

4 Materialien

4.1 Kosmetische Öle

4.1.1 Tegosoft® DC

Tegosoft® DC (Decyl Cocoate) ist, basierend auf pflanzlichen Rohstoffen, ein kosmetisches Öl mit niedriger Viskosität und geringer Spreitung. Es wird hauptsächlich in Augenpflegeprodukten und O/W Sonnenschutz-Emulsionen eingesetzt (Goldschmidt Personal Care, Essen).

4.1.2 Tegosoft® TN

Tegosoft® TN (C12-15 Alkyl Benzoate) ist ein Emollient mit hohem Lösungsvermögen für öllösliche Arzneistoffe und UV-Filter. Es ist besonders für Sonnenschutz-Formulierungen und Hautpflegeprodukte geeignet und hinterlässt ein angenehmes, nicht fettendes Hautgefühl (Goldschmidt Personal Care, Essen).

4.1.3 Varonic® APM

Varonic® APM (PPG-3 Myristyl Ether) besitzt als stark polares kosmetisches Öl solubilisierende Eigenschaften und wird in transparenten Deo-/Antiperspirant-Stiften verwendet (Goldschmidt Personal Care, Essen).

4.1.4 Miglyol

Miglyol (Fa. Caesar & Loretz GmbH, Hilden) ist ein flüssiges Triglycerid, in dem hauptsächlich C₈ – C₁₂- Fettsäuren verestert sind. Es weist eine niedrige Viskosität und einen Erstarrungspunkt je nach Modifikation von –22 °C bis –50 °C auf. Als öliges Vehikel mit spreitungs- und permeationsfördernden Eigenschaften wird Miglyol für Suspensionen, Lösungen, Salben, Cremes und als Lösungsvermittler genutzt [Burger und Wachter 1986, Fiedler 1996].

4.1.5 Eutanol G

Eutanol G (2-Octyldodecanol aus Ph. Eur. 4.05) ist ein an Position 2 verzweigter, einwertiger Alkohol, der von der Firma Caelo, Caesar & Loretz GmbH in Hilden bezogen wurde. Der Schmelzbereich wird mit –1 °C bis +1 °C angegeben (Produktinformation der Firma Condea in Witten). Er ist praktisch unlöslich in Wasser und leicht löslich in fetten Ölen. Auf topischem Gebiet wird er vor allem zur Permeationsverbesserung von Salben und als Lösungsmittel für lipophile Stoffe verwendet.

4.2 Emulgatoren

4.2.1 Phospholipide

Zur Herstellung der Nanoemulsionen wurden soja- bzw. eiphspholipidhaltige Emulgatorgemische (Lipoid KG, Ludwigshafen) verwendet, die in die Gruppe der Phosphoglyceride (Abb. 4.2.1) gehören und amphiphile Emulgatoren mit hervorragender Hautverträglichkeit darstellen.

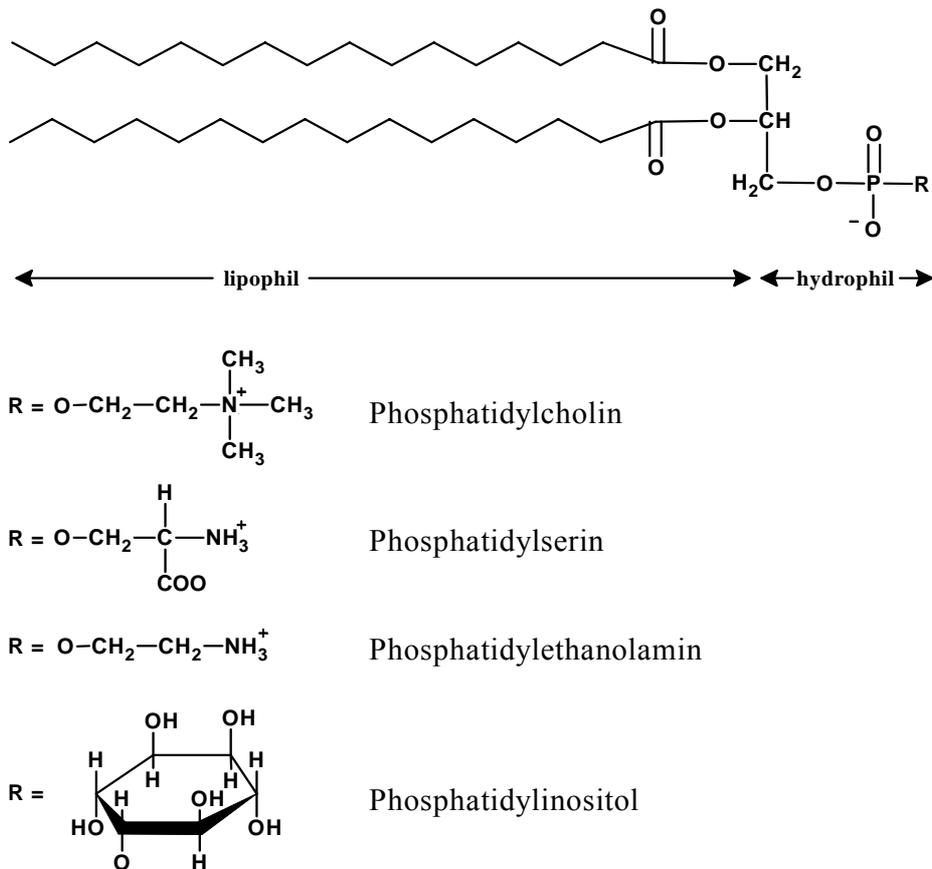


Abb. 4.2.1: Struktur der Phosphoglyceride

Phosphoglyceride sind in pflanzlichen und tierischen Membranen und als Bestandteil von Fettdispersionen (Milch, Intralipid[®], Lipofundin[®]) weit verbreitet. Die Wirkung auf physiologischer Ebene ist die Verstärkung der Barrierefunktion der Haut und die Stabilisierung des natürlichen transepidermalen Wasserverlustes [Produktinformation Lipoid KG, Ludwigshafen, Ghyczy und Gareiss 1994]. In der folgenden Tabelle 4.2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten wasserunlöslichen Phospholipide mit entsprechender Zusammensetzung aufgelistet.

Tab. 4.2.1: Zusammensetzung der Phospholipidgemische gemäß Herstellerspezifikation

Produkt	Vorkommen	Eigenschaften	Phospholipidanteil (% m/m)			
			PC	PE	SM	LPC
L- α -PC	Sojabohne	Ungesättigt	45-55			
Lipoid E 80 [®]	Eigelb	Ungesättigt	81,9	8,9	2,3	2,3
Lipoid E 100 [®]	Eigelb	Ungesättigt	96,6	<0,1	<3,0	0,5
Lipoid E 80-3 [®]	Eigelb	Gesättigt	84,2	7,0	<2,0	2,7
Lipoid S 75 [®]	Sojabohne	Ungesättigt	68,6	-	-	2,2
Lipoid S 100 [®]	Sojabohne	Ungesättigt	97,8	-	-	1,0

L- α -PC: L- α -Phosphatidylcholin; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; Sphingomyelin; LPC: Lyso-Phosphatidylcholin

4.2.2 Phytosphingosin

In dieser Arbeit wurde Phytosphingosin der Firma Degussa, Essen, eine freie, amphiphile Sphingoidbase (2S-Amino-1, 3S, 4R-octadecantriol) mit einem pK_b-Wert von ca. 9 zur positiven Aufladung der Nanoemulsionströpfchen verwendet. Phytosphingosin kommt im Stratum corneum von Menschen in hohen Konzentrationen vor. Die Literatur des Phytosphingosins beschäftigt sich mit der Hemmung von Mikroorganismen und der biologischen Rolle als ein natürlich vorkommender, entzündungshemmender Stoff [Wolf et al. 1997, Lambers und Streekstra 1998, Park et al. 2001a, 2002, Lersch und Schick, 2003]. Aufgrund seiner Eigenschaften scheint Phytosphingosin beim Immunsystem der Haut entscheidend mitzuwirken. Deshalb kann Phytosphingosin in einer Reihe von Produktanwendungen eingesetzt werden, was seine Anwendung in topischen Zubereitungen interessant macht.

4.2.3 Tween 80[®]

Tween 80[®] (Polysorbat 80; Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat) ist ein nichtionischer sterischer Emulgator mit einem HLB-Wert von 15,3 [Fiedler 1996]. Bei Ratten ist ein oraler LD₅₀-Wert von 38 g/kg angegeben. In Deutschland ist die oberflächenaktive Substanz in parenteral zu applizierenden Arzneimitteln zugelassen (z.B. Acithaemyl[®], Coradex[®]) [Rote Liste 2003]. Es wurde bezogen von der Firma Uniqema, Everberg, Belgien.

4.2.4 Poloxamer 188[®]

Poloxamer 188[®] (Lutrol F68[®]), ein Handelspräparat der Firma BASF (Ludwigshafen), ist ein sterisch stabilisierendes, nichtionisches Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymer mit einem HLB-Wert von 29, das zur parenteralen Anwendung zugelassen ist.

4.3 Stratum corneum Lipide

4.3.1 Palmitinsäure

Palmitinsäure (Hexadecansäure mit MW: 256,43 g/mol), eine gesättigte Fettsäure, besteht aus weißen fettigen Plättchen, praktisch unlöslich in Wasser, löslich in Ether und Alkohol [Fiedler 1996]. Der Schmelzpunkt liegt bei ca. 63 °C. Die verwendete Palmitinsäure hatte einen Reinheitsgrad von ≥ 98 % (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe).

4.3.2 Myristinsäure

Myristinsäure (Tetradecansäure mit MW: 228,38 g/mol) ist eine farblos bis gelbe Festsubstanz mit einem Schmelzpunkt von 54 °C (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Die Säure ist unlöslich in Wasser, jedoch löslich in Ethylalkohol und Ether. Sie ist Bestandteil fast aller Tier- und Pflanzenfette und wird hauptsächlich zur Herstellung von Seifen verwendet, die als besonders hautverträglich gelten [Fiedler 1996].

4.3.3 Cholesterol

Cholesterol (5-Cholesten-3 β -ol) ist ein weißes kristallines Pulver, das praktisch unlöslich in Wasser und wenig löslich in Aceton und Ethanol ist. Die Schmelztemperatur liegt im Bereich zwischen 147 und 150 °C (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe).

4.4 ESR-Spinsonden

Für die ESR-Untersuchungen wurden Nitroxylradikale mit Piperidin- und Oxazolinstruktur verwendet (Abb. 4.4). Diese N,N-disubstituierten Verbindungen verfügen über ein ungepaartes Elektron und sind somit paramagnetisch. Das Radikal wird über drei π -Elektronen, die über zwei Atomzentren verteilt sind, sowie eine sterische Abschirmung durch jeweils zwei α -ständige Methylgruppen stabilisiert [Kroll 1999].

Die Strukturen der verwendeten Spinsonden unterschieden sich in Bezug auf Lipophilie, die durch den n-Octanol-/Wasser-Verteilungskoeffizient angegeben wird. Die amphiphilen Sonden TEMPO und TEMPOL haben aufgrund ihres Verteilungskoeffizienten unterschiedlich stark ausgeprägte Affinitäten zu den O/W-Grenzflächen der Nanoemulsionen und zum Stratum corneum der Haut. Durch die Auswertung ihrer Signalintensitäten werden von diesen Sonden in besonderen Maße Aussagen zur Penetration der dermal applizierten Modellarzneistoffe erwartet. 5-Doxylpalmitinsäure, die aufgrund seiner amphiphilen Struktur eine hohe Affinität zu Grenzflächen hat, wurde zur Bestimmung der Beweglichkeit bzw. Viskosität der O/W-Grenzflächen der Nanoemulsionen herangezogen.

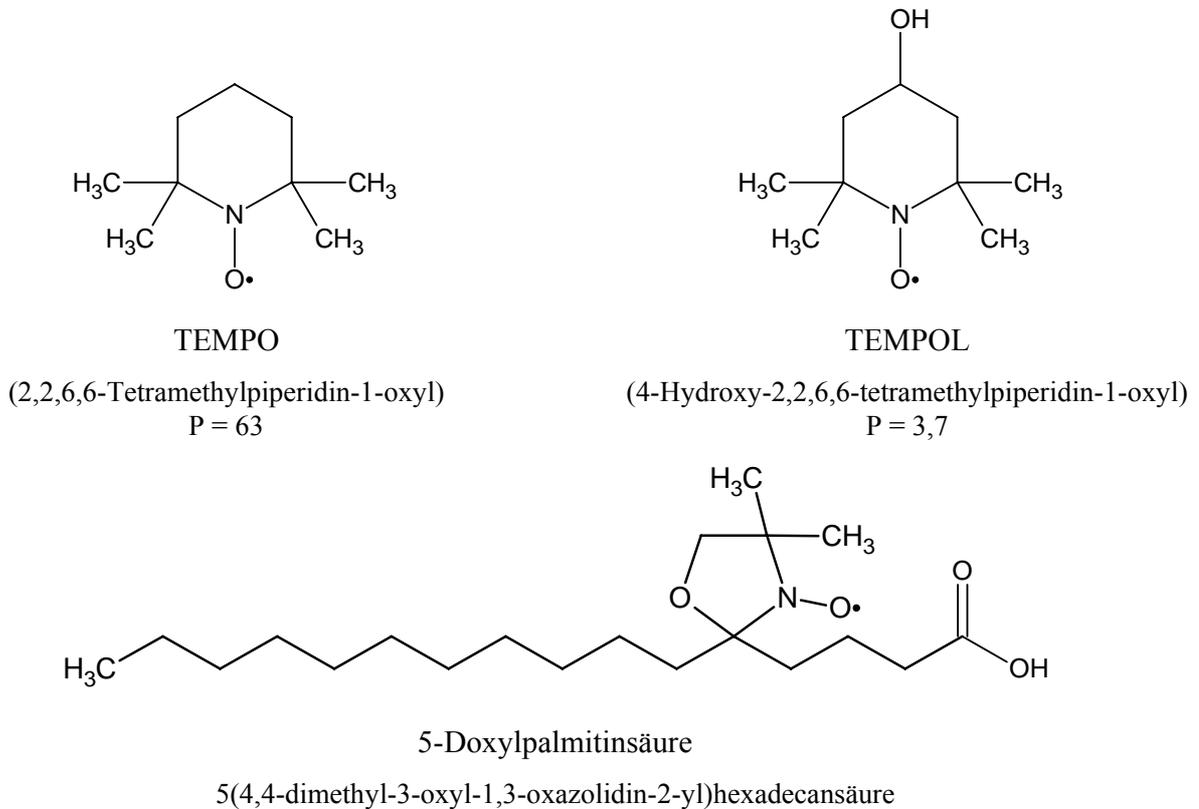


Abb. 4.4: Strukturformel, IUPAC-Bezeichnung und n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient P (vgl. [Kroll 1999]) der verwendeten Spinsonden

4.5 Weitere Materialien

Substanz	Hersteller/Lieferant	Verwendung
Vitamin E	Synopharm (Barsbüttel)	Antioxidationsmittel
Kaliumsorbat	Caesar & Lorentz GmbH (Hilden)	Konservierungsmittel
Carbopol 940	Noveon Pharma GmbH & Co. KG (Raubling)	Gelbildner
Methanol (HPLC-Qualität)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)	Bestandteil des HPLC-Fließmittels und Lösungsmittel im Rahmen der HPLC Analytik
Ammoniumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	Bestandteil des HPLC-Fließmittels
Isopropanol 100 % (HPLC-Qualität)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)	Lösungsmittel im Rahmen der HPLC-Analytik
Wasser	Millipore (Schwalbach)	Entspricht Arzneibuchmonographie „Aqua purificata“

4.6 Verwendete Zubereitungen

4.6.1 Physiogel®-Creme

Physiogel®-Creme (Firma Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main) ist eine Creme mit Derma-Membran-Struktur (DMS). Ziel der Entwicklung von DMS-Cremes war es eine der Haut entsprechende Creme zu entwickeln, die die Haut nicht irritiert. Anders als bei herkömmlichen O/W- und W/O-Emulsionen, bei denen eine Phase in Form kleiner Tröpfchen in einer zweiten Phase verteilt ist, zeichnet sich die DMS-Creme durch ihre lamellare Struktur aus, die an den Aufbau der natürlichen Lipidbarriere der Haut erinnert. In der Physiogel®-Creme sind mit Triglyceriden, Sterolen, Phospholipiden, freien Fettsäuren, Squalen und Ceramiden ausschließlich hautverwandte Lipide pflanzlichen Ursprungs enthalten (Tab. 4.6.1.1), die zur Lipidsubstitution bei geschädigter Hautbarriere gut geeignet sind.

Tab. 4.6.1.1: Inhaltsstoffe und Funktion von Physiogel®-Creme

Inhaltsstoffe	Funktion
Wasser	
Triglyceride vorwiegend mit Caprylsäuren	Weichmacher
Glycerol	Feuchthaltemittel
Pentylenglykol	Feuchthaltemittel und „Konservierungsmittel“
Cocos Nucifera	Weichmacher
Sheabutter	Weichmacher, enthält Phytosterole
hydriertes Lecithin	Stärkung der Barrierenfunktion, strukturgebende Komponente
Squalene	Weichmacher, Bestandteil der intrazellulären Lipide
Hydroxyethylcellulose	Gelbildner
Xanthan-Gummi	Gelbildner
Carbomer	Gelbildner
Ceramid III	Stärkung der Barrierenfunktion, strukturgebende Komponente

Da sich chemisch gesehen, die Haut und die Creme, in ihren Bestandteilen nur geringfügig unterscheiden, weist die Creme ähnlich wie die Haut lamellare Strukturen auf. Mit Hilfe einer speziellen Hochdrucktechnologie, die meist mehrfach angewendet werden muss, werden die Komponenten in ihre mikrokristalline, lamellare Struktur gezwungen und dabei eine hohe Viskosität erzielt. Zur Herstellung ist jedoch ein hoher Energieaufwand nötig.

Einige Studien zeigten die Verbesserung der Hauteigenschaften durch die Physiogel®-Creme. Insbesondere wurden die Hautfeuchtigkeit, Elastizität und die Hautrauhigkeit signifikant erhöht bzw. verbessert. [Derma Consult GmbH 1998].

4.6.2 Ethanolhaltige Miconazolnitrat-Lösung

Die ethanolhaltige Miconazolnitrat-Lösung wurde ähnlich der Rezeptur aus dem NRF 11.80 hergestellt (Tab. 4.6.2).

Tab. 4.6.2: Zusammensetzung der ethanolhaltigen Miconazolnitrat-Lösung (NRF 11.80)

Bestandteile	Konzentration (% m/m)	Hersteller/Lieferant
Miconazolnitrat	0 – 0,5	Synopharm GmbH & Co. KG (Barsbüttel)
Propylenglykol	20	Caesar & Lorentz GmbH (Hilden)
Macrogol- Glycerolhydroxystearat	12	BASF (Ludwigshafen)
Milchsäure	40	Caesar & Lorentz GmbH (Hilden)
Ethanol 96 %	15	Merck KGaA (Darmstadt)
Gereinigtes Wasser	ad 100	Millipore (Schwalbach)

5 Methoden

5.1 Hochdruckhomogenisation

Hochdruckhomogenisatoren werden seit Beginn des 20. Jahrhunderts im Bereich der Milchproduktion verwendet. Seitdem hat sich die Methode in vielen Industriezweigen etabliert und spielt gerade im Bereich der pharmazeutischen Industrie eine große Rolle.

Bei Hochdruckhomogenisatoren handelt es sich um Strömungsdispergiermaschinen, deren Arbeitsweise das Prinzip nach Bernoulli zu Grunde liegt [Stricker 1987]. In durchströmten Systemen ist die Summe aus dynamischen und statischen Druck zu jeder Zeit konstant. Wird eine Flüssigkeit unter hohem Druck durch einen engen Spalt gepresst, steigt der dynamische Druck stark an und der statische fällt in gleichem Maße. Sinkt dabei der statische Druck unter den Dampfdruck der verwendeten Flüssigkeit, fängt diese an zu sieden und es bilden sich Gasblasen. Bei Austritt aus dem Spalt steigt der statische Druck wieder rapide an und die Gasblasen kollabieren. Die Implosion der Gasblasen erzeugt starke Kräfte, die in Form von Stoßwellen auf das Homogenisationsgut treffen und zu dessen Zerkleinerung beitragen [Holley 1984]. Das Entstehen und die anschließende Implosion von Gasblasen wird als Kavitation bezeichnet (allgemein: Hohlraumbildung im Kontinuum flüssiger Medien).

In dieser Arbeit wurde der Micron-Lab 40, APV Gaulin, Lübeck verwendet (Micron Lab 40, APV Gaulin, Deutschland). Dabei handelt es sich um ein Kolben-Spalt-

Hochdruckhomogenisator, der mit Drücken zwischen 100 und 1600 bar arbeiten kann. Dieses Gerät ist für den Labormaßstab direkt durch „scaling-down“ von Produktionsgeräten entwickelt worden, so dass Ergebnisse auf den Produktionsmaßstab übertragbar sind.

5.2 Herstellung der Ceramid-haltigen Nanoemulsionen und Cremes zur kosmetischen Anwendung

Zunächst erfolgte die Herstellung der wässrigen Phase, die Tween 80[®], Glycerol, Kaliumsorbat und bidestilliertes Wasser enthält, und unter leichtem Rühren auf 25, 50, 75 oder 90 °C erhitzt wurde (Tab. 5.2.1). Phytospingosin, für die lipidhaltige, positiv geladene Nanoemulsion (PPNSC), Ceramid 3 und Ceramid 3B wurden in Eutanol G bei über 100 °C gelöst und anschließend auf 75 °C abgekühlt. In diese Ölphase wurden dann Myristinsäure, für die lipidhaltige, negativ geladene Nanoemulsion (MNNSC), Lipoid E 80[®], Cholesterol, Palmitinsäure und α -Tocopherol gelöst und auf Temperaturen von 25, 50, 75 oder 90 °C gebracht. Den MNNSC wurde nach Abkühlung auf 50 °C Ethanol zugefügt, um die Lipide zu lösen. Bei den eingestellten Temperaturen wurden beide Phasen vereinigt und mit einem Ultra-Turrax vorhomogenisiert (Janke and Kunkel GmbH, Staufen).

Die Tröpfchengröße in den Voremulsionen sollte 20 μm nicht überschreiten, da das Ergebnis der anschließenden Hochdruckhomogenisation stark von der Qualität der Vorstufe abhängt [Collins-Gold et al. 1990]. Um dieses zu erreichen, wurden die Emulsionen bei 8000 Umdrehungen min^{-1} drei Minuten vorhomogenisiert. Die eigentliche Homogenisation erfolgte dann mit dem Hochdruckhomogenisator unter den in der Tabelle 5.2.2 aufgelisteten Prozessbedingungen.

Nach raschem Abkühlen auf Raumtemperatur und pH-Einstellung (pH-Meter: Modell pH 522, WTW, Deutschland), wurden die Nanoemulsionen durch ein Membranfilter (Polytetrafluorethylen-Filter, Sartorius AG Germany; Porengröße: 1,2 μm) gedrückt und nach Stickstoff-Begasung gelagert und anschließend charakterisiert. Nach Zugabe des Gelbildners, Carbopol 940, wurden die Nanoemulsionen zur Erhaltung von halbfesten, streichfähigen Cremes sehr langsam (30 - 60 Minuten) mit einem Flügelrührer im Unguator[®] E 100 (GAKO Konietzko GmbH, Bamberg) gerührt und vor und nach der Charakterisierung bei Temperaturen von 2 - 8°C gelagert.

Die lipidhaltigen, durch Phytospingosin positiv geladenen Nanoemulsionen wurden durch Variation der Homogenisations- und Formulierungsparameter (Tab. 5.2.1 und 5.2.2) optimiert, um die physikalische Stabilität der Nanoemulsionen durch enge Teilchengrößenverteilung und durch elektrostatische und/oder sterische Stabilisierung zu gewährleisten und die Löslichkeit der Sphingolipide, Ceramid 3, Ceramid 3B und Phytospingosin zu verbessern.

Material und Methoden

Tab. 5.2.1: Zusammensetzung der Nanoemulsionen zur Optimierung der Homogenisations- und Formulierungsparameter

Bestandteil	Konzentration (% m/m)	Eigenschaft
<i>Ölphase</i>		<i>Dispergierte Phase</i>
Eutanol G	20 *	Kosmetisches Öl
Lipoid E-80®	0,5, 1, 1,5, 2 , 3	Lipophiles Emulgatorgemisch
Myristinsäure	0,6	Koemulgator
Phytosphingosin	0,2, 0,4, 0,5, 0,6 , 0,7, 0,8	Koemulgator
Ceramid 3B	0,1, 0,2 , 0,3, 0,5	Verwandtes Stratum-corneum-Lipid
Ceramid 3	0,1, 0,2 , 0,3, 0,5	Stratum-corneum-Lipid
Palmitinsäure	0,1, 0,2 , 0,3, 0,5	Stratum-corneum-Lipid
Cholesterol	0,1, 0,2 , 0,3, 0,5	Stratum-corneum-Lipid
Vitamin E	0,03	Antioxidationsmittel
Ethanol	2	Kosolvenz
<i>Wasserphase</i>		<i>Disperse Phase</i>
Tween 80®	0,5, 1, 1,5, 2 , 3	Hydrophiler Emulgator
Glycerol	2,5	Feuchthaltemittel
Kaliumsorbat	0,1	Konservierungsmittel
Carbopol 940	0,3	Gelbildner
Wasser zu	100	Bidestilliertes Wasser
pH-Wert	5, 5,5 , 6, 6,5, 7, 8	

*die fett gedruckten Zahlen zeigen die Konzentrationen der jeweiligen Bestandteile, die bei der Optimierung der Homogenisations- und Formulierungsparameter konstant waren, während die Konzentrationen der anderen Bestandteile variiert wurden

Tab. 5.2.2: Homogenisationsparameter des Hochdruckhomogenisators zur Optimierung der Nanoemulsionen

Homogenisationsparameter	
Homogenisationstemperatur (°C)	25, 50 , 75, 90
Homogenisationsdruck (bar)	300, 500 , 700
Zahl an Homogenisationszyklen*	1, 3, 5, 8 *, 10

*8 Zyklen bedeuten, dass die Voremulsion mit Hilfe des Kolbens 8 mal durch den Spalt des Hochdruckhomogenisators gedrückt wurde; die fett gedruckten Zahlen zeigen die Parameter an, die konstant gehalten wurden, während die anderen variierten

Für die in-vivo-Hautstudie wurden folgende halb feste Formulierungen eingesetzt:

Tab. 5.2.3: Zusammensetzung der halbfesten Nanoemulsionszubereitungen für die in-vivo-Hautstudien

Bestandteile	Zusammensetzung der Nanoemulsions-Cremes (% m/m)		
	PPNSC	MNNSC	PPN
<i>Ölphase</i>			
Eutanol G	20	20	20
Lipoid E-80®	2	2	2
Phytosphingosin	0,6	-	0,6
Myristinsäure	-	0,6	-
Ceramid 3B	0,2	0,2	-
Ceramid 3		0,2	-
Palmitinsäure	0,2	0,2	-
Cholesterol	0,2	0,2	-
Ethanol	-	2	-
Vitamin E	0,03	0,03	0,03
<i>Wasserphase</i>			
Tween 80®	2	2	2
Glycerol	2,5	2,5	2,5
Kaliumsorbat	0,1	0,1	0,1
Carbopol 940	0,3	0,3	0,3
Wasser ad	100	100	100

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

5.3 Herstellung der Miconazolnitrat-haltigen Nanoemulsionen zur dermatologischen Anwendung

Zur Herstellung der Miconazolnitrat-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen (PPNM) und durch Myristinsäure negativ geladene Nanoemulsionen (MNNM) (Tab. 5.3) wurde wie im Abschnitt 5.2 verfahren, wobei die Stratum-corneum-Lipide und das Ceramid 3B durch das Antimykotikum Miconazolnitrat ersetzt wurden.

Tab. 5.3: Zusammensetzung der Nanoemulsionen zur Optimierung der Homogenisations- und Formulierungsparameter

Bestandteil	Konzentration (% m/m)	Eigenschaft
<i>Ölphase</i>		<i>Dispergierte Phase</i>
Eutanol G	20	Kosmetisches Öl
Lipoid E-80 [®]	0,5, 1, 1,5, 2 , 3	Lipophiles Emulgatorgemisch
Phytosphingosin	0,2, 0,4, 0,5, 0,6 , 0,7, 0,8	Koemulgator
Myristinsäure	0,6	Koemulgator
Miconazolnitrat	0,1, 0,2, 0,3, 0,4 0,5	Antimykotikum
Ethanol	2	Kosolvenz
Vitamin E	0,03	Antioxidationsmittel
<i>Wasserphase</i>		<i>Disperse Phase</i>
Tween 80 [®]	0,5, 1, 1,5, 2 , 3	Hydrophiler Emulgator
Glycerol	2,5	Feuchthaltemittel
Kaliumsorbat	0,1	Konservierungsmittel
Wasser zu	100	Bidestilliertes Wasser
pH-Wert	5, 5,5 , 6, 6,5, 7, 8	

*die fett gedruckten Zahlen zeigen die Konzentrationen der jeweiligen Bestandteile an, die bei der Optimierung der Homogenisations- und Formulierungsparameter konstant waren, während die Konzentrationen der anderen Bestandteile variiert wurden

5.4 Charakterisierung der Nanoemulsionen

5.4.1 Photonenkorrelationsspektroskopie

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren. Als Ergebnis erhält man zum einen den PCS-Durchmesser (mittlerer Teilchen- bzw. Tröpfchendurchmesser) der Probe im Messbereich von 5 nm bis 3 µm [Komatsu et al. 1997], zum anderen den Polydispersitätsindex, der ein Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung ist (Tab. 5.4.1). Das Messverfahren erfasst Schwankungen in der Intensität gestreuten Laserlichtes, die durch ungerichtete Bewegung dispergierter Teilchen verursacht werden [Müller und Schumann 1996].

Die Messungen erfolgten mit einem Zetasizer 4 (Malvern, Instruments, UK). Um Mehrfachstreuungen zu vermeiden, wurden 10 µl Proben mit 10 – 20 ml bidestilliertem Wasser, das 0,1 % Tween 80 und 1 % Glycerol 86 – 88 % enthielt, auf ideale Streulichtintensität verdünnt.

Tab. 5.4.1: Einteilung der Größenverteilungsbreite anhand des Polydispersitätsindex nach Müller und Schuhmann [1996]

Polydispersitätsindex	Größenverteilung
0,03 bis 0,06	unimodal
0,10 bis 0,20	eng
0,25 bis 0,50	breit
über 0,50	multimodal

5.4.2 Laserdiffraktometrie

Grundlage der Laserdiffraktometrie (LD) ist die Beugung des Lichts an dispergierten Teilchen [Müller und Schumann 1996]. Zur Auswertung der Partikelgrößen und -verteilungen wurde die Mie-Theorie herangezogen, bei der die Kenntnis eines realen Brechungsindex und eines Absorptionswerts (=imaginärer Brechungsindex) der dispergierten Teilchen notwendig ist. Nach Müller und Schuhmann [1996] wurde für alle Messungen ein realer Brechungsindex von 1,46 und ein imaginärer Brechungsindex von 0,001 angenommen.

Für die durchgeführten Messungen wurde ein Coulter LS 230 verwendet. Dieses Gerät ist mit der Polarization Intensity Differential Scattering Technology (PIDS) ausgestattet und erweitert den gewöhnlichen Messbereich von 100 bis 2000 μm im unteren Bereich bis auf 40 nm. Die Messungen wurden im wässrigen Dispersionsmedium, das 0,1 % Tween 80 und 1 % Glycerol 86 – 88 % enthielt, durchgeführt. Die notwendigen Volumina, die benötigt wurden, um eine ausreichende Intensität des gestreuten Lichts detektieren zu können, waren von der vermessenen Probe abhängig. Die Volumenverteilungen werden in Abhängigkeit vom Durchmesser der Teilchen angegeben. So bedeutet der LD-Durchmesser d_{99} %, dass 99 % der detektierten Teilchen einen kleineren Durchmesser als den genannten hatten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwar LD-Durchmesser bestimmt, aber diese in dieser Dissertationsanfertigung aufgrund der sehr kleinen Tröpfchen ($d_{100} \% < 1\mu\text{m}$) mit enger Tröpfchengrößenverteilung nur selten aufgeführt.

5.4.3 Zetapotenzial

Das Zetapotenzial (ξ) beschreibt die Oberflächenladung von partikulären Systemen, wie z.B. Emulsionen und Suspensionen. Es ist definiert als das unter Einwirken eines elektrischen Feldes an der Scherebene messbare Potenzial eines diffundierenden Teilchens.

Die Bestimmung des Zetapotenzials erfolgt nach dem Prinzip der Laser Doppler Anemometrie [Müller 1996]. Die Messungen erfolgten mit einem Zetasizer 4 (Malvern Instruments, UK) in bidestilliertem Wasser, das mit 0,1 % HCl- oder NaOH-Lösung und mit physiologischer Kochsalzlösung ergänzend auf den entsprechenden pH-Wert (pH-Meter: Modell pH 522, WTW, Deutschland) (Tab. oben) und auf eine Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Konduktometer: Modell LF 537, WFT, Deutschland) eingestellt wurde, da für das Verdünnungsmedium Wasser, je nach

Aufbereitungszeit und Standzeit, Schwankungen in der Leitfähigkeit auftreten können. Schon geringe Schwankungen können zu Fehlern in der Zetapotenzialmessung führen [Müller 1996].

Die Langzeitstabilität der optimierten PPNSC wurde durch Bestimmung des Zetapotenzials, der mittleren Tröpfchengröße, des Polydispersitätsindex und des d_{99} %-Durchmessers über einen Zeitraum von sechs Monaten untersucht.

5.4.4 Kryo-Elektronenmikroskopie

Um Strukturinformationen von Objekten, die ihre Raumstruktur ausschließlich in einer wässrigen Umgebung einnehmen, in ihrem nativen, hydratisierten Zustand zu erhalten, müssen Dehydratations-, Kristallisations- und Neuordnungseffekte auf molekularer Ebene vermieden werden. Durch rasches Einfrieren in geeigneten Kühlmitteln bei Abkühlraten von $\sim 10^4$ K/s können ultradünne Probenschichten in ihrem nativen Zustand durch amorphe Verfestigung des Lösungsmittels („Vitrifikation“) fixiert werden [Adrian et al. 1984, Dubochet et al. 1988]. Die Objekte, die in eine feste, glasartigen ultradünne Schicht des Lösungsmittels (100-200nm) eingebettet sind, können mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop unter Anwendung des Phasenkontrastverfahrens (= Defokussierung der Objektivlinse) relativ kontrastreich abgebildet werden [Lin et al. 2002, Danino et al. 2003]. Es sind in der Regel keine zusätzlichen Kontrastmittel notwendig. Durch fortwährende Kühlung des Präparates (94 K) während der Bildaufzeichnung wird die native Struktur bewahrt und auch der Strahlenschaden reduziert.

Zur Probenvorbereitung wird ein Tropfen der Probe (5 μ l) auf ein mit hydrophilisierter Lochfolie (= perforierter Kohlefilm, Lochgröße = 1 μ m) überzogenes Trägernetz (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena) aufgebracht und der flüssige Überstand solange mit einem Filterpapier abgesaugt, bis nur noch eine ultradünne Schicht der Probenflüssigkeit (100 – 200nm) die Löcher des Kohlefilms überspannt. Die Hydrophilisierung des Kohlefilms vor Aufbringen der Probe erfolgte durch Plasmabehandlung für 60 Sekunden bei 8 Watt in einer BALTEC MED 020 Apparatur (BALTEC, Liechtenstein).

Die präparierten Trägernetze wurden unter Verwendung einer CEVS-Apparatur in flüssiges Ethan an seinem Gefrierpunkt (90 K) eingeschossen. Bei der CEVS-Apparatur („Controlled Environment Vitrification System“) handelt es sich um eine Guillotine-funktionsähnliche Einschussapparatur, die zusätzlich über ein feuchtigkeits- und temperaturkontrolliertes Kammersystem verfügt, mit dessen Hilfe temperatur- und eintrocknungsbedingte Effekte vermieden werden [Bellare et al. 1988]. Die vitrifizierten Proben wurden anschließend unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Gatan Kryopräparathalters (Model 626, Gatan Inc., Kalifornien, USA) in ein Philips CM12-Transmissionselektronenmikroskop (FEI Company, Oregon, USA) eingebracht. Mikroskopiert wurde bei einer Proben temperatur von 94 Kelvin unter Verwendung der Low-Dose-Steuerung des Mikroskops bei einer Primärvergrößerung von 58300x. Es wurde eine LaB₆-Kathode als Strahlquelle bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV verwendet. Zur Erzeugung des Phasenkontrastes wurde ein Defokus von 1,2 μ m eingestellt, was einem ersten Nulldurchgang der Phasenkontrastübertragungsfunktion bei 2,1 nm entspricht.

5.4.5 DSC

Die DSC wurde zur Charakterisierung der Schmelzpunkte der Sphingolipide, Ceramid 3, Ceramid 3B und Phytosphingosin, und der Wechselwirkungen zwischen den Lipiden und den lipophilen Emulgatorgemischen, Lipoid E 80[®] und Lipoid E 80-3[®], im Eutanol G verwendet. Zur Schmelzpunktbestimmung wurden die einzelnen Substanzen in 40 µl-Aluminiumtiegel genau eingewogen. Für die Charakterisierung der Interaktion wurden die Lipide im Eutanol G mit und ohne den lipophilen Emulgatorgemischen im Verhältnis 10 : 0,3 : 0,1 : 0,1 : 0,1 : 0,1 [:1] (EutanolG : Phytosphingosin : Ceramid 3 : Ceramid 3B : Palmitinsäure : Cholesterol [: Lecithin]) eingewogen. Nach der Einwaage wurden die Tiegel verschlossen, mit einem feinen Loch versehen und anschließend mit der DSC 821e (Mettler-Toledo, Giessen) analysiert. Die Proben wurden bei 100 °C 10 Minuten vorgeheizt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden sie mit einer Heizrate von 10 Kelvin/Minute von 0 °C auf 100 °C (Bestimmung der Interaktion der Lipide im Öl) oder 30 °C bis 200 °C (Schmelzpunktbestimmung) erhitzt. Ein leerer Aluminiumtiegel diente als Referenz. Der Ofen wurde mit 80 ml Stickstoff/ Minute umspült.

Die Rekristallisationstemperaturen von Ceramid 3, Ceramid3B und Phytosphingosin in den kosmetischen Ölen (Abschnitt 4.1) wurden ebenfalls mittels DSC bestimmt. Dabei wurden 0,5 % der Sphingolipide auf 125 °C erhitzt und anschließend mit einer Rate von 10 Kelvin/Minute abgekühlt. Die Rekristallisationstemperatur entsprach dem Maximum des Rekristallisationspeaks.

5.4.6 Löslichkeit der Arzneistoffe in den Nanoemulsionen

5.4.6.1 Sphingolipide

Die Löslichkeit der Sphingolipide, Phytosphingosin, Ceramid 3 und Ceramid 3B, in der Ölphase der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion wurde bestimmt, indem feste Mengen (0,05 %-Abstände) an Phytosphingosin oder an äquimolaren Konzentrationen von Ceramid 3 und 3B sukzessiv in die Ölphase der positiv geladenen Nanoemulsionen hinzugefügt wurden. Die Löslichkeit in der Ölphase wurde definiert als die maximale Phytosphingosin- oder Ceramid 3- und Ceramid 3B-Konzentration, bei der eine Woche lang weder punkt- oder nadelförmige Kristalle noch feine Fasern beobachtet werden konnten. Zur Detektion der Kristalle wurde ein Mikroskop mit polarisiertem Licht verwendet (Axioskop, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) oder ein Mikroskop mit Heiztisch bis 50°C (Biokulares Mikroskop FBH - MIC 2520, Beyersdörfer GmbH, Mandelbachtal).

5.4.6.2 Miconazolnitrat

Zur Bestimmung der Löslichkeit des Miconazolnitrats in der Ölphase der durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion wurden die Vitamin E-haltigen Ölphasen, die variierende Mengen an Phytosphingosin und Lipoid E 80[®] enthielten, mit Arzneistoff gesättigt. Diese gesättigten, öligen Lösungen (5 ml) wurden 24 Stunden bei 100 Bewegungen/min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie 30 Minuten bei 3000 Umdrehungen/min

zentrifugiert. 0,5 ml des Filtrats wurden mit Isopropanol 1:10 und danach mit Methanol 1:100 verdünnt. Schließlich erfolgte die Bestimmung der Miconazolnitratmenge mit Hilfe der HPLC.

Die Bestimmung der Miconazolnitratmenge in den Nanoemulsionen erfolgte nach Verdünnung mit Isopropanol (1:10) und Methanol (1:10) und anschließender Bestimmung des Arzneistoffgehalts mittels HPLC. Die ermittelten Miconazolnitrat-Konzentrationen in g Arzneistoff / ml PPNM wurden mit Hilfe der Dichte der miconazolnitrathaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen (0,971 g/ml) in g Miconazolnitrat / g PPNM umgerechnet.

5.4.7 Viskosität

Die Viskositäten der halbfesten Zubereitungen wurden mit einem Platte-Kegel Rotationsviskosimeter (Haake RH101, Thermo Haake GmbH, 76227 Karlsruhe) bei einem Winkel von 4°, einer konstanten Schergeschwindigkeit von 20 Umdrehungen/Minute und einer Temperatur von 25 °C bestimmt.

Die Bestimmung der Viskositäten der Ölphase der lipidhaltigen, positiv geladenen Nanoemulsion erfolgte mit einem Kugel-Fall-Viskosimeter (Haake Technik GmbH, Vreden). Die Viskositäten (η) wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\eta = t \cdot (\rho_1 - \rho_2) \cdot K$$

t : Fallzeit (s)

ρ_1 : Dichte der Kugel (2.392 g/ml)

ρ_2 : Dichte der Ölphase der lipidhaltigen, positiv geladenen Nanoemulsion (0.855 g/ml bei 25 °C und 0.840 g/ml bei 50 °C; bestimmt mit einem Densitometer DMA 38 (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich))

K : Gerätekonstante (0,0586)

5.4.8 Agar-Diffusionstest

Zur Untersuchung der Wirksamkeit der miconazolnitrathaltigen Formulierungen wurde ein Agar-Diffusionstest durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Pilzkultur mit definierter Keimzahl (*Candida albicans* ATCC mit 10^8 Keimen/ml) angelegt. 1,25 ml Pilzkultur wurde durch Rühren gleichmäßig auf Platten mit 50 ml erwärmten Agar (Antibiotic Medium I von der Firma Difco) verteilt. Zur Einbringung der Zubereitungen wurden 10 Löcher pro Platte mit einem Durchmesser von 10 mm ausgestanzt. Nach Einpipettieren von 50 μ l miconazolnitrathaltiger Formulierungen in die Ausstanzungen wurden die Platten 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Um die Ausstanzungen bildeten sich aufgrund der Anwesenheit des Antimykotikums Hemmhöfe ohne Pilzwachstum aus. Das Ausmaß der antimykotischen Wirkung der verschiedenen Zubereitungen zeigte sich dabei am jeweiligen Durchmesser der Hemmhöfe. Je stärker die antimykotische Wirkung, desto größer war der gebildete Hemmhof.

Getestet wurden die negativ geladenen, Lipoid E 80[®]-freien und -haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen mit Miconazolnitrat in den Konzentrationen 0,001 – 0,5 % (Tab. 5.4.8). Als Vergleich wurde ebenfalls die ethanolhaltige Miconazolnitrat-Lösung aus dem NRF 11.80 verwendet (Abschnitt 4.6.2), die unter anderem Miconazolnitrat in den Konzentrationen 0,001 – 0,5 % enthielt.

Tab. 5.4.8: Zusammensetzung der Formulierungen für den Agar-Diffusionstest

Bestandteile	Zusammensetzung der Nanoemulsionen (g)		
	PPNM	MNNM	PPNM ohne Lipoid E 80 [®]
<i>Ölphase</i>			
Eutanol G	20	20	20
Lipoid E-80 [®]	2	2	-
Phytosphingosin	0,6	-	0,6
Myristinsäure	-	0,6	-
Ethanol	-	2	2
Miconazolnitrat	0,001 – 0,5	0,001 – 0,05	0,001 – 0,5
Vitamin E	0,03	0,03	0,03
<i>Wasserphase</i>			
Tween 80 [®]	2	2	2
Glycerol	2,5	2,5	2,5
Kaliumsorbat	0,1	0,1	0,1
Wasser zu	100	100	100

PPNM: miconazolnitrathaltige, positiv geladene Nanoemulsion; MNNM: miconazolnitrathaltige, negativ geladene Nanoemulsion

5.4.9 Dermales Irritationsmodell

Irritationen, die nach topischer Anwendung von Arzneistoffen und/oder Zubereitungen auftreten, können sich je nach Stärke in Rötung, Erythem- und Ödembildung, sowie Schuppungen und Fissuren, die mit Schmerzen einhergehen, äußern. Oft laufen daneben auch entzündliche Prozesse ab.

Zur Bestimmung der Irritationspotenziale miconazolnitrathaltiger Formulierungen diente das sogenannte „dermale Irritationsmodell (Dermal Irritection Assay)“, welches von der Firma In vitro International (Irvine, USA) entwickelt und für diese Arbeit einmalig mit begrenzter Zahl an Zubereitungen durchgeführt wurde. Dabei handelt es sich um ein Zwei-Kompartiment-Modell, mit dem aufgrund makromolekularer Veränderungen das irritative Potenzial getesteter Arzneistoffe oder Zubereitungen vorhergesagt werden kann.

Die im vorigen Abschnitt verwendeten Formulierungen (s.o. 5.4.8) und eine Placebo-Nanoemulsion, der im Gegensatz zu den positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen der Arzneistoff und das Phytosphingosin bzw. Myristinsäure fehlt wurden mit einer Konzentration

von 0,5 % Miconazolnitrat in verschiedenen Volumina (25 – 125 µl) auf eine semipermeable Membran aufgebracht. Diese enthält eine Keratin-Kollagen-Matrix, die mit einem roten Farbstoff überzogen ist (erstes Kompartiment). Diffundieren Bestandteile der Zubereitung in und durch die Matrix, kommt es zu Interaktionen, die zu unterschiedlich starken Proteindenaturierungen und letztendlich zur Freisetzung des Farbstoffes führen. Nach Diffusion durch die gesamte Matrix treten Bestandteile der Formulierung (u.a. der Arzneistoff) in das zweite Kompartiment über. Dieses besteht aus einer Pufferlösung, die hochgeordnete Globuline und Glykoproteine enthält. Eine Reaktion der Substanzen der Formulierungen mit diesen Proteinen und makromolekularen Komplexen ruft Konformationsänderungen hervor, die als zunehmende Trübung detektierbar werden. Die Summe aus Farbstofffreisetzung und Trübung wurde nach 24 Stunden fotometrisch bei 450 nm gemessen. Der dadurch erhaltene Wert wird nach Multiplikation mit dem Faktor 1000 als OD₄₅₀-Wert (OD = optische Dichte gemessen bei 450 nm) angegeben.

Das dermale irritative Potenzial einer Zubereitung wird durch den Human Irritancy Equivalent (HIE)-Score ausgedrückt. Hierzu wurden mit Hilfe bekannter irritativer Substanzen eine Kalibrierfunktion aufgenommen, in der jedem OD₄₅₀-Wert einer Substanz ein HIE-Score zwischen 0 und 5 zugeordnet wurde (Abb. 5.4.9). Dabei wurden HIE-Scores von 0 - 0,90 als nicht irritierend und 1,21 - 5,00 als irritierend klassifiziert (Tab. 5.4.9). Das Irritationspotenzial dieser Substanzen wurde während der Entwicklung des Assays durch die Firma In Vitro International von über 100 Probanden bewertet.

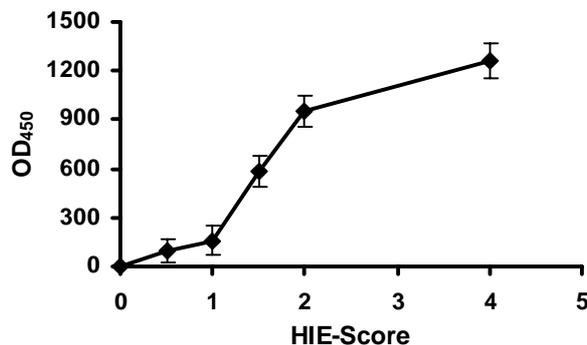


Abb. 5.4.9: Kalibrierfunktion zur Bestimmung des HIE-Scores ($\bar{x} \pm s$ mit $n = 20$)

Tab. 5.4.9: Bewertungsschema zur Vorhersage des Irritationspotenzials

HIE-Score	Klassifizierung
0,00 – 0,90	Nicht irritierend
0,91 – 1,20	Grenzbereich
1,21 – 5,00	Irritierend

Die in vitro/(Human) in vivo-Korrelation dieses Modells wurde von Bason et al. [1992] für vier irritative Stoffe (Benzalkoniumchlorid, Salzsäure, Phenol und Trichloressigsäure) untersucht. Dabei wurde der von gesunden Probanden angegebene Score mit den mit diesem Assay erhaltenen OD₄₅₀-Werten verglichen. In allen Fällen wurden gute bis sehr gute

Korrelationskoeffizienten erzielt. Eine weitere Studie [Gordon et al. 1990] zeigte, dass die Irritationsdaten dieses Assays in 89 % aller Fälle mit in vivo Draize-Test-Daten am Kaninchen korrelierten. Bei diesem umstrittenen, aus tierethischen Gründen höchst problematischen Test zur Bewertung von kosmetischen Inhaltsstoffen werden den Kaninchen Chemikalien in die Augen geträufelt und der Verätzungsgrad subjektiv durch Betrachtung beurteilt. Somit stellt das dermale Irritationsmodell eine gute Alternative für in-vivo-Untersuchungen zur Beurteilung von Irritationspotenzialen von topisch applizierten Substanzen dar.

5.4.10 Phospholipidhaltiger Assoziatanteil

Nanoemulsionen enthalten einen lipophilen Ölkern, der an der O/W-Grenzfläche zum Wasser von einem Monolayer aus Phospholipiden umgeben ist [Schoeßl 1986]. Während der Herstellung von Nanoemulsionen diffundieren ständig Phospholipide, deren Konzentration meist oberhalb ihrer kritischen Mizellkonzentrationen liegt und die daher als schlecht öllösliche Assoziate (u.a. Mizellen, Liposomen) in der Wasserphase gebunden vorliegen, nach Desaggregation dieser Assoziate an die neu entstehenden, durch Energiezufuhr größer werdenden Grenzflächen [Schubert und Armbruster 1989], um diese Energie zu reduzieren. Somit existieren in der Wasserphase bei der Herstellung von Nanoemulsionen durch Hochdruckhomogenisation aufgrund der Anwesenheit von Phospholipiden und deren begrenzter Löslichkeit im Ölkern kolloiddispers verteilte, assoziierte Strukturen, die unerwünscht sind. Das Ausmaß der Bildung von Assoziaten in Nanoemulsionen ist folglich u.a. von der Art und Konzentration des phospholipidhaltigen Emulgators [Ferezou et al. 1994] abhängig.

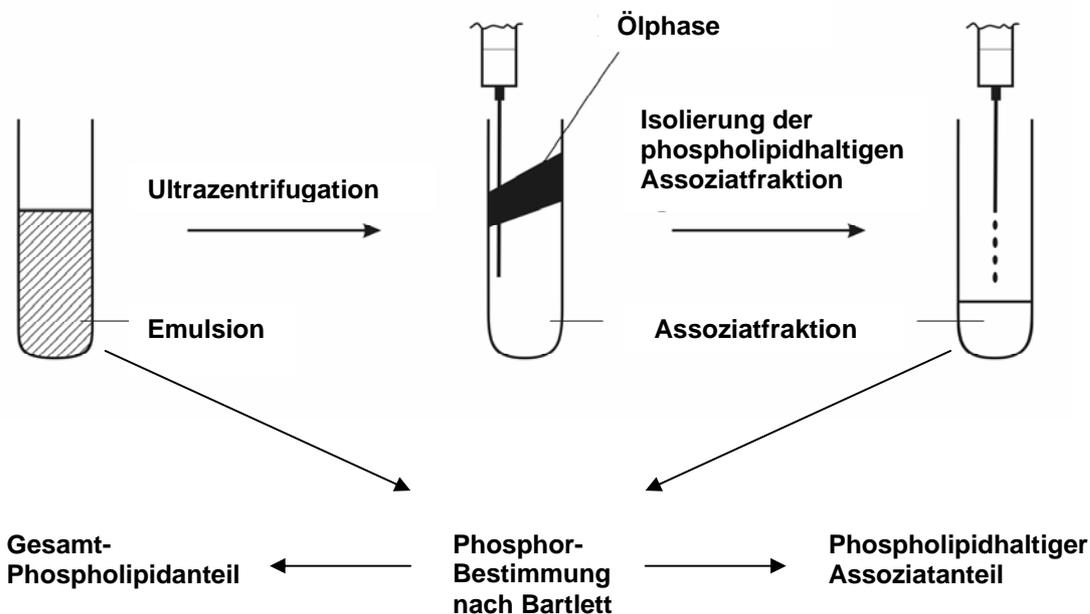


Abb. 5.4.10: Vorgehensweise zur quantitativen Bestimmung des phospholipidhaltigen Assoziatanteils der Nanoemulsionen

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des phospholipidhaltigen Emulgators Lipoid E 80[®] auf die Assoziatbildung in den lipid- und miconazolnitrathaltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen untersucht. Hierzu wurden die Nanoemulsionen einer Ultrazentrifugation unterzogen (Abb. 5.4.10). Nach 20 minütiger Zentrifugation von 2 ml Emulsion bei 150000 g wurden zwei Phasen erhalten. Die obere Phase mit geringer Dichte bildete eine Ölphase, die aus den Nanoemulsionströpfchen bestand, und die Assoziat befanden sich unter der Ölphase in der äußeren Wasserphase kolloiddispers verteilt und konnten mit Hilfe einer Kanüle entnommen werden. Anschließend wurde der Phospholipidgehalt bzw. Phosphorgehalt dieser entnommenen Fraktion und der Nanoemulsion nach der Bartlett-Methode bestimmt. Das Verhältnis dieser beiden Werte wurde als prozentualer phospholipidhaltiger Assoziatanteil angegeben, der nach Ultrazentrifugation ermittelt wurde. Dieser gibt zwar nicht den tatsächlichen Anteil der Assoziat in den Nanoemulsionen wieder, doch können Tendenzen aufgezeigt werden.

Bei der Bartlett-Methode wurden zunächst 80 µl Emulsion zu 1 ml mit destilliertem Wasser verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden in phosphatfreien Reagenzgläsern unter Zusatz von 0,5 ml 10 N H₂SO₄ 3 Stunden bei ca. 160°C im Trockenschrank verascht. Nach Addition von 4 Tropfen H₂O₂ erfolgte eine weitere 1,5 stündige Veraschung. Anschließend wurden 4,6 ml Ammoniummolybdatlösung und 0,2 ml einer Reducerlösung zugegeben. Die Reagenzgläser wurden mit Murmeln verschlossen und für 10 Minuten in einen auf 95 °C vorgeheizten Heizblock gestellt. Es bildete sich ein blau gefärbter Komplex, dessen Absorption UV-fotometrisch bei 700 nm gemessen wurde.

Mit der verwendeten Standardlösung, die 1 mMol/L Phosphor, 2 % (m/m) Tween 80, 2,5 % (m/m) Glycerol, 0,1 % (m/m) Kaliumsorbat enthielt, wurde eine Kalibriergerade erstellt. Die resultierende Kalibriergerade mit $y = 0,0734x + 0,0006$, $R^2 = 0,9999$ war über den Bereich von 1,4 – 12 µg Phosphor linear.

5.4.11 Verteilungskoeffizient von Miconazolnitrat in den Nanoemulsionen

Ein Arzneistoff verteilt sich in einem zweiphasigen System, das aus einer hydrophilen und lipophilen Phase besteht, entsprechend seiner eigenen Hydro- bzw. Lipophilie zwischen diesen beiden Phasen, bis sich ein Verteilungsgleichgewicht einstellt. Diese Verteilung kann als Nernst-Verteilungskoeffizient angegeben werden:

$$\log K = \log \frac{c_{\text{org}}}{c_{\text{hydr}}}$$

K : Nernst-Verteilungskoeffizient

c_{org} : Konzentration des Arzneistoffes in der lipophilen Phase

c_{hydr} : Konzentration des Arzneistoffes in der hydrophilen Phase

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten des Miconazolnitrats (0,5 %) in den positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen wurden 2 ml der Formulierungen einer Ultrazentrifugation

(20 Minuten bei 150000 g) unterworfen. Aus der oberen und unteren Phase wurden 250 µl entnommen und der Gehalt an Miconazolnitrat mit Hilfe der HPLC-Analytik (Abschnitt 5.4.14) bestimmt. Diese entsprachen der Arzneistoffkonzentration in der äußeren Wasserphase bzw. der inneren Ölphase.

5.4.12 Freisetzung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Freisetzungsuntersuchungen aus den im Abschnitt 5.4.8 aufgeführten Formulierungen und der Ölphase der positiv geladenen Nanoemulsion mit Hilfe der Franz-Diffusionszelle, bei der das Donatorkompartiment von der Akzeptorflüssigkeit durch eine Nephrophan[®]-Membran mit einem Porendurchmesser von ca. 10 nm getrennt wurde. Diese Zellen, die eine effektive Diffusionsfläche von 2,01 cm² und ein Akzeptorvolumen von 7 ml besaßen, wurden durch einen Wassermantel (37 °C) auf 32 °C (Temperatur an Membran) temperiert. Um im geschlossenen System kumulativ zu arbeiten und dabei Sink-Bedingungen einzuhalten, wurde als Akzeptorflüssigkeit eine Mischung aus 70 % (v/v) Ammoniumphosphat-Puffer (pH = 4,6) und 30 % (v/v) Propylenglykol verwendet. Die Akzeptorflüssigkeit wurde während der Freisetzungsuntersuchungen konstant durch einen Rührmagneten bei 250 U/min gerührt. Die okklusiven Untersuchungen erfolgten durch Abdecken der Franzzellenöffnung mit Parafilm[®], wodurch ein Austausch mit der Atmosphäre verhindert wurde.

Es wurden jeweils 150 µl von den Formulierungen aufgetragen (entsprechend einer Arzneistoffmenge von 450 µg auf 2,01 cm²). Nach bestimmten Zeiten wurden jeweils 200 µl Akzeptorflüssigkeit entnommen und diese ohne weitere Behandlung mittels HPLC vermessen. Das Akzeptormedium wurde mit 200 µl temperierter Akzeptorflüssigkeit aufgefüllt. Am Ende der Freisetzungsuntersuchungen wurden die Membranen mit den aufgetragenen Formulierungen vorsichtig in Zentrifugengläser mit 5 ml Akzeptormedium eingetaucht und einer Zentrifugation (30 Minuten bei 3000 U/min) unterworfen. Nach Zentrifugation wurde die Konzentration im Überstand mittels HPLC ermittelt, um dadurch die auf der Membran verbliebene Miconazolnitratmenge zu bestimmen. Die Wiederfindungsrate (Verhältnis aus gefundenem und tatsächlichem Gehalt) betrug bei allen durchgeführten Experimenten größer 90 %.

5.4.13 Penetration und Permeation

Zur Untersuchung der Penetrationen wurden die im Abschnitt 5.4.12 verwendeten Formulierungen und Franz-Diffusionszellen eingesetzt. Anstelle der künstlichen Membran wurde hier exzidierte Humanbauchhaut verwendet. Dieser Haut, die von Patientinnen zwischen 35 und 40 Jahren maximal 24 Stunden vorher chirurgisch entfernt wurde, wurde das subkutane Fettgewebe mit Pinzetten und Scheren abgetrennt, anhaftendes Blut mit Phosphatpuffer entfernt und die Haut anschließend mit Zellstofftüchern trockengetupft. Aus diesen Hautfetzen wurde mit einem Lochisen (d = 20 mm) Hautproben ausgestanzt. Diese Hautproben wurden auf die Polycarbonatmembran von Nunc-Zellzuchteinsätzen (d = 48 mm, Nunc[®], Dänemark) gelegt und diese in Petrischalen (d = 50 mm) eingesetzt, die mit 1,5 ml einer Nährlösung (Dulbeccos Modified Eagles Medium) gefüllt wurden. Um die Viabilität der Haut zu gewährleisten, wurden

die Hautstücke bei 4 °C gelagert und die Penetrationsuntersuchungen innerhalb von drei Tagen abgeschlossen.

Diese Hautstücke wurden auf die mit Akzeptorflüssigkeit gefüllten Franz-Diffusionszellen gespannt. Nach einer Stunde wurden jeweils 160 µl von den Formulierungen aufgetragen (entsprechend einer Arzneistoffmenge von 480 µg auf 2,01cm²). Nach bestimmten Zeiten wurden jeweils 200 µl Akzeptorflüssigkeit entnommen und diese ohne weitere Behandlung mittels HPLC vermessen. Das Akzeptormedium wurde mit 200 µl temperierter Akzeptorflüssigkeit aufgefüllt. Am Ende der Untersuchungen wurde zur Bestimmung der in die Haut penetrierten Menge die Hautstücke vorsichtig von der Franz-Zelle entfernt. Anschließend wurden die Hautoberflächen von der Formulierung mit 30 ml (dreimal 10 ml) Akzeptormedium heruntergewaschen und die Miconazolnitratmenge mittels HPLC bestimmt. Nach vorsichtiger Trocknung mit Watte wurden die Hautstücke mit einem Ultra-Turrax homogenisiert, mit 10 ml Methanol versetzt und anschließend 24 Stunden bei 37 ± 1 °C in einem Inkubator bei 100 Bewegungen/min geschüttelt, um Miconazolnitrat aus der Haut vollständig zu extrahieren. Aus dem Filtrat wurde die Arzneistoffmenge in der Epidermis und Dermis mittels HPLC ermittelt. Die Wiederfindungsrate lag bei mehr als 80 %.

5.4.14 HPLC-Analytik

Zur quantitativen Bestimmung des Miconazolnitrats wurde eine HPLC-Methode mit folgenden in der Tabelle 5.4.14 aufgeführten Parametern verwendet [Piemi et al. 1999].

Tab. 5.4.14: Parameter und zugehörige Größen der verwendeten HPLC-Analytik von Miconazolnitrat

Parameter	Größe/Beschreibung
Vorsäule	LiChrospher [®] RP18, LiChroCart [®] 4-4 (Merck KgaA, Darmstadt)
Hauptsäule	LiChrospher [®] RP18, LiChroCart [®] 125-4 (5 µm) (Merck KgaA, Darmstadt)
Pumpe	L6200A (Merck Hitachi, Deutschland)
Injektionsvolumen	20 µl; Autosampler AS-2000A (Merck Hitachi, Deutschland)
Mobile Phase:	
Methanol	90 Teile
Ammoniumphosphat-Puffer (pH = 4,6)	10 Teile
Flussrate	1,5 ml/min
Temperatur	Raumtemperatur
UV-Detektion	230 nm; UV-Detektor L-4500 (Merck Hitachi, Deutschland)
Laufzeit	7 min
Retentionszeit	1,2 ± 0,2 min
Präzision (Variationskoeffizient; n = 6)	8,2 %
Nachweisgrenze	0,2 µg/ml

Die Bestimmung der unbekannt Konzentrationen erfolgte stets randomisiert zusammen mit bekannten Konzentrationen des in Methanol gelösten Miconazolnitrats, um die Präzision der Methode zu überprüfen. Die Präzision, die die Standardabweichung der Wiederholungsmessungen ($n=6$) darstellt, schloss die Probeneinwaage, Probenaufbereitung und die quantitative Analyse ein. Die Nachweisgrenze entsprach der Miconazolnitrat-Konzentration, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis 3:1 betrug. Zur Kalibrierung wurde eine Stammlösung mit genau definierter Konzentration von Miconazolnitrat in Methanol gelöst, zu bestimmten Konzentrationen verdünnt und anschließend die Peakfläche mittels HPLC bestimmt ($n = 6$). Die Linearität der Ergebnisse war mit $R^2 = 0,9996$ für den Konzentrationsbereich von 0,5 bis 50 $\mu\text{g/ml}$ gegeben (Abb. 5.4.14).

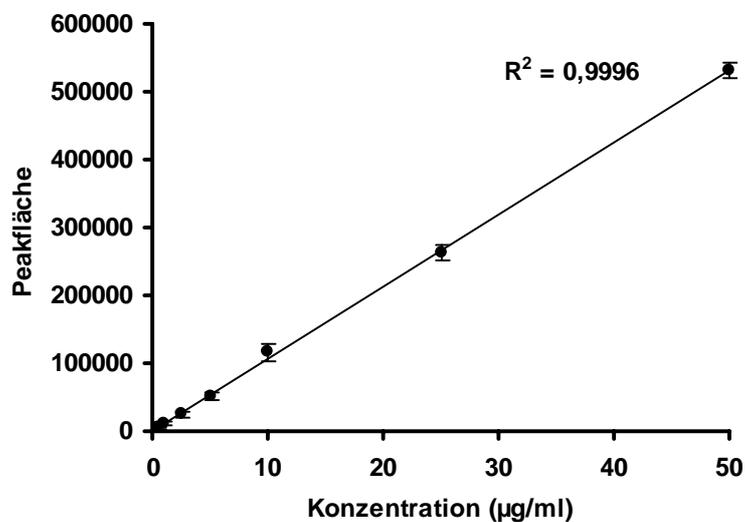


Abb. 5.4.14: Kalibriergerade von Miconazolnitrat in Methanol ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$).

5.5 In-vivo-Hautstudie

5.5.1 Hautfeuchtigkeit (Corneometer[®] 825)

Die Messung der Hautfeuchtigkeit erfolgte mit dem Corneometer[®] 825, das an einem Multi-Probe-Adapter[®] MPA5 (Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Köln) angeschlossen war und basierte auf einer kapazitiven Messmethode. Die Messung beruht auf der Tatsache sehr unterschiedlicher Dielektrizitätskonstanten von Wasser mit ca. $80 \text{ C}^2/\text{Nm}^2$ und den anderen meist organischen Stoffen ($\epsilon_r \leq 7 \text{ C}^2/\text{Nm}^2$), die sich in den obersten Hautschichten befinden. Wenn der Messkopf der Sonde kurz auf die Haut gedrückt wird, werden die obersten Hautschichten ($30 \mu\text{m}$) in das flächige, elektrische Streufeld des in der Sonde befindlichen Messkondensators eingebracht. Dieser reagiert auf die in sein Messvolumen eingebrachten oberen Hautschichten mit unterschiedlichen Kapazitätsänderungen, die vom Wassergehalt abhängig sind. Die Kapazitätsänderung des Messkondensators wird in einen dem Feuchtigkeitsgehalt der Haut proportionalen digitalen Messwert (arbitrary units) umgewandelt. Durch die kurze Messdauer von einer Sekunde werden Feuchtigkeitsstau sowie Beeinflussung der Ergebnisse durch

Bewegungen der Probandinnen verhindert. Je Messung wurden pro Testfeld fünf Einzelwerte auf verschiedenen Hautstellen aufgenommen und deren Mittelwert als Messwert gespeichert.

5.5.2 Hautelastizität (Cutometer[®] SEM 575)

Die Messung der Hautelastizität erfolgte mit dem Cutometer[®] SEM 575 (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Köln), bei der eine nicht-invasive Saugmethode angewandt wurde. Dabei wird ein Unterdruck erzeugt, der während der Messung einige Millimeter der obersten Hautschichten in die 2 mm breite Öffnung der Messsonde anzieht. Die Eindringtiefe der Haut in die Messsonde wird durch ein optisches Messsystem berührungslos erfasst. Das optische Messsystem besteht aus einem infraroten Lichtsender und einem Lichtempfänger sowie zwei gegenüberliegenden Glasprismen, die das Licht vom Sender zum Empfänger leiten. Das optische System misst die Abnahme der Lichtintensität des infraroten Lichtstrahls in Abhängigkeit der Eindringtiefe der Haut.

In dieser Arbeit wurde der Dehnungs-Zeit-Modus gewählt, der die Deformation der Haut als Funktion der Zeit bestimmt. Jede Messung, bei der ein konstanter Unterdruck von 450 mbar angelegt wurde, bestand aus fünf Messzyklen, die sich aus aufeinanderfolgenden Saug- (drei Sekunden) und Relaxationsphasen (drei Sekunden) zusammensetzten. Somit wurde der Parameter U_a/U_f bestimmt (Abb. 5.5.2).

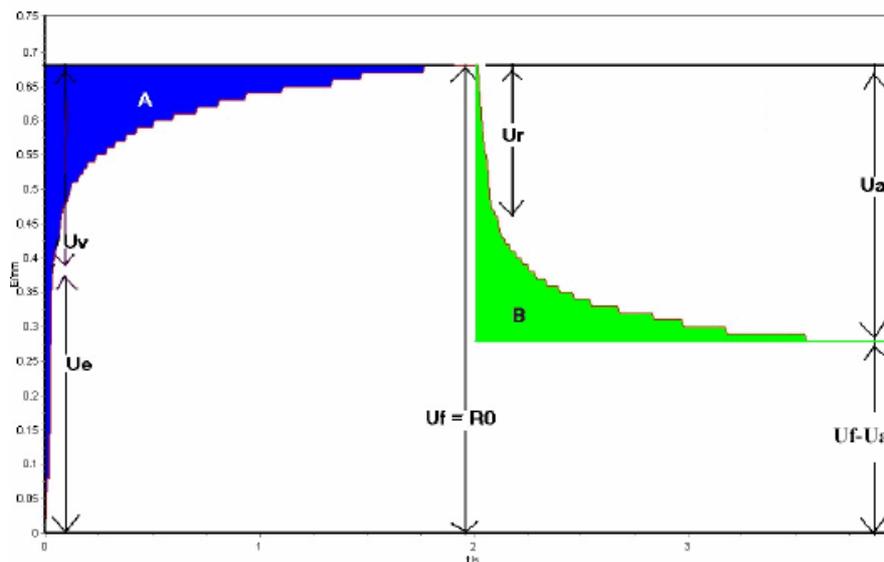


Abb. 5.5.2: Typischer Kurvenverlauf einer Cutometermessung mit bestimmten Deformationsparametern; dargestellt: Abhängigkeit der Eindringtiefe der Haut in die Messsonde von der Zeit; Fläche A (Saugphase) und Fläche B (Relaxationsphase) (Produktinformation Courage und Khazaka, Köln)

U_a/U_f ist ein relativer Deformationsparameter und stellt das Verhältnis zwischen maximaler Hautausdehnung im ersten Messzyklus (U_f) und der sofortigen Rückverformung (U_a) dar und wird als (Brutto)elastizität bezeichnet. Die Haut ist 100 %ig elastisch, wenn U_a/U_f den Wert eins

erreicht. Je Messfeld wurden an verschiedenen Hautstellen drei Wiederholungsmessungen vorgenommen und deren Mittelwert als Messwert verwendet.

5.5.3 Hautrötung (Mexameter® 18) und Hautverträglichkeit

Hautirritationen wurden visuell beobachtet. Jegliche Veränderung der Farbe oder der Struktur der Hautoberfläche wurde von den Probandinnen registriert. Die Erythemmessungen, die gleichzeitig Messungen des Hämoglobingehaltes darstellen, wurden fotometrisch mit dem Mexameter® 18 (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Köln) durchgeführt und basieren auf Remissionsmessungen. Die Messsonde sendet genau zwei definierte Wellenlängen (568 und 660 nm) aus, wobei eine Wellenlänge ungefähr den Hauptabsorptionsspitzen von Hämoglobin entspricht und die andere wird so gewählt, dass andere Farbeinflüsse (z.B. Bilirubin) möglichst ausgeschlossen werden. Ein Empfänger in der Sonde misst dann das von der Haut reflektierte Licht. Der Erythemwert (EW) wird von dem Gerät anhand folgender Formel berechnet: $EW = 1000 \cdot \log(\text{Rotremission} / \text{Grünremission})$. Jede Messung wurde pro Messfeld an fünf verschiedenen Hautstellen durchgeführt und gemittelt als Messwert gespeichert.

5.5.4 Studiendesign

Die drei Studien erfolgten einfachblind, randomisiert mit intraindividuell kontrolliertem Vergleich von zwei mit Prüfpräparaten behandelten Feldern und zwei unbehandelten Testfeldern auf den Unterarminnenseiten. An jeder Studie nahmen 14 gesunde, kaukasische Frauen im Alter zwischen (25 – 50 Jahren), die vorher mündlich zustimmten, teil. Sie applizierten über einen Zeitraum von 28 Tagen morgens und abends zwei Formulierungen (Tab. 5.5.4) auf die Unterarminnenseiten. Die Wahl der Applikation der Cremes auf die rechte oder linke Unterarminnenseite erfolgte randomisiert. Die Innenseiten beider Unterarme wurden dazu visuell in zwei Abschnitte geteilt. Auf den oberen Bereichen, die der Ellenbeuge am nächsten sind, wurden jeweils die Formulierungen aufgetragen und die unteren, handnahen Bereiche blieben unbehandelt und dienten als Kontrolle.

Tab. 5.5.4: Die in den Studien verwendeten Formulierungen

Studie	PPNSC-Cremes	Physiogel®-Cremes	PPN-Cremes	MNNSC-Cremes
1	√	√		
2	√		√	
3	√			√

PPNSC-Cremes: halb feste Zubereitungen aus lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen; PPN-Cremes: halb feste Zubereitungen aus lipidfreien, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen; MNNSC-Cremes: halb feste Zubereitungen aus lipidhaltigen, durch Myristinsäure negativ geladenen Nanoemulsionen

Die Messungen der Hauteigenschaften erfolgten jeweils zur gleichen Tageszeit vor der Applikation am Tag 0 (Basiswert), an den Tagen 14, 28 und ein und drei Tage nach der letzten Anwendung, an den Tagen 29 und 31. Dabei wurden die Cremes an den Tagen 14 und 28 morgens nicht appliziert. Die Probandinnen mussten sich sitzend in einem klimatisierten Raum bei einer Temperatur von $21 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von $50 \pm 5\%$ mindestens 15 Minuten akklimatisieren. Um die Compliance zu gewährleisten und zu überprüfen, wurden die Probandinnen ausführlich in die Produktanwendung eingewiesen, ihnen wurde ein Applikationsprotokoll mitgegeben, in das sie die Applikationszeiten eintragen mussten und am Anfang und am Ende der Studie wurden alle Kruken gewogen.

Zielgrößen für die Bewertung des Einflusses der Formulierungen auf die Hauteigenschaften waren die mittleren prozentualen Messparameter Hautfeuchtigkeit, -elastizität und -rötung der Prüfprodukte zu jedem Messzeitpunkt bezogen auf die Basiswerte (Tag 0) auf den zum selben Zeitpunkt gemessenen Mittelwert des jeweiligen unbehandelten Kontrollfeldes. Die mittlere prozentuale Messparameteränderung bzw. der Anstieg der mittleren prozentualen Messparameter durch Applikation der Cremes wurde folglich mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Messparameter [\%]} = (\overline{Q}_{tv} / \overline{Q}_{0v} - 1) \cdot 100$$

Messparameter : Veränderung (Anstieg) der Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität und Hautrötung zum Zeitpunkt t in %

t : Zeitpunkt

v : die an jeweils einer Studie teilgenommenen Probandinnen

\overline{Q}_{tv} : Mittelwert der Quotienten aus Messwerten der behandelten und der unbehandelten Felder aller Probandinnen einer Studie zum Zeitpunkt t

\overline{Q}_{0v} : Mittelwert der Quotienten aus Messwerten der behandelten und der unbehandelten Felder aller Probandinnen einer Studie vor der Anwendung am Tag 0

Somit wurde jeder gemessene Wert des behandelten Hautfeldes gegen das unbehandelte Feld des gleichen Tages und gegen den am Tag 0 gemessenen Basiswert verglichen.

5.5.5 Ex-vivo-Spreitfähigkeitsuntersuchungen

Je größer das Ausmaß der Spreitung einer Flüssigkeit auf einer festen Oberfläche ist, desto größer ist die Anziehung oder Adhäsion zwischen Flüssigkeit und Festkörper (Young-Dupré-Gleichung). Folglich kann die Spreitfähigkeit als ein Parameter zur Verdeutlichung des Ausmaßes der Interaktion zwischen den flüssigen O/W Nanoemulsionen und der festen Hautoberfläche herangezogen werden. Diese Wechselwirkung könnte das Penetrationsverhalten der Arzneistoffe entscheidend beeinflussen. Die Young- und die Dupre-Gleichung, die in der

Grenzflächenthermodynamik von fundamentaler Wichtigkeit sind, können mit folgender Gleichung zusammengefasst werden:

$$S = \gamma_{LV} (\cos\theta - 1)$$

- S : Spreitungskoeffizient [mN/m]
 γ_{LV} : Oberflächenspannung der Formulierungen [mN/m]
 θ : Kontaktwinkel zwischen den Formulierungen und der exzidierten Humanhaut [°]

Aus dieser Beziehung kann gefolgert werden, dass jeder negative Wert, der sich der Zahl null nähert, eine verbesserte Spreitung der Formulierung auf der Hautoberfläche anzeigt, denn bei $S = 0$ erfolgt komplette Spreitung.

Die Oberflächenspannungen der positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen wurden mit dem Wilhelmy-Platten-Tensiometer K100 (Krüss GmbH, Hamburg) bestimmt. Die Kontaktwinkelmessungen erfolgten statisch auf der Basis der liegenden Drop-Methode am Tropfenkonturanalysesystem DSA10DO4 (Krüss GmbH, Hamburg). Dabei wurde ein Tropfen (5 μ l) der Nanoemulsionen auf die mit 2 %iger Tween 80-Lösung vorbehandelten Haut (frisch exzidierte Bauchdecke nach plastischer Entfernung; Präparation: siehe Abschnitt 5.4.13) mit Hilfe einer Spritze aufgebracht und möglichst parallel zur Festkörperoberfläche betrachtet. Das Bild des Tropfens wurde mit einer Kamera aufgenommen, von einer Videokarte digitalisiert und der Kontaktwinkel nach einer Minute durch Anlegen einer Tangente an dem Tropfen mit Hilfe der Tropfenkonturanalyse nach der Ellipse-Fit-Methode (Krüss GmbH, Hamburg) bestimmt.

5.6 ESR-Untersuchungen

5.6.1 Grundlagen

Die ESR setzt die Existenz von magnetischen Dipolen (ungepaarten Elektronen) voraus. Dabei wird durch ein äußeres Magnetfeld mit einer magnetischen Induktion B_0 eine parallele oder antiparallele Anordnung der Elektronenspins hervorgerufen (Abb. 5.6.1.1), die in Abhängigkeit der Induktion B_0 in unterschiedliche Energieniveaus aufgespalten werden (Abb. 5.6.1.2). Durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen können Übergänge von $M(-1/2)$ nach $M(+1/2)$ induziert werden, wenn die Energie der Strahlung ($h \cdot \nu$) der Energiedifferenz ΔE der Spinzustände entspricht (Resonanzbedingung). Die Messung dieser Energiedifferenz ist die Grundlage der ESR-Experimente [Weil et al. 1994].



Abb. 5.6.1.1: Stark vereinfachte Darstellung zum Ausrichten der Elektronenspins vor (links) und nach (rechts) dem Anlegen eines magnetischen Feldes der Induktion B_0

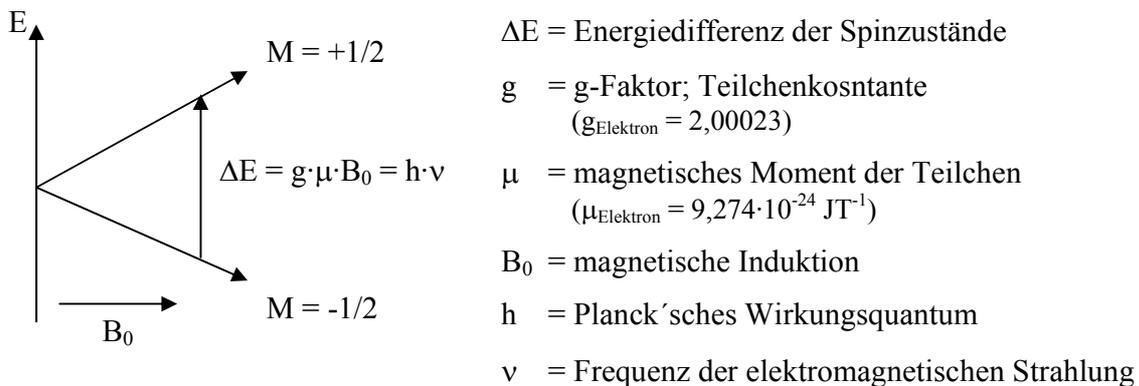


Abb. 5.6.1.2: Aufspaltung der Energieniveaus durch Anlegen eines homogenen Magnetfeldes der Induktion B_0

In den letzten Jahren wurde die Anwendung der ESR aufgrund der Verwendung niedriger Frequenzen und von Spinsonden für die Arzneimittelforschung ermöglicht [Mäder et al. 1994, Stößer et al. 1995, Mäder 1998]. Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und -Tomografie lassen sich bei Verwendung geeigneter stabiler Radikale (Spinsonden), die als Reporter-moleküle fungieren, Informationen über die Spinsondenumgebung gewinnen. Da die Anwesenheit von ungepaarten Elektronen Voraussetzung ist und somit nur paramagnetische Verbindungen selektiv detektiert werden, ermöglicht die ESR die Untersuchungen von komplexen Systemen ohne vorherige Probenvorbereitung. Ein weiterer Vorteil ist ihre Anwendbarkeit auf alle Aggregatzustände und ihre Nutzbarkeit für nicht transparente Proben. Doch dielektrische Verluste durch wasserhaltige Proben und die zwingende Voraussetzung von ungepaarten Elektronen limitieren den Einsatz der ESR.

5.6.2 Bestimmung der Mikroumgebung der ESR-aktiven Sonden

Wenn das ungepaarte Elektron mit dem Atomkern, der ebenfalls ein magnetisches Moment induziert, Wechselwirkungen eingeht, werden die Energieniveaus in Abhängigkeit von der Kernspinzquantenzahl I in $2I + 1$ Übergänge aufgespalten. Für ein ungepaartes Elektron am

Stickstoff (^{14}N : $I = 1$, $s = 1/2$) ergibt sich somit ein ESR-Spektrum aus drei symmetrischen Linien (Abb. 5.6.2), die von der kugelsymmetrischen Verteilung der Ladungen ausgeht.

Die Energieniveaus des Elektrons können also durch Überlagerung des eigentlichen Resonanzfeldes mit den Kernfeldern mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu \cdot B_0 + m_I \cdot A$$

- m_I : Kernspin (für ^{14}N mit $I = 1$ kann m_I die Werte -1 , 0 und $+1$ annehmen)
- A : Hyperfeinkopplungskonstante ($a_N =$ Hyperfeinaufspaltung am Stickstoffkern)

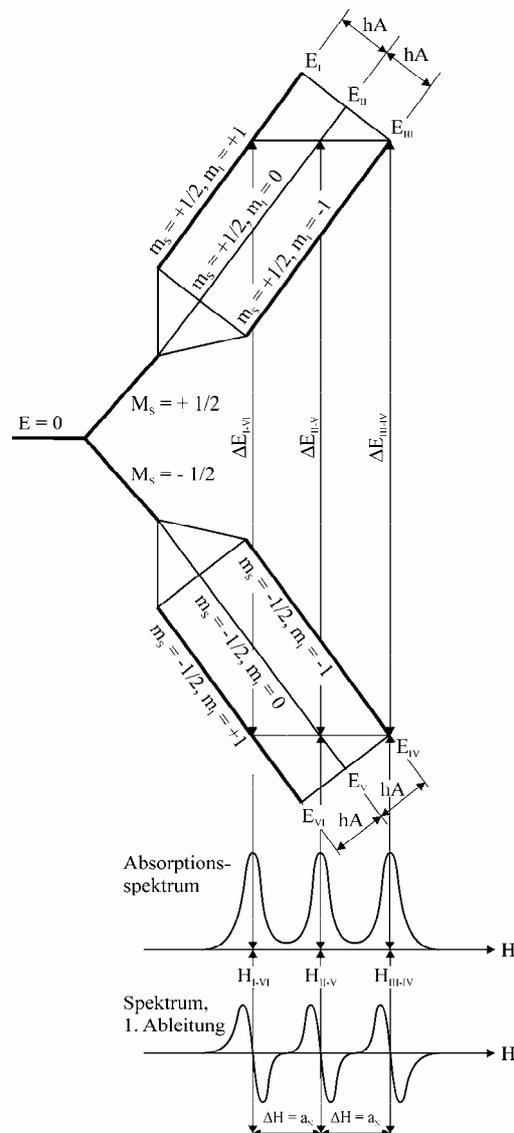


Abb.5.6.2: Aufspaltung der Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons (Elektronenspin = $1/2$) im homogenen Magnetfeld durch Wechselwirkungen mit dem magnetischen Moment eines Stickstoffkerns (Kernspin = 1) [Ranby und Rabek 1977].

Die Hyperfeinkopplungskonstante a_N spiegelt dabei die Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem Kernspin wider und ist daher ein empfindlicher Parameter für alle Veränderungen in der Elektronendichte im Molekül [Weil et al. 1994]. Da das ungepaarte Elektron hauptsächlich mit seiner Umgebung wechselwirkt, wird sich jede Veränderung in dieser Umgebung auch auf die Hyperfeinkopplungskonstante auswirken. Diesen Umstand macht man sich bei der Untersuchung der Mikroviskosität (Veränderung im spektralen Habitus) und der Mikropolarität (Veränderung in der Aufspaltung) biologischer Objekte mit Hilfe von stabilen Radikalen (meist Nitroxide) als Reportermoleküle zunutze [Galla 1988].

5.6.2.1 Bestimmung der Rotationskorrelationszeit

Die Rotationskorrelationszeiten, die über die Stokes-Einstein-Beziehung mit der Viskosität in Verbindung stehen [Moll 2004], wurden mit Hilfe zweier Verfahren ermittelt. Das eine Verfahren basiert auf der vollständigen Spektrensimulation mit Anpassung [Budil et al. 1996] und setzt kein drei-Linien-Signal voraus. Währenddessen ist beim zweiten Verfahren ein drei-Linien-Signal unabdingbar, da die Amplituden der drei Linien des ESR-Spektrums zur Auswertung herangezogen werden. Die Auswertung der ESR-Spektren erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms PEST [Duling 1996]. Mit Hilfe einer empirischen Beziehung [Kusnetzov et al. 1971, Kovarskii et al. 1972]

$$\tau_r = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta B_0 ((h_0/h_{-1})^{-1/2} - 1)$$

ΔB_0 : Linienbreite der mittleren Linie

h_0/h_{-1} : Intensitätsverhältnis der mittleren zur Hochfeldlinie des Drei-Linien-Spektrums

ließen sich in vereinfachter Weise die Rotationskorrelationszeiten aus den ESR-Spektren ermitteln.

Zur Bestimmung der Mikroviskosität wurden in den Ölphasen der lipidhaltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsionen (Zusammensetzung: siehe 5.2; ohne Vitamin E) Palmitinsäure durch 5-Doxylpalmitinsäure ersetzt, um Informationen über die Mikroumgebung der Spinsonde zu erhalten. Die Miconazolnitrat-haltigen Formulierungen aus Abschnitt 5.3 (ohne Vitamin E) wurden mit 0,1 % Doxylpalmitinsäure ergänzt. Die Vermessung der Proben erfolgte nach Überführung in Mikropipetten mittels X-Band-ESR unter folgenden Bedingungen: B_0 -Feld: 337,5 mT; B_0 -Scan: 8,0 mT, Punkte: 1024; Modulation: 0,3 mT; Mikrowellenfrequenz: 9,5 GHz. Aus den erhaltenen ESR-Spektren wurden mit Hilfe der beiden oben beschriebenen Verfahren die Rotationskorrelationszeiten bestimmt.

5.6.2.2 Bestimmung der Mikropolarität und der ESR-Aktivität

Eine Möglichkeit der Beeinflussung der Spindichteverteilung am ungepaarten Elektron ist durch die Polarität des Lösungsmittels gegeben. Apolare Lösungsmittel erhöhen die Elektronendichte

am Stickstoff der NO-Gruppe von Nitroxyl-Radikalen und führen zu einer Verringerung der Hyperfeinkopplungskonstante (Abb. 5.6.2.2.1). Da die in unmittelbarer Nachbarschaft befindlichen Lösungsmittelmoleküle einen Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen Kern- und Elektronenspin haben, ist es möglich, aus ESR-Spektren Aussagen zur Mikropolarität in der Umgebung der Spinsonden zu gewinnen.

Die TEMPO- und TEMPOL-haltigen Nanoemulsionen (Zusammensetzung: siehe 5.6.3.1) und deren jeweilige innere und äußere Phase wurden nach Überführung in Mikropipetten mit der X-Band-ESR unter folgenden Bedingungen vermessen: B_0 -Feld: 337,5 mT; B_0 -Scan: 8,0 mT, Punkte: 1024; Modulation: 0,3 mT; Mikrowellenfrequenz: 9,5 GHz. Hierbei wurden die Hyperfeinkopplungskonstanten a_N der Sonden in den Nanoemulsionen (Gesamtspektren) und den jeweiligen inneren und äußeren Phasen (Einzelspektren) ermittelt. Mit dem Auswertungsprogramm PEST [Duling 1996] wurden die Einzelspektren und die Anteile der Einzelspektren am Gesamtspektrum und damit die Anteile der Spinsonden in der inneren Ölphase und der äußeren Wasserphase bestimmt (Abb. 5.6.2.2.2).

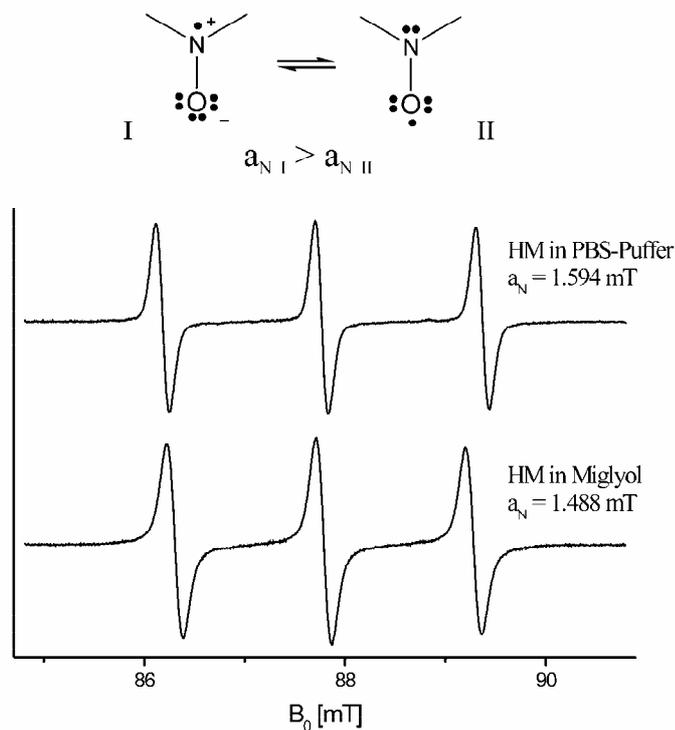


Abb. 5.6.2.2.1: S-Band-ESR-Spektren der Lösungen von 2,2,3,4,5,5-Hexamethyl-imidazolidin-1-oxyl (HM) in Lösungsmitteln mit unterschiedlicher Polarität

Nach Zugabe von 100 μ l 2 % (m/m) Natriumascorbatlösung in 100 μ l TEMPO- und TEMPOL-haltige, positiv geladene Nanoemulsionen wurde unter denselben, oben beschriebenen Bedingungen die ESR-Spektren aufgenommen. Ihre Signalfächen, die nach Doppelintegration erhalten wurden, sind proportional zur Nitroxidspinsonden-Konzentration. Natriumascorbat, das

sich in der Wasserphase löst, reduziert paramagnetische Nitroxide zu diamagnetischen Hydroxylaminen. Somit kann die Freisetzung bzw. die Verteilung der Spinsonden in den Nanoemulsionen charakterisiert werden.

Zur Bestimmung des prozentualen Intensitätsanteils des ESR-Signals am Tag 14 im Vergleich zum Tag 0 wurden die Nanoemulsionen am Tag der Herstellung und nach 14 Tagen wie oben beschrieben im X-Band vermessen. Die Flächen aus den Spektren wurden nach Doppelintegration bestimmt und diese wie folgt ins Verhältnis gesetzt: $\text{ESR-Signalintensität (\%)} = \text{Fläche Tag 14} / \text{Fläche Tag 0}$

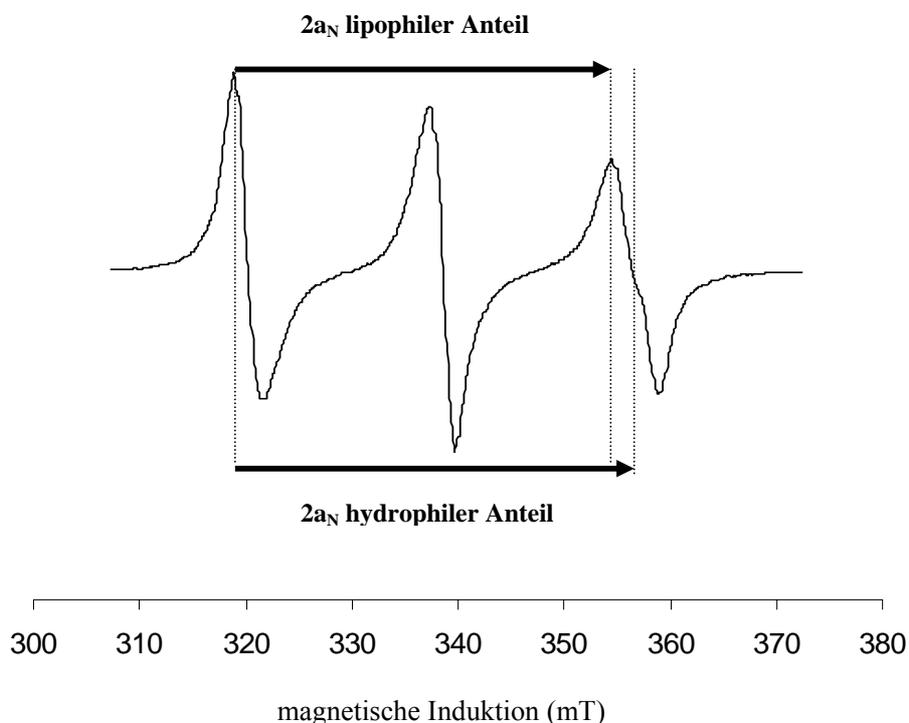


Abb. 5.6.2.2.2: ESR-Spektrum der Nitroxidspinsonde TEMPO in der positiv geladenen Nanoemulsion

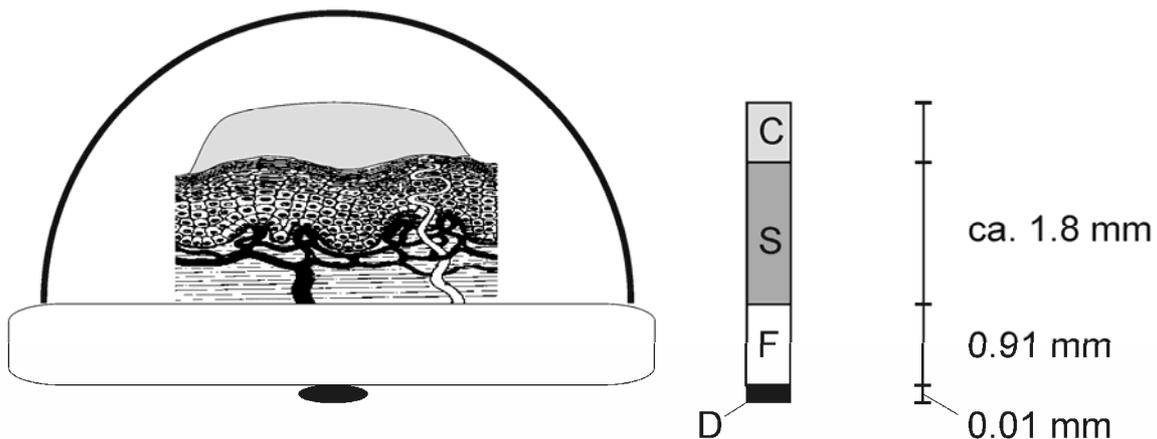
5.6.3 ESR-Tomografie

Für die räumlich aufgelöste ESR-Spektroskopie ist die Aufnahme eines Satzes von ESR-Spektren (Projektionen) mit räumlicher Kodierung erforderlich. Dieser wurde durch eine genau definierte Inhomogenität des Magnetfeldes (graduierter Feldgradient) für jedes der einzelnen Spektren des Gesamtsatzes gewonnen [Eaton et al. 1991].

Die in dieser Arbeit angewandte Methode ist die der spektral-räumlichen ESR-Tomografie, die nur eine eindimensionale, räumliche Auflösung liefert [Maltempo et al. 1991]. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass dabei die komplette spektrale Information räumlich aufgelöst zur

Verfügung steht. Nur die spektrale Information ermöglicht den Zugang zu den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Systeme.

Ein bei dieser Methode auftretendes Problem ist das der räumlichen Skalierung des untersuchten Objekts. Diese wurde mit Hilfe zweier ESR-Standards (Zuckerkohle als Suspension nach Abschluss der Penetrationsstudien auf die Probenoberfläche aufgetragen und α -Diphenylpicrylhydracyl (DPPH) auf dem Quarzträger der modifizierten Gewebezelle befestigt; Abb. 5.6.3.1) ermittelt [Moll 2004]. Das DPPH diente auch als externer Intensitätsstandard.



- C- Kohle (Korngröße 30 μm)
- S- Hautprobe
- F - Quarzscheibe
- D- externer DPPH-Standard

Abb. 5.6.3.1: Probenanordnung für die Untersuchungen mit spektral-raumlicher ESR-Tomografie an exzidiertem Humanhaut

Nach Aufnahme von 95 Projektionen wurde mittels Rückprojektion eine Matrix von 256 Spektren mit jeweils 256 Punkten berechnet. Diese Matrix wurde dann in die individuellen Spektren zerlegt, denen jeweils eine bestimmte Tiefe (Schnittebene) zugeordnet wurde. Zur Auswertung der Signalintensitätsverteilung in der Haut wurden die Amplituden des Mittensignals herangezogen (Abb. 5.6.3.2; Mitte und unten). Aus den spektralen Schnitten (Abb. 5.6.3.2; Mitte und oben) wurden die Hyperfeinkopplungskonstanten a_N und die Rotationskorrelationszeiten, wie in Abschnitt 5.6.2 beschrieben, ermittelt.

Die Hautpräparation erfolgte wie im Abschnitt 5.4.13, wobei der Nährlösung (Dulbeccos Modified Eagles Medium) Ethylmaleinimid (30mM) hinzugefügt wurde, um in den Hautproben die Reduktion der Spinsonden durch die Blockade reduzierender Enzyme zu hemmen [Michel et al. 1993]. Vor den ESR-tomografischen Untersuchungen wurden die Hautproben mindestens 12 Stunden in dieser Nährlösung inkubiert.

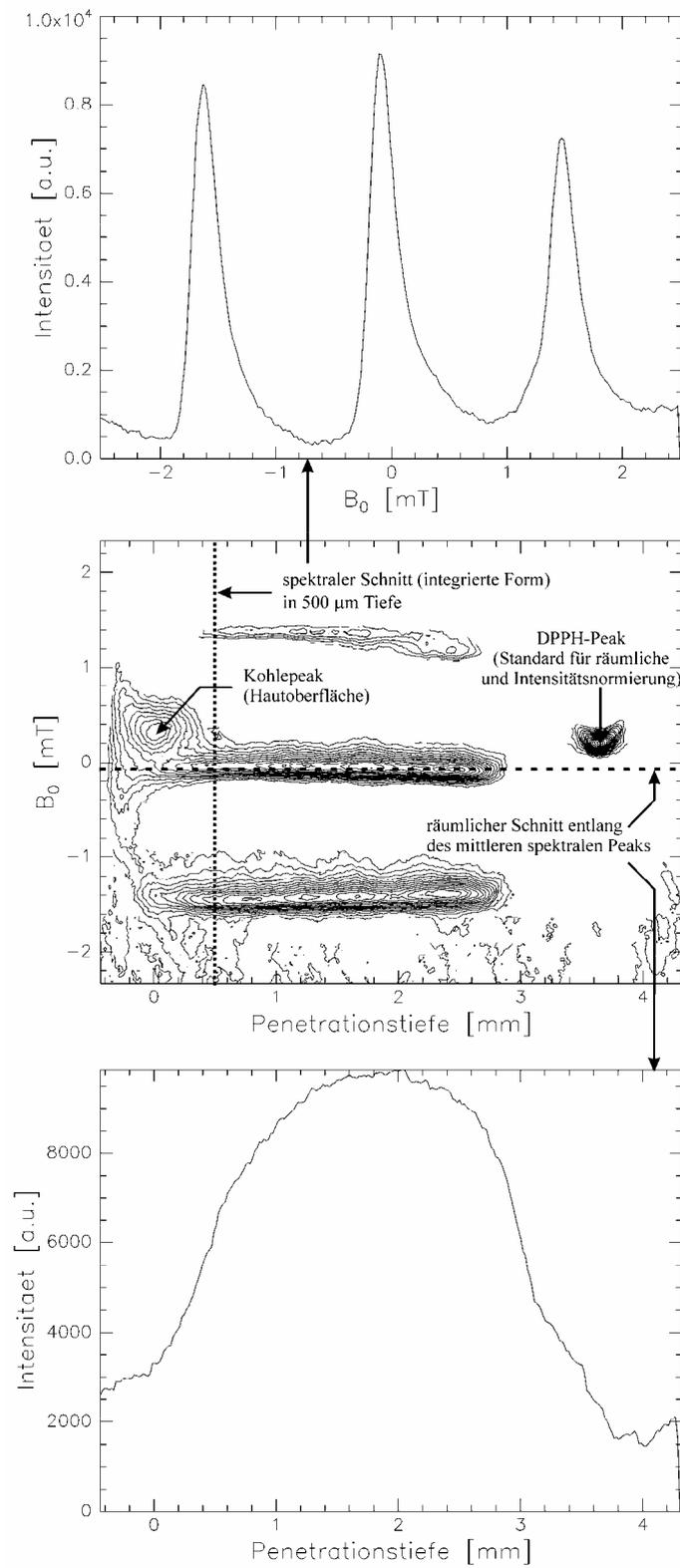


Abb. 5.6.3.2: Schematische Darstellung der Gewinnung von Informationen aus einer Rückkonstruktionsmatrix von 256 x 256 Punkten

5.6.3.1 Durchführung der ESR-Untersuchungen

In die Mitte der Hautproben wurde mit einem Stempel ($d = 10 \text{ mm}$) ein Bereich markiert und auf diesen $15 \mu\text{l}$ der zu untersuchenden Nanoemulsionsformulierung (Tab. 5.6.3.1) aufgetragen. Diese Hautproben wurden anschließend in den Zellzuchtplatten über gesättigter Kochsalzlösung bei $32 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 44% inkubiert, um die Austrocknung der Hautproben während der Untersuchungen zu vermeiden. Jeweils eine der Hautproben wurde nach 1, 3,5, 6 und 24 Stunden entnommen, der Überschuss der Zubereitung zur Vermeidung von Schmiereffekten abgetupft und danach mit Hilfe einer Lochzange ($d = 4,5 \text{ mm}$) im markierten Bereich eine Hautprobe ausgestanzt. Die Vermessung der Proben erfolgte im X-Band. Da es bei wasserhaltigen Proben immer zu dielektrischen Verlusten kommt, mussten die Hautproben entsprechend dimensioniert und im Resonator positioniert werden. Dafür wurden die Hautproben in eine aus einem Quarzglasprobenhalter mit Abdeckung bestehende modifizierte Gewebezelle überführt (Abb. 5.6.3.1), mit der die Probe im Resonator fixiert wurde. Das freie Volumen über den Hautproben war klein, um Austrocknungen zu vermeiden. Die Tomografieexperimente an Hautproben wurden bei einer Temperatur von $32 \text{ }^\circ\text{C}$ im X-Band-ESR-Spektrometer durchgeführt.

Tab. 5.6.3.1: Zusammensetzungen der zur ESR-Untersuchungen verwendeten Nanoemulsions-Formulierungen

Bestandteile	Zusammensetzung der Nanoemulsionen (% m/m)			
	PPN-TEMPO	PPN-TEMPOL	MNN-TEMPO	PPN-TEMPOL
<i>Ölphase</i>				
Eutanol G	20	20	20	20
Lipoid E-80 [®]	2	2	2	-
Phytosphingosin	0,6	0,6	-	0,6
Myristinsäure		-	0,6	0,6
TEMPO	0,5	-	0,5	
TEMPOL	-	0,5	-	0,5
<i>Wasserphase</i>				
Tween 80 [®]	2	2	2	2
Glycerol	2,5	2,5	2,5	2,5
Kaliumsorbat	0,1	0,1	0,1	0,1
Wasser zu	100	100	100	100

Herstellung erfolgte analog zu 5.3; PPN: durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsion; MNN: durch Myristinsäure negativ geladene Nanoemulsion

5.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Software STAtEasy (Version 2002) verwendet. Statistische Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurde mit Hilfe des t-Test unter Verwendung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,05 ermittelt. Varianzhomogenität und Normalverteilung wurden stets geprüft. Bei der Hautstudie aus Abschnitt 4.5 wurden statistische Unterschiede mit dem Wilcoxon-Test für gepaarte Beobachtungen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,05 als minimale Signifikanzschranke untersucht.