

**Mikroemulsionen als moderne Formulierungen  
zum Einsatz bei chronisch entzündlichen  
Hauterkrankungen am Beispiel Tacrolimus  
und Linolsäure**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Alexandra Sabine Bärbel Göbel

geboren am 16.10.1980 in Hanau

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert

2. Prof. Dr. Johannes Wohlrab

3. Prof. Dr. Dr. Jürgen Lademann

Halle (Saale), 19.02.2010

## Abkürzungsverzeichnis

13-HPODE	13-Hydroperoxy-9-cis-11-trans-octadecadiensäure
16-DSA	16-Doxylstearinsäure
ACP	Ascorbylpalmitat
AD	Atopische Dermatitis
AK	Akzeptor
AMK	Arzneimittelkommission
$a_N$	Hyperfeinkopplungskonstante
APG	Alkylpolyglucoside
$B_0$	Magnetfeld
BHT	Butylhydroxytoluol
CAM	Chorio Allantois Membran
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
$c_s$	Sättigungskonzentration
$c_v$	Wirkstoffkonzentration im Vehikel
D	Diffusionskoeffizient
$D_0$	Wechselwirkungsfreier Diffusionskoeffizient
DAD	Diodenarraydetektor
DAZ	Deutsche Apothekerzeitung
DB	Doppelbindung
Dil.-reihe	Dilutionsreihe
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	Dermis
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EOS	ester-linkage $\omega$ -hydroxysphingosine
EP	Lebende Epidermis
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FK 506	Tacrolimus ( <i>Tsukuba macrolide immune suppressant</i> )
FKPB-12	<i>FK 506 binding protein</i>
FSG	Fettsäuregemisch
GC	Gaschromatographie
HD-PMI	2-Heptadecyl-2,3,4,5,5-pentamethylimidazolidine-1-oxyl
HET CAM	Hühner-Ei-Test Chorio Allantois Membran
HLB	<i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>High pressure liquid chromatography</i> )

HR	Hämorrhagie
I	Kernspinquantenzahl
IgE	Immunglobuline der Klasse E
INCI	Internationale Nomenklatur für kosmetische Stoffe
J	Flux
LSR	Linolsäure
MD	Membranverfärbung
ME	Mikroemulsion
MMF	Mycophenolatmofetil
M <sub>s</sub>	Magnetquantenzahl
MS	Massenspektrometrie
NF-ATc	<i>nuclear factor of activated cells</i>
NMF	Natürliche Feuchthaltefaktoren ( <i>natural moisturizing factor</i> )
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
O/W	Öl in Wasser
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PASI	<i>Psoriasis Area and Severity Index</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PeG	1,2-Pentylenglycol
PEG	Polyethylenglycol
Ph 90G	Phospholipon 90G
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PI 1200	Plantacare 1200 UP
PI 2000	Plantacare 2000 UP
PrG	1,2-Propylenglycol
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
S	Elektronenspin
SANS	Neutronenkleinwinkelstreuung
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SC	<i>Stratum corneum</i>
SD	absolute Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	<i>Selected ion monitoring mode</i>
SLS	Statische Lichtstreuung
Sp	Spezies
T CG90	Tegocare CG90
TCL	Tacrolimus
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
Th	T-Helferzellen
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid

## Abkürzungsverzeichnis

---

UP	Konservierungsmittelfrei ( <i>unpreserved</i> )
UVA	Ultraviolett Typ A
$V_k$	Verteilungskoeffizient
W/O	Wasser in Öl
$\alpha$ -TPA	$\alpha$ -Tocopherolacetat
$\eta$	Dynamische Viskosität
$\kappa$	elektrische Leitfähigkeit
$\kappa_a$	korrigierte elektrische Leitfähigkeit
$\tau$	Rotationskorrelationszeit

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einführung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1 Die menschliche Haut als Applikationsort für Wirkstoffe	3
2.1.1 Aufbau und Funktion	3
2.1.2 Dermaler Transport von Wirkstoffen	4
2.2 Möglichkeiten zur Penetrationsverbesserung von Wirkstoffen	6
2.2.1 Modulation des <i>Stratum Corneums</i>	6
2.2.2 Physikalische und mechanische Methoden	7
2.2.3 Verwendung unterschiedlicher Vehikel	7
2.3 Mikroemulsionen	8
2.3.1 Definition und Eigenschaften	8
2.3.2 Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung	9
2.4 Chronisch Entzündliche Hauterkrankungen	10
2.4.1 Atopische Dermatitis	11
2.4.2 Psoriasis	11
<b>3 Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von Tacrolimus</b>	<b>13</b>
3.1 Tacrolimus – Pharmakologisches Profil	13
3.2 Tacrolimus in der dermalen Anwendung	15
3.3 Physikochemische Eigenschaften von Tacrolimus	17
3.3.1 Sättigungslöslichkeiten	17
3.3.2 Verteilungskoeffizienten	18
3.3.3 Stabilität bei unterschiedlichen pH-Werten	18
3.3.4 Zusammenfassung der physikochemischen Eigenschaften	19
3.4 Entwicklung kolloidaler Carriersysteme	20
3.4.1 Entwicklung der Mikroemulsionen	20
3.4.2 Charakteristika der verwendeten Substanzen	22
3.5 Untersuchungen an tacrolimushaltigen Mikroemulsionen	25
3.5.1 Sättigungslöslichkeiten in den Mikroemulsionen	25
3.5.2 Wirkstoffstabilität in den Mikroemulsionssystemen	26
3.5.3 Extraktionsvorversuche	28
3.6 Untersuchungen zur Penetration von Tacrolimus in exzidierte Humanhaut	29
3.6.1 Penetration von Tacrolimus aus Mikroemulsionen	31
3.6.2 Penetration aus dem Standardvehikel Protopic® 0,1 %	36
3.6.3 Vergleich der Penetrationsergebnisse von Tacrolimus aus den Mikroemulsionen und Protopic® 0,1 %	37
3.6.4 Zusammenfassung der Penetrationsergebnisse	40
<b>4 Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von Linolsäure</b>	<b>41</b>
4.1 Linolsäure-Anwendung und Wirkung	41
4.2 Physikochemische Eigenschaften von Linolsäure	43
4.2.1 Sättigungslöslichkeiten	44

4.2.2 Zusammenfassung der physikochemischen Eigenschaften	45
4.3 Entwicklung eines kolloidalen Carrier Systems	45
4.3.1 Entwicklung der Mikroemulsion	45
4.3.2 Charakteristika der verwendeten Substanzen	47
4.4 Untersuchungen an linolsäurehaltigen Mikroemulsionen	49
4.4.1 Stabilität der Octadiensäuren im System	49
4.4.2 Extraktionsvorversuche	53
4.5 Untersuchungen zur Penetration von 9,11-Octadiensäure in exzidierte Humanhaut	54
4.5.1 Penetration aus der Mikroemulsion	55
4.5.2 Penetration aus dem Standardvehikel Linola Fett®	56
4.5.3 Vergleich der Penetrationsprofile von 9,11-Octadiensäure aus der Mikroemulsion und Linola Fett®	57
4.5.4 Zusammenfassung der Penetrationsergebnisse	61
<b>5 Charakterisierung der entwickelten Mikroemulsionen</b>	<b>62</b>
5.1 Erstellung von Phasendiagrammen	62
5.2 Polarisationsmikroskopie	67
5.3 Untersuchungen zur dynamischen Viskosität	67
5.4 Konduktivitätsmessungen	70
5.5 Dynamische Differenzkalorimetrie	72
5.6 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	78
5.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	85
5.8 Dynamische Lichtstreuung	86
5.9 HET CAM-Untersuchungen	88
5.10 Zusammenfassung der physikochemischen Charakterisierung	90
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>7 Experimenteller Teil</b>	<b>94</b>
7.1 Herstellung der Formulierungen	94
7.2 Wirkstoffanalytik	94
7.2.1 Analytik von Tacrolimus	94
7.2.2 Analytik der Octadiensäuren	95
7.3 Extraktion der Wirkstoffe aus der Formulierung	96
7.4 Wirkstoffstabilitätsuntersuchungen	97
7.5 Physikochemische Parameter der aktiven Komponenten	97
7.6 Penetrationsstudien <i>ex vivo</i>	98
7.7 Physikochemische Charakterisierung	99
7.7.1 pH-Wert Bestimmung	99
7.7.2 Erstellung von Phasendiagrammen	99
7.7.3 Polarisationsmikroskopie	99
7.7.4 Viskositätsuntersuchungen	99
7.7.5 Konduktivitätsmessungen	100
7.7.6 Dynamische Differenzkalorimetrie	100
7.7.7 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	100

7.7.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	100
7.7.9 Dynamische Lichtstreuung	101
7.7.10 HET CAM-Untersuchungen	101
7.8 Statistik	101
7.9 Substanzen	101
<b>8 Literatur</b>	<b>103</b>

# 1 Einführung und Zielsetzung

Die menschliche Haut erfüllt in ihrer Eigenschaft als größtes Organ nicht nur physiologische Funktionen, vielmehr stellt sie auch einen wichtigen Applikationsort für Arzneistoffe dar. Das Interesse einer topischen Therapie krankhafter Hautveränderungen insbesondere chronisch entzündlicher Hauterkrankungen hat in den letzten Jahren zugenommen, da diese im Vergleich zu einer systemischen Applikation diverse Vorteile bietet. Zum einen ist die dermale Applikation bei der Behandlung lokaler Erkrankungen von Vorteil, da sich der therapeutische Effekt auf das betroffene Hautareal beschränkt, wodurch eine systemische Belastung des gesamten Körpers reduziert werden kann.

Andererseits ist es trotzdem möglich, wenn gewünscht, eine systemische Arzneistoffverfügbarkeit mit transdermaler Administration verschiedener Wirkstoffe zu erzielen, wodurch es zu einer Minimierung des *first pass*-Effektes kommt. Allerdings muss bei einer dermalen Applikation zuerst die äußere Hautbarriere das *Stratum corneum* (SC) überwunden werden, um therapeutische Wirkstoffkonzentrationen in tieferen Hautschichten oder im Blut zu erzielen. Dieser Prozess kann von verschiedenen Faktoren wie den physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffes sowie dem verwendeten Vehikel beeinflusst werden.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, großmolekulare, lipophile Substanzen in geeignete galenische Systeme zu inkorporieren und damit in großem Maße in die Haut zu transportieren. Die Penetrationseigenschaften dieser für die dermale Applikation problematischen Stoffe soll dadurch signifikant verbessert werden. Idealerweise wird letztendlich eine ausreichende bzw. verbesserte Bioverfügbarkeit der Substanzen in der Haut erreicht. Geeignete Modellsubstanzen für diesen Zielgedanken sind der lipophile Arzneistoff Tacrolimus (FK 506) und die Fettsäure Linolsäure (LSR). Diese beiden Stoffe zeichnen sich zum einen durch ihre physikochemischen Eigenschaften als ideale Vertreter großmolekularer, stark lipophiler Stoffe aus. Zum anderen haben beide Substanzen eine hohe dermatologische bzw. kosmetische Relevanz, die für Tacrolimus und auch Linolsäure insbesondere in der Basis- sowie akuten Therapie chronisch entzündlicher Hauterkrankungen zum Tragen kommt.

Einsatz findet das Makrolidlacton Tacrolimus (TCL) mit seinen immunsuppressiven bzw. immunmodulierenden Eigenschaften in der systemischen Therapie zur Immunsuppression nach Organtransplantationen. Für die topische Anwendung steht TCL seit 2002 in Deutschland bekanntlich in Form einer lipophilen Salbe Protopic<sup>®</sup> in einer 0,1 %igen und einer 0,03 %igen Konzentration kommerziell zur Verfügung. Aufgrund seiner hohen Lipophilie und hohen Molmasse gestaltet sich die Penetration von TCL als schwierig. Konventionelle Vehikel sind aus diesem Grund nicht in der Lage ausreichend hohe Wirkstoffkonzentrationen in tiefere Hautschichten penetrieren zu lassen, was für die Therapie der *Psoriasis vulgaris* Voraussetzung ist. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die galenische Optimierung von tacrolimusenthaltenden Präparationen für die epikutane Applikation notwendig ist.

LSR stellt eine wichtige Komponente in der Basistherapie chronisch entzündlicher Hauterkrankungen sowie in der Therapie der Xerosis dar. Diese essentielle ungesättigte Fettsäure besitzt als Bestandteil der interzellulären Lipidmatrix des SC strukturbestimmende Merkmale

und darüber hinaus noch multiple Schutzfunktionen. Neben den wichtigen strukturegebenden Funktionen werden der LSR noch antiinflammatorische Wirkungen zugesprochen. Im Handel ist mit Linola Fett<sup>®</sup> bereits ein linolsäurereiches Fertigpräparat verfügbar. Aufgrund der hohen Molmasse und der sehr hohen Lipophilie ist jedoch auch hier eine Penetration großer Anteile von LSR schwer erreichbar.

Um eine verbesserte lokale Bioverfügbarkeit und damit eine Realisierung bzw. Verstärkung der therapeutischen Effekte von Tacrolimus und Linolsäure zu erreichen, ist der Einsatz moderner galenischer Formulierungen und Vehikel ein innovativer Ansatz, mit dem eine Steigerung der Freisetzung und Penetration von TCL und LSR möglich wird. Dieses ist insbesondere im Hinblick auf die Gegebenheiten der psoriatisch veränderten Haut wichtig.

Zu diesen modernen galenischen Konzepten gehören Mikroemulsionen, die exzellente Solubilisierungseigenschaften speziell für Problemwirkstoffe wie TCL oder stark lipophile Komponenten wie LSR bieten. Gleichzeitig sind diese Vehikelsysteme in der Lage, die Barrierefunktionen des SC reversibel herabzusetzen und damit eine Penetrationsverbesserung zu erzielen.

Im Fokus dieser Arbeit liegt die Entwicklung verschiedener Mikroemulsionssysteme für großmolekulare, stark lipophile Substanzen wie z.B. TCL und LSR, die für die dermale Anwendung eingesetzt werden können. Es sollen O/W-Mikroemulsionssysteme formuliert werden, deren Inhaltsstoffe sehr gut hautverträglich sind. Gleichzeitig sollen der Wirkstoff TCL und LSR in relevanten Konzentrationen inkorporiert werden. Charakterisiert werden die Formulierungen mit Hilfe verschiedenster Methoden. Zusätzlich werden Experimente zu Löslichkeiten und Stabilitäten der beiden Stoffe in verschiedenen Medien sowie in den Mikroemulsionssystemen durchgeführt. Weiterführend wird das Penetrationsverhalten von TCL und LSR aus verschiedenen Systemen in exzidierte Humanhaut *ex vivo* untersucht und die Ergebnisse mit den oben erwähnten Fertigpräparaten Protopic<sup>®</sup> oder Linola Fett<sup>®</sup> verglichen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Die menschliche Haut als Applikationsort für Wirkstoffe

#### 2.1.1 Aufbau und Funktion

Die Haut stellt das größte menschliche Organ des Körpers dar. Sie dient zur Abgrenzung zwischen der Umwelt und dem Organismus. In dieser Eigenschaft besitzt sie Schutz-, Kontakt- und Sinnesfunktionen. Aufgebaut ist die Haut aus Epidermis, Dermis und Subcutis. Es finden sich zusätzlich Hautanhangsgebilde (Adnexe) wie Schweißdrüsen, Talgdrüsen, Haare und Nägel (Abbildung 1).

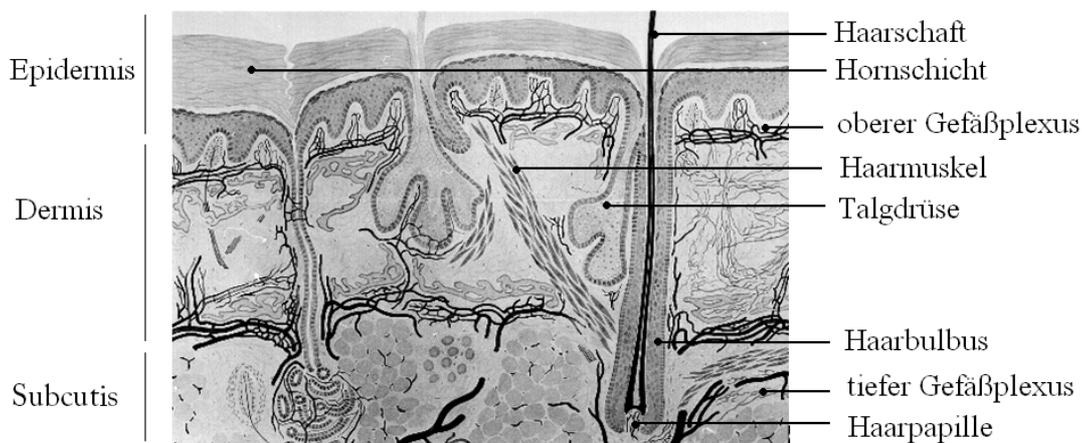


Abbildung 1 – Aufbau der Haut mit Hautanhangsgebilden, modifiziert nach GRÜNEBERG, zitiert nach [150].

Die Hautoberfläche ist mit einer dünnen Emulsionsschicht bestehend aus abgestoßenen Hornzellen sowie Ab- bzw. Ausscheidungsprodukten der Hornschicht, Schweiß- und Talgdrüsen bedeckt. Der Oberflächenfilm besitzt jedoch keine Barriereigenschaften sondern ist gut permeabel für Sauerstoff, Kohlendioxid und Wasser. Der pH-Wert liegt im Allgemeinen zwischen 5,0 und 6,0 und trägt maßgeblich zu den bakteriziden und fungiziden Eigenschaften dieser Emulsionsschicht bei [150].

Die äußerste Hautschicht, die Epidermis, ist ein verhornendes Plattenepithel. Sie lässt sich in verschiedene Schichten gliedern. Zu diesen gehören von außen nach innen das *Stratum corneum*, das *Stratum granulosum*, das *Stratum spinosum* und das *Stratum basale*, wobei der lebende Teil mit dem *Stratum lucidum* beginnt, das zwischen *Stratum corneum* und *Stratum granulosum* lokalisiert ist. Die Epidermis besteht zu einem Großteil (ca. 90 %) aus Keratinozyten. Diese werden durch Zellproliferation im *Stratum basale* gebildet und wandern durch die Schichten der Epidermis bis ins *Stratum corneum*. Die Keratinisierung erfolgt letztendlich beim Übergang vom *Stratum granulosum* ins *Stratum corneum*. Aus den lebenden kernhaltigen Keratinozyten entstehen auf diesem Wege kernlose Hornzellen, die Korneozyten. Neben den Keratinozyten finden sich in der Epidermis noch pigmentproduzierende Melanozyten sowie Langerhans Zellen, die in der Lage sind, eine Immunantwort einzuleiten [150].

Die äußerste Epidermisschicht, das *Stratum corneum* (SC) kann in seinem Aufbau nach ELIAS [59] als ein Zweikompartimentmodell beschrieben werden. Es besteht aus 10 bis 20 Zellschichten keratinisierter Korneozyten eingebettet in interkorneozytäre, lamellare Lipidschichten, die sich aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren zusammensetzen. Die Synthese der Hautlipide erfolgt in Lamellargranula den *odland bodies*, die aus dem Golgiapparat hervorgehen. Die Korneozyten sind überwiegend aus Keratinfilamenten aufgebaut, umgeben von einer rigiden Hülle bestehend aus dem Protein Involucrin der *cornified envelope*. Die Stabilität und Barrierefunktion des SC wird auf verschiedenen Ebenen realisiert. Einerseits sind die Korneozyten durch hakenähnliche Strukturen sowie durch Corneodesmosomen verbunden. Andererseits tragen die Bilayerstrukturen der Lipidschicht zur Festigkeit bei [225].

Die unter der Epidermis liegende Dermis besteht aus Kollagen- und Elastinfasern. Eingebettet in dieses Gerüst findet man ein verzweigtes Netz aus Lymphbahnen, Nervenfasern und Blutkapillaren, letztere sind, neben der Blutversorgung der Haut, mit den Schweißdrüsen auch für die Regulation des Wärmehaushaltes verantwortlich. In der Dermis finden sich ebenfalls die Hautanhangsgebilde Haare, Nägel, Schweiß- und Talgdrüsen.

Die unterste Hautschicht, die Subcutis, besteht aus lockerem Bindegewebe mit eingelagerten Fettzellen. Ihre Funktion besteht in der Energiespeicherung, Wärmeisolation und dem mechanischem Schutz [229].

### 2.1.2 Dermaler Transport von Wirkstoffen

Der Transport von Wirkstoffen in die Haut kann mittels Penetration durch die Hornschicht oder durch die Hautanhangsgebilde erfolgen.

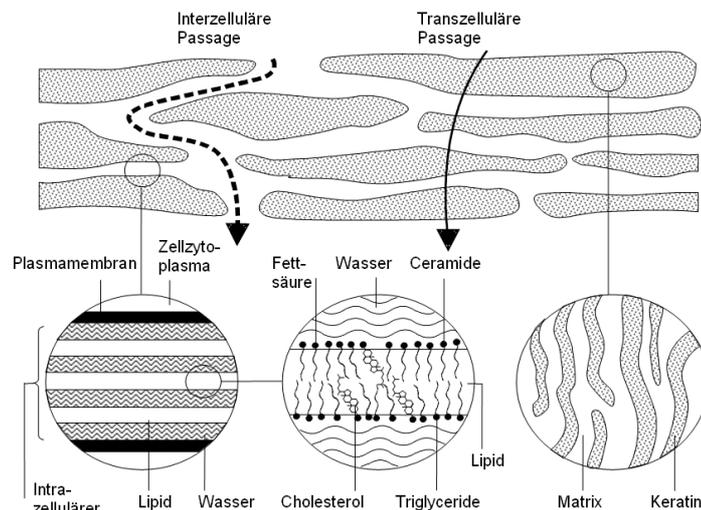


Abbildung 2 – Penetrationswege in die Haut modifiziert nach BARRY [22]

Aufgrund des geringen Anteils an Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen auf der Hautoberfläche (0,1 % - 1 %) scheinen die transfollikuläre sowie die transglanduläre Route eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. In Abhängigkeit der Körperregion kann, wie von OTBERG untersucht, der Anteil der Haarfollikel erhöht sein [154]. Dies führt zu einem Anstieg der Penetration durch diese sogenannten *shunt*-Routen. Allerdings stehen nur die „offenen“ Haarfol-

likel zur Aufnahme von Stoffen zur Verfügung, die Talgproduktion bzw. Haarwachstum aufweisen [121].

Die Penetration von Stoffen erfolgt jedoch zu großen Anteilen über den transepidermalen Weg (Abbildung 2). Lipophile Stoffe verfolgen dabei am wahrscheinlichsten den interzellulären Weg entlang der lipophilen Kohlenwasserstoffketten der SC-Lipide [22]. Für hydrophile Moleküle wird eher die transzelluläre Route angenommen. Da diese Substanzen dabei abwechselnd durch lipophile und hydrophile Bereiche diffundieren müssen, ist dieser Weg umstritten. Möglich ist jedoch eine Penetration durch die corneodesmosomalen Strukturen, die die Korneozyten miteinander verbinden [225]. Diskutiert wird zusätzlich eine mögliche Diffusion hydrophiler Substanzen entlang der hydratisierten Kopfgruppen innerhalb der Lipidbilayer, wodurch die interzelluläre Route als wichtigster Weg eingestuft werden kann [22, 81, 200].

Die Aufnahme von Wirkstoffen über die oben beschriebenen verschiedenen Routen ist nicht allein durch die Barrierefunktion der Haut geprägt, sondern stellt ein komplexes Wechselspiel zwischen den physikochemischen Eigenschaften des einzubringenden Stoffs, dem Vehikel sowie der Haut dar. Voraussetzung ist im ersten Schritt das Lösen des Wirkstoffes in der Grundlage des Vehikels, daraufhin kommt es zur Diffusion der Moleküle zur Grenzfläche zwischen Vehikel und SC (Liberation). Gefolgt von der Penetration in die Hornschicht sowie der Permeation durch die lebende Epidermis und Dermis. In der Dermis kann letztendlich die Aufnahme in die systemische Zirkulation durch Resorption über das mikrovaskuläre Gefäßnetz erfolgen. Da das SC die Hautbarriere darstellt, handelt es sich bei der Penetration gewöhnlich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Der Wirkstofftransport in die Haut stellt hierbei einen passiven Prozess dar. Er lässt sich unter der Annahme vorherrschender *sink*-Bedingungen in der Haut, die durch den steten Abtransport des Wirkstoffes im Körper realisiert wird, mit Hilfe des 1. FICKschen Diffusionsgesetz beschreiben. Zusätzlich ist der Substanzfluss von der Verteilung des Wirkstoffes zwischen dem Vehikel und der Haut abhängig, woraus sich letztendlich folgende Gleichung ergibt [126, 189]:

$$J = P * c_v = -\frac{D * V k_{SC/V} * c_v}{h} = \frac{dQ}{dt * A} \quad \text{Formel 1}$$

Hierbei gilt:

- P Permeationskoeffizient,
- $c_v$  Konzentration des freien, gelösten Arzneistoffes im Vehikel,
- D Diffusionskoeffizient des Arzneistoffes im SC,
- $V k_{SC/V}$  Verteilungskoeffizient zwischen SC und Vehikel,
- h Länge des Diffusionsweges,
- $dQ/dt$  pro Zeiteinheit aus dem Vehikel diffundierende Wirkstoffmenge und
- A Fläche.

In der Gleichung spielen nach Definition von D mit der STOKES-EINSTEIN Beziehung weitere Einflussgrößen wie die Molekülgröße, die Viskosität des Diffusionsmediums und die Temperatur eine Rolle [126].

Die Verteilung des Wirkstoffes zwischen der Formulierung und dem SC stellt einen nicht unerheblichen Faktor für die dermale bzw. transdermale Wirkung dar. Charakterisiert werden kann die Affinität eines Stoffes zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Medien mit Hilfe des Verteilungskoeffizienten  $V_k$ . Da das SC sowohl hydrophile als auch lipophile Areale beinhaltet, ist die Penetration von Stoffen mit einem Verteilungskoeffizienten nahe 1 begünstigt [238].

Eine weitere Größe zur Beurteilung der Tendenz eines Stoffes aus seiner Formulierung zu liberieren, stellt die thermodynamische Aktivität dar. Sie drückt das Verhältnis der Konzentration des Wirkstoffes ( $c_v$ ) zu dessen Sättigungslöslichkeit ( $c_s$ ) im Vehikel aus ( $c_v/c_s$ ). Erhöht man folglich die Konzentration des Stoffes in der Formulierung kommt es zu einem Anstieg der thermodynamischen Aktivität. Sie erreicht ihr Maximum bei  $c_v = c_s$  [20].

## 2.2 Möglichkeiten zur Penetrationsverbesserung von Wirkstoffen

Die gezielte Penetration von Wirkstoffen in die Haut sowie deren dortige Anreicherung oder Resorption in den systemischen Blutkreislauf stellt aufgrund der Gegenwart der Hautbarriere SC eine Herausforderung dar. Zur Verbesserung des Wirkstofftransportes in die Haut können verschiedenen Strategien verfolgt werden, von denen nachstehend einige wichtige betrachtet werden.

### 2.2.1 Modulation des *Stratum Corneums*

Die einfachste Methode zur Beeinflussung der Hautbarriere kann durch die Erhöhung des Wasseranteils in der Hornschicht realisiert werden. Durch Okklusion kann der Wassergehalt bis zu 50 % gesteigert werden [94]. Als wahrscheinlichster Mechanismus der Hydratisierung wird hier die Proteinmatrix in den Korneozyten als Angriffspunkt diskutiert [237]. Gleichzeitig kann durch die Einlagerung von Wasser in die Lipidmatrix der Ordnungszustand der Bilayer gestört werden [32]. Neben seiner keratinolytischen Wirkung besitzt auch Urea die Eigenschaft, Wasser zu binden und dadurch die Hydratation der Hornschicht zu erhöhen [226]. Infolge der Hydratisierung des SC ist es möglich, die Penetration von hydrophilen und lipophilen Arzneistoffen in die Haut zu fördern.

Eine weitere Möglichkeit zur Modulation des SC ist das Einbringen von Penetrationsenhancern. Diese Substanzen setzen die Barrierefunktion reversibel herab und erleichtern damit das Eindringen von Arzneistoffen. Die genauen Mechanismen sind häufig komplex und nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Wirkungsweisen von Enhancern sowie Beispiele für Substanzen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1 – Penetrationsenhancer und ihre Wirkweisen [150, 219, 220]**

<b>Substanzen</b>	<b>Mechanismus</b>
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Ausbildung lösemittelgefüllter Räume im SC</li><li>– Verbesserung der Fluidität der Bilayerstrukturen des SC</li><li>– Veränderung der Wirkstoffverteilung zugunsten des SC</li><li>– Interaktion mit intrazellulärem Keratin (Konformationsänderung)</li></ul>

Substanzen	Mechanismus
<b>kurzkettige Alkohole</b> z.B. Ethanol, Propanol, Butanol, Pentanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Erniedrigung der Diffusionsbarriere des SC durch Extraktion von Lipiden und Proteinen</li> <li>– Erhöhung der thermodynamischen Aktivität des Wirkstoffs im Vehikel durch schnellere Verdunstung</li> <li>– Lösungsvermittelnde Eigenschaften</li> </ul>
<b>Polyole</b> z.B. Propylenglycol, Pentylenglycol	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Schlepperfunktion ins SC für Wirkstoffe (<i>solvent drag</i>)</li> <li>– Erniedrigung der Diffusionsbarriere des SC durch Solvatisierung von Keratin</li> </ul>
<b>Tenside</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Änderung der Diffusionsbarriere durch Adsorption an Grenzflächen und Wechselwirkungen mit Membranen</li> <li>– Solubilisierung von SC Lipiden</li> </ul>
<b>Fettsäuren</b> z.B. Linolsäure, Ölsäure	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Erniedrigung der Diffusionsbarriere durch Störung der interzellulären Bilayer</li> <li>– Verbesserung der Fluidität der Bilayerstrukturen des SC</li> </ul>
<b>Terpene</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Erniedrigung der Diffusionsbarriere durch Störung der interzellulären Bilayer</li> </ul>
<b>Pyrrolidonderivate</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Erniedrigung der Diffusionsbarriere durch Störung der interzellulären Bilayer und durch Interaktion mit Keratin</li> <li>– Veränderung der Wirkstoffverteilung zugunsten des SC</li> </ul>

### 2.2.2 Physikalische und mechanische Methoden

Neben der Modulation des SC durch Hydratisierung oder Einbringen verschiedener Enhancermoleküle, ist es zudem möglich mittels physikalischer oder mechanischer Methoden die Barrierefunktion des SC herabzusetzen. In Tabelle 2 sind verschiedene Methoden mit ihren Wirkprinzipien dargestellt.

**Tabelle 2 – Physikalische und mechanische Methoden zur Penetrationsverbesserung [48, 219, 220]**

Methode	Wirkprinzip
<b>Iontophorese</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Einbringen von Wirkstoffen durch Anlegen einer geringen elektrischen Spannung</li> <li>– Ionogene Wirkstoffe werden von der Arbeitselektrode abgestoßen und in die Haut gedrängt</li> <li>– Ionentransport ist proportional zur angelegten Spannung und damit gut steuerbar</li> </ul>
<b>Elektroporation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Einbringen von Wirkstoffen durch Anlegen hoher Spannungspulse</li> <li>– Erzeugung vorübergehender hydrophiler Poren</li> </ul>
<b>Sonophorese</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Verbesserung der Konvektion und Diffusion von Wirkstoffen durch Anlegen von Ultraschall</li> <li>– Ultraschallwellen erzeugen Kavitationsblasen</li> </ul>
<b>Mikronadeln</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Einbringen von Wirkstoffen durch Perforation des SC mit Mikronadelarrays (Länge 10 µm – 200 µm)</li> </ul>

### 2.2.3 Verwendung unterschiedlicher Vehikel

Neben den oben vorgestellten Strategien zur Penetrationsverbesserung von Wirkstoffen ist es außerdem möglich durch die Verwendung geeigneter Carrier, Wirkstoffkonzentrationen in der Haut zu steigern. Zum Einsatz kommen dabei z.B. Liposomen oder die verwandten Niosomen. Bei diesen Carriersystemen wird davon ausgegangen, dass sie selbst nicht tief in die Haut penetrieren, sondern im SC oder den oberen Bereichen der lebenden Epidermis akkumulieren [23, 62, 219]. Auch die Verwendung von Nanopartikeln als Carrier für die dermale Anwendung von Wirkstoffen ist weit verbreitet und bereits in nachstehenden Quellen ausführlich beschrieben [104, 109, 122, 157, 203, 236].

Der Fokus dieser Arbeit liegt bei der Verwendung von Mikroemulsionen als kolloidale Carrier Systeme für die dermale Anwendung von Wirkstoffen. Charakteristika von Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung werden im nachfolgenden Kapitel betrachtet.

## 2.3 Mikroemulsionen

### 2.3.1 Definition und Eigenschaften

Mikroemulsionen (ME) gehören zu den modernen Arzneistoffträgersystemen. Sie sind thermodynamisch stabile, kolloidale Systeme, bestehend aus einer öligen und einer wässrigen Phase. Die Stabilisierung erfolgt durch den Einsatz von Emulgatoren. Die Bildung von ME erfolgt spontan durch Kombination geeigneter Konzentrationen der verschiedenen Phasen und Emulgatoren und wurde erstmals 1943 von HOAR und SCHULMAN beschrieben [90].

ME-Systeme sind optisch isotrope, transparente bzw. leicht opaleszente Lösungen. Sie besitzen eine geringe Viskosität und zeigen das Verhalten Newtonscher Flüssigkeiten. Zur Bildung ist keinerlei Energieaufwand erforderlich [49, 58, 147] und sie geht mit einer signifikanten Abnahme der Grenzflächenspannung einher [51, 129]. Um die benötigte niedrige Grenzflächenspannung im System zu erreichen ist es notwendig einen Co-Emulgator (z. B. kurzkettige Alkohole oder nichtionogene Emulgatoren) hinzuzufügen, der in der Lage ist durch Einlagerung in amphiphilen Grenzschichten deren Fluidität und Krümmung zu verstärken [17, 51].

Die Mikrostruktur der resultierenden ME-Systeme kann unterschiedlich ausgeprägt sein, submikroskopische Regionen von wässriger oder öliger Natur werden von einer Grenzflächenschicht der Emulgatorphase getrennt. Abhängig von der Hauptkomponente der ME werden die Systeme in Wasser-in-Öl (W/O) oder Öl-in-Wasser (O/W) Mikroemulsionen mit tröpfchenähnlicher Struktur eingeteilt. Falls in dem System ölige Phase und wässrige Phase zu gleichen Teilen enthalten sind, können bikontinuierliche Strukturen mit zusammenhängenden Bereichen getrennt von emulgatorreichen Grenzflächen beobachtet werden [195]. Die Gemeinsamkeit aller Mikrostrukturen liegt jedoch darin, dass sie sehr dynamisch sind und kontinuierlichen sowie spontanen Fluktuationen unterliegen. Innerhalb der Systeme kommt es dadurch zu laufendem Aufbrechen der Domänen und spontanen Reorganisationsprozessen [110, 123]. Die Bezeichnung Mikroemulsion ruft gelegentlich Missverständnisse hervor, denn sie impliziert die Gegenwart klassischer emulsionsartiger Eigenschaften mit Tröpfchendurchmesser im Submikronbereich. In Tabelle 3 sind die unterschiedlichen Eigenschaften von „Mikro“- und „Makro“- Emulsionen aufgeführt, um die Unterschiede dieser beiden Systeme zu verdeutlichen.

**Tabelle 3 – Unterschiedliche Eigenschaften von Mikroemulsionen und Makroemulsionen [87]**

<b>Eigenschaft</b>	<b>Mikroemulsion</b>	<b>Emulsion</b>
Erscheinungsbild	transparent / durchscheinend	milchig
Thermodynamik	stabil	instabil (kinetisch stabilisiert)
Bildungsprozess	spontan	Energieaufwand nötig
Grenzflächenspannung	gegen $0 \text{ mN m}^{-1}$	$\sim 50 \text{ mN m}^{-1}$
Mikrostruktur	dynamisch (fluktuierende Strukturen)	Einzelgebilde (bis zur Koaleszenz)

<b>Eigenschaft</b>	<b>Mikroemulsion</b>	<b>Emulsion</b>
optisch isotrop	ja	nein
Tröpfchengröße der kolloidalen Phase	5 nm – 100 nm	> 500 nm (Nanoemulsionen: > 50 nm)

Aufgrund ihrer kleinen Teilchengröße, der stark fluktuierenden Strukturen und daraus entstehenden verschiedenen Mikrostrukturen, ist die Charakterisierung entwickelter kolloidaler Systeme sehr anspruchsvoll. Die Kombination verschiedener Techniken ist nötig, um falsche Ergebnisinterpretationen ausschließen zu können. Zu der physikochemischen Charakterisierung werden unter anderem Polarisationsmikroskopie, Rheologie- und Konduktivitätsmessungen herangezogen [8, 119, 164, 212]. Etwas anspruchsvollere Untersuchungen können mit statischer (SLS) oder dynamischer Lichtstreuung (DLS), Kleinwinkelneutronenstreuung (SANS) oder Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) und Kernspin- (NMR) und Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR) durchgeführt werden [18, 116, 186, 197, 198]. Zur Veranschaulichung der Mikrostruktur ist es außerdem möglich, ME mittels Elektronenmikroskopie zu untersuchen [99].

### 2.3.2 Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung

Aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften bieten Mikroemulsionen viele Vorzüge für den Einsatz als galenische Vehikel zur dermalen Anwendung. Dazu gehören die sehr einfache Herstellung, ihre hohe Stabilität, die exzellenten Solubilisierungseigenschaften sowohl für hydrophile als auch lipophile Stoffe und ihre sehr guten Penetrationseigenschaften [87]. Ihre topische Applikation als Vehikelsysteme von Wirkstoffen ist eine innovative Möglichkeit zur Erhöhung der Verfügbarkeit von Wirkstoffen in den Zielkompartimenten der Haut. In der transdermalen Therapie ist es zudem denkbar unter Umgehung des *first pass*-Effektes, erhöhte Konzentrationen im Blutkreislauf zu erreichen. Die Verwendung von ME bietet demnach eine Reihe an Vorteilen, trotzdem ist ihre Anwendung in der Praxis noch nicht weit verbreitet. Als Nachteil von ME ist der Einsatz hoher Emulgatorkonzentrationen zu nennen. Um eine gute dermale Verträglichkeit zu erzielen, sollte die Konzentration der Tenside kleiner als 40 % gehalten werden und nur sehr gut hautverträgliche Emulgatoren zum Einsatz kommen.

Die exzellenten penetrationsverbessernden Eigenschaften für Wirkstoffe sind für ME zwar allgemein akzeptiert, jedoch ist der genaue Mechanismus ihrer Wirkweise als kolloidale Carrier noch nicht vollständig aufgeklärt. Angenommen wird ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die maßgeblich von der Zusammensetzung der ME und der daraus resultierenden Mikrostruktur abhängig sind. Der Einfluss der Emulgatorphase auf den Arzneistofftransport in die Haut wurde vielfach untersucht. Es konnte häufig beobachtet werden, dass mit steigender Emulgatorkonzentration sich nicht unbedingt auch der Flux des Wirkstoffs erhöhte [44, 53, 116, 202, 235]. Vermutlich kommt es durch Anstieg der Emulgatorphase zu einem Absinken der thermodynamischen Aktivität des Wirkstoffs im System, woraus eine schlechtere Liberationsrate resultiert [44, 235]. Die penetrationsfördernden Wirkungen der ME können

damit nicht allein auf die Wechselwirkungen der Tenside mit dem SC zurückgeführt werden. Der Einfluss der Wasserkonzentration auf die penetrationsfördernden Eigenschaften wurde ebenfalls mehrfach betrachtet. Die Untersuchungen ergaben, dass in Gegenwart von freiem Wasser im System der Wirkstofftransport in die Haut erhöht werden konnte [43, 153, 202]. Bei niedrigen Wasserkonzentrationen im System scheinen alle Wassermoleküle die Kopfgruppen der Tenside zu hydratisieren und nicht zur Penetration ins SC zur Verfügung zu stehen bzw. keine schnelle Wirkstoffdiffusion zu ermöglichen. Die Hydratisierung des SC nach Applikation der ME scheint damit Einfluss auf die Penetration hydrophiler sowie auch lipophiler Moleküle zu nehmen. Hinzuzufügen ist dabei, dass kontinuierliche und spontane Fluktuationen der Domänen innerhalb der ME eine hohe Beweglichkeit des Wirkstoffs ermöglichen, wodurch es zu einer Verbesserung des Diffusionsprozess kommt [53, 97, 116]. O/W-ME waren in den meisten Studien vermutlich aus den oben genannten Gründen anderen ME-Typen überlegen [87].

Neben der penetrationsfördernden Wirkung aufgrund der Mikrostruktur und Wirkstoffbeweglichkeit kann ebenfalls die sehr gute Solubilisierungskapazität der kolloidalen Carrier Systeme ausgenutzt werden. Appliziert man wirkstoffgesättigte oder übersättigte Systeme, entsteht eine sehr hohe thermodynamische Aktivität und zusätzlich ein sehr hoher Konzentrationsgradient zwischen Haut und Vehikel, was die Wirkstoffliberation und Penetration fördert [111, 112, 161, 221].

Als Penetrationsroute für Arzneistoffe nach Applikation von Mikroemulsionen kann im Allgemeinen der interzelluläre Weg angenommen werden. Allerdings werden auch die transglanduläre und transfolikuläre Route in Betracht gezogen [25, 43, 215]. Von Vorteil sind hierbei die geringe Grenzflächenspannung, die zu einer guten Spreitung auf der Haut führt sowie die niedrige Viskosität, die das Eindringen der Formulierung in die Hautanhangsgebilde erleichtert sowie den Hautkontakt erhöht.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Wirkung von ME in ihrer Eigenschaft als kolloidale Carrier Systeme von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, wobei die Mikrostruktur innerhalb der Systeme womöglich am stärksten für den hohen Wirkstofftransport in und durch die Haut verantwortlich ist.

Neben Untersuchungen zur Wirkweise des penetrationsfördernden Effekts von ME sind weitere Arbeiten zur dermalen Anwendung von ME erschienen. Diese sind bereits in eigener vorangegangener Arbeit umfangreich vorgestellt und diskutiert worden [74, 87]. Hierauf sei zur weiteren Orientierung verwiesen.

## **2.4 Chronisch Entzündliche Hauterkrankungen**

Ein nicht unbedeutender Teil dermatologischer Erkrankungen steht pathogenetisch im Zusammenhang mit dem Immunsystem. Hierbei sei vor allem die atopische Dermatitis, das allergische Kontaktekzem, die Urtikaria und die Psoriasis zu nennen. Zu den wichtigsten chronisch rezidivierenden entzündlichen Hauterkrankungen, deren Therapie u.a. mit Antiphlogistika und Immunsuppressiva erfolgt, zählen dabei die atopische Dermatitis sowie die Psoriasis, die im Folgenden näher vorgestellt werden.

### 2.4.1 Atopische Dermatitis

Bei der atopischen Dermatitis (AD), auch atopisches Ekzem genannt, handelt es sich um eine der häufigsten chronisch rezidivierenden entzündlichen Hauterkrankungen. Etwa 5 % - 20 % der Kinder sowie 1 % - 3 % der Erwachsenen sind von dieser Krankheit betroffen. In den letzten Jahren ist eine steigende Inzidenz zu beobachten [69, 192], die womöglich auf eine verstärkte Belastung von Umwelttoxinen oder auch auf die steigende Aufmerksamkeit gegenüber dieses Krankheitsbildes zurückzuführen ist. Klinisch tritt die AD in der akuten Phase bei Kindern als intensiv juckende, erythematöse Papulovesikel verbunden mit Krusten- und Schuppenbildung und serumhaltigen Exsudaten in Erscheinung. Im chronischen Verlauf der Krankheit kommt noch eine deutliche Lichenifikation der befallenen Hautareale hinzu. Prägend ist allerdings, dass zu allen Stadien der AD ein trockener Hautzustand existiert [224].

Die Ursachen sowie die detaillierten Entstehungs- und Verlaufsmechanismen sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Die Krankheit resultiert aus verschiedenen komplexen Interaktionen zwischen genetischen Prädispositionen, der Umwelt, infektiöser Erreger, der Störung der Hautbarriere und immunologischen inflammatorischen Prozessen. Inwieweit die genetische Prädisposition für dieses Krankheitsbild verantwortlich ist, ist noch nicht vollständig geklärt [192, 224]. Möglicherweise wird die bei der Atopie auftretende T-Zell-Aktivierung genetisch so gesteuert, dass es nach Antigenexposition präferenziell zur Ausbildung so genannter Th2-Lymphozyten kommt. Th2-Zellen produzieren dabei Zytokine (IL-3, IL-4 und IL-5), die die IgE-Produktion induzieren und zusätzlich die Reifung eosinophiler Granulozyten fördern [103, 108, 138, 209]. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass spezifische T-Zell-Klone von Allergenen wie Hausstaubmilben oder Pollen im Blut von Patienten größtenteils dem Th2-Typ angehören. Durch das Th2-Reaktionsmuster wird einerseits die IgE-Produktion induziert und andererseits kann am Ort des antigenen Depots eine Ekzemreaktion ausgelöst werden [103, 108, 159, 160].

Die Therapie erfolgt zum einen als Basistherapie mit verschiedenen Emollientien. Diese dienen zur Linderung des Juckreizes sowie der Hauttrockenheit. Die Basistherapie wird in symptomfreien Intervallen sowie beim Auftreten von Hauterscheinungen angewendet. Falls es nicht gelingt das ekzematöse Geschehen allein mit Emollientien zu therapieren, ist zum anderen eine antientzündliche Therapie möglich. Zum Einsatz kommen dabei bevorzugt Glucocorticoide, jedoch zeigen auch topische Makrolide in zweiter Linie gute Therapieerfolge [1].

### 2.4.2 Psoriasis

Die *Psoriasis vulgaris* ist eine häufig auftretende, chronisch rezidivierende entzündliche Erkrankung, die durch charakteristische schuppene Herde gekennzeichnet ist. Die pustulöse Variante ist die *Psoriasis pustulosa*, die als exsudative Maximalvariante dieser Erkrankung gewertet werden kann [191].

Die Inzidenz beläuft sich in der westlichen Bevölkerung auf 2 %. In Amerika sollen bis zu 4 % betroffen sein. Zur Manifestation der Krankheit kommt es in der Regel jenseits der Pubertät [45, 152, 192]. Die *Psoriasis vulgaris* ist durch einen chronischen und schubartigen Verlauf gekennzeichnet. Das Krankheitsbild weist als typische Läsion meist rundliche, aber scharf begrenzte, ziegelrote Herde mit leichter Infiltration auf. Diese Herde sind charakteristisch mit einer silbrig-weißen, groß- bis groblamellösen Schuppung versehen. Bevorzugt tritt sie an Knien und Ellenbogen, der Sakralregion und im behaarten Kopfbereich auf.

Bei der Psoriasis handelt es sich um eine durch T-Zellen vermittelte Entzündungsreaktion. Maßgeblich wird die Entzündung von Th1-Zellen dominiert [133, 191]. Es wird allerdings auch eine Beteiligung der T-Helferzellen Th17 diskutiert [55]. Ausgelöst wird die Krankheit aus einem komplexen Zusammenspiel von Umweltfaktoren sowie genetischen Faktoren. Es wird von genetischen Prädispositionen ausgegangen [55]. Die Entzündungsreaktion geht einher mit einer epidermalen für die Psoriasis charakteristischen Hyperproliferation und Differenzierungsstörung. Diese Dysregulation zeigt vordergründig die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Epidermis, bindet jedoch die meisten Zelltypen und Mediatorsysteme der Haut mit ein [192, 222].

Die Therapie der Psoriasis beinhaltet die Entzündungshemmung, Proliferationshemmung, Immunsuppression, Hemmung der Migration und Funktion neutrophiler Granulozyten und die Vasokonstriktion. Zur Anwendung kommen dabei u.a. Glucocorticoide, Psoralene gekoppelt mit UVA-Bestrahlung, Dithranol und Vitamin D3-Analoga. Begleitet wird die Therapie der akuten Effloreszenzen durch eine pflegende Basistherapie, die auch nach Besserung der Symptome weitergeführt wird [150, 152].

### 3 Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von Tacrolimus

In der topischen Standardtherapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen der Haut wie atopischer Dermatitis, Psoriasis vulgaris und exzematösen Hautveränderungen sind Glucocorticoide bis heute das Mittel der Wahl. Glucocorticoide bieten vielseitige Therapieeffekte wie antiproliferative, vasokonstriktorische, immunsuppressive und vor allem antiinflammatorische Wirkungen, die eine möglichst vollständige Entzündungshemmung der chronisch-entzündlichen Dermatosen bewirken. Problematisch sind allerdings die in dieser Behandlung auftretenden unerwünschten Wirkungen. Dazu gehören unter anderem periorale Dermatitis, Talgveränderungen, Hirsutismus sowie eine Kapillarfragilität der Gefäße. Das Hauptproblem, das insbesondere eine Dauertherapie der Glucocorticoide erschwert, ist jedoch die auftretende Hautatrophie.

Infolge der Weiterentwicklung topisch anwendbarer Glucocorticoide konnten in ihrer vierten Generation, den sogenannten *soft steroids*, diese Nebenwirkungen zwar gesenkt werden, jedoch erfolgte damit auch eine Verminderung der Wirkstärke [84]. Dem verbesserten Nutzen-Risiko-Verhältnis dieser *soft steroids* steht häufig auch eine durch Verunsicherung bedingte Ablehnungshaltung des Patienten gegenüber. Der Bedarf an zuverlässig wirksamen, nebenwirkungsarmen und topisch anwendbaren Therapeutika für entzündliche Hauterkrankungen ist damit immer noch gegeben [29].

Immunsuppressive Makrolide wie Tacrolimus (TCL) werden in diesem Zusammenhang mit großem Interesse betrachtet. Die folgenden Kapitel sollen beleuchten, welches Potential Mikroemulsionen (ME) bieten, die Behandlung chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen insbesondere der Psoriasis vulgaris mit TCL zu verbessern.

#### 3.1 Tacrolimus – Pharmakologisches Profil

Die Isolierung von TCL gelang erstmals 1984 in Japan aus dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis*. Der Name Tacrolimus setzt sich aus seinem Entdeckungsort Tsukuba, seiner chemischen Struktur Makrolid und seiner Wirkung als Immunsuppressivum zusammen. Die Aktivität dieses starken Immunsuppressivums ist *in vitro* 50 - 100 mal und *in vivo* 10 - 20 mal höher als die von Ciclosporin A [92]. Obwohl beide Arzneistoffe strukturell keine Gemeinsamkeit zeigen, ist ihr Wirkmechanismus, der nachstehend erläutert wird, gleich.

Nach zahlreichen erfolgreichen Tierexperimenten wurde TCL erstmals 1989 von THOMAS E. STARZL an der Universität Pittsburgh an lebertransplantierten Patienten als *Rescue Therapie* angewandt [54, 184, 206]. 1999 gelang schließlich die Markteinführung von TCL in Deutschland unter dem Handelsnamen Prograf<sup>®</sup> als Immunsuppressivum zur Rejektionsprophylaxe im Rahmen der allogenen Leber- und Nierentransplantationsprophylaxe [184]. 2002 folgte die Zulassung von TCL als Salbe in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 % und 0,03 %) unter dem Namen Protopic<sup>®</sup> zur Therapie der mittelschweren bis schweren atopischen Dermatitis. Indiziert ist die Anwendung von Protopic<sup>®</sup> bei Patienten, die auf eine herkömmliche Therapie nicht reagiert haben bzw. diese nicht vertragen [50].

TCL ist wie der verwandte Wirkstoff Sirolimus strukturell ein Makrolidlacton (Abbildung 3), funktionell gehört es jedoch anders als Sirolimus in die Gruppe der Calcineurininhibitoren.

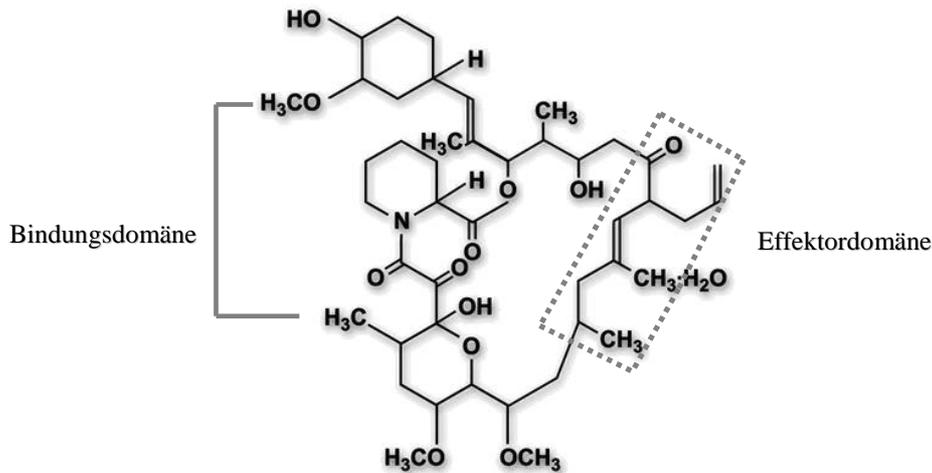
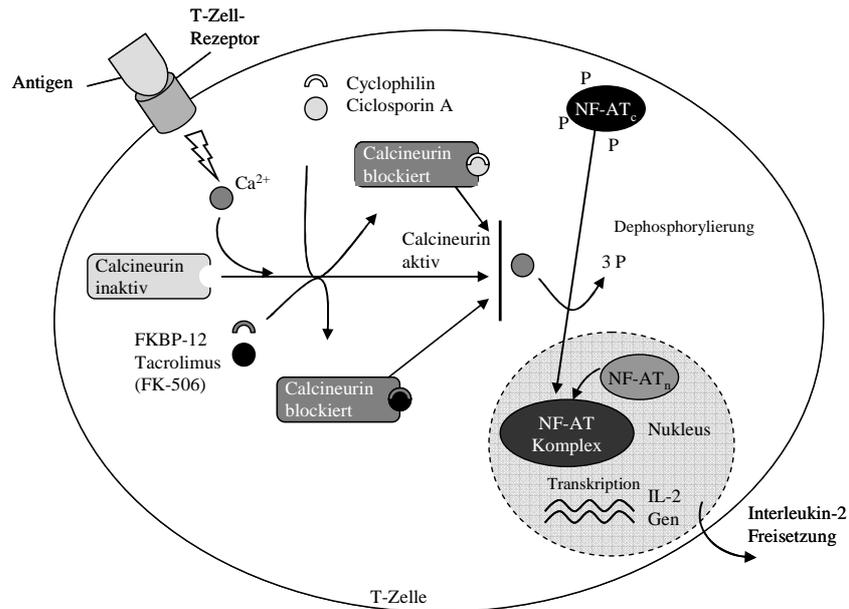


Abbildung 3 – Strukturformel von TCL (FK 506) mit seiner Effektor- und Bindungsdomäne

Hauptangriffspunkt der drei bekannten Calcineurininhibitoren Ciclosporin A, Tacrolimus und Pimecrolimus sind die T-Lymphozyten (Abbildung 4). Die Arzneistoffe bilden, einmal in die Zelle gelangt, einen Komplex mit zelleigenen Immunophilinen. Ciclosporin A bildet diesen Komplex mit Cyclophilin, während Tacrolimus und Sirolimus an das *FK 506 binding protein* (FKPB-12) binden. Beide Komplexe führen durch Anlagerung an die Phosphatase Calcineurin zu deren Hemmung. Das Tacrolimusmolekül (Abbildung 3) besitzt für diese Funktion eine Bindungsdomäne, mit der es sich an FKPB-12 anlagern kann sowie eine Effektordomäne, über die der entstandene Komplex mit hoher Affinität an die Calcineurinphosphatase binden und diese hemmen kann [70, 124, 134, 135, 144].

Da es sich bei Calcineurin um eine calcium- und calmodulinabhängige Phosphatase handelt, hat ein intrazytoplasmatischer Anstieg der Calciumkonzentration, der bei Stimulation von T-Zellenrezeptoren erfolgt, ihre Aktivierung zur Folge. Calcineurin dephosphoryliert daraufhin den zytosolischen Teil des Kernfaktors NF-ATc (*nuclear factor of activated cells*), woraufhin es zur Translokation von NF-ATc in den Zellkern kommt. Im Zellkern wird dann gemeinsam mit dem nucleären Teil NF-ATn der funktionsfähige Kernfaktor NF-AT gebildet. Dieser Kernfaktor, der sich nur in T-Lymphozyten befindet, initiiert die Transkription von Genen proinflammatorischer Zytokine durch Bindung an Promoterregionen, vor allem von Interleukin 2 (IL-2), aber auch IL-4, IL-5, Interferon  $\gamma$  und TNF $\alpha$  [184].

Komplexiert nun aber der Tacrolimus-FKPB-12-Komplex Calcineurin, wird dessen enzymatische Aktivität blockiert, wodurch es zu keiner Aktivierung und Translokation von NF-ATc kommen kann. Eine Bildung von NF-AT findet nicht mehr statt und damit auch keine Transkription von IL-2, das eine wichtige Rolle in der Immunreaktion spielt. Damit kommt es zu einer verminderten Synthese und Freisetzung weiterer Zytokine, Proliferationsfaktoren und der Aktivierung von T-Lymphozyten [218, 228]. Ohne die Wirkung von IL-2 verharren die T-Lymphozyten in der G<sub>0</sub>- oder der G<sub>1</sub>- Phase des eukaryoten Zellzyklus. TCL beeinflusst allerdings nicht bereits aktivierte T-Zellen und auch keine calciumunabhängigen Aktivierungsprozesse.



**Abbildung 4 – Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von TCL und Ciclosporin A modifiziert nach RUPPRECHT [184].**

Neben der Verwendung von TCL in der Behandlung und Prophylaxe von Transplantatabstoßung nach Nieren- und Lebertransplantationen wurde erstmals 1992 von JEGASOTHY et al. nach systemischer Gabe von TCL ein Therapieerfolg bei Psoriasis vulgaris beobachtet [100]. Sieben Patienten wurden mit einer täglichen Dosis von zweimal  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  über vier Wochen behandelt. Es konnte eine Verbesserung der Symptome oder sogar eine vollständige Remission beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden in einer in Europa durchgeführten multizentrischen, doppelblinden placebokontrollierten Studie bestätigt. Nach neunwöchiger täglicher oraler Gabe von  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  bis  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  TCL konnte ein signifikanter Rückgang psoriatischer Läsionen gemäß des PASI Scores festgestellt werden [30].

Die erhaltenen klinischen Ergebnisse zeigen damit auf, dass es sich bei TCL um einen effektiven Wirkstoff in der Behandlung der Psoriasis handelt. Die dermale Applikation von TCL zur Therapie von entzündlichen Hauterkrankungen wird im folgenden Kapitel näher betrachtet.

### 3.2 Tacrolimus in der dermalen Anwendung

TCL ist zur lokalen Therapie der atopischen Dermatitis in Form einer lipophilen Salbe (Protopic®) in Deutschland verfügbar. Protopic® besteht aus weißer Vaseline, gebleichtem Wachs, dickflüssigem Paraffin sowie Hartparaffin. Darin dispergiert befinden sich als Quasiemulsion Tröpfchen von Propylencarbonat, in denen TCL gelöst vorliegt [61].

Zu den lokalen Nebenwirkungen von Protopic® zählen Hautreizungen wie Brennen und Juckreiz, die bei 50 % der Patienten auftreten und innerhalb einer Woche meistens wieder verschwinden sowie Hautrötungen. An den Behandlungsstellen wurde zudem häufig ein Wärmegefühl, Schmerz, Parästhesie und Ausschlag beobachtet. Ebenfalls kann es zum Auftreten von Follikulitis, Akne und Herpesvirusinfektionen kommen [61]. Im Gegensatz zu Glucocorticoiden konnte eine Atrophie der Haut jedoch nicht beobachtet werden. Vielmehr konnte in einer einjährigen Studie beobachtet werden, dass die Monotherapie mit

Calcineurininhibitoren zu einem Rückgang der atrophischen Hautveränderungen bei mit Steroiden behandelten Patienten führte [178].

Die Wirksamkeit von TCL in der lokalen Therapie der atopischen Dermatitis konnte bereits durch placebokontrollierte, doppelblinde, multizentrische Studien in Europa und den USA aufgezeigt werden [6, 27]. Auch für Kinder im Alter von 3 bis 6 Jahren konnte ein Therapieerfolg von TCL bei atopischer Dermatitis erzielt werden [187, 201]. Die Wirksamkeit von TCL beim allergischen Kontaktekzem wurde am Meerschweinchenmodell und am Menschen gezeigt [127, 128]. ASHCROFT et al. konnten sogar eine stärkere Wirksamkeit von 0,1 % TCL im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung von 0,1 % Hydrocortisonbutyrat am Körper und 1 % Hydrocortisonacetat im Gesicht nachweisen [14]. Auch im Vergleich mit dem Calcineurininhibitor Pimecrolimus zeigte TCL eine höhere Wirksamkeit und einen schnelleren Wirkeintritt [155].

Der Wirkmechanismus von TCL in der Therapie der atopischen Dermatitis ist nicht vollständig geklärt. Neben dem oben beschriebenen Wirkmechanismus der Hemmung der Calcineurinphosphatase wurde nachgewiesen, dass TCL die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen der Haut sowie aus basophilen und eosinophilen Granulozyten hemmt. Im Tierversuch konnte außerdem beobachtet werden, dass Tacrolimussalbe Entzündungsreaktionen in experimentellen Dermatitismodellen unterdrückt, die eine Ähnlichkeit mit dem atopischen Ekzem beim Menschen aufweisen [61].

Neben der Therapie der atopischen Dermatitis ist auch die Behandlung der Psoriasis vulgaris mit TCL untersucht worden. Der Einsatz in der Therapie der Plaque-Psoriasis hat sich bislang aufgrund der womöglich schlechten Penetration durch die schuppenden Läsionen, die eine erhöhte Diffusionsdicke bzw. Barriere darstellen, nicht bewährt [80, 239].

Durch Verwendung von Okklusion als physikalische Methode der Penetrationsverbesserung konnten allerdings Erfolge in der Therapie der Psoriasis erzielt werden. REMITZ et al. zeigten eine Verminderung von Erythema und Infiltration bei Plaque-Psoriasis Patienten durch Behandlung mit Tacrolimussalbe unter Okklusionsbedingungen oder durch Applikation in einer *Finn chamber* [179]. Des Weiteren wurde eine Verbesserung der Wirkstoffpenetration von ERDOGAN et al. mit einer liposomalen Lotion im murinen Modell gezeigt [60]. Die Ergebnisse einer klinischen Studie bleiben abzuwarten.

Studien zur Anwendung von topischen TCL im Gesicht oder auch in Hautfalten zeigten ebenfalls eine gute Wirksamkeit. LEBWOHL et al. und FREEMAN et al. zeigten eine signifikante Verbesserung der Läsionen in der Therapie von Gesichtsporiasis sowie inverser Psoriasis nach Applikation von Tacrolimussalbe. [68, 130, 131]. STEELE et al. konnten die Ergebnisse in der Behandlung der inversen Psoriasis an Kindern bestätigen. Zwölf der 13 Patienten zeigten nach Applikation von Protopic<sup>®</sup> innerhalb von zwei Wochen einen vollständigen Rückgang der Läsionen [208]. KROFT et al. untersuchten die Therapie von Psoriasis im Gesicht mit Tacrolimussalbe und konnten nach einem Monat eine deutliche Verbesserung und nach fünf Monaten eine vollständige Abheilung der Läsionen beobachten [117]. YAMAMOTO et al. erzielten ebenfalls gute Erfolge mit der Applikation von 0,1 %iger Tacrolimussalbe in der Therapie der Psoriasis im Gesicht sowie bei zwei Patienten im Mundbereich [232, 233].

Diese guten Ergebnisse in der Therapie der Psoriasis durch Einsatz von Okklusion, einer Modifizierung des Vehikels oder an dünneren Hautarealen im Gesicht und in Hautfalten können durch die besseren Penetrationsvoraussetzungen für TCL erklärt werden.

Die bislang verfügbaren Vehikel zur dermalen Anwendung sind damit trotz der Wirksamkeit bei Psoriasis nicht in der Lage, TCL in allen Hautarealen in therapeutischen Konzentrationen in tiefere Hautschichten penetrieren zu lassen, weshalb der Einsatz innovativer galenischer Vehikel unerlässlich ist, um adäquate Konzentrationen für eine Erhöhung der lokalen Bioverfügbarkeit und damit eine Realisierung bzw. Verstärkung des therapeutischen Effektes in der Therapie der Psoriasis zu erzielen.

Trotz der sehr guten Wirksamkeit von TCL in der topischen Therapie von Hauterkrankungen wurden der EMEA Fälle von Neoplasien unter der Therapie von TCL und Pimecrolimus gemeldet [13]. In Tierexperimenten konnte bei hochdosierter Anwendung eine dosisabhängige ansteigende Inzidenz von Tumorneubildungen gezeigt werden [10]. Obwohl eine kausale Verbindung in verschiedenen Studien nicht bestätigt werden konnte [12, 185], führte die FDA im März 2005 einen *Black Box* Warnhinweis auf ein möglicherweise erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen durch die Behandlung mit Calcineurininhibitoren ein. Somit bleibt den topischen Calcineurininhibitoren zurzeit leider nur der Reservestatus. Da jedoch die topische Langzeitanwendung von Glucocorticoiden sehr problematisch ist, stellt TCL eine sehr wichtige Alternative mit möglicherweise besserem Nutzen-Risiko-Verhältnis dar.

### 3.3 Physikochemische Eigenschaften von Tacrolimus

Bei TCL (Summenformel  $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ ) handelt es sich chemisch um ein Makrolidlacton. Die Molmasse des Moleküls beträgt für das Monohydrat  $822,05 \text{ g mol}^{-1}$ . Der Schmelzpunkt liegt bei  $127 \text{ °C} - 129 \text{ °C}$ . TCL besitzt zwei  $pK_s$ -Werte bei 9,97 und -2,38. Die Wasserlöslichkeit ist von pH 1 – pH 10 gleichbleibend schlecht [194]. Gut löslich ist TCL in Methanol, Ethanol, Aceton, Chloroform, Ethylacetat oder Ether [141]. Die schlechte Wasserlöslichkeit wird ebenfalls durch den hohen Verteilungskoeffizienten  $\log P$  bestätigt, der bei  $3,96 \pm 0,83$  liegt [194]. Der pH-Wert hat im Bereich 1 – 8 kaum Einfluss auf die Verteilung von TCL zwischen der lipophilen und hydrophilen Phase, weshalb der  $\log D$  konstant bleibt. Ab einem pH-Wert von 9 sinkt der  $\log D$  Wert auf 3,91 und bei pH 10 auf 3,64, was für eine geringfügig höhere Verteilung in der hydrophilen Phase spricht [194]. Experimentelle Bestimmungen des Verteilungskoeffizienten bei bestimmten pH-Werten zeigten Abweichungen von den kalkulierten Ergebnissen. BILLICH et al. ermittelten bei pH 7,4 für TCL einen höheren  $\log D_{\text{Octanol/Puffer } 7,4}$  von  $6,09 \pm 0,04$  [26], während LUCANGIOLI et al. einen leicht niedrigeren  $\log D_{\text{Octanol/Puffer pH } 7,5}$  bei pH 7,5 von 3,77 ermittelten [136]. Trotz der Abweichungen zeigen alle Ergebnisse auf, dass es sich bei TCL um einen sehr lipophilen Arzneistoff handelt.

#### 3.3.1 Sättigungslöslichkeiten

Zur Charakterisierung des Arzneistoffes und im Vorfeld der Bestimmung verschiedener Verteilungskoeffizienten wurden die Sättigungslöslichkeiten des Wirkstoffes in Phosphatpuffer bei unterschiedlichen pH-Werten und Octanol bestimmt.

Die in der Literatur angegebene schlechte Wasserlöslichkeit konnte experimentell bestätigt werden (Tabelle 4). Bei unterschiedlichen pH-Werten kam es jedoch zu starken Löslichkeitschwankungen. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Instabilität des Wirkstoffes bei höheren pH-Werten sein. Dies wird in Kapitel 3.3.3 noch näher betrachtet, da es auch für die Entwicklung kolloidaler Carrier zur dermalen Anwendung von Relevanz ist. Die Löslichkeit von TCL steigt in dem lipophilen Medium Octanol stark an, was auch für eine bevorzugte Verteilung von TCL in diesem Medium spricht und im folgenden Kapitel 3.3.2 vorgestellt wird.

**Tabelle 4 – Sättigungslöslichkeiten von TCL in verschiedenen Medien (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ )**

Medium	Sättigungslöslichkeit $c_s$ [mg mL <sup>-1</sup> ]	Löslichkeit nach Ph.Eur.[162]
Puffer pH 5	$62,42 \cdot 10^{-3} \pm 34,51 \cdot 10^{-3}$	praktisch unlöslich <sup>a</sup>
Puffer pH 7,4	$11,88 \cdot 10^{-3} \pm 16,45 \cdot 10^{-3}$	praktisch unlöslich <sup>a</sup>
Puffer pH 9	$0,25 \cdot 10^{-3} \pm 0,35 \cdot 10^{-3}$	praktisch unlöslich <sup>a</sup>
Octanol	$36,20 \pm 3,21$	löslich <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Löslichkeit < 100 µg mL<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>Löslichkeit 30 mg mL<sup>-1</sup> – 100 mg mL<sup>-1</sup>

### 3.3.2 Verteilungskoeffizienten

Zur besseren Beurteilung der Penetrationseigenschaften von TCL wurden Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Puffer bei drei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Dazu wurden der physiologische pH-Wert von 7,4, ein leicht saurer pH-Wert von 5, wie man ihn auf der Hautoberfläche vorfindet, sowie ein basischer pH-Wert von 9 ausgewählt.

**Tabelle 5 – Verteilungskoeffizienten (log D) von TCL zu unterschiedlichen pH-Werten (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ )**

Phasen	log D
Octanol/Puffer pH 5	$3,56 \pm 0,20$
Octanol/Puffer pH 7,4	$3,56 \pm 0,1$
Octanol/Puffer pH 9	$4,12 \pm 0,57$

Wie in der Literatur angegeben bleibt der log D bei den pH-Werten 5 und 7,4 stabil. Die experimentell ermittelten log D Werte liegen hier jedoch unter dem *in silico* berechneten Wert von 3,96, was für eine leicht höhere Hydrophilie von TCL spricht. Der Anstieg des log D-Wertes bei pH 9 widerspricht den Angaben in der Literatur. Da es, wie schon beim der Versuch der Sättigungslöslichkeiten vermutet, bei höheren pH-Werten zu einer Zersetzung von TCL zu kommen scheint (vgl. Kapitel 3.3.1), ist dieser höhere log D<sub>Octanol/Puffer pH 9</sub>-Wert eher auf eine Instabilität in der wässrigen Phase zurückzuführen als auf eine höhere Verteilung des Wirkstoffes in die Octanolphase.

### 3.3.3 Stabilität bei unterschiedlichen pH-Werten

Zur Überprüfung der Wirkstoffstabilität wurden wässrige Lösungen hergestellt. Aus Löslichkeitsgründen wurde nicht pures Wasser verwendet, sondern Pentylenglycol/Wasser (2:1 (V/V)) Mischungen mit 0,5 %igem Tacrolimusgehalt hergestellt. Die Mischungen wurden auf sieben pH-Werte zwischen pH 4 und pH 10 eingestellt. Der Wirkstoffgehalt wurde nach unterschiedlichen Lagerzeiten überprüft.

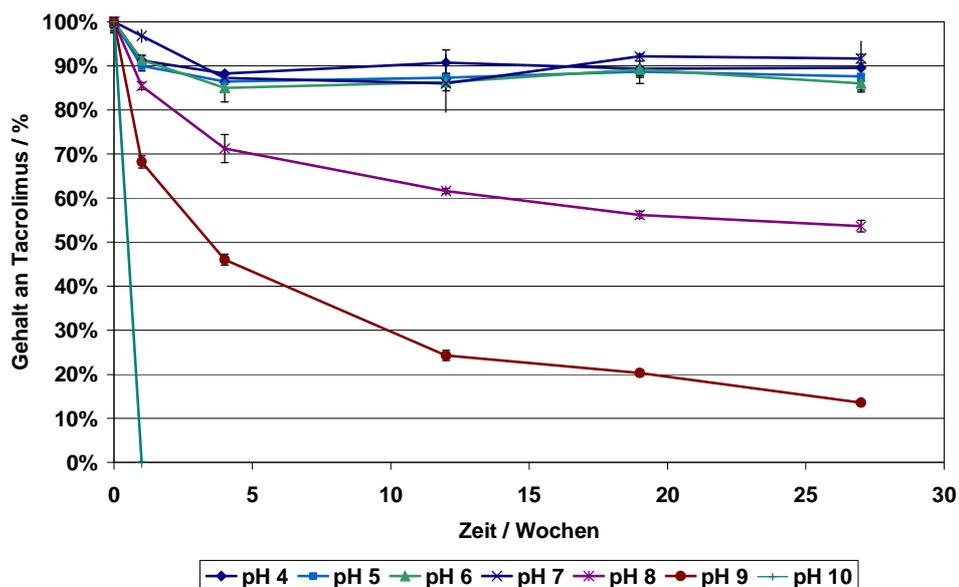


Abbildung 5 – Tacrolimusstabilität in wässriger Lösung bei unterschiedlichen pH-Werten (Angaben in % - m/m) (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ ).

Die Untersuchung der pH-Stabilität von TCL hat deutlich gemacht, dass der Wirkstoff bei pH-Werten über 7 Instabilitäten zeigt. Ab einem pH-Wert von 8 war schon nach fünf Wochen ein Wirkstoffabfall von etwa 30 % in der Lösung zu beobachten (Abbildung 5). Bei pH 9 sank der Tacrolimusgehalt nach fünf Wochen bereits auf unter die Hälfte des Anfangsgehaltes. Bei pH 10 war die Instabilität am stärksten ausgeprägt. Hier war nach einer Woche kein TCL mehr in der Lösung detektierbar.

In der Literatur sind Veröffentlichungen von TANAKA et al. zu finden, die von einem Zerfall der Struktur unter alkalischer Hydrolyse berichten. ASKIN et al. fügten diesen Beobachtungen 1989 eine experimentell bestätigte leichte, durch Hydroxide verursachte Benzilsäureumlagerung des Tricarbonylsystems von TCL hinzu. Diese Erkenntnisse erklären die Instabilität in alkalischer Lösung [15, 16, 213].

Für die dermale Wirkung ist diese Instabilität nicht von Bedeutung, da der sich auf der Hautoberfläche befindende Schutzfilm einen sauren pH-Wert besitzt und in der Haut der physiologische pH-Wert von 7,4 vorherrscht. Da TCL bei pH 7 stabil war und bei pH 8 erst nach fünf Wochen einen starken Wirkstoffabfall zeigte, ist nicht von einer verminderten Wirkung aufgrund einer pH-Instabilität auszugehen. Für die Entwicklung eines geeigneten Vehikels für TCL ist es jedoch erforderlich, einen leicht sauren pH-Wert einzustellen, um einer Wirkstoffzersetzung in der Formulierung vorzubeugen. Da Arzneiformen zur dermalen Anwendung meistens im neutralen bis leicht sauren Bereich eingestellt werden und diese aufgrund der leicht sauren Hautoberfläche auch gut verträglich sind, sollte dies unproblematisch sein [180].

### 3.3.4 Zusammenfassung der physikochemischen Eigenschaften

Die physikochemischen Eigenschaften von TCL sind mit Blick auf seine Masse von über  $800 \text{ g mol}^{-1}$  und seiner großen Makrolidstruktur ungünstig für die topische Penetration von TCL durch das SC. Hinzu kommt, dass TCL eine hohe Lipophilie besitzt. Der errechnete log P liegt bei fast 4. Als ideal für die Penetration ins SC mit seinen hydrophilen und lipophilen Ei-

genschaften wird ein Verteilungskoeffizient von 1 für Wirkstoffe angesehen [238]. Neben den physikochemischen Parametern ist bei der Entwicklung eines geeigneten Vehikels zur dermalen Applikation zu beachten, dass TCL, wie experimentell gezeigt, bei höheren pH-Werten chemisch instabil ist.

Eine galenische Optimierung des Vehikels ist somit unerlässlich, um therapeutische Konzentrationen insbesondere in der Therapie der Plaque Psoriasis zu erzielen.

### **3.4 Entwicklung kolloidaler Carriersysteme**

Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung verschiedener O/W-Mikroemulsionssysteme zur dermalen Anwendung. Diese sollten eine gute Solubilisierungskapazität für TCL besitzen. Gleichzeitig wurde bei der Entwicklung der Systeme in der Auswahl der Inhaltsstoffe auf eine gute Hautverträglichkeit geachtet, um die Systeme für die dermatologische Anwendung zu optimieren.

#### **3.4.1 Entwicklung der Mikroemulsionen**

Aufgrund der sehr lipophilen Eigenschaften von TCL ist die Entwicklung eines geeigneten Vehikels zur dermalen Administration schwierig. Die Grundlage, der sich im Handel befindenden Salbe Protopic<sup>®</sup>, basiert auf rein lipophilen Bestandteilen und ist wasserfrei. Es handelt sich dabei um eine Lösungssalbe, in der der Wirkstoff in eingebetteten Propylencarbonatröpfchen gelöst vorliegt. Die Freisetzung von TCL könnte durch Inkorporierung in ein hydrophileres Vehikel noch verbessert werden. Da der Verteilungskoeffizient hoch ist, würde TCL sich damit zu größeren Teilen in das lipophile SC verteilen. Die aufgezeigte schlechte Löslichkeit von TCL in wässrigen Phasen und seine Instabilität bei basischen pH-Werten stellt die Entwicklung problematisch dar. Eine Suspensionszubereitung mit kristallinem dispergiertem TCL hat sich nach YOSHIDA et al. aufgrund schlechter Freisetzungsraten nicht bewährt [234].

Aufgrund ihrer guten Solubilisierungseigenschaften eignen sich besonders ME als kolloidale Carrier für TCL. Die Herstellung einer Lösungszubereitung in geeigneten Wirkstoffkonzentrationen ist möglich. Gleichzeitig ist durch die penetrationsfördernden Eigenschaften der ME eine Verbesserung der dermalen Bioverfügbarkeit von TCL zu erwarten. Angestrebt wurde in dieser Arbeit die Entwicklung verschiedener O/W-Mikroemulsionssysteme mit einem maximalen Emulgatorgehalt von 30 % und einer Ölkonzentration von mindestens 5 %, um Systeme für die Solubilisierung lipophiler Arzneistoffe zu erhalten und trotzdem eine dermale Verträglichkeit gewährleisten zu können. Es wurden verschiedene Emulgatoren getestet, um empirisch ME zu ermitteln. Der Schwerpunkt in der Wahl der Emulgatoren lag bei der sehr guten Hautverträglichkeit, weshalb Lecithin, Alkylpolyglucoside (vgl. Kapitel 4.3.1) und möglichst nicht ethoxylierte Emulgatoren bevorzugt wurden.

Die Verwendung von Lecithin als Emulgator in topischen Formulierungen zeigt selbst in hohen Konzentrationen sehr gute Verträglichkeiten und ist dank seiner Eigenschaft als Penetrationsverbesserer sehr vielversprechend [28]. Die Bildung von ME mit Lecithin ist durch die amphiphile Struktur des Hauptbestandteils Phosphatidylcholin (Abbildung 6) mög-

lich. Phospholipide können dabei in begrenzten Bereichen allein oder mit Hilfe eines Co-Tensids ME bilden. Besonders lecithinhaltige O/W-ME haben sich vorteilhaft für die dermale Penetration von Arzneistoffen erwiesen [42, 43]. Eine umfassende Ausführung über verschiedene phospholipidhaltige ME ist in vorangegangener Arbeit bereits vorgestellt worden [87]. Ethoxylierte Emulgatoren werden kontrovers diskutiert, da sie die Penetration allergener und irritierender Substanzen fördern und dadurch Hautirritationen verursachen können. Gleichzeitig stehen sie im Verdacht, besonders in Lichtschutzformulierungen *Acne aestivalis* auszulösen [125]. Da die Hautverträglichkeit in der Entwicklung im Vordergrund stand, wurde auf die Verwendung dieser problematischen Emulgatorgruppen weitestgehend verzichtet.

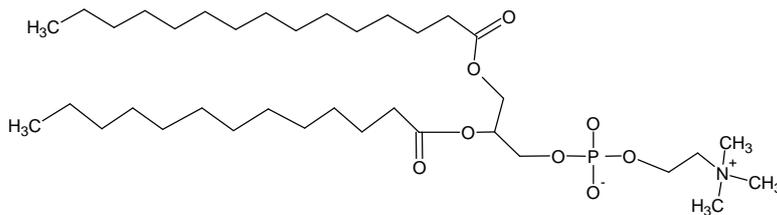


Abbildung 6 – Strukturformel von Phosphatidylcholin (Fettsäurereste sind in ihrer Kettenlänge und Art der Fettsäure variabel)

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, folgende ME-Systeme zu ermitteln:

<b>Mikroemulsion A</b>	(% - m/m)
Phospholipon 90G und Plantacare 2000 UP (1:2)	10 % - 75 %
lipophile Phase*	1 % - 35 %
1,2-Pentylenglycol	10 % - 20 %
Wasser	1 % - 79 %

\* Cetiol B, IPM, IPP, Myritol 318, Spezialöl 107 oder Tegosoft CI

<b>Mikroemulsion B</b>	(% - m/m)
Phospholipon 90G und Tagat S2 (1:3)	15 % - 60 %
Cetiol B	5 % - 70 %
Wasser/1,2-Propylenglycol (1:2)	10 % - 80 %

<b>Mikroemulsion C</b>	(% - m/m)
Phospholipon 90G und Span 80 (3:2)	5 % - 70 %
Cetiol B	7,5 % - 70 %
1,2-Pentylenglycol	20 %
Wasser	2,5 % - 45 %

Als lipophile Phase wurde in allen drei Systemen Cetiol B gewählt. Die Einarbeitung anderer pharmazeutischer Öle wie IPM, Spezialöl 107 und Tegosoft CI in das System Phospholipon 90G und Plantacare 2000 UP erwies sich jedoch ebenfalls als möglich. Die Maximalkonzentrationen der verschiedenen Phasen variierten durch den Austausch der Ölphase. Zur Systemstabilisierung wurde der hydrophilen Phase Wasser 1,2-Pentylenglycol (PeG) in Konzentrationen

zwischen 10 % - 20 % oder 1,2-Propylenglycol im Verhältnis 2:1 (V/V) zu Wasser hinzugesetzt.

Die genauen Phasengrenzen und die Charakterisierung aller drei ME-Systeme sind in Kapitel 5 dargestellt.

### 3.4.2 Charakteristika der verwendeten Substanzen

Die für die Entwicklung verschiedener ME verwendeten Substanzen werden nun im Folgenden näher vorgestellt.

#### Emulgatoren

**Phospholipon 90G** wird aus Sojabohnen-Lecithin gewonnen, dann angereichert und aufgereinigt. Der Anteil an Phosphatidylcholin beläuft sich auf 92 % - 98 %. Lysolecithin ist zu maximal 6 % und neutrale Öle und Sterole sind zu maximal 3 % enthalten. Des Weiteren findet sich bis zu 0,3 % Tocopherol als Oxidationsschutz in Phospholipon 90G. Es liegt in Form eines hygroskopischen, weißen bis gelblichen, wachsartigen Granulates mit nussartigem Geruch vor. Löslich ist Phospholipon 90G in Glycerol, fetten Ölen sowie in Ethanol. Es sollte aufgrund seiner Oxidationsempfindlichkeit kühl gelagert werden.

Lecithin hat Bedeutung für die Herstellung von Liposomen, ME und Mischmizellen in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie. Weiterhin dient es als Lösungsvermittler in Parenteralia und als Bestandteil in Nahrungsergänzungsmitteln. Seine amphiphile Struktur ermöglicht den Einsatz sowohl als O/W- als auch als W/O-Emulgator. Es ist weder toxisch noch allergen für Menschen und Tiere [182, 199].

**Plantacare 2000 UP** (INCI: *Decyl Glucoside*) besteht aus einer wässrigen Lösung eines mit Fettalkoholen der Kettenlänge C8 - C16 veretherten Polyglukosids. Der Oligomerisierungsgrad der Verbindung, also die Anzahl der Glucosemoleküle, die miteinander verknüpft an der Alkylkette hängen, liegt hierbei zwischen 1 und 2 [9]. Es ist ein nichtionogenes Tensid mit guten dermatologischen und exzellenten Schaumeigenschaften. Plantacare 2000 UP ist konservierungsmittelfrei und enthält 51 % - 55 % aktive Substanz sowie 45 % - 49 % Wasser. Der HLB-Wert beläuft sich auf etwa 13 [64].

**Span 80** (Sorbitanmonooleat) gehört zu der Gruppe der Sorbitanfettsäureester. Diese stellen Mischungen partieller Fettsäureester des Sorbitols und seiner Anhydride mit verschiedenen Fettsäuren dar. Bei Span 80 handelt es sich im Speziellen um Ölsäure. Zur Anwendung kommt es als nichtionogener Emulgator des Typs W/O, als Netzmittel oder auch als Solubilisator für hydrophile Arzneistoffe in lipophilen Systemen. Sorbitanmonooleat ist in Wasser unlöslich und in fetten Ölen mehr oder weniger gut löslich. Es besitzt einen HLB Wert von 4,3. Span 80 ist gut verträglich, praktisch reizlos und sehr wenig toxisch [37].

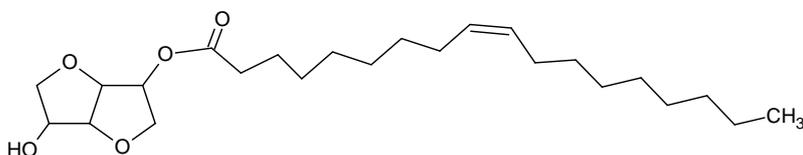


Abbildung 7 – Strukturformel von Span 80

**Tagat S2** (Macrogol-20-glycerolmonostearat, Polyoxyethylenglykolglycerolmonostearat) stellt hauptsächlich das Monostearat des Glycerolmonoethers mit Polyethylenglykol dar. Einsatz findet es als nichtionogener O/W-Emulgator in Emulsionen und Cremegrundlagen, Netzmittel und als Lösungsvermittler. Die elfenbeinfarbene, feste bis zum Teil flüssige Masse besitzt einen HLB Wert von ca. 15. Tagat S2 ist löslich in Ethanol. In Wasser ist es trüblöslich und es ist unlöslich in Fetten sowie Paraffinöl [37, 64].

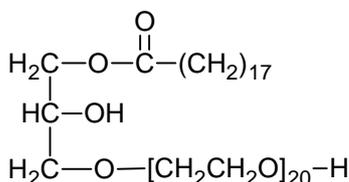


Abbildung 8 – Strukturformel von Tagat S2

### Co-Tenside/Co-Solventien

**1,2- Pentandiol** (Pentylenglycol, PeG, Hydrolite 5) gehört zur Gruppe der Dirole. Dieser vicinale mehrwertige Alkohol zeichnet sich genauso wie 1,2-Propylenglycol (PrG) durch seine niedrige Toxizität im Vergleich zu einwertigen Alkoholen aus. Er besitzt sehr gute solubilisierende Eigenschaften, die ihn als Co-Solvens sogar noch effektiver machen als PrG [106, 107]. Durch die antimikrobiellen Eigenschaften kann der Einsatz von Konservierungsmitteln unterbleiben. Durch den Zusatz von 1,2-Pentandiol in halb feste Zubereitungen konnte eine Penetrationsverbesserung hydrophiler sowie lipophiler Stoffe erzielt werden [75, 89], weshalb es sich besonders gut für die Entwicklung tacrolimushaltiger ME eignet. Gleichzeitig bietet es in seiner Eigenschaft als *Moisturizer* auch feuchtigkeitsspendende Eigenschaften [163].

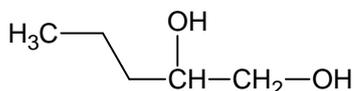


Abbildung 9 – Strukturformel von 1,2-Pentylenglycol

**1,2-Propandiol** (INCI: Propylenglycol) (PrG) ist eine farblose, viskose Flüssigkeit, die als Co-Solvens oder Penetrationenhancer eingesetzt wird. Aufgrund seiner mikrobiellen Eigenschaften kann es auch als Konservierungsmittel zum Einsatz kommen. Verwendung findet es in vielen Dermatika. In hohen Konzentrationen kann PrG zu Hautirritationen führen, in den üblichen Einsatzkonzentrationen gilt es jedoch als unbedenklich [64].

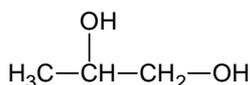


Abbildung 10 – Strukturformel von 1,2-Propylenglycol

### Hydrophile Phase

Es wurde stets **gereinigtes Wasser** verwendet.

### Lipophile Phase

**Cetiol B** (INCI: Dibutyladipat) gehört zu der Gruppe der Emollienten und stellt eine wasserklare, praktisch geruchsfreie, ölige Flüssigkeit dar, die eine sehr niedrige Viskosität besitzt und

ein nur schwaches fettiges Hautgefühl verursacht. Die Konzentration der Aktivsubstanz beträgt 100 %. Cetiol B wird für die Herstellung in Tagescremes und flüssigen Emulsionen verwendet [64].

**Myritol 318** (Neutralöl, Caprylic/Capric-Triglyceride) ist eine Mischung aus Triglyceriden mittelkettiger gesättigter Fettsäuren mit Capryl-Caprinsäuretriglyceriden als Hauptbestandteil. Es ist ein klares, leicht gelbes, geruchsloses, polares Öl, das den Anforderungen des DAB für Mittelkettige Triglyceride entspricht. Eingesetzt wird Myritol 318 aufgrund seiner guten Verträglichkeit und seiner guten Spreitungseigenschaften als lipophile Phase in pharmazeutischen oder kosmetischen Zubereitungen, kann aber auch zur oralen oder parenteralen Applikation eingesetzt werden [64, 168].

**Isopropylpalmitat** (IPP) sowie **Isopropylmyristat** (IPM) gehören zu der Gruppe der flüssigen, synthetischen Wachse. Es sind farblose, geruchsneutrale, ölige, oxidationsstabile Flüssigkeiten. Beide sind mischbar mit Ethanol sowie pflanzlichen Ölen und Mineralölen. Aufgrund ihrer Lipophilie sind sie jedoch unlöslich in Wasser, Glycerol und PrG. IPP und IPM sind nicht hautreizend und werden als lipophile Bestandteile in Dermatika verwendet. Zusätzlich besitzen sie ein gutes Spreitungs- und Permeationsvermögen [64].

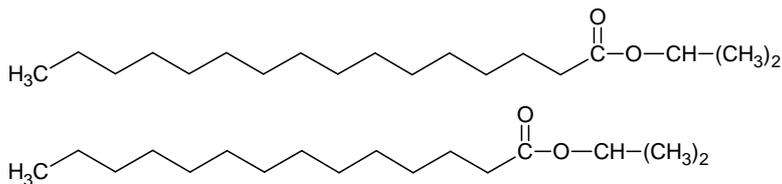


Abbildung 11 – Strukturformel von Isopropylpalmitat (oben) und Isopropylmyristat (unten)

**Spezialöl 107** (Glycerol Triheptanoat, Triheptanoïn) ist ein hochaufgereinigtes Triglycerid. Hergestellt wird es aus der Veresterung von n-Heptansäure und Glycerol. Spezialöl 107 ist ein leicht gelbliches Öl mit niedriger Viskosität. Es ist praktisch geruchs- und geschmacklos. Eingesetzt wird es unter anderem als Nahrungszusatz in der Lebensmittelindustrie [170].

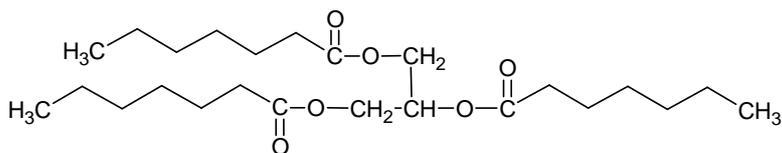


Abbildung 12 – Strukturformel von Spezialöl 107

**Tegosoft CI** (Cetearyl Isononanoat) ist ein kosmetisches Öl mit ausgeprägt hydrophoben Eigenschaften. Hergestellt wird es durch Veresterung von Cetyl- oder Stearylalkohol mit Iso-Pelargonsäure. Es stellt eine Mischung aus beiden Estern zu etwa gleichen Teilen dar. Es ist flüssig, farblos bis schwach gelb. Tegosoft CI besitzt ein gutes Spreitungsvermögen und hinterlässt einen angenehmen Ölfilm, der die Haut vor Austrocknung schützt. Es besitzt ein gutes Lösungsvermögen für öllösliche Wirkstoffe und UV-Filter. Mischbar ist es mit kosmetischen Ölen und Fetten und es ist unempfindlich gegen oxidative Einflüsse. Tegosoft CI ist geeignet für Bodylotions, Sonnenschutzmittel, Hautschutzsalben, Babycremes und -lotionen [64, 172].

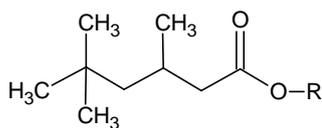


Abbildung 13 – Strukturformel von Iso-Pelargonsäure, R = Cetyl- oder Stearylalkohol

### 3.5 Untersuchungen an tacrolimushaltigen Mikroemulsionen

Die Einarbeitung von TCL und die Durchführung aller weiteren Experimente erfolgten in Anlehnung an die in Kapitel 3.4.1 vorgestellten Systeme in Mikroemulsionen der nachfolgenden Zusammensetzungen:

Mikroemulsion TCL A	(% - m/m)
Phospholipon 90G und Plantacare 2000 UP (1:2)	30 %
Cetiol B	10 %
1,2-Pentylenglycol	20 %
Wasser	40 %

Mikroemulsion TCL B	(% - m/m)
Phospholipon 90G und Tagat S2 (1:3)	25 %
Cetiol B	10 %
Wasser/1,2-Propylenglycol (1:2)	65 %

Mikroemulsion TCL C	(% - m/m)
Phospholipon 90G und Span 80 (3:2)	25 %
Cetiol B	10 %
1,2-Pentylenglycol	20 %
Wasser	45 %

Alle drei Systeme wurden mit Citronensäure auf einen pH-Wert von 4,8 eingestellt, um die Stabilität von TCL gewährleisten zu können.

#### 3.5.1 Sättigungslöslichkeiten in den Mikroemulsionen

Zur Bestimmung der maximalen Aufnahmekapazität der ME für TCL wurden die Sättigungslöslichkeiten in den oben aufgeführten Systemen sowie in den Einzelkomponenten, soweit dies möglich war, untersucht.

Die Löslichkeit von TCL in Wasser (Tabelle 6) gleicht den bereits oben erwähnten Löslichkeiten in den verschiedenen Phosphatpuffern (Tabelle 4). Damit ist TCL in Wasser, der Hauptphase aller drei ME-Systeme, praktisch unlöslich. In der lipophilen Phase Cetiol B ist der Wirkstoff wenig löslich.

Die Löslichkeit von TCL scheint nicht allein von der Lipophilie des Mediums abhängig zu sein. Während TCL in Cetiol B mit einem Verteilungskoeffizienten  $\log P$  4,22 nur wenig löslich ist, steigt dessen Löslichkeit in den hydrophileren Diolen an. PrG besitzt einen  $\log P$  Wert von -1,34 und PeG von -0,28 [194]. Trotz dieser Hydrophilie ist die Löslichkeit in beiden

Diolen in etwa doppelt so hoch wie in Cetiol B. Dies rührt womöglich von den amphiphilen Eigenschaften der vicinalen mehrwertigen Alkohole, die sich mit steigender Kettenlänge noch erhöhen. Damit können PrG und PeG als Lösungsvermittler schwerlöslicher Substanzen fungieren.

**Tabelle 6 – Sättigungslöslichkeiten von TCL in verschiedenen Medien (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ )**

Medium	Sättigungslöslichkeit $c_s$ [mg mL <sup>-1</sup> ]	Löslichkeit nach Ph.Eur.[162]
Cetiol B	14,13 ± 2,38	wenig löslich <sup>a</sup>
1,2-Propylenglycol	27,29 ± 1,39	wenig löslich <sup>a</sup>
1,2-Pentylenglycol	35,61 ± 2,56	löslich <sup>b</sup>
Wasser	2,15*10 <sup>-3</sup> ± 1,12*10 <sup>-3</sup>	praktisch unlöslich <sup>c</sup>
ME TCL A	11,84 ± 0,38	wenig löslich <sup>a</sup>
ME TCL B	6,93 ± 0,61	schwer löslich <sup>d</sup>
ME TCL C	10,93 ± 0,23	wenig löslich <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Löslichkeit 10 mg mL<sup>-1</sup> – 30 mg mL<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>Löslichkeit 30 mg mL<sup>-1</sup> – 100 mg mL<sup>-1</sup>

<sup>c</sup>Löslichkeit < 100 µg mL<sup>-1</sup>

<sup>d</sup>Löslichkeit 1 mg mL<sup>-1</sup> – 10 mg mL<sup>-1</sup>

Die Löslichkeit von TCL in den ME lag nicht höher als die Löslichkeit in der Summe aller Einzelkomponenten. Der hohe Wasseranteil könnte ein Grund dafür sein, dass der sehr lipophile Arzneistoff nur bis zu einem Massenprozentanteil von 1,16 % in ME TCL A, 0,67 % in ME TCL B und 1,10 % in ME TCL C eingearbeitet werden konnte. Obwohl eine Solubilisierungssteigerung von TCL im Vergleich zu den Einzelkomponenten durch eine Inkorporierung in ME nicht erreicht werden konnte, ist es gelungen, stabile Systeme mit hohem Wasseranteil ohne erneute Auskristallisation von TCL zu erhalten.

### 3.5.2 Wirkstoffstabilität in den Mikroemulsionssystemen

Zur Gewährleistung der Wirkstoffstabilität in den entwickelten ME wurde ein Versuch zur Lagerstabilität durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Wie schon in Kapitel 3.3.3 aufgezeigt, verhält sich TCL bei basischen pH-Werten instabil. Aus diesem Grund wurde zur Vorbeugung ein leicht saurer pH-Wert von 4,8 eingestellt. Zum Vergleich wurde zusätzlich der Wirkstoffgehalt in ME TCL A ohne pH-Wert Einstellung untersucht. Der gemessene pH-Wert betrug in diesem System 7,5. Zur Optimierung der ME wurde ebenfalls in einem Versuch zur Lagerstabilität überprüft, ob sich der Zusatz von Antioxidantien positiv auf die Wirkstoffstabilität von TCL auswirkt. Allen drei Systemen wurde entweder 0,1 % Ascorbylpalmitat (ACP) oder 0,1 %  $\alpha$ -Tocopherolacetat ( $\alpha$ -TPA) zugesetzt.

Die Ergebnisse der Lagerstabilität (Abbildung 14) zeigen, dass in ME TCL A mit einem pH-Wert von 7,5 eine Wirkstoffzersetzung erfolgte. In den anderen Systemen mit saurem pH war zwar ein Wirkstoffabfall zu beobachten, dieser war jedoch bei weitem nicht so gravierend wie im ersten System. Der in den ME TCL B und TCL C stärkere Wirkstoffabfall im Vergleich zu ME TCL A wirkte sich nicht auf weitere Untersuchungen an den Systemen aus, da TCL über zwei Monate hinweg einen Wirkstoffgehalt über 85 % zeigte. In Bezug auf die Wirkstoffstabilität eignete sich ME TCL A mit leicht saurem pH-Wert am besten als galenisches Vehikel für TCL. Aufgrund der späteren Entwicklung der ME TCL B und TCL C ergab sich bei diesen

beiden Systemen eine kürzere Lagerzeit. Die Ergebnisse der Lagerstabilität mit Zusatz von Antioxidantien sind beispielhaft am System ME TCL B in Abbildung 15 aufgeführt.

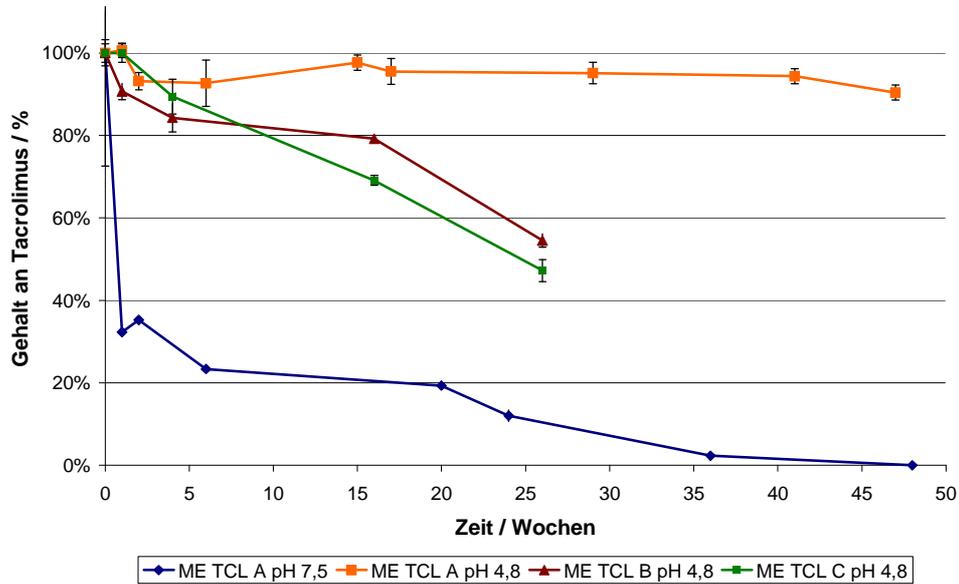


Abbildung 14 – Tacrolimusgehalt in den verschiedenen ME über einen Lagerzeitraum von mehreren Wochen (Angaben in % - m/m) (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ ).

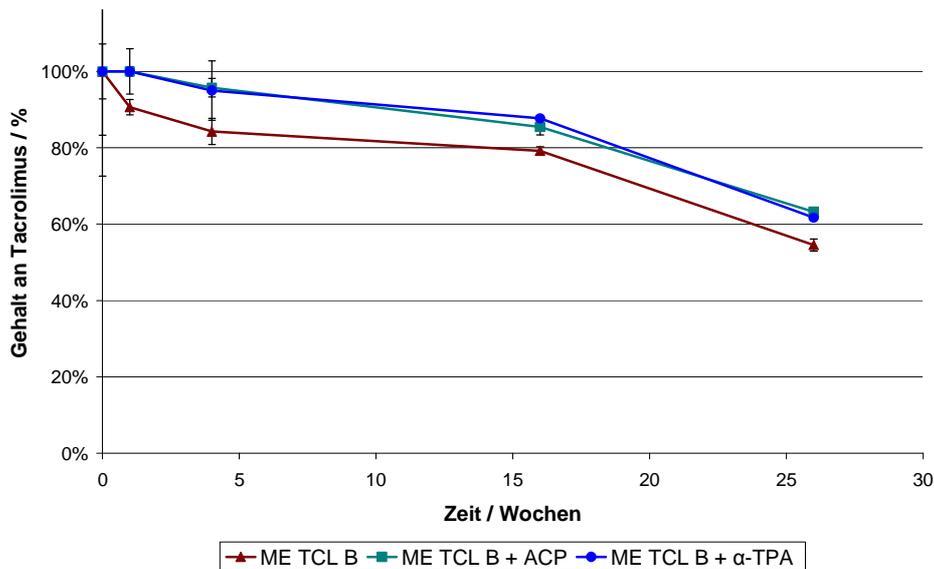


Abbildung 15 – Tacrolimusgehalt in ME TCL B (pH-Wert 4,8) mit und ohne Zusatz von Antioxidantien (ACP = Ascorbylpalmitat, alpha-TPA = alpha-Tocopherolacetat) über einen Lagerzeitraum von mehreren Wochen (Angaben in % - m/m) (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ ).

Wie in Abbildung 15 ersichtlich konnte der Wirkstoffabfall durch den Einsatz beider Antioxidantien verlangsamt werden. Es kam zwar auch zu einem Absinken des Tacrolimusgehaltes, jedoch befand sich nach acht Wochen etwa sieben Prozent mehr Wirkstoff in den Systemen mit Oxidationsschutz im Vergleich zu ME TCL B ohne Schutz. Der Zusatz von ACP oder alpha-TPA als Antioxidanz in der Formulierung ist damit zu empfehlen.

### 3.5.3 Extraktionsvorversuche

Im Hinblick auf die Durchführung von Penetrationsexperimenten in Humanhaut wurde die Extraktion von TCL aus den Testformulierungen untersucht, um auszuschließen, dass Bestandteile der Grundlage die Quantifizierung stören. Zusätzlich wurde die Wirkstoffextraktion in Gegenwart von Humanvollhaut geprüft, um auch hier Störungen ausschließen zu können.

#### Extraktion aus der Formulierung

Es wurde einerseits die Extrahierbarkeit von TCL aus den oben angegebenen ME untersucht und andererseits die Extraktion von TCL aus Protopic® 0,1 % Salbe, da diese als Standardvehikel zum Vergleich in den Penetrationsexperimenten diene. Als Extraktionsmittel kam zunächst Methanol zum Einsatz. Die Wiederfindung in prozentualen Anteilen der applizierten Dosis von TCL in den einzelnen Systemen belief sich auf:

<b>ME TCL A pH 7,5</b>	18,86 % ± 1,95 %*
<b>ME TCL A pH 4,8</b>	95,81 % ± 3,16 %*
<b>ME TCL B pH 4,8</b>	111,9 % ± 20 %*
<b>ME TCL C pH 4,8</b>	102,3 % ± 19,7 %*
<b>Protopic® 0,1 % Salbe</b>	29,20 % ± 36,4 %*

\*Angaben in % - m/m, n = 3,  $\bar{x} \pm SD$

ME TCL A pH 7,5 zeigte mit nur ca. 20 % eine sehr schlechte Wiederfindung. Dies war nicht auf die Extraktionsmethode zurückzuführen, da sich die ME komplett in Methanol löste, sondern, wie schon in Kapitel 3.5.2 erwähnt, auf die sehr rasche Zersetzung des Wirkstoffes in diesem System. Die anderen ME zeigten sehr gute Wiederfindungsraten von nahezu 100 %. Methanol eignet sich damit zur Wirkstoffextraktion von TCL aus den entwickelten ME.

Die Wiederfindung von TCL aus dem Fertigpräparat Protopic® ergab mit Methanol als Extraktionsmittel keine guten Resultate. Es konnte nur ein Drittel des laut Hersteller enthaltenen Wirkstoffs quantifiziert werden und es ergaben sich hohe Standardabweichungen. Dies lag an der schlechten Löslichkeit der extrem lipophilen Grundlage in dem organischen Lösungsmittel. Da mit Methanol die Auflösung oder wenigstens Dispergierung der restlichen Salbenbestandteile nicht erreicht werden konnte, war es auch nicht möglich, den Wirkstoff aus Protopic® zu extrahieren.

Die vollständige Auflösung von Protopic® konnte mit Chloroform durchgeführt werden. Die Analyse der Chloroformlösung war aufgrund der Inkompatibilität von Chloroform mit der eingesetzten Umkehrphasenchromatographie nicht möglich. Somit war es nötig, eine aufwendigere Extraktion durch Kombination zwei verschiedener Extraktionsmittel durchzuführen. Nach Auflösung von Protopic® in Chloroform wurde der Lösung Methanol hinzugegeben, um TCL von den restlichen Salbenbestandteilen abzutrennen, die dadurch ausgefällt wurden. Nach Eindampfen einer definierten Lösungsmenge wurde der Rückstand mit Methanol aufgenommen und quantifiziert. Die ermittelte Wiederfindung in prozentualen Anteilen der applizierten Dosis von TCL in Protopic® 0,1 % belief sich nach diesem Extraktionsprozess auf:

<b>Protopic® 0,1 % Salbe</b>	95,07 % ± 2,08 %*
------------------------------	-------------------

\*n = 3,  $\bar{x} \pm SD$

Die Wiederfindungsrate von nahezu 100 % zeigte damit auf, dass sich der Extraktionsvorgang sehr gut für die Quantifizierung von TCL aus Protopic® eignet [76].

Es ist damit gelungen, zuverlässige Extraktionsmethoden für die Quantifizierung von TCL aus den Testformulierungen zu entwickeln. Eine Störung durch Bestandteile der Grundlage konnte ausgeschlossen werden.

#### Extraktion in Gegenwart von Humanhaut

Um Störungen durch Hautbestandteile in der Quantifizierung von TCL nach Durchführung von Penetrationsexperimenten auszuschließen, wurde TCL erneut aus der Formulierung unter Durchführung der oben vorgestellten Extraktionen quantifiziert. Diesmal wurde die Formulierung jedoch auf Hautstücke appliziert (vgl. Kapitel 7.4). Dieses wurde stellvertretend für alle Testformulierungen mit ME TCL A pH 4,8 durchgeführt. Zusätzlich erfolgte als Blindversuch die Extraktion eines Vollhautstücks ohne Applikation einer Formulierung mit Methanol. Es ergaben sich folgende Wiederfindungsraten:

<b>ME TCL A pH 4,8</b>	97,61 % ± 7,68 %*
<b>Blindversuch</b>	0,00 %*

\*n = 3,  $\bar{x} \pm SD$

Die chromatographische Auftrennung der Blindproben erbrachte zur Retentionszeit von TCL keinen Peak. Störungen bei der Quantifizierung aus Humanhaut durch Hautbestandteile konnten damit ausgeschlossen werden. Die Wiederfindung in prozentualen Anteilen der applizierten Dosis von TCL führte erneut zu guten Ergebnissen. Somit wurde Methanol für weitere Experimente als Extraktionsmittel für TCL aus Humanhaut gewählt.

### **3.6 Untersuchungen zur Penetration von Tacrolimus in exzidierte Humanhaut**

Zur Untersuchung der Penetration von TCL aus verschiedenen Vehikeln kam die Diffusionszelle nach FRANZ zum Einsatz. Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 7.7 beschrieben. Die Franzzelle stellt heute den Standard in der Durchführung von Studien zur perkutanen Absorption dar, denn es konnte mit diesem Modell eine gute Korrelation zwischen den ermittelten *ex vivo* und *in vivo* Ergebnissen gezeigt werden [66].

Neben der Applikation einer überschüssigen Dosis (*infinite dose*) als Donor, wird heute häufig die *finite dose* Technik angewandt. Hierbei werden klinisch relevante Dosen appliziert (~ 3 mg – 6 mg Formulierung pro cm<sup>2</sup> Haut). Im Gegensatz zur überschüssigen Dosis kommt es hierbei nicht zu einer durch die Formulierung verursachten Veränderung der Hautbarriere oder einer erhöhten Transportrate in oder durch die Haut. Das auch hier verwendete *finite dose*-Modell ist damit besser in der Lage, klinische Bedingungen nachzuahmen, jedoch werden hierbei keine *steady state* Bedingungen mit konstanten Fluxen erreicht [67, 175].

Die ideale Membran zur Simulation möglichst *in vivo* naher Bedingungen stellt die Verwendung von Humanhaut dar. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit sowie der inter- und intraindividuellen Unterschiede des biologischen Materials wurde bei diesen Experimenten nur exzidierte Humanhaut der Brust verwendet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhö-

hen. Die Spenderinnen waren alle weiblichen Geschlechts mit möglichst geringem Altersunterschied. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung der Haut bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der Einfrierprozess führt, wie in der Literatur zu finden, dabei nicht zur Beeinflussung der Barrierefunktion der Haut [36, 66, 83, 142].

Die Wahl des Akzeptormediums fiel trotz der geringen Löslichkeit in wässrigen Lösungen und somit möglicher Aufsättigung im Akzeptorkompartiment von TCL auf PBS pH 7,4. Die Verwendung dieser isotonischen Lösung mit physiologischem pH eignete sich am besten zur Einhaltung physiologischer Bedingungen. *Sink*-Bedingungen konnten damit allerdings nicht erreicht werden. Um diese zu erhalten, sind Zusätze lösungsvermittelnder oder lipophiler Stoffe wie Emulgatoren, Albumin oder Ethanol zur Akzeptorlösung möglich. Zusätze von PEG 400 oder Brij O20 resultierten hier für TCL jedoch in keiner ausreichenden Lösungsverbesserung. Gleichzeitig sind solche Zusätze auch als kritisch zu beurteilen, da diese Stoffe Einfluss auf die Integrität der Haut nehmen können. Hinzu kommt, dass es besonders bei Albuminen zur Adsorption des Wirkstoffes kommen kann, wodurch eine Quantifizierung des gebundenen Anteils nicht mehr möglich ist. Lipophile Zusätze wie Ethanol können zu einer Extraktion von Hautbestandteilen führen, wodurch es wiederum zu einer Veränderung der Integrität kommen kann [35, 98].

In den im Folgenden vorgestellten Experimenten wurde hauptsächlich die Penetration des Arzneistoffes in die Haut untersucht. Die Betrachtung der Tacrolimuskonzentration im Akzeptorkompartiment geschah zur Vervollständigung der Ergebnisse. Aus diesen Werten konnten allerdings keine Aussagen über systemische Konzentrationen *in vivo* getroffen werden. Vielmehr kam es bei der Untersuchung der Penetration von TCL aus verschiedenen Vehikeln zur Beurteilung seiner dermalen Penetration sowie seiner Lokalisation und Verteilung innerhalb der verschiedenen Hautschichten.

Zuerst wurde der Einfluss verschiedener ME-Systeme auf das Penetrationsverhalten von TCL untersucht. Danach kam es zum Vergleich der Penetrationsprofile der ME mit dem Standardvehikel Protopic<sup>®</sup> Salbe 0,1 %. Neben der penetrierten prozentualen Menge der applizierten Dosis wurden Tiefenprofile in molaren Konzentrationen erstellt, um die Dicke der einzelnen Hautschichten einbeziehen zu können. Hierbei wurde kalkuliert, wie hohe molare Konzentrationen in welche Tiefen der Haut penetrieren konnten. Es erfolgte keine Darstellung des Gehaltes im SC, da der Gehalt an Wirkstoff in diesem Hautkompartiment hier nicht von Relevanz war.

Durch die Wahl der drei verschiedenen Inkubationszeiten von 30 min, 300 min und 1000 min konnten Rückschlüsse über das Verhalten der Systeme zur Initialphase bei 30 min, zu einer mittleren Applikationszeit von 300 min und nach Langzeitapplikation von 1000 min geschlossen werden.

### **3.6.1 Penetration von Tacrolimus aus Mikroemulsionen**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Penetration von TCL aus den oben genannten drei Mikroemulsionen vorgestellt.

#### Mikroemulsion TCL A

In Abbildung 16 ist die Verteilung des penetrierten Anteils TCL in die Humanhaut sowie die Konzentrationen im Akzeptorkompartiment nach Applikation der ME TCL A dargestellt. Anhand dieses Systems wurden zwei Penetrationsuntersuchungen mit zwei unterschiedlichen Tacrolimuskonzentrationen durchgeführt. Es wurden dazu einmal die im Fertigpräparat Protopic<sup>®</sup> enthaltene Konzentration von 0,1 % und eine höhere von 0,5 % gewählt. Dies diente dazu, Unterschiede des Penetrationsverhaltens von TCL durch Veränderung seiner Konzentration im Vehikel zu untersuchen.

Obwohl die gleiche ME zur Anwendung kam, zeigten die Ergebnisse doch deutlich, dass die Penetration von TCL auch von seiner Konzentration abhängig war. TCL penetrierte in einer Wirkstoffkonzentration von 0,1 % größtenteils in die vitalen Hautschichten und war nur zu einem kleinen Teil im Akzeptor vorzufinden. Trotzdem befand sich nicht im SC der größte Wirkstoffanteil, sondern in der lebenden Epidermis sowie den oberen Dermissschichten. TCL war damit in der Lage, das SC mit dem Vehikel der ME zu überwinden (Abbildung 16).

Bei 0,5 %iger Tacrolimuskonzentration zeigte sich insbesondere zu längeren Versuchszeiten ein anderes Penetrationsprofil. TCL war es in höherer Konzentration möglich, schon in der Initialphase durch alle Hautschichten hindurch zu permeieren und in signifikant höheren Anteilen der applizierten Dosis im Vergleich zu ME TCL A 0,1 % das Akzeptorkompartiment zu erreichen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Systemen zeigten sich in den Hautschichten jedoch hauptsächlich erst nach 300 min sowie 1000 min. Gründe dafür können sein, dass es durch Erhöhung der Dosis zu einem Anstieg der thermodynamischen Aktivität und des Konzentrationsgradienten zwischen dem Vehikel und der Haut kam. Zu Beginn des Experiments in der Initialphase kam dieser Unterschied noch nicht sehr stark zum Tragen, weshalb das Penetrationsverhalten zwischen beiden Systemen mit Ausnahme der Akzeptorkonzentration gleich war. Nach längerer Inkubationszeit schien sich der Unterschied in thermodynamischer Aktivität und dem Konzentrationsgradienten durch die erfolgte Penetration von TCL jedoch zu erhöhen, woraus eine signifikant größere Konzentration des Wirkstoffs aus ME TCL A 0,5 % in den Hautschichten resultierte. Durch eine höhere Konzentration konnte somit mehr Wirkstoff diffundieren und damit auch permeieren. Folglich gelang eine erhöhte und tiefere Penetration bzw. Permeation des Wirkstoffs.

Mit steigender Versuchszeit stieg der Wirkstoffgehalt in allen Hautschichten sowie im Akzeptorkompartiment leicht an. Der Abfall des Tacrolimusgehaltes im Akzeptor bei 1000 min nach Applikation der 0,5 %igen Konzentration kann auf die oben genannte Zersetzung und Metabolisierung des Wirkstoffs in wässriger Lösung bzw. in der Haut oder einen Aufsättigungseffekt zurückgeführt werden.

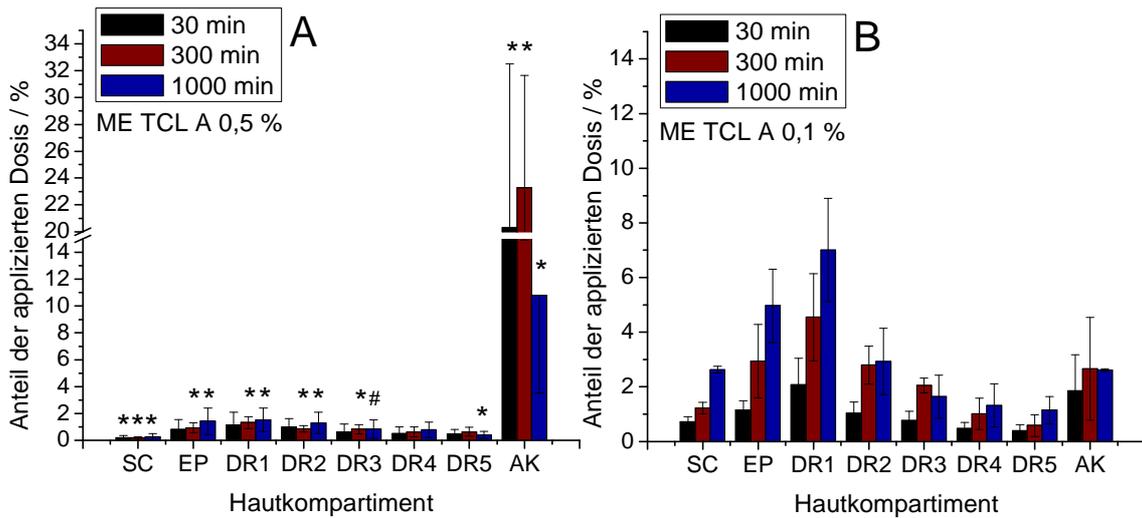


Abbildung 16 – Penetrationsergebnisse von TCL aus ME TCL A mit (A) 0,5 %iger Wirkstoffkonzentration und mit (B) 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in die verschiedenen Hautkompartimente (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 gegenüber ME TCL A 0,1 % und #p < 0,05 gegenüber ME TCL A 0,1 %) SC = *Stratum corneum*, EP = *vitale Epidermis*, DR1 = *Dermisschicht 1*, DR2 = *Dermisschicht 2*, DR3 = *Dermisschicht 3*, DR4 = *Dermisschicht 4*, DR5 = *Dermisschicht 5*, AK = *Akzeptorkompartiment*.

Betrachtet man das Tiefenprofil beider Formulierungen in Abbildung 17 ist ersichtlich, dass, obwohl der größte Anteil von TCL aus der 0,5 % konzentrierten ME im Akzeptor zu finden ist, im Vergleich mit der 0,1 %igen ME insbesondere nach einer Versuchszeit von 300 min auch signifikant größere Anteile an Wirkstoff in den tiefen Dermissschichten zu finden war. Obwohl ansonsten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten, zeigt sich doch der Trend, dass eine erhöhte Konzentration zu einem vermehrten Anteil des penetrierten Wirkstoffs führte, was Raum für die Findung einer therapeutischen Konzentration in der Therapie der Psoriasis bietet, sofern die unerwünschten Wirkungen nicht überwiegen.

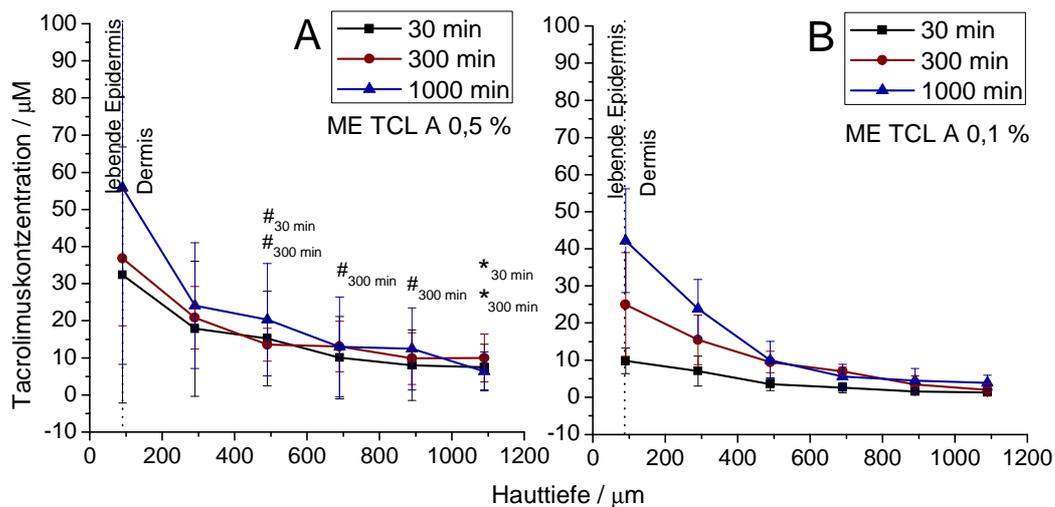
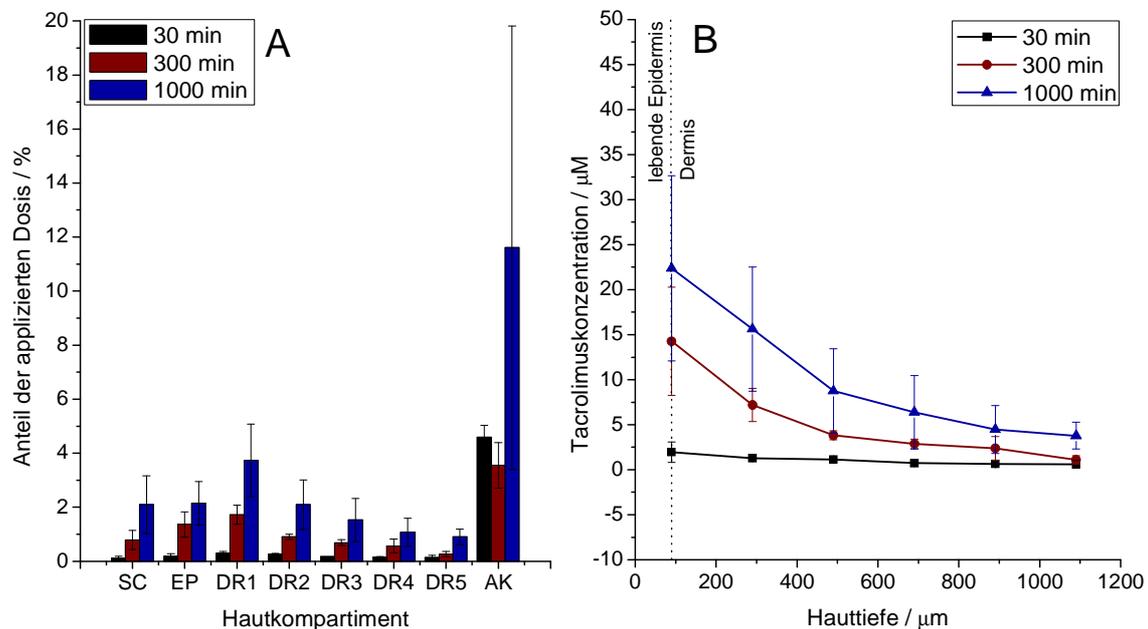


Abbildung 17 – Tiefenprofil von TCL nach Applikation von ME TCL A mit (A) 0,5 %iger Wirkstoffkonzentration und mit (B) 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration. Das SC wurde hierbei nicht berücksichtigt (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 gegenüber ME TCL A 0,1 % und #p < 0,05 gegenüber ME TCL A 0,1 %).

### Mikroemulsion TCL B

Wie in Abbildung 18 erkennbar, war es TCL möglich, nach Applikation von ME TCL B mit einer 0,1 %igen Wirkstoffkonzentration die vitalen Hautschichten zu erreichen. Nach 30 min befanden sich 0,2 % in der lebenden Epidermis und ca. 1 % in der Dermis. TCL penetrierte damit in die tiefen Hautschichten und konnte bereits nach 30 min Versuchszeit in der Akzeptorphase in einer Konzentration von 4,6 % der applizierten Dosis detektiert werden. Mit steigender Versuchszeit stieg die Konzentration in allen Schichten an. Nach 300 min fanden sich das Siebenfache des Wirkstoffs in der vitalen Epidermis und das Vierfache in der Dermis im Vergleich zur Initialphase. Die Langzeitapplikation von 1000 min ergab ebenfalls noch eine leichte Erhöhung auf 2,1 % der Tacrolimuskonzentration in der lebenden Epidermis und auf 9,3 % in der Dermis. Der Hauptanteil des Wirkstoffes reicherte sich somit nicht im SC an, sondern konnte die Hautbarriere überwinden und penetrierte in die vitalen Hautschichten.



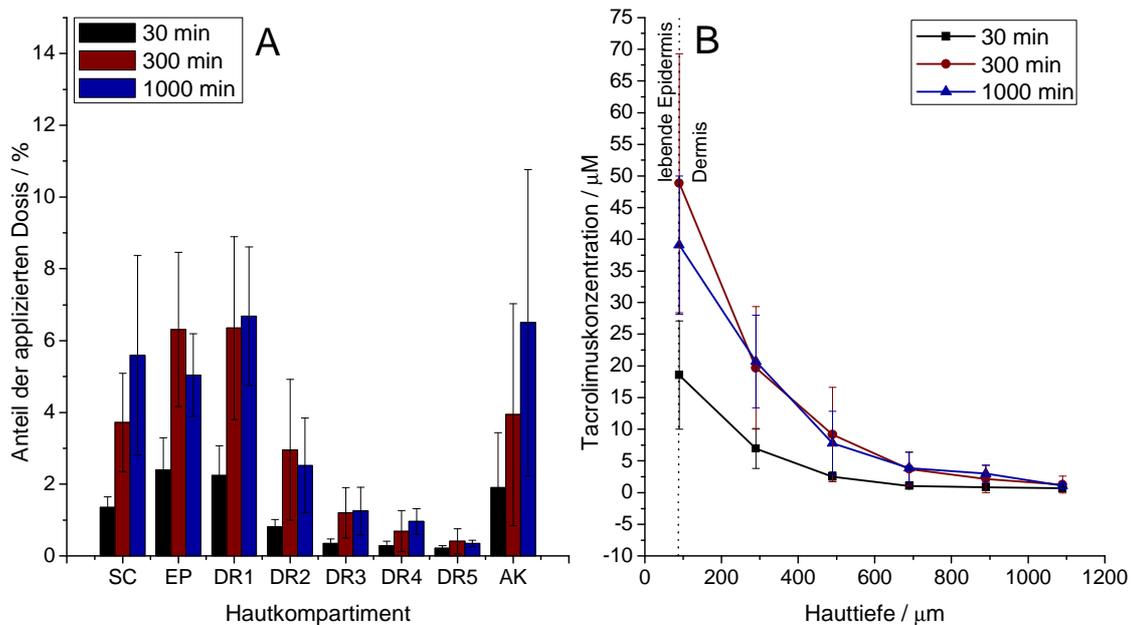
**Abbildung 18 – (A) Penetrationsergebnisse von TCL aus ME TCL B mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in die verschiedenen Hautkompartimente und (B) Tiefenprofil von TCL nach Applikation von ME TCL B mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration. Das SC wurde hierbei nicht berücksichtigt (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

Das Tiefenprofil in Abbildung 18B lässt erkennen, dass der Wirkstoff die tiefen Schichten erreicht hatte. Da das Akzeptorkompartiment bei diesem Profil nicht einbezogen wird, wurde irrtümlich der Eindruck erweckt, TCL hätte nach 30 min nur minimal die vitalen Hautschichten penetriert. Es ist jedoch zu erkennen, dass bereits 5 % der applizierten Dosis im Akzeptor zu finden waren und dieser Teil damit die vitalen Hautschichten schon permeiert hatte, was für ein Eindringen in die tiefen Hautschichten spricht.

### Mikroemulsion TCL C

Die Penetrationsergebnisse von TCL aus ME TCL C (Abbildung 19) in der gleichen Konzentration von 0,1 % resultierten auch hier in einer Penetration des Wirkstoffs in die vitalen Hautschichten sowie in einem Erreichen des Akzeptorkompartiments. Der größte Anteil war in der vitalen Epidermis und den oberen Dermissschichten zu finden, jedoch penetrierte TCL auch in

die tiefen Dermissschichten. In der Initialphase ergab sich eine Konzentration von 2,4 % in der vitalen Epidermis, nach 300 min waren im gleichen Hautkompartiment bereits 6,3 % TCL in Anteilen der applizierten Dosis zu finden. Nach der Langzeitapplikation von 1000 min konnte mit 5 % ein ähnlich hoher Wert, aber keine Erhöhung der Konzentration mehr ermittelt werden. In der Dermis kam es zu einem Anstieg der Tacrolimuskonzentration zwischen der Initialphase und den längeren Versuchszeiten mit einem Anteil von 3,9 % nach 30 min, 11,6 % nach 300 min und 11,8 % nach 1000 min Versuchszeit.



**Abbildung 19 – (A) Penetrationsergebnisse von TCL aus ME TCL C mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in die verschiedenen Hautkompartimente und (B) Tiefenprofil von TCL nach Applikation von ME TCL C mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration. Das SC wurde hierbei nicht berücksichtigt (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

Das Tiefenprofil in Abbildung 19B zeigte auch hier auf, dass TCL die tiefen Dermissschichten erreicht hatte. Schon nach 30 min waren bei einer Hauttiefe von 1100 µm Wirkstoffkonzentrationen zu finden. Obwohl Unterschiede zwischen der kurzen Inkubationszeit von 30 min und den längeren Zeiten besonders in den oberen Schichten ermittelt werden konnten, ließen sich mit längerer Zeit keine Unterschiede mehr feststellen. In den tiefen Dermissschichten konnte zu allen drei Zeiten ein fast identischer Wirkstoffanteil detektiert werden, was bei diesem System eher für eine Kumulation in den oberen Schichten spricht.

### Vergleich der Penetrationsergebnisse von Tacrolimus aus den Mikroemulsionen

Im Vergleich der drei Mikroemulsionen untereinander, dargestellt in Abbildung 20 und Abbildung 21, resultierte ein unterschiedliches Penetrationsverhalten von TCL. ME TCL B verblieb nur zu kleinen Teilen im SC und der lebenden Epidermis (Abbildung 20) und zeigte seine höchsten Konzentrationen in der Dermis und im Akzeptor (Abbildung 21). Während ME TCL B im Akzeptor zu fast allen Versuchszeiten die höchsten Konzentrationen im Vergleich zu den anderen ME aufwies, waren die ME TCL A und TCL C ihr in ihrer Tacrolimuskonzentration in der Dermis überlegen. Dort konnten insbesondere durch ME TCL A nach 30 min und 300 min signifikant höhere Anteile im Vergleich zu ME TCL B erreicht werden. ME TCL A

und TCL C wiesen auch in den oberen Schichten dem SC und der Epidermis zu den kürzeren Versuchszeiten signifikant höhere Werte auf. Nach der Langzeitapplikation von 1000 min war es allerdings nicht möglich, große signifikante Unterschiede in den tiefen Schichten zu beobachten. Die verschiedenen ME erwiesen sich als relativ gleich im Penetrationsverhalten von TCL.

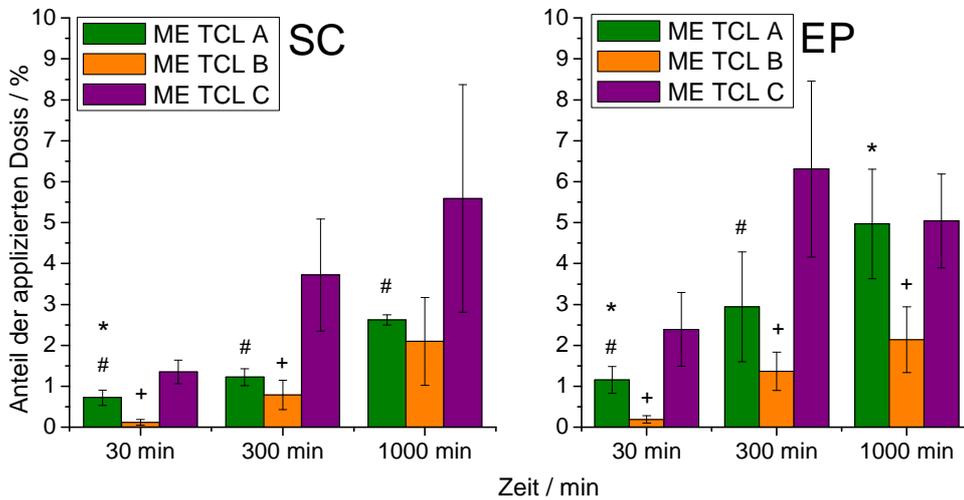


Abbildung 20 – Vergleich der Penetrationsergebnisse von TCL aus allen drei ME TCL A bis C mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in das *Stratum corneum* (SC) und die vitale Epidermis (EP) ( $n = 9$ ,  $\bar{x} \pm SD$ , \* $p < 0,01$  ME TCL A gegenüber ME TCL B, # $p < 0,01$  ME TCL A gegenüber ME TCL C, + $p < 0,01$  ME TCL B gegenüber ME TCL C).

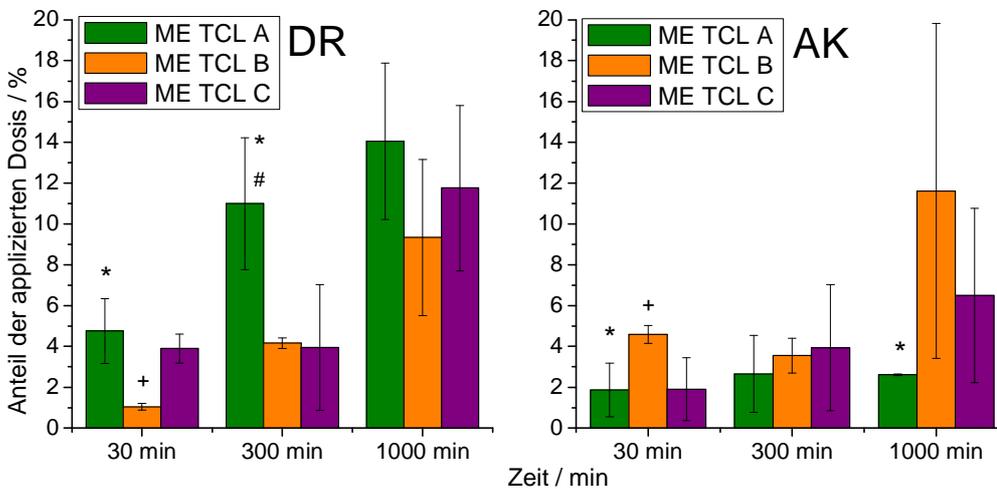


Abbildung 21 – Vergleich der Penetrationsergebnisse von TCL aus allen drei ME TCL A bis C mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in die Dermis (DR) und das Akzeptorkompartiment (AK) ( $n = 9$ ,  $\bar{x} \pm SD$ , \* $p < 0,01$  ME TCL A gegenüber ME TCL B, # $p < 0,01$  ME TCL A gegenüber ME TCL C, + $p < 0,01$  ME TCL B gegenüber ME TCL C).

Somit ist zusammenfassend festzustellen, dass ME TCL A und ME TCL C Tacrolimus insgesamt schnell und gut in die Haut lieferten und in den oberen Hautschichten sowie im Zielkompartiment Dermis mit seinen Lymphozyten hohe Anteile zeigten, was besonders nach den Versuchszeiten 30 min und 300 min festzustellen ist. ME TCL C ähnelte zwar dem Verhalten von ME TCL A. Hier gelangte jedoch etwas weniger Arzneistoff ins Zielkompartiment Dermis und verblieb im SC und in der vitalen Epidermis. Im Akzeptor konnten von beiden Systemen fast

gleiche Konzentrationen erzielt werden. ME TCL B unterschied sich am stärksten von den beiden anderen ME. Insgesamt wurde hier zu den kurzen Inkubationszeiten ein geringerer Teil der applizierten Dosis in der Haut wiedergefunden, was sich allerdings nach 1000 min den beiden anderen Systemen anglich. Jedoch zeigte sich, dass diese ME den höchsten Anteil in das Akzeptorkompartiment liefern konnte. Mit Blick auf die Sättigungslöslichkeiten von TCL in den verschiedenen ME-Systemen in Kapitel 3.5.1 wird deutlich, dass ME TCL B die geringste Aufnahmekapazität hatte. Daraus resultierte infolge der Inkorporierung der gleichen Tacrolimuskonzentration in allen drei Systemen eine höhere thermodynamische Aktivität des Wirkstoffes. Wie schon in 3.5.1.1. angesprochen, konnte durch diese Erhöhung auch hier eine höhere Konzentration im Akzeptorkompartiment erzielt werden. Es ergab sich somit ein ähnliches Verhalten wie von TCL aus ME TCL A 0,5 %. Weniger Arzneistoff verweilte in der Haut und permeierte stattdessen in kurzer Zeit durch alle Hautschichten. Diese Beobachtung ist jedoch nicht zwingend mit einem Übergang in den Blutkreislauf gleichzusetzen.

Alle drei Systeme wiesen durch ihre hohen Konzentrationen im Zielkompartiment Dermis gute Eigenschaften für die Applikation von TCL zur Therapie entzündlicher Hauterkrankungen auf. Weiterführende klinische Untersuchungen sind jedoch nötig, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

### 3.6.2 Penetration aus dem Standardvehikel Protopic® 0,1 %

Zur besseren Beurteilung der Penetration von TCL aus den entwickelten ME wurde zum Vergleich die Penetration nach Applikation des Standardvehikels Protopic® 0,1 % untersucht. Durch das erhaltene Penetrationsprofil konnte beurteilt werden, ob es zu einem besseren Transport des Wirkstoffs in tiefe Hautschichten durch den Einsatz von ME-Systemen kommen konnte.

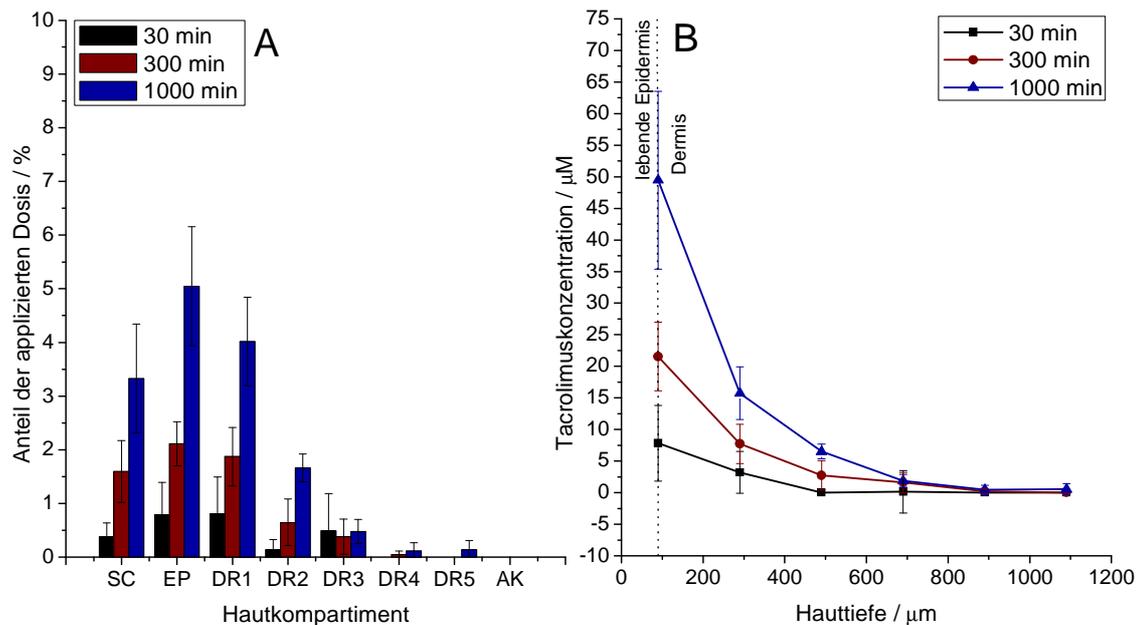


Abbildung 22 – (A) Penetrationsergebnisse von TCL aus Protopic® 0,1 % mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in die verschiedenen Hautkompartimente und (B) Tiefenprofil von TCL nach Applikation von Protopic® 0,1 % mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration. Das SC wurde hierbei nicht berücksichtigt (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ ).

Abbildung 22A gibt die Ergebnisse in Anteilen der applizierten Dosis wider. Anders als bei den oben aufgeführten Mikroemulsionen zeigte sich eine andere Verteilung des Wirkstoffes in den verschiedenen Hautschichten. Der Wirkstoff erreichte zwar die vitalen Hautschichten, jedoch nur die oberen Bereiche. Ab Dermis 4 war mit höchstens 0,1 % nach 1000 min Versuchszeit fast kein Arzneistoff mehr detektierbar. Das Akzeptorkompartiment konnte zu allen drei Versuchszeiten gar nicht erreicht werden. Auch bei längerer Inkubationszeit kam es zu keiner tieferen Penetration, sondern nur zu einem steigenden Anteil in den oberen Schichten. Im Tiefenprofil (Abbildung 22B) wird nochmals ersichtlich, dass eine Penetration aus Protopic® nach 30 min nur bis zu einer Hauttiefe von 490 µm möglich war. Nach 300 min und 1000 min konnten geringe Anteile an TCL in der tiefen Dermis gefunden werden. TCL verblieb allerdings weitestgehend in den oberen Schichten. Dass das Akzeptorkompartiment auch hier nicht einbezogen wurde, ist nicht von Relevanz, da dort kein Wirkstoff detektiert werden konnte. Die niedrigen Konzentrationen rührten daher nicht von einer bereits erfolgten Permeation durch alle Schichten, wie bei ME TCL B beobachtet, her, sondern resultierten tatsächlich aus einer geringeren Penetration.

### 3.6.3 Vergleich der Penetrationsergebnisse von Tacrolimus aus den Mikroemulsionen und Protopic® 0,1 %

Die Ergebnisse aller Penetrationsuntersuchungen, dargestellt in Abbildung 23 – 26, zeigten, dass die getesteten ME-Systeme verglichen mit dem Fertigarzneimittel Protopic® zu jeder Inkubationszeit höhere Penetrationsraten besonders in der Dermis (Ausnahme ME TCL B nach 30 min) aufwiesen. Auch die Konzentrationen im Akzeptorkompartiment zeigten signifikante Unterschiede, da bei Protopic® zu keiner Zeit TCL zu messen war, während der Wirkstoff aus den ME schon nach 30 min alle Hautschichten permeiert hatte und im Akzeptormedium nachgewiesen werden konnte (Abbildung 24).

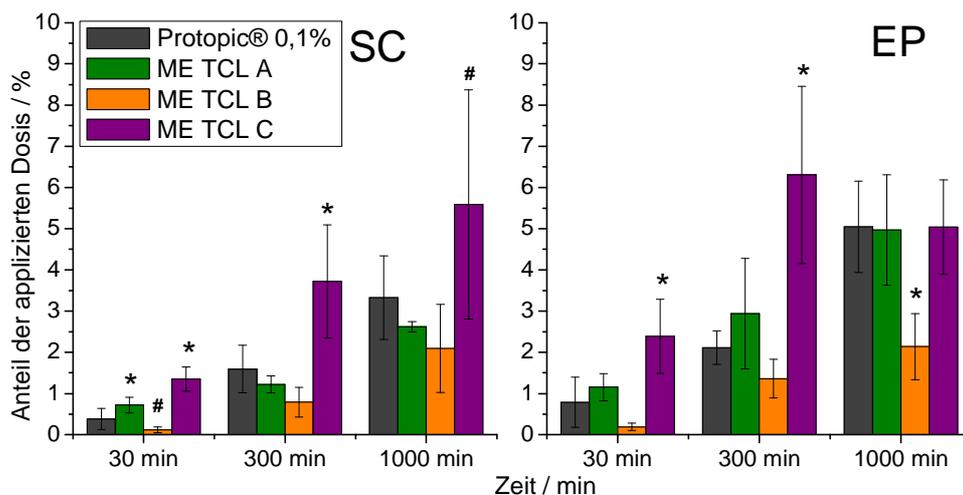


Abbildung 23 – Vergleich der Penetrationsergebnisse von TCL aus allen drei ME TCL A bis C und der Salbe Protopic® 0,1 % mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in das Stratum corneum (SC) und die vitale Epidermis (EP) (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 gegenüber Protopic® und #p < 0,05 gegenüber Protopic®).

In den oberen Hautschichten dagegen waren die ME dem Standardvehikel nicht überlegen. TCL war es nicht möglich, aus der Protopic® Salbe die tiefen Hautschichten zu erreichen, sondern kumulierte in den oberen Kompartimenten. Aus diesem Grund konnten im Vergleich zu den ME dort teilweise höhere oder ähnliche Konzentrationen gemessen werden (Abbildung 23). Der Fokus der durchgeführten Untersuchungen lag besonders auf der Dermis und somit den tieferen Hautschichten, weil dort die Lymphozyten lokalisiert sind, die den Hauptzielort von TCL für die Hemmung der Calcineurinphosphatase darstellen.

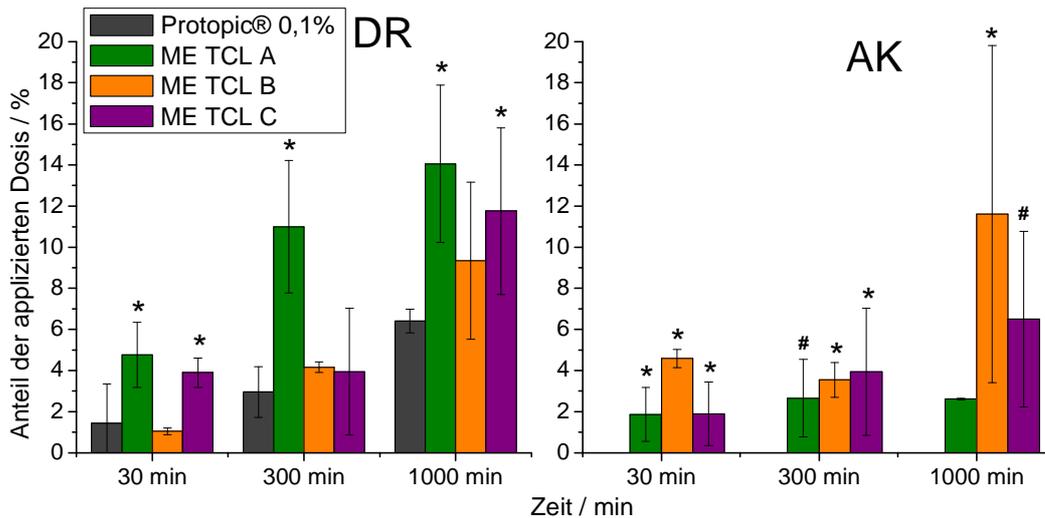


Abbildung 24 – Vergleich der Penetrationsergebnisse von TCL aus allen drei ME TCL A bis C und der Salbe Protopic® 0,1 % mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in der Dermis (DR) und dem Akzeptorkompartiment (AK) (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 gegenüber Protopic® und #p < 0,05 gegenüber Protopic®).

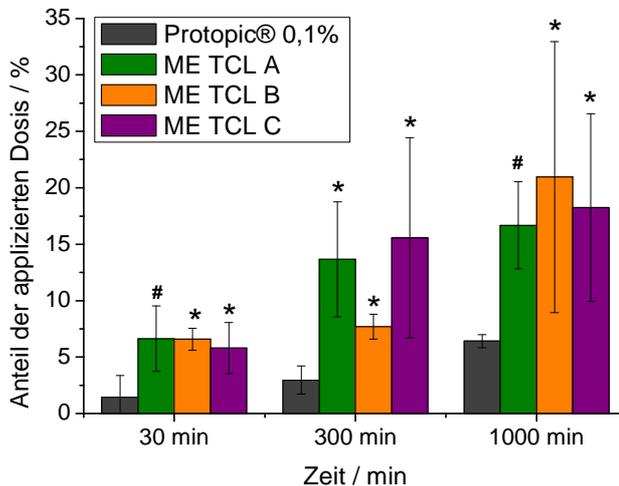
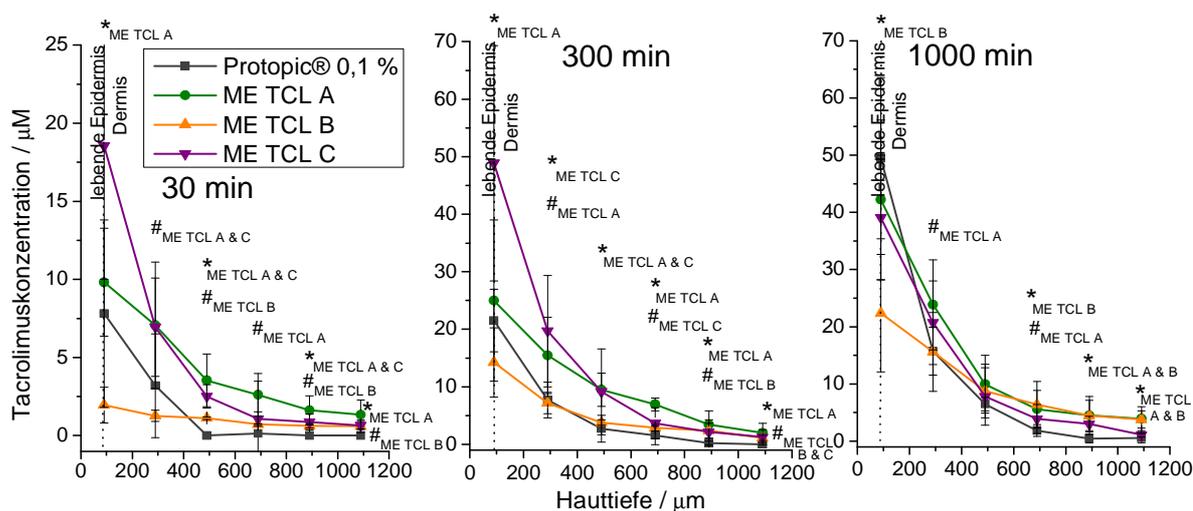


Abbildung 25 – Vergleich der Penetrationsergebnisse von TCL aus allen drei ME TCL A bis C und der Salbe Protopic® 0,1 % mit 0,1 %iger Wirkstoffkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis berechnet als bioverfügbarer Anteil (Summe Dermis und Akzeptorkompartiment) (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 gegenüber Protopic® und #p < 0,05 gegenüber Protopic®).

Der bioverfügbare Anteil des Arzneistoffes am Zielort errechnete sich aus der Summe der Wirkstoffanteile, die sich nach den jeweiligen Inkubationszeiten einerseits noch in der Dermis befanden und den Wirkstoffanteilen, die die Dermis permeiert hatten und andererseits bereits das Akzeptorkompartiment erreicht hatten. Wie bereits erwähnt kann mit diesem Versuchs-

dell nicht auf einen Übergang des permeierten Anteils in die systemische Zirkulation geschlossen werden. Der bioverfügbare Anteil von TCL aus den ME lag nach 30 min Versuchszeit bereits bei ca. 6 % (Abbildung 25), während aus der Salbe Protopic® lediglich 1,4 % zum in die tiefen Schichten gelangen konnten. Nach 300 min und 1000 min Versuchszeit stieg dieser Unterschied noch an. Nach 300 min waren als Höchstwerte der verschiedenen ME bis zu 15,6 % aus ME TCL C der applizierten Dosis und nach 1000 min bis zu 21 % aus ME TCL B bioverfügbar, während nach Applikation von Protopic® nach 300 min nur 2,95 % und nach 1000 min 6,41 % TCL bioverfügbar war.

Bei Betrachtung der Tiefenprofile zeigte sich, dass Protopic® in der Lage war, die Dermis zu erreichen. Der Wirkstoff verblieb dort allerdings nur in den oberen Dermissschichten und gelangte nicht in tiefere Schichten der Dermis. Auch bei längerer Versuchszeit konnten keine höheren Anteile in der tiefen Dermis erhalten werden (Abbildung 26). Ab einer Hauttiefe von 700 µm wurde zu allen drei Zeiten kein Wirkstoff mehr detektiert. Die ME hingegen wiesen zum größten Teil auch Wirkstoffanteile im unteren Bereich der Dermis und nicht zuletzt im Akzeptorkompartiment auf.



**Abbildung 26 – Vergleich der Tiefenprofile von TCL nach Applikation der drei ME TCL A bis C und der Salbe Protopic® 0,1 % zu den drei verschiedenen Versuchszeiten 30 min, 300 min und 1000 min. Das SC wurde hier außer Acht gelassen (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 gegenüber Protopic® und #p < 0,05 gegenüber Protopic®).**

Eine Erhöhung des Anteils an TCL im Zielkompartiment ist die Voraussetzung für die Therapie der Psoriasis mit Hilfe dieses Immunmodulators. Im Unterschied zur atopischen Dermatitis kommt es bei Psoriasis zu einer Verdickung der Hautbarriere. Dieses bedeutet ein größeres Hindernis für die Penetration der Wirkstoffe. Der gesteigerten Keratinozytenproliferation, die zur Bildung der Plaque bei dieser Krankheit führt, geht eine Immunreaktion voraus, die schon in der Dermis unterdrückt werden muss. Durch die Hemmung der Calcineurinphosphatase kann der immunologische Prozess dort am Anfang gehemmt werden, wodurch die Plaquentstehung unterbunden wird.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der Wirkstoff TCL in seinen Penetrations- und Permeationseigenschaften durch den Einsatz von kolloidalen Carriern signifikant verbessert werden konnte. Die Hautbarriere SC konnte zu größeren Anteilen im Vergleich zum Standard-

vehikel überwunden werden. Diese Verbesserung wurde ausschließlich durch den Einsatz eines anderen Vehikels erreicht. Okklusionsbedingungen waren nicht erforderlich. Dies könnte die *Compliance* fördern, insbesondere wenn größere Hautareale behandelt werden müssen.

Trotzdem unterscheiden sich auch die verschiedenen ME in ihren Penetrationsprofilen, wodurch ersichtlich wird, dass auch die Zusammensetzung der Systeme entscheidend für das Penetrationsverhalten des Wirkstoffs ist. Eine weitere Optimierung der verschiedenen Systeme ist damit noch möglich.

In der Literatur sind bereits Daten zum Penetrationsverhalten von TCL zu finden. Durch den Einsatz von Liposomen als Wirkstoffträger konnten auch schon von ERDOGAN et al. Erfolge im murinen Modell erzielt werden. Leider fehlt jedoch der Vergleich zu einem Standardvehikel [60].

BILLICH et al. und MEINGASSNER et al. untersuchten das Permeationsverhalten von TCL im Vergleich zu Pimecrolimus und Glucocorticoiden. Als Formulierung wurde eine Lösung von PrG:Oleylalkohol (9:1) oder nur PrG verwendet. Das Resultat war eine erhöhte Permeation von TCL durch seine höhere Hydrophilie im Vergleich zu Pimecrolimus. Leider sind die Ergebnisse nicht mit den hier ermittelten Werten vergleichbar, da ein *infinite dose* Design verwendet wurde und die Werte in  $\mu\text{g g}^{-1}$  angegeben wurden [26, 140].

### 3.6.4 Zusammenfassung der Penetrationsergebnisse

Es ist gelungen, geeignete ME zur dermalen Anwendung als Vehikel für den Immunmodulator TCL zu entwickeln. Insbesondere ME TCL A hat sich durch eine schnelle und signifikant größere Penetration von TCL in tiefe Hautschichten im Vergleich zu Protopic<sup>®</sup> als besonders geeignet erwiesen. Allerdings konnten auch durch die beiden anderen Systeme adäquate Konzentrationen erreicht werden. Es wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von kolloidalen Carriern die Penetration von TCL essentiell verbessert werden kann. Große Anteile des Wirkstoffes konnten in kurzer Zeit in tiefe Hautschichten penetrieren, wodurch die galenischen Voraussetzungen für eine Wirksamkeit bei Psoriasis vulgaris geschaffen wurden.

Eine Modulation der Penetrationsprofile ist durch die Variation der Inhaltsstoffe im ME-System möglich. Dies wurde besonders im Penetrationsverhalten von TCL aus ME TCL B im Vergleich zu den anderen ME deutlich.

Die Auswahl eines ME-Systems als Vehikel zur Therapie chronisch entzündlicher Hauterkrankungen ist zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht zu treffen. Alle Systeme wiesen zwar vielversprechende Ergebnisse auf, die Bestätigung der praktischen Relevanz kann jedoch letztendlich nur durch klinische Studien speziell an erkrankter Haut belegt werden.

## 4 Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von Linolsäure

In der Therapie entzündlicher Hauterkrankungen mit trockener barrieregestörter Haut spielt nicht nur die in Kapitel 3 vorgestellte antiinflammatorische und immunsuppressive Behandlung der gestörten Keratinozytenproliferation sowie akute entzündliche Infiltrate eine Rolle. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die adjuvante Basistherapie mit arzneistofffreien Formulierungen. Die Verminderung der Barrierefunktion der Haut aufgrund verschiedener Faktoren wie Störungen des Lipidstoffwechsels, Keratinozytenmangel, einer Verminderung des *natural moisturizing factor* (NMF) oder Entzündungszuständen äußert sich in einem gesteigerten transepidermalen Wasserverlust (TEWL) und einer verminderten Wasserbindungsfähigkeit der Haut. Aus dieser Störung kann eine Sebestase resultieren. Zur Behandlung dieses Hautzustandes ist die regelmäßige, großflächige Behandlung zur Erhaltung und Wiederherstellung der natürlichen Hautbarriere essentiell.

Eingesetzt werden zu diesem Zweck verschiedene Emollienten, zu denen galenische Zubereitungen wie Cremes, Salben, Pasten, Gele oder auch Lösungen gehören. Gesichtspunkte bei der Auswahl der verschiedenen Formulierungen sind der Hautzustand, die Jahreszeit sowie der zu behandelnde Hautbereich. Hierbei sollen einmal die lipophilen Bestandteile die natürlichen Hautlipide ersetzen und die hydrophile Phase andererseits Feuchtigkeit spenden. Die Hautbarriere kann durch diese Behandlung zumindest teilweise wiederhergestellt werden, wodurch es zu einer Reduktion der Keratinozytenproliferation und zu einer Induktion der Differenzierung kommt.

Zur Unterstützung können diesen Vehikeln noch aktive Komponenten hinzugefügt werden. Der *natural moisturizing factor* Urea (Harnstoff) wird aufgrund seiner wasserbindenden und proliferationsmindernden Wirkung auf Keratinozyten gern in der Basistherapie eingesetzt, ist aber aufgrund seines *stinging effects*, der sich insbesondere bei Kindern oder empfindlichen Hautpartien in einem Brennen äußert, nicht unbedenklich einsetzbar. Eine wichtige Alternative repräsentiert der Zusatz von Linolsäure (LSR). Diese essentielle ungesättigte Fettsäure besitzt als Bestandteil der interzellulären Lipidmatrix des SC strukturbestimmende Merkmale und darüber hinaus noch multiple Schutzfunktionen. In den folgenden Kapiteln soll nun betrachtet werden, inwieweit sich ME als Vehikel der lipophilen LSR zur adjuvanten Basistherapie chronisch entzündlicher Hauterkrankungen eignen.

### 4.1 Linolsäure – Anwendung und Wirkung

Linolsäure (Abbildung 27) gehört zu den ungesättigten Fettsäuren, die als Glycerolester in praktisch allen natürlichen Fetten und Ölen (z.B. Sonnenblumenöl und Maisöl) vorkommt. Aus dem Samenöl (*Lini oleum*) von Lein (*Linum usitatissimum*) wurde zuerst LSR gewonnen, woraus sich auch ihr Name aus dem lateinischen von *linum* (griech. *linon*) für Lein und *oleum* Öl ableitet.

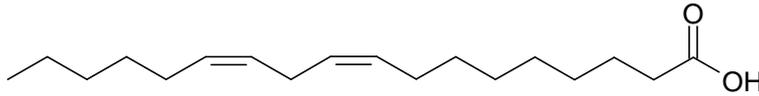


Abbildung 27 – Strukturformel von Linolsäure (9,12-Octadiensäure)

Linolsäure kann auf natürlichem Wege nur von Pflanzen und Mikroorganismen synthetisiert werden. Der menschliche Körper ist dazu nicht selbstständig in der Lage und muss sie durch die Nahrung aufnehmen. LSR gehört also der Gruppe der essentiellen Fettsäuren an. Sie ist sowohl für die Bildung von bestimmten Membranlipiden als auch für die Synthese von Prostaglandinen notwendig [177]. Linolsäure ist besonders als Bestandteil von Phospholipiden zu beachten, die entscheidend am Aufbau von Lipiddoppelschichten biologischer Membranen beteiligt sind. Eine große Anzahl Doppelbindungen, die in den Membranlipiden enthaltenen Fettsäuren, führt zu einer erhöhten Fluidität, was rasche Transportvorgänge begünstigt [217]. Gespeichert werden ungesättigte Fettsäuren im menschlichen Körper als Triacylglycerine (Neutralfette). Die Mobilisierung erfolgt durch Lipasen [211]. Im menschlichen Organismus kann durch die Wirkung einer mikrosomalen Desaturase eine weitere Doppelbindung eingeführt werden. Aus LSR wird dann zunächst  $\gamma$ -Linolensäure. Durch eine Kettenverlängerung um zwei C-Atome bildet sich daraufhin Eicosatriensäure und zuletzt durch Einführung einer weiteren Doppelbindung die physiologisch wichtige Arachidonsäure (Abbildung 28) [149].

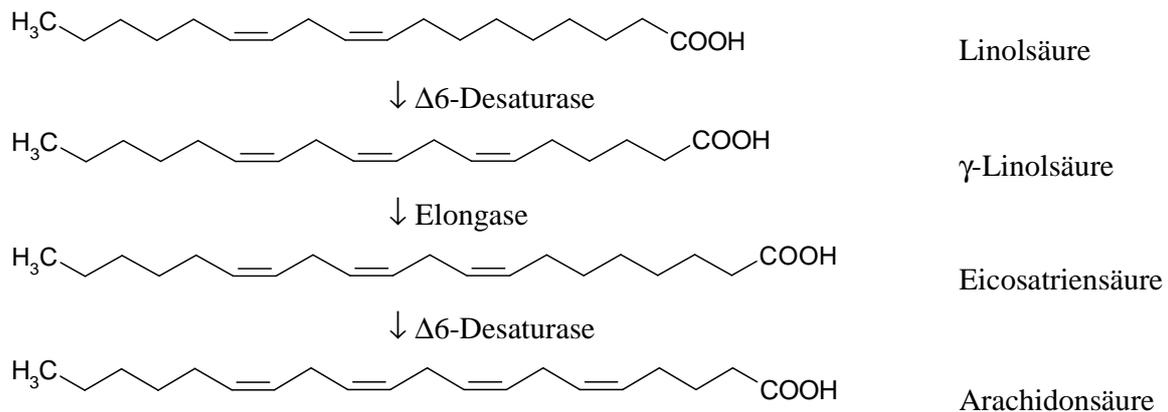


Abbildung 28 – Bildung von Arachidonsäure aus Linolsäure im menschlichen Körper modifiziert nach MUTSCHLER und CALDER [39, 149].

In die Haut gelangen essentielle Fettsäuren wie die LSR durch Aufnahme aus dem Blutkreislauf, wobei der genaue Mechanismus noch unbekannt ist [190]. Dort sind sie ein wichtiger Bestandteil der interzellulären Lipide im *Stratum corneum* und somit an der Anordnung der lamellaren Schichten beteiligt. Sie tragen damit merklich zum Aufbau und der Erhaltung der Hautbarriere bei. Neben der im SC frei vorliegenden LSR ist ein Teil zusätzlich in die Synthese der Ceramide involviert. LSR wird maßgeblich in Ceramid [EOS] eingebaut. Dieses Ceramid trägt wesentlich zur Erhaltung der Bilayerstruktur sowie der Permeabilitätsbarriere bei [33, 47, 52, 91, 113]. Die Synthese der Ceramide erfolgt in den *odland bodies*, die in der vitalen Epidermis und dort im *Stratum spinosum* lokalisiert sind [59]. HOUTSMULLER et al. konnten bereits 1981 durch die Applikation von LSR bei fettsäuredefizienten Ratten eine komplette Wiederherstellung der Permeabilitätsbarriere der Haut innerhalb weniger Tage erzielen [95].

Neben den wichtigen strukturegebenden Funktionen werden der LSR noch antiinflammatorische Wirkungen zugesprochen. Dieser Effekt scheint im Zusammenhang mit einer durch ungesättigte Fettsäuren hervorgerufenen Hemmung der Prostaglandin- und Leukotriensynthese zu stehen [204]. Der Metabolit von LSR Dihomo- $\gamma$ -linolensäure trägt dabei ebenfalls zur antiinflammatorischen Wirkung bei, indem er durch Umwandlung in Prostaglandin E<sub>1</sub> den *second messenger* cAMP stimuliert, damit die Aktivität der Phospholipase inhibiert, wodurch eine Hyperreaktivität des Immunsystems unterbunden wird. Dihomo- $\gamma$ -linolensäure kann sich zu 15-Hydroxy-dihomo- $\gamma$ -linolensäure umwandeln. Dieser Stoff ist ein Inhibitor der Lipoxygenase und damit auch der Bildung von Leukotrienen [93]. Fettsäuren besitzen nur wenige Nebenwirkungen. Nach dermalen Applikation kann es zu örtlich begrenzten Hautreaktionen wie Brennen, Rötungen oder Juckreiz kommen [204].

Der epidermale Lipidstoffwechsel spielt auch bei Hauterkrankungen eine wichtige Rolle. Tritt eine Barriestörung des SC auf, reagiert der Körper mit einer verstärkten Synthese von Lipiden und DNS, um die Barrierefunktion wieder herzustellen. Die vermehrte DNS-Synthese resultiert bei chronischen Störungen, wie sie von Hauterkrankungen hervorgerufen werden können, in einer epidermalen Hyperplasie. Durch die Applikation von Fettsäuren ist es jedoch möglich, dieser Hyperplasie abzuhelpen bzw. vorzubeugen, weshalb LSR auch eine antiproliferative Wirkung zugesprochen wird [173].

Im Zusammenhang mit atopischer Dermatitis ist der physiologische Linolsäuregehalt zwar nicht vermindert, allerdings sind in der Haut von Atopikern weniger Linolsäuremetabolite vorhanden. Gleichzeitig wird LSR weniger in Ceramid [EOS] eingebaut. YAMAMOTO et al. beobachteten einen verstärkten Einbau von Ölsäure in Ceramid [EOS] anstelle von LSR [231]. Ein Defekt oder Mangel der oben aufgeführten  $\delta$ -6-Desaturase scheint eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen zu sein [93]. Obwohl damit eine Insuffizienz von Arachidonsäure auftritt, die eine proinflammatorische Wirkung hat, kommt es gerade bei Atopikern zu Entzündungen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass aus Arachidonsäure auch antiinflammatorische Mediatoren wie Lipoxin A<sub>4</sub> hervorgehen [38, 39, 196], die dann ebenfalls nicht mehr zur Verfügung stehen.

Bei Psoriasispatienten wurde ähnlich wie bei Atopikern eine Verminderung von Ceramid [EOS] detektiert, jedoch wurde in psoriatischen Schuppen zusätzlich ein verringerter Anteil freier Fettsäuren in der interzellulären Lipidmatrix beobachtet [145, 146].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die dermale Applikation von LSR in der Basistherapie von entzündlichen Hauterkrankungen ein guter Ansatz ist, um trockene Hautzustände zu verbessern und die Permeabilitätsbarriere wiederherzustellen. Ebenso kann sie eine antiinflammatorische Wirkung zeigen, obwohl die Rolle von natürlicher LSR im Zusammenhang mit dem Auftreten von atopischer Dermatitis noch nicht vollständig geklärt ist.

## 4.2 Physikochemische Eigenschaften von Linolsäure

Linolsäure (9,12-Octadiensäure) ist eine zweifach ungesättigte Fettsäure. Beide Doppelbindungen befinden sich in einer *cis*-Konfiguration und sind nicht konjugiert. LSR (Summenformel C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) hat eine Molmasse von 280,5 g mol<sup>-1</sup>. Der Siedepunkt liegt bei 360,6 °C und

der Schmelzpunkt bei  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , weshalb LSR bei Raumtemperatur flüssig ist. Die Fettsäure ist eine farblose bis gelbliche Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch. Da LSR eine schwache Säure ist, liegt der pKs-Wert bei  $4,78 \pm 0,1$  [194].

Die Wasserlöslichkeit von LSR ist im sauren pH-Bereich schlecht. In einem pH-Bereich von 1 bis 7 ist LSR schwer wasserlöslich, wobei die Löslichkeit nach Erreichen des pKs-Werts leicht ansteigt. Bei basischem pH-Wert ist LSR bis pH 9 wenig löslich und bei pH 10 schließlich löslich [82, 96, 194]. In organischen Lösungsmitteln ist LSR löslich.

Die Lipophilie von LSR ist, wie schon aus den Löslichkeitsdaten ersichtlich, sehr hoch. In der Literatur ist ein Verteilungskoeffizient ( $\log P$ ) von 7,05 zu finden [96]. *In silico*-Berechnungen zufolge liegt der  $\log P$  mit  $7,18 \pm 0,26$  im gleichen Bereich [194]. Der Verteilungskoeffizient ändert sich bei unterschiedlichen pH-Werten analog zur Löslichkeit der Fettsäure in Wasser. Bei sauren pH-Bereichen bis pH 4 bleibt der  $\log D$  im Bereich von ca. 7,15. Nach Erreichen des pKs-Werts wird das Linolsäuremolekül hydrophiler, was in einem Absinken des  $\log D$  von 6,75 bei pH 5 auf bis zu 3,44 bei pH 10 zu erkennen ist.

Die Veränderungen der Löslichkeiten von LSR sind mit dem Dissoziationsverhalten des Moleküls zu erklären. Bei niedrigen pH-Werten liegt LSR überwiegend undissoziiert als Säure vor. Wird der pKs-Wert erreicht, findet man die undissoziierte lipophile Säure im gleichen Anteil zu ihrer dissoziierten hydrophileren Base vor. Im basischen Bereich steigt dann letztendlich der Anteil der dissoziierten freien Base an, wodurch sich gleichzeitig die Wasserlöslichkeit des Moleküls erhöht.

#### 4.2.1 Sättigungslöslichkeiten

Zur Charakterisierung der LSR und im Vorfeld der Bestimmung verschiedener Verteilungskoeffizienten wurden, wie auch schon bei TCL, die Sättigungslöslichkeiten in Phosphatpuffer bei unterschiedlichen pH-Werten und Octanol bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7 – Sättigungslöslichkeiten  $c_s$  von LSR (Detektiert und quantifiziert als 9,11-Octadiensäure) in verschiedenen Medien ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).**

Medium	Sättigungslöslichkeit $c_s$ [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	Löslichkeit nach Ph.Eur. [162]
Puffer pH 5	$89,96 * 10^{-3} \pm 30,78 * 10^{-3}$	praktisch unlöslich <sup>a</sup>
Puffer pH 7,4	$1,89 \pm 0,02$	praktisch unlöslich <sup>a</sup>
Puffer pH 9	$0,84 \pm 0,004$	praktisch unlöslich <sup>a</sup>
Octanol	mischbar in jedem Verhältnis	

<sup>a</sup>Löslichkeit  $< 100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$

Die laut Literatur [194] schlechte Wasserlöslichkeit konnte experimentell bestätigt werden. Die sehr lipophile LSR ist bei allen drei pH-Werten praktisch unlöslich. In höheren pH-Bereichen ist der in der Literatur angegebene Anstieg zu beobachten. Die Löslichkeit von LSR liegt bei pH 9 um eine Zehnerpotenz höher als bei pH 5. Unerwartet ist jedoch die größere Löslichkeit bei pH 7,4 im Vergleich zu pH 9. Der Unterschied ist aber verglichen mit pH 5 weniger gravierend.

Aufgrund der Mischbarkeit von LSR mit Octanol war eine experimentelle Bestimmung verschiedener  $\log D_{\text{Octanol/Puffer}}$  nicht möglich. Aus den Löslichkeitsergebnissen ist allerdings ersichtlich, dass es sich bei LSR um ein lipophiles Molekül handeln muss.

#### **4.2.2 Zusammenfassung der physikochemischen Eigenschaften**

Die physikochemischen Eigenschaften von LSR sind mit Blick auf die nicht sehr hohe Molekülgröße im Vergleich zu TCL für die topische Penetration durch das SC etwas besser. Problematisch ist allerdings auch hier die sehr hohe Lipophilie des Moleküls. Der errechnete  $\log P$  liegt bei fast 7,2. Der ideale Verteilungskoeffizient von 1 für die Penetration ins SC mit seinen hydrophilen und lipophilen Eigenschaften liegt damit weit entfernt [238]. Demzufolge ist die Entwicklung eines optimalen galenischen Vehikels für das Erreichen hoher Konzentrationen im Zielkompartiment auch hier unerlässlich.

### **4.3 Entwicklung eines kolloidalen Carrier Systems**

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer O/W-ME bestehend aus einem Fettsäuregemisch (FSG) mit Octadiensäuren als Hauptbestandteil sowie sehr gut hautverträglichen Emulgatoren.

#### **4.3.1 Entwicklung der Mikroemulsion**

Die Entwicklung eines kolloidalen Carriersystems für die dermale Anwendung von LSR gestaltet sich weniger schwierig als für einen lipophilen Arzneistoff. Obwohl LSR noch lipophiler als TCL ist, ist in diesem Fall keine Solubilisierung des Stoffes im fertigen System nötig. LSR kann aufgrund seiner Eigenschaften und seines flüssigen Aggregatzustandes bei Raumtemperatur direkt als lipophile Phase in ein System eingearbeitet werden. Damit liegt der Wirkstoff kolloidal verteilt vor. Es kommt zu keiner Distribution zwischen der hydrophilen und lipophilen Phase, wie es bei nachträglich eingearbeiteten Wirkstoffen der Fall ist. Das bislang im Markt verfügbare Standardvehikel mit LSR ist Linola Fett<sup>®</sup>, eine Creme vom Typ W/O-Emulsion. Die Grundlage von Linola Fett<sup>®</sup> basiert auf Paraffinen, Erdnussöl, Hartfett sowie Wollwachsen. Damit unterscheiden sich die Vehikeleigenschaften von Linola Fett<sup>®</sup> stark von denen einer O/W-ME. Linolsäure liegt im Standardvehikel gelöst in der lipophilen Phase vor. Dies bietet ungünstige Voraussetzungen für die Freisetzung aus dem Vehikel.

Die Inkorporierung in eine O/W-ME und damit in ein hydrophiles Vehikel kann sich positiv auf die Freisetzung und Penetration von LSR auswirken. Da der Verteilungskoeffizient sehr hoch ist, würde sich LSR damit zu größeren Teilen aus dem hydrophilen Vehikel in das lipophile SC verteilen. Gleichzeitig würde der hohe Anteil der hydrophilen Phase zur Hydratisierung des SC beitragen und damit trockene Hautzustände verbessern. Die penetrationsfördernden Eigenschaften von ME sind bei diesem stark lipophilen Stoff besonders von Vorteil, um eine Penetration in das SC bzw. eine Penetration in die vitale Epidermis zu erzielen und damit mehr LSR dermal verfügbar zu machen. Angestrebt wurde in dieser Arbeit die Entwicklung eines O/W-Mikroemulsionssystems mit einem maximalen Emulgatorgehalt von 30 % und einer Fettsäurekonzentration von 2 %, um einen geeigneten Linolsäuregehalt zu er-

halten und trotzdem eine dermale Verträglichkeit gewährleisten zu können. Der Schwerpunkt in der Wahl der Emulgatoren lag bei den sogenannten Zuckertensiden.

Erste Versuche wurden mit Sucroseestern durchgeführt. Die Entwicklung eines ME-Systems war jedoch nicht erfolgreich, da sich diese pulverförmigen Emulgatoren in keinem der weiteren verwendeten Bestandteile der ME lösen ließen. In der Literatur beschriebene ME mit Sucroseestern als Emulgatoren wurden zum Beispiel in einem Artikel von LEHMANN et al. drei Stunden bei 90 °C erhitzt, um eine ME-Bildung zu erzielen [132]. Diese Ergebnisse konnten hier experimentell nicht reproduziert werden. Zudem ist es fraglich, wie lange ein ME-System, das durch solch einen hohen Energieaufwand hergestellt werden musste, stabil bleibt. Längerfristig ist wohl mit erneutem Ausfällen des Emulgators oder einer Phasentrennung zu rechnen.

THEVENIN et al. [216] beschrieben, dass in ihrem Fall der Einsatz eines Co-Emulgators unerlässlich war, da die Löslichkeit in Wasser und dem verwendeten Öl sehr schlecht war. Ausgewählt wurde Ethanol, um eine Löslichkeit der Sucroseester zu erzielen. Da aber kurzkettige einwertige Alkohole aufgrund ihrer höheren Toxizität im Vergleich zu ihren korrespondierenden 1,2-Alkoholen [106, 107] keinesfalls in dem hier zu entwickelnden O/W-Mikroemulsionssystem eingesetzt werden sollten, kam eine Solubilisierung in solch einem Co-Emulgator nicht in Frage. Sollte ein anderer Co-Emulgator zur Lösung eingesetzt werden, müsste dieser wahrscheinlich in höheren Konzentrationen vorliegen, als der Sucroseester, wodurch die Frage auftritt, inwieweit es sich dann noch um ein Emulgatorsystem aus Zuckertensiden handelt. Da sich ME spontan bilden und nur in bestimmten Grenzen entstehen können, wurde der Fokus nicht nur auf eine Gruppe von Zuckertensiden gelegt, sondern über die Gruppe der Sucroseester hinaus erweitert.

Zum Einsatz kamen daher des Weiteren Alkylpolyglucoside (APG). Im Unterschied zu Sucroseestern besteht der hydrophile Teil des Emulgators nicht aus Saccharose sondern aus Glucose, die mit Fettalkoholen unterschiedlicher Kettenlängen verknüpft ist.

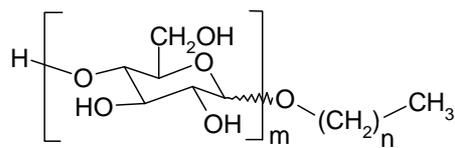


Abbildung 29 – Strukturformel von Alkylpolyglucosiden ( $m = 1 - 10$ ,  $n = 5 - 15$ ) [120]

APGs gehören zu der Gruppe der nichtionogenen und nichtethoxylierten Tenside und werden vollständig auf der Basis nachwachsender Rohstoffe produziert. Sie zeigen keinerlei Toxizität und zeichnen sich durch eine exzellente Hautverträglichkeit aus, weswegen sie Verwendung in Reinigungs- und Pflegeprodukten finden. Als erste Emulgatorklasse wurden APG aufgrund ihrer Eigenschaften und der Tatsache, dass sie vollständig biologisch abbaubar sind, in die niedrigste Wassergefährdungsklasse eingestuft [11, 87, 207]. Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die Bildung von ME mit diesen Emulgatoren möglich ist. Im Gegensatz zu ethoxylierten Fettalkoholen sind APG temperaturstabil [21, 34]. Die Bildung von ME erfolgt durch den Einsatz verschiedener Co-Tenside im richtigen Verhältnis oder der Änderung des Verhältnisses der lipophilen und hydrophilen Phase. [57, 65].

Nach Untersuchungen von NEUBERT et al. waren APG zudem in der Lage aus einer W/O-ME in das SC zu penetrieren und dort einen leichten Enhancereffekt für hydrophile Stoffe auszuüben. Womöglich beeinflusste das Tensid die Anordnung der polaren Kopfgruppen im interzellulären Lipidfilm, woraus eine erhöhte Hydratation des SC resultierte [151]. Der penetrationsfördernde Einfluss für lipophile Stoffe ist bislang noch nicht untersucht worden. Durch die Störung der lamellaren Anordnung im hydrophilen Bereich der Lipide ist aber auch mit einer Aufweitung der Strukturen im lipophilen Teil zu rechnen.

Unter Verwendung der APG war es möglich, folgendes ME-System zu entwickeln:

<b>Mikroemulsion D</b>	(% - m/m)
Tegocare CG 90 und Plantacare 1200 UP (1:3)	5 % - 60 %
Pentylenglycol	20 %
Fettsäuregemisch	2 % - 45 %
Wasser	1 % - 93 %

Als Emulgatoren kamen mit Tegocare CG90 und Plantacare 1200 UP zwei verschiedene APG zum Einsatz. Zur Stabilisierung der hydrophilen Hauptphase wurde auch in diesem System PeG zugesetzt. Die lipophile Phase enthielt ein FSG, das zum größten Teil zwei Octadiensäuren, darunter auch natürliche LSR, enthielt. Die genauen Phasengrenzen und die Charakterisierung des ME-Systems sind in Kapitel 5 dargestellt. Der pH-Wert lag bei 5,57, weshalb keine Hautirritationen in Folge des pH-Werts zu erwarten sind.

#### 4.3.2 Charakteristika der verwendeten Substanzen

Nachstehend werden die in der ME eingesetzten Stoffe charakterisiert.

##### Emulgatoren

**Plantacare 1200 UP** (INCI: *Lauryl Glucoside*) besteht aus einer wässrigen Lösung eines mit Fettalkoholen der Kettenlänge C12-C16 veretherten Polyglykosids. Der Oligomerisierungsgrad der Verbindung beträgt bei Plantacare 1200 UP durchschnittlich 1,4 [223]. Es ist ein nichtionisches Tensid mit guten dermatologischen und exzellenten Schaumeigenschaften. Plantacare 1200 UP ist konservierungsmittelfrei und enthält 50 % - 53 % aktive Substanz sowie 47 % - 50 % Wasser. Der HLB-Wert beläuft sich auf etwa 13 [169].

Bei **Tegocare CG 90** (INCI: *Cetearyl Glucoside*) handelt es sich um einen nichtionogenen PEG-freien und hydrolysestabilen Emulgator auf der Basis von Zucker. Tegocare CG 90 ist ein weißes Pulver mit niedrigem Fettalkoholgehalt, das einen HLB-Wert von 11 besitzt. Zur Anwendung kommt der Emulgator in der Gesichts- und Körperpflege, Babypflege und in Sonnenschutzmitteln [171].

##### Co-Tensid/Co-Solvent

Die Eigenschaften von **1,2-Pentandiol** sind bereits in Kapitel 3.4.2 erläutert worden.

##### Hydrophile Phase

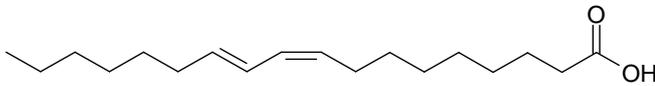
Es wurde stets **gereinigtes Wasser** verwendet.

### Lipophile Phase

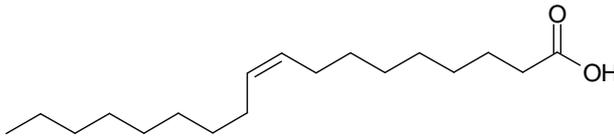
Das eingesetzte **Fettsäuregemisch** setzt sich zum größten Teil aus Octadiensäuren und damit einem Isomerengemisch der Linolsäure zusammen. Etwa ein Viertel besteht dabei aus natürlicher Linolsäure. Zusätzlich sind noch weitere Fettsäuren enthalten, die jedoch, begründet durch ihren geringen Anteil, vernachlässigbar sind und im Folgenden auch nicht weiter betrachtet werden (Tabelle 8). Die Eigenschaften von LSR sind in Kapitel 4.1 und 4.2 bereits ausführlich beschrieben worden.

**Tabelle 8 – Zusammensetzung des FSG**

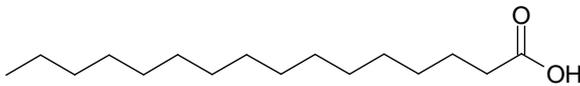
Fettsäure	Anteil [%]
9,12-Octadiensäure cis-cis Fettsäure (nichtkonjugierte DB) (Abbildung 27)	24-28,0
9,11-Octadiensäure cis-trans Fettsäure (konjugierte DB) (Abbildung 30)	60-70,0
Ölsäure (Abbildung 31)	< 7,0
Palmitinsäure und Stearinsäure (Abbildung 32, Abbildung 33)	< 4,0



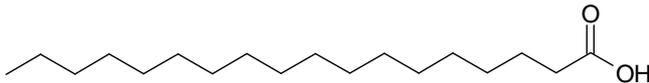
**Abbildung 30 – Strukturformel von 9,11-Octadiensäure**



**Abbildung 31 – Strukturformel von Ölsäure**



**Abbildung 32 – Strukturformel von Palmitinsäure**



**Abbildung 33 – Strukturformel von Stearinsäure**

## 4.4 Untersuchungen an linolsäurehaltigen Mikroemulsionen

Für die Durchführung aller weiteren Experimente wurde aus der in Kapitel 4.3.1 vorgestellten ME folgende Zusammensetzung ausgewählt [77]:

<u>Mikroemulsion LSR</u>	<u>(% - m/m)</u>
Tegocare CG 90 und Plantacare 1200 UP (1:3)	20 %
Pentylenglycol	20 %
Fettsäuregemisch	2 %
Wasser	58 %

Die Ermittlung von Sättigungskonzentrationen der Fettsäuren im ME-System war nicht möglich, da die Fettsäuren als lipophile Phase essentiell für die Bildung des Systems waren. Die möglichen Konzentrationen der Fettsäuren bei verschiedenen Zusammensetzungen der restlichen Bestandteile wurden durch Ermittlung eines Phasendiagramms erhalten. Dieses ist in Kapitel 5.1 vorgestellt.

### 4.4.1 Stabilität der Octadiensäuren im System

Da in beiden Octadiensäuren zwei Doppelbindungen enthalten sind, sind diese besonders oxidationsempfindlich. Zur Gewährleistung der Stabilität in der entwickelten ME wurde ein Experiment zur Lagerstabilität durchgeführt. Zur Optimierung der ME wurde hier gleichzeitig überprüft, ob sich der Zusatz von Antioxidantien positiv auf die Stabilität der aktiven Komponenten auswirkt. Dem ausgewählten System wurde entweder 0,1 % ACP oder 0,05 % Butylhydroxytoluol (BHT) hinzugesetzt.

Als weiteres Experiment wurde eine Oxidation künstlich induziert, um die Oxidationsvorgänge im System genauer zu untersuchen und Unterschiede zwischen verschiedenen Systemen festzustellen.

#### Lagerstabilität

Die Stabilität der Octadiensäuren im ME-System mit und ohne Oxidationsschutz wurde über einen Zeitraum von 36 Wochen bei Raumtemperatur untersucht. Die Quantifizierung der Octadiensäuren erfolgte mit HPLC und DAD-Detektion. Durch Verwendung dieser Methode konnte der größte Teil der enthaltenen Fettsäuren (9,11-Octadiensäure) zuverlässig detektiert und quantifiziert werden, da nur diese Säure durch ihre konjugierten Doppelbindungen gute UV-Aktivität aufzeigt.

Die Ergebnisse in Abbildung 34 zeigen, dass 9,11-Octadiensäure über vier Wochen hinweg stabil war. Nach drei Monaten konnte beobachtet werden, dass die Systeme mit zugesetztem Oxidationsschutz dem ohne Schutz in ihrer Wirkstoffstabilität überlegen waren. Während im System ohne Schutz der 9,11-Octadiensäuregehalt auf 82 % gesunken war, blieb der Gehalt der Säure bei zugesetztem BHT oder ACP stabil. Dieser Trend setzte sich mit steigender Lagerzeit noch fort. Nach 36 Wochen Lagerung konnten nur noch etwa ein Viertel der enthaltenen 9,11-Octadiensäurenkonzentration wiedergefunden werden. Im Gegensatz dazu blieb der

Wirkstoff durch Hilfe der beiden Antioxidantien immernoch stabil. Ein Oxidationsschutz ist demnach sehr zu empfehlen [77].

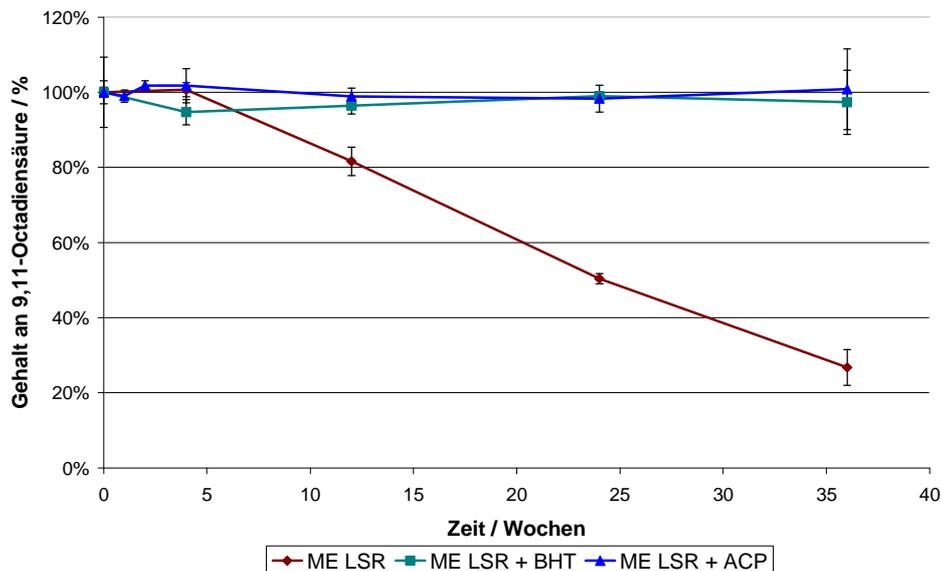


Abbildung 34 – Gehalt an 9,11-Octadiensäure in ME LSR mit und ohne Zusatz von Antioxidantien (BHT = Butylhydroxytoluol, ACP = Ascorbylpalmitat) über einen Lagerzeitraum von 36 Wochen (Angaben in % - m/m) (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ ).

Zusätzlich zur Lagerung der ME mit und ohne Oxidationsschutz wurde der Einfluss der Zusammensetzung der ME auf die Stabilität von 9,11-Octadiensäure untersucht. Dazu wurden die in Tabelle 9 aufgeführten ME-Systeme sowie eine wässrige Lösung zum Vergleich getestet.

Tabelle 9 – Zusammensetzungen der auf Stabilität von 9,11-Octadiensäure untersuchten Systeme (ACP = Ascorbylpalmitat, FSG = Fettsäuregemisch, PeG = Pentylenglycol, Pl 1200 = Plantacare 1200 UP, T CG90 = Tegocare CG90) (Angaben in % - m/m).

	T CG 90	Pl 1200	PeG	FSG	Wasser	ACP
ME LSR A	1,25 %	3,75 %	20 %	2 %	73 %	-
ME LSR B	5 %	15 %	20 %	2 %	58 %	-
ME LSR C	8,75 %	26,25 %	20 %	2 %	43 %	-
ME LSR D	12,5 %	37,5 %	20 %	2 %	28 %	-
ME LSR E	1,25 %	3,75 %	20 %	2 %	72,9 %	0,1 %
ME LSR F	5 %	15 %	20 %	2 %	57,9 %	0,1 %
ME LSR G	8,75 %	26,25 %	20 %	2 %	42,9 %	0,1 %
ME LSR H	12,5 %	37,5 %	20 %	2 %	27,9 %	0,1 %
LSG LSR i	-	-	50 %	2 %	48 %	-
LSG LSR j	-	-	50 %	2 %	47,9 %	0,1 %

Die Lagerung der verschiedenen ME und der wässrigen Vergleichslösung zeigten, dass die ME im Vergleich zur Lösung eindeutig die Stabilität von 9,11-Octadiensäure begünstigen konnten (Abbildung 35). Während es in Lösung LSG LSR i zu einem starken Abfall des 9,11-Octadiensäuregehalts kam, blieb die Konzentration in den ME (Ausnahmen ME LSR A und ME LSR B) über einen Zeitraum von 18 Wochen mit mindestens 90 % stabil. Der Wirkstoffabfall in ME LSR B weicht mit 85 % 9,11-Octadiensäuregehalt nach 18 Wochen nur geringfügig von den restlichen Systemen ab. Lediglich die Inkorporierung des Fettsäuregemischs in

ME LSR A konnte den Abbau der aktiven Komponente nicht verhindern. Durch Zusatz des Antioxidanz ACP konnte die Zersetzung, die offenbar Oxidationsprozessen unterliegt, verhindert werden. Wie die Ergebnisse von ME LSR E zeigen, war im selben System nur mit Zusatz von ACP nach 18 Wochen ein Gehalt von über 90 % zu finden. Der Einsatz eines Antioxidanz in der Lösung j konnte den Abbau der Fettsäure zwar verlangsamen, jedoch lag der Restgehalt auch hier nach 18 Wochen mit 40 % viel zu gering.

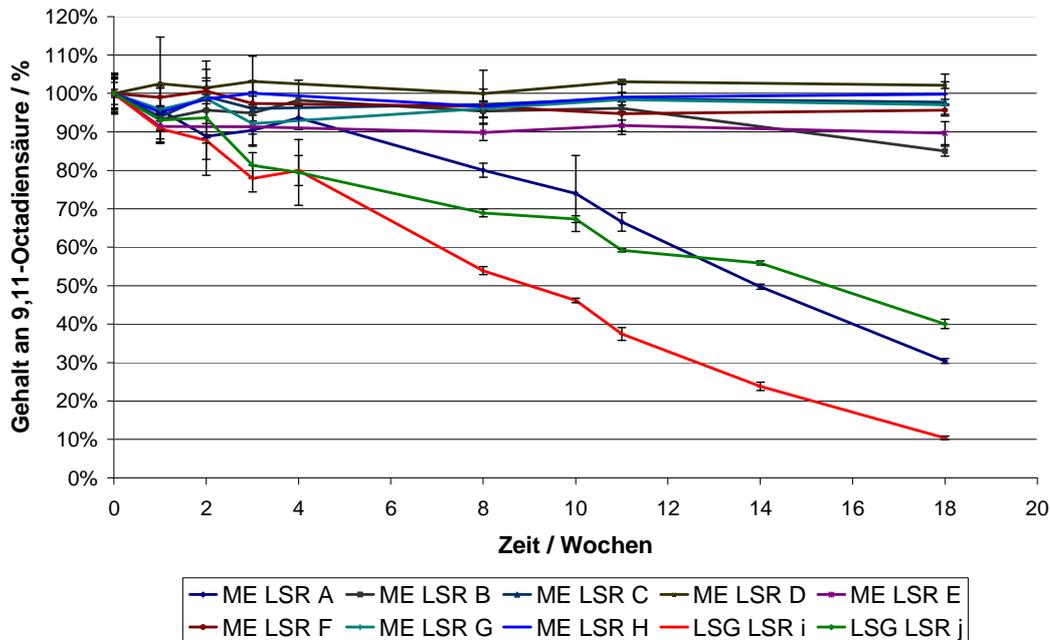


Abbildung 35 – Gehalt an 9,11-Octadiensäure bezogen auf den Anfangsgehalt nach 18wöchiger Lagerung in verschiedenen Systemen (Angaben in % - m/m) (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ ).

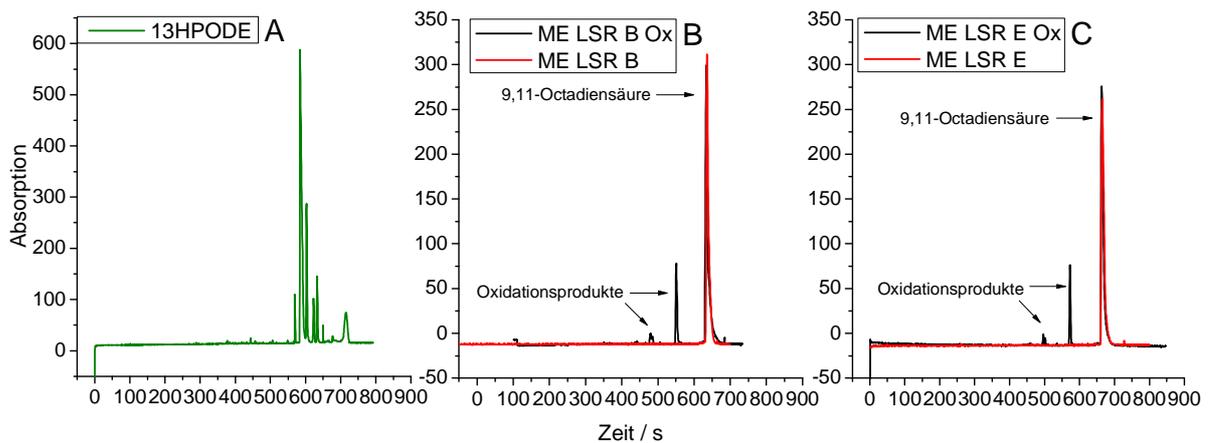
Gründe für die Stabilität von 9,11-Octadiensäure könnte die Lokalisation der lipophilen Phase im System sein. Im Gegensatz zur molekulardispersen Verteilung der Fettsäuren in den beiden Lösungen LSR i und LSR j kommt es in den ME zu einer kolloidalen Verteilung, die durch eine Trennung von fettsäurereichen Domänen und der hydrophilen Phase des Systems durch emulgatorreiche Grenzschichten charakterisiert ist. Durch den recht geringen Anteil an Emulgator in System ME LSR A scheint hier der Schutz durch die Grenzschichten nicht ausreichend zu sein.

Die Oxidation von LSR in verschiedenen Systemen wurde bereits von einer italienischen Arbeitsgruppe untersucht [40]. Es wurde ein Vergleich zwischen einer ME mit einer Emulsion und einer mizellaren Lösung durchgeführt. Alle Vehikel enthielten die gleichen Bestandteile sowie LSR. Die Ergebnisse einer künstlich induzierten Oxidation ergaben für LSR inkorporiert in die Emulsion und die mizellare Lösung gleiche Oxidationsraten. Die Oxidation von LSR in der ME führte allerdings zu viel kleineren Werten der Oxidationsprodukte. Dies konnte auf die dicht gepackten emulgatorreichen Grenzschichten zurückgeführt werden und bestätigt die hier erhaltenen Ergebnisse. Eine zweite Theorie könnte sein, dass die enthaltenen APG zusätzlich in diesem System als Oxidationsschutz fungieren. Hier greift nun die Tatsache, dass diese Tenside bioabbaubar sind. Sie unterliegen Oxidationsprozessen und im stark sauren Bereich Hydrolyse [34, 71, 174]. Eine Instabilität der ME-Systeme konnte durch den eventuellen Abbau

der APG nicht beobachtet werden. Organoleptische Prüfungen ergaben auch nach einem Jahr Lagerung keine Zerstörung der ME-Systeme. Um die Stabilität der Fettsäuren im System zu erhöhen, ohne den Emulgator damit in Mitleidenschaft zu ziehen, muss möglicherweise eine Erhöhung des Oxidationsschutzes im System erfolgen.

#### Induzierte Oxidation der Octadiensäuren

Mit Hilfe der oben vorgestellten Experimente zur Lagerstabilität konnte nur der Gehalt und damit die Stabilität von 9,11-Octadiensäure überprüft werden. Um auch Einblicke in die Stabilität der natürlichen LSR zu erhalten, wurde eine Oxidation des FSG unter UVA-Strahlung induziert. Als Reaktionsbeschleuniger diente dabei Bengalrose B. Die oxidierten Systeme wurden mittels Kapillarelektrophorese analysiert, da es mit dieser Methode auch möglich war, die UV-aktiven Oxidationsprodukte der Fettsäuren zu trennen. Dies ist am Beispiel des Oxidationsproduktes der LSR 13-Hydroperoxy-9-cis-11-trans-octadecadiensäure (13-HPODE) in Abbildung 36A, das zusätzlich mit UVA-Licht bestrahlt wurde, vorgestellt. Reine 9,12-Octadiensäure zeigte auch bei diesem Verfahren aufgrund der fehlenden UV-Aktivität keinen Peak. Der erkennbare Peak in Abbildung 36B und C und Abbildung 37A und B in den Formulierungen ohne Lichtbestrahlung stellt 9,11-Octadiensäure dar.



**Abbildung 36 – Elektropherogramme von (A) 13-HPODE, (B) ME LSR B unbehandelt, (B) ME LSR B Ox nach induzierter Oxidation und (C) ME LSR E unbehandelt und (C) ME LSR E Ox nach induzierter Oxidation.**

Aus den Abbildungen 36 und 37 wird ersichtlich, dass es bei Bestrahlung der ME-Systeme LSR B und LSR E, die beispielhaft dargestellt sind, zu einer leichten Bildung von Oxidationsprodukten kam. Die entstandenen Oxidationsprodukte sind durch die Peaks bei kürzeren Retentionszeiten erkennbar. System LSR E, dem ACP als Oxidationsschutz zugesetzt, war hierbei System LSR B ohne Schutz nicht überlegen. In beiden wässrigen Lösungen LSR i und LSR j (Abbildung 37A und B) wurde deutlich, dass es hier zu einer stark vermehrten Bildung von oxidierten Verbindungen kam. Im Vergleich zu den beiden ME sind mehrere und größere Peaks in den Elektropherogrammen zu sehen. Auch bei den Lösungen kam der Oxidationsschutz nicht zum Tragen. System LSG j zeigte vergleichbare Peaks wie LSG LSR i.

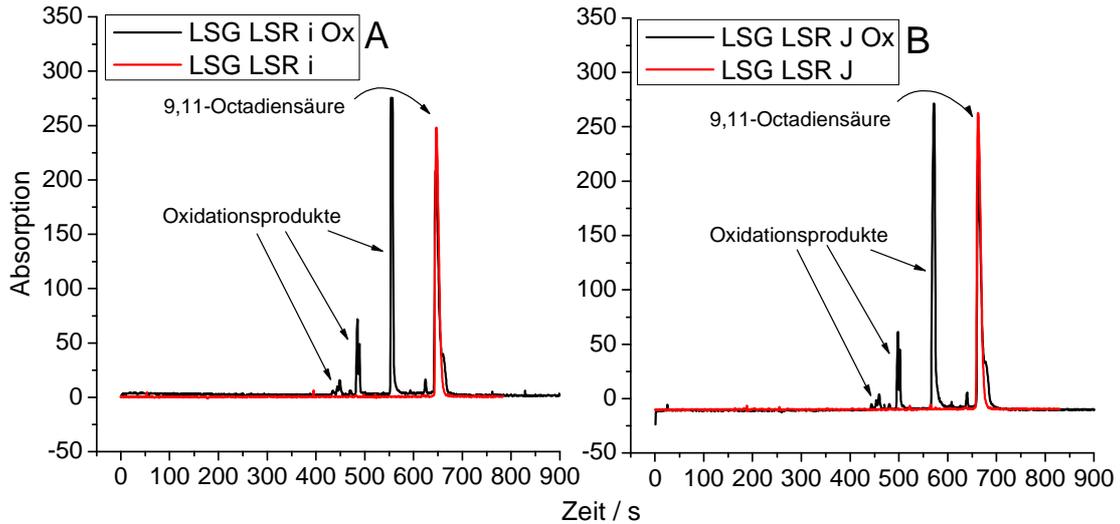


Abbildung 37 – Elektropherogramme von (A) LSG LSR i unbehandelt, (A) LSG LSR i Ox nach induzierter Oxidation und (B) LSG LSR j unbehandelt und (B) LSG LSR j Ox nach induzierter Oxidation.

Aufgrund der unselektiven Bildung von zahlreichen Oxidationsprodukten durch die Einstrahlung von UVA sowie wegen fehlenden Standards war es leider nicht möglich, die entstandenen Oxidationsprodukte zu qualifizieren und quantifizieren. Trotz allem bestätigten sich in diesem Experiment die Ergebnisse der Lagerstabilität. Die Octadiensäuren waren in den ME-Systemen vor Oxidation stärker geschützt als in molekulardispersen Lösungen. Diese Erkenntnisse scheinen auf die 9,12-Linolsäure übertragbar zu sein.

#### 4.4.2 Extraktionsvorversuche

Im Hinblick auf die Durchführung von Penetrationsexperimenten in Humanhaut wurde auch hier im Vorfeld die Extraktion der Octadiensäuren aus ME LSR und dem Standardvehikel Linola Fett<sup>®</sup> (2 % Fettsäuregemischgehalt) untersucht, um auszuschließen, dass Bestandteile der Grundlage die Quantifizierung stören könnten.

Zusätzlich wurde die Wirkstoffextraktion in Gegenwart von Humanvollhaut geprüft, um Störungen ausschließen zu können.

##### Extraktion aus der Formulierung

Die Extraktion der Octadiensäuren aus ME LSR und Linola Fett<sup>®</sup> zeigte in beiden Fällen mit Methanol gute Ergebnisse. Die Wiederfindung in prozentualen Anteilen der applizierten Dosis von 9,11-Octadiensäure in den einzelnen Systemen belief sich auf:

<b>Mikroemulsion LSR</b>	91,18 % ± 2,99 %*
<b>Linola Fett<sup>®</sup></b> (2 % Fettsäuregemischgehalt)	93,30 % ± 1,72 %*

\*n = 3,  $\bar{x} \pm SD$

Methanol eignet sich in Anbetracht der guten Wiederfindungsraten für die Extraktion von 9,11-Octadiensäure aus der entwickelten ME und dem Standardvehikel Linola Fett<sup>®</sup>.

### Extraktion in Gegenwart von Humanhaut

Als Vorversuch zur Penetrationsstudie wurde die Extraktion beider Octadiensäuren in Gegenwart von Humanhaut untersucht. Zum Vergleich erfolgte die Analyse mit HPLC-DAD und GC-MS. Es ergaben sich folgende Wiederfindungsraten (Tabelle 10):

**Tabelle 10 – Wiederfindungsraten beider Octadiensäuren in Gegenwart von Humanhaut durch Bestimmung mit HPLC-DAD und GC-MS (Angaben in % - m/m) (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

	HPLC-DAD	GC-MS
<b>Leerversuch ohne Formulierung</b>		
9,11-Octadiensäure	0,14 % $\pm$ 0,03 %	0,4 % $\pm$ 0,68 %
9,12-Octadiensäure	-	237,6 % $\pm$ 27,69 %
<b>ME LSR</b>		
9,11-Octadiensäure	110,6 % $\pm$ 4,04 %	99,4 % $\pm$ 9,28 %
9,12-Octadiensäure	-	216,57 % $\pm$ 55,52 %

Wie der Vorversuch mit Humanhaut zeigt, ist es nicht möglich, 9,12-Octadiensäure quantitativ zu bestimmen. Es handelt sich hierbei um die natürlich in der Haut vorkommende LSR. Wie der Blindversuch, bei dem nur die Haut ohne Formulierungsapplikation untersucht wurde, und die dabei gefundenen Wiederfindungsraten zeigen, wird die natürlich vorkommende LSR ebenfalls extrahiert. Die perkutan aufgetragene Menge kann somit nicht mehr quantifiziert werden. Zudem kommt es zu großen Standardabweichungen, weshalb es auch nicht möglich ist, zuverlässige Vergleiche zu dem natürlichen Gehalt und dem durch Applikation einer Formulierung erhöhten Gehaltes der Haut an LSR zu ziehen.

Die Quantifizierung der Octadiensäuren im ME-System erfolgte deshalb über die 9,11-Octadiensäure, die nur zu vernachlässigbaren Teilen in der Haut messbar war, wie im Vorversuch ohne Applikation einer Formulierung erwiesen werden konnte. Die festgestellten Wiederfindungsraten ergaben hier bessere Ergebnisse.

Da die Bestimmung mittels HPLC-DAD zuverlässiger und mit weniger Aufwand verbunden ist als die Analyse mit GC-MS, wurde diese zur Quantifizierung der folgenden Penetrationsversuche verwendet. Die Quantifizierung der Octadiensäuren in den Penetrationsuntersuchungen erfolgte damit über die Detektion der 9,11-Octadiensäure. Da die 9,11-Octadiensäure den Hauptbestandteil des FSG bildet und sich 9,11-Octadiensäure sowie 9,12-Octadiensäure in ihren physikochemischen Eigenschaften nicht unterscheiden, kann über die Detektion von 9,11-Octadiensäure auf das Penetrationsverhalten natürlicher LSR geschlossen werden.

## **4.5 Untersuchungen zur Penetration von 9,11-Octadiensäure in exzidierte Humanhaut**

Zur Untersuchung der Penetration der Octadiensäuren aus verschiedenen Vehikeln kam die Diffusionszelle nach FRANZ zum Einsatz. Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 7.7 beschrieben [66].

Die Vorstellung der Franzzelle als Standard in der Durchführung von Studien zur perkutanen Absorption ist bereits in Kapitel 3.6 erfolgt. Zum Einsatz kam auch bei den im Folgenden dar-

gestellten Experimenten wieder exzidierte Humanhaut, die aus Mammareduktionsplastiken erhalten wurde. Damit wurden alle Versuche mit der Haut eines Körperareals durchgeführt. Die drei Spenderinnen waren alle weiblichen Geschlechts und besaßen einen möglichst geringen Altersunterschied. Bis zur Verwendung wurde die Haut bei -20 °C gelagert. Der Einfrierprozess führt, wie bereits in Kapitel 3.6 erwähnt, nicht zur Beeinflussung der Barrierefunktion der Haut [36, 66, 83, 142].

Die Wahl des Akzeptormediums fiel trotz der geringen Löslichkeit der Fettsäuren in wässrigen Lösungen und somit möglichen Aufsättigungseffekten im Akzeptorkompartiment auf PBS-Puffer pH 7,4, da sich diese gepufferte isotonische Lösung mit physiologischem pH am besten zur Einhaltung physiologischer Bedingungen eignet (vgl. Kapitel 3.6). *Sink*-Bedingungen konnten damit allerdings nicht erreicht werden.

In den nachstehenden Penetrationsuntersuchungen lag das Augenmerk vorrangig auf der Penetration der Octadiensäuren in die Haut. Die ermittelten Konzentrationen im Akzeptorkompartiment wurden zur Vervollständigung der Ergebnisse betrachtet, woraus allerdings keine Aussagen über systemische Konzentrationen *in vivo* getroffen werden konnten. Im Vordergrund stand die Beurteilung der dermalen Penetration sowie der Lokalisation und Verteilung der aktiven Komponente innerhalb der verschiedenen Hautschichten. Hierbei wurde ein Vergleich der Penetrationsprofile der 9,11-Octadiensäure aus den entwickelten ME im Vergleich mit dem Standardvehikel Linola Fett® Creme durchgeführt. Der Fettsäuregehalt in Linola Fett® beträgt im Fertigarzneimittel nur 0,815 %. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde Linola Fett® vor den Penetrationsuntersuchungen weitere Fettsäuren zugesetzt, um auch in dieser Formulierung einen Fettsäuregemischanteil von 2 % zu erreichen. Auf die Stabilität der Creme hatte dieser Zusatz keinen Einfluss. Neben der penetrierten prozentualen Menge der applizierten Dosis wurden Tiefenprofile in molaren Konzentrationen erstellt, um die Dicke der einzelnen Hautschichten einbeziehen zu können.

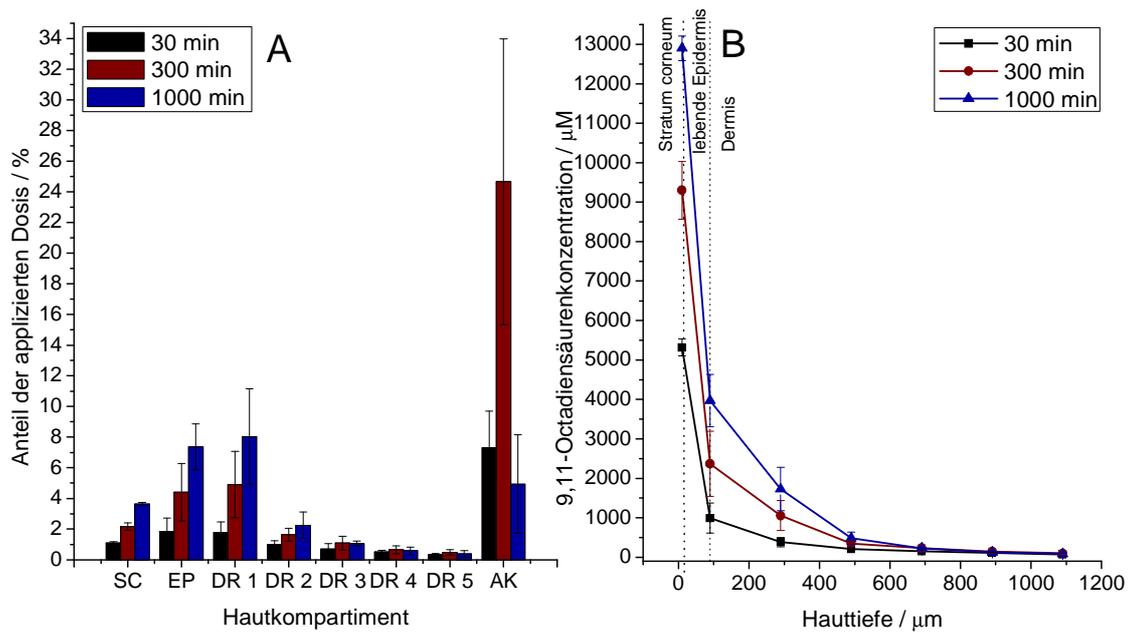
Die Wahl der drei verschiedenen Inkubationszeiten fiel, wie schon bei den Penetrationsuntersuchungen von TCL bewährt, wieder auf 30 min, 300 min und 1000 min, um Rückschlüsse über das Verhalten der Systeme zur Initialphase, zu einer mittleren Applikationszeit und nach Langzeitapplikation ziehen zu können.

#### **4.5.1 Penetration aus der Mikroemulsion**

Die Penetrationsergebnisse von 9,11-Octadiensäure nach Applikation der ME LSR sind in Abbildung 38 dargestellt. Sie zeigen, dass 9,11-Octadiensäure zu großen Teilen in die Haut penetrieren konnte. Die Fettsäure erreichte die vitalen Hautschichten, wobei der größte Anteil der penetrierten Menge in den oberen Hautschichten zu finden war. Ab Dermissschicht 2 wurden auch nach längerer Versuchszeit als Höchstwert nur 2 % der applizierten Dosis detektiert. Die hohen Werte in Dermissschicht 1 und der danach starke Abfall der Konzentration könnten für eine Lokalisation der 9,11-Octadiensäure in der lebenden Epidermis sprechen, denn aufgrund der zapfenförmigen Schichten der lebenden Epidermis den Reteleisten, ist es unmöglich, durch horizontale Schnitte nur Dermissschichten an der Grenze zur lebenden Epidermis zu erhalten.

Nach längerer Versuchszeit stieg die Konzentration in den oberen Hautschichten weiter an. Während sich nach 30 min in der lebenden Epidermis 1,8 % der Fettsäure befanden, stieg dieser Gehalt nach 1000 min auf das Vierfache. Auch im SC war der gleiche Trend zu erkennen. In der Initialphase konnten 1,1 % in das oberste Kompartiment penetrieren, nach 300 min stieg dieser Wert mit 2,2 % auf das Doppelte und konnte sich nach der Langzeitapplikation von 1000 min noch mal auf 3,6 % steigern.

Mit Blick auf das Akzeptorkompartiment zeigt sich, dass 9,11-Octadiensäure alle Hautschichten permeierte und schon nach 30 min dort Konzentrationen aufwies. Dies weist jedoch nicht zwingend auf einen Übertritt in den systemischen Kreislauf hin.



**Abbildung 38 – (A) Penetrationsergebnisse von 9,11-Octadiensäure aus ME LSR in Anteilen der applizierten Dosis in die verschiedenen Hautkompartimente und (B) Tiefenprofil von 9,11-Octadiensäure nach Applikation von ME LSR (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

Das Tiefenprofil (Abbildung 38B) bestätigt die Ergebnisse aus Abbildung 38A in Anteilen der applizierten Dosis. Der Wirkstoff wies zu allen drei Versuchszeiten die höchsten Werte in der Epidermis auf. Diese Konzentrationen erhöhten sich mit längerer Versuchszeit noch. In die tiefen Schichten der Dermis konnte nur wenig 9,11-Octadiensäure penetrieren. Ab einer Hauttiefe von 500 µm waren fast keine molaren Konzentrationen mehr zu sehen. Man kann davon ausgehen, dass 9,11-Octadiensäure und demzufolge auch LSR in der Lage waren, die Epidermis zu großen Teilen nach Applikation der ME zu erreichen. Es schien zu einer Kumulation in der Epidermis zu kommen, da die tiefen Hautschichten nur zu kleinen Teilen erreicht wurden. Die ermittelten Akzeptorkonzentrationen könnten von dem starken Konzentrationsgradienten zwischen Vehikel und Haut herrühren.

#### 4.5.2 Penetration aus dem Standardvehikel Linola Fett®

Die Ergebnisse des Standardvehikels Linola Fett® ergaben eine Penetration von 9,11-Octadiensäure in die oberen Schichten der Haut (Abbildung 39). Die tiefen Schichten ab Dermis 3 konnten nur zu geringen Anteilen von unter 0,6 % erreicht werden. Die Konzentrationen

onen stiegen bei längerer Inkubationszeit zwar minimal an, blieben aber eindeutig in irrelevanten Konzentrationsbereichen. Das Akzeptorkompartiment konnte zu keiner Versuchszeit erreicht werden. Die aktive Komponente reicherte sich vielmehr in den oberen Hautschichten an. Nach längerer Inkubationszeit wurden höhere Werte der Fettsäure in der Epidermis und den oberen Schichten der Dermis gemessen. Trotz allem wird ersichtlich, dass 9,11-Octadiensäure nur zu kleinen Teilen in die Haut eindringen konnte. Nach 30 min war ein Gesamtanteil von 3 % der applizierten Dosis in allen Hautschichten zu finden und nach der Langzeitapplikation wurden lediglich 8 % detektiert. Selbst im lipophilen SC kam es zu keiner Anreicherung der Fettsäure.

Ein Grund für diese geringen Werte könnte möglicherweise eine schlechte Freisetzung der aktiven Komponente aus dem Vehikel sein. Bei Linola Fett® handelt es sich um eine W/O-Grundlage. Da der Verteilungskoeffizient (log P) von LSR mit über 7 sehr hoch liegt, verteilen sich LSR und damit auch 9,11-Octadiensäure normalerweise in lipophilen Phasen. Diese finden die Substanzen in der lipophilen Grundlage bereits vor und penetrieren aus diesem Grund nicht bevorzugt in das ebenfalls lipophile SC.

Im Tiefenprofil (Abbildung 39B) wird nochmals deutlich, dass eine Penetration in tiefere Schichten aus Linola Fett® nicht möglich war. 9,11-Octadiensäure verblieb nur in den oberen Schichten. In diesen konnten zudem nur kleine Konzentrationen der aktiven Komponente ermittelt werden.

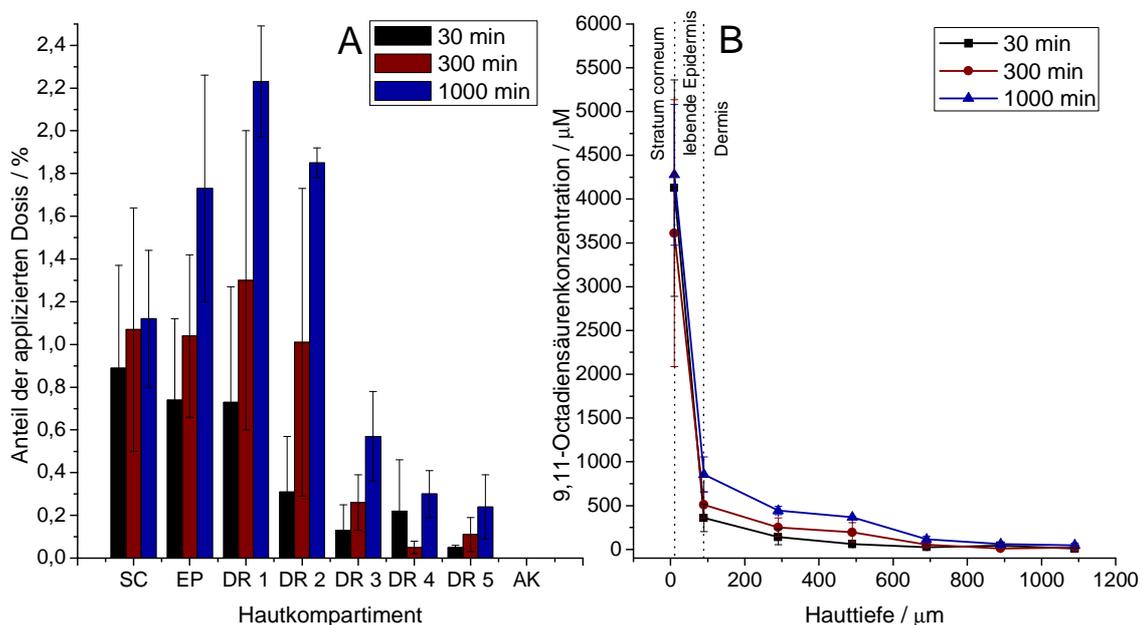
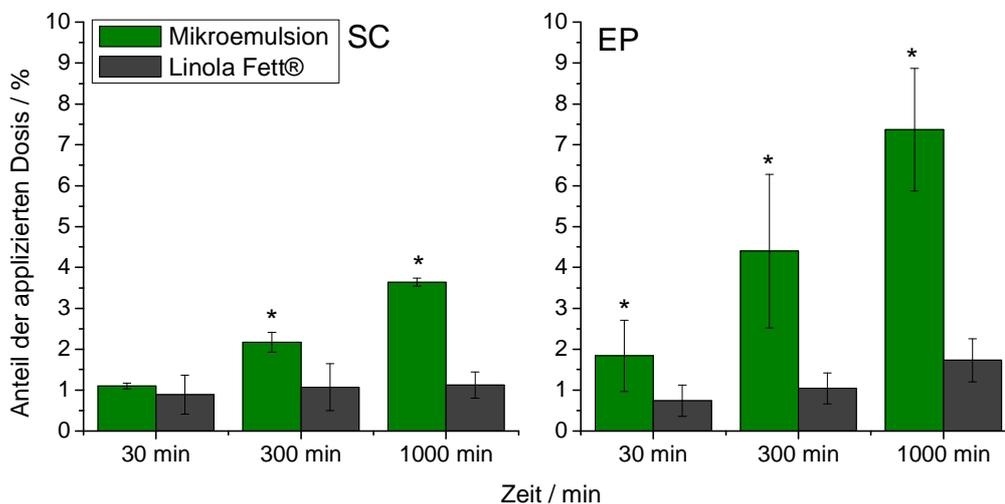


Abbildung 39 – (A) Penetrationsergebnisse von 9,11-Octadiensäure aus dem Standardvehikel Linola Fett® mit 2 %iger Fettsäuregemischkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in die verschiedenen Hautkompartimente und (B) Tiefenprofil von 9,11-Octadiensäure nach Applikation des Standardvehikels Linola Fett® mit 2 %iger Fettsäuregemischkonzentration (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ ).

#### 4.5.3 Vergleich der Penetrationsprofile von 9,11-Octadiensäure aus der Mikroemulsion und Linola Fett®

Die Ergebnisse beider Penetrationsstudien demonstrieren, dass zu allen drei Versuchszeiten höhere 9,11-Octadiensäuregehalte aus der ME in die Haut penetrieren konnten (Abbildung 40

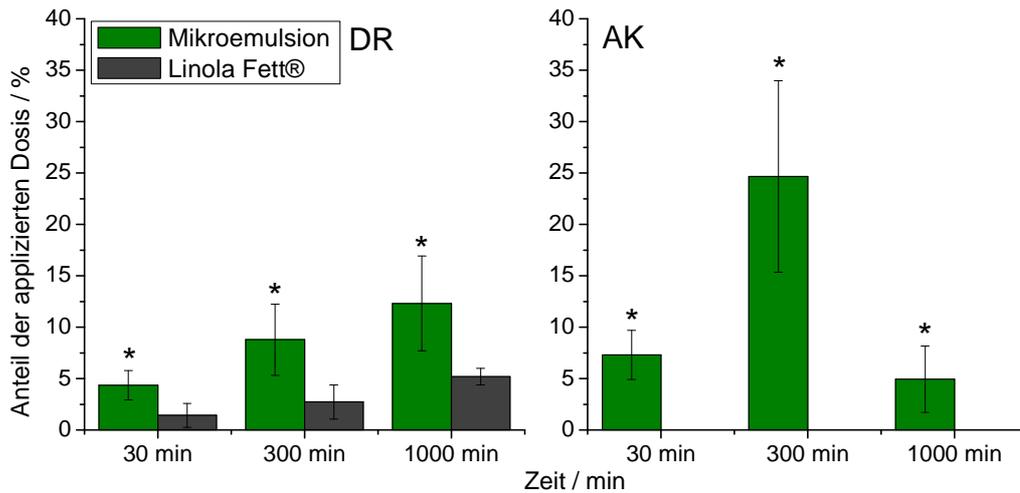
und Abbildung 41). Die Konzentrationen im SC konnten durch das Vehikel Linola Fett® mit längerer Inkubationszeit nicht gesteigert werden und blieben konstant im Bereich von 1 % der applizierten Dosis. Aus der ME konnte zur Initialphase nur geringfügig mehr Fettsäure die Hornschicht penetrieren. Die Konzentration stieg allerdings mit längerer Zeit auf das 3,5fache an. Durch Einsatz der ME war es möglich, signifikant höhere Konzentrationen penetrieren zu lassen. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Darstellung des Tiefenprofils. Dort wird deutlich, dass die molaren Konzentrationen nach Applikation der ME in einer Hauttiefe von 10 µm um bis das 2,5fache im Vergleich zum Standardvehikel erhöht waren (Abbildung 42). Es steht demzufolge mehr 9,11-Octadiensäure und so auch mehr LSR zur Regeneration und Erhaltung der Hautbarriere zur Verfügung, indem deren Integration in die Lipidbilayer des SC erfolgt. Fehlende natürliche Hautlipide können ersetzt werden und der TEWL kann damit minimiert werden, womit eine Verbesserung trockener Hautzustände eintritt. Gleichzeitig kann die durch Barrierschäden aktivierte übermäßige DNS-Produktion gesenkt werden. Dadurch kommt die antiproliferative Wirkung zum Tragen.



**Abbildung 40 – Vergleich der Penetrationsergebnisse von 9,11-Octadiensäure aus ME LSR und der Creme Linola Fett® mit 2 %iger Fettsäuregemischkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in das Stratum corneum (SC) und die vitale Epidermis (EP) (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 gegenüber Linola Fett®).**

In der lebenden Epidermis konnten ebenfalls Unterschiede im Penetrationsverhalten von 9,11-Octadiensäure aus beiden Vehikeln beobachtet werden. Durch den Einsatz des kolloidalen Carriers fanden sich schon in der Initialphase nach 30 min mit 1,84 % mehr als doppelt soviel des Anteils der applizierten Dosis an 9,11-Octadiensäure verglichen zu Linola Fett® mit nur 0,74 %. Nach 1000 min war dieser Unterschied noch deutlicher. Linola Fett® erreichte nur einen Anteil von 1,73 % während aus der ME 7,37 % in der lebenden Epidermis zu finden waren. Der 9,11-Octadiensäuregehalt erhöhte sich nach Applikation der ME in der lebenden Epidermis und in den oberen Schichten der Dermis 1 mit längerer Versuchszeit weiter. Linola Fett® war, wie in Abbildung 40 und Abbildung 41 ersichtlich, nicht in der Lage, den Wirkstoffgehalt in diesen Hautschichten mit längerer Penetrationszeit stark zu vergrößern. Es ergaben sich signifikant höhere Werte an Fettsäurekonzentrationen in den lebenden Schichten der Epidermis. Für die antientzündliche Wirkung der LSR ist die Penetration in die lebende Epi-

dermis notwendig. Dort sind die Enzyme lokalisiert, die die Umsetzung der LSR in ihre Oxidationsprodukte katalysieren. Dadurch können antiinflammatorische Prozesse eingeleitet werden. Bei atopischer Dermatitis ist diese Wirkung womöglich nicht gegeben, da bei dieser Erkrankung ein Enzymdefekt diskutiert wird, der die Umsetzung von LSR verhindert. Da aber bei atopischer Dermatitis auch ein verminderter Einbau von LSR in Ceramid [EOS] beobachtet wurde [190], könnte eine Linolsäureapplikation den Einbau in Ceramid [EOS] begünstigen. Da die Synthese der Ceramide im *Stratum spinosum* stattfindet, ist die Penetration der Fettsäure in die lebende Epidermis unerlässlich.

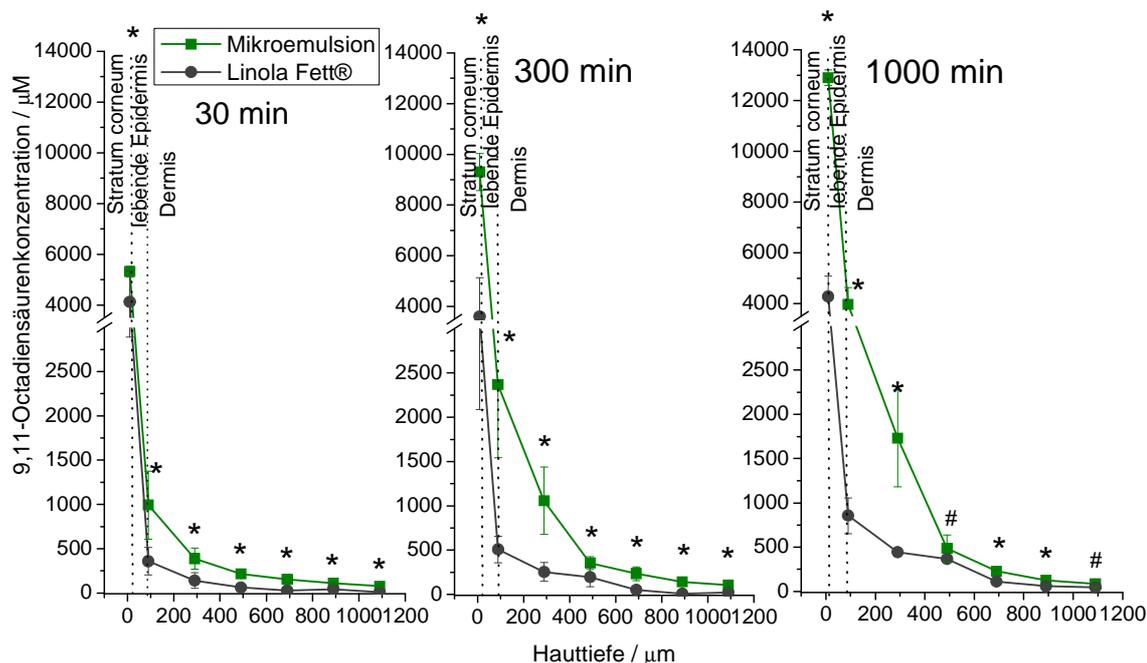


**Abbildung 41 – Vergleich der Penetrationsergebnisse von 9,11-Octadiensäure aus ME LSR und der Creme Linola Fett® mit 2 %iger Fettsäuregemischkonzentration in Anteilen der applizierten Dosis in die Dermis (DR) und das Akzeptorkompartiment (AK) (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 gegenüber Linola Fett®).**

In den unteren Dermissschichten blieb die 9,11-Octadiensäurekonzentration bei beiden Formulierungen zu allen drei Inkubationszeiten sehr niedrig und weitestgehend konstant. Ab einer Hauttiefe von 700  $\mu\text{m}$  waren nur noch geringe molare Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  detektierbar. Diese Beobachtung spricht bei beiden Formulierungen für eine Kumulation der aktiven Komponente in der Epidermis, die das Zielkompartiment darstellt. Die penetrationsfördernden Eigenschaften der ME scheinen einen höheren Konzentrationsgradienten zu erzeugen, der für die Permeation durch alle Hautschichten sorgt, wodurch sich auch im Akzeptorkompartiment 9,11-Octadiensäure detektieren ließ.

Die Gesamtpenetration der aktiven Komponente aus der ME war im Vergleich zur W/O-Creme Linola Fett® erheblich höher. Nach 30 min konnten aus der ME bereits 7,3 % der applizierten Dosis in der Haut gefunden werden. Aus Linola Fett® penetrierten lediglich 3,1 %. Nach 300 min waren mit 15,3 % im Gegensatz zu 4,8 % etwa dreifach höhere Konzentrationen aus der ME detektierbar. Dieser Trend erhöhte sich nach 1000 min noch weiter mit einem 9,11-Octadiensäuregehalt nach Applikation der ME von 23,3 % zu 8,4 % nach Applikation der Creme. Die Ergebnisse aus dem Akzeptorkompartiment wurden hierbei nicht berücksichtigt. Aus diesen Daten ist zu erkennen, dass es in der Penetrationsrate aus Linola Fett® nur einen kleinen Anstieg gab. Eine hohe Penetration wird vermutlich durch eine niedrige Freisetzung unterbunden. Bei handelsüblicher Linola Fett® Creme ist mit einer noch geringeren Penetration

zu rechnen, denn dort ist die thermodynamische Aktivität aufgrund geringerer Fettsäuregemischkonzentrationen niedriger.



**Abbildung 42 – Vergleich der Tiefenprofile von 9,11-Octadiensäure nach Applikation der ME LSR und der Creme Linola Fett® mit 2 %iger Fettsäuregemischkonzentration zu den drei verschiedenen Versuchszeiten 30 min, 300 min und 1000 min (n = 9,  $\bar{x} \pm SD$ , \*p < 0,01 und #p < 0,05 gegenüber Linola Fett®).**

Untersuchungen zur Penetration von LSR sind auch in der Literatur zu finden. Eine britische Gruppe untersuchte den Einfluss von okklusiven Bedingungen auf die Penetration von LSR inkorporiert in eine ethanolische Lösung oder Cylcomethicon [214]. Die Ergebnisse zeigten für LSR aus beiden Vehikeln höhere Penetrationsraten unter nicht-okklusiven Bedingungen. Da es sich bei beiden Vehikeln um flüchtige Substanzen handelte, wurden die Evaporation der Lösungen und der damit erfolgte Anstieg des Konzentrationsgradienten und der thermodynamischen Aktivität als möglicher Grund diskutiert. Trotzdem blieben alle Ergebnisse mit einer Gesamtpenetration von unter 5 % der applizierten Dosis in die gesamte Haut weit unter den Penetrationsergebnissen der hier verwendeten ME. Eine ermittelte *in vivo*-Verteilung von LSR zeigte im Tierversuch ungewöhnlich hohe Konzentrationen in einer Hauttiefe von 160 µm – 400 µm. Die Autoren vermuteten eine Akkumulation der LSR in den Talgdrüsen. Auch hier lagen die ermittelten Konzentrationen, die sich im unteren Nanomolbereich bewegten unter den Ergebnissen des kolloidalen Carriers [181]. RAUFAST und MAVON dagegen erhielten nach Applikation einer linolsäurehaltigen Emulsion jeweils 10 % der applizierten Dosis im SC und den lebenden Hautschichten (Summe der Epidermis und der Dermis). Dies wurde jedoch nicht auf die gute Penetration in die Hornschicht zurückgeführt, sondern auf eine transfollikuläre Penetration von LSR. Da bei den hier durchgeführten Experimenten nur die transepidermale Route berücksichtigt wurde, wurden die in den Haarfollikeln enthaltenen Konzentrationen nicht erfasst, weswegen die Ergebnisse nicht vergleichbar sind [176].

#### **4.5.4 Zusammenfassung der Penetrationsergebnisse**

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich war, mit Hilfe des ME-Systems in kurzer Zeit hohe Raten an 9,11-Octadiensäure in die Haut penetrieren zu lassen. Trotz der hohen Lipophilie der aktiven Komponente bewirkten die Applikation der ME eine exzellente Penetration. Im Vergleich zum Standardvehikel war die ME zu allen drei Versuchszeiten der Linola Fett® Creme überlegen. Nach Applikation der ME reicherte sich die Fettsäure mit steigender Versuchszeit nicht in den tiefen Dermissschichten an, sondern kumulierte im Zielkompartiment Epidermis. Zur Bestätigung der Ergebnisse sind allerdings noch klinische Untersuchungen nötig [77].

## 5 Charakterisierung der entwickelten Mikroemulsionen

Die Penetrationsuntersuchungen stark lipophiler Substanzen nach Applikation der in Kapitel 3 und 4 entwickelten ME ergaben Rückschlüsse über die Eignung der Systeme als kolloidale Carrier zur dermalen Therapie. Um weitere Einblicke zu gewinnen, wurden die ME unter Verwendung verschiedener Methoden charakterisiert.

Angesichts ihrer dynamischen Mikrostruktur und des geringen Volumens der kolloidalen Phase ist die Charakterisierung der Systeme äußerst schwierig. Um Fehlinterpretationen, hervorgerufen durch Probenpräparationsfehler oder die Messung von Artefakten, zu vermeiden, wurden mehrere Methoden eingesetzt. Damit konnte eine umfassende Charakterisierung der einzelnen Systeme erzielt werden.

### 5.1 Erstellung von Phasendiagrammen

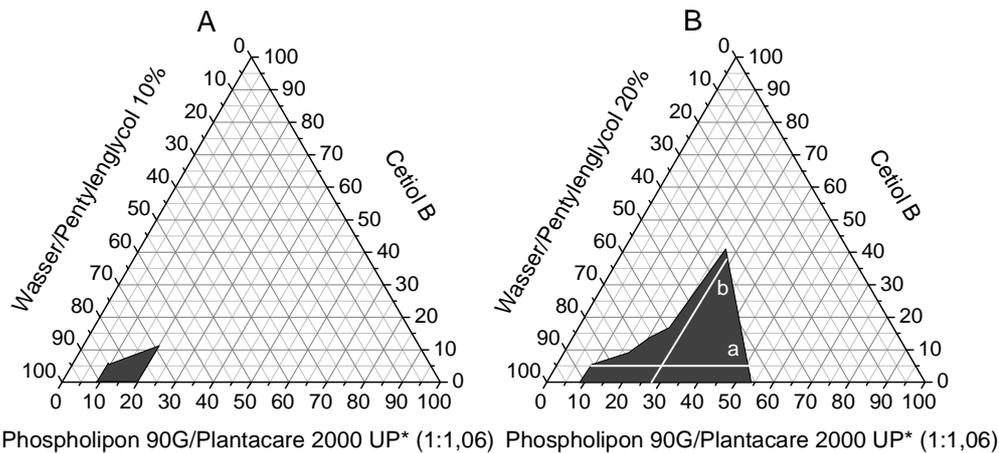
Die Ermittlung der Phasengrenzen der einzelnen entwickelten Systeme ME A bis D ist ein essentieller Faktor, um Aussagen über den Umfang und die Lage des optisch isotropen ME-Gebietes (vgl. Kapitel 5.2) treffen zu können. Pseudoternäre Phasendiagramme, in denen die Emulgatorkonzentration gegen die Konzentration der lipophilen Phase und gegen die Konzentration der hydrophilen Phase aufgetragen wird, eignen sich hierbei gut zur Darstellung und Beurteilung des ME-Gebietes. In dieser Arbeit wurden von allen vier entwickelten Systemen ME A bis D (vgl. Kapitel 3.4.1 und Kapitel 4.3.1) Phasendiagramme angefertigt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 43 bis 47 dargestellt. Da es sich bei den in ME A und ME D eingesetzten Emulgatoren der Sorte Plantacare um APG mit einem Wasseranteil von 47 % bzw. 48,5 % handelt, wurde in den entsprechenden Phasendiagrammen dieser Anteil der hydrophilen Phase zugeordnet und somit für den Emulgatoranteil nur die aktive Substanz berücksichtigt. Daraus ergab sich bei ME A und ME D ein verändertes Verhältnis der beiden eingesetzten Emulgatoren. Für ME A wurde das Verhältnis von Phospholipon 90 G zu Plantacare 2000 UP von 1:2 unter ausschließlicher Berücksichtigung der aktiven Substanz auf 1:1,06 korrigiert. Für ME D ergab sich ein korrigiertes Verhältnis von Tegocare CG 90/Plantacare 1200 UP von 1:3 auf 1:1,545.

#### Mikroemulsionssystem A

Anhand ME A wurde der Einfluss der Co-Solvenskonzentration auf die Systembildung untersucht. Die Ermittlung der Phasengrenzen wurde einmal mit 10 %iger und noch mit 20 %iger PeG-Konzentration durchgeführt (Abbildung 43). Auch die Wahl der lipophilen Phase und ihr Einfluss auf die Ausbildung von ME wurden durch Einsatz verschiedener Öle untersucht. Es kamen dabei flüssige Wachse sowie mittelkettige Triglyceride zum Einsatz (Abbildung 44).

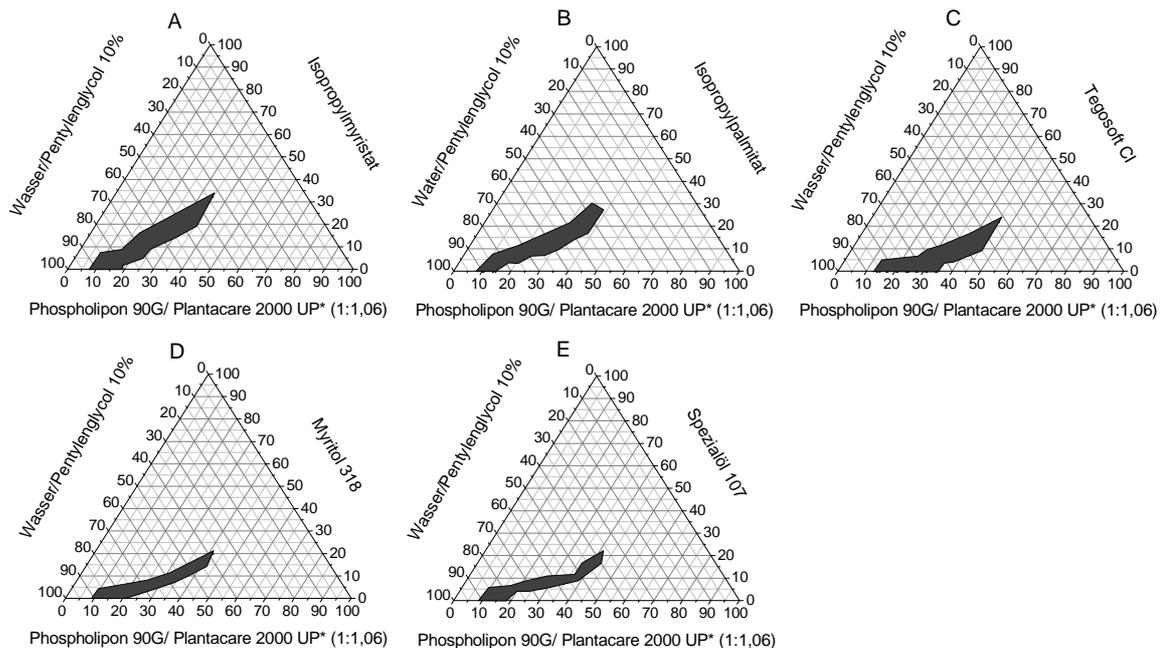
Wie die dargestellten Ergebnisse in Abbildung 43 erkennen lassen, hatte die Konzentration des Co-Solvens Einfluss auf die Mikroemulsionsbildung. Bei einem Zusatz von 10 % PeG resultierte ein sehr kleines isotropes Phasengebiet. Durch den Einsatz von 20 % des Co-Solvens kam es dagegen zu einer erheblichen Ausdehnung des Mikroemulsionsgebietes. Die Erhöhung von PeG führte vermutlich zu einem Anstieg der Fluidität der emulgatorreichen Grenzschichten. Insbesondere für lecithinhaltige ME, die zur Bildung rigider Filme neigen, ist in der Lite-

ratur beschrieben, dass die Eingliederung von Co-Tensiden und Co-Solventien die Flexibilität erhöhen kann [3]. Gleichzeitig führen Alkohole auch zu einer Destabilisierung von flüssigkristallinen Phasen in Systemen mit hoher Emulgatorkonzentration [230]. Allein durch Veränderung der Co-Solvens-Konzentration war es somit möglich, das Phasengebiet maßgeblich zu erweitern. Durch Erhöhung des Diolgehaltes können hier neben der wichtigen Stabilisierung der ME zusätzlich auch dessen exzellente Solubilisierungseigenschaften und antimikrobiellen Eigenschaften ausgenutzt werden.



**Abbildung 43 – Pseudoternäre Phasendiagramme der ME A mit (A) einem Zusatz von 10 % PeG und (B) einem Zusatz von 20 % PeG (\*nur aktive Substanz berücksichtigt).**

Der Einfluss der Art der lipophilen Phase auf die Ausbildung von Mikroemulsionsregionen wurde unter Zuhilfenahme der verschiedenen flüssigen Wachse IPM, IPP und Tegosoft CI sowie der beiden mittelkettigen Triglyceride Myritol 318 und Spezialöl 107 untersucht. Die Ermittlung erfolgte mit einem Zusatz von 10 % PeG zur hydrophilen Phase.



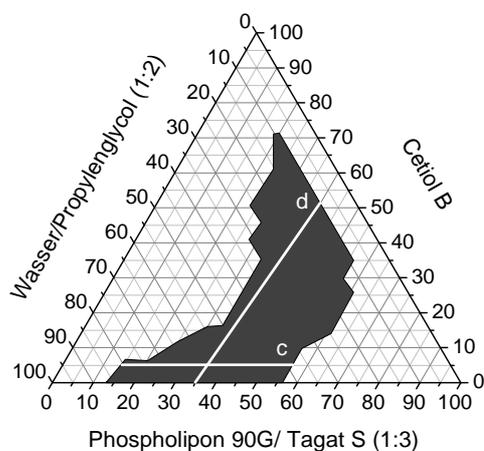
**Abbildung 44 – Pseudoternäre Phasendiagramme der ME A mit unterschiedlichen Ölen als lipophile Phase (A) Isopropylmyristat, (B) Isopropylpalmitat, (C) Tegosoft CI, (D) Myritol 318 und (E) Spezialöl 107 (\*nur aktive Substanz berücksichtigt).**

Wie in Abbildung 43 ersichtlich, kam es bei dieser Konzentration zu kleineren isotropen Gebieten als bei einem 20 %igem Zusatz, so dass der Einfluss des Öls bei dieser Zusammensetzung vermutlich besser zu erkennen ist.

Die Ergebnisse in Abbildung 44 zeigen auf, dass sich bei Austausch der lipophilen Phase durch verschiedene Öle nur geringe Unterschiede im Phasenverhalten der ME ergaben. Lediglich die beiden mittelkettigen Triglyceride Myritol 318 und Spezialöl 107 (Abbildung 44 D und E) resultierten in kleineren Flächen als die flüssigen Wachse. Diese beiden Substanzen besitzen im Vergleich zu den flüssigen Wachsen eine etwas größere Molmasse. Nach Untersuchungen von ABOOFAZELI et al. können Öle mit kleineren Molmassen die Ausbildung von ME begünstigen [4] und womöglich nimmt auch die sterische Form des jeweiligen Öls Einfluss. Die Lipophilie der Öle in Abbildung 44 bewegte sich in allen Fällen in einem Bereich von  $\log P$  7,5 – 8,5 [194], wodurch diese Eigenschaft zur Ausbildung unterschiedlicher isotroper Phasengebiete nicht weiter zum Tragen kam. Die Größenunterschiede des isotropen Bereichs sind in den Phasendiagrammen allerdings nur unwesentlich zu erkennen. Durch die Variation der lipophilen Phase war es zusammenfassend nicht möglich, große Unterschiede in Ausmaß und Lage des isotropen Phasenbereichs zu zeigen.

### Mikroemulsionssystem B

Das Phasengebiet der ME B ergab ähnlich wie für ME A mit 20 %igem PeG-Zusatz große einphasige, isotrope Bereiche (Abbildung 45).



**Abbildung 45 – Pseudoternäres Phasendiagramm der ME B**

Begünstigt wurde die Entstehung von ME womöglich auch hier durch den Zusatz des Co-Solvens PrG. ME B zeigte zudem mehrphasige Bereiche innerhalb bestimmter Emulgatorkonzentrationen. Während es möglich war, in einem Konzentrationsbereich von 20 % - 30 % einphasige Mischungen mit niedrigem Öl- oder niedrigem Wassergehalt zu bilden, konnten keine Systeme mit etwa gleichen Teilen beider Phasen erhalten werden. Bei höheren Emulgatorkonzentrationen verschwanden diese mehrphasigen Bereiche inmitten einer bestimmten Emulgatorkonzentration. Ein Grund dafür könnte sein, dass es sich bei den Systemen mit etwa gleichem Öl- und Wassergehalt um bikontinuierliche ME handelt. Bei höheren Emulgatorkonzentrationen erfolgte womöglich eine Stabilisierung der bikontinuierlichen Be-

reiche durch den erhöhten Anteil der emulgatorreichen Grenzschichten, die bei niedrigem Emulgatorgehalt nicht realisiert werden konnte.

### Mikroemulsionssystem C

Durch Ermittlung der Phasengrenzen von ME A konnte bereits der förderliche Einfluss einer 20 %igen PeG-Konzentration auf die Bildung eines isotropen Gebietes gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde auch für die Systeme ME C und D eine 20 %ige PeG Konzentration gewählt. Das Phasendreieck für ME-System C (Abbildung 46) konnte auch hier wahrscheinlich durch den Einsatz des Co-Solvens PeG große einphasige Bereiche aufweisen.

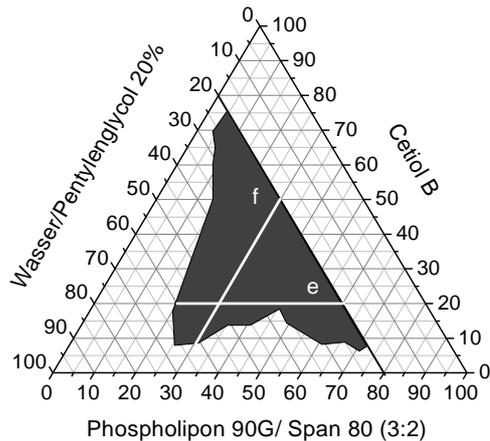


Abbildung 46 – Pseudoternäres Phasendiagramm der ME C

ME C resultierte womöglich durch den niedrigen HLB-Wert des Co-Emulgators Span 80 in einer etwas anderen Lage des isotropen Gebietes im Phasendiagramm im Vergleich zu ME A und B. Es konnten vorwiegend ME mit einer öligen Hauptphase gebildet werden. Trotzdem war es auch möglich, Systeme mit einer hydrophilen Hauptphase zu ermitteln. Diese waren jedoch am Phasengrenzgebiet lokalisiert.

### Mikroemulsionssystem D

Im entwickelten linolsäurehaltigen System, dessen Phasengrenzen in Abbildung 47 dargestellt sind, kamen ausschließlich APG zur Anwendung.

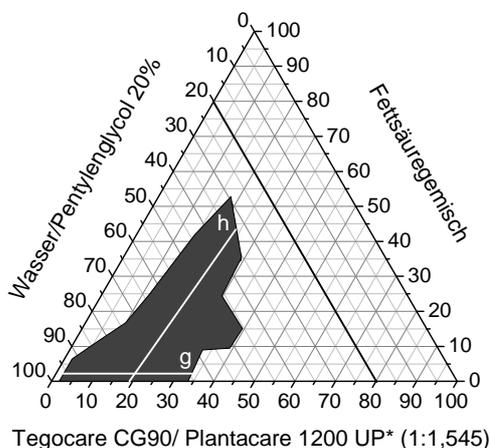


Abbildung 47 – Pseudoternäres Phasendiagramm der ME D (\*nur aktive Substanz berücksichtigt)

Da damit beide Tenside über einen sehr hohen HLB-Wert verfügen, existierte in ME D kein klassisches Emulgatorsystem. Trotzdem ist die Bildung rein APG-haltiger ME mit Hilfe eines Alkohols in der Literatur beschrieben [34, 41]. Dies konnte auch anhand ME D realisiert werden. Zur Ausbildung einphasiger, isotroper Systeme hatte PeG hier nicht nur die Funktion eines Co-Solvens, sondern auch die des Co-Tensids. PeG lagerte sich vermutlich in die Grenzschicht ein und bildete zusätzlich Bulkbereiche in der kontinuierlichen Phase.

**Zusammenfassung**

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es durch die Ermittlung der Phasengrenzen der entwickelten ME-Systeme gelungen ist, das Ausmaß und die Lage der einphasigen isotropen Bereiche zu erhalten. Da mit dieser Methode jedoch keine Aussagen über den Charakter (O/W, bikontinuierlich oder W/O) der einzelnen Systeme getroffen werden können, sind noch weitere Untersuchungen nötig. Zur besseren Charakterisierung der ME-Systeme A bis D wurden aus diesem Grund entlang der Dilutionsreihen a bis h (vgl. Abbildungen 43, 45, 46 und 47) verschiedene ME gewählt, deren Zusammensetzungen in Tabelle 11 aufgeführt sind.

**Tabelle 11 – Zusammensetzungen der ME entlang der Dilutionsreihen a bis h (Dil.-reihe = Dilutionsreihe, FSG = Fettsäuregemisch, PeG = Pentylenglycol, Ph 90G = Phospholipon 90G, Pl 1200 = Plantacare 1200 UP, Pl 2000 = Plantacare 2000 UP, PrG = Propylenglycol, T CG90 = Tegocare CG90) (\*nur aktive Substanz berücksichtigt) (Angaben in % - m/m).**

<i>Dil.-reihe</i>	<i>Cetiol B</i>	<i>FSG</i>	<i>PeG</i>	<i>Ph 90G</i>	<i>Pl 1200*</i>	<i>Pl 2000*</i>	<i>PrG</i>	<i>Span 80</i>	<i>Tagat S2</i>	<i>T CG90</i>	<i>Wasser</i>
<b>a<sub>1</sub></b>	5 %		20 %	6,67 %		7,06 %					61 %
<b>a<sub>2</sub></b>	5 %		20 %	10 %		11 %					54 %
<b>a<sub>3</sub></b>	5 %		20 %	16,67 %		17,66 %					41 %
<b>a<sub>4</sub></b>	5 %		20 %	20 %		21 %					34 %
<b>b<sub>1</sub></b>	2,50 %		20 %	13,33 %		14,14 %					50,03 %
<b>b<sub>2</sub></b>	5 %		20 %	13,33 %		14,14 %					48 %
<b>b<sub>3</sub></b>	15 %		20 %	13,33 %		14,14 %					38 %
<b>b<sub>4</sub></b>	25 %		20 %	13,33 %		14,14 %					28 %
<b>b<sub>5</sub></b>	35 %		20 %	13,33 %		14,14 %					18 %
<b>c<sub>1</sub></b>	5 %			3,75 %			53,33 %		11,25 %		26,67 %
<b>c<sub>2</sub></b>	5 %			6,25 %			46,67 %		18,75 %		23,33 %
<b>c<sub>3</sub></b>	5 %			8,75 %			40 %		26,25 %		20 %
<b>c<sub>4</sub></b>	5 %			11,25 %			33,33 %		33,75 %		16,67 %
<b>c<sub>5</sub></b>	5 %			13,75 %			26,67 %		41,25 %		13,33 %
<b>d<sub>1</sub></b>	15 %			8,75 %			33,33 %		26,25 %		16,67 %
<b>d<sub>2</sub></b>	25 %			8,75 %			26,67 %		26,25 %		13,33 %
<b>d<sub>3</sub></b>	35 %			8,75 %			20 %		26,25 %		10 %
<b>d<sub>4</sub></b>	45 %			8,75 %			13,33 %		26,25 %		6,67 %
<b>d<sub>5</sub></b>	55 %			8,75 %			6,67 %		26,25 %		3,33 %
<b>e<sub>1</sub></b>	20 %		20 %	12 %				8 %			40 %
<b>e<sub>2</sub></b>	20 %		20 %	24 %				16 %			20 %
<b>e<sub>3</sub></b>	20 %		20 %	30 %				20 %			10 %
<b>e<sub>4</sub></b>	19 %		20 %	36 %				24 %			1 %
<b>f<sub>1</sub></b>	10 %		20 %	18 %				12 %			40 %
<b>f<sub>2</sub></b>	20 %		20 %	18 %				12 %			30 %
<b>f<sub>3</sub></b>	30 %		20 %	18 %				12 %			20 %
<b>f<sub>4</sub></b>	40 %		20 %	18 %				12 %			10 %
<b>f<sub>5</sub></b>	49 %		20 %	18 %				12 %			1 %

<b>g<sub>1</sub></b>	2 %	20 %	1,93 %	1,25 %	75 %
<b>g<sub>2</sub></b>	2 %	20 %	8 %	5 %	65 %
<b>g<sub>3</sub></b>	2 %	20 %	11,59 %	7,50 %	59 %
<b>g<sub>4</sub></b>	2 %	20 %	15 %	10 %	53 %
<b>h<sub>1</sub></b>	10 %	20 %	11,59 %	7,50 %	51 %
<b>h<sub>2</sub></b>	20 %	20 %	11,59 %	7,50 %	41 %
<b>h<sub>3</sub></b>	30 %	20 %	11,59 %	7,50 %	31 %
<b>h<sub>4</sub></b>	40 %	20 %	11,59 %	7,50 %	21 %
<b>h<sub>5</sub></b>	49 %	20 %	11,59 %	7,50 %	12 %

## 5.2 Polarisationsmikroskopie

Die Polarisationsmikroskopie kann als optisches Verfahren zur Erkennung anisotroper Eigenschaften in flüssigen und klaren Systemen genutzt werden. Anisotrope (geordnete) Strukturen erzeugen in diesem Zusammenhang durch Doppelbrechung des Lichts bunte Texturbilder, während isotrope (ungeordnete) Strukturen aufgrund fehlender Doppelbrechung im Betrachtungsfeld des Mikroskops schwarz erscheinen. Alle in Kapitel 5.1 vorgestellten Mikroemulsionsgebiete wurden unter Zuhilfenahme des Polarisationsmikroskops untersucht. Nur Systeme, die keine Doppelbrechung zeigten, wurden als ME charakterisiert und dem einphasigen, isotropen Phasengebiet der pseudoternären Diagramme zugeordnet.

## 5.3 Untersuchungen zur dynamischen Viskosität

Durch Messung der dynamischen Viskosität als Maß der inneren Reibung von ME ist es möglich, Einblicke in die Struktur und Stabilität der Systeme zu gewinnen. Die Viskosität wird hierbei sowohl von den verwendeten Bestandteilen als auch ihrer quantitativen Zusammensetzung beeinflusst. ME zeichnen sich durch eine niedrige Viskosität aus. Mittels dieser Eigenschaft lassen sich Unterschiede zu flüssigkristallinen Strukturen erkennen, die aufgrund ihrer Anisotropie höhere Viskositäten im Vergleich zu ME aufzeigen können. Während O/W- und W/O-ME in der Regel idealviskoses NEWTONsches Fließverhalten zeigen, können bikontinuierliche Systeme auch Nicht-NEWTONsche Fließeigenschaften aufweisen [147]. Durch Veränderung der verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Phasen ist es möglich, innerhalb von ME-Systemen den Phasenübergang von sphärischen Partikeln in einer monokontinuierlichen Phase zu bikontinuierlichen Phasen mit Viskositätsmessungen zu beobachten, denn dieser Übergang geht mit einem Viskositätsmaximum einher [78, 147].

In dieser Arbeit wurde zum einen der Einfluss der Art der lipophilen Phase auf die Viskosität von ME A untersucht sowie zum anderen anhand der in Kapitel 5.1 ermittelten Dilutionsreihen a bis h geprüft, ob es innerhalb dieser Reihen zu Veränderungen der Viskosität kommt, die auf den Charakter der einzelnen ME schließen lassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 und Abbildung 48 aufgeführt bzw. dargestellt.

### Mikroemulsionssystem A – Einfluss der lipophilen Phase

Der Einfluss der Art der Ölphase auf die dynamische Viskosität wurde bei **ME A** untersucht. Es wurde sich, im Rahmen der Phasengrenzen, für eine ME mit niedrigem Emulgator- und

Diolgehalt entschieden, um den Einfluss der lipophilen Phase besser beurteilen zu können. Die Zusammensetzung der untersuchten ME ist in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12 – Zusammensetzung der auf ihre dynamische Viskosität untersuchten Systeme (Angaben in % - m/m).**

	<i>Cetiol B</i>	<i>IPM</i>	<i>IPP</i>	<i>Tegosoft CI</i>	<i>PeG</i>	<i>Ph 90G</i>	<i>PI 2000</i>	<i>Wasser</i>
<b>ME A DV 1</b>	7,5 %				10 %	6,67 %	13,33 %	62,5 %
<b>ME A DV 2</b>		5 %			10 %	6,67 %	13,33 %	65 %
<b>ME A DV 3</b>			5 %		10 %	6,67 %	13,33 %	65 %
<b>ME A DV 4</b>				5 %	10 %	6,67 %	13,33 %	65 %

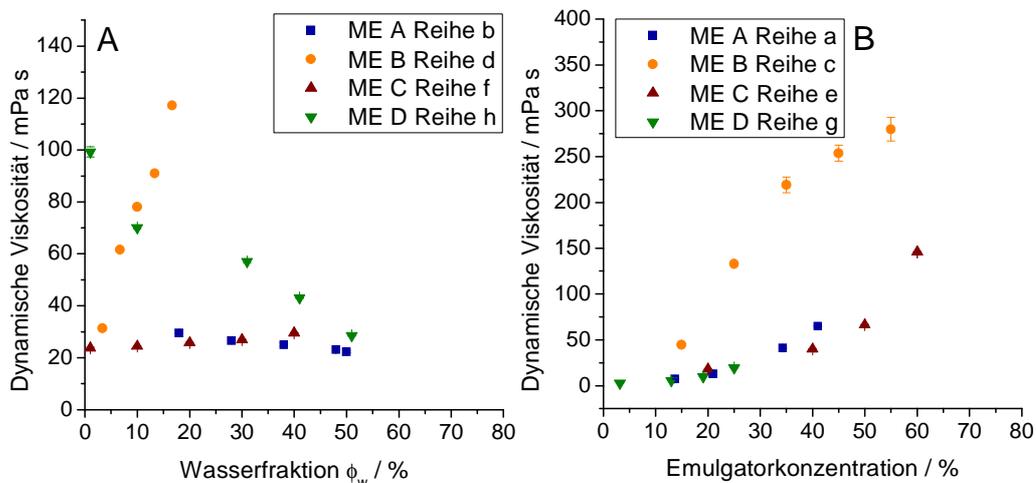
**Tabelle 13 – Dynamische Viskositäten der ME-Systeme A DV 1 bis 4 (Messung bei 13 verschiedenen Scherraten,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

	$\eta$ (mPa s)
<b>ME A DV 1</b>	$9,23 \pm 0,11$
<b>ME A DV 2</b>	$6,75 \pm 0,13$
<b>ME A DV 3</b>	$5,19 \pm 0,17$
<b>ME A DV 4</b>	$3,91 \pm 0,09$

Alle vier untersuchten ME resultierten in idealviskosem Fließverhalten und wiesen eine niedrige Viskosität auf (Tabelle 13). Wie aus den Daten erkennbar, hatte die Ölphase nur geringen Einfluss auf die dynamische Viskosität. Alle Systeme zeigten Viskositäten unter 10 mPa s. Die Ergebnisse bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie für vergleichbare ME, die in der Literatur zu finden sind [5]. Aufgrund ihres NEWTONschen Fließverhaltens und der niedrigen Viskosität kann bei den untersuchten Systemen vermutet werden, dass es sich um monokontinuierliche Systeme mit sphärischen Partikeln handelt.

#### Mikroemulsionssysteme A bis D – Viskositätsmessungen entlang der Dilutionsreihen

Der Einfluss des Wasser- sowie des Emulgatorgehaltes wurde durch Viskositätsmessungen entlang der Dilutionsreihen a bis h (vgl. Tabelle 11) untersucht. In den graphisch dargestellten Ergebnissen in Abbildung 48 ist ersichtlich, dass die dynamische Viskosität von ME stark von deren Zusammensetzung abhängig ist.



**Abbildung 48 – Dynamische Viskosität verschiedener Zusammensetzungen der ME A-D entlang der Dilutionsreihen a bis h) in Abhängigkeit der (A) Wasserkonzentration und (B) der Emulgatorkonzentration (Messung bei 13 verschiedenen Scherraten,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

Einfluss der Wasserphase:

Durch Erhöhung der Wasserphase konnten unterschiedliche Effekte beobachtet werden (Abbildung 48A). Während es bei den beiden phospholipidhaltigen ME B und C zu einem Anstieg der Viskosität kam, sank die Viskosität in den APG-haltigen ME A und ME D ab. **ME A** resultierte mit steigender Wasserfraktion in einer absinkenden dynamischen Viskosität. Hervorgerufen wird dieses Verhalten womöglich durch die gleichzeitige Absenkung der Cetiol B Konzentration, dessen Viskosität mit 5 mPa s - 7 mPa s [167] höher als die von Wasser mit 1 mPa s liegt. Da sich diese beiden Werte nicht erheblich voneinander unterscheiden, ist der Abfall der dynamischen Viskosität entlang Dilutionsreihe b nur schwach ausgeprägt. Vergleichbare Werte ähnlich zusammengesetzter Systeme wurden bereits von GRAF et al. publiziert [79].

**ME B** zeigte auch bei niedrigen Wasserkonzentrationen eine hohe Viskosität, vermutlich bedingt durch die hohe Konzentration an PrG im System und einen starken Anstieg der Viskosität durch Erhöhung der hydrophilen Phase. **ME C** erhöhte sich in seiner Viskosität nur leicht, obwohl die Cetiol B Konzentration entlang der Dilutionsreihe f absank und das niedrig viskosere Wasser in seinem Gehalt anstieg. Die leichte Erhöhung könnte auf das bereits erwähnte Maximum durch Ausbildung bikontinuierlicher Strukturen hinweisen, da sie nicht mit der Zusammensetzung der Einzelkomponenten und ihren Viskositäten zu erklären ist. In den ME-Systemen A, B und D war kein Maximum, das auf einen Phasenübergang von sphärischen Partikeln zu bikontinuierlichen Phasen hinweisen würde, erkennbar. Der Anstieg der Viskosität in vergleichbarem Ausmaß phospholipidhaltiger ME mit steigender Wasserfraktion ist bereits in der Literatur beschrieben [79]. Im System **ME D** kam es durch die steigende Wasserkonzentration ebenfalls zu einer Erniedrigung der Viskosität. Diese wurde vermutlich durch das korrespondierende Absinken der Fettsäurekonzentration verursacht. Diese Komponente weist mit 42 mPa s [114] eine höhere Viskosität als Wasser auf. Daten zur Viskosität rein APG-haltiger ME sind in der Literatur bislang nicht verfügbar.

Einfluss der Emulgatorphase:

Neben dem Einfluss der Wasserphase auf die Viskosität der ME wurde ebenfalls die Emulgatorkonzentration entlang der Dilutionsreihen a bis h untersucht (Abbildung 48B). Durch Erhöhung des Emulgatorgehaltes konnten bei allen ME ansteigende Viskositäten beobachtet werden, jedoch in unterschiedlichem Maße. **ME A** stieg in ihrer Viskosität erst leicht und ab einer Emulgatorkonzentration von 20 % stärker an. In dieser ME findet sich als Emulgator Plantacare 2000 UP, das bereits ca. 47 % Wasser enthält. Durch Erhöhung der Emulgatorkonzentration nimmt hier damit auch der Wasseranteil zu. Dieses eingebrachte Wasser kann zur Solubilisierung von Phospholipon 90G und zur Hydratisierung der Kopfgruppen beider Tenside verwendet werden, woraus sich zuerst ein nur kleiner Anstieg der dynamischen Viskosität ergibt. Ab höheren Emulgatorkonzentrationen scheint jedoch der Einfluss des enthaltenen wachsartigen Phospholipon 90G zu überwiegen. Dadurch kann ein stärkerer Anstieg beobachtet werden. Dies wird auch bei den ME B und C deutlich. **ME B und C** stiegen in ihrer Viskosität stark an. Herbeigeführt wird dies vermutlich durch den Zusatz des wachsartigen Phospholipon 90G und dessen Solubilisierung. Eine Rolle könnte auch der Hydratationszustand der Emulgatormole-

küle spielen. Durch die Erhöhung der Konzentration der Phospholipidmoleküle steigt gleichzeitig der gebundene Wasseranteil im Emulgatorfilm an. Dieser Anteil ist nicht mehr in der kontinuierlichen Phase frei verfügbar und kann somit nicht zu einer geringeren Viskosität beitragen. **ME D** wurde im Gegensatz zu den anderen ME kaum in seiner Viskosität beeinflusst. In dieser ME besteht das Emulgatorsystem zum Teil aus Plantacare 1200 UP, das bereits ca. 48,5 % Wasser enthält. Durch Erhöhung der Emulgatorkonzentration nimmt hier ebenfalls der Wasseranteil zu. Damit kann das durch Plantacare 1200 UP eingebrachte Wasser zur Solubilisierung von Tegocare CG90 und zur Hydratisierung der Kopfgruppen beider Tenside verwendet werden. In der kontinuierlichen Phase existiert damit ein höherer Anteil freien Wassers. Tegocare CG 90 scheint in diesem System nicht so großen Einfluss auf die Viskosität zu nehmen wie Phospholipon 90 G in den übrigen ME-Systemen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle in Tabelle 13 und Abbildung 48 untersuchten Systeme niedrige Viskositäten und idealviskoses Fließverhalten aufwiesen, besonders bei niedrigen und damit dermal verträglicheren Emulgatorkonzentrationen. Die Existenz sphärischer Partikel in allen ME-Systemen kann vermutet werden. ME C zeigte zudem auch Hinweise auf bikontinuierliche Strukturen entlang der Dilutionsreihe f.

## 5.4 Konduktivitätsmessungen

Leitfähigkeitsmessungen an ME kommen zur Anwendung, um Veränderungen in der Mikrostruktur innerhalb einer Dilutionsreihe zu untersuchen. Der Übergang von sphärischen Wasserstrukturen, dispergiert in eine lipophile Hauptphase zu bikontinuierlichen Systemen, ist mit einem starken Anstieg der Leitfähigkeit an der so genannten Perkolationschwelle verbunden [8, 24]. Denn durch die Erhöhung des Wassergehaltes innerhalb des Systems kommt es zu einer Verbindung der isolierten kolloidal verteilten Wassertröpfchen zu größeren miteinander verbundenen Wasserbereichen bis hin zu einer monokontinuierlichen Wasserphase, in der sphärische Ölbereiche enthalten sind. Dadurch entstehen Kanäle, die den in der wässrigen Phase enthaltenen Ionen ermöglichen, sich stärker zu bewegen [72]. Ersichtlich wird dieser Punkt in einem Diagramm, in dem die Leitfähigkeit  $\kappa$  gegen die Wasserfraktion  $\phi_w$  aufgetragen ist, durch einen Wendepunkt mit darauf folgendem steilem Anstieg innerhalb der gemessenen Leitfähigkeitswerte. Nach MEHTA und BALA kann die Perkolationschwelle auch mittels Darstellung der ersten Ableitung von  $\kappa$  ( $d \log \kappa / d\phi_w$ ) gegen die Wasserfraktion durch ein Maximum im Diagramm erkennbar sein [139].

Die Konduktivität wurde in dieser Arbeit an allen vier entwickelten ME-Systemen entlang der Dilutionsreihen a bis h (vgl. Tabelle 11) getestet. Auf einen Zusatz von Elektrolyten wurde verzichtet. Damit wurde vermieden, Änderungen im Phasenverhalten der einzelnen Systeme herbeizuführen [164]. Die Plantacare enthaltenden Systeme ME A und D besitzen darüber hinaus Ionenanteile, die vom Herstellungsprozess der Tenside herrühren. In diesem Zusammenhang seien die Katalyse bei der Acetalisierungsreaktion der enthaltenen Glucose mit den jeweiligen Fettalkoholen sowie die Bleiche in Gegenwart von Magnesium-Ionen erwähnt [86]. Da die experimentell bestimmte Leitfähigkeit von Plantacare 2000 UP und Plantacare 1200 UP bei  $6014 \pm 86,16 \mu\text{S cm}^{-1}$  bzw.  $8173,4 \pm 38,24 \mu\text{S cm}^{-1}$  lag, wurde die Leitfähigkeit der ME be-

dingt durch die Veränderung der Plantacare Konzentrationen entlang der Dilutionsreihen verfälscht. Aus diesem Grund wurde für ME A und D eine korrigierte Leitfähigkeit  $\kappa_a$  angegeben, die sich aus dem Quotienten der Konduktivität  $\kappa$  und der enthaltenen Tensidfraktion in %-m/m zusammensetzte [88]. Die Ergebnisse der Leitfähigkeitsuntersuchungen sind in Abbildung 49 dargestellt. Zudem wurde auch die etwas sensitivere Darstellungsweise von MEHTA und BALA [139] angewendet und ist in Abbildung 50 zu finden.

ME A zeigte in Abbildung 49 in beiden Dilutionsreihen keine Anzeichen für eine Perkolationschwelle. Es konnte kein starker Anstieg oder ein eindeutiger Wendepunkt in der Leitfähigkeit beobachtet werden. Die Darstellung in Abbildung 50 ließ jedoch ein Maximum in Reihe b erkennen. Da dieses aber nur leicht ausgeprägt war, ist ein eindeutiger Übergang zu einem bikontinuierlichen System nicht ersichtlich.

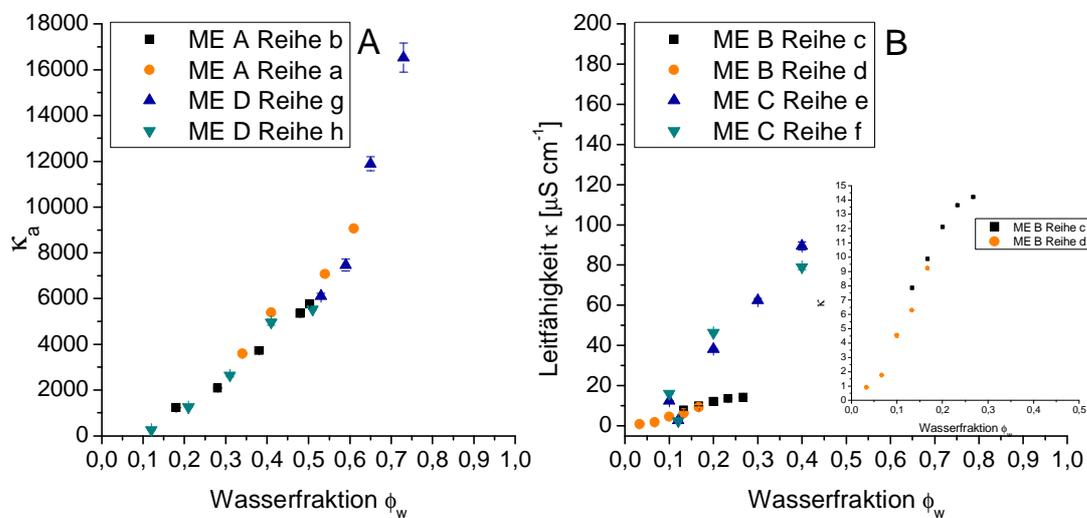


Abbildung 49 – (A) Korrigierte elektrische Leitfähigkeit  $\kappa_a$  der ME A und D gegen die Wasserfraktion  $\phi_w$  und (B) elektrische Leitfähigkeit  $\kappa$  der ME B und C gegen die Wasserfraktion  $\phi_w$  entlang der Dilutionsreihen a bis h; Inset: elektrische Leitfähigkeit der ME B entlang der Dilutionsreihen c und d gegen die Wasserfraktion  $\phi_w$  ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm SD$ ).

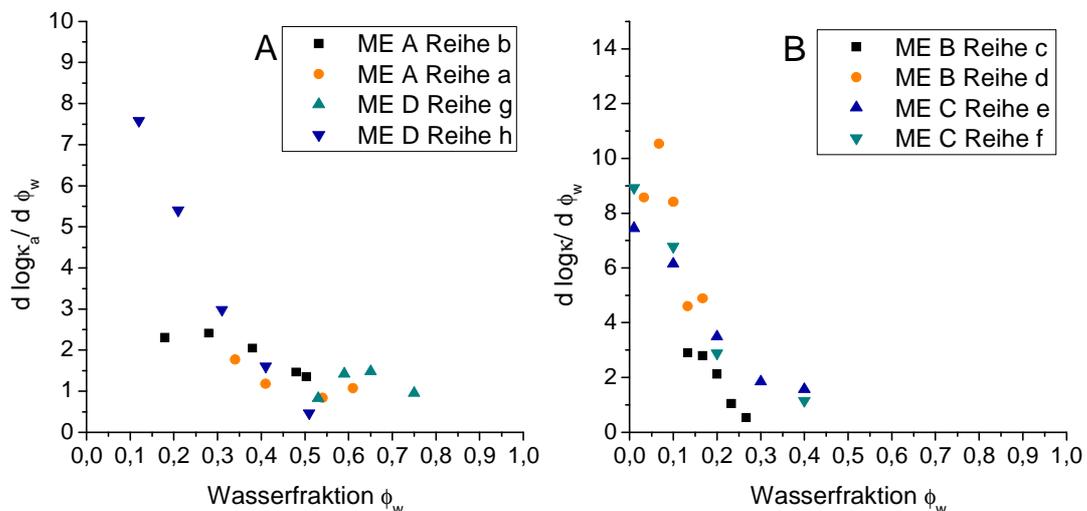


Abbildung 50 – Darstellung von (A)  $(d \log \kappa_a / d \phi_w)$  von ME A und D gegen die Wasserfraktion  $\phi_w$  sowie (B)  $(d \log \kappa / d \phi_w)$  von ME B und C gegen die Wasserfraktion  $\phi_w$  entlang der Dilutionsreihen a bis h.

**ME B**, die in Abbildung 49 zusätzlich im eingelegten Diagramm erkennbar ist, wies in Reihe d zwischen 3,33 % und 6,67 % Wasserkonzentration einen geringeren Anstieg als zwischen 6,67 % und 10 % auf. Dies könnte für eine Strukturänderung innerhalb des Systems sprechen. Unterstützt wird die Vermutung in der Darstellung der ME in Abbildung 50. Dort ließ sich ein eindeutiges Maximum bei einem Wasseranteil von 6,67 % erkennen. Nach MEHTA und BALA spricht dies für einen Übergang von isolierten Wassertropfchen zu bikontinuierlichen, quervernetzten Strukturen an der Perkolationsschwelle [139]. Die Konduktivität des ME-Systems bewegte sich generell in einem niedrigen Bereich unter  $15 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Vergleichbare Leitfähigkeitswerte wurden auch von PODLOGAR et al. erzielt [164]. In **ME-System C** konnten dagegen für beide Dilutionsreihen keine Strukturänderungen durch Messung der Leitfähigkeit erkannt werden. Es wurde weder ein stärkerer Anstieg in Abbildung 49 noch ein Maximum in Abbildung 50 identifiziert. Die elektrische Konduktivität stieg bei ME C mit erhöhter Wasserfraktion im Vergleich zu ME B steiler an. Die Gründe dafür sind nicht klar. Ein ähnlicher Anstieg wurde jedoch auch von ALANY et al. [8] und DJORDJEVIC et al. [56] beobachtet. Die Ergebnisse von **ME-System D** wiesen in Dilutionsreihe g einen steileren Anstieg der Konduktivität nach einer Wasserkonzentration von 48 % auf. Zusätzlich war auch in Abbildung 50 bei der gleichen Wasserkonzentration ein Maximum zu erkennen. An dieser Stelle scheint somit die Schwelle zur Ausbildung bikontinuierlicher Strukturen erreicht worden zu sein.

Alle untersuchten Systeme wiesen zusammenfassend mit steigender Wasserfraktion höhere Leitfähigkeitswerte auf. Dies spricht für die Ausbildung einer kontinuierlichen Wasserphase im System, die es ermöglicht eine Leitfähigkeit des Systems zu erzielen. Dadurch kann bei den ME, die auch zur Untersuchung von Penetrationsprofilen verwendet wurden, ein hydrophiler Charakter und die Existenz lipophiler sphärischer Partikel vermutet werden. Die ME-Systeme B und D ließen zusätzlich einen wahrscheinlichen Übergang zwischen mono- und bikontinuierlichen Systemen entlang der Dilutionsreihen erkennen.

## 5.5 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Verwendung der dynamischen Differenzkalorimetrie (in englisch *differential scanning calorimetry*) (DSC) ist dazu geeignet, analog zu den vorangegangenen Viskositäts- und Konduktivitätsmessungen, Hinweise auf die kolloidale Struktur von ME sowie auf Veränderungen entlang verschiedener Dilutionsreihen zu geben. Betrachtet wird bei diesen Untersuchungen der Zustand des enthaltenen Wassers. In der Kühlkurve repräsentieren die Größe und die Position von exothermen Peaks, die Wasser zugeordnet werden können, das Einfrieren des enthaltenen Wassers in der ME. Interagiert das Wasser im System stark mit den Emulgatormolekülen innerhalb der ME kommt es zu einem Einfrieren bei tieferen Temperaturen im Vergleich zu freiem, nicht gebundenem Wasser [164, 165].

In dieser Arbeit wurden DSC-Untersuchungen an allen vier Systemen ME A bis D entlang der in Kapitel 5.1 vorgestellten Dilutionsreihen a bis h durchgeführt. Betrachtet wurden nur die Kühlkurven, um Informationen über die exothermen Peaks des Wassers zu erhalten. Aus den Aufheizkurven ergaben sich keine neuen Hinweise über die Struktur der Systeme. Anhand der

exothermen Wasserpeaks der verschiedenen ME innerhalb der jeweiligen Dilutionsreihe sollte beurteilt werden, ob Strukturänderungen von O/W-Systemen, die freies Wasser enthalten, zu bikontinuierlichen ME mit stärker gebundenem Wasser erfolgten. Zur besseren Einschätzung wurden zusätzlich die lipophile Phase, das Emulgatorsystem dispergiert in PeG bzw. PrG, sowie Wasser untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 51 – 54 dargestellt.

#### Ergebnisse der reinen Komponenten

Die Messungen der lipophilen Phase, die in den ME A bis C aus Cetiol B und in ME D aus dem FSG bestand, ergaben keinen Peak für das FSG. Bei Cetiol B zeigte sich ein Maximum bei -58,1 °C. Bei dieser Temperatur konnte allerdings in keinem der untersuchten Systeme ein Peak beobachtet werden. Der exotherme Peak des Cetiol B in den ME verschiebt sich vermutlich zu tieferen Temperaturen. Ein ähnliches Verhalten ist bereits von GRAF et al. mit IPM beschrieben worden. Die Autoren führten diese Veränderung des Maximums auf Interaktionen des Öls mit den Emulgatormolekülen zurück [79]. Die Kühlkurve des Wassers resultierte in einem exothermen Peak mit einem Maximum bei -22,5 °C. Die Messungen der reinen Emulgatorsysteme, die in PrG oder PeG dispergiert vorlagen, ergaben bei allen vier Systemen keinen Peak (Abbildung 51 – 54). Die ermittelten DSC-Kurven der ME entlang der Dilutionsreihen a bis h hingegen zeigten einen exothermen Peak. Bei Betrachtung dieser Kurven wird deutlich, dass der abnehmende Wassergehalt innerhalb der Systeme zu einer Verschiebung des Peaks zu tieferen Temperaturen führte und entspricht damit dem Erstarren von unterkühltem Wasser [164]. Dieses Verhalten ging zusätzlich mit einer Abnahme der Peakfläche einher.

#### Mikroemulsionssystem A

Bei Betrachtung der DSC-Kurven von ME A (Abbildung 51) ist ersichtlich, dass bis zu einem Wassergehalt von 38 % ein eindeutiges exothermes Maximum auftrat. Die Systeme mit einem geringeren Wasseranteil zeigten lediglich leichte Abweichungen von der Basislinie und können nicht mehr als Peak gewertet werden. Obwohl auch das Emulgatorgemisch in PeG durch Plantacare 2000 UP mit seinem etwa 47 %igen Wasseranteil noch 22,3 % Wasser enthielt, zeigte sich auch hier kein Peak. Interpretationen von PODLOGAR et al. zu folge deuten exotherme Peaks, die zu tieferen Temperaturen auftreten als Wasser, jedoch eine scharfe Form aufweisen auf freies, wenig mit der Tensidschicht interagierendes Wasser hin. Kommt es zu einer starken Bindung des enthaltenen Wassers an die Kopfgruppen der Emulgatormoleküle, erscheint dieses in der DSC-Kurve als kleiner, nicht mehr scharf ausgeprägter Peak, der bei Temperaturen unter -30 °C auftritt [164, 165]. Möglicherweise war aber auch hier der Wasseranteil so stark gebunden, dass es sich in den ME bzw. der Emulgatormischung um *non freezing water* handelte, das nicht mit DSC detektierbar ist [205]. Ein weiterer Grund könnte der Zusatz der verschiedenen Diöle sein, die zu einer Gefrierpunktniedrigung des Wassers führen können [31, 88].

Bei ME A kann entlang der Dilutionsreihen a und b davon ausgegangen werden, dass ab einem Wassergehalt von 48 % in Reihe b freies Wasser existierte. In Dilutionsreihe a wurde dieses ab einem Gehalt von 54 % beobachtet. Weniger Wasser führte innerhalb beider Reihen zu undefinierten flachen Peaks und spricht für gebundenes Wasser. Es könnte dabei zu einer Struktur-

umwandlung von O/W-ME zu bikontinuierlichen Systemen gekommen sein. Cetiol B war, obwohl es als Reinsubstanz einen Peak bei  $-58,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ergab, in keinem System identifizierbar. Dies liegt womöglich daran, dass der reine Peak sehr nah an der Grenze des Temperaturmessbereichs lag. Da es auch zu Verschiebungen des exothermen Öl-Maximums durch Einbindung in ME kommen kann [79], wurden Peaks bei tieferen Temperaturen nicht mehr detektiert.

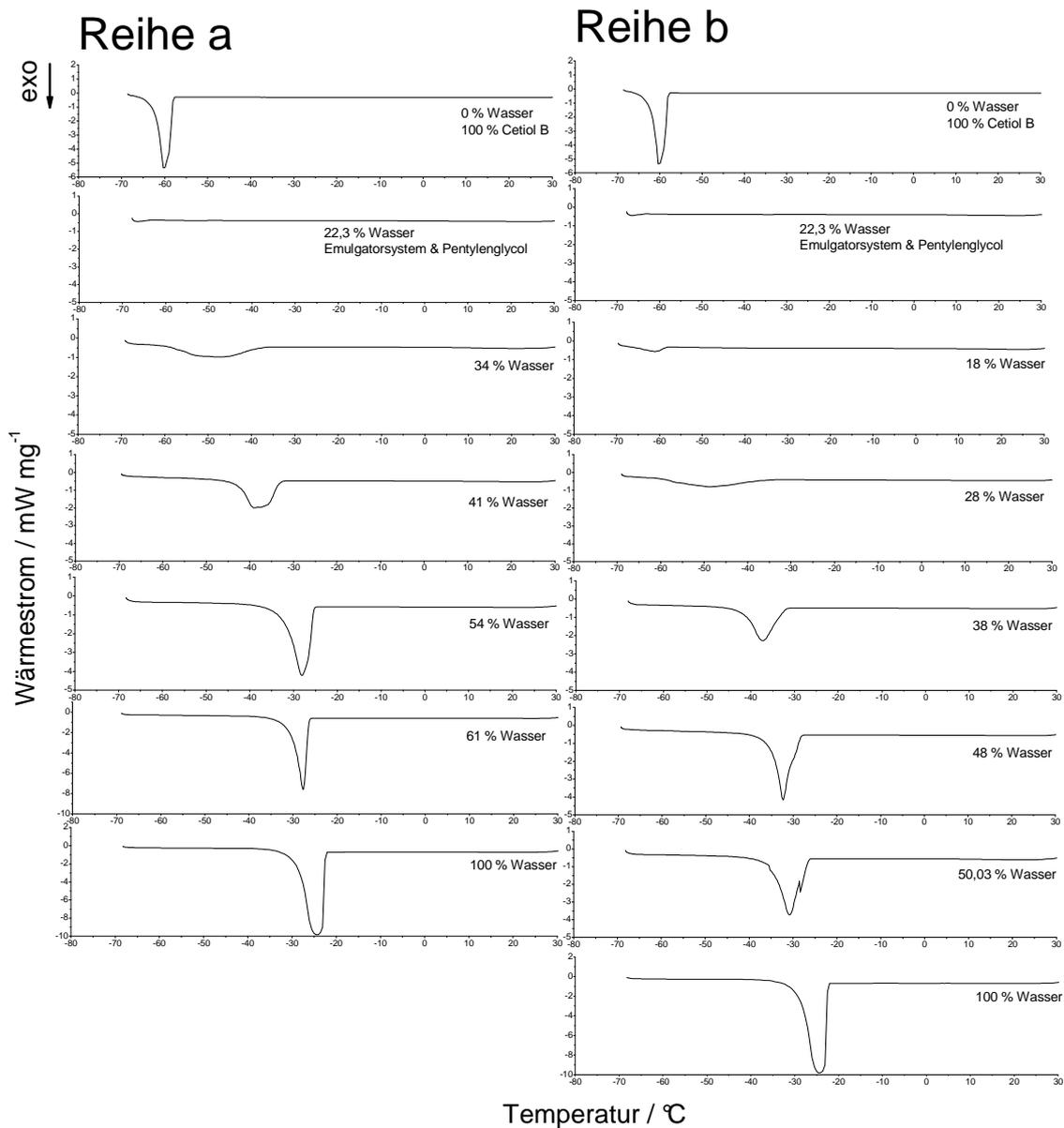


Abbildung 51 – DSC-Kühlkurven von ME A entlang der Dilutionsreihen a und b sowie von Wasser, Cetiol B und des Emulgatorsystems in PeG.

### Mikroemulsionssystem B

Die Ergebnisse von ME B (Abbildung 52) ließen in keinem System entlang der Dilutionsreihen c und d einen scharfen Peak erkennen. Die geringen Wasseranteile waren vermutlich stark in die Hydratation der Kopfgruppen der Emulgatormoleküle einbezogen. Durch diese Interaktionen kam es zu keinem eindeutigen exothermen Maximum. Gleichzeitig fungierte PrG wie oben erwähnt als Gefrierschutz. Aufgrund des hohen PrG-Gehaltes innerhalb des ME-Systems kam diese Eigenschaft hier vermutlich sehr stark zum Tragen.

Ausnahmen bildeten die Kühlkurven in Reihe d mit einem Wassergehalt von 6,67 % und 3,33 %. Dort zeigte sich jeweils bei sehr tiefen Temperaturen unter  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  ein Maximum. Vermutlich handelt es sich bei diesen Peaks der beiden Systeme jedoch um Cetiol B, das als reine Substanz bei  $-58,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ein Maximum aufwies. Rückschlüsse über die Struktur von ME B sind wegen des hohen dominierenden PrG-Gehaltes an dieser Stelle also nicht zu treffen.

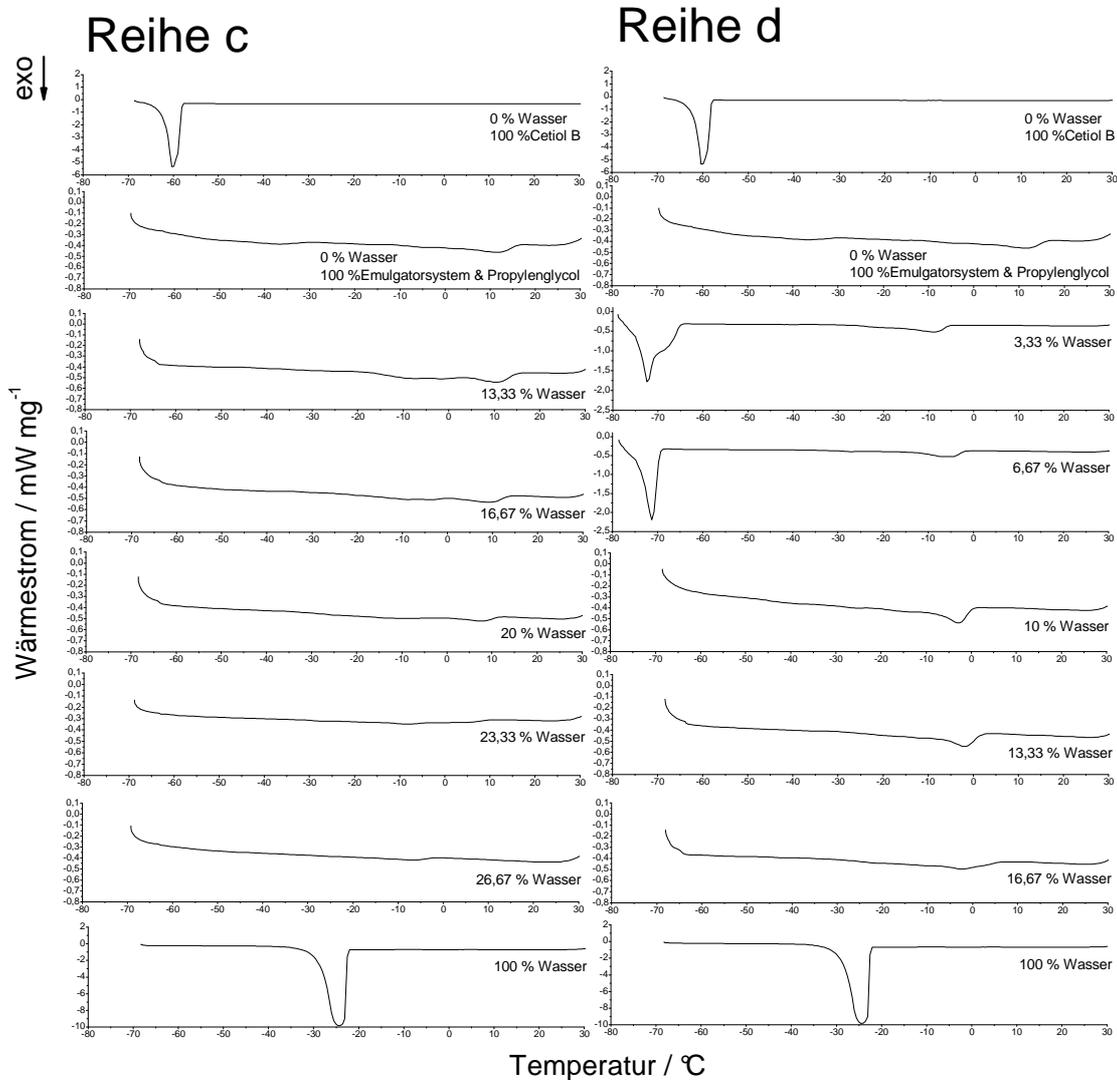


Abbildung 52 – DSC-Kühlkurven von ME B entlang der Dilutionsreihen c und d sowie von Wasser, Cetiol B und des Emulgatorsystems in PrG.

### Mikroemulsionssystem C

Die Untersuchungen an ME C (Abbildung 53) entlang der Dilutionsreihen e und f resultierten in beiden Reihen in einem scharfen Peak bis zu einem Wasseranteil von 40 %, der auf die Existenz freien Wassers hinweist. Damit ist in diesen Systemen freies Wasser vorhanden, was auf O/W-ME hindeutet. Ab einem Wassergehalt von 30 % lag gebundenes Wasser vor, das sich in flachen Peaks äußerte. In den DSC-Kühlkurven mit einem Wassergehalt von 10 % oder weniger war kein Wassermaximum mehr zu sehen. In diesen Systemen kam es vermutlich zu einem Einfrieren zu tieferen Temperaturen außerhalb des Messbereichs oder es resultierten nicht mehr erkennbare kleine Peaks. Cetiol B erzeugt in allen ME kein exothermes Maximum.

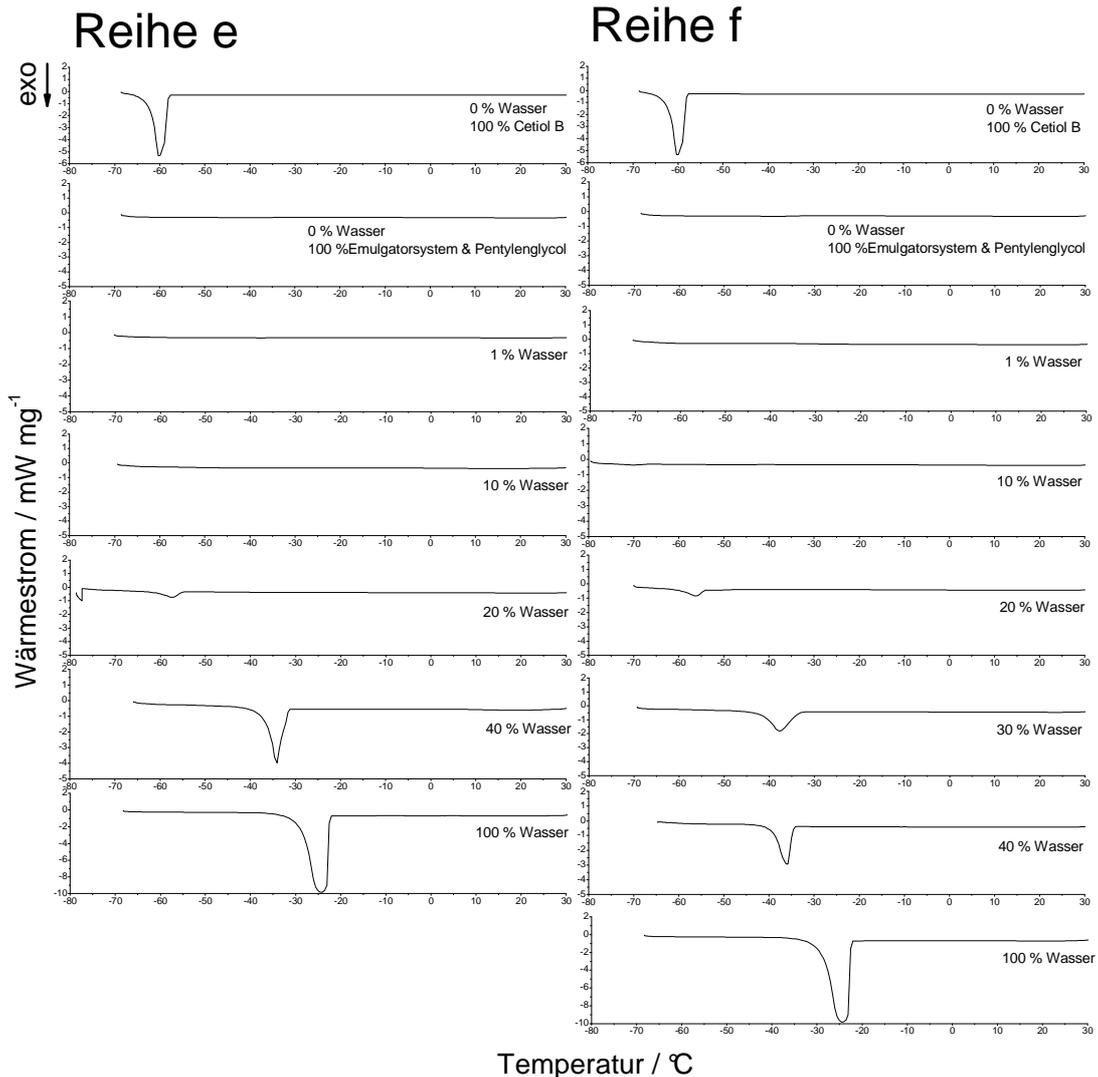


Abbildung 53 – DSC-Kühlkurven von ME C entlang der Dilutionsreihen e und f sowie von Wasser, Cetiol B und des Emulgatorsystems in PeG.

### Mikroemulsionssystem D

Bei Betrachtung der Kühlkurven von ME D ist zu sehen, dass scharfe Peaks bei ME D entlang Reihe h ab 41 % und entlang Reihe g ab 53 % Wasserkonzentration zu erkennen waren. In den Systemen mit einer Wasserkonzentration von 20 % war ein flacher Peak zu erkennen. Dies weist an dieser Stelle auf eine Strukturumwandlung von O/W-ME zu bikontinuierlichen Systemen hin. Ab 10 % Wasser oder weniger war kein Einfrieren von Wasser mehr ersichtlich. Auch bei dem Emulgatorsystem mit einem Wassergehalt von 18,2 % bedingt durch Plantacare 1200 UP konnte kein exothermer Peak detektiert werden. Als Gründe dafür sind, wie bereits bei ME A aufgeführt, die starke Interaktion des enthaltenen Wassers mit der Tensidschicht sowie der Gefrierschutz des enthaltenen Diols zu nennen. Das FSG zeigte weder in den Systemen noch alleine exotherme Maxima.

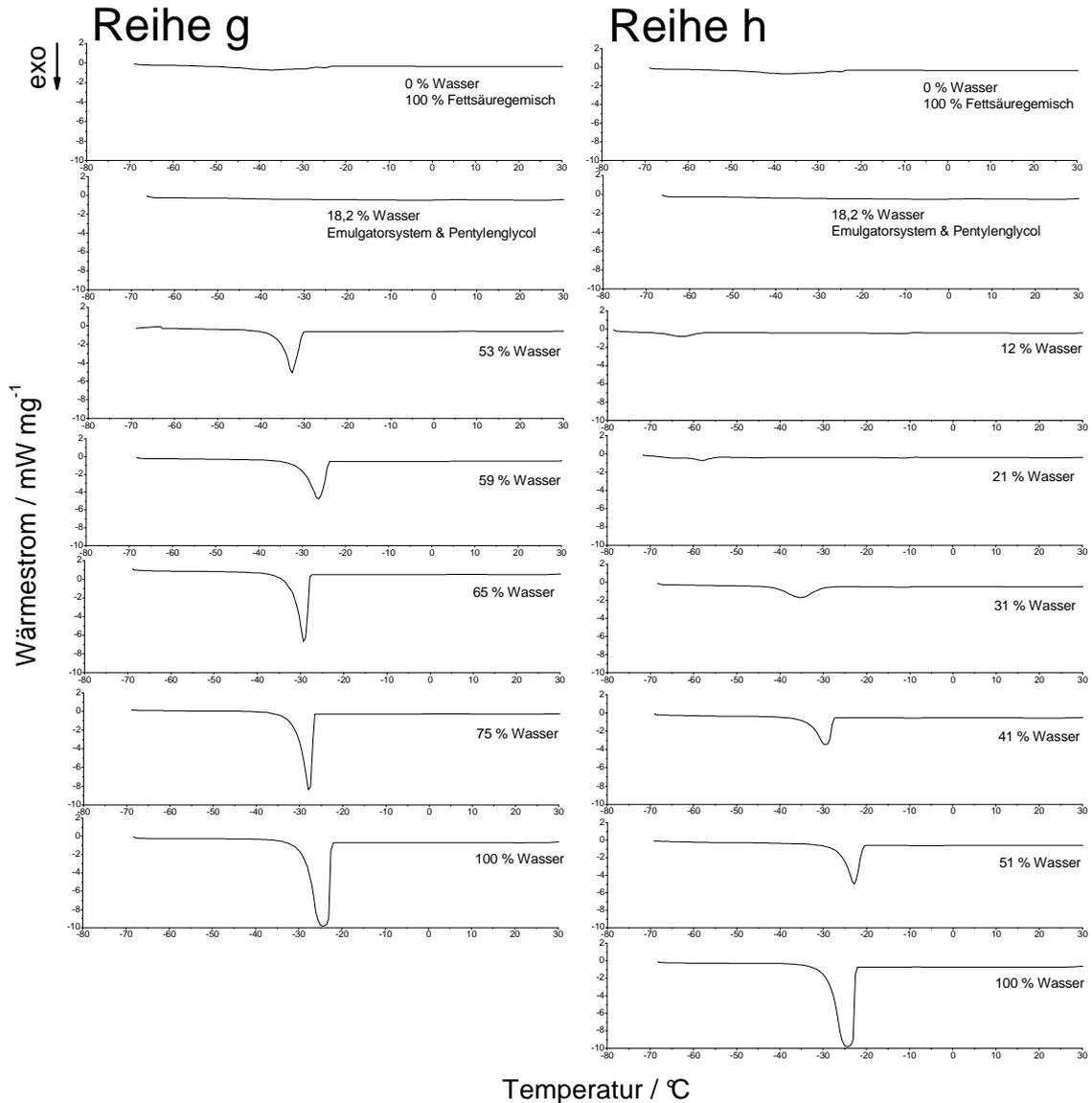


Abbildung 54 – DSC-Kühlkurven von ME D entlang der Dilutionsreihen g und h sowie von Wasser, dem FSG und des Emulgatorsystems in PeG.

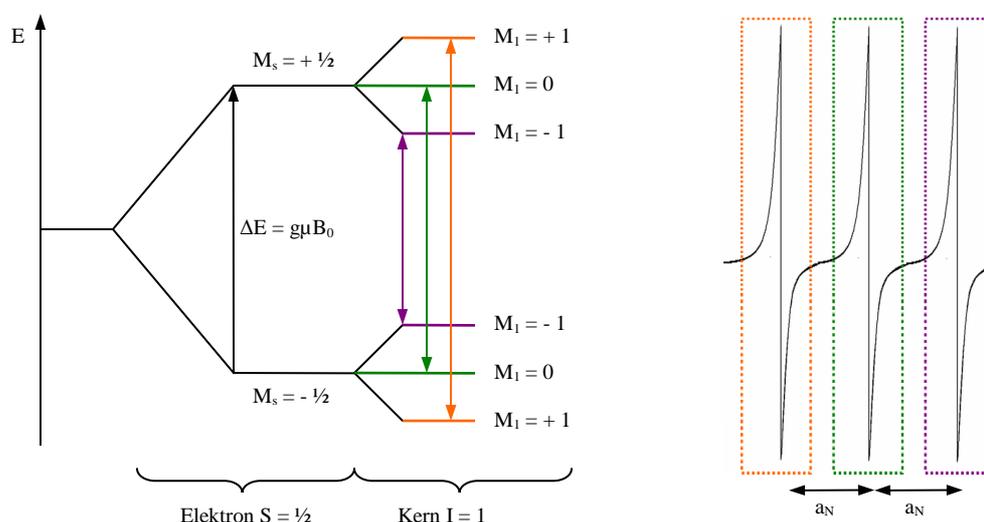
#### Zusammenfassung der DSC-Ergebnisse

Durch Anwendung der dynamischen Differenzkalorimetrie konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass in den ME-Systemen A, C und D innerhalb der verschiedenen Dilutionsreihen bei höheren Wasserkonzentrationen freies Wasser existierte, das vermutlich in der äußeren Phase der ME vorlag. Dies weist auf die Mikrostruktur von O/W-ME hin, die durch die kolloidale Verteilung lipophiler Ölanteile in eine äußere hydrophile Phase charakterisiert sind. In Systemen mit geringem Wassergehalt wurde in den untersuchten Systemen gebundenes, vermutlich in die Hydratisierung der Kopfgruppen der Emulgatormoleküle involviertes, Wasser beobachtet. Da in diesen ME zu wenig Wasser zur freien Verteilung in die äußere Phase vorhanden war, kam es wahrscheinlich zu einer Umwandlung der Mikrostruktur in bikontinuierliche Systeme. ME B zeigte in den DSC-Kurven lediglich gebundenes Wasser. Aufgrund der hohen dominierenden PrG-Konzentration in den ME konnten keine Schlüsse auf die Mikrostruktur innerhalb beider Reihen gezogen werden.

## 5.6 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die Anwendung der ESR-Spektroskopie, auch *electron paramagnetic resonance* (EPR) genannt, stellt eine nicht-invasive Methode dar, die durch die Detektion paramagnetischer Substanzen auf strukturelle und dynamische Gegebenheiten in Systemen schließen lässt. Hierbei erfolgt die Absorption elektromagnetischer Strahlung im Mikrowellenbereich durch die ungepaarten Elektronen der paramagnetischen Verbindungen in Anwesenheit eines magnetischen Feldes.

Ohne ein angelegtes Magnetfeld kommt es zur Rotation der Elektronenspins um die eigene Achse und damit zur Verteilung in alle Raumrichtungen. Wird nun ein externes magnetisches Feld  $B_0$  angelegt, kommt es zur Ausrichtung der mit dem Elektronenspin verbundenen magnetischen Momente in Richtung des äußeren Magnetfeldes oder entgegengesetzt. Diese entsprechen zwei verschiedenen Energieniveaus. Die ungepaarten Elektronen können sich dabei einmal in einem angeregten Zustand antiparallel zum Magnetfeld (Magnetquantenzahl ( $M_s$ )  $+1/2$ ) oder in einem Grundzustand parallel ( $M_s$   $-1/2$ ) ausrichten (Abbildung 55). Durch die Einstrahlung elektromagnetischer Energie, die der Differenz zwischen den beiden Spinzuständen entspricht (Resonanzbedingung), können unter Absorption von Strahlung Übergänge zwischen diesen beiden Zuständen induziert werden. Die erste Ableitung der detektierten Mikrowellenabsorption ergibt dann das ESR-Signal. Durchgeführt werden die Messungen meist in der *continuous wave*-Betriebsart. Dabei wird die Wellenlänge der Mikrowellenstrahlung konstant gehalten und das Magnetfeld kontinuierlich variiert. Bei einem X-Band Spektrometer, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, liegt die Mikrowellenstrahlung bei etwa 9 GHz [101, 137].



**Abbildung 55 – Aufspaltung der Energieniveaus nach Anlegen eines homogenen Magnetfelds  $B_0$  (links) und die resultierende Aufspaltung des ESR-Signals bei Nitroxylradikalen (rechts).**

Aufgrund der Möglichkeit, mittels ESR-Spektroskopie nicht-invasive *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen an nicht-transparenten Proben durchzuführen, findet sie auch in Medizin und Pharmazie Einsatz. Da pharmazeutische Formulierungen nur selten paramagnetische Substanzen, die sich durch das Vorhandensein nicht gepaarter Elektronen auszeichnen, enthalten, ist das Einbringen von Reporter-molekülen, sogenannter Spinsonden unerlässlich, um ESR-

Signale erhalten zu können. Am häufigsten verwendet werden zu diesem Zweck stabile organische Nitroxylradikale. Die ESR-Spektren der Nitroxylradikale liegen in Form eines Linientrip-  
 letts vor (Abbildung 55). Diese Hyperfeinaufspaltung rührt von der Wechselwirkung des  
 Elektronenspins des ungepaarten Elektrons mit dem Kernspin des  $^{14}\text{N}$  Stickstoffs her. Da der  
 Kernspin (Kernspinquantenzahl  $I = 1$ ) wie auch der Elektronenspin gequantelt ist, kann es auf-  
 grund der Existenz dreier Energieniveaus zu drei verschiedenen Übergängen kommen, die den  
 drei Hyperfeinlinien im ESR-Spektrum entsprechen (Abbildung 55). Die ESR-Spektroskopie  
 erlaubt, unter Verwendung der Spinsonden Aussagen über ihre Mikroumgebung in Arzneiformen  
 zu treffen. Dazu gehören unter anderem die Viskosität, Polarität sowie der pH-Wert. Gleichzeit-  
 ig ist es möglich, auch Liberationsprozesse zu verfolgen [137, 183].

Die erste wichtige Information, über die das ESR-Spektrum Auskunft geben kann, ist die **Mikroviskosität** in der Umgebung der Spinsonde. Diese geht aus der Linienbreite und der Signal-  
 amplitude des Spektrums hervor. Da die Viskosität die Beweglichkeit der Spinsonde beein-  
 flusst, kann als Parameter die Rotationskorrelationszeit  $\tau$  herangezogen werden. Mit ihrer Hilfe  
 wird der durchschnittliche Zeitraum beschrieben, in dem sich die Spinsonde um ein rad dreht.  
 Handelt es sich um ein niedrigviskoses Medium, kommt es zu einer sehr schnellen Rotation  
 des Radikals, wobei die magnetische Anisotropie der Spinsonde ausgemittelt wird. Die dazu-  
 gehörigen ESR-Spektren weisen drei Hyperfeinlinien gleicher Breite und gleicher Signalampli-  
 tude auf. Befindet sich das Reporter-molekül in einem höherviskosen Medium, bewegt sich die  
 Sonde langsamer. Es kommt zu einer Verbreiterung der Linien und zu einer abnehmenden  
 Signalamplitude innerhalb der Spektren [102, 137]. In dieser Arbeit wurden nur isotrope Um-  
 orientierungen berücksichtigt.

Neben der Mikroviskosität können ESR-Messungen auch Aufschluss zur **Mikropolarität** der  
 Umgebung der Spinsonde geben. Charakterisiert wird sie über die Hyperfeinkopplungskon-  
 stante  $a_N$ , die die Distanz zwischen den einzelnen Linien im Spektrum angibt. In polaren Um-  
 gebungen befindet sich das ungepaarte Elektron der Spinsonde bevorzugt am Sauerstoff und  
 bildet dadurch eine Zwitterionenstruktur (Abbildung 56). Es resultieren höhere Abstände zwi-  
 schen den Hyperfeinlinien und somit im Gegensatz zu apolaren Medien, wo es zur bevorzug-  
 ten Bildung der zweiten mesomeren Grenzform (Abbildung 56) kommt, zu höheren Hyper-  
 feinkopplungskonstanten.

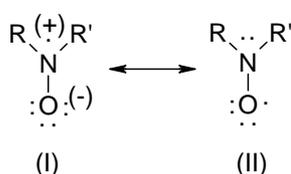


Abbildung 56 – Mesomere Grenzformen der Nitroxylgruppe von Nitroxylradikalen

Möchte man die **Konzentration** der Spinsonde, die proportional zum ESR-Signal ist, ermit-  
 teln, ist dies durch Einbringen eines internen Standards möglich [137].

Aufgrund der dynamischen Mikrostruktur von ME ist die ESR-Spektroskopie zum einen eine  
 gut geeignete Methode, um nicht-invasive Einblicke in die Systeme zu erhalten. Zum anderen  
 stellt sich die Simulation sowie Interpretation der erhaltenen Spektren als sehr anspruchsvoll

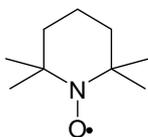
dar. In der vorliegenden Arbeit wurden deswegen ESR-Untersuchungen an nur einem ME-System durchgeführt. Zum Einsatz kam dazu ME A. Es wurden drei verschiedene ME dieses Systems mit unterschiedlicher Emulgatorkonzentration getestet. Dies diente dazu, den Einfluss des Tensidgehaltes auf die Mikrostruktur der ME oder Lokalisation der eingebrachten Reporter-moleküle zu ermitteln. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 14 aufgeführt. Zur besseren Interpretation der Ergebnisse wurden zusätzlich die Einzelkomponenten sowie das in PeG dispergiert vorliegende Emulgatorsystem untersucht. Hierbei wurde darauf geachtet, die gleichen Verhältnisse der eingesetzten Emulgatoren in Bezug zu PeG wie innerhalb der untersuchten ME zu verwenden (vgl. Tabelle 14). Die Messung des reinen Emulgatorsystems war aufgrund des festen Aggregatzustands von Ph 90G nicht möglich.

**Tabelle 14 – Zusammensetzung der mittels ESR-Spektroskopie untersuchten Systeme (Angaben in % - m/m).**

	<i>IPP</i>	<i>PeG</i>	<i>Ph 90G</i>	<i>Pl 2000</i>	<i>Wasser</i>
ME A ESR1	5 %	10 %	5 %	10 %	70 %
ME A ESR2	5 %	10 %	8,33 %	16,67 %	60 %
ME A ESR3	7,5 %	10 %	11,67 %	23,33 %	47,5 %
E-System/PeG (1,5:1)		40 %	20 %	40 %	
E-System/PeG (2,5:1)		28,6 %	23,8 %	47,6 %	
E-System/PeG (3,5:1)		22,22 %	25,93 %	51,85 %	

In die ausgewählten Systeme wurden jeweils drei verschiedene Spinsonden (TEMPO, HD-PMI und 16-DSA) eingebracht. Diese Vorgehensweise brachte den Vorteil, Moleküle unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften auf ihre Umgebung im System untersuchen zu können und damit in größerem Maße auf die Mikrostruktur des Systems sowie das Verhalten verschiedener inkorporierbarer Arzneistoffe Rückschlüsse treffen zu können. Die Ergebnisse der erhaltenen Hyperfeinkopplungskonstanten sowie Rotationskorrelationszeiten der untersuchten ME und ihren Reinkomponenten sind in Abbildung 60 und Abbildung 61 dargestellt.

Die Spinsonde TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl) (Abbildung 57) besitzt eine Molmasse von  $156,2 \text{ g mol}^{-1}$ . Mit einem Verteilungskoeffizienten von 63, was einem  $\log P$  von 1,8 entspricht, handelt es sich um ein leicht lipophiles Molekül [118].



**Abbildung 57 – Strukturformel von TEMPO**

HD-PMI (2-Heptadecyl-2,3,4,5,5-pentamethylimidazolidine-1-oxyl) ist mit seiner Molmasse von  $395,5 \text{ g mol}^{-1}$  mehr als doppelt so schwer wie TEMPO. Auch der  $\log P$ , der nach RÜBE größer 6 sein muss [183], unterscheidet sich stark von TEMPO. HD-PMI ist folglich ein stark lipophiles Molekül.

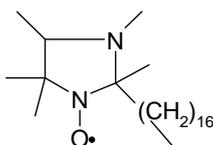


Abbildung 58 – Strukturformel von HD-PMI

16-DSA (16-Doxylstearinsäure) (Abbildung 59) besitzt aufgrund ihrer hydrophilen Kopfgruppe (-COOH) und ihrem lipophilen Rest (C<sub>18</sub>) einen amphiphilen Charakter. Bringt man sie in Mizellare Systeme ein, kommt es zur Einlagerung des Reporter-moleküls in die emulgatorreichen Grenzschichten [19]. Die Molmasse liegt bei dieser Spinsonde bei 384,6 g mol<sup>-1</sup>. Der Verteilungskoeffizient bewegt sich mit einem log P von 4,49 zwischen der Lipophilie von TEMPO und HD-PMI [46].

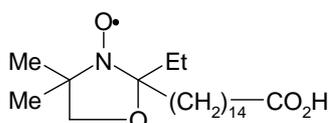


Abbildung 59 – Strukturformel von 16-DSA

Bei Betrachtung der durch Simulation der ESR-Spektren ermittelten Hyperfeinkopplungskonstanten und Rotationskorrelationszeiten wird deutlich, dass alle drei untersuchten ME Gemeinsamkeiten zeigten. Bei Inkorporierung jeder Spinsonde wiesen die Systeme zwei verschiedene Spezies (Abbildung 60 und Abbildung 61) auf. Dies bedeutet, dass die Spinsonden innerhalb der ME jeweils in zwei verschiedenen Umgebungen verteilt vorlagen. Ein Verteilungsraum wird dabei als Spezies bezeichnet. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich um Systeme mit unterschiedlichen Phasen handelte und somit der Definition von ME entsprechen.

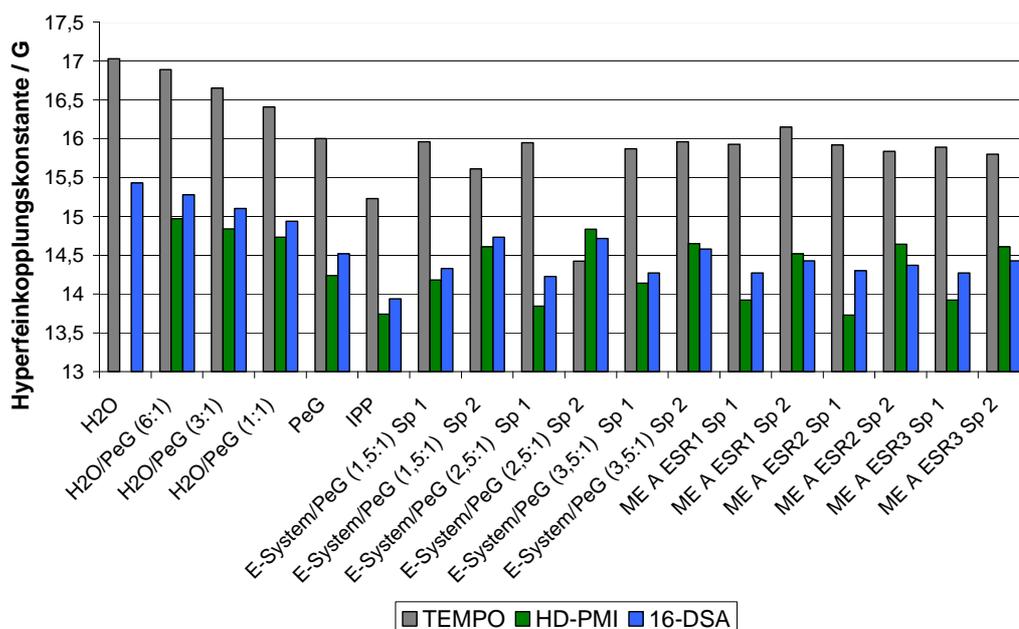


Abbildung 60 – Hyperfeinkopplungskonstanten der Spinsonden TEMPO, HD-PMI und 16-DSA in verschiedenen Medien (Sp 1 = Spezies 1, Sp 2 = Spezies 2) (Die Messung von HD-PMI in Wasser war aus Gründen der Löslichkeit nicht möglich).

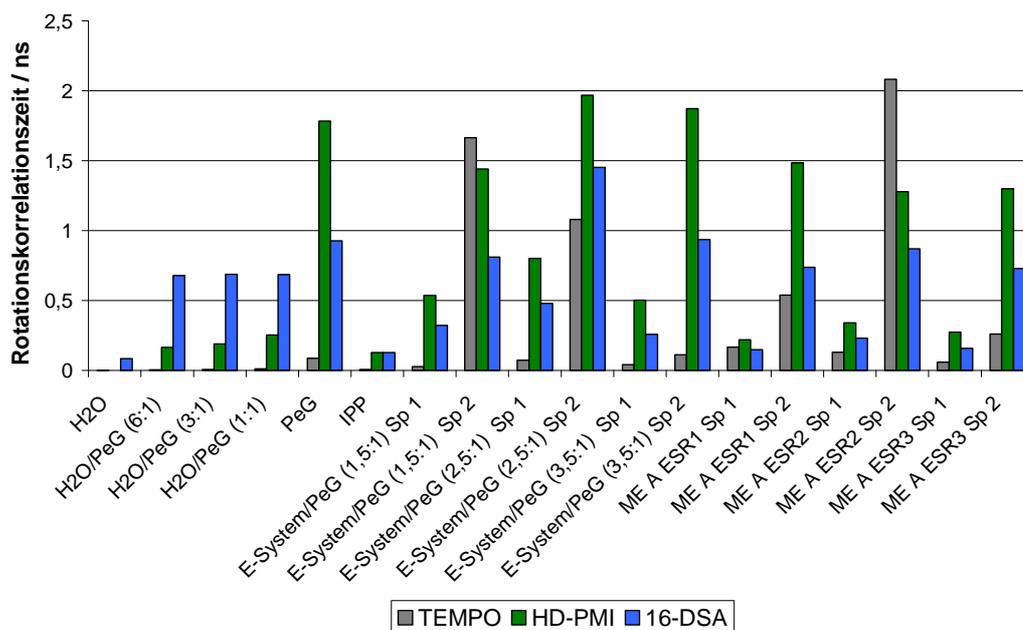


Abbildung 61 – Rotationskorrelationszeiten der Spinsonden TEMPO, HD-PMI und 16-DSA in verschiedenen Medien (Sp 1 = Spezies 1, Sp 2 = Spezies 2) (Die Messung von HD-PMI in Wasser war aus Gründen der Löslichkeit nicht möglich).

Die Messungen der verschiedenen ME A ESR 1 bis 3 ergaben für die eingesetzten Spinsonden keine starken Veränderungen ihrer  $a_N$  und der  $\tau$  (Abbildung 60 und Abbildung 61). Die Emulgatorkonzentration in den ausgewählten ME hatte damit keinen Einfluss auf den Aufenthaltsort der unterschiedlichen Spinsonden.

Neben den Gemeinsamkeiten der ausgewählten ME-Systeme ergaben sich jedoch Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Spinsonden TEMPO, HD-PMI und 16-DSA. Die vermuteten Lokalisationen der drei Sonden innerhalb der Systeme werden im Folgenden näher betrachtet:

#### Aufenthaltsort von TEMPO

Bei Betrachtung der ermittelten Hyperfeinkopplungskonstanten ( $a_N$ ) für TEMPO in den reinen Komponenten wird deutlich, dass es bei steigender Polarität der gemessenen Substanzen ebenfalls zu einem Anstieg der  $a_N$  kam. Während das polarste Medium Wasser eine  $a_N$  von 17,03 G ergab, konnte das lipophilste Medium IPP nur 15,23 G erreichen. Deutlich wird der korrespondierende Anstieg der  $a_N$  mit erhöhter Polarität besonders in der Darstellung der verschiedenen Wasser/PeG Mischungen. Da reines PeG eine unpolare Umgebung als Wasser darstellt, erhöhte sich mit steigendem Wassergehalt in der Mischung gleichzeitig die  $a_N$ . Die untersuchten Emulgatormischungen ergaben jeweils zwei Spezies. Man kann davon ausgehen, dass eine Spezies das Emulgatorsystem repräsentiert und sich die Spinsonde im zweiten Verteilungsraum in PeG befindet. Vergleicht man nun die Hyperfeinkopplungskonstanten aller drei ME mit den Werten der einzelnen Komponenten lässt sich vermuten, dass sich die Spinsonde mit Werten von 15,8 G bis 16,15 G in einer deutlich polaren Umgebung als der lipophilen Phase IPP einlagerte. Die Verteilung von TEMPO in die reine Ölphase innerhalb der ME war somit nicht gegeben. Der Vergleich der  $a_N$  von Wasser und den Wasser/PeG Mischungen (16,41 G, 16,65 G und 16,89 G) mit den niedrigeren Werten der ME zeigte jedoch, dass sich das Repor-

termolekül auch nicht in einer wasserreichen Umgebung aufhalten konnte. Aufgrund der Eigenschaft kurzkettiger Alkohole, Bulkeffekte auszuüben, die Einfluss auf die Polarität von Kompartimenten nehmen können, ist es wahrscheinlich, dass sich PeG innerhalb der ME nicht nur in die wässrige Phase verteilte, sondern auch Mischungen mit IPP bildete. Die  $a_N$  einer solchen Mischung müsste dann niedriger als die von PeG, aber höher als die von IPP und dadurch im Bereich der gemessenen Werte der ME liegen. Damit konnte sich TEMPO laut der Hyperfeinkopplungskonstanten in eine IPP- und PeG-reiche Phase einlagern. Die Spinsonde befand sich damit wahrscheinlich innerhalb der kolloidalen Phase. Als zweite Möglichkeit könnte es beim Vergleich der Systeme mit den jeweiligen Emulgator/PeG-Mischungen zur Einlagerung in die Grenzschicht zwischen den Emulgatormolekülen mit einem zusätzlichen Anteil an PeG gekommen sein. Beide Spezies aller drei ME ergaben ähnliche Werte für die  $a_N$ . Ein Unterschied in der Mikropolarität ist in beiden Spezies damit nicht zu erkennen.

Bezieht man allerdings die Rotationskorrelationszeiten der ME in die Vermutungen mit ein, zeigen sich Unterschiede in der Beweglichkeit beider Spezies. Spezies 1 war bei allen drei ME beweglicher als Spezies 2. Dieses spiegelte sich in einer kleineren  $\tau$  wider. Vergleicht man die Werte von Spezies 1 der ME-Systeme (0,167 ns, 0,131 ns und 0,06 ns) mit den Daten der reinen Komponenten, war eine Lokalisation der Spinsonde in einer PeG-reichen Umgebung möglich, da PeG mit einer Rotationskorrelationszeit von 0,087 ns den Werten der ME am nächsten kam. Dies stützt die Vermutung, dass sich TEMPO in eine Mischung aus IPP und PeG verteilte. Die höheren Werte im Vergleich zu IPP (0,007 ns) und reinem PeG sind damit erklärbar, dass es sich bei dieser Mischung um eine innere Phase handeln muss, deren Begrenzung durch die Emulgatorschicht die Beweglichkeit des Reportertermoleküls behindert. Die zweite Spezies ist mit Blick auf die hohe  $\tau$  in ihrer Beweglichkeit eindeutig behindert. Vergleicht man die Zeiten mit den Daten der reinen Komponenten lassen sie sich mit denen des Emulgatorsystems (1,665 ns, 1,08 ns und 0,114 ns) vereinbaren. TEMPO lagerte sich, wie schon nach Ermittlung der  $a_N$  vermutet, zwischen die Tensidmoleküle ein, wodurch sich seine Beweglichkeit einschränkte.

#### Aufenthaltort von HD-PMI

Die Messung der Einzelkomponenten ergab für HD-PMI den gleichen Trend wie für TEMPO. Mit steigender Polarität der untersuchten Substanz erhöhte sich die  $a_N$ . Die Messung der Spinsonde in Wasser war nicht durchführbar, da sich HD-PMI nicht löste und kein ESR-Signal erzeugt werden konnte. Die Emulgatorgemische zeigten auch beim Einbringen dieser Spinsonde zwei Spezies. Dies spricht, wie schon oben erwähnt, für eine Verteilung des Reportertermoleküls zwischen die Tensidschichten und in PeG. Bei Betrachtung der ermittelten  $a_N$  der ME mit den Daten der reinen Komponenten wird ersichtlich, dass sich das im Vergleich zu TEMPO unpolare HDPMI in Spezies 1 der ME-Systeme A ESR 1 bis 3 (13,92 G, 13,73 G und 13,92 G) in der unpolaren Phase IPP (13,74 G) befand. Auch hier könnte es sich um eine Mischung mit PeG (14,24 G) handeln, da deren  $a_N$  keine großen Differenzen aufwies. Angesichts der  $\tau$  wurde jedoch deutlich, dass sich das Reportertermolekül im Verteilungsraum 1 in nahezu 100 % IPP mit seiner Rotationskorrelationszeit von 0,129 ns befinden musste, da HD-PMI in PeG mit einer  $\tau$  von 1,784 ns eine hohe Unbeweglichkeit zeigte. Im Gegensatz zu

TEMPO schien sich HD-PMI in Spezies 1 im Inneren der unpolaren kolloidalen Phase ohne Beteiligung von PeG zu befinden.

Die zweite Spezies innerhalb der ME A ESR 1 bis 3 befand sich im Hinblick auf die Mikropolarität (14,52 G, 14,64 G und 14,61 G) und Mikroviskosität (1,484 ns, 1,281 ns und 1,301 ns) wahrscheinlich auch hier in der Grenzschicht, wodurch seine Beweglichkeit eingeschränkt war. Da jedoch auch in reinem PeG eine hohe  $\tau$  auftrat, spricht die zweite Spezies auch für eine Interaktion mit PeG-Molekülen, die sich womöglich in ihrer Eigenschaft als Co-Solvens auch in die Tensidschicht eingliederten.

#### Aufenthaltort von 16-DSA

Die Untersuchungen mit der Spinsonde 16-DSA ergaben keine neue Lokalisation des Reportermoleküls in der ME im Vergleich zu den anderen beiden Spinsonden TEMPO und HD-PMI. In Spezies 1 zeigte sich das gleiche Verhalten wie im ersten Verteilungsraum von HD-PMI. Es schien, zu einer Lokalisation der Spinsonde in die unpolare Phase IPP mit seiner  $a_N$  von 13,94 G und seiner  $\tau$  von 0,13 ns zu kommen. Dieses wurde durch die Simulationsergebnisse der  $a_N$  (14,27 G, 14,3 G und 14,27 G) und der  $\tau$  (0,15 ns, 0,231 ns und 0,158 ns) der verschiedenen ME A ESR 1 bis 3 ersichtlich.

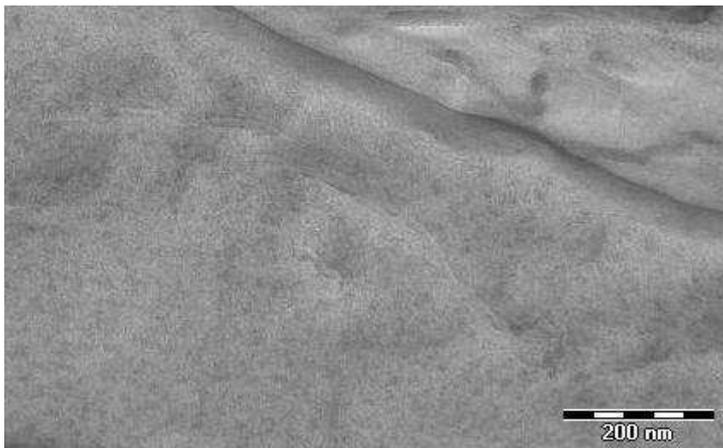
Die zweite Spezies glich dem Verhalten von TEMPO und HD-PMI. Die Spinsonde zeigte mit Rotationskorrelationszeiten von 0,739 ns, 0,871 ns und 0,729 ns eine hohe Unbeweglichkeit, die der  $\tau$  der reinen Emulgatorphase (E-System/PeG 1,5 – 3,5:1) (0,811 ns, 1,454 ns und 0,938 ns) glich. Es kam somit auch hier wieder zu einer Interaktion des Reportermoleküls mit der emulgatorreichen Grenzschicht, in denen vermutlich zusätzlich PeG enthalten war.

#### Zusammenfassung der ESR-Ergebnisse

Die Untersuchungen verschiedener Spinsonden in den ausgewählten ME A ESR 1 bis 3 ließen den Trend erkennen, dass die Reportermoleküle mit steigendem log P-Wert weniger mit dem polaren Co-Solvens PeG (log P -0,28 [194]) interagierten, sondern sich bevorzugt in die unpolare Phase IPP (log P 8,5 [194]) verteilten. Eventuelle Bulkeffekte von PeG schienen, in Bezug auf IPP eher in der Nähe der Tensid/Co-Tensid Grenzschicht eine Rolle zu spielen. Zu starken Interaktionen der Spinsonden kam es außerdem mit dem enthaltenen Emulgatorsystem. Alle Spinsonden reicherten sich in die emulgatorreichen Domänen der Grenzschicht innerhalb der ME an. Dies könnte Hinweise auf die Realisierung der guten Solubilisierungskapazität innerhalb von ME geben. Jedoch konnte die Verteilung der Spinsonden durch Variation des Emulgatoranteils nicht beeinflusst werden. In der Umgebung des in den ME enthaltenen Wassers konnte keine Spinsonde vorgefunden werden. Die Spinsonden waren zu unpolar, um mit Wasser oder Wasser/PeG Mischungen in Interaktion zu treten. In Bezug auf einsetzbare Arzneistoffe zeigen die Ergebnisse, dass unterschiedliche physikochemische Eigenschaften, insbesondere die Lipophilie von Stoffen, deren Aufenthaltort innerhalb einer ME beeinflussen können. Dieses deutet damit wiederum auf ein System mit unterschiedlichen Bereichen bzw. Phasen hin.

## 5.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

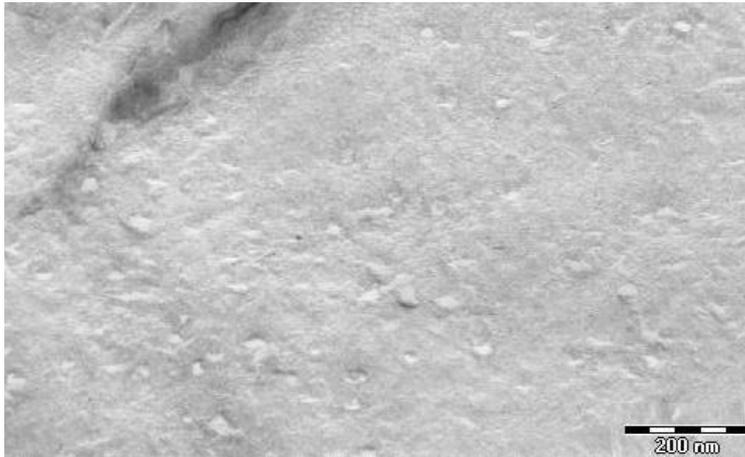
Zur Veranschaulichung der Mikrostruktur in ME-Systemen ist es möglich, diese mittels Elektronenmikroskopie zu untersuchen. Es lassen sich dabei Unterschiede zwischen tröpfchenartigen und bikontinuierlichen Phasen ermitteln [99]. Bereits SCHULMAN et al. und später auch PRINCE untersuchten Mikroemulsionen mittels Elektronenmikroskopie [166, 193]. Die Probenpräparation der zu untersuchenden Systeme stellt bei dieser Methode eine Herausforderung dar, da es häufig zu einem Überzug der Probe mit Eisflächen bzw. Eiskristallen und der damit verbundenen Messung von Artefakten kommen kann [8]. Um dieses zu verhindern sind hohe Gefriereraten und eine begrenzte Anzahl von Komponenten im eingesetzten ME-System erforderlich [99]. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, sollten zusätzlich weitere Charakterisierungsmethoden angewandt werden. In dieser Arbeit wurde die Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskopie (FF-TEM) durchgeführt. Nach dem Einfrieren der ME erfolgte ihr Aufbrechen und Ätzen im Vakuum. Bei der FF-TEM Methode wird durch Bedampfung mit Platin und Kohle im schrägen Winkel ein Abdruck erstellt, wodurch im TEM nicht die eingefrorene Probe selbst betrachtet wird [105]. Die Untersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden aufgrund des hohen Probenpräparationsaufwandes beispielhaft an ME A durchgeführt. Es wurden Aufnahmen der schon in Kapitel 5.6 aufgeführten ME A ESR2 erstellt. Durch Anwendung der Elektronenmikroskopie sollte die bereits aus den vorangegangenen Untersuchungen (vgl. Kapitel 5.3 bis 5.6) vermutete Existenz sphärischer Partikel in ME-Systemen mit O/W-Charakter visualisiert werden. Um eine bessere Abgrenzung zwischen Artefakten und tatsächlichen Struktureigenschaften der ME zu erhalten, wurde zusätzlich das gleiche System ohne Wasserphase untersucht. Im Gegensatz zum ME-System sind in dieser Komponentenmischung keine sphärischen Partikel zu erwarten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 62 und Abbildung 63 dargestellt.



**Abbildung 62 – FF-TEM Aufnahme der Komponentenmischung von ME A ESR 2 ohne Wasser**

Die FF-TEM Aufnahmen der beiden untersuchten Systeme ergaben für das Komponentengemisch ohne Wasser keine Struktur. Die Aufnahme zeigte nur eine glatte Oberfläche. Durch die Abwesenheit von Wasser konnte innerhalb des Systems keine Mikrostruktur ausgebildet werden. Andererseits könnte hier durch die höhere Gesamtkonzentration im System der gefrier-

schützende Effekt von PeG stärker zum Tragen gekommen sein, wodurch sich beim Aufbrechen der eingefrorenen Probe keine starken Konturen ausbildeten (Abbildung 62).



**Abbildung 63 – FF-TEM Aufnahme von ME A ESR 2**

Die FF-TEM Aufnahme der ME A ESR2 ließ hingegen eine leichte tröpfchenartige Struktur erkennen. Abschätzen lässt sich die Größe dieser tröpfchenartig verteilten Phase auf Werte zwischen 12 nm und 35 nm (Abbildung 63). Vergleichbare TEM-Aufnahmen von O/W-ME wurden bereits von STREY sowie von JAHN publiziert [98, 210]. Im Vergleich zu Abbildung 62 sind damit eindeutige Unterschiede in der Oberflächenstruktur erkennbar.

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik, der Artefaktmessung und der nur schwach erkennbaren Tröpfchenstruktur, ist die Interpretation der visualisierten Struktur als sphärische Partikel allerdings nicht eindeutig möglich.

## 5.8 Dynamische Lichtstreuung

Um Einblicke in die Größe der kolloidalen Phase innerhalb von ME zu gewinnen, ist in der Literatur häufig der Einsatz von Lichtstreuungsverfahren beschrieben [2, 18, 188, 197]. In dieser Arbeit wurde die Dynamische Lichtstreuung (DLS) angewandt. Da mittels DLS der Übergang von sphärischen Partikeln zu bikontinuierlichen Phasen innerhalb einer Dilutionsreihe nicht messbar ist, wurden hierbei nicht die in Kapitel 5.1 vorgestellten ME entlang der Dilutionsreihen a bis h untersucht. Der Fokus wurde vielmehr auf die O/W-Systeme ME TCL A bis C und ME LSR gelegt, die bereits für die Penetrationsuntersuchungen verwendet wurden.

DLS beruht auf der Detektion zeitabhängiger Intensitätsfluktuationen von an Partikeln gestreutem Laserlicht. Die Fluktuationen werden von der BROWNSchen Molekularbewegung der kolloidalen Partikel, dispergiert in der kontinuierlichen Phase, der ME hervorgerufen. Die Ermittlung der Teilchengröße erfolgt über die Bestimmung des scheinbaren Diffusionskoeffizienten aus einer Autokorrelationsfunktion. Unter Annahme des Vorliegens harter, kugelförmiger Teilchen wird dieser in den wahren wechselwirkungsfreien Diffusionskoeffizienten  $D_0$  umgerechnet. Mit Hilfe der STOKES-EINSTEIN-Gleichung kann aus  $D_0$  schließlich der hydrodynamische Radius  $R_h$  berechnet werden [197].

Die ermittelten Radien der vier unterschiedlichen ME-Systeme sind in Tabelle 15 aufgeführt.

**Tabelle 15 – Hydrodynamische Radien der untersuchten ME (Messung bei 13 unterschiedlichen Winkeln,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

<b>Mikroemulsion</b>	<b>Hydrodynamischer Radius <math>R_h</math> [nm]</b>
ME TCL A	$3,82 \pm 0,25$
ME TCL B	$10,77 \pm 0,61$
ME TCL C	$8,20 \pm 0,48$
ME LSR	$2,87 \pm 0,19$

Die Ergebnisse zeigen, dass sich zwischen den Systemen deutliche Unterschiede in der Größe der kolloidal verteilten Phase ergaben. Die beiden Systeme **ME TCL B** und **ME TCL C** resultierten in ähnlichen Radien, die auch mit in der Literatur zu findenden Daten für O/W-ME vergleichbarer Zusammensetzung vereinbar sind [143, 156, 197]. Für die Systeme **ME TCL A** und **ME LSR** wurden im Vergleich zu ME TCL B und C kleinere Tröpfchengrößen ermittelt. Obwohl alle Systeme O/W-Charakter besaßen, schienen die restlichen Bestandteile, womöglich insbesondere die Wahl der Tenside, Einfluss auf die Größe der inneren Phase zu nehmen. Für ME LSR wurde der kleinste Radius gemessen. Dies wurde vermutlich durch die lipophile Phase in diesem System hervorgerufen, die nur einen Anteil von 2 % hatte. Es stand somit nicht viel FSG zur Solubilisierung der Tenside zu Verfügung, wodurch es zu keiner großen Ausdehnung der Tensidmizellen kam. Wie bereits in der Literatur demonstriert, hat die Ölkonzentration Einfluss auf die Tröpfchengröße in ME-Systemen [188, 198]. Aus diesem Grund ist bei höheren Fettsäuregemischkonzentrationen auch eine Zunahme des  $R_h$  zu erwarten.

ME TCL A und ME LSR lagen bezüglich der Größe ihrer kolloidalen Phase an der unteren Grenze laut der Definition von ME (vgl. Kapitel 2.3.1). Einfluss auf diese kleine Größe der kolloidalen Phase könnten womöglich die in beiden ME enthaltenen APG nehmen. Radien in der gleichen Größenordnung sind in der Literatur bereits mit Zuckerestern beschrieben worden [63, 73]. Die Gründe dafür sind allerdings noch nicht aufgeklärt. Vermutet werden Interaktionen zwischen den Mizellen, wie z.B. eine Interpenetration der Zuckerestermoleküle in benachbarte Mizellen [63]. Allerdings wurden auch von anderen Gruppen für ME-Systeme ohne Zuckerester derart kleine  $R_h$  ermittelt [85, 158, 212], wodurch deutlich wird, dass die Abgrenzung zwischen solubilisierten mizellaren Systemen und ME nicht völlig eindeutig ist [17, 148]. Die Messung der mizellaren Lösungen zum Vergleich war nicht möglich, da keine völlig klaren Lösungen erhalten wurden.

Die Ergebnisse der DLS weisen zusammenfassend auf eine Mikrostruktur mit kugelförmigen Domänen hin, die nach SHUKLA et al. neben der reinen lipophilen Phase auch eine gebundene Schicht an Tensidmolekülen enthalten dürfte [197]. Da es sich bei ME um Systeme mit stark fluktuierenden Strukturen handelt, ist es mittels DLS nur möglich, Durchschnittswerte zu ermitteln, denn die reale Teilchengröße der kolloidal dispergierten Phase unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau.

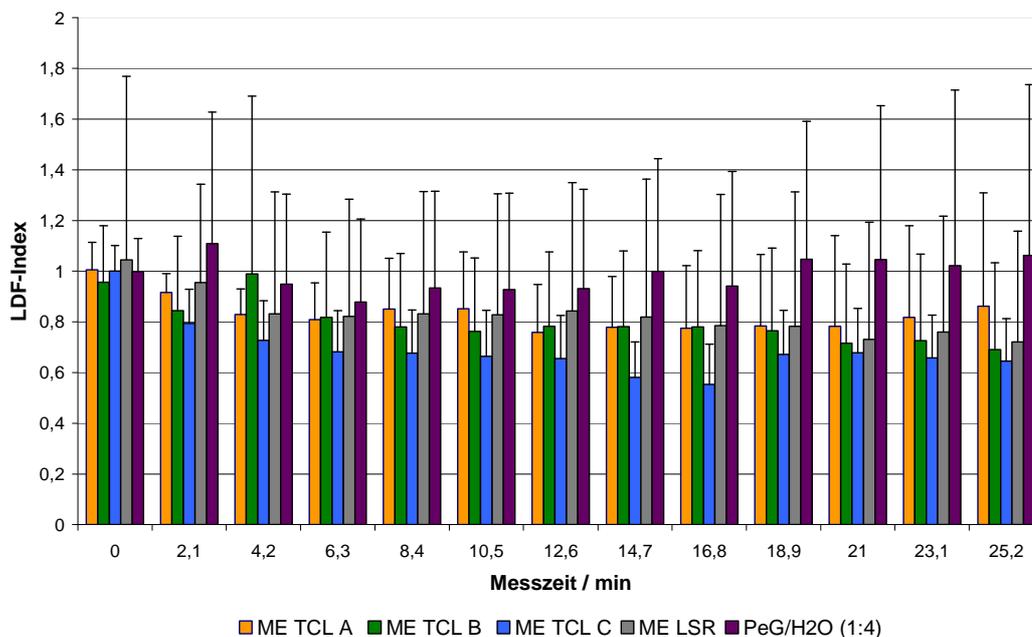
## 5.9 HET CAM-Untersuchungen

Um unter *in vivo* Bedingungen Abschätzungen über die Gewebetoxizität von Substanzen für Haut bzw. Schleimhaut treffen zu können, kommt häufig die Hen`s Egg Test (HET)-Chorio Allantois Membran (CAM)-Methode zur Anwendung. Es handelt sich hierbei um eine schnell durchführbare und empfindliche *in vivo* Methode, die zudem noch mit wenigen Kosten verbunden ist. Da die Membran ca. 8 - 10 Tage nach der Befruchtung verwendet wird, besitzt sie zwar ein funktionstüchtiges Gefäßsystem, aber noch keine Nervenzellen, weshalb an schmerzfreier Materie gearbeitet wird [115]. Das HET CAM-Modell ist als Alternative zum Tierversuch (DRAIZE-Test) international etabliert und akzeptiert und liefert gleichwertige Ergebnisse. Irritative Erscheinungen zeigen sich in einer Veränderung des Gefäßsystems sowie der Durchblutung der stark vaskulierten CAM nach WOHLRAB in einer Erhöhung der Gefäßperfusion [227]. Zur Einschätzung der Perfusion insgesamt wird der Laser-Doppler-Flux (LDF) mit Hilfe der Laser-Doppler-Fluxmetrie in definierten Zeitintervallen bis ca. 30 min nach Applikation bestimmt. Treten Irritationserscheinungen auf, kommt es zu einer Erhöhung der Perfusion und dadurch ebenfalls des Laser-Doppler-Flux (LDF).

Zur besseren Vergleichbarkeit und zur Korrektur von Perfusionsdifferenzen durch Unterschiede im Gefäßdurchmesser, Blutdruck oder/und Gefäßanzahl wird jeweils ein Index (LDF-Index) berechnet, der den Messwert zum Zeitpunkt  $x$  ins Verhältnis zum Baseline-Wert vor Applikation der Testformulierung setzt. Dabei werden der Wert des LDF unmittelbar vor Applikation der Testsubstanz ( $LDF_0$ ) und der Wert des LDF nach Applikation der Testsubstanz ( $LDF_x$ ) ins Verhältnis gesetzt.

Um irritative Potentiale der entwickelten ME ausschließen zu können, wurden alle Systeme (ME TCL A bis C und ME LSR) untersucht, die zur Erstellung der Penetrationsprofile eingesetzt wurden. Auf die Einarbeitung von TCL wurde verzichtet, da nur das irritative Potential der reinen Formulierung untersucht werden sollte. Da FSG zur Bildung der Mikroemulsion essentiell war, musste diese aktive Komponente in ME LSR eingearbeitet werden. Hierbei kam es jedoch zur Testung verschiedener Fettsäuregemischkonzentrationen im System bei gleich bleibendem Emulgatorgehalt. Die Auswertung des LDF-Index für alle vier ME ist in Abbildung 64 über einen Zeitraum von 25,2 min dargestellt, wobei der zur Zeit  $t = 0$  dargestellte Wert die Referenz vor Applikation der ME repräsentiert.

Für **ME TCL A** ergab sich eine geringe Perfusionsminderung und keine eindeutige Fluxsteigerung, die für ein relevantes irritatives Potential sprechen könnte. Die **ME TCL B** und **ME TCL C** und **ME LSR** verhielten sich ähnlich und zeigten ebenfalls keine Hinweise auf einen irritativen oder vasoaktiven Effekt. ALANY et al. berichteten im Zusammenhang mit der Applikation reiner Dirole von einem irritativen Potential ab einer Kettenlänge von  $C_5$  [7]. Da in drei der vier untersuchten Systeme PeG zum Einsatz kam, wurde zusätzlich eine PeG/Wasser Mischung im Verhältnis 1:4 (V/V) untersucht, um die Konzentration innerhalb des ME-Systems zu erzielen (Abbildung 64). Es ergaben sich keine deutlichen Fluxsteigerungen, wodurch ein irritatives Potential der ME, hervorgerufen durch den Einsatz des Diols in der getesteten Konzentration, ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 64 – Laser Doppler Flux-Index der ME TCL A bis C und LSR und PeG/H<sub>2</sub>O (1:4) (PeG/Wasser Mischung (1:4) (V/V)) nach Applikation im HET CAM Modell (n = 12,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

Da ME LSR bereits die aktive Komponente enthält, wurden verschiedene Systeme mit unterschiedlicher Fettsäuregemischkonzentration geprüft (siehe Tabelle 16), um deren Einfluss auf das irritative Potential der ME zu untersuchen. Die getesteten Systeme sind in Tabelle 16 aufgeführt. ME LSR HC3 entspricht ME LSR und wurde zur Bestätigung der Ergebnisse in dieser Konzentrationsreihe erneut untersucht.

**Tabelle 16 – HET CAM untersuchte ME-Systeme D (Angaben in % - m/m)**

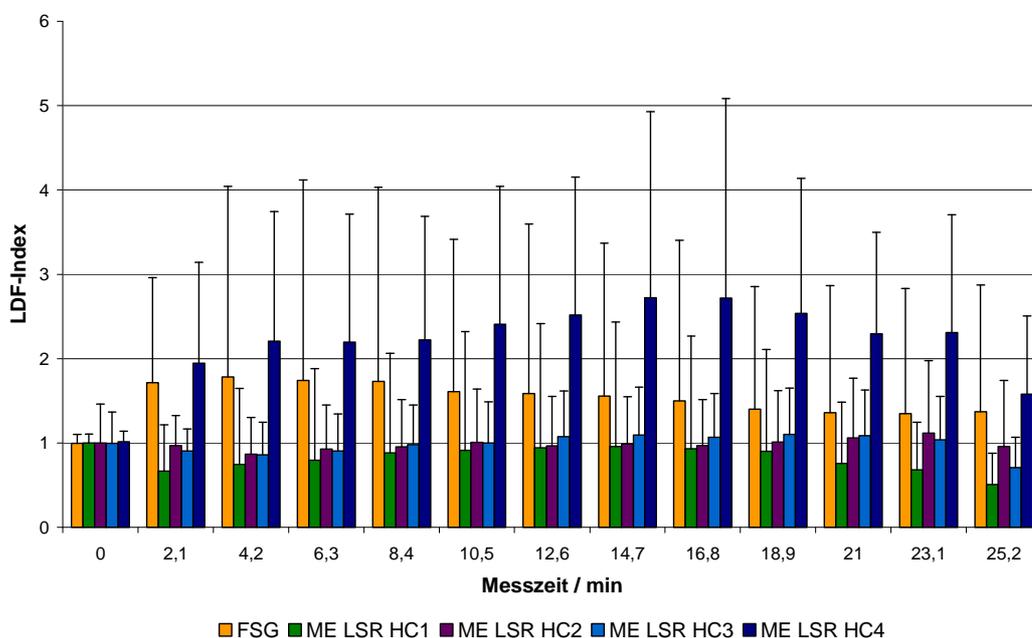
	<i>FSG</i>	<i>PeG</i>	<i>Pl 1200</i>	<i>TCG 90</i>	<i>Wasser</i>
ME LSR HC1	0,50 %	20 %	15 %	5 %	59,50 %
ME LSR HC2	1 %	20 %	15 %	5 %	59 %
ME LSR HC3	2 %	20 %	15 %	5 %	58 %
ME LSR HC4	5 %	20 %	15 %	5 %	55 %

Hierbei wurde neben der Betrachtung des LDF-Index eine visuelle Bewertung vorgenommen. Die Lyse sowie das Transparentwerden von Gefäßen nach 5 min wurden als Membranverfärbung (MD) gewertet, wobei drei Kategorien (leicht, mittel und schwer) unterschieden wurden. Vereinzelt transparente Kapillarabschnitte wurden als leichte, die Transparenz von ganzen Kapillaren als mittlere und das Auftreten von Lysen als schwere MD bewertet. Die Hämorrhagie (HR) wurde entsprechend des Ausmaßes von Erythrozytenextravasaten ebenfalls nach einer Applikationszeit von 5 min in drei Kategorien halbquantitativ beurteilt. Einzelne Kapillarblutungen bei morphologisch intakten Kapillaren wurden als leichte, multiple Kapillarblutungen bei morphologisch intakten Kapillaren als mittlere und morphologisch geschädigte Kapillaren mit Kapillarblutung oder Massenblutung als schwere HR eingestuft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 65 und Tabelle 17 dargestellt. Sie weisen auf, dass sich für ME LSR HC1 bis 3 keine Perfusionsminderung oder Fluxsteigerung ergaben. Auch die visuelle Bewertung brachte keine Indizien für ein irritatives Potential der Formulierungen. ME LSR

HC4 mit einer FSG-Konzentration von 5 % hingegen resultierte genau wie die Testung des reinen FSG in einer eindeutigen Fluxsteigerung. Auch die visuelle Bewertung zeigte eine leichte Hämorrhagie bei 75 % der untersuchten Eier. Membranverfärbungen konnten bei allen untersuchten Eiern festgestellt werden, wobei bei drei sogar das Auftreten von Lysen beobachtet werden konnte.

**Tabelle 17 – Visueller Bewertung der getesteten ME-Systeme D (HR = Hämorrhagie, MD = Membranverfärbung) (n = 12).**

	Vital	HR			MD		
		leicht	mittel	schwer	leicht	mittel	schwer
ME LSR HC1	12	0	0	0	0	0	0
ME LSR HC2	12	0	0	0	2	0	0
ME LSR HC3	12	0	0	0	3	0	0
ME LSR HC4	12	9	0	0	6	3	3



**Abbildung 65 – Laser Doppler Flux-Index der ME LSR HC1 bis 4 und FSG nach Applikation im HET CAM Modell (n = 12,  $\bar{x} \pm SD$ ).**

Die Zubereitungen ME TCL A, B, C und LSR sowie die ME LSR HC1 bis 3 konnten als hautverträglich im Sinne des Testes gelten. Das gleiche Ergebnis ergab sich für die Mischung PeG/Wasser 1:4. Ab einer Konzentration von 5 % FSG muss das ME-System LSR HC4 genauso wie die Applikation des reinen FSG als irritativ bzw. toxisch bewertet werden.

## 5.10 Zusammenfassung der physikochemischen Charakterisierung

Die Untersuchungen zur Charakterisierung der verschiedenen entwickelten Systeme konnten bei allen vier ME A bis D den Charakter von Mikroemulsionen aufzeigen. Durch Erstellung von Phasendiagrammen wurden bei allen vier ME A bis D isotrope Phasengebiete identifiziert. Die Ergebnisse der Viskositätsuntersuchungen resultierten für alle getesteten ME in idealviskosem Fließverhalten mit niedriger Viskosität. Für ME C konnte zusätzlich ein möglicher Übergang von ME mit sphärischen Partikeln zu bikontinuierlichen Systemen innerhalb einer

Dilutionsreihe beobachtet werden. Den Konduktivitätsmessungen zufolge konnten für ME B und ME C und den DSC-Untersuchungen zufolge für ME A, ME C und ME D sowohl O/W-Systeme sowie auch bikontinuierliche ME ermittelt werden. ESR sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen veranschaulichten zusätzlich für ME A eine Mikrostruktur, in der lipophile Phasen separiert durch emulgatorreiche Grenzschichten in einer monokontinuierlichen hydrophilen Phase existierten und deutet insbesondere bei niedrigen Ölkonzentrationen auf das Vorhandensein kugelförmiger kolloidaler Tröpfchen hin. Die Größe der kolloidalen Phase wurde für die O/W-ME TCL A bis C und ME LSR anhand von DLS-Experimenten bestimmt. Die hydrodynamischen Radien resultierten mit Werten zwischen 2,87 nm – 10,77 nm in unterschiedlichen Größen der kolloidalen Phase. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen ME zurückzuführen. Zusätzlich zeigten alle vier zur Penetration eingesetzten ME TCL A bis C und ME LSR eine gute Verträglichkeit im Sinne des HET CAM-Modells.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung dermatologisch gut verträglicher Mikroemulsionen zur Inkorporierung großmolekularer, lipophiler Substanzen am Beispiel des Arzneistoffs TCL sowie der ungesättigten Fettsäure LSR. Durch den Einsatz dieser kolloidalen Carrier sollte eine verbesserte lokale Bioverfügbarkeit und damit einer Realisierung bzw. Verstärkung der therapeutischen Effekte von TCL und LSR erzielt werden.

Die Charakterisierung der entwickelten Systeme ergab für alle Mikroemulsionen keine Hinweise auf ein irritatives Potential, wodurch ideale Voraussetzungen für die topische Applikation zur Therapie von Hauterkrankungen gegeben sind. Des Weiteren konnten eindeutig isotrope ME-Systeme identifiziert werden, die eine tröpfchenartige, kolloidale Phase oder aber bikontinuierlichen Charakter besaßen. Die ermittelte Mikrostruktur der Systeme wies insbesondere bei niedrigen Ölkonzentrationen auf das Vorhandensein lipophiler Domänen separiert durch emulgatorreiche Grenzschichten in einer monokontinuierlichen hydrophilen Phase hin und spricht damit für die Existenz kugelförmiger, sphärischer Partikel.

### **Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von Tacrolimus**

Es ist gelungen, geeignete ME zur dermalen Anwendung als Vehikel für den Immunmodulator TCL zu entwickeln.

Neben der physikochemischen Charakterisierung des Arzneistoffs zur besseren Einschätzung dessen Penetrationseigenschaften, konnte ebenfalls die Stabilität von TCL in den drei entwickelten ME gezeigt werden. Hierbei erwies sich allerdings ME TCL A als das vorteilhafteste System, da hier die längste Wirkstoffstabilität festgestellt werden konnte.

Die Penetrationsuntersuchungen *ex vivo* ergaben für alle drei getesteten Systeme eine schnelle Penetration in die tiefen Hautschichten. Dabei ähnelte das Penetrationsverhalten von ME TCL A dem von ME TCL C. Besonders nach den Versuchszeiten 30 min und 300 min konnten hohe Anteile von TCL im Zielkompartiment Dermis mit seinen Lymphozyten festgestellt werden. ME TCL B wies leichte Unterschiede im Penetrationsverhalten von TCL im Vergleich zu den beiden anderen ME-Systemen auf. Diese ME erzielte geringere Wirkstoffkonzentrationen in der Haut, aber die höchsten Anteile des Arzneistoffs im Akzeptorkompartiment im Vergleich zu den beiden anderen Systemen. Dies lag vermutlich an der etwas höheren thermodynamischen Aktivität von TCL in ME TCL B. Damit ist eine Modulation der Penetrationsprofile durch die Verwendung verschiedener Inhaltsstoffe in den Mikroemulsionssystemen möglich.

Im Vergleich der drei ME zum Standardvehikel Protopic<sup>®</sup> konnte von allen ME eine schnelle und signifikant größere Penetration von TCL in tiefe Hautschichten im Vergleich zu Protopic<sup>®</sup> erreicht werden. Bereits nach 30 min war eine 4,6fache größere Menge an TCL im Vergleich zu Protopic<sup>®</sup> bioverfügbar. Mit steigender Versuchszeit erhöhte sich diese Differenz noch leicht. Nach 300 min konnten 5,3fach höhere Konzentrationen an TCL in der Dermis und im Akzeptorkompartiment nach Applikation der ME im Vergleich zur Salbe gemessen werden. Nach der Langzeitapplikation von 1000 min zeigten die ME immer noch höhere bioverfügbare TCL-Konzentrationen, jedoch fiel die Differenz auf einen 3,3fach höheren Anteil leicht ab. Es wurde damit zusammenfassend gezeigt, dass durch den Einsatz von kolloidalen Carriern die

Penetration von TCL essentiell verbessert werden konnte. Mit dieser modernen Formulierung konnten die galenischen Voraussetzungen für eine Wirksamkeit bei *Psoriasis vulgaris* geschaffen werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse sind jedoch noch Untersuchungen an erkrankter Haut und klinische Studien notwendig.

### **Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von Linolsäure**

Die Entwicklung einer geeigneten Mikroemulsion zur dermalen Applikation für LSR konnte ebenfalls erfolgreich ausgeführt werden. Die Fettsäure wurde als lipophile Komponente in das System inkorporiert. Dies brachte den Vorteil, die aktive Komponente kolloidal verteilt vorliegen zu haben. Die Stabilität der oxidativ anfälligen ungesättigten Fettsäuren im System konnte ebenfalls gezeigt werden, wodurch die Grundvoraussetzung für die topische Applikation des entwickelten ME-Systems geschaffen wurde.

In den Penetrationsuntersuchungen *ex vivo* wurde gezeigt, dass es möglich war, durch den Einsatz des kolloidalen Carriersystems in kurzer Zeit hohe Konzentrationen an Fettsäuren in die Haut penetrieren zu lassen. Im Vergleich zum Fertigpräparat Linola Fett<sup>®</sup> Creme wies die Mikroemulsion zu allen drei Versuchszeiten signifikant höhere Fettsäurekonzentrationen, die etwa der dreifachen Menge an 9,11-Octadiensäure entsprachen, in der Haut auf. Trotz der hohen Lipophilie der aktiven Komponente konnten die Vehikeleigenschaften der Mikroemulsion eine exzellente Penetration erzielen. Nach Applikation der ME lagerte sich die Fettsäure mit steigender Versuchszeit nicht in den tiefen Dermissschichten an, sondern kumulierte im Zielkompartiment Epidermis. Zur Bestätigung der Ergebnisse werden jedoch noch *in vivo* Untersuchungen erforderlich sein.

Neben den exzellenten penetrationsfördernden Eigenschaften von Mikroemulsionen spielen in der adjuvanten Basistherapie chronisch entzündlicher Hauterkrankungen auch die Eigenschaften der Formulierung eine wichtige Rolle. Die effektive Applikation hoher Lipidkonzentrationen inkorporiert in ein schnell einziehendes, nicht klebendes, wässriges System, könnte zudem die *Compliance* chronischkranker Patienten erhöhen.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Herstellung der Formulierungen

#### Mikroemulsionssysteme

Die Herstellung der verschiedenen ME-Systeme erfolgte durch Einwiegen aller Bestandteile in ein Rundbodenglas mit Schliff oder ein Schnappdeckelgläschen (Analysenwaage AG 204 Delta Range, Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland). Die kompletten Mischungen wurden daraufhin auf dem Laborschüttler (GFL 3006, GFL-Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland) bis zur Aufklärung geschüttelt. TCL, Citronensäure und die Antioxidantien wurde nachträglich in der fertigen ME gelöst.

#### Standardvehikel

Protopic<sup>®</sup> wurde direkt und ohne weitere Bearbeitung verwendet. Da der Anteil des Fettsäuregemischs im Fertigpräparat Linola Fett<sup>®</sup> nur 0,815 % betrug, wurde es zum besseren Vergleich, durch Zugabe von weiterem FSG auf 2 % erhöht. Dabei wurde Linola Fett<sup>®</sup> in einer Fantaschale vorgelegt. Die entsprechende FSG-Menge wurde hinzugewogen und homogen verrührt.

### 7.2 Wirkstoffanalytik

#### 7.2.1 Analytik von Tacrolimus

##### HPLC-Analytik mit Diodenarraydetektion

Die Quantifizierung von TCL erfolgte mittels einer HPLC Waters (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) bestehend aus einer Waters controller 600 Pumpe, einem Waters 717plus Autosampler und einem Waters 2996 Photodiodenarraydetektor mit folgenden Parametern:

Säule:	YMC-ODS-AQ (150 x 4,0 i.d.; S-5 µm; 200 Å (YMC Europe, Dinslaken, Deutschland)
Mobile Phase:	Acetonitril/Wasser/Ameisensäure 60/40/0,005 (V/V) isokratisch
Flussrate:	1 mL min <sup>-1</sup>
Säulentemperatur:	60 °C
Injektions-Volumen:	20 µL
Druck:	60 bar
Detektion:	DAD 204 nm (220 nm; 295 nm)
Stammlösung:	1000 µg mL <sup>-1</sup> TCL in Methanol
Kalibrierbereich:	1,00 µg mL <sup>-1</sup> – 100 µg mL <sup>-1</sup> in Methanol
Retentionszeit:	6,9 min
Präzision:	0,8 % bei einem Kalibrationsbereich von 1 µg mL <sup>-1</sup> – 100 µg mL <sup>-1</sup>
Bestimmtheitsmaß:	R <sup>2</sup> = 0,999.
Nachweisgrenze:	0,3 µg mL <sup>-1</sup>
Bestimmungsgrenze:	1 µg mL <sup>-1</sup>

##### HPLC-Analytik mit massenspektrometrischer Detektion

Die Quantifizierung von TCL nach Durchführung der Penetrationsuntersuchungen konnte aufgrund der hohen Nachweisgrenze nicht mit Diodenarraydetektion durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde dafür die Detektion mittels Massenspektrometrie verwendet. Zum Einsatz kam hier ein Agilent 1100 HPLC System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt mit einem Finnigan LCQ Ionenfallenspektrometer (Thermo Fisher, Egelsbach, Deutschland). Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mit Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven Ionen-Modus. Folgende Methodenparameter wurden angewendet [76]:

Säule:	YMC-ODS-AQ 150 x 2,1 i.d.; S-3 µm; 200 Å (YMC Europe, Dinslaken, Deutschland)
Mobile Phase:	Acetonitril/Wasser/Ameisensäure 60/40/0,005 (V/V) isokratisch

Flussrate:	0,2 mL min <sup>-1</sup>
Säulentemperatur:	60 °C
Injektions-Volumen:	5 µL
Druck:	60 bar
Interner Standard:	Mycophenolatmofetil
Detektion:	ESI positiv SIM Modus TCL Ion [M + Na] <sup>+</sup> m/z 826,3; Interner Standard Mycophenolatmofetil Ion [M + H] <sup>+</sup> m/z 434,1
Capillary-Temperatur:	250 °C
Spannung:	4,5 kV
Sheath Flow Rate:	70
Aux flow Rate:	0
Stammlösung:	1000 µg mL <sup>-1</sup> TCL in Methanol
Kalibrierbereich:	0,0005 µg mL <sup>-1</sup> – 1,00 µg mL <sup>-1</sup> in Methanol
Retentionszeiten:	6,9 min TCL 4,1 min MMF
Präzision:	8,7 % bei einem Kalibrationsbereich von 0,0005 µg mL <sup>-1</sup> – 1,00 µg mL <sup>-1</sup>
Bestimmtheitsmaß:	R <sup>2</sup> = 0,9941
Nachweisgrenze:	2 ng mL <sup>-1</sup>
Bestimmungsgrenze:	5 ng mL <sup>-1</sup>

## 7.2.2 Analytik der Octadiensäuren

### HPLC-Analytik mit Diodenarraydetektion

Die Analytik der 9,11-Octadiensäure erfolgte mit dem Agilent 1100 HPLC System (Agilent, Waldbronn, Deutschland). Folgende Parameter kamen hierbei zum Einsatz:

Säule:	Nucleosil C18 125 x 2 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
Mobile Phase:	Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure 70/30/0,1
Flussrate:	0,2 ml min <sup>-1</sup>
Säulentemperatur:	40 °C
Injektions-Volumen:	5 µL
Druck:	61 bar
Detektion:	DAD 234 nm, 248 nm
Interner Standard:	Mometasonfuroat
Stammlösung:	1000 µg mL <sup>-1</sup> in Methanol
Kalibrierbereich:	1 µg mL <sup>-1</sup> – 100 µg mL <sup>-1</sup> in Methanol
Retentionszeit:	9,11-Octadiensäure 4,0 min Mometasonfuroat 1,8 min
Quantifizierungsgrenze:	0,5 µg mL <sup>-1</sup>
Präzision:	2,27 %
Bestimmtheitsmaß:	R <sup>2</sup> = 0,9996

### Gaschromatographie-Analytik mit massenspektrometrischer Detektion

Die Messungen wurden an einem Varian Gas Chromatograph (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) gekoppelt mit einem Magnum GC-MS System von Finnigan (Thermo Finnigan MAT, Bremen) mit nachfolgend aufgeführten Parametern durchgeführt:

Säule:	HP-FFAP 25 m x 0,2 mm x 0,3 µm			
Trägergas:	Helium			
Flussrate:	12 Psi			
Temperaturprogramm:	Fett-Opt			
	Temp [°C]	Rate [°C min <sup>-1</sup> ]	Time [min]	Total [min]
	60	0	1,00	1,00
	180	20	6,00	7,00
	240	15	4,00	11,00
	280	30	1,33	12,33

	280	0	5,00	17,33
Injektions-Volumen:	1 $\mu\text{L}$			
Ionisation:	Elektrospray-Ionisation			
Detektion:	ESI Massen 262 $\text{g mol}^{-1}$ und 294 $\text{g mol}^{-1}$			
Stammlösung:	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Fettsäuregemisch in Methanol			
Kalibrierbereich:	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Methanol			
Methylierungsmittel:	TMSH (Trimethylsulfoniumhydroxid) 1 $\mu\text{L}$ TMSH + 50 $\mu\text{L}$ Probe direkt im Vial vermischt (Reaktion bei Raumtemperatur)			
Retentionszeiten:	9,11-Octadiensäure 15,10 min 9,12-Octadiensäure 14,15 min			
Präzision:	2,54 % bei einem Kalibrationsbereich von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
Bestimmtheitsmaß:	$R^2 = 0,9915$			
Bestimmungsgrenze:	0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			

### Kapillarelektrophorese-Analytik mit UV/VIS-Detektion

Zur Trennung der Octadiensäuren und ihrer Oxidationsprodukte wurde mit Kapillarelektrophorese mit einem Hochspannungsgenerator FuG HCN 7E 35000 (FuG Elektronik GmbH, Rosenheim, Deutschland) unter Verwendung folgender Parameter gearbeitet:

Elektrode:	Platin
Kapillare:	Quarz (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) Länge insgesamt 77 cm, Länge zum Detektor 58 cm Innendurchmesser 75 $\mu\text{m}$ ,
Puffer:	20 mM SDS in Boraxpuffer ( $10^{-2}$ M)
Injektion:	manuell 10 s, Injektionshöhe 11 cm
Temperatur:	Raumtemperatur
Spannung:	21 kV
Detektion:	UV 234 nm

## **7.3 Extraktion der Wirkstoffe aus der Formulierung**

### Extraktion von Tacrolimus aus Mikroemulsionen und Protopic<sup>®</sup>

Zur Ermittlung der TCL-Konzentration in den ME wurden je dreimal 10 mg der ME mit einem Gehalt von 0,5 % TCL eingewogen und mit jeweils 5 mL Methanol versetzt. Die ME-Systeme mit 0,1 %iger TCL-Konzentration wurden nur mit jeweils 2 mL Methanol extrahiert. Die Lösungen wurden kurz auf dem Vortexer (neoLab-Reagenzglas mixer Vortex 7-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) gemischt und anschließend mittels HPLC-DAD vermessen.

Für die Extraktion von TCL aus Protopic<sup>®</sup> wurden je dreimal 50 mg der Salbe eingewogen und in 1 mL Chloroform vollständig gelöst. Anschließend wurden 4 mL Methanol zugesetzt, wodurch es zu einem Ausfällen der lipophilen Grundlage kam. Die Lösungen wurden durch einen Spritzenfilter mit 0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße (Rotilabo PTFE-Spritzenfilter, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland) filtriert. Von dem Filtrat wurden 2 mL abgenommen. Diese wurden unter Stickstoffatmosphäre bei 30 °C abgedampft. Anschließend wurde der Rückstand mit 2 mL Methanol wieder aufgenommen. Die Lösungen wurden 45 min im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex super RK 255H, Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland) behandelt und vor dem Vermessen mit HPLC-DAD nochmals filtriert.

### Extraktion der Octadiensäuren aus Mikroemulsionen und Linola Fett<sup>®</sup>

Die Extraktion der Octadiensäuren aus der Formulierung erfolgte mit Methanol. Es wurden je dreimal ca. 10 mg der ME eingewogen und mit 5 mL Methanol versetzt. Die Lösungen wurden kurz auf dem Vortexer (neoLab-Reagenzglas mixer Vortex 7-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) gemischt und anschließend mittels HPLC-DAD vermessen. Zusätzlich wurden die Linola Fett<sup>®</sup> enthaltenden Lösungen noch 45 min im

Ultraschallbad (Bandelin Sonorex super RK 255H, Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland) behandelt und mit einem Spritzenfilter (Rotilabo PTFE-Spritzenfilter, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland) vor dem Vermessen filtriert.

#### Extraktion in Gegenwart von Humanhaut

Zur Untersuchung eventueller Störungen durch Hautbestandteile wurden jeweils ca. 2 mg der tacrolimus- bzw. linolsäurehaltigen ME sowie eine entsprechenden ME ohne Wirkstoff als Leerversuch auf ca. 25 mm<sup>2</sup> große Vollhautstücke aufgetragen. Diese Hautstücke wurden 120 min bei 32,0 °C inkubiert, anschließend mit 1 mL Methanol versetzt und 2 h auf dem Schüttler extrahiert. Die Lösungen wurden anschließend zentrifugiert und mit HPLC-DAD vermessen.

### **7.4 Wirkstoffstabilitätsuntersuchungen**

#### Stabilitätsuntersuchungen von Tacrolimus

Zur Überprüfung der Wirkstoffstabilität bei unterschiedlichen pH-Werten wurde eine PeG/Wasser (2:1 V/V) Mischung mit 0,5 %igem Tacrolimusgehalt hergestellt. Für je 1000 mg dieser Mischung wurden die verschiedenen pH-Werte (pH 4 – pH 10) entweder mit Citronensäure oder Trometamol eingestellt.

Zur Überprüfung der Wirkstoffstabilität im Vehikel wurde eine Lagerstabilität angesetzt. Die ME TCL B und C wurden mit einem TCL-Gehalt von 0,1 % und die ME TCL A mit einem TCL-Gehalt von 0,5 % hergestellt und lichtgeschützt gelagert. Zusätzlich wurden alle Systeme mit zwei unterschiedlichen Antioxidantien versetzt. Dazu wurden allen drei ME entweder 0,1 % ACP oder 0,1 %  $\alpha$ -TPA zugegeben. Zur Ermittlung des Wirkstoffgehalts wurden in regelmäßigen Abständen je dreimal 20 mg abgewogen. Die ME TCL B und C wurden mit 2 mL Methanol und ME TCL A mit 5 mL Methanol versetzt und mittels HPLC-DAD vermessen.

#### Stabilitätsuntersuchungen der Octadiensäuren

Die Lagerstabilität der Octadiensäuren im ME-System wurde mit verschiedenen ME (vgl. Tabelle 9) getestet. Zum Vergleich wurde eine PeG/Wasser Mischung (1:1 V/V) mit einem 2 %igen FSG-Gehalt hergestellt. Alle ME sowie die wässrige Lösung wurden zusätzlich mit einem 0,1 %igen ACP- oder 0,05 %igen BHT-Gehalt hergestellt und gelagert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden je dreimal 20 mg Formulierung abgewogen, mit 5 mL Methanol versetzt und mittels HPLC-DAD vermessen.

Des Weiteren wurden je 50  $\mu$ L aller ME mit einer Spatelspitze Bengalrose B versetzt und mit einer Bestrahlungsdosis von 2000 J cm<sup>-2</sup> UVA-Licht in einem Abstand von 18 cm bestrahlt, um eine Oxidation zu induzieren. Zur Bestrahlung wurden CLEO Performance R UVA-Leuchtstoffröhren mit einem Emissionsspektrum von 305 nm bis 420 nm (Veith Import-Export, Westerau, Deutschland) verwendet. Die UV-Dosen wurden mit einem UVA-Sensor (Kühnast Strahlungstechnik, Wächtersbach, Deutschland) bestimmt. Zum Vergleich wurden die unbehandelten sowie die bestrahlten ME mit CE-UV/VIS analysiert.

### **7.5 Physikochemische Parameter der Wirkstoffe**

#### Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten

Zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten von TCL in verschiedenen Medien wurden je dreimal 100  $\mu$ L der ME TCL A, B und C, Octanol, PrG, PeG, Cetiol B, Wasser und der drei verschiedenen Puffer nach SÖRENSEN (pH 5, 7,4, 9) in Eppendorfcaps eingefüllt und mit TCL bis zum Verbleib eines Bodensatzes versetzt. Die Mischungen wurden 48 h auf dem Laborschüttler bewegt. Bei vollständiger Lösung von TCL in den Proben wurde weiteres TCL hinzugegeben. Nach dem endgültigen Verbleib eines Wirkstoffbodensatzes wurden 50  $\mu$ L der Pufferlösungen und des Wassers abgenommen. Von den restlichen Lösungen wurden jeweils 5 mg mit 2 mL Methanol verdünnt. Alle Proben wurden mittels HPLC-DAD untersucht. Für die Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten der Octadiensäuren wurden jeweils dreimal 1 mL Octanol, PeG, Wasser sowie der drei Puffer nach SÖRENSEN (pH 5, 7,4, 9) in Reagenzgläser

gefüllt und mit den Octadiensäuren bis zum Trübwerden der Lösung versetzt. Die Mischungen wurden 24 h auf dem Laborschüttler bewegt. Daraufhin wurden die trüben Proben zentrifugiert und 100  $\mu\text{L}$  des klaren Überstandes abgenommen und mit HPLC-DAD untersucht.

#### Bestimmung von Octanol/Puffer Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung verschiedener  $V_k$  von TCL bei unterschiedlichen pH-Werten wurden je dreimal 50  $\mu\text{L}$  des mit dem entsprechendem Puffer gesättigten Octanols und jeweils 50  $\mu\text{L}$  des mit Octanol gesättigten Puffers nach SÖRENSEN (pH 5, pH 7,4 und pH 9) in Eppendorfcaps eingefüllt, worin 1 mg TCL gelöst wurde. Die Mischungen wurden 48 h auf dem Laborschüttler bewegt. 25  $\mu\text{L}$  der Pufferphase wurde abgenommen mit 25  $\mu\text{L}$  Methanol verdünnt. Von der Octanolphase wurden je dreimal 10 mg mit 5 mL Methanol verdünnt und mit HPLC-DAD vermessen.

### 7.6 Penetrationsstudien *ex vivo*

Die Penetrationsuntersuchungen wurden an exzidiierter Humanhaut durchgeführt, die von Mammareduktionsplastiken stammte. Die gewonnenen Gewebesektionen wurden dafür postoperativ mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und die subkutane Fettschicht wurde entfernt. Daraufhin wurden kreisrunde Hautstücke mit einem Durchmesser von 20 mm ( $3,14\text{ cm}^2$ ) ausgestanzt und einzeln sowie dicht in Aluminiumfolie verpackt. Die verpackten Stücke wurden in Polyethylenbeuteln bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Zu Versuchsbeginn wurden die benötigten Vollhautstücke aufgetaut und ihre Oberfläche mit Wattetupfern getrocknet. Zur Durchführung der Penetrationsuntersuchungen kam die Diffusionszelle nach FRANZ (Crown Glass Company, Somerville, New York, USA) zur Anwendung. Der Aufbau ist in Abbildung 66 dargestellt. [66]. Das durch einen Glasring und einer Metallklammer auf der Filtergaze positionierte, Hautstück stand von der dermalen Seite aus in Kontakt mit der Akzeptorflüssigkeit (PBS pH 7,4). Diese wurde kontinuierlich mit einem Magnetrührer gerührt, um die Diffusionsschicht möglichst klein zu halten. Somit wurden die Voraussetzungen für die Permeation aktiver Substanz geschaffen und physiologische Bedingungen simuliert. Durch eine Glasabdeckung wurde das System vor Verdunstungsverlusten während des Versuches geschützt.

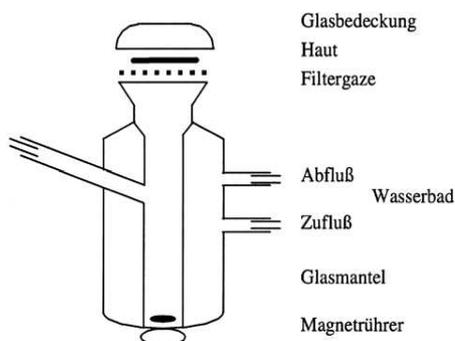


Abbildung 66 – Aufbau der Diffusionszelle nach FRANZ

Es wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  der ME oder ca. 20 mg der Standardvehikel Protopic<sup>®</sup> oder Linola Fett<sup>®</sup> auf ein entsprechendes Hautstück aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Es wurden drei verschiedene Spenderhäute sowie drei verschiedene Versuchszeiten gewählt. Anschließend wurde das präparierte Hautstück auf der Gaze der auf  $32\text{ }^\circ\text{C}$  temperierten Diffusionszelle platziert und dort 30 min, 300 min oder 1000 min belassen. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die überschüssige Formulierung auf der Hautoberfläche mit einem Tupfer entfernt. Das Hautstück wurde von der Diffusionszelle entfernt und diente zur Gewinnung von drei Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 6 mm ( $0,2827\text{ cm}^2$ ) (Kromayer Stanze, Stiefel-Laboratorium, Offenbach, Deutschland), aus denen mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Fa. Jung, Heidelberg, Deutschland) bei  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  horizontale Schnitte angefertigt wurden. Die einzelnen Schnitte sind in Tabelle 18 aufgeführt.

**Tabelle 18 – Aufbereitung der Proben im Anschluss an die Penetrationsuntersuchungen**

Nicht penetrierter Anteil	Tupfer
Stratum Corneum (SC)	10 $\mu\text{m}$
Vitale Epidermis (EP)	4 Schnitte à 20 $\mu\text{m}$
Dermis 1 (DR 1)	5 Schnitte à 40 $\mu\text{m}$
Dermis 2 (DR 2)	5 Schnitte à 40 $\mu\text{m}$
Dermis 3 (DR 3)	5 Schnitte à 40 $\mu\text{m}$
Dermis 4 (DR 4)	5 Schnitte à 40 $\mu\text{m}$
Dermis 5 (DR 5)	5 Schnitte à 40 $\mu\text{m}$
	und verbleibender Stumpf
Permeierter Anteil	Akzeptorflüssigkeit

Die zur gleichen Hautschicht gehörenden Schnitte wurden zusammen in 1,5 mL Eppendorfcaps gelagert.

Die zum Abwischen der überschüssigen Formulierung verwendeten Tupfer wurden zur Extraktion in Reagenzgläser gegeben, mit 2,0 mL oder 5,0 mL Methanol, je nach erwarteter Konzentration, versetzt und 12 h auf dem Laborschüttler bewegt. Die einzelnen Hautschnitte wurden mit 200  $\mu\text{L}$  – 500  $\mu\text{L}$  Methanol, ebenfalls je nach erwarteter Wirkstoffmenge versetzt und eine Stunde auf dem Vortexer (neoLab-Reagenzglasmixer Vortex 7-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) geschüttelt. Anschließend wurden sie über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag erneut 1 h geschüttelt. Die Proben wurden zentrifugiert, der Überstand wurde analysiert. Die Akzeptorenflüssigkeiten aller Zellen wurden nach Versuchende in Probenröhrchen gefüllt und direkt ohne weitere Bearbeitung vermessen. Die Analytik aller Proben erfolgte für TCL mit HPLC-MS und für die Octadiensäuren mit HPLC-DAD. Der interne Standard wurde jeweils vor dem Vermessen den Lösungen hinzugegeben.

## **7.7 Physikochemische Charakterisierung**

### **7.7.1 pH-Wert Bestimmung**

Die pH-Wert Bestimmungen erfolgten mittels des pH-Meters Typ 1120 (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland) sowie entweder der Elektrode Knick SE 101 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) oder der Mikroelektrode In Lab Micro (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland).

### **7.7.2 Erstellung von Phasendiagrammen**

Zur Ermittlung der Phasengrenzen der verschiedenen ME-Systeme wurden die jeweiligen Emulgatorenverhältnisse sowie eine feste Konzentration des Co-Solvens festgelegt. Danach wurden ME verschiedener Konzentrationsverhältnisse, in 2,5 % – 5 % Schritten, hergestellt und sechs Monate gelagert. Danach erfolgten die visuelle Beurteilung sowie eine Betrachtung der Systeme unter dem Polarisationsmikroskop.

### **7.7.3 Polarisationsmikroskopie**

Ein Tropfen der zu untersuchenden ME wurde auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Polarisationsmikroskop (Zeiss Axiolab Pol, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) begutachtet.

### **7.7.4 Viskositätsuntersuchungen**

Die dynamischen Viskositäten der ME wurden mit einem Rotationsviskosimeter nach dem COUTTE-Prinzip (Fluids Spectrometer RFS II, Rheometrics Scientific, Bensheim, Deutschland) bzw. mit einem Rotationsviskosimeter mit Zylindermesszelle und Doppelspalt Typ MCR

501 (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) bestimmt. Die Temperierung erfolgte über eine Peltierzelle (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich). Die Messungen wurden bei einer Temperatur von  $25\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$  sowie einer Scherrate von  $0,1\text{ s}^{-1} - 100\text{ s}^{-1}$  durchgeführt.

Die kinematischen Viskositäten der wässrigen Diol/Wasser Mischungen wurden mit dem UBBELOHDE Viskosimeter (Schott AG, Mainz, Deutschland) bestimmt. Es wurde eine Ic Kapillare verwendet. Die kinematische Viskosität wurde aus der bestimmten Durchflusszeit der Lösung errechnet. Die dynamische Viskosität konnte daraus unter Einbeziehung der Dichte kalkuliert werden. Das Probenvolumen betrug bei allen Methoden 15 mL.

### 7.7.5 Konduktivitätsmessungen

Die Leitfähigkeitsmessungen wurden bei Raumtemperatur unter Verwendung des Cyberscan CON 11 Gerätes (Eutech Instruments Europe B.V., Nijkerk, Niederlande) durchgeführt. Die Zellkonstante betrug  $1,0\text{ cm}^{-1}$ . Die Messelektrode wurde bis zur Stabilisierung in der Probe belassen und der angezeigte Messwert wurde notiert. Dies wurde insgesamt fünfmal hintereinander durchgeführt.

### 7.7.6 Dynamische Differenzkalorimetrie

Für die DSC-Messungen wurde das DSC 200 (Netzsch-Gerätebau GmbH, Selb, Deutschland) verwendet. Die Proben (ca. 15 mg) wurden exakt eingewogen und befanden sich während der Messungen hermetisch abgeschlossen in Aluminiumtiegel. Die Verdunstung von Wasser konnte damit ausgeschlossen werden. Zuerst erfolgte die Probenabkühlung von  $40\text{ °C}$  auf  $-60\text{ °C}$  (Abkühlrate  $10\text{ K min}^{-1}$ ). Nach 5 minütiger Equilibrierung bei  $-60\text{ °C}$  erfolgte anschließend das Aufheizen (Rate  $10\text{ K min}^{-1}$ ) der Probe auf  $120\text{ °C}$ . Als Referenz diente ein leerer Aluminiumtiegel. Gespült wurde während der Messungen mit Stickstoff ( $10\text{ mL min}^{-1}$ ).

### 7.7.7 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Zur Probenvorbereitung wurden Stammlösungen einer Konzentration von  $1\text{ mg mL}^{-1}$  der Spinsonden TEMPO, HD-PMI und 16-DSA in Aceton hergestellt. Da die Spinsondenkonzentration in den zu vermessenden Proben  $0,1\text{ mmol L}^{-1}$  oder  $0,5\text{ mmol L}^{-1}$  betragen sollte, wurden entsprechende Volumina der hergestellten Stammlösungen einzeln in Eppendorfcaps pipettiert. Nach Verdunsten des Acetons wurden die Eppendorfcaps dann mit jeweils 1 mL des zu untersuchenden Mediums versetzt und 3 min auf dem Vortexer (neoLab-Reagenzglasmixer Vortex 7-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) behandelt. Die Messungen erfolgten in Glaskapillaren bei Raumtemperatur. Zum Einsatz kam dazu das X-Band-ESR Spektrometer Miniscope MS 200 (Magnettech, Berlin, Deutschland) mit einer Mikrowellenstrahlung der Frequenz von etwa 9,5 GHz unter folgenden Bedingungen:

B0 -field	335,5 mT
Sweep	10 mT
Sweeptime	30 s
Modulation frequency	100 kHz
Microwave power	20 mW
Modulation amplitude	0,1 mT

Nach Simulierung der erhaltenen Spektren mit dem Programm EPRSIM V4.99 (Biophysical laboratory-EPR centre, Josef Stefan Institute, Ljubljana, Slowenien) erfolgte die Auswertung.

### 7.7.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Proben wurden mit einem Propanjet (Bal Tec AG, Balzers, Liechtenstein) bei  $-150\text{ °C}$  flüssigem Propan eingefroren. Der Gefrierbruch der Proben erfolgte mit einem BAF 060 Freeze-Fracture System (Bal Tec AG, Balzers, Liechtenstein) bei  $-150\text{ °C}$ . Zur Herstellung der Abdrücke wurden die Brüche mit Platin in einem Winkel von  $45\text{ °C}$  sowie mit Kohle in einem Winkel von  $90\text{ °C}$  bedampft. Die erhaltenen Abdrücke wurden in Natriumchloridlösung abge-

löst und mit destilliertem Wasser sowie Aceton gereinigt. Die Betrachtung der Proben erfolgte daraufhin mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM900, Carl Zeiss SMT AG, Oberkochen, Deutschland). Zur bildlichen Darstellung wurde eine Variospeed SSCCD Kamera SM-1k-120 der Firma TRS (Moorenweis, Deutschland) verwendet.

### 7.7.9 Dynamische Lichtstreuung

Die zu untersuchenden Systeme wurden im Vorfeld mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm) (Rotilabo Nylon-Spritzenfilter, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland) filtriert. Die Durchführung der Messungen erfolgte in Laserstreulichtküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) bei einer Temperatur von 25,0 °C. Zur Messung verwendet wurde ein Kompakt-Goniometer ALV/SP 86 (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen, Deutschland) mit einem Nd:YAG-Laser (ADLAS GmbH, Weil im Schönbuch, Deutschland) der Wellenlänge 532 nm und einer Leistung von 140 mW. Es wurde in einem Winkelbereich von 30 ° - 140 ° gemessen. Der im Vorfeld zur Berechnung der Teilchengröße benötigte Brechungsindex der äußeren Phase wurde mit einem Abbé-Refraktometer (Abbemat, Dr. Kernchen, Seelze, Deutschland) bestimmt. Die ebenfalls notwendige Viskosität der äußeren Phase wurde gemäß Kapitel 7.2.4 bestimmt.

### 7.7.10 HET CAM-Untersuchungen

Es wurden natürlich befruchtete Hühnereier der Rasse *New Hampshire* verwendet, die am Legetag durch das Nutztierwissenschaftliche Zentrum Merbitz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt wurden. Die Eier wurden nach dem Transport über acht Tage bei 37 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank bebrütet und dabei (außer in den letzten 24 h) alle 12 h gewendet. Nach Ablauf der Brutzeit wurden die Eier einzeln mikrochirurgisch unter einer Laminar Air Flow Box präpariert.

Nach Durchleuchten der Eipole mit einer lichtstarken Taschenlampe wurde ein etwa kreisrundes Loch mit einem Durchmesser von 1,5 cm im Bereich der Luftkammer in den schwächer konvexen Pol des Eis geschnitten. Der durch die Öffnung entstehende Staub wurde vorsichtig mit einem Gummiblasebalg von der Eihaut abgeblasen. Die Eihaut wurde im Folgenden mit 37 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung benetzt. Die CAM wurde durch Entfernung der äußeren Eihaut freigelegt. Zur Verwendung kamen nur Eier mit einem gut ausgebildeten Gefäßsystem sowie einem deutlich vitalen Embryo. Als Testlösungen wurden jeweils 100 µL der zu untersuchenden ME-Systeme verwendet. Die CAM wurde mit monochromatischem, niedrigerenergetischem Laserlicht (Helium-Neon Laser mit 632,8 nm – rot) illuminiert. Nach ca. 30 min wurde mit Hilfe der Laser-Doppler-Fluxmetrie die Gefäßperfusion im Vergleich zu beiden Kontrollen bestimmt [227].

## 7.8 Statistik

Die Ermittlung der Regressionen im Rahmen der Kalibrierungen wurde mit der Software Excel 2003 durchgeführt. Die statistische Auswertung der Penetrationsergebnisse wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) und zum Vergleich der ME mit dem jeweiligen Standardvehikel (Kapitel 3.6.4 und 4.5.3) mit anschließendem Dunnett's Test als Post-Hoc Analyse (inerSTAT-a V1.3) durchgeführt. Zum Vergleich der ME untereinander in Kapitel 3.6.2 wurde der Tukey's Test als Post-Hoc Analyse (inerSTAT-a V1.3) verwendet. Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

## 7.9 Substanzen

16-Doxylstearinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland))
Aceton	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Acetonitril	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande); VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)

Bengalrose B	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Brij O20	Croda GmbH (Nettetal, Deutschland)
Butylhydroxytoluol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Cetiol B	Cognis GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Chloroform	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Citronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Dermofeel Ascorbyl Palmitate	Dr. Straetmans GmbH (Hamburg, Deutschland)
Fettsäuregemisch	Oelon GmbH (Emmerich am Rhein, Deutschland)
HD-PMI	Magnettech GmbH (Berlin, Deutschland)
Hydrolite 5	Symrise GmbH & Co. KG (Holzminden, Deutschland)
Isopropylmyristat	Cognis GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Isopropylpalmitat	Fagron GmbH & Co. KG (Barsbüttel, Deutschland)
Linola Fett	Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel (Bielefeld, Deutschland)
Methanol	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande); VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Mometasonfuroat	Almirall Hermal GmbH (Reinbek, Deutschland)
Mycophenolat mofetil	Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz)
Myritol 318	Cognis GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Octanol	Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)
Phospholipon 90G	Phospholipid GmbH (Köln, Deutschland)
Plantacare 1200 UP	Cognis GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Plantacare 2000 UP	Cognis GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Propylenglycol	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Protopic	Astellas Pharma GmbH (München, Deutschland)
Puffersubstanzen	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Rotipuran (PEG 400)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Span 80	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Spezialöl 107	Sasol Germany GmbH (Witten, Deutschland)
Tacrolimus	Bereitstellung durch die Hautklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Tagat S2	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Tegocare CG90	Evonik Goldschmidt GmbH (Essen, Deutschland)
Tegosoft CI	Evonik Goldschmidt GmbH (Essen, Deutschland)
TEMPO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Trimethylsulfoniumhydr oxid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Wasser	Hausleitung Institut für Pharmazie Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
$\alpha$ -Tocopherolacetat	Synopharm GmbH & Co. KG (Barsbüttel, Deutschland)

## 8 Literatur

1. Abels C, Proksch E. Therapy of atopic dermatitis. *Hautarzt* 2006; 57:711-723.
2. Aboofazeli R, Barlow DJ, Lawrence MJ. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: II. Photon correlation spectroscopy. *Aaps Pharmsci* 2000; 2:U175-U188.
3. Aboofazeli R, Lawrence CB, Wicks SR, Lawrence MJ. Investigations into the Formation and Characterization of Phospholipid Microemulsions .3. Pseudo-Ternary Phase-Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Isopropyl Myristate and Either an Alkanoic Acid, Amine, Alkanediol, Polyethylene-Glycol Alkyl Ether or Alcohol as Cosurfactant. *International Journal of Pharmaceutics* 1994; 111:63-72.
4. Aboofazeli R, Patel N, Thomas M, Lawrence MJ. Investigations into the Formation and Characterization of Phospholipid Microemulsions .4. Pseudo-Ternary Phase-Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Alcohol and Oil - the Influence of Oil. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 125:107-116.
5. Acosta EJ, Nguyen T, Witthayapanyanon A, Harwell JH, Sabatini DA. Linker-based bio-compatible microemulsions. *Environmental Science & Technology* 2005; 39:1275-1282.
6. Alaiti S, Kang SW, Fiedler VC, et al. Tacrolimus (FK506) ointment for atopic dermatitis: A phase I study in adults and children. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1998; 38:69-76.
7. Alany RG, Rades T, Nicoll J, Tucker IG, Davies NM. W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *Journal of Controlled Release* 2006; 111:145-152.
8. Alany RG, Tucker IG, Davies NM, Rades T. Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2001; 27:31-38.
9. Althaus S, Prinz D, Weichold C, Dierker M. Kosmetische Zusammensetzungen enthaltend Ester auf Basis von 2-Ethylbutanol EP 1 889 641 A1. Europäisches Patentamt, Deutschland, 2006.
10. AMK Mitteilungen 71/05: Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker. *Deutsche Apothekerzeitung* 2005; 145:3245.
11. Andree H, Middelhaue B. Possibilities of the use of alkylpolyglucosides in detergents and cleaning liquids. *Tenside, Surfactants, Detergents* 1991; 28:413-18.
12. Arellano FM, Wentworth CE, Arana A, Fernandez C, Paul CF. Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127:808-816.
13. Arzneimitteltelegramm 16.02.2005. Tusann PressRue de Provence 4, F-67116 Reichstett, 2005.
14. Ashcroft DM, Dimmock P, Garside R, Stein K, Williams HC. Efficacy and tolerability of topical pimecrolimus and tacrolimus in the treatment of atopic dermatitis: meta-analysis of randomised controlled trials. *British Medical Journal* 2005; 330:516-522.
15. Askin D, Reamer RA, Joe D, Volante RP, Shinkai I. A Mechanistic Study of the Fk-506 Tricarbonyl System Rearrangement - Synthesis of C.9 Labeled Fk-506. *Tetrahedron Letters* 1989; 30:6121-6124.
16. Askin D, Reamer RA, Jones TK, Volante RP, Shinkai I. Chemistry of Fk-506 - Benzilic Acid Rearrangement of the Tricarbonyl System. *Tetrahedron Letters* 1989; 30:671-674.

17. Attwood D. Microemulsions. In: Kreuter J, ed. Colloidal Drug Carrier Systems. Vol. 66 New York: Marcel Dekker, 1994.
18. Attwood D, Ktistis G. A light scattering study on oil-in-water microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 1989; 52:165-171.
19. Avramiotis S, Cazianis CT, Xenakis A. Interfacial Properties of Lecithin Microemulsions in the Presence of Lipase. A Membrane Spin-Probe Study. *Langmuir* 1999; 15:2375-2379.
20. Bach M, Lippold BC. Percutaneous penetration enhancement and its quantification. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1998; 46:1-13.
21. Balzer D. Alkylpolyglucosides, their physicochemical properties and their uses. *Tenside, Surfactants, Detergents* 1991; 28:419-27.
22. Barry BW. Penetration enhancers. In: Shroot B, Schaefer H, eds. *Skin Pharmacokinetics* Basel, München, Paris, London, New York: Karger, 1987.
23. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 14:101-114.
24. Bennett KE, Hatfield JC, Davis HT, Macosko CW, Scriven LE. Viscosity and conductivity of microemulsions. *Microemulsions, [Proc. Conf. Phys. Chem. Microemulsions]* 1982:65-84.
25. Biju SS, Ahuja A, Khar RK. Tea tree oil concentration in follicular casts after topical delivery: Determination by high-performance thin layer chromatography using a perfused bovine udder model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 94:240-245.
26. Billich A, Aschauer H, Aszodi A, Stuetz A. Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 269:29-35.
27. Boguniewicz M, Fiedler VC, Raimer S, et al. A randomized, vehicle-controlled trial of tacrolimus ointment for treatment of atopic dermatitis in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998; 102:637-644.
28. Bonina FP, Montenegro L, Scrofani N, et al. Effects of Phospholipid Based Formulations on in-Vitro and in-Vivo Percutaneous-Absorption of Methyl Nicotinate. *Journal of Controlled Release* 1995; 34:53-63.
29. Bornhovd EC, Schuller E, Bieber T, Wollenberg A. The use of immunosuppressive macrolides in clinical dermatology. *Hautarzt* 2000; 51:646-654.
30. Bos JD, Witkamp L, Zonnevald IM, et al. Systemic tacrolimus (FK 506) is effective for the treatment of psoriasis in a double-blind, placebo-controlled study. *Archives of Dermatology* 1996; 132:419-423.
31. Boutron P, Kaufmann A. Stability of the Amorphous State in the System Water-Glycerol-Ethylene Glycol. *Cryobiology* 1979; 16:83-89.
32. Bouwstra JA, Devries MA, Gooris GS, Bras W, Brussee J, Ponec M. Thermodynamic and Structural Aspects of the Skin Barrier. *Journal of Controlled Release* 1991; 15:209-220.
33. Bouwstra JA, Gooris GS, Dubbelaar FER, Weerheim AM, IJzerman AP, Ponec M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *Journal of Lipid Research* 1998; 39:186-196.
34. Brandt M, Wehling A, Schumpe A. Microemulsions with alkylpolyglucosides. *Chemie Ingenieur Technik* 1997; 69:500-504.
35. Bronaugh RL, Stewart RF. Methods for Invitro Percutaneous-Absorption Studies. 3. Hydrophobic Compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1984; 73:1255-1258.

36. Bronaugh RL, Stewart RF, Simon M. Methods for Invitro Percutaneous-Absorption Studies .7. Use of Excised Human-Skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1986; 75:1094-1097.
37. Burger A, Wachter H. *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, Studienausgabe*. Vol. 7. Auflage: de Gruyter, 1993.
38. Cabral GA. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Sciences* 2005; 77:1699-1710.
39. Calder PC. Abnormal fatty acid profiles occur in atopic dermatitis but what do they mean? *Clinical and Experimental Allergy* 2006; 36:138-141.
40. Carlotti ME, Gasco MR, Trotta M, Morel S. Autoxidation of Linoleic-Acid in Cosmetic Formulations. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 1991; 42:285-298.
41. Chai JL, Li GZ, Zhang GY, Lou AJ, Zhang J, Zhang Y. Middle-phase microemulsions of green surfactant alkyl polyglucosides. *Science in China Series B-Chemistry* 2003; 46:25-34.
42. Changez M, Chander J, Dinda AK. Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: In vivo. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2006; 48:58-66.
43. Changez M, Varshney M, Chander J, Dinda AK. Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: In vitro. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2006; 50:18-25.
44. Chen HB, Chang XL, Weng T, et al. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *Journal of Controlled Release* 2004; 98:427-436.
45. Christophers E, Mrowietz U, Sterry W. *Psoriasis-Auf einen Blick* Stuttgart: Georg Thieme, 2002.
46. Cimato AN, Piehl LL, Facorro GB, Torti HB, Hager AA. Antioxidant effects of water- and lipid-soluble nitroxide radicals in liposomes. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37:2042-2051.
47. Coderch L, Lopez O, de la Maza A, Parra JL. Ceramides and skin function. *American Journal of Clinical Dermatology* 2003; 4:107-129.
48. Daniels R. Strategien zur Verbesserung der Hautpenetration. *Skin Care Forum* 2004; 37
49. Danielsson I, Lindman B. The definition of microemulsion. *Colloids and Surfaces* 1981; 3:391-2.
50. DAZ. *Deutsche Apothekerzeitung* 12/2002 2002; 142 (2):1485-1486.
51. De Gennes PG, Taupin C. Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces. *Journal of Physical Chemistry* 1982; 86:2294-304.
52. de Jager M, Gooris G, Ponc M, Bouwstra J. Acylceramide head group architecture affects lipid organization in synthetic ceramide mixtures. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 123:911-916.
53. Delgado-Charro M, Iglesias-Vilas G, Blanco-Mendez J, Lopez-Quintela M, Marty J, Guy R. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1997; 43:37-42.
54. Demetris AJ, Fung JJ, Todo S, et al. Fk-506 Used as Rescue Therapy for Human Liver Allograft Recipients. *Transplantation Proceedings* 1991; 23:3005-3006.
55. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129:1339-1350.

56. Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D. Characterization of caprylo-caproyl macroglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 271:11-19.
57. Doerfler HD, Grosse A. Applications of microemulsions with different compositions in detergents technique. *Progress in Colloid & Polymer Science* 1996; 101:113-115.
58. Eccleston G. Microemulsions. In: Swarbrick J, Boylan J, eds. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Vol. 9 New York: Marcel Dekker, 1994.
59. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983; 80 Suppl:44s-49s.
60. Erdogan M, Wright JR, McAlister VC. Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model. *British Journal of Dermatology* 2002; 146:964-967.
61. Fachinformation Protopic 0,1 % Salbe; Astellas Pharma GmbH. München, 2006.
62. Fang J-Y, Hwang T-L, Huang Y-L. Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes. *Current Nanoscience* 2006; 2:55-70.
63. Fanun M. Properties of microemulsions with sugar surfactants and peppermint oil. *Colloid and Polymer Science* 2009; 287:899-910.
64. Fiedler H. *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete* Aulendorf: Editio Cantor Verlag, 2002.
65. Foerster T, Guckenbiehl B, Hensen H, Von Rybinski W. Physico-chemical basics of microemulsions with alkyl polyglycosides. *Progress in Colloid & Polymer Science* 1996; 101:105-112.
66. Franz TJ. Percutaneous Absorption - Relevance of Invitro Data. *Journal of Investigative Dermatology* 1975; 64:190-195.
67. Franz TJ, Barker EA. Finite Dose Technique as a Valid Invitro Model for Study of Percutaneous Absorption in Man. *Clinical Research* 1977; 25:A198-A198.
68. Freeman AK, Linowski GJ, Brady C, et al. Tacrolimus ointment for the treatment of psoriasis on the face and intertriginous areas. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2003; 48:564-568.
69. Fritsch P. *Dermatologie und Venerologie* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2004.
70. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin Phosphatase-Activity in Lymphocytes-T Is Inhibited by Fk-506 and Cyclosporine-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89:3686-3690.
71. Garcia MT, Ribosa I, Campos E, Sanchez Leal J. Ecological properties of alkylglucosides. *Chemosphere* 1997; 35:545-556.
72. Georges J, Chen JW. Microemulsions Studies - Correlation between Viscosity, Electrical-Conductivity and Electrochemical and Fluorescent-Probe Measurements. *Colloid and Polymer Science* 1986; 264:896-902.
73. Glatter O, Orthaber D, Stradner A, et al. Sugar-ester nonionic microemulsion: Structural characterization. *Journal of Colloid and Interface Science* 2001; 241:215-225.
74. Goebel A, Neubert RHH. Dermal Peptide Delivery Using Colloidal Carrier Systems. *Skin Pharmacology and Physiology* 2008; 21:3-9.
75. Goebel A, Schmaus G, Wohlrab J, Pillai R, Neubert RHH. 1,2-pentanediol enhances cutaneous penetration and bioavailability of active ingredients. *Journal of the American Academy of Dermatology Poster Abstracts, American Academy of Dermatology 67th Annual Meeting* 2009; 60:AB82.

76. Goebel A, Wohlrab J, Neubert R. Quantification of Tacrolimus in Human Skin Samples and Ointment by LC-MS. *Chromatographia* 2009; 70:581-584.
77. Goebel ASB, Knie, U., Abels, C, Wohlrab, J, Neubert, R.H.H.: A novel microemulsion system for improved and specific skin penetration of linoleic acids. *European Journal of pharmaceutical sciences*; eingereicht am 23.10.2009
78. Gradzielski M, Hoffman H. Rheological Properties of Microemulsions. In: Kumar P, Mittal K, eds. *Handbook of Microemulsion Science and Technology* New York: Marcel Dekker Inc, 1999.
79. Graf A, Ablinger E, Peters S, Zimmer A, Hook S, Rades T. Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: Nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 350:351-360.
80. Gupta AK, Adamiak A, Chow M. Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2002; 16:100-114.
81. Hadgraft J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 224:1-18.
82. Haridas A, Suresh S, Chitra KR, Manilal VB. The Buoyant Filter Bioreactor: a high-rate anaerobic reactor for complex wastewater--process dynamics with dairy effluent. *Water Research* 2005; 39:993-1004.
83. Harrison SM, Barry BW, Dugard PH. Effects of Freezing on Human-Skin Permeability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1984; 36:261-262.
84. Hatz HJ. Glucocorticoide. In: *Kompendium M*, ed. Ammon, HPT; Werning C. Vol. 12726. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1998.
85. Heinz A. Entwicklung und Charakterisierung von phospholipidhaltigen W/O-Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung, Diplomarbeit: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2005.
86. Hensen H. E-Mail KorrespondenzDüsseldorf: , e-mail correspondence, Cognis GmbH, Application Technology Hair Body Oral Care, 2009.
87. Heuschkel S, Goebel A, Neubert RHH. Microemulsions - Modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 97:603-631.
88. Heuschkel S, Wohlrab J, Neubert RHH. Dermal and transdermal targeting of dihydroavanthramide D using enhancer molecules and novel microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 72:552-560.
89. Heuschkel S, Wohlrab J, Schmaus G, Neubert RHH. Modulation of Dihydroavanthramide D release and skin penetration by 1,2-alkanediols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008; 70:239-247.
90. Hoar T, Schulman J. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. *Nature (London, United Kingdom)* 1943; 152:102-103.
91. Holleran WM, Man MQ, Wen NG, Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Sphingolipids Are Required for Mammalian Epidermal Barrier Function - Inhibition of Sphingolipid Synthesis Delays Barrier Recovery after Acute Perturbation. *Journal of Clinical Investigation* 1991; 88:1338-1345.
92. Honbo T, Kobayashi M, Hane K, Hata T, Ueda Y. The oral dosage form of FK-506. *Transplantation Proceedings* 1987; 19:17-22.
93. Horrobin DF. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 71:367S-372S.
94. Horsch W. Transportmechanismen und Einflussfaktoren in den Systemen Salbe/Haut und Arzneistoff/salbegrundlage. *Pharmazie* 1984; 39:598-605.
95. Houtsmuller UMT, Van der Beek A. Effects of topical application of fatty acids. *Progress in Lipid Research* 1981; 20:219-24.

96. Howard PH, Meylan WM, Editors. Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals 2112 pp. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1997.
97. Hua L, Weisan P, Jiayu L, Ying Z. Preparation, evaluation, and NMR characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2004; 30:657-666.
98. Jahn K. *Moderne galenische Zubereitungen zur dermalen Anwendung von Ciclosporin A und Mycophenolatmofetil* Halle Wittenberg, Germany: Martin Luther University, 2002.
99. Jahn W, Strey R. Microstructure of Microemulsions by Freeze-Fracture Electron-Microscopy. *Journal of Physical Chemistry* 1988; 92:2294-2301.
100. Jegasothy BV, Ackerman CD, Todo S, Fung JJ, Abuelmagd K, Starzl TE. Tacrolimus (Fk-506) - a New Therapeutic Agent for Severe Recalcitrant Psoriasis. *Archives of Dermatology* 1992; 128:781-785.
101. Jeschke G. *Einführung in die ESR-Spektroskopie*. Skript. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 1998.
102. Jeschke G. *Structure Determination II (ESR, NMR)*. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 2003.
103. Jirapongsananuruk O, Hofer MF, Trumble AE, Norris DA, Leung DYM. Enhanced expression of B7.2 (CD86) in patients with atopic dermatitis: A potential role in the modulation of IgE synthesis. *Journal of Immunology* 1998; 160:4622-4627.
104. Jung S, Patzelt A, Otberg N, Thiede G, Sterry W, Lademann J. Strategy of topical vaccination with nanoparticles. *Journal of Biomedical Optics* 2009; 14:021001/1-021001/7.
105. Junginger H, Heering W. Darstellung kolloidaler Strukturen von Salben, Cremes, Emulsionen und Mikroemulsionen mittels Gefrierbruch-Ätztechnik und TEM. *Acta Pharmaceutica Technologica* 1983; 29:85-96.
106. Kahlweit M, Busse G, Faulhaber B. Preparing nontoxic microemulsions with alkyl monoglucosides and the role of alkanediols as cosolvents. *Langmuir* 1996; 12:861-862.
107. Kahlweit M, Busse G, Faulhaber B, Eibl H. Preparing Nontoxic Microemulsions. *Langmuir* 1995; 11:4185-4187.
108. Kang K, Polster A, Nedorost S, Stevens S, Cooper K. Atopic Dermatitis. In: Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, eds. *Dermatology*. Vol. 1 199-214. Edinburgh-London New York Oxford Philadelphia St Louis Sydney Toronto: Mosby, 2003.
109. Keck CM, Hommoss AH, Mueller RH. Lipid nanoparticles for encapsulation of actives: dermal & oral formulations. *American Pharmaceutical Review* 2007; 10:78, 80-82.
110. Keipert S, Siebenbrodt I, Luders F, Bornschein M. Microemulsions and Their Potential Pharmaceutical Application. *Pharmazie* 1989; 44:433-444.
111. Kemken J, Ziegler A, Muller BW. Investigations into the Pharmacodynamic Effects of Dermal Administered Microemulsions Containing Beta-Blockers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1991; 43:679-684.
112. Kemken J, Ziegler A, Muller BW. Influence of Supersaturation on the Pharmacodynamic Effect of Bupranolol after Dermal Administration Using Microemulsions as Vehicle. *Pharmaceutical Research* 1992; 9:554-558.
113. Kessner D, Kiselev M, Dante S, et al. Arrangement of ceramide [EOS] in a stratum corneum lipid model matrix: new aspects revealed by neutron diffraction studies. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 2008; 37:989-999.
114. Knie U. E-Mail Korrespondenz Bielefeld: Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel, 2009.

115. Köszegei D, Nothhelfer B, Leimbeck R. Der HET-CAM-Test (Hühner-Ei-Test-Chorioallantoismembran). *Euro Cosmetics* 6 1999:29-33.
116. Kreilgaard M, Pedersen EJ, Jaroszewski JW. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *Journal of Controlled Release* 2000; 69:421-433.
117. Kroft EBM, Erceg A, Maimets K, Vissers W, van der Valk PGM, van de Kerkhof PCM. Tacrolimus ointment for the treatment of severe facial plaque psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2005; 19:249-251.
118. Kroll C. Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Untersuchungen. Dissertation Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin, 1999.
119. Ktistