen binden und so eine Inkompatibilität erzeugen, wenn der Abstand der Carboxylate entlang der Polymerketten für die positiv geladenen Stoffe groß genug ist und somit kein sterisches Hindernis zwischen diesen beiden entgegengesetzt geladenen Verbindungen vorhanden ist [Barreiro-Iglesias 2003]. Aufgrund der Anwesenheit des Tween 80[®] und des Lipoid E 80[®] konnten die an der Ölphase der Nanoemulsion fixierten positiv geladenen Phytosphingosin-Moleküle nicht in die Mikrogelstruktur des Gelbildners eindringen und mit dessen Carboxylat-Ionen vollständig interagieren. Vor allem das Fehlen des Tween 80[®] verursachte eine starke Veränderung der Viskosität. Direkt nach der Zugabe des Gelbildners waren die Viskositäten der PPNSC ohne Tween 80[®] erniedrigt (Tab. 3.1.4.1.2), was auf eine Interaktion der positiv geladenen Phytosphingosin-Moleküle an der O/W-Grenzfläche der Nanoemulsionströpfchen mit den wenigen, deprotonierten Carbonsäure-Gruppen des Carbopols hindeutete. Dieses führte aufgrund von Präzipitation zu einem Verlust der Gelstruktur des Carbopols und damit der streichfähigen Konsistenz, denn die Viskosität nahm von 17000 ± 2500 mPa·s auf 2200 ± 300 mPa·s rapide ab.

Tab. 3.1.4.1.2: Einfluss von Tween 80[®] auf die Viskosität und die mittlere Tröpfchengröße der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsions-Creme (PPNSC-Creme) ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

PPNSC-Creme	Viskosität (mPa·s)	mittlere Tröpfchengröße (nm)
mit Tween 80 [®]	17000 ± 2500	202 ± 21
ohne Tween 80 [®]	2200 ± 300	530 ± 63

Hinzu kam, dass zahlreiche Carbonsäure-Gruppen des Carbopols bei einer Konzentration von 0,3 % und einem pH-Wert von $5,0 \pm 0,2$ nicht dissoziiert vorlagen [Noveon Inc. 2002]. Diese Carbonsäure-Gruppen bildeten mit den in der äußeren Phase der Nanoemulsion befindlichen Glycerol und dem hydrophilen Teil (Ethylenoxid-Teil) des Tween 80[®] verstärkt Wasserstoffbrückenbindungen aus, die das Gelgerüst zusätzlich stabilisierten [Barreiro-Iglesias 2001, Noveon Inc. 2002]. Folglich waren Lipoid E 80[®] und vor allem Tween 80[®] essenziell für die Erhaltung der positiven Ladung nach Einarbeitung des Carbopols und für die physikalischen Stabilität der Cremes verantwortlich.

Die halbfesten Zubereitungen der PPN und der MNNSC (Zusammensetzung: siehe 5.2), zeigten mit jeweils $+38 \pm 5$ mV und -43 ± 5 mV ebenfalls hohe Zetapotenzialbeträge, und vergleichbare mittlere Teilchengrößen und Viskositäten wie die PPNSC-Cremes (Tab. 3.1.4.1.1). Diese Formulierungen waren ebenfalls über einen Zeitraum von vier Wochen physikalisch stabil.

Während der Studie änderten sich die Viskositäten, die Zetapotenzial-Werte und die mittleren Tröpfchengrößen der Zubereitungen nicht signifikant. Eine Stabilitätsstudie über diese vier Wochen hinaus wurde jedoch nicht durchgeführt.

3.1.4.2 Compliance und Hautverträglichkeit

Alle Cremes wurden bei Applikationsraten von über $97,2 \pm 2,0$ % regelmäßig aufgetragen (Tab. 3.1.4.2).

Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Tab. 3.1.4.2: Compliance und Hautverträglichkeit der Formulierungen

Studie	Creme- Formulierung	Creme- Verbrauch (g)	Applikationsrate ^a (%)	Hauterythem ^b (%)	
				2 Wochen- Anwendung	4 Wochen- Anwendung
1	PPNSC	9,57 ± 3,98	98,2 ± 1,3	0,7 ± 3,9	1,4 ± 4,3
	Physiogel®	10,83 ± 4,95		1,3 ± 3,5	0,4 ± 4,8
2	PPNSC	10,71 ± 1,65	97,2 ± 2,0	0,1 ± 4,2	0,7 ± 3,2
	PPN	9,10 ± 1,68		0,3 ± 4,5	0,7 ± 4,6
3	PPNSC	10,70 ± 3,82	97,4 ± 1,5	0,3 ± 2,8	0,5 ± 3,6
	MNNSC	9,88 ± 4,32		0,2 ± 3,4	0,3 ± 3,0

^a Verhältnis aus tatsächlichem Verbrauch in Tagen zur Gesamtapplikationsdauer von 28 Tagen;

^b Verhältniszahl bezogen auf Tag 0 und dem unbehandelten Kontrollfeld ($\bar{x} \pm s$; n = 14);

PPNSC: lipidhaltige, durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsion; PPN: lipidfreie, durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsion; MNNSC: lipidhaltige, durch Myristinsäure negativ geladene Nanoemulsion

Da in den drei Studien die Unterschiede in dem Verbrauch der Formulierungen für beide Unterarminnenseiten nach 28 Tagen nicht signifikant war (Wilcoxon-Test, $\alpha < 0,05$), wurde davon ausgegangen, dass die Probandinnen auf beide Unterarme vergleichbare Mengen der Zubereitungen aufgetragen hatten, was den intraindividuellen Vergleich ermöglichte. Die Erythemmessungen nach zwei und vier Wochen ergaben keine signifikanten Unterschiede zu den Basiswerten am Tag 0 und zu den unbehandelten Kontrollfeldern, was eine cremebedingte Hautrötung ausschloss. Es wurden zum Teil negative Hauterythemwerte ermittelt, die durch eine nicht visuell erfassbare Bleichung der Haut durch Ceramid 3B verursacht sein könnte, wie sie für das Ceramid 3B-strukturverwandte Ceramid 3A beschrieben wurde [Degussa Personal Care Herstellerinformation]. Die Cremes induzierten keine sichtbaren Hautirritationen. Somit konnte gefolgert werden, dass alle Zubereitungen gut vertragen wurden, und eine gute Compliance gegeben war.

3.1.4.3 Studie 1

In der ersten Studie wurden PPNSC-Cremes gegen Physiogel[®]-Cremes desselben Ceramidgehalts verglichen. Physiogel[®]-Cremes dienten dabei als Goldstandard, da die Verbesserung der Hauteigenschaften durch Erhöhung der Hautfeuchtigkeit und -elastizität bewiesen war [Derma Consult 1998]. Das Maximum an Feuchtigkeitszunahme mit $33,3 \pm 5,2$ % (PPNSC-Cremes) und $32,7 \pm 7,6$ % (Physiogel[®]-Cremes) wurde bei beiden Formulierungen nach zwei Wochen erreicht (Abb. 3.1.4.3).

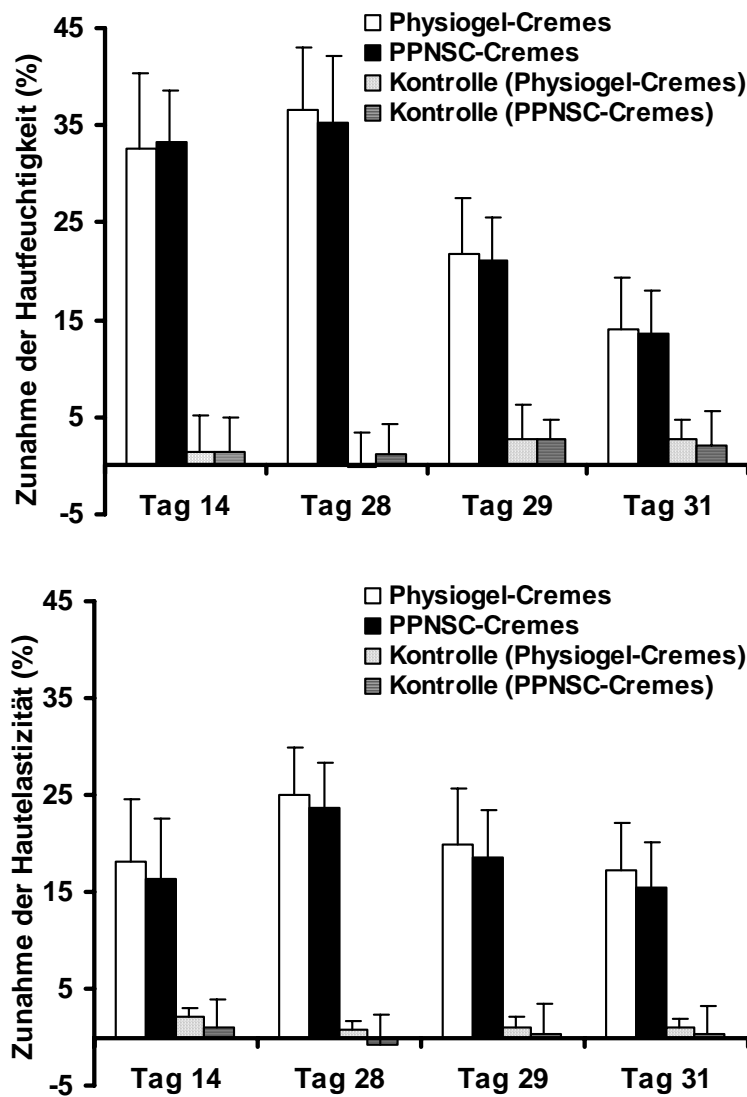


Abb. 3.1.4.3: Einfluss von Physiogel[®]- und den lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsions-Cremes (PPNSC-Cremes) auf den Anstieg der Hautfeuchtigkeit (oben) und -elastizität (unten) im Vergleich zu den Basiswerten, die am Tag 0 ermittelt wurden, und den unbehandelten Kontrollfeldern ($\bar{x} \pm s$; n = 14)

Drei Tage nach der letzten Applikation waren die Hautfeuchtigkeiten mit $13,6 \pm 4,5$ % für PPNSC-Cremes und $14,4 \pm 5,4$ % für Physiogel[®]-Cremes erhöht. Dieses verdeutlichte den persistierenden Effekt der Formulierungen auch nach Beendigung der Anwendung. Die Zunahme der Hautelastizität über 31 Tage zeigte bei beiden Formulierungen den gleichen Verlauf. Jedoch wurde das Maximum von $23,6 \pm 4,7$ % für PPNSC-Cremes und $25,0 \pm 4,9$ % für Physiogel[®]-Cremes im Gegensatz zum Maximum der Hautfeuchtigkeit, das schon mindestens nach zwei Wochen erhalten wurde, erst nach vier Wochen erreicht.

Die Hautfeuchtigkeit wird durch den Wassergehalt der obersten Hautschichten beeinflusst. Die Elastizität dagegen wird durch Elastin- und Kollagenfasern, die in tieferen Schichten (Dermis) lokalisiert sind, beeinflusst. Deren Einfluss erfolgt erst nach Zunahme des Gehaltes an Wasser in der Haut, das nach Erreichen der Dermis die Konformation der Elastin- und Kollagenfasern dermaßen verändert, dass es zu einer Beeinflussung bzw. Erhöhung der Hautelastizität kommt [Cua et al. 1990]. Dies könnte die unterschiedliche Kinetik in der Zunahme der Hautfeuchtigkeit und –elastizität erklären.

Die PPNSC- und Physiogel[®]-Cremes zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Werten der Feuchtigkeits- und Elastizitätsmessungen. Somit konnte von vergleichbaren Wirkungen auf Hautfeuchtigkeit und –elastizität ausgegangen werden, was die hervorragende Wirksamkeit der PPNSC-Cremes auf Hauteigenschaften aufzeigte.

Topisch applizierte optimierte Stratum-corneum-Lipidmischungen dringen nicht einfach in die Barriere ein und füllen Defekte in den multilamellaren Lipidschichten des Stratum corneums auf. Vielmehr penetrieren die Lipide bis in die lebende Epidermisschichten und werden von den Keratinozyten des apikalen Stratum granulosum aufgenommen [Mao-Qiang et al. 1995]. Denn in der gestörten Barriere war die Konzentration der mRNA für die Fettsäure-Translokase, einem Protein, das die Aufnahme von freien Fettsäuren in die Zelle erleichtert, signifikant erhöht [Harris et al. 1998]. Diese aufgenommenen Lipide werden dann in den Organellen des Keratinozyten prozessiert und mit Enzymen zusammen [Rassner et al. 1999] in den Keratinosomen zu Odland-Körpern verpackt. Durch Exozytose ausgeschleust können die Lipide dann die gestörte Barriere regenerieren.

3.1.4.4 Studie 2

Nach vier Wochen zeigten beide Formulierungen einen Anstieg der Hautfeuchtigkeit und -elastizität von jeweils $33,4 \pm 4,3$ % (PPNSC-Cremes), $18,9 \pm 3,6$ % (PPN-Cremes) und $19,7 \pm 2,7$ % (PPNSC-Cremes), $11,4 \pm 3,7$ % (PPN-Cremes) (Abb. 3.1.4.4). Zusätzlich konnte drei Tage nach der letzten Anwendung vergleichbar mit den Ergebnissen der ersten Studie ein verlängerter Effekt von jeweils $16,5 \pm 4,4$ % (PPNSC-Cremes), $6,3 \pm 2,7$ % (PPN-Cremes), und $16,8 \pm 3,0$ % (PPNSC-Cremes), $5,9 \pm 2,4$ % (PPN-Cremes) beobachtet werden.

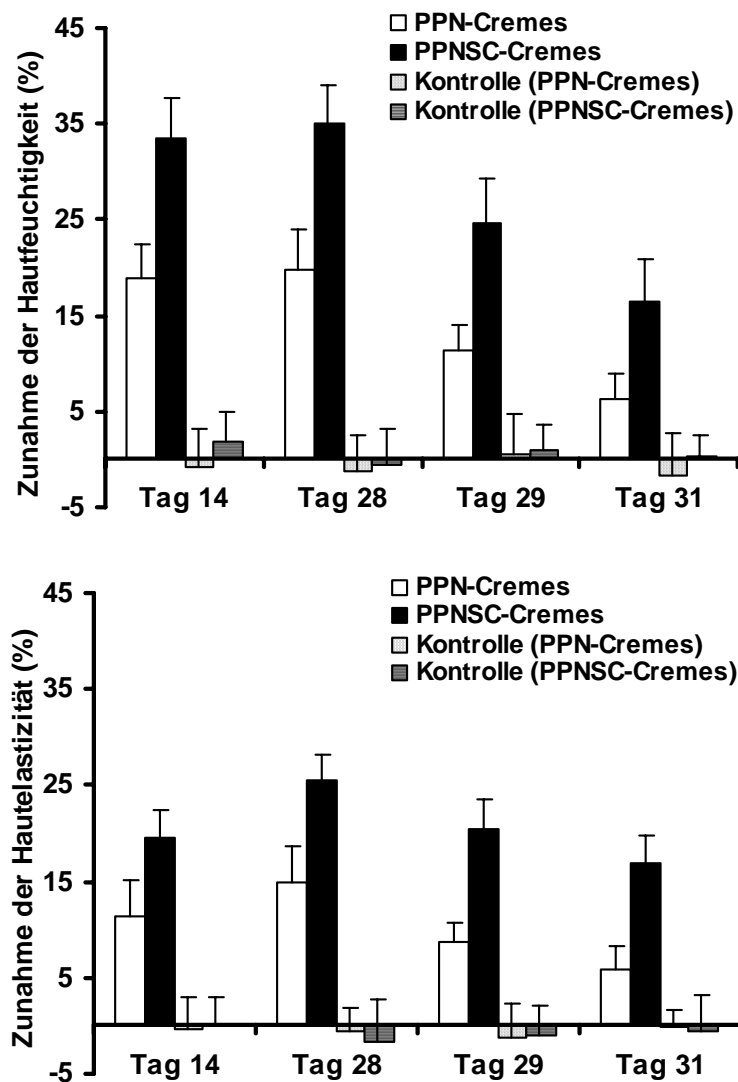


Abb. 3.1.4.4: Einfluss von lipidfreien (PPN)- und lipidhaltigen (PPNSC), durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsions-Cremes auf den Anstieg der Hautfeuchtigkeit (oben) und -elastizität (unten) im Vergleich zu den Basiswerten, die am Tag 0 ermittelt wurden, und den unbehandelten Kontrollfeldern ($\bar{x} \pm s$; n = 14)

Jedoch waren die Effekte der PPN-Cremes weniger stark ausgeprägt als die der PPNSC-Cremes. Dies demonstrierte die Wichtigkeit der Stratum-corneum-Lipide und des Ceramid 3B auf die Hauteigenschaften. Alle Werte für die PPNSC-Cremes waren signifikant höher als die der PPN-Cremes (Wilcoxon; $\alpha < 0,05$). Somit waren die Stratum-corneum-Lipide und Ceramid 3B verantwortlich für die stärker ausgeprägten Feuchtigkeits- und Elastizitätszunahmen der Haut, die durch Verbesserung der Hautbarrierefunktion verursacht wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Mao-Qiang et al. [1993b, 1996] überein, die feststellten, dass Cholesterol, Ceramide und Fettsäuren für die Hauthomöostase erforderlich sind. Aber die getrennte Applikation der drei Lipide auf gestörte Haut verhinderte die Barriereregeneration. Vielmehr mussten alle drei Lipide zusammen appliziert werden, um die Hautbarrierefunktion zu verbessern, unvollständige Lipidmischungen verzögerten die Hautbarrierehomöostase. Weitere Erhöhung der Konzentration eines Lipidbestandteils führte sogar zu einer gesteigerten Barrierereparatur [Mao-Qiang et al. 1996]. Dies war neben der besseren Löslichkeit im Vergleich zu Ceramid 3 ein wichtiger Grund für die Verwendung des Stratum-corneum-Lipid-ähnlichen Ceramid 3B in den PPNSC-Formulierungen. Dennoch hatten die „Placebo“(PPN)-Cremes einen Effekt auf die Hautfeuchtigkeit und –elastizität, die auf die Anwesenheit von Glycerol [Thau 2002] und den durch die Ölphase der Cremes induzierten Okklusionseffekt [Berardesca und Maibach 1988] zurückzuführen war.

3.1.4.5 Studie 3

Die Kinetik in der Zunahme der Hautfeuchtigkeit und der –elastizität waren mit der der ersten und zweiten Studie vergleichbar (Abb. 3.1.4.5). Auch in dieser Studie waren die Anstiege der Hautfeuchtigkeit mit $34,6 \pm 5,0$ % (PPNSC-Cremes) und $26,9 \pm 5,2$ % (MNNSC-Cremes) nach zwei Wochen und die Anstiege der Hautelastizität mit $25,4 \pm 3,1$ % (PPNSC-Cremes) und $19,0 \pm 4,5$ % (MNNSC-Cremes) nach vier Wochen maximal. Der verlängerte Effekt auf die Feuchtigkeit und die Elastizität mit jeweils Werten von $19,0 \pm 3,7$ % (PPNSC-Cremes), $11,0 \pm 3,0$ % (MNNSC-Cremes) und $16,8 \pm 4,4$ % (PPNSC-Cremes), $11,0 \pm 3,2$ % (MNNSC-Cremes) konnte ebenfalls drei Tage nach der letzten Anwendung beobachtet werden. Jedoch waren alle Werte der PPNSC-Cremes signifikant höher als die der MNNSC-Cremes (Wilcoxon-Test; $\alpha < 0,05$), was zeigte, dass das Phytosphingosin, das die positive Ladung induzierte,

entscheidend für die verbesserte Wirksamkeit auf die Hauteigenschaften war. Dieser Unterschied könnte durch eine stärkere Interaktion der durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionströpfchen in den PPNSC-Cremes mit der Hautoberfläche erklärt werden, die zu einer verstärkten Penetration der Lipide in die Haut führte.

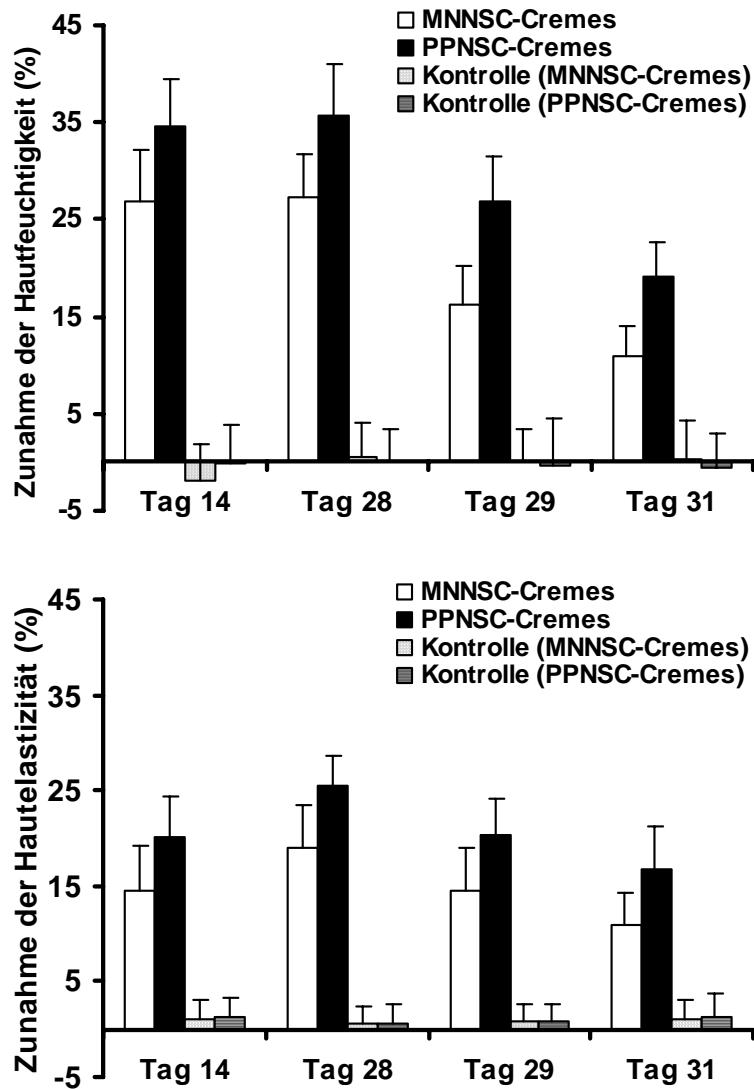


Abb. 3.1.4.5: Einfluss von lipidhaltigen, durch Myristinsäure negativ geladenen (MNNSC) und durch Phytosphingosin positiv geladenen (PPNSC) Nanoemulsions-Cremes auf den Anstieg der Hautfeuchtigkeit (oben) und -elastizität (unten) im Vergleich zu den Basiswerten, die am Tag 0 ermittelt wurden, und den unbehandelten Kontrollfeldern ($\bar{x} \pm s$; n = 14)

Diese Vermutung wurde durch eine Studie bestätigt, die zeigte, dass stearylaminhaltige, positiv geladene Nanoemulsionen wirksamer in der Hautpenetration waren als deoxycholathaltige, negativ geladene Nanoemulsionen [Piemi et al. 1999]. Positiv geladene Nanoemulsionen transportierten den Arzneistoff effektiver in die Haut und begünstigten somit die Penetration des Arzneistoffes durch die Haut. Der Grad der Hautaffinität ist bei positiv geladenen Tröpfchen wahrscheinlich wichtiger als bei negativ geladenen, denn es ist bekannt, dass die Haut bei physiologischem pH negativ geladen ist. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse von Conrads und Zahn [1987] aufgestellt, die herausfanden, dass die Bindung des anionischen Emulgators Natriumsulfat an menschliches Stratum corneum bei einem pH-Wert von zwei maximal war und dieses Phänomen mit steigendem pH-Wert abnahm. Es wurde daraus abgeleitet, dass das Stratum corneum bei niedrigem pH-Wert positiv geladen ist und bei hohem, z.B. physiologischem pH-Wert nach Überschreiten des isoelektrischen Punktes von Keratin, dem wichtigsten Bestandteil des Stratum corneums, eine negative Ladung annimmt. Diese Vermutung wurde durch zahlreiche Arbeiten bestätigt [Burnette und Ongpipattanakul 1987, Marro et al. 2001, Raiman et al. 2003,], die zeigten, dass positiv geladene Stoffe via Iontophorese besser durch die Haut transportiert werden konnten als negativ geladene.

Um diese verstärkte Interaktion in dieser Studie zu belegen, wurden ex-vivo-Spreitfähigkeitsuntersuchungen mit den lipidfreien, positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen durchgeführt. Die Spreitfähigkeit kann als Maß für die Adhäsion bzw. Anziehung zwischen den Formulierungen und der Haut und somit als Maß für die Wechselwirkungen der Formulierungen mit der Haut herangezogen werden. Die Oberflächenspannungen und die Viskositäten der positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-test; $\alpha < 0,05$) (Tab. 3.1.4.5). Jedoch waren ihre Spreitfähigkeiten auf der Haut aufgrund verschiedener Spreitungskoeffizienten unterschiedlich. Der Grund lag in den unterschiedlichen Kontaktwinkeln der Formulierungen mit der Haut, denn diese lagen bei $40,3 \pm 5,1^\circ$ für die positiv geladene und $55,9 \pm 6,8^\circ$ für die negativ geladene Nanoemulsion. Nach Einsetzen in die Young-Dupré Gleichung erhielt man Werte von $-7,3 \pm 1,7$ mN/m (positiv geladene Nanoemulsion) und $-13,8 \pm 2,3$ mN/m (negativ geladene Nanoemulsion). Jeder Wert, der näher zur Zahl null liegt, zeigt eine verbesserte Spreitfähigkeit auf der Haut, weil es bei einem Wert von null zur kompletten Spreitung auf der Oberfläche

kommt. Da der Spreitungskoeffizient der positiv geladenen Nanoemulsion dem Wert 0 näher war als der der negativ geladenen, kann gefolgert werden, dass die positiv geladenen Nanoemulsionen besser auf der menschlichen Haut spreiteten. Da sich außer den Ladungen die physikochemischen Eigenschaften wie Oberflächenspannung und Viskosität nicht signifikant unterschieden, kann abgeleitet werden, dass die Ursache der verbesserten Spreitung der positiv geladenen Nanoemulsionen auf der Haut in der stärkeren Interaktion der durch Phytosphingosin, positiv geladenen Nanoemulsionströpfchen mit der Haut lag, die zu einer verbesserten Spreitung auf der Hautoberfläche und aufgrund der Ergebnisse der dritten Studie zu einer verbesserten Penetration der Stratum-corneum-Lipide und Ceramid 3B in die Haut führte.

Tab. 3.1.4.5. Untersuchungen der physikochemischen Eigenschaften und der Spreitfähigkeit von positiv (PPN) und negativ (MNN) geladenen Nanoemulsionen auf exzidiierter Humanhautoberfläche ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

Eigenschaft	PPN	MNN
Zetapotenzial (mV)	+46 ± 3	-44 ± 2
Viskosität (mPa·s)	1,011 ± 0,042	0,984 ± 0,050
Oberflächenspannung (mN/m)	30,9 ± 0,6	31,3 ± 0,9
Kontaktwinkel (°)	40,3 ± 5,1	55,9 ± 6,8
Spreitungskoeffizient (mN/m)	-7,3 ± 1,7	-13,8 ± 2,3

Vergleichbare Ergebnisse wurden von Benita et al. [1999] erhalten, die die Augenkornea von Kaninchen als Barriere für die ophthalmisch applizierten Formulierungen nutzten. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die positive Ladung der Nanoemulsionen aufgrund der verstärkten Interaktion mit der Kornea die Spreitung verbesserte und die Verweildauer des Arzneistoffes erhöhte, so dass der Arzneistoff effizienter in das Auge transportiert werden konnte. Zulli und Suter [1996] zeigten, dass positiv geladene Nanopartikel effektiver an Haaren, die aufgrund der Kollagenfasern eine negative Ladung nach außen tragen, anhefteten als negativ geladene und somit das Auswaschen von Arzneistoffen aus den Haaren reduzierten.

Trotz des vorhandenen anionischen Carbopols in den Nanoemulsions-Cremes entfalteten die positiv geladenen Nanoemulsionströpfchen eine starke Wechselwirkung mit der Haut. Einerseits

lag es daran, dass zahlreiche Carbonsäure-Gruppen des Carbopols bei einer Konzentration von 0,3 % und einem pH-Wert von $5,0 \pm 0,2$ nicht dissoziiert vorlagen [Noveon Inc. 2002] und adnererseits zeigten Vondruska et al. [2004], dass positiv geladene Stoffe, auch wenn sie mit negativ geladenen Verbindungen komplexiert werden, ihre Eigenschaft der verstärkten Interaktion mit der Haut bzw. den Haaren nicht verlieren, sobald sie sterisch geschützt werden.

3.1.5 Zusammenfassung zur kosmetischen Anwendung von Nanoemulsionen

Ein großes Problem bei der Entwicklung von Nanoemulsionen ist die physikalische Stabilität. Zur Verbesserung der Stabilität wurden zunächst die Homogenisationsprozessparameter optimiert. Hierzu wurden die Homogenisationstemperatur, -druck und Homogenisationszyklenanzahl variiert. Die optimale Homogenisationstemperatur lag bei 50 °C, dagegen führen Temperaturen oberhalb des Trübungspunktes des hydrophilen Emulgators Tween 80[®] aufgrund seiner Dehydratation zur Teilchengrößenzunahme. Mangels sterischen Schutzes waren diese Nanoemulsionen nicht stabil. Unterhalb von 50 °C war die Energiezufuhr zu gering, um minimale Nanoemulsionströpfchen herzustellen. Erwartungsgemäß wurde mit zunehmender Homogenisationszyklenanzahl und Homogenisationsdruck die Tröpfchengröße verringert: maximal bei einem Druck von 500 bar und nach acht Zyklen.

Bei der Optimierung der Formulierungsparameter standen die Verbesserung der physikalischen Stabilität und der Löslichkeit der schwerlöslichen Sphingolipide Ceramid 3 und Ceramid 3B im Mittelpunkt. Eutanol G wurde als kosmetisches Öl eingesetzt, da es die Rekristallisationstemperatur der schwerlöslichen Sphingolipide im Vergleich zu den anderen kosmetischen Ölen am stärksten senkte. Diese lagen für Ceramid 3 bei $23 \pm 1^\circ\text{C}$ und für Ceramid 3B bei weniger als 20 °C. Um jegliche Rekristallisationen bei Raumtemperaturen von $20 \pm 3^\circ\text{C}$ zu verhindern, wurden dem Eutanol G natürliche Emulgatoren (Phospholipidgemische) zugegeben. Inhomogene Gemische von Eigelbphospholipiden mit Phosphatidylcholin-Anteilen von mindestens 80% sorgten dabei für stabilere Nanoemulsionen als die entsprechenden Sojabohnenphospholipide. Der Grund für die schlechte physikalische Stabilität der Sojabohnenphospholipid-haltigen Nanoemulsionen war die Anwesenheit geringer Mengen negativ geladener Phosphatidsäuren und Phosphatidylinositolen. Diese Komponenten bildeten

entweder Komplexe mit den protonierten Aminogruppen des Phytosphingosins oder neutralisierten diese partiell an der Oberfläche der dispergierten Ölphase und verminderten dadurch die elektrostatische Stabilität der Nanoemulsionen.

Ungesättigte Eigelbphospholipide wie Lipoid E 80[®] senkten bei Konzentrationen von 2 % die Rekristallisationstemperatur des Ceramid 3B und der Stratum-corneum-Lipide Ceramid 3, Palmitinsäure und Cholesterol in der Ölphase der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion auf Raumtemperatur und erhöhten die Löslichkeit der Sphingolipide Ceramid 3 und 3B von jeweils 0,25 % auf 1 %. Gleichzeitig wurde durch Lipoid E 80[®] die Beweglichkeit der Bestandteile in der Ölphase erhöht, die während der Herstellung für eine vollständige Absättigung der O/W-Grenzflächen durch Phytosphingosin sorgte und dadurch zu hohen Zetapotenzialen führte. Insgesamt zeigte der sterische Stabilisator Tween 80[®] einen größeren Einfluss auf die Stabilität als das Lipoid E 80[®], denn im Gegensatz zu Lipoid E 80[®] führte eine Reduktion der Tween 80[®]-Konzentration auf 1 % zum Brechen der Nanoemulsionen. Bei physiologischem Haut-pH-Wert von 5,5 unterstützte Phytosphingosin in Konzentrationen von 0,6 % die physikalische Stabilität der Nanoemulsionen durch die elektrostatische Aufladung der Tröpfchenoberfläche. Zusätzlich ermöglicht es durch Wechselwirkung seiner Aminoalkoholkopfgruppe mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide im Lipoid E 80[®] eine Deformierung der Tröpfchen. Die Prozess- und Formulierungsoptimierungen ergaben positiv geladene Nanoemulsionen mit mittleren Tröpfchendurchmessern von 207 ± 19 nm und Zetapotenzialen von 47 ± 1 mV, deren physikalische Stabilität für mindestens sechs Monate gewährleistet war.

In in-vivo-Hautstudien wurde der Einfluss der lipidhaltigen, positiv und negativ geladenen Nanoemulsion auf Eigenschaften wie Hautfeuchtigkeit, -elastizität und -rötung untersucht. Die Nanoemulsionen wurden in halbfeste Zubereitungen überführt und zeigten über die ganze Studie hinweg gute physikalische Stabilitäten, die unter anderem auf die hohen Zetapotenziale von über 30 mV zurückzuführen waren. Die Erythemmessungen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Tag 0 und zur Kontrolle. Somit verursachten die Zubereitungen keine Hautrötungen. Da die Cremes auch keine sichtbaren Hautirritationen induzierten, wurden sie sehr gut vertragen und mit Applikationsraten von über $97,2 \pm 2,0$ % regelmäßig aufgetragen. Bei allen

drei Studien wurde festgestellt, dass die Zubereitungen nach zwei Wochen zu maximalen Hautfeuchtigkeiten führten, während die Hautelastizitäten nach vier Wochen noch weiter zunahmen. Die lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsions-Cremes wiesen vergleichbare und damit hervorragende Wirksamkeiten auf Hautfeuchtigkeit und –elastizität auf, wie die auf dem Markt befindlichen Physiogel[®]-Cremes, die den Goldstandard darstellen. Die Stratum-corneum-Lipide und das Ceramid 3B waren für die Verbesserung der Hauteigenschaften essenziell, denn die lipidhaltigen Cremes zeigten signifikant höhere Hautfeuchtigkeits- und –elastizitätsanstiege als die lipidfreien Cremes. Vor allem kam der durch Phytosphingosin induzierten positiven Ladung eine große Bedeutung hinsichtlich der Verbesserung der Hautspreitung gegenüber den negativ geladenen Nanoemulsionen zu. Da die Viskosität und die Oberflächenspannung beider Formulierungen vergleichbar waren, konnte eine verstärkte Interaktion der positiv geladenen Nanoemulsionströpfchen mit der Hautoberfläche gefolgert werden. Diese verstärkte Interaktion führte zu einer im Vergleich zu den lipidhaltigen, durch Myristinsäure negativ geladenen Nanoemulsionen stärkeren Erhöhung der Hautfeuchtigkeit und –elastizität, die durch vermehrte Penetration der Stratum-corneum-Lipide und des Ceramid 3B verursacht wurde.

3.2 Entwicklung von Nanoemulsionen zur dermatologischen Anwendung

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Rezepturentwicklung miconazolnitrathaltiger Nanoemulsionen, wobei auf die Optimierung der physikalischen und chemischen Stabilität und der Löslichkeit des Arzneistoffes eingegangen wird. Da der Gesetzgeber verlangt, die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Zubereitungen zu prüfen, wurden diese in vitro untersucht. Das Penetrations- und Permeationsverhalten des Arzneistoffes aus der entwickelten Arzneiform wird ausführlich diskutiert.

3.2.1 Optimierung der Prozessparameter

Die durch Hochdruckhomogenisation hergestellten, miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNM), deren Zusammensetzung unter Abschnitt 5.3 angegeben ist, wurden analog zu 3.1.1.1 optimiert. Bei Temperaturen von 75 °C und 90 °C wurde der Arzneistoff erheblich abgebaut, denn nach der Herstellung wurden nur noch jeweils $88,4 \pm 4,6$ % bzw. $78,7 \pm 4,8$ % der eingearbeiteten Miconazolnitratsmenge von 0,5 % (m/m) wiedergefunden. Die optimale Temperatur lag auch in diesem Abschnitt bei 50 °C. Nach Herstellung der PPNM wurden dabei $95,7 \pm 3,5$ % der eingearbeiteten Miconazolnitrats-Menge wiedergefunden.

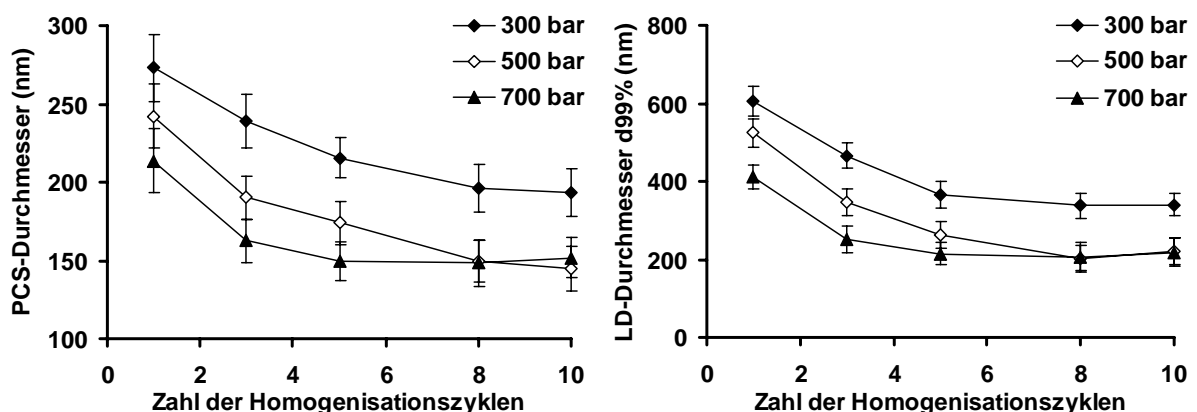


Abb. 3.2.1: Einfluss der Zahl an Homogenisationszyklen und des Homogenisationsdruckes auf die mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonkorrelationsspektroskopie, PCS (links) und der Laserdiffraktometrie, LD d99 % (rechts)) der miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

Die mittlere Tröpfchengröße der PNNM nahm mit Erhöhung der Homogenisationszyklenzahl und des -druckes analog zu den Stratum-corneum-Lipid-haltigen Systemen (siehe Abschnitt 3.1.1.2) ab. Bei 500 bar und acht Zyklen konnte die mittlere Tröpfchengröße mit 152 ± 13 nm, der LD-Durchmesser $d_{99} \%$ mit 206 ± 32 nm und der PI mit $0,096 \pm 0,019$ (nicht dargestellt) maximal vermindert werden (Abb 3.2.1.1).

3.2.2 Optimierung der Formulierungsparameter

Die Nanoemulsionen wurden im Folgenden bei 50°C, 500 bar und acht Homogenisationszyklen produziert.

3.2.2.1 Emulgatoren Lipoid E-80[®] und Tween 80[®]

In Analogie zu den in den Abschnitten 3.1.2.2 und 3.1.2.3 durchgeführten Optimierungen der Konzentrationen des lipophilen (Lipoid E 80[®]) und des hydrophilen Emulgators (Tween 80[®]) wurden jeweils Konzentrationen von 2 % als optimal bestimmt. Dabei lag der nach Ultrazentrifugation ermittelte phospholipidhaltige Assoziatanteil der Nanoemulsionen bei $4,3 \pm 1,8$ % und die Formulierungen blieben über einen Zeitraum von zwei Wochen bei 50 °C physikalisch stabil.

3.2.2.2 pH-Wert, Miconazolnitrat- und Phytosphingosin-Konzentration

Der Einfluss des pH-Wertes auf die physikalische Stabilität war gering, denn alle PPNM blieben bei pH-Werten zwischen fünf und sieben zwei Wochen lang nach Lagerung bei 50 °C stabil (Abb. 3.2.2.2.1). Die gute Stabilität war auf die hohen Zetapotenziale von über +35 mV zurückzuführen. Im Vergleich zu den PPNSC blieben die Zetapotenziale der PPNM bei pH-Werten von über sechs größer als 30 mV, welches auf die Anwesenheit des basischen Arzneistoffes Miconazolnitrat zurückzuführen war, der aufgrund seines amphiphilen Charakters ebenfalls an der O/W-Grenzfläche lokalisiert war und durch Protonierung seines Imidazol-Stickstoffes zu der positiven Aufladung der Oberfläche der Öltröpfchen beitrug.

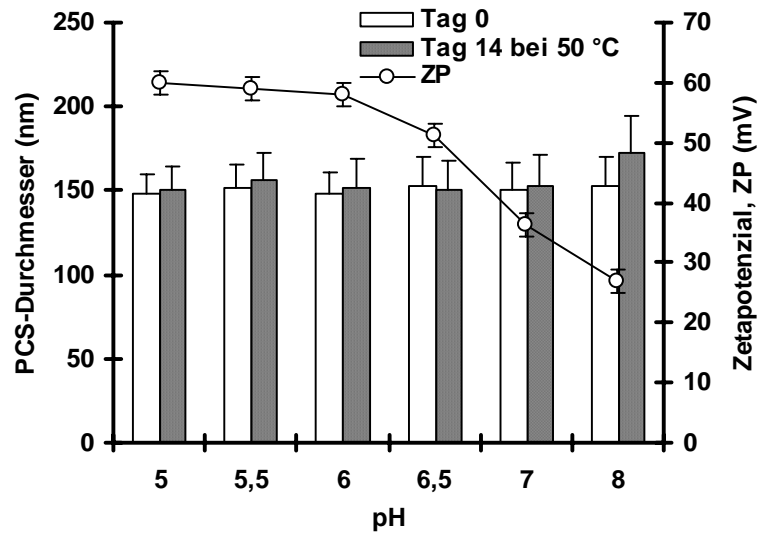


Abb. 3.2.2.2.1: Einfluss des pH-Wertes auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), das Zetapotenzial und die Stabilität der miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen; sind keine Balken abgebildet, erfolgte Phasenseparation ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

Die Erhöhung der Konzentration des Miconazolnitrats von 0,1 % auf 0,5 % sorgte für eine zusätzliche Besetzung der O/W-Grenzfläche durch Arzneistoffmoleküle, die eine Erhöhung des Zetapotenzials von 49 ± 2 mV auf 58 ± 2 mV verursachte (Abb. 3.2.2.1.2).

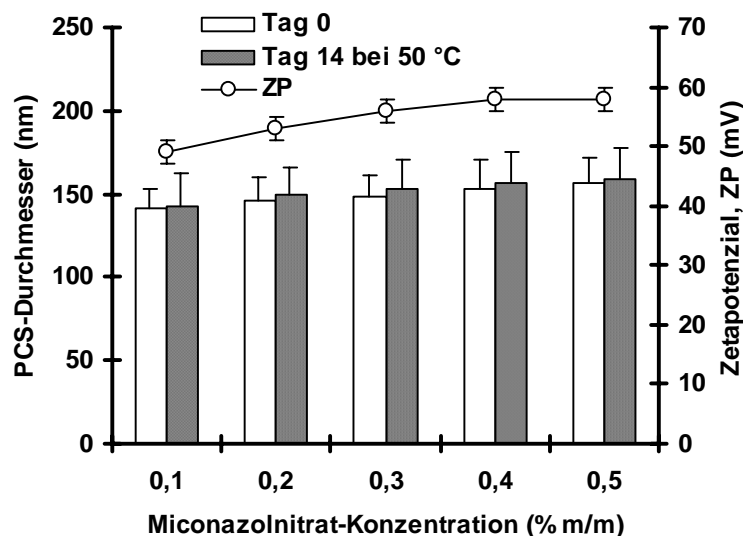


Abb. 3.2.2.2.2.: Einfluss von Miconazolnitrats auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), das Zetapotenzial und die Stabilität der miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen; sind keine Balken abgebildet, erfolgte Phasenseparation ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

Die Phytosphingosin-Konzentration hatte in den untersuchten Konzentrationsbereichen einen großen Einfluss auf die Zetapotenzial-Werte, denn eine Erhöhung der Konzentration von 0,2 % auf 0,6 % (Sättigungskonzentration) sorgte für eine Zunahme der Zetapotenzialwerte von 35 ± 2 mV auf 59 ± 2 mV und damit für stabile PNNM (Abb. 3.2.2.2.3). Der Anstieg der Tröpfchengröße von 123 ± 18 nm auf 149 ± 19 nm war auf die Erhöhung der Viskosität von 38 ± 5 mPa·s (0,2 % Phytosphingosin) auf 58 ± 9 mPa·s (0,6 % Phytosphingosin) zurückzuführen.

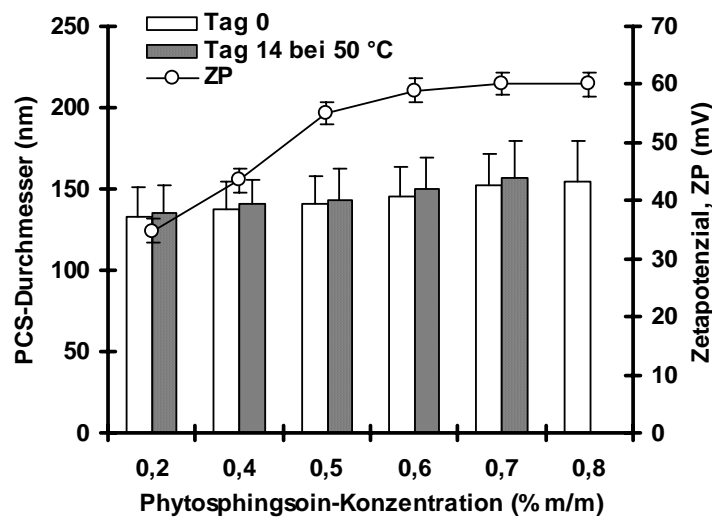
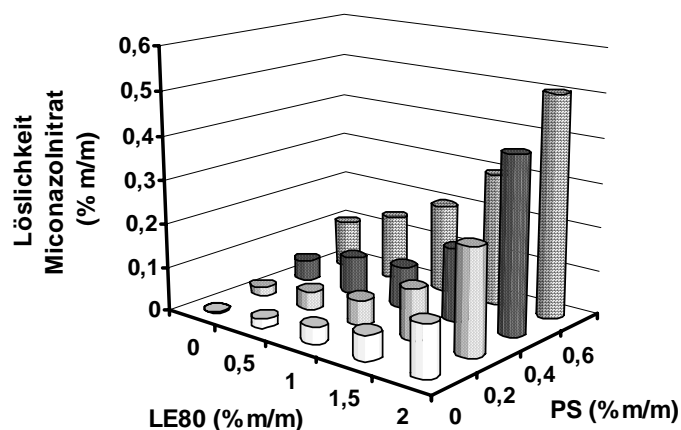


Abb. 3.2.2.2.3: Einfluss von Phytosphingosin auf den mittleren Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), das Zetapotenzial und die Stabilität der miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen; sind keine Balken abgebildet, erfolgte Phasenseparation ($\bar{x} \pm s$; n = 5)



Tab. 3.2.2.2.1: Abhängigkeit der Löslichkeit des Miconazolnitrats in der Ölphase der positiv geladenen Nanoemulsion von der Lipoid E80® (LE80)- und Phytosphingosin (PS)-Konzentration

Die Löslichkeit des Miconazolnitrats in der Ölphase der PPNM war von der Lipoid E 80[®]- und der Phytosphingosin-Konzentration abhängig. Eine Erhöhung der Lipoid E 80[®]- bzw. Phytosphingosin-Konzentration von 0 auf 2 % bzw. auf 0,6 % (Sättigungskonzentration) führte zu einem Anstieg der Löslichkeit von 0,002 % auf 0,506 % (Abb. 3.2.2.3). Die Lipoid E 80[®]-Konzentration wurde nicht weiter erhöht, da bei 2 % die Grenzfläche der hergestellten PPNM maximal mit Emulgatormolekülen besetzt war, denn eine Erhöhung von 2 % auf 2,5 % führte zu keiner signifikanten Veränderung der mittleren Tröpfchengröße von 149 ± 15 nm.

Um die Verteilung des Miconazolnitrats in den PPNM zu bestimmen, wurde der Verteilungskoeffizient $\log K$ ermittelt (siehe Abschnitt: 5.4.11). Bei einer Miconazolnitratkonzentration von 0,5 % (m/m) betrug $\log K$ $2,72 \pm 0,01$. Dies bedeutete, dass Miconazolnitrats bevorzugt in der Ölphase lokalisiert war, während der Anteil in der Wasserphase sehr gering war.

3.2.2.3 Langzeitstabilität der Nanoemulsionen und des Miconazolnitrats

Nach Optimierung der Prozess- und Formulierungsparameter wurden PPNM (Tab. 3.2.2.3.1) mit guter chemischer und physikalischer Stabilität über einen Zeitraum von sechs Monaten erhalten (Abb. 3.2.2.3 und Tab. 3.2.2.3.2).

Tab. 3.2.2.3.1: Zusammensetzung der optimierten miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion

Bestandteil	Konzentration (% m/m)	Bestandteil	Konzentration (% m/m)
<i>Ölphase</i>		<i>Wasserphase</i>	
Eutanol G	20	Tween 80 [®]	2
Lipoid E-80 [®]	2	Glycerol	2,5
Phytosphingosin	0,6	Kaliumsorbat	0,1
Miconazolnitrats	0,5	Wasser zu	100
Vitamin E	0,03	pH	5,5

Tab. 3.2.2.3.2: Chemische Stabilität der miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen über einen Zeitraum von sechs Monaten ($\bar{x} \pm s$; n = 5);

Tag	0	30	60	90	180
Miconazolnitratsmenge* (g/100g PPNM)	0,47 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,45 ± 0,04	0,44 ± 0,04	0,42 ± 0,04

* mittels HPLC bestimmt (siehe 5.4.6.2)

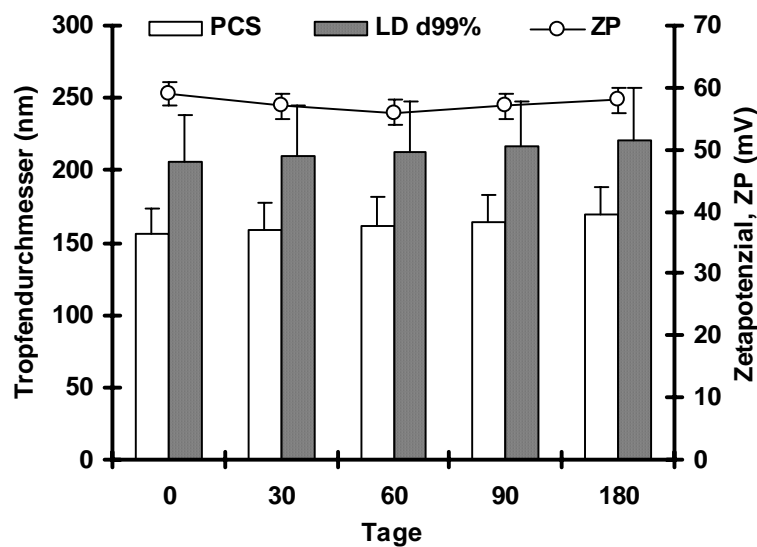


Abb. 3.2.2.3: Tropfendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS und Laserdiffraktometrie, LD d99 %) und Zetapotenzial der optimierten, miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen nach Lagerung über einen Zeitraum von sechs Monaten ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

3.2.3 In-vitro-Wirksamkeitsnachweis

Die Wirksamkeit der optimierten PPNM mit Miconazolnitrats-Konzentration von 0,001 - 0,5 % (entsprechend 10 - 5000 $\mu\text{g/g}$ PPNM) und der vergleichbaren negativ geladenen Nanoemulsionen (MNNM) wurde neben der Lipoid E 80[®]-freien PPNM und der ethanolhaltigen Lösung in vitro mit dem Agar-Diffusionstest untersucht (Zusammensetzung: siehe Tab. 5.4.8). Alle untersuchten Formulierungen bildeten Hemmhöfe gegen *Candida albicans* aus (Abb. 3.2.3), während die Prüfungen aller entsprechenden Placeboformulierungen in keinem Fall zu einem messbaren

Hemmhof führten. Erwartungsgemäß wurden die Hemmhofdurchmesser mit zunehmender Konzentration erhöht.

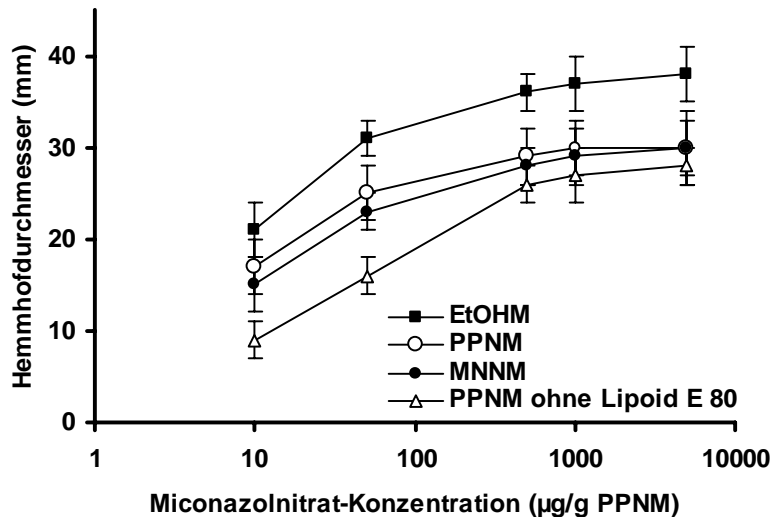


Abb. 3.2.3: Hemmhofbildung durch verschiedene Miconazolin-Zubereitungen; EtOHM: ethanolhaltige Lösung; PPNM: positiv geladene Nanoemulsion; MNNM: negativ geladene Nanoemulsion; ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

Die maximalen Hemmhofdurchmesser wurden bei Konzentrationen von 500 µg/g PPNM erhalten. Die ethanolhaltigen Lösungen zeigten bei allen Miconazolin-Konzentrationen die größten Hemmhofdurchmesser, die auf die hohen Mengen an Propylenglykol, Macrogol-Glycerolhydroxystearat und Ethanol zurückzuführen waren. Diese Bestandteile veränderten bzw. schädigten die Pilzzellwand dermaßen, dass der Arzneistoffflux in die Pilzzelle verbessert wurde. Eine Reduktion des Miconazolin-Gehaltes auf 50 µg/g bewirkte bei der PPNM ohne Lipoid E 80[®] deutlich kleinere Hemmhöfe mit Durchmessern von jeweils 16 ± 2 mm, während diese bei den PPNM und den MNNM kaum verringert war. Bei 10 µg/g bildeten die Lipoid E 80[®]-freien PPNM nur noch Hemmhöfe mit einem Durchmesser von 9 ± 2 mm. Dagegen bildeten die gleichkonzentrierten PPNM und MNNM kleine Hemmhöfe aus, deren Durchmesser mit jeweils 17 ± 3 mm und 15 ± 3 mm jedoch größer waren als die der Lipoid E 80[®]-freien PPNM. Dieses deutete auf eine verstärkte Interaktion der modifizierten Nanoemulsionströpfchen mit der Pilzzellwand hin, die den Arzneistoffflux in die Pilzzelle begünstigte.

Die Erhöhung des Arzneistoffinflux mit anschließender Hemmung der Ergosterolbiosynthese kann durch eine verstärkte Wechselwirkung der an der O/W-Grenzfläche der Nanoemulsionen lokalisierten Phospholipide mit der Pilzwand erklärt werden, analog der Interaktion zwischen Phospholipiden und der Haut [Braun-Falco et al. 1992, Blume et al. 1993, Schaller et al. 1999]. Ein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen konnte nicht beobachtet werden, da die Pilzzellwand, die hauptsächlich aus Polysacchariden wie Glucanen und Mannanen besteht, im Gegensatz zu Membranen im menschlichen Körper [Rojanasakul et al. 1992, Marro et al. 2001] keine ausgeprägte Affinität zu positiv geladenen Stoffen und Phytosphingosin besitzt.

3.2.4 In-vitro-Verträglichkeitsnachweis

Die in-vitro-Verträglichkeit der Formulierungen wurde mit Hilfe eines dermalen Irritationsmodells untersucht, bei dem es sich um ein Zwei-Kompartiment-Modell handelt (siehe 5.4.9). Im ersten Kompartiment befindet sich eine Keratin-Kollagen-Matrix, in der ein Farbstoff eingebracht ist. Das zweite Kompartiment besteht aus einer Pufferlösung, die Globuline und Glykoproteine enthält. Durch Wechselwirkungen der zu testenden Zubereitungen mit den Makromolekülen der zwei Kompartimente kommt es zu Farbstofffreisetzung und zur Trübung, die fotometrisch bestimmt und durch den OD_{450} -Wert (OD_{450} = optische Dichte gemessen bei 450 nm) angegeben wird. Über diesen Wert wird schließlich der Human Irritancy Equivalent (HIE)-Score ermittelt, der das dermale irritative Potenzial der Zubereitungen ausdrückt.

Sowohl die Placebo-Nanoemulsion als auch die phospholipidhaltigen MNNM und PPNM, deren Zusammensetzungen im Abschnitt 5.4.9 dargelegt sind, zeigten sehr flache Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 3.2.4.1). Dies bedeutet, dass das irritative Potenzial mit zunehmender Dosierung langsam anstieg, denn die OD_{450} -Werte lagen bei $20 \pm 14 - 54 \pm 18$ (Placebo-Nanoemulsion), $90 \pm 15 - 150 \pm 20$ (PPNM) und $110 \pm 18 - 170 \pm 20$ (MNNM). Dagegen war der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve der PPNM ohne Lipoid E 80[®] und vor allem der ethanolhaltigen Lösung sehr steil. Die Erhöhung der aufgetragenen Menge von 25 μ l auf 125 μ l bewirkte hier einen Anstieg der OD_{450} -Werte von 130 ± 21 auf 590 ± 22 für die ethanolhaltige Lösung und von 120 ± 21 auf 290 ± 20 für die PPNM ohne Lipoid E 80[®].

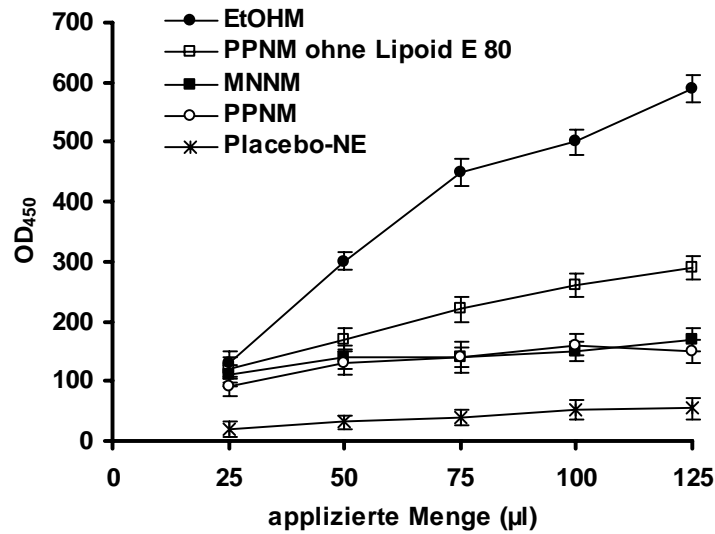


Abb. 3.2.4.1: Dosis-Wirkungs-Kurven untersuchter Miconazolnitrat-Formulierungen; EtOHM: ethanolhaltige Lösung; PPNM: positiv geladene Nanoemulsion; MNNM: negativ geladene Nanoemulsion; Placebo-NE: wirkstofffreie, nicht geladene Nanoemulsion ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

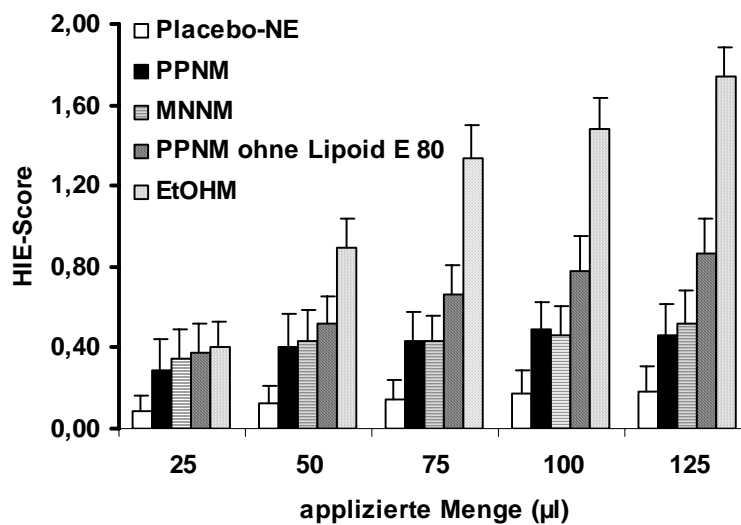


Abb. 3.2.4.2: HIE-Scores der untersuchten Miconazolnitrat-haltigen Formulierungen; Placebo-NE: wirkstofffreie, nicht geladene Nanoemulsion; PPNM: positiv geladene Nanoemulsion; MNNM: negativ geladene Nanoemulsion; EtOHM: ethanolhaltige Lösung ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

Anschließend wurden mit Hilfe einer Kalibrierfunktion die HIE-Scores der Formulierungen bestimmt (Abb. 3.2.4.2). Bis zu einem HIE-Score von 0,9 gilt eine Formulierung als nicht irritativ. Alle Werte der Placebo-Nanoemulsion und der beiden phospholipidhaltigen MNNM und

PPNM lagen unterhalb von 0,9. Bei der höchsten applizierten Menge (125 µl) waren die HIE-Scores mit $0,18 \pm 0,12$ (Placebo-Nanoemulsion), $0,46 \pm 0,15$ (PPNM) und $0,52 \pm 0,16$ (MNNM) deutlich unterhalb der Irritationsgrenze. Die PPNM ohne Lipoid E 80[®] waren ab einer applizierten 100 µl Menge mit HIE-Scores um $0,78 \pm 0,17$ als kritisch zu betrachten. Dagegen befanden sich die HIE-Scores der ethanolhaltigen Lösung bereits bei einer aufgetragenen Menge von 50 µl oberhalb von $0,9 \pm 0,14$ im Grenzbereich zwischen nicht irritativ und irritativ. Über 50 µl wurden sogar HIE-Scores von mehr als 1,2 bestimmt, was deutlich aufzeigte, dass die ethanolhaltige Lösung von Miconazolnitrat als irritativ zu bewerten war.

Bei den ethanolhaltigen Lösungen waren neben dem Miconazolnitrat die oberflächenaktiven, in hohen Konzentrationen vorliegenden Bestandteile Propylenglykol, Macrogol-Glycerolhydroxystearat und Ethanol verantwortlich für das verstärkte irritative Potenzial. Diese Bestandteile, die die Löslichkeit des Miconazolnitrats in der Lösung verbessern, wirken gleichzeitig als Penetrationenhancer und waren aufgrund der hohen eingesetzten Mengen in der Lage, mit den Proteinen und Lipiden der beiden Kompartimente des in-vitro-Modells Wechselwirkungen einzugehen. Die verstärkte Interaktion mit der Keratin-Kollagen-Matrix des ersten Kompartiments führte zur vermehrten Freisetzung des dort fixierten Farbstoffes. Nach Diffusion der Bestandteile durch diese Matrix in das zweite Kompartiment kam es zu Konformationsänderungen der dort befindlichen Makromoleküle und damit zur verstärkten Trübung, die neben dem freigesetzten Farbstoff aus dem ersten Kompartiment, gemessen wurde.

Da die Placebo-Nanoemulsion sehr geringe Irritationspotenziale aufwies, kann gefolgert werden, dass das Miconazolnitrat in den arzneistoffhaltigen Nanoemulsions-Formulierungen hauptsächlich für die Irritationen verantwortlich war.

Die phospholipidfreien PPNM-Formulierungen hatten vor allem bei höheren Konzentrationen ein geringfügig höheres Irritationspotenzial als die phospholipidhaltigen MNNM- und PPNM-Formulierungen. Zur Erklärung dieser Tatsache wurden zunächst die Verteilungskoeffizienten der Formulierungen mit 0,5 % Miconazolnitrat bestimmt. Diese waren bei der phospholipidfreien PPNM-Formulierung mit $\log K = 2,09 \pm 0,01$ kleiner als bei den phospholipidhaltigen mit $2,72 \pm 0,01$ (PPNM) und $2,47 \pm 0,01$ (MNNM). Somit lagen bei den Lipoid E 80[®]-freien PPNM

größere Mengen des Arzneistoffes in der äußeren Wasserphase gelöst vor und können dadurch verstärkt mit der porösen Keratin-Kollagen-Matrix des ersten Kompartiments und mit den Makromolekülen und den Lipiden des zweiten Kompartiments interagieren. Gleichzeitig zur Diffusion des Arzneistoffes in die Kompartimente wird neuer Arzneistoff aus den Nanoemulsionströpfchen freigesetzt, der ebenfalls für Interaktionen zur Verfügung steht. Diese Freisetzung aus den Lipoid E 80[®]-haltigen PPNM und MNNM war aufgrund der höheren Rigidity der O/W-Grenzfläche geringer ausgeprägt als aus den Lipoid E 80[®]-freien PPNM. Als Maß für die Rigidity bzw. Mikroviskosität wurde die mit Hilfe der ESR-Spektroskopie ermittelte Rotationskorrelationszeit der in die Formulierungen eingearbeiteten Doxylpalmitinsäure, die als amphiphile Verbindung die O/W-Grenzfläche besetzt, herangezogen (siehe Abschnitt 4.6.3). Bei den PPNM ohne Lipoid E 80[®] waren die Rotationskorrelationszeiten und damit die Rigiditäten signifikant kleiner als bei den Lipoid E 80[®]-haltigen MNNM und PPNM (Tab. 3.2.4.1).

Tab. 3.2.4.1: Mit der ESR-Spektroskopie ermittelte Rotationskorrelationszeiten der durch Spinlabeling markierten Doxylpalmitinsäure in den miconazolnitrathaltigen, positiv (PPNM) und negativ (MNNM) geladenen Nanoemulsionen (\bar{x} mit n = 5)

Formulierung	Rotationskorrelationszeit (ns)*
PPNM ohne Lipoid E 80 [®]	0,09
MNNM	0,82
PPNM	0,74

*Werte der PPNM-Formulierungen ohne Lipoid E 80[®] unterscheiden sich signifikant von den MNNM- und PPNM-Formulierungen (t-Test; $\alpha < 0,05$).

Zusätzlich wird eine stabilisierende Wirkung der Phospholipide auf Biomembranen diskutiert [Ghyczy und Gareiss 1994, Reineck 1998]. Demzufolge wirkte die Stabilisierung der Makromoleküle und Lipide im zweiten Kompartiment durch Phospholipide einer Konformationsänderung entgegen, wodurch das irritative Potenzial der phospholipidhaltigen PPNM und MNNM gesenkt wurde.

3.2.5 In-vitro-Freisetzung

3.2.5.1 Untersuchungen unter okklusiven Bedingungen

Die an Franz-Zellen, mit Nephrophan[®]-Membranen, okklusiv durchgeführten Freisetzungsuntersuchungen der Formulierungen (Zusammensetzung: siehe 5.4.12) zeigten bei der ethanolhaltigen Lösung eine rasche Freisetzung des sehr gut verfügbaren Miconazolnitrats (Abb. 3.2.5.1), da nach zwei Stunden $84,6 \pm 7,3$ % des Arzneistoffes freigesetzt wurden.

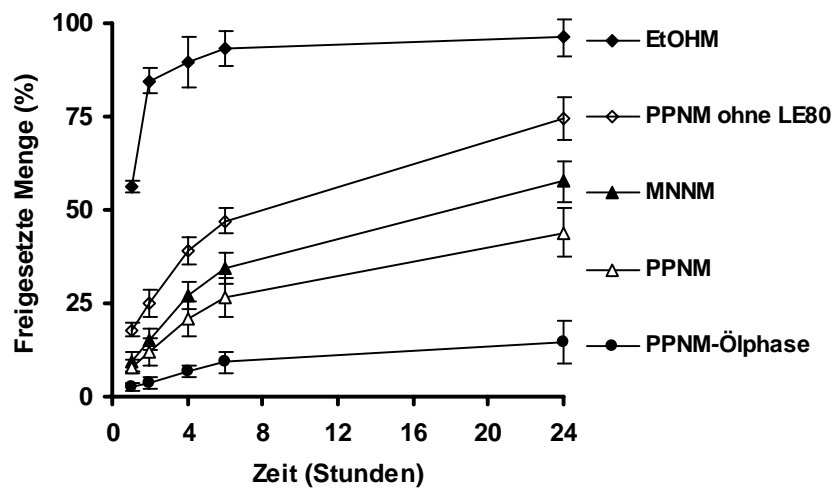


Abb. 3.2.5.1: Freisetzungsprofile des Miconazolnitrats (okklusiv) aus den Formulierungen; Arzneistoff-Konzentration: 0,5 %; EtOHM: ethanolhaltige Lösung; PPNM: positiv geladene Nanoemulsion; MNNM: negativ geladene Nanoemulsion; LE80: Lipoid E 80[®] ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Die Lipoid E 80[®]-freien PPNM wiesen eine schnellere Freisetzung auf als die Lipoid E 80[®]-haltigen MNNM und PPNM-Formulierungen. Dies war einerseits auf den niedrigeren Verteilungskoeffizienten des Miconazolnitrats in den Lipoid E 80[®]-freien PPNM im Vergleich zu den PPNM und MNNM mit Lipoid E 80[®] und andererseits auf die geringere Rigidität der O/W-Grenzfläche der Lipoid E 80[®]-freien PPNM-Tröpfchen (Tab. 3.2.4.1) zurückzuführen. Aufgrund des geringen Verteilungskoeffizienten in den Lipoid E 80[®]-freien PPNM ($\log K = 2,09 \pm 0,01$) war die Konzentration des gelösten Arzneistoffes in der äußeren Wasserphase erhöht, wodurch ein hoher Konzentrationsgradient zwischen Donor (gelöster Arzneistoff in der Wasserphase der Formulierung) und Akzeptormedium bestand. Diese hohe Konzentration in der äußeren

Wasserphase wurde zusätzlich durch die erniedrigte Rigidität der O/W-Grenzfläche begünstigt, da diese für eine rasche Diffusion des Arzneistoffes von der inneren Ölphase in die äußere Wasserphase sorgte. Der geringere Verteilungskoeffizient ($\log K = 2,47 \pm 0,01$) führte auch zu einer schnelleren Freisetzung des Arzneistoffes aus den MNNM im Vergleich zu den PPNM mit $\log K = 2,72 \pm 0,01$. Nach 24 Stunden war die Freisetzung aus den MNNM mit $57,8 \pm 5,5$ % signifikant höher als aus den PPNM mit $43,9 \pm 6,5$ %.

Die Nanoemulsionen zeigten höhere freigesetzte Mengen als die PPNM-Ölphase, da durch den hohen Lösungsdruck bzw. Laplace-Druck über den Nanoemulsionströpfchen die Löslichkeit der inneren Phase zur äußeren Phase zunimmt und sich dadurch der Arzneistoff aus den Nanoemulsionen schneller in die Wasserphase verteilte als aus den PPNM-Ölphasen. Der Arzneistoff diffundierte aufgrund der hohen Lipophilie nur sehr langsam aus der PPNM-Ölphase in das wässrige Freisetzungsmedium, denn nach 24 Stunden wurden in diesem lediglich $14,5 \pm 5,6$ % gefunden.

3.2.5.2 Untersuchungen unter nicht-okklusiven Bedingungen

Die nicht okklusive Freisetzung zeigte beim Vergleich der Formulierungen untereinander einen ähnlichen Trend wie bei der okklusiven Freisetzung (Abb. 3.2.5.2), jedoch wurden nach 24-stündiger, nicht okklusiver Freisetzung geringere Mengen an Arzneistoff freigesetzt als nach okklusiver.

Bei den ethanolhaltigen Lösungen erfolgt zunächst ein schneller Übergang des Miconazolnitrats in das Akzeptorkompartiment, da der Arzneistoff bereits in Lösung vorliegt. Mit der Zeit nahm jedoch aufgrund einer Verdampfung von Ethanol der Übergang des Arzneistoffes in das Akzeptormedium ab, da es zur Ausfällung kommt. Zusätzlich verdunstete auch Wasser. Bei den Lipoid E 80[®]-freien PPNM wurde aufgrund des kleineren Verteilungskoeffizienten initial größere Mengen freigesetzt als bei den MNNM und den Lipoid E 80[®]-haltigen PPNM. Mit der Zeit verdunstete Wasser, und es kam einerseits zur Verringerung des verfügbaren, gelösten Anteils des Arzneistoffes in der Wasserphase und andererseits zum Brechen der Nanoemulsion, das zu einer starken Verminderung des Laplace-Drucks bzw. Lösungsdrucks über den

Nanoemulsionströpfchen führte. Der Konzentrationsgradient zwischen gelöstem Arzneistoff in der Wasserphase und dem FreisetzungsmEDIUM sank und führte zu einer Verringerung der Diffusion und damit der Freisetzung im Vergleich zu den okklusiven Untersuchungen. Die nicht okklusiven Freisetzungen aus den MNNM und PPNM zeigten untereinander einen ähnlichen Trend jedoch geringere Werte als bei der okklusiven Freisetzung. Nach 24 Stunden wurden nicht okklusiv $28,75 \pm 4,4$ % (PPNM) und $37,4 \pm 5,3$ % (MNNM) im Gegensatz zu $43,9 \pm 6,5$ % (PPNM) und $57,8 \pm 5,5$ % (MNNM) freigesetzt. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass das Freisetzungverhalten aus den untersuchten Formulierungen sehr stark von der Okklusion abhängig war. Die PPNM-Ölphasen, die per se stark okkludierend sind, zeigten okklusiv wie auch nicht okklusiv vergleichbare Freisetzungverhalten.

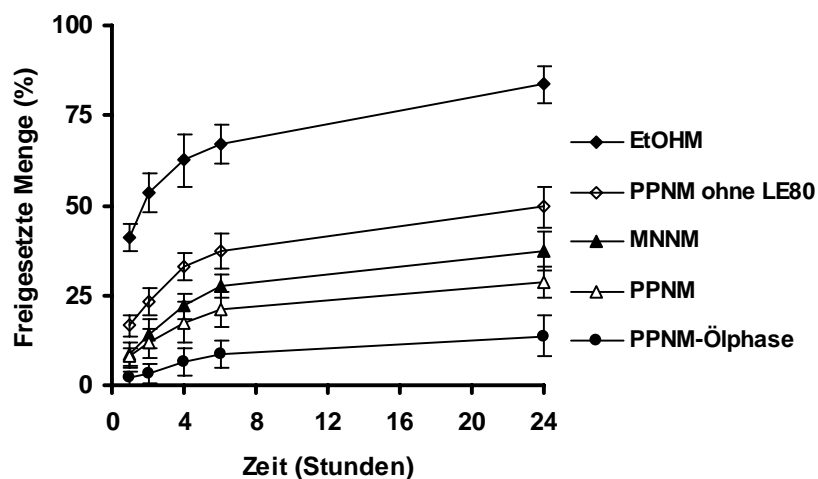


Abb. 3.2.5.2: Freisetzungsprofile des Miconazolnitrats (nicht okklusiv) aus den Formulierungen; Arzneistoff-Konzentration: 0,5 %; EtOHM: ethanolhaltige Lösung; PPNM: positiv geladene Nanoemulsion; MNNM: negativ geladene Nanoemulsion; LE80: Lipoid E 80® ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

3.2.6 Penetration und Permeation

3.2.6.1 Untersuchungen unter okklusiven Bedingungen

Diese und die nachfolgenden Untersuchungen wurden an exzidiierter Humanhaut unter Verwendung von Franz-Zellen durchgeführt (siehe 5.4.13).

Die ethanolhaltige Miconazolnitrat-Lösungen zeigten okklusiv die höchsten Permeationsraten durch die Humanhaut, die zu $411 \pm 22 \mu\text{g}$ Miconazolnitrat im Akzeptormedium führten (Abb. 3.2.6.1 und Tab. 3.2.6.1.1). Diese verstärkte Penetration wurde u.a. durch die erhöhte Löslichkeit und den Penetrationenhancer-Effekt von Ethanol verursacht. Der Mechanismus der Penetrationsverbesserung durch Ethanol beruht auf seinem Eindringen in die Lipidbereiche des Stratum corneum und einer daraus folgenden erhöhten Löslichkeit des Miconazolnitrats in dieser Region.

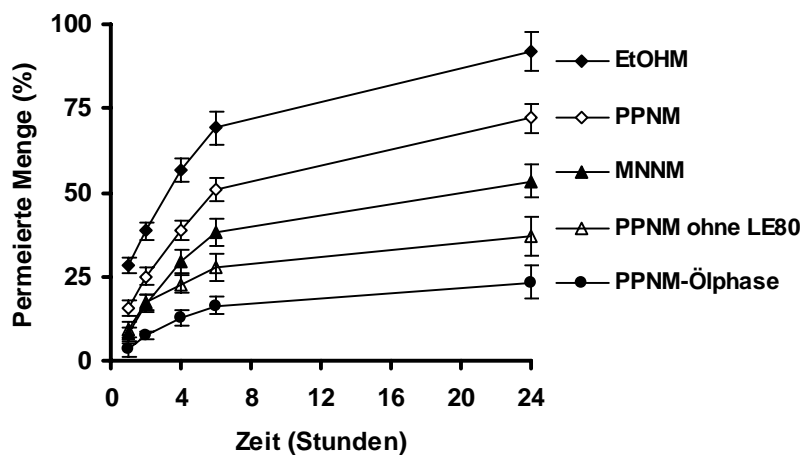


Abb. 3.2.6.1: Permeationsprofile des Miconazolnitrats (okklusiv) durch exzidierte Humanhaut unter Verwendung von ethanolhaltigen Lösungen (EtOHM), positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNM) und negativ geladenen Nanoemulsionen (MNNM); LE80: Lipoid E 80[®] ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Tab. 3.2.6.1.1: Menge an Miconazolnitrat nach 24 Stunden in den verschiedenen Kompartimenten unter Verwendung von ethanolhaltigen Lösungen (EtOHM), positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNM) und negativ geladenen Nanoemulsionen (MNNM) ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Formulierung	Menge an Miconazolnitrat (μg)			
	Hautoberfläche	Epidermis und Dermis	Akzeptor	Gesamtmenge
EtOHM	8 ± 3	9 ± 3	411 ± 22	428 ± 21
PPNM	17 ± 3	87 ± 9	314 ± 19	418 ± 20
MNNM	114 ± 19	60 ± 8	240 ± 20	414 ± 24
PPNM ohne Lipoid E 80 [®]	205 ± 20	44 ± 7	167 ± 17	416 ± 25
PPNM-Ölphase	236 ± 20	72 ± 9	105 ± 20	413 ± 24

Außerdem erhöht Ethanol durch Extraktion von Stratum-corneum-Lipiden und Proteinen die Porosität des Stratum-corneums und erleichtert somit die Diffusion des Arzneistoffes durch die Haut [Kalbitz et al. 1996]. Folglich konnte das in den ethanolhaltigen Lösungen vorhandene Wasser aufgrund der Okklusion nicht verdunsten und drang verstärkt in das durch Ethanol permeabler gewordene Stratum corneum ein. Die Okklusion und die verstärkte Penetration des Wassers sorgten für eine starke Quellung des Stratum corneums, die eine rasche Diffusion des Arzneistoffes durch die Haut in das Akzeptormedium begünstigte. Aufgrund der starken Volumenzunahme der Haut und der dadurch erhöhten Diffusion des Miconazolnitrats durch das Stratum corneum verblieben nur geringe Mengen auf der Hautoberfläche und in der Epidermis und Dermis (Tab. 3.2.6.1.1). Aufgrund der starken Veränderung des Stratum corneums mit eventueller Erhöhung des TEWL ist die Anwendung dieser ethanolhaltigen Lösung als bedenklich einzustufen (siehe auch Abschnitt 3.2.4).

Die PPNM zeigten von Beginn an höhere permeierte Arzneistoffmengen als MNNM (Abb. 3.2.6.1), denn nach einer Stunde lagen sie bei $15,2 \pm 2,3$ % (PPNM) und $7,9 \pm 2,2$ % (MNNM) und erreichten nach 24 Stunden jeweils $72,0 \pm 4,2$ % (PPNM) und $53,3 \pm 4,9$ % (MNNM). Dies könnte trotz des größeren Verteilungskoeffizienten an Phytosphingosin und der von ihm induzierten positiven Ladung liegen, die eine starke Interaktion mit der Haut verursachten und so zu einer vermehrten Einschleusung des Arzneistoffes in das Stratum corneum führten. Das an der O/W-Grenzfläche lokalisierte Phytosphingosin besaß eine hohe Affinität zu dem negativ geladenen Stratum corneum [Rojanasakul et al. 1992], die zusätzlich durch die positive Ladung verstärkt wurde [Piemi et al 1999]. Diese hohe Affinität sorgte bei PPNM für ein Verbleiben von 87 ± 9 µg Arzneistoff in der Epidermis und Dermis im Vergleich zu den MNNM, bei denen nur 60 ± 8 µg Miconazolnitrat in den oberen Schichten wiedergefunden wurden. Da jedoch die Freisetzung des Miconazolnitrats aus den PPNM-Formulierungen sehr langsam erfolgte, deuteten diese Ergebnisse auf eine epidermale Penetration von Öltröpfchen bzw. Bestandteilen von Öltröpfchen in die oberen Hautschichten hin. Diese Penetration sorgte durch Fluidisierung der oberen Hautschichten, die im Abschnitt 3.3 diskutiert wird, für eine verstärkte Diffusion des Arzneistoffes.

Lipoid E 80[®] war für die verbesserte Permeation entscheidend, denn nach 24 Stunden sorgten die Lipoid E 80[®]-freien PPNM mit $37,1 \pm 5,8$ % für eine geringere Permeation als die Lipoid E 80[®]-haltigen PPNM ($72,0 \pm 4,2$ %) und MNNM ($53,3 \pm 4,9$ %). Gleichzeitig wurden bei den PPNM und MNNM mit jeweils 87 ± 9 μg und 60 ± 8 μg größere Mengen an Arzneistoff in der Epidermis gefunden als bei den Lipoid E 80[®]-freien PPNM mit 44 ± 7 μg . Diese erhöhte Akkumulation in den oberen Hautschichten wurde neben Phytosphingosin durch Phosphatidylcholin verursacht, das eine hohe Affinität zum Stratum corneum besitzt, denn nach Ghyczy und Gareiss [1994] akkumulierten 99 % der applizierten Phosphatidylcholinmenge im Stratum corneum. Dabei wurde eine Veränderung der Mikrostruktur [Lasch und Bouwstra 1995] mit starker Fluidisierung [Blume et al. 1993] der oberen Hautschichten diskutiert, die eine erhöhte Penetration von Arzneistoffen in die Haut begünstigte. Trotz der Veränderung der Mikrostruktur und der Fluidisierung des Stratum corneums wurden Hauteigenschaften wie Hautfeuchtigkeit und Hautrauhigkeit erhöht bzw. verbessert [Ghyczy und Gareiss 1994] und zeigten somit deutlich die stabilisierenden Eigenschaften der Phospholipide auf die Hautbarriere.

Der Arzneistoff permeierte bei den Lipoid E 80[®]-freien PPNM trotz des kleineren Verteilungskoeffizienten (Abschnitt 3.2.5) weniger durch die Haut als bei den PPNM und MNNM. Zwar wurde ein hoher Konzentrationsgradient des gelösten Arzneistoffes zwischen der wässrigen Phase der Nanoemulsion und der Haut aufgebaut, doch hier war der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Diffusion in das Stratum corneum, denn die Penetration des in der Wasserphase gelösten Arzneistoffes sowie von Öltröpfchenbestandteilen in die Haut war mangels Interaktion und Fluidisierung des Stratum corneums aufgrund des Fehlens von Lipoid E 80[®] gering. Dies wurde deutlich bei der Menge an Arzneistoff, die auf der Hautoberfläche verblieb; hier wurden mit 205 ± 20 μg fast 50 % der Arzneistoffmenge wiedergefunden (Tab. 3.2.6.1.1).

Nach Applikation des Arzneistoffes via PPNM-Ölphase erfolgte die geringste Permeation. Der Arzneistoff blieb in der Formulierung und verteilte sich aufgrund der hohen Lipophilie nur sehr schwer in das Stratum corneum, denn mit 236 ± 20 μg verblieben mehr als 50 % der wiedergefundenen Arzneistoffmenge auf der Hautoberfläche (Tab. 3.2.6.1.1). Aufgrund der Anwesenheit von Lipoid E 80[®] und Phytosphingosin in der PPNM-Ölphase penetrierten dennoch

$72 \pm 9 \mu\text{g}$ Miconazolnitrat in die Epidermis, jedoch wurden im Vergleich zu den anderen Formulierungen die geringsten Mengen ($23,3 \pm 4,9 \%$) im Akzeptormedium gefunden. Diese Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass dem hydrophilen Emulgator Tween 80[®] eine große Bedeutung bei der Penetration in exzidierte Humanhaut zukam. Dieser diente wie auch Lipoid E 80[®] und Phytosphingosin als Vermittler bei der Einschleusung des Arzneistoffes in die Haut, ohne eine starke Veränderung oder sogar Schädigung des Stratum corneums hervorzurufen [Shokri et al. 2002].

Um den Einfluss der Tröpfchengröße auf das Penetrationsverhalten des Miconazolnitrats zu untersuchen, wurden die positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNM) und die entsprechenden Makroemulsionen (PPEM) verglichen.

Tab. 3.2.6.1.2: Menge an Miconazolnitrat in den verschiedenen Kompartimenten nach 24 Stunden unter Verwendung von miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNM) oder Makroemulsionen (PPEM) ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Formulierung	Menge an Miconazolnitrat (μg)			
	Hautoberfläche	Epidermis und Dermis	Akzeptor	Gesamtmenge
PPNM (d 99 % = $205 \pm 31 \text{ nm}$)	20 ± 5	91 ± 11	306 ± 20	417 ± 20
PPEM (d 99 % = $24 \pm 5 \mu\text{m}$)	147 ± 16	58 ± 10	210 ± 20	415 ± 22

Der Arzneistoff penetrierte via PPNM stärker in die Haut als über PPEM, denn in der Epidermis wurden jeweils $91 \pm 11 \mu\text{g}$ (PPNM) und $58 \pm 10 \mu\text{g}$ (PPEM) Arzneistoff wiedergefunden (Tab. 3.2.6.1.2). Diese Ergebnisse verdeutlichten die Wichtigkeit der Tröpfchengröße für die Hautpenetration von Arzneistoffen via oberflächenmodifizierten Emulsionen. Aufgrund der sehr kleinen Öltröpfchen der PPNM war einerseits der Lösungsdruck über den PPNM sehr groß und andererseits wurde die postulierte Penetration der Öltröpfchenbestandteile in die oberen Bereichen des Stratum corneums durch verstärkte Interaktion mit Phytosphingosin und der durch ihn induzierten Ladung begünstigt [Rolland et al. 1993]. Währenddessen verblieben die mikrometergroßen Emulsionstropfen der PPEM auf der Hautoberfläche. Miconazolnitrat-Moleküle verteilten sich aufgrund des geringeren Lösungsdruckes über den Tröpfchen langsamer

in die äußere Wasserphase, aus der sie in die Haut penetrierten. Daher wurden bei den PPEM mit $147 \pm 16 \mu\text{g}$ viel größere Mengen an Arzneistoff auf der Hautoberfläche wiedergefunden als bei den PPNM mit $20 \pm 5 \mu\text{g}$. Diese geringe Penetration sorgte bei den PPEM für einen im Vergleich zu den PPNM kleineren Konzentrationsgradient zwischen der Epidermis/Dermis und dem Akzeptor, wodurch die Diffusion des Arzneistoffes durch die Haut in das Akzeptormedium vermindert wurde. Folglich befanden sich nach 24 Stunden via PPNM mit $306 \pm 20 \mu\text{g}$ größere Mengen an Miconazolnitrat im Akzeptormedium als über PPEM mit $210 \pm 20 \mu\text{g}$ (PPNM). Schwarz et al. [1995] und Friedman et al. [1994] zeigten ebenfalls, dass die transdermale Freigabe und damit die pharmakodynamischen Wirkungen von Diazepam und nichtsteroidalen Antiphlogistika aus topisch applizierten Nanoemulsionen u.a. von der Tröpfchengröße abhängig waren. Sie machten die epidermale Penetration von nanometergroßen Öltröpfchen für die verbesserte Wirkung verantwortlich. Dabei wurde nach topischer Applikation von Diazepam aus phospholipidhaltigen O/W-Nanoemulsionen die durch Pentamethyltetrazol induzierten Krämpfe bei Mäusen effektiver reduziert als durch Emulsionen mit mikrometergroßen Öltröpfchen. Nichtsteroidale Antiphlogistika reduzierten nach topischer Applikation via O/W-Nanoemulsionen ebenfalls Ödeme effektiver als über Emulsionen. Verma et al. [2003] stellten fest, dass die Größe von Liposomen die dermale Penetration in die Haut beeinflusst. Dabei zeigten Liposomen mit Teilchengrößen um 200 nm im Vergleich zu denen um 1 μm verbesserte Penetration.

3.2.6.2 Untersuchungen unter nicht-okklusiven Bedingungen

Die ethanolhaltige Lösungen sorgten nach einer Stunde mit $21,2 \pm 3,2 \%$ für die höchsten permeierten Arzneistoffmengen im Vergleich zu den anderen Formulierungen (Abb. 3.2.6.2). Jedoch nahm die penetrierte Menge an Miconazolnitrat im Vergleich zu den okklusiven Untersuchungen ab. Dieses lag einerseits an dem raschen Verdampfen von Ethanol bei 32 °C Hauttemperatur und andererseits an dem später auftretenden Verdunsten von Wasser und verdeutlichte die Wichtigkeit von Enhancern für die Penetration von Arzneistoffen in die Haut. Der Verlust des Penetrationenhancers, Ethanol, verursachte eine starke Abnahme der Porosität des Stratum corneums, die in einer Verminderung der Arzneistoffdiffusion in und durch das Stratum corneum resultierte. Gleichzeitig nahm die Löslichkeit des Miconazolnitrats in der Lösung rapide ab und verringerte den verfügbaren, gelösten Anteil des Miconazolnitrats und

damit die Diffusion in und durch die Haut. Daher verblieben nach nicht okklusiver Permeation $155 \pm 17 \mu\text{g}$ Miconazolnitrat auf der Hautoberfläche im Vergleich zu $10 \pm 3 \mu\text{g}$ nach okklusiver Untersuchung (Tab. 3.2.6.2). Die Reduzierung der Diffusion durch das Stratum corneum sorgte nach 24 Stunden nicht okklusiv mit $31 \pm 8 \mu\text{g}$ für eine höhere Arzneistoffmenge in der Epidermis und Dermis im Vergleich zu $15 \pm 3 \mu\text{g}$ nach okklusiver Untersuchung.

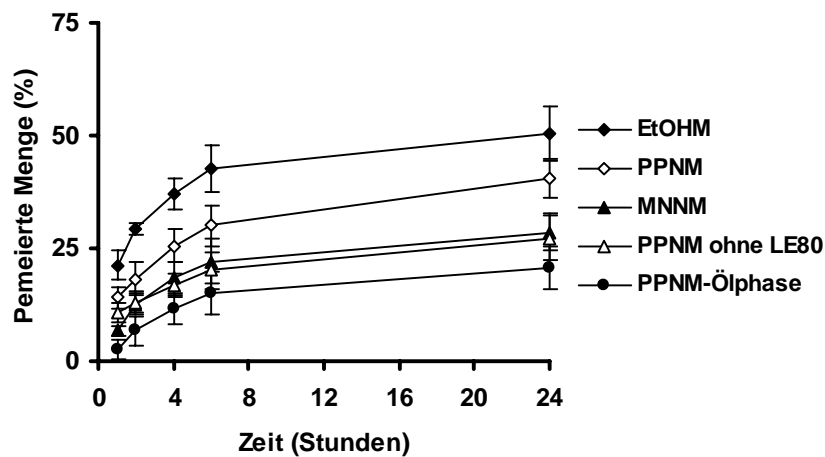


Abb. 3.2.6.2: Permeationsprofile des Miconazolnitrats (nicht okklusiv) durch exzidierte Humanhaut unter Verwendung von ethanolhaltigen Lösungen (EtOHM), positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNM) und negativ geladenen Nanoemulsionen (MNNM); LE80: Lipoid E 80[®] ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Tab. 3.2.6.2.1: Menge an Miconazolnitrat in den verschiedenen Kompartimenten nach 24 Stunden unter Verwendung von ethanolhaltigen Lösungen (EtOHM), positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNM) und negativ geladenen Nanoemulsionen (MNNM) ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Formulierung	Menge an Miconazolnitrat (μg)			
	Hautoberfläche	Epidermis und Dermis	Akzeptor	Gesamtmenge
EtOHM	155 ± 17	31 ± 8	228 ± 20	414 ± 24
PPNM	129 ± 16	101 ± 16	182 ± 22	412 ± 25
MNNM	221 ± 21	70 ± 9	129 ± 19	420 ± 23
PPNM ohne Lipoid E 80 [®]	266 ± 21	44 ± 7	105 ± 16	415 ± 24
PPNM-Ölphase	256 ± 20	72 ± 10	93 ± 17	421 ± 21

Die PPNM-Ölphase zeigte nicht okklusiv vergleichbare Ergebnisse wie okklusiv, die den ausgeprägten Okklusions-Effekt der lipophilen Ölphase deutlich machten.

Beim Vergleich der phospholipidhaltigen Formulierungen wurde nach 24 Stunden-Applikation der PPNM mit $41,4 \pm 4,2$ % höhere Mengen an Miconazolnitrat im Akzeptormedium gefunden als nach Applikation der MNNM mit $28,6 \pm 4,0$ %. Dies lag an der zu Beginn verstärkten Interaktion der Phytosphingosin-haltigen, positiv geladenen Öltröpfchen mit dem Stratum corneum und der damit verbundenen epidermalen Penetration von Öltröpfchenbestandteilen in die oberen Hautschichten, die nach einer Stunde zu einer permeierten Arzneistoffmenge von $14,1 \pm 2,3$ % (PPNM) im Gegensatz zu $6,7 \pm 1,2$ % (MNNM) führte. Jedoch nahm die permeierte Menge im Vergleich zu den okklusiven Untersuchungen mit der Zeit ab, da aufgrund von Wasserverdunstung die Nanoemulsionen brachen und der vesikuläre Charakter verloren ging. Diese Ergebnisse verdeutlichten nochmals die Bedeutung der Phospholipide für die epidermale Penetration von Arzneistoffen. Die Lipoid E 80[®]-freien PPNM induzierten nur eine schwache Einschleusung des Arzneistoffes via Öltröpfchen in die Haut, denn diese Formulierungen sorgten mit 266 ± 21 µg für eine höhere Arzneistoffmenge auf der Hautoberfläche als die Lipoid E 80[®]-haltigen PPNM mit 129 ± 16 µg.

Der Vergleich der PPNM und der PPEM zeigte nicht okklusiv einen ähnlichen Trend wie okklusiv (Tab. 3.2.6.2.2).

Tab. 3.2.6.2.2: Menge an Miconazolnitrat in den verschiedenen Kompartimenten nach 24 Stunden unter Verwendung von miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen (PPNM) oder Makroemulsionen (PPEM) ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Formulierung	Menge an Miconazolnitrat (µg)			
	Hautoberfläche	Epidermis und Dermis	Akzeptor	Gesamtmenge
PPNM (LD d 99 % = 205 ± 31 nm)	123 ± 13	101 ± 13	192 ± 20	416 ± 21
PPEM (LD d 99 % = 24 ± 5 µm)	208 ± 20	62 ± 10	151 ± 20	421 ± 23

Die Nanoemulsionen zeigten im Vergleich zu den okklusiven Untersuchungen geringere aber im Vergleich zu den Makroemulsionen dennoch höhere Mengen an Miconazolnitrat in der Epidermis/Dermis und im Akzeptormedium. Dabei permeierten via PPNM nach 24 Stunden $192 \pm 20 \mu\text{g}$ Arzneistoff in das Akzeptormedium im Vergleich zu $151 \pm 20 \mu\text{g}$ bei den PPEM. Der zu Beginn hohe Lösungsdruck über den PPNM-Tröpfchen, die verstärkte Interaktion der PPNM mit den oberen Hautschichten und die epidermale Penetration der Öltröpfchen bzw. Öltröpfchenbestandteilen in die oberen Hautschichten sorgten trotz der langsam eintretenden Wasserverdunstung zu einer verstärkten Penetration bzw. Permeation des Miconazolnitrats in und durch die Haut, die gleichzeitig dazu führten, dass bei den PPNM mit $123 \pm 13 \mu\text{g}$ signifikant weniger Arzneistoff auf der Hautoberfläche verblieb als bei den PPEM mit $208 \pm 20 \mu\text{g}$. Somit war auch nicht okklusiv neben der Anwesenheit von Lipoid E 80[®] und des Phytosphingosins an den O/W-Grenzflächen der Nanoemulsionen die Tröpfchengröße verantwortlich für die verbesserte Penetration. Die Ergebnisse verdeutlichten auch, dass der Einfluss der oberflächenmodifizierten Nanoemulsionen auf die Penetration bzw. Permeation okklusiv ausgeprägter war als nicht okklusiv. Dies könnte ein möglicher Ansatz für die Entwicklung von transdermalen Pflastern sein, die arzneistoffhaltige, durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsionen enthalten.

3.2.7 Zusammenfassung zur dermatologischen Anwendung der Nanoemulsionen

Die physikalische und chemische Stabilität der miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen wurde durch Variation der Homogenisationsprozessparameter optimiert. Dabei erwies sich, ebenso wie bei den kosmetischen Nanoemulsionen, eine Homogenisationstemperatur von 50 °C als optimal. Oberhalb dieser Temperatur ($\geq 75 \text{ °C}$) wurde einerseits Miconazolnitrat verstärkt zersetzt und andererseits nahm die Tröpfchengröße aufgrund der Dehydratation des Tween 80[®] zu. Erwartungsgemäß wurde durch Erhöhung der Homogenisationszyklenzahl und –druck die Tröpfchengröße reduziert und erreichte bei acht Zyklen und 500 bar ihr Minimum.

Die Optimierung der Formulierungsparameter ergaben für Tween 80[®] und Lipoid E 80[®] jeweils Konzentrationen von 2 %, bei denen die Nanoemulsionen nach zweiwöchiger Lagerung bei 50 °C physikalisch stabil blieben. Zusätzlich verbesserte Lipoid E 80[®] mit Hilfe des Phytosphingosins die Löslichkeit des Miconazolnitrats von 0,002 % auf 0,506 %. Die physikalische Stabilität der positiv geladenen Nanoemulsionen wurde vom pH-Wert sowie von Miconazolnitrat und Phytosphingosin beeinflusst. Bei optimalen pH-Werten von 5,5 sorgten Konzentrationserhöhungen von Miconazolnitrat und Phytosphingosin von 0,1 % auf 0,5 % bzw. von 0,2 % auf 0,6 % zu Steigerungen der Zetapotenziale von 49 ± 2 mV auf 58 ± 2 mV für Miconazolnitrat bzw. von 35 ± 2 mV auf 59 ± 2 mV für Phytosphingosin. Somit wurde gezeigt, dass sich Miconazolnitrat und vor allem Phytosphingosin in der O/W-Grenzfläche verteilen und durch Protonierung ihrer Aminogruppen die Tröpfchenoberfläche positiv aufladen. Diese hohen positiven Zetapotenziale unterstützten durch elektrostatische Abstoßung der Öltröpfchen die physikalische Stabilität der Nanoemulsionen. Die optimierten miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen zeigten eine gute physikalische und chemische Stabilität über einen Zeitraum von 180 Tagen.

Im Agar-Diffusionstest wurde die Wirksamkeit der entwickelten positiv geladenen Nanoemulsion gegen den Pilz *Candida albicans* in vitro untersucht. Dabei zeigten die Lipoid E 80[®]-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen größere Hemmhofdurchmesser als die entsprechenden Lipoid E 80[®]-freien Formulierungen. Somit konnte die Erhöhung des Arzneistoffluxes mit anschließender Hemmung der Ergosterolbiosynthese durch eine verstärkte Wechselwirkung der an der O/W-Grenzfläche der Nanoemulsionen lokalisierten Phospholipide erklärt werden. Da die Pilzzellwände hauptsächlich aus Polysacchariden bestehen und keine ausgeprägte Affinität zu den positiv geladenen Nanoemulsionen besitzen, konnte kein Unterschied in den Wirkungen der positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen nachgewiesen werden. Die entsprechenden ethanolhaltigen Lösungen zeigten anhand der Hemmhofdurchmesser die stärksten fungiziden Wirkungen. Diese dürften durch die zahlreich vorhandenen Penetrationenhancer verursacht sein, die die Pilzzellwand stark veränderten. Jedoch zeigten diese Formulierungen am dermalen Irritationsmodell die schlechteste in-vitro-Verträglichkeit. Im Gegensatz dazu wiesen die Nanoemulsionen sehr gute Verträglichkeiten auf, die unter anderem auf die Anreicherung des hauptsächlich für die Irritationen verantwortliche Miconazolnitrats in

der innere Ölphase der Nanemulsionen zurückzuführen war. Somit war die in der äußeren Wasserphase der Nanoemulsionen verfügbare Arzneistoffmenge gering und konnte nur sehr langsam in die verschiedenen Kompartimente des dermalen Irritationsmodells eindringen, um mit den dort befindlichen Makromolekülen und Lipiden unter Konformationsänderung zu interagieren. Die Phospholipide wirkten aufgrund der membranstabilisierenden Eigenschaften einer Konformationsänderung entgegen.

Die Freisetzungen aus den Nanoemulsionen wurden durch den Verteilungskoeffizienten bestimmt, wobei große Verteilungskoeffizienten langsame Arzneistofffreisetzungen bedeuten. Danach nahm die Arzneistofffreisetzung von den Lipoid E 80[®]-haltigen, positiv geladenen ($\log K = 2,72 \pm 0,01$) über die der negativ geladenen ($\log K = 2,57 \pm 0,01$) und den Lipoid E 80[®]-freien, positiv geladenen Nanoemulsionen ($\log K = 2,09 \pm 0,01$) zu. Dabei wurden unter okklusiven Bedingungen höhere Arzneistoffmengen freigesetzt als nicht okklusiv, wo es durch stetige Wasserverdunstung zum Brechen der Emulsion kam.

Die Penetrationsuntersuchungen an exzidiierter Humanhaut zeigten, dass der Arzneistoff trotz des hohen Verteilungskoeffizienten via positiv geladener Nanoemulsion stärker in die Haut penetrierte als aus der negativ geladenen Nanoemulsion. Diese verbesserte Penetration lag an der starken Interaktion der Nanoemulsionströpfchen mit der Haut, die durch Phospholipide und positiv geladene Phytosphingosine begünstigt wurde. Die Tröpfchengröße spielte ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Penetration, denn via Nanoemulsionen penetrierten höhere Arzneistoffmengen in die Haut als über die entsprechenden Emulsionen, deren Tröpfchengröße im Mikrometerbereich lagen. Dieses wurde durch den hohen Lösungsdruck über den Nanoemulsionströpfchen und/oder durch eine verstärkte epidermale Penetration von nanometergroßen Ölströpfchen bzw. Ölströpfchenbestandteilen verursacht. Analog zur Freisetzung wurden nicht okklusiv geringere penetrierte und permeierte Mengen gefunden.

3.3 Charakterisierung von Nanoemulsionen mit Hilfe der ESR

Der letzte Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Möglichkeiten der Elektronenspinresonanz (ESR) zur Charakterisierung von Nanoemulsionen. Zunächst werden die physikochemischen Eigenschaften der spinsondenhaltigen Nanoemulsionen in Bezug auf die Tröpfchengröße, das Zetapotenzial und die Stabilität untersucht. Mittels ESR-Spektroskopie wird die Verteilung der Sonden in den hydrophilen und lipophilen Phasen dieser Nanoemulsionen ausführlich diskutiert. Die ESR-Tomografie wird schließlich zur Untersuchung der zeitabhängigen Penetration der Spinsonden via Nanoemulsionen in die Haut herangezogen.

3.3.1 Physikochemische Charakterisierung der Nanoemulsionen

In diesen Untersuchungen wurden die optimierten durch Phytosphingosin positiv und durch Myristinsäure negativ geladenen Nanoemulsionen mit den Spinsonden TEMPO und TEMPOL als Reportermoleküle verwendet (siehe Tab. 5.6.3.1). Zur Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften der Nanoemulsionen wurde der PCS- und LD-Tröpfchendurchmesser, das Zetapotenzial, die Stabilität und die ESR-Signalintensität über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. (Tab. 3.3.1.1).

Tab. 3.3.1.1: Bestimmung der Tröpfchendurchmesser (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS und Laserdiffraktometrie, LD d99%), des Zetapotenzials sowie der Signalintensität der TEMPO- und TEMPOL-haltigen positiv (PPN) und negativ (MNN) geladenen Nanoemulsionen direkt nach der Herstellung (Tag 0) und nach 14-tägiger Lagerung bei Raumtemperatur von $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Formulierung	PCS-Durchmesser (nm)		LD-Durchmesser d99 % (nm)		Zetapotenzial (mV)		ESR-Signalintensität (%) [*]
	Tag 0	Tag 14	Tag 0	Tag 14	Tag 0	Tag 14	Tag 14
PPN-TEMPO	131 ± 24	134 ± 25	172 ± 31	174 ± 29	+44 ± 2	+43 ± 2	94 ± 5
PPN-TEMPOL	125 ± 22	127 ± 22	157 ± 32	160 ± 28	+49 ± 2	+48 ± 2	95 ± 4
MNN-TEMPO	132 ± 22	137 ± 20	170 ± 29	175 ± 28	-38 ± 3	-38 ± 3	93 ± 5
MNN-TEMPOL	128 ± 21	132 ± 21	160 ± 32	163 ± 31	-44 ± 2	-43 ± 2	94 ± 5

* prozentualer Intensitätsanteil des ESR-Signals am Tag 14 im Vergleich zum Tag 0

Die PCS- und die LD-Durchmesser d₉₉ % der Nanoemulsionen lagen nach 14-tägiger Lagerung zwischen 125 ± 22 nm und 137 ± 20 nm bzw. zwischen 157 ± 32 nm und 175 ± 28 nm und verdeutlichten die sehr gute Stabilität der spinsondenhaltigen positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen. Diese gute physikalische Stabilität war unter anderem zurückzuführen auf die elektrostatische Abstoßung der Nanoemulsionströpfchen, die durch Zetapotenzial-Beträge von über 30 mV verursacht wurde. Jedoch unterschieden sich die Zetapotenziale der jeweiligen TEMPOL- und TEMPO-haltigen Formulierungen geringfügig. Am Beispiel der spinsondenhaltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen soll dieser Unterschied erläutert werden. Nach Einarbeitung des lipophilen TEMPO in die Nanoemulsionen wurden nach Simulation der ESR-Spektren mit Hilfe des Simulationsprogramms PEST [Duling 1996] 94,4 % der Moleküle in der lipophilen Phase wiedergefunden. Nur ein sehr kleiner Anteil befand sich somit in der Wasserphase. (Tab. 3.3.1.2). Aufgrund seiner höheren Hydrophilie war dagegen TEMPOL vorwiegend in der äußeren Wasserphase lokalisiert und hatte keinen Einfluss auf die Oberflächenladung, da eine Erhöhung der TEMPOL-Konzentration von 0,1 % auf 0,5 % zu Zetapotenzialen von jeweils 49 ± 2 mV führte (Abb. 3.3.1.1). Diese Ergebnisse über die Verteilung der Spinsonden in den Nanoemulsionen müssen mit Vorsicht betrachtet werden, da in jedem Fall eine Spektrenüberlagerung stattfindet. Die Bestimmung der jeweiligen spektralen Anteile wird dann besonders schwierig, wenn eine der Komponenten das Spektrum weitgehend dominiert, bzw. die Spinsondenkonzentration sehr hoch ist und eine Linienverbreiterung vorliegt [Moll 2004]. Hier stieß die PEST-Auswertung an ihre Grenzen. Jedoch konnten Tendenzen der Verteilung aufgezeigt werden.

Tab. 3.3.1.2: Hyperfeinkopplungskonstanten a_N der ESR-Signale und die ermittelten Anteile der lipophilen und hydrophilen Komponenten des Gesamtspektrums von TEMPO und TEMPOL in den positiv geladenen Nanoemulsionen 24 Stunden nach der Herstellung ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Spinsonde	a_N lipophile Phase (mT)	a_N hydrophile Phase (mT)	lipophiler Anteil (%)	hydrophiler Anteil (%)
TEMPO	1,480	1,590	$94,4 \pm 5,9$	$5,6 \pm 3,1$
TEMPOL	1,450	1,570	0	100

Die Anlagerung von TEMPO-Molekülen an die O/W-Grenzfläche wurde durch die Bestimmung des Zetapotenzials mit steigender Spinsonden-Konzentration belegt. Eine Erhöhung der TEMPO-Konzentration von 0,1 % auf 0,5 % verursachte eine leichte Abnahme des Zetapotenzials von 48 ± 2 mV auf 44 ± 2 mV bei gleichbleibendem pH-Wert von $5,5 \pm 0,2$ (Abb. 3.3.1.1). Während der Herstellung belegten mit zunehmender Konzentration vermehrt lipophile TEMPO-Moleküle die O/W-Grenzfläche und gleichzeitig verminderte sich dadurch geringfügig die Besetzung dieser Grenzflächen durch Phytosphingosin-Moleküle, die für die positive Ladung verantwortlich sind. Da sich die TEMPO-Moleküle vorwiegend in der lipophilen Phase der positiv geladenen Nanoemulsionen befanden (Tab. 3.3.1.2), könnte ihre Lokalisation an der inneren Seite der O/W-Grenzfläche sehr wahrscheinlich sein.

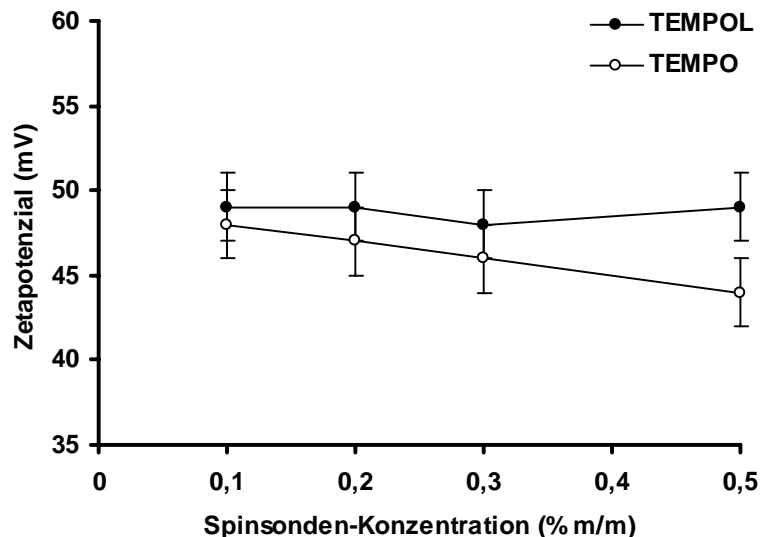


Abb. 3.3.1.1: Einfluss der TEMPO- bzw. TEMPOL-Konzentrationen auf die Zetapotenziale der spinsondenhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Die Verteilung der Sonden in den Formulierungen wurde zusätzlich durch Zugabe des Natriumascorbats mit Hilfe der ESR-Spektroskopie charakterisiert. Dabei löst sich Natriumascorbat in der wässrigen Phase der Nanoemulsion und reduziert paramagnetische Nitroxide, die sich in der wässrigen Phase der Nanoemulsion befinden, zu diamagnetischen Hydroxylaminen.

Nach Zugabe von Natriumascorbat-Lösung in die TEMPOL-haltigen Nanoemulsionen lag durch Reduktion der Spinsonde die Signalintensität innerhalb von zwei Minuten unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 3.3.1.2). Somit wurde gezeigt, dass TEMPOL hauptsächlich in der wässrigen Phase der positiv geladenen Nanoemulsion lokalisiert war. Die Zugabe des Reduktionsmittels in die TEMPO-haltige Nanoemulsion führte zu einer raschen Reduktion des TEMPO, die nach zwei Minuten durch eine ca. 6-fache Abnahme der Signalintensität gekennzeichnet und nach acht Minuten nicht mehr detektierbar war. Jedoch erfolgte die Reduktion deutlich langsamer als die der TEMPOL-Moleküle. Die Ursache für die im Vergleich zu TEMPOL langsamere Reduktion lag in der hauptsächlichlichen Verteilung der TEMPO-Moleküle in der Ölphase (Tab. 3.3.1.2). Die Nanoemulsionströpfchen weisen dabei aufgrund der sehr kleinen Größe eine starke Krümmung auf. Da mit abnehmender Tröpfchengröße der Laplace-Druck und damit die Neigung der in der Ölphase befindlichen Bestandteile steigt, sich in der äußeren Phase zu lösen [Higuchi und Misra 1962], erfolgte bei den TEMPO-haltigen Nanoemulsionen eine rasche Umverteilung der lipophilen TEMPO-Moleküle in die Phasengrenze der Nanoemulsionen, in der sie anschließend schnell zu diamagnetischen Hydroxylaminen reduziert wurden.

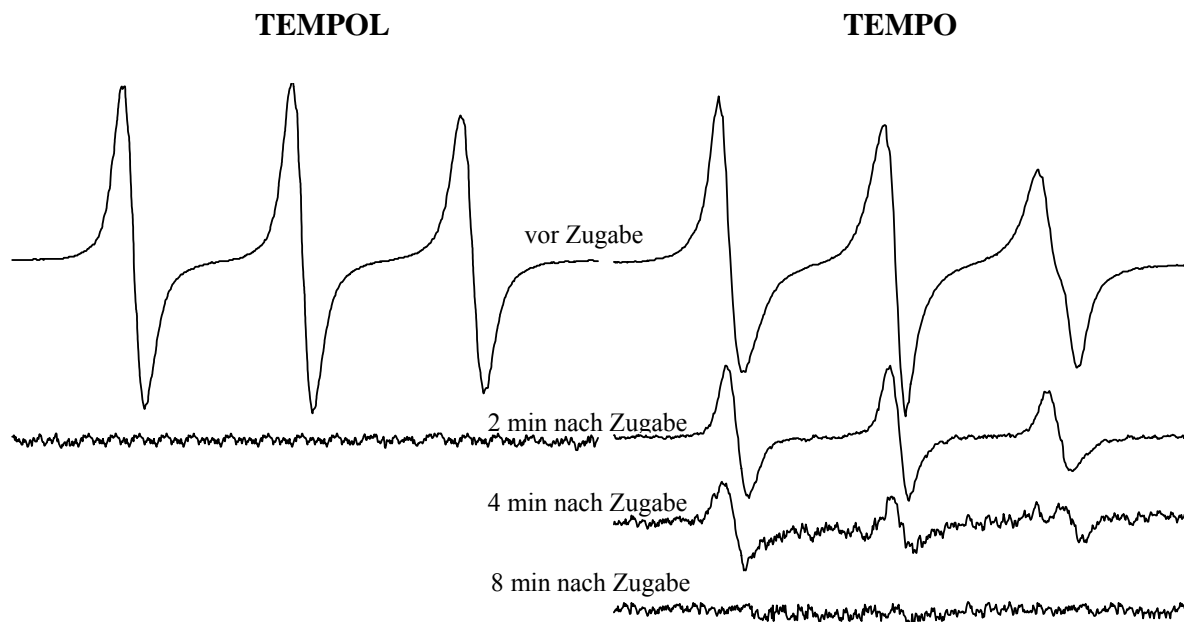


Abb. 3.3.1.2: Einfluss der Zugabe von Natriumascorbat-Lösung auf die ESR-Spektren der Nitroxidspinsonden TEMPOL (links) und TEMPO (rechts) in spinsondenhaltiger, durch Phytosphingosin positiv geladener Nanoemulsion

Diese entstandenen Hydroxylamine, die im Gegensatz zu den Nitroxiden stark basisch sind, verursachten dann eine Zunahme des pH-Wertes um 2,3 Einheiten von 5,5 auf 7,8 im Gegensatz zu den TEMPO-freien Nanoemulsionen, die den pH-Wert aufgrund der Natriumascorbat-Zugabe nur um 0,7 Einheiten von 5,5 auf 6,2 erhöhten (Tab. 3.3.1.3). Diese Zunahme des pH-Wertes durch die entstandenen Hydroxylamine war auch die Ursache für die Abnahme des Zetapotenzials von 44 ± 2 mV auf 26 ± 3 mV.

Tab. 3.3.1.3: Einfluss der Zugabe von Natriumascorbat-Lösung auf den pH-Wert und das Zetapotenzial der TEMPO-freien (PPN) und -haltigen (PPN-TEMPO) positiv geladenen Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 5$)

Formulierung	pH	Zetapotenzial (mV)	pH	Zetapotenzial (mV)
	vor Zugabe von Natriumascorbat		nach Zugabe von Natriumascorbat	
PPN	$5,5 \pm 0,2$	49 ± 3	$6,2 \pm 0,2$	38 ± 3
PPN-TEMPO	$5,5 \pm 0,2$	44 ± 2	$7,8 \pm 0,2$	26 ± 2

Die paramagnetische Aktivität der Nitroxidspinsonden blieb 14 Tage nach Herstellung mit 93 ± 5 % sehr gut erhalten (Tab. 3.3.1.1). Somit konnten stabile Nitroxidspinsonden-haltige Nanoemulsionen hergestellt werden, die anschließend zur Charakterisierung der Penetration herangezogen wurden.

3.3.2 Penetration der Nitroxidspinsonden in die Haut via Nanoemulsionen

Mit Hilfe der ESR-Tomografie wurde das Penetrationsverhalten der paramagnetischen Reportermoleküle TEMPO und TEMPOL in die exzidierte Humanhaut untersucht, wobei die Abhängigkeit der Penetration von den physikochemischen Eigenschaften der Sondenmoleküle und der Nanoemulsionen im Mittelpunkt stand.

3.3.2.1 TEMPO-haltige Nanoemulsionen

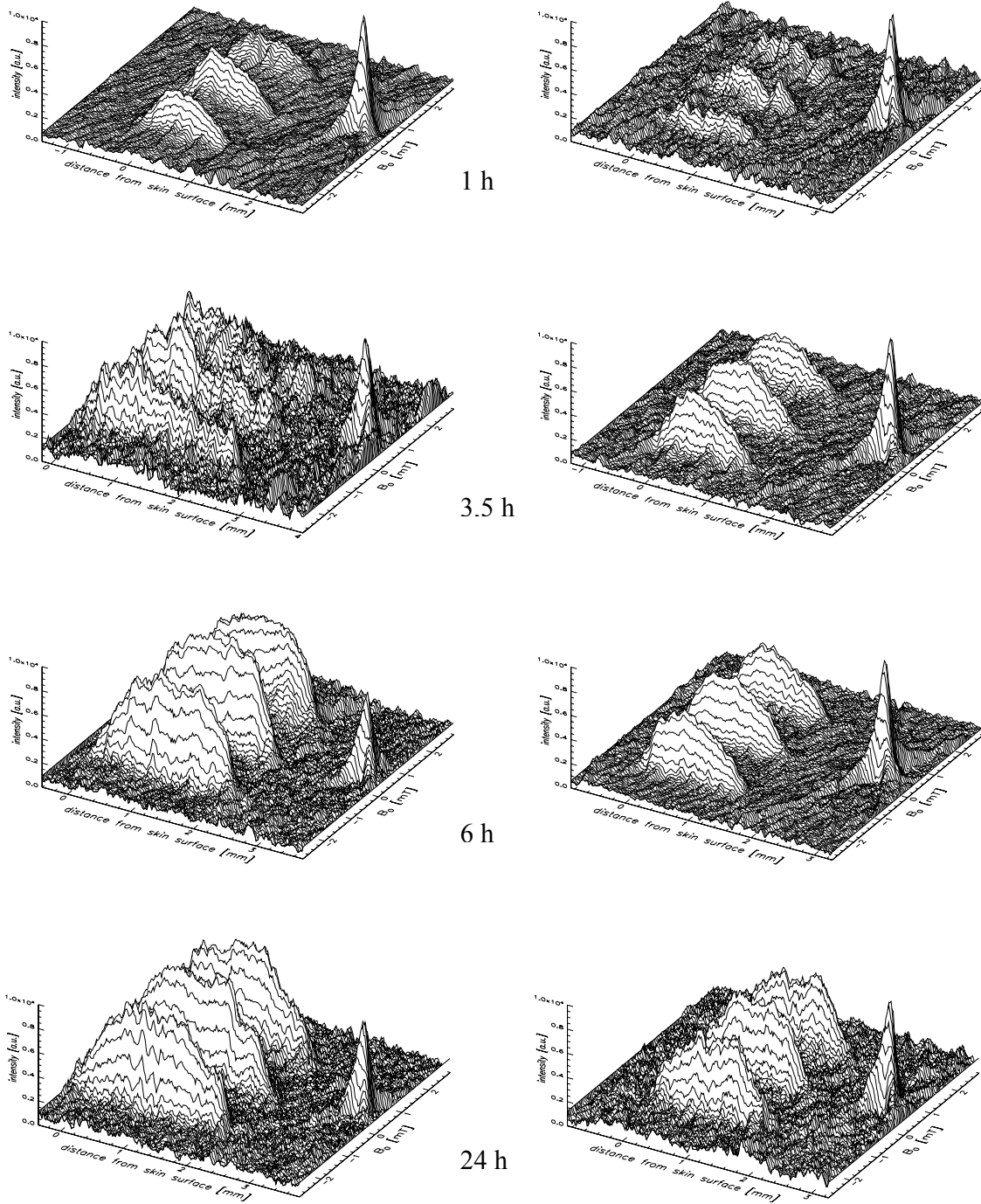


Abb. 3.3.2.1.1: ESR-Tomogramme von Hautproben 1, 3,5, 6 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPO via positiv (links) und negativ (rechts) geladener Nanoemulsion

Die erhaltenen Tomogramme (Abb. 3.3.2.1.1) wurden in die einzelnen Spektren zerlegt und in bestimmten Hauttiefen die Signalintensitäten, die zu den Intensitäten des externen DPPH-Standards bezogen wurden, die Hyperfeinkopplungskonstanten a_N und die Rotationskorrelationszeiten der TEMPO-haltigen, positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen ermittelt (siehe 5.6.3).

Die TEMPO-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen sorgten innerhalb von sechs Stunden für eine starke Zunahme der Penetration von TEMPO in die Haut (Abb. 3.3.2.1.2 links), denn nach sechs Stunden wurde in Hauttiefen von 100 μm und 1000 μm im Vergleich zum externen DPPH-Standard Signalintensitäten von jeweils 7302 und 11951 bestimmt, während sie nach einer Stunde noch bei jeweils 4577 und 5626 lagen. Bei den TEMPO-haltigen, negativ geladenen Nanoemulsionen wurde ein ähnliches zeitabhängiges Penetrationsverhalten des TEMPO beobachtet (Abb. 3.3.2.1.2 rechts), denn die Signalintensitäten betrugen nach einer Stunde bei 100 μm Hauttiefe 2830 und bei 1000 μm Tiefe 3813 und erhöhten sich nach sechs Stunden auf 4904 bzw. 9714.

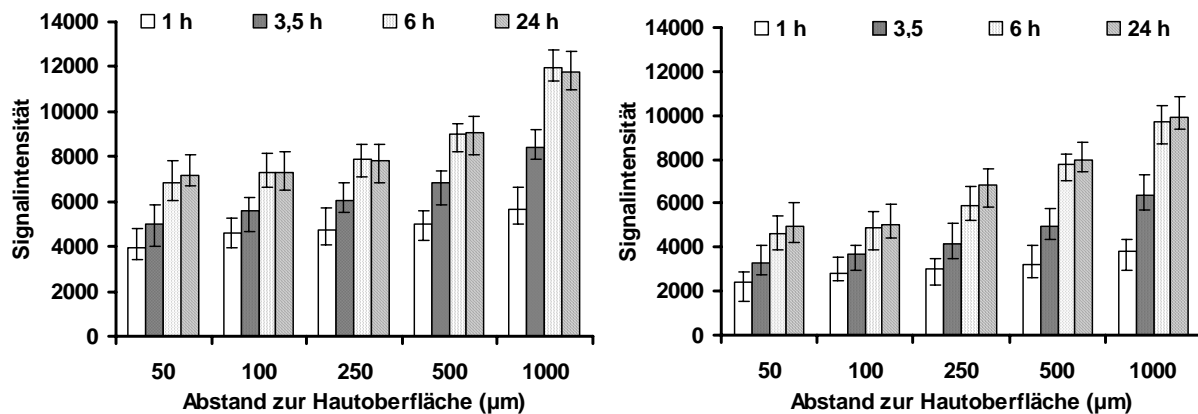


Abb. 3.3.2.1.2: Signalintensitäten von TEMPO in Hautproben 1, 3,5, 6 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation via positiv (links) und negativ (rechts) geladener Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm R$ mit $n = 3$)

Somit nahm mit zunehmender Zeit die penetrierte Menge an TEMPO in allen Hautschichten zu und erreichte nach sechs Stunden ihr Maximum. Um dieses Penetrationsverhalten zu erklären, wurden zu allen Zeiten und Hauttiefen die Mikroviskositäten und –polaritäten der Spinsonde untersucht. Nach Applikation der Nanoemulsionen nahm mit zunehmender Zeit die

Rotationskorrelationszeiten und damit korrelierend die Mikroviskositäten der TEMPO-Moleküle in den oberen Hautschichten ab (Abb. 3.3.2.1.3).

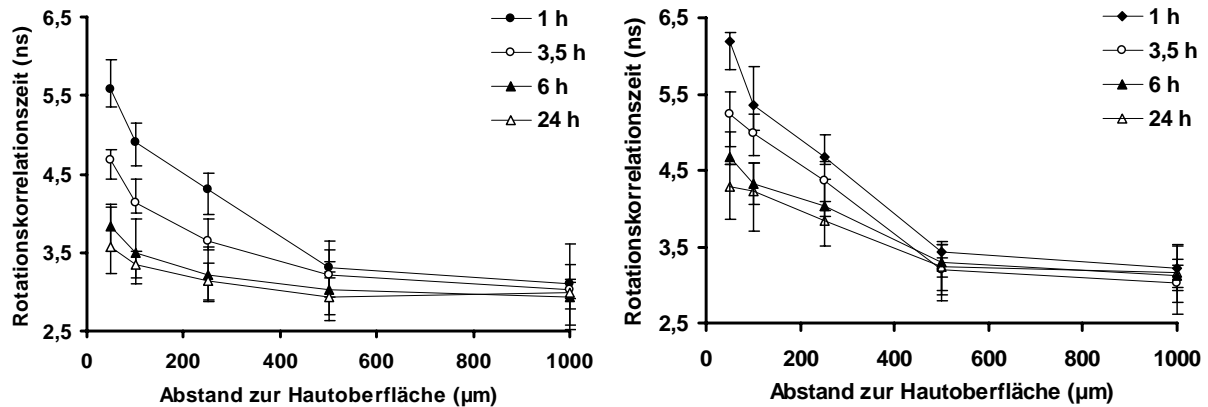


Abb. 3.3.2.1.3: Rotationskorrelationszeit von TEMPO in Hautproben in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1, 3,5, 6 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation via positiv (links) und negativ (rechts) geladener Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm R$ mit $n = 3$)

Bei den TEMPO-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen wurden bei 100 µm Hauttiefe nach einer Stunde Rotationskorrelationszeiten von 4,91 ns und nach sechs Stunden 3,49 ns ermittelt, während sie bei den negativ geladenen Nanoemulsionen 5,35 ns (nach einer Stunde) und 4,33 ns (nach sechs Stunden) betragen. In Hauttiefen um 500 µm wurden dagegen keine Unterschiede in den Rotationskorrelationszeiten beobachtet. Diese Ergebnisse zeigten, dass mit zunehmender Zeit die Mikroviskositäten der oberen Epidermisschichten (Hauttiefe bis 250 µm) gesenkt wurden. Die zeitabhängige Abnahme der Viskosität könnte durch eine zunehmende Wechselwirkung der oberen Hautschichten mit Formulierungsbestandteilen hervorgerufen worden sein. Vor allem könnten Phosphatidylcholin-Moleküle im Lipoid E 80[®] eine starke Fluidisierung der Epidermis verursacht haben [Ghyczy und Gareiß 1994], die mit einer Abnahme der Viskosität einherging. Zusätzlich könnte ein osmotisch bedingter Wassereinstrom zur Viskositätsminderung beigetragen haben. Die TEMPO-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen verursachten dabei eine stärkere Verminderung der Rotationskorrelationszeiten/Mikroviskositäten in den oberen Hautschichten als die negativ geladenen Nanoemulsionen (Abb. 3.3.2.1.3). Dieses könnte an der starken Wechselwirkung der Haut mit den durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen liegen, die zu einer stärkeren Fluidisierung der oberen Hautschichten führten als mit durch

Myristinsäure negativ geladenen Nanoemulsionen. Diese erhöhte Fluidisierung könnte ein Grund für die verbesserte Penetration des TEMPO via positiv geladener Nanoemulsion sein.

Aufgrund des hohen Verteilungskoeffizienten kam es in den unteren Dermis-schichten zu einer Anreicherung des TEMPO in den Fettzellen. Dieses Verteilungsverhalten von TEMPO war bei Hauttiefen von 1000 μm deutlich zu erkennen, die ungefähr dem Übergang von der oberen polaren zur unteren apolaren Dermis entsprechen [Steinsträsser und Merkle 1995] (Abb. 3.3.2.1.2). Zu allen Zeiten wurden in 1000 μm Hauttiefe höhere Signalintensitäten ermittelt als in den anderen Hauttiefen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit denen von Moll [2004], der ebenfalls zeigte, dass sich TEMPO in den unteren lipidreichen Dermis-Schichten anreichert. Jedoch waren die Signalintensitäten bei sechs und 24 Stunden nicht unterschiedlich. Hierbei könnte entweder nach sechs Stunden eine vollständige Verteilung des TEMPO in den Hautproben oder nach 24 Stunden ein starker Abbau der Spinsonde erfolgt sein.

Die Bestimmung der Hyperfeinkopplungskonstanten ergab unterschiedliche Polaritäten in den verschiedenen Hautschichten (Abb.: 3.3.2.1.3). Nach einer Stunde Applikation der TEMPO-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen lagen in den oberen Epidermisschichten (bis 250 μm) die Werte bei 1,496 mT bis 1,532 mT. In den oberen Dermis-schichten (500 μm) stiegen die Hyperfeinkopplungskonstanten auf Werte von 1,560 mT bis 1,575 mT deutlich an. Diese Erhöhung im Vergleich zu der Epidermis war zurückzuführen auf die Verteilung des TEMPO in die zellarmen, wasserreichen Dermis-schichten. In 1000 μm Hauttiefe nahmen die Werte auf 1,479 mT – 1,499 mT gravierend ab, da sich das lipophile TEMPO in den lipidreichen Strukturen der Dermis anreicherte. Diese Ergebnisse über das Polaritätsprofil der Haut sind im Einklang mit denen von Moll [2004], der ebenfalls diese Unterschiede aufzeigte.

In den Epidermisbereichen nahm nach Applikation der Nanoemulsionen mit zunehmender Zeit die Hyperfeinkopplungskonstanten a_N zu (Abb. 3.3.2.1.4). Nach einer Stunde wurden in Hauttiefen von 100 μm für die TEMPO-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen Werte von 1,514 mT und für negativ geladenen Nanoemulsionen Werte von 1,502 mT ermittelt. Diese stiegen nach sechs Stunden für die positiv geladene Nanoemulsion auf 1,536 mT und für die negativ geladene Nanoemulsion auf 1,514 mT an.

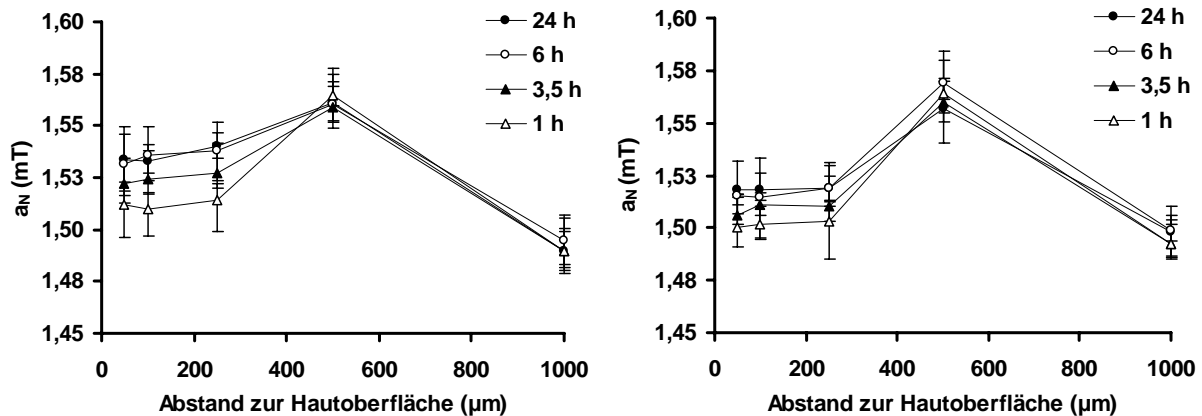


Abb. 3.3.2.1.4: Hyperfeinkopplungskonstante a_N von TEMPO in Hautproben in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1; 3,5; 6 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation via positiv (links) und negativ (rechts) geladener Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm R$ mit $n = 3$)

Da Nanoemulsionsbestandteile (wie Phospholipide des Lipoid E 80[®] und Phytosphingosin) und eventuell Nanoemulsionströpfchen in die oberen Hautschichten eindringen bzw. mit diesen Schichten interagieren und dadurch osmotisch bedingt Wasser mitzogen, kam es zu einer mit der Zeit zunehmenden Erhöhung der Polarität der oberen Hautschichten (bis 250 μm). Die Polarität der Epidermisbereiche wurde dabei durch die positiv geladenen Nanoemulsionen mit zunehmender Zeit stärker erhöht als durch die negativ geladenen Nanoemulsionen.

Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass via positiv geladener Nanoemulsionen mehr TEMPO-Moleküle in die Haut penetrierten als über negativ geladener Nanoemulsionen. Diese penetrationsfördernde Wirkung der positiv geladenen Nanoemulsionen war zurückzuführen auf die starke Wechselwirkung der durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionströpfchen mit den oberen Hautschichten, die zu einer erhöhten Fluidisierung und Polarität führte.

3.3.2.2 TEMPOL-haltige Nanoemulsionen

Die ESR-Tomogramme der TEMPOL-haltigen, positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen (siehe Tab. 5.6.3.1) wurden analog zum oberen Abschnitt analysiert (Abb. 3.3.2.2.1).

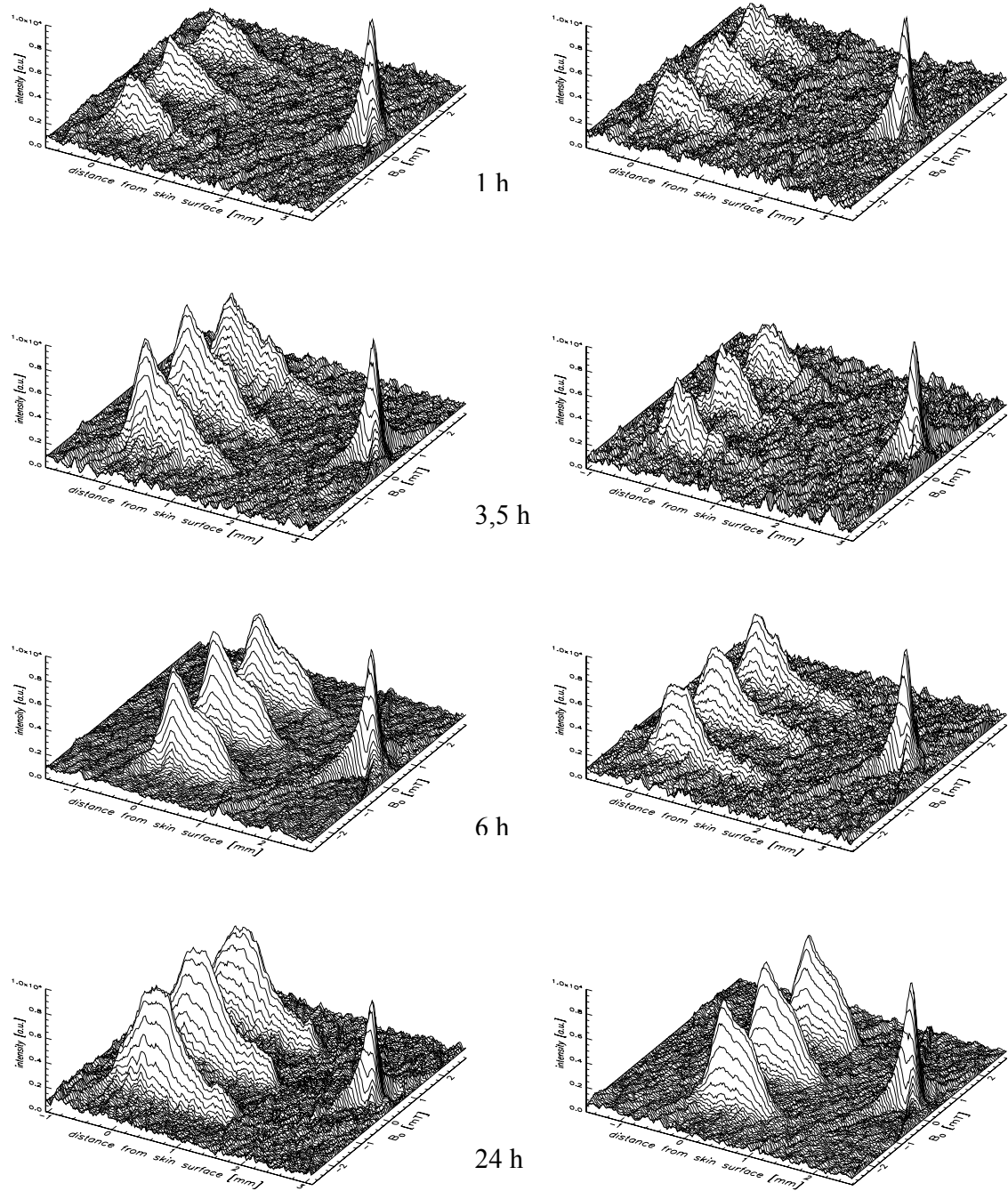


Abb. 3.3.2.2.1: ESR-Tomogramme von Hautproben 1, 3,5, 6 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL via positiv (links) und negativ (rechts) geladener Nanoemulsion

Die TEMPOL-haltigen Nanoemulsionen zeigten ein anderes Penetrationsverhalten als die TEMPO-haltigen. Auffällig sind die hohen Signalintensitäten in den oberen Hautschichten (Abb. 3.3.2.2.2). In 100 µm Hauttiefe wurden nach 3,5 Stunden bei den TEMPOL-haltigen, positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen hohe Intensitäten von 8676 bzw. 6308 erreicht. Währenddessen wurden nach 24 Stunden die geringsten Intensitäten von 3885 für die positiv geladene Nanoemulsionen und 2708 für die negativ geladene Nanoemulsionen in Hauttiefen von 1000 µm ermittelt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die amphiphilen TEMPOL-Moleküle rasch in die hydrophilen Bereiche der Epidermisschichten penetrierten, jedoch diese sehr langsam verließen, um in die unteren Schichten zu diffundieren.

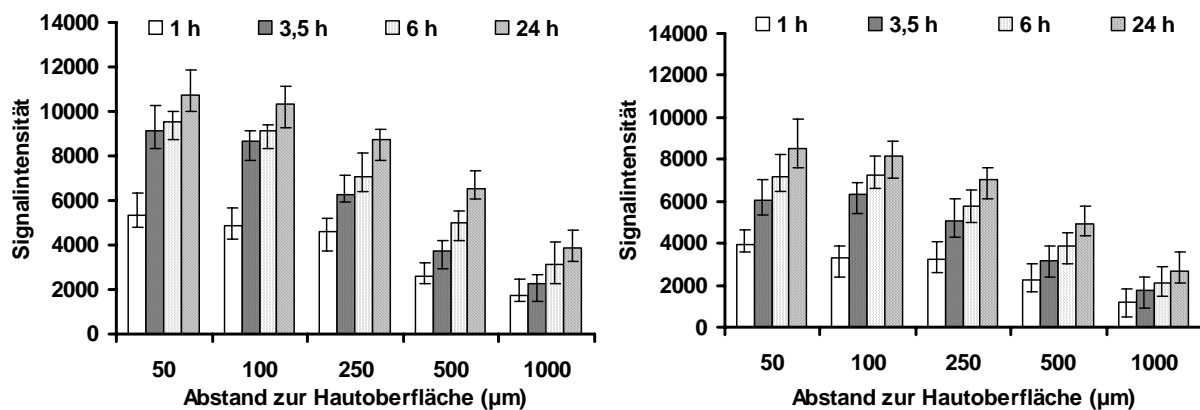


Abb. 3.3.2.2.2: Signalintensität von TEMPOL in Hautproben 1, 3,5, 6 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation via positiv (links) und negativ (rechts) geladener Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm R$ mit $n = 3$)

Dabei zeigten die spinsondenhaltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen durchweg höhere Signalintensitäten als die negativ geladenen Nanoemulsionen, welches nochmals die hervorragende penetrationsfördernde Wirkung der durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen in die Haut zeigt. Die Ursache der Penetrationsverbesserung wurde durch die Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten und der Polaritäten der Spinsonden in den verschiedenen Hauttiefen untersucht. Nach einer Stunde betragen die Rotationskorrelationszeiten in Hauttiefen von 50 µm für die positiv geladene Nanoemulsion 3,80 ns und für die negativ geladene Nanoemulsion 4,54 ns und erreichten nach 24 Stunden Werte von 2,29 ns bzw. 2,88 ns (Abb. 3.3.2.2.3). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Nanoemulsionen die Mikroviskositäten in den oberen Hautschichten senkten und dadurch eine penetrationsfördernde Wirkung entfalteten.

Dabei war die Viskositätssenkung der oberen Hautschichten durch die positiv geladenen Nanoemulsionen stärker ausgeprägt als durch die negativ geladenen Nanoemulsionen, die daher via positiv geladener Nanoemulsionen zu einer höheren Diffusion der TEMPOL-Moleküle in die oberen Hautschichten führte.

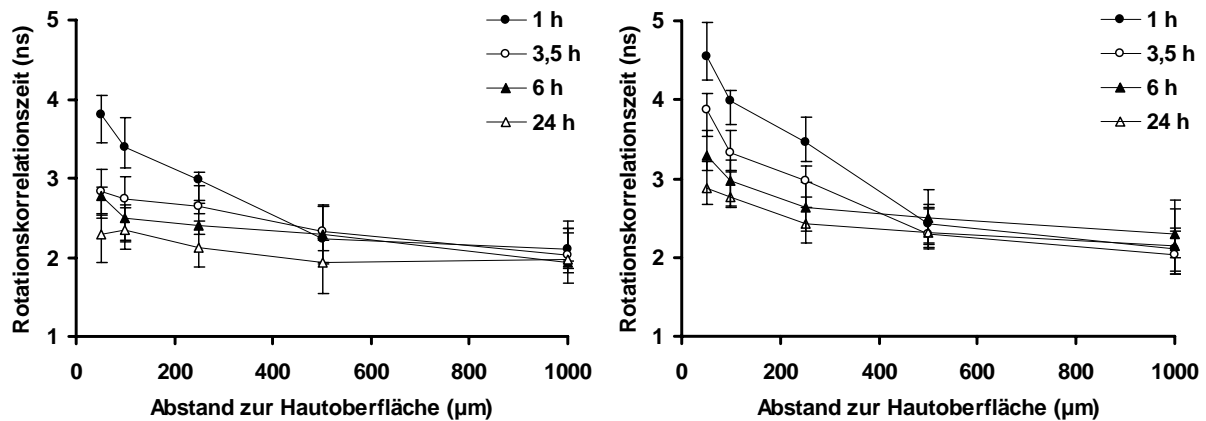


Abb. 3.3.2.2.3: Rotationskorrelationszeit von TEMPOL in Hautproben in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1; 3,5; 6 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation via positiv (links) und negativ (rechts) geladener Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm R$ mit $n = 3$)

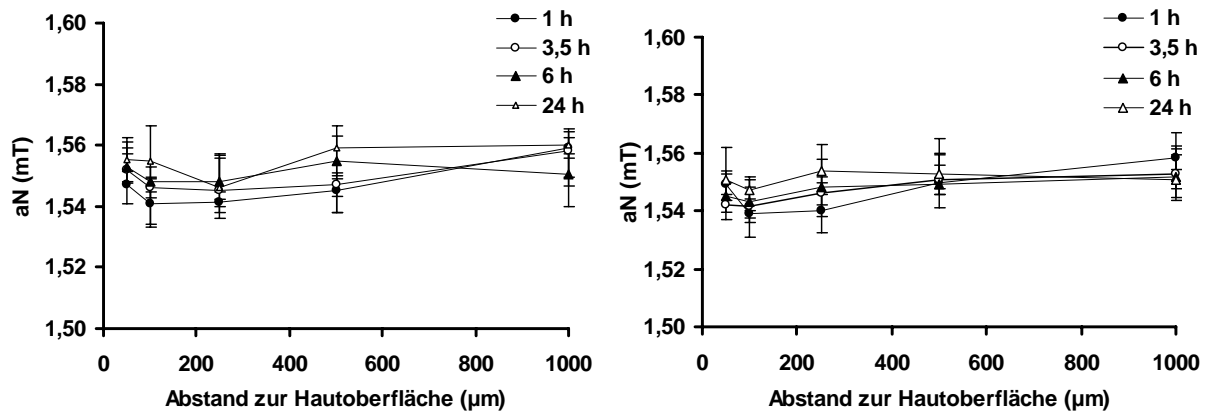


Abb. 3.3.2.2.4: Hyperfeinkopplungskonstante a_N von TEMPOL in Hautproben in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1; 3,5; 6 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation via positiv (links) und negativ (rechts) geladener Nanoemulsionen ($\bar{x} \pm R$ mit $n = 3$)

Die Polaritätsuntersuchungen ergaben keine Unterschiede zwischen den Formulierungen, den gemessenen Zeiten und den verschiedenen Hauttiefen (Abb. 3.3.2.2.4). Die

Hyperfeinkopplungskonstanten nahmen bei den TEMPOL-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen Werte von 1,533 mT bis 1,567 mT an. In der hydrophilen und lipophilen Phase der positiv geladenen Nanoemulsionen betragen sie 1,570 mT bzw. 1,450 mT. Da alle Hyperfeinkopplungskonstanten näher an dem hydrophilen Wert lagen, kann man schlussfolgern, dass sich TEMPOL-Moleküle hauptsächlich in den polaren Bereichen der verschiedenen Hautschichten aufhielten. Die hohe Polarität der Sondenumgebung speziell in den oberen Hautschichten konnte durch Wassereinstrom nicht weiter erhöht werden.

3.3.3 Zusammenfassung der ESR-Untersuchungen

Die TEMPO- und TEMPOL-haltigen, positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen zeigten über einen Zeitraum von zwei Wochen eine gute physikalische und chemische Stabilität. Die Verteilung der Spinsonden, die über die ESR-Spektren-Simulation mit Hilfe der PEST-Auswertung bestimmt wurde, ergaben für das lipophile TEMPO und das amphiphile TEMPOL bevorzugte Verteilungen in der inneren Ölphase bzw. in der äußeren Wasserphase. Dieses Verteilungsverhalten wurde nach Reduktion durch das hydrophile Reduktionsmittel Natriumascorbat bestätigt. TEMPOL wurde innerhalb von zwei Minuten bis unter die Nachweisgrenze reduziert, während TEMPO langsamer in das diamagnetische Hydroxylamin umgewandelt wurde. Diese dennoch schnelle Reduktion lag an der raschen Umverteilung des TEMPO an die O/W-Phasengrenze bedingt durch den hohen Laplace-Druck in den Nanoemulsionströpfchen. Darüber hinaus führte die Umwandlung in das basische Hydroxylamin zur Absenkung des pH-Wertes und dadurch zur Erniedrigung des Zetapotenzials.

Die Penetration der Nitroxidspinsonden via positiv und negativ geladener Nanoemulsionen wurde mit Hilfe der ESR-Tomografie untersucht. Dazu wurden die erhaltenen ESR-Tomogramme in die einzelnen Spektren zerlegt und aus diesen Informationen über die Mikroumgebung wie Mikroviskosität, Mikropolarität und die Signalintensität, die proportional zur Spinsondenkonzentration ist, gewonnen. Die Ergebnisse der Penetrationsstudien mit TEMPO zeigten, dass die Spinsonde mit zunehmender Zeit vermehrt in die unteren Hautschichten penetrierte. Diese vermehrte Penetration war bei den positiv geladenen Nanoemulsionen stärker ausgeprägt als bei den negativ geladenen Nanoemulsionen. Die Ursache lag in der stärkeren

Viskositätserniedrigung und Polaritätserhöhung der oberen Hautschichten (bis 250 μm) durch positiv geladene Nanoemulsionen, d.h. die durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen interagierten verstärkt mit den oberen Hautschichten und verursachten somit eine stärkere Fluidisierung. Diese Fluidisierung bedingte osmotisch einen verstärkten Wassereinstrom und damit eine Erhöhung der Polarität. Das lipophile TEMPO verteilte sich mit zunehmender Zeit verstärkt in die unteren Dermisbereiche, die lipidreiche Strukturen enthalten. TEMPOL dagegen penetrierte aufgrund zunehmender Fluidität rasch in die oberen Hautschichten und verteilte sich nur sehr langsam in die unteren Hautschichten. Aufgrund seines Verteilungskoeffizienten ist TEMPOL vorwiegend in den Bereichen der Haut lokalisiert, die eine hohe Polarität aufweisen. Deshalb ergaben sich bei den Polaritätsuntersuchungen nur geringe Unterschiede in den verschiedenen Hauttiefen, geringe Abhängigkeiten von der Inkubationszeit und den Formulierungen.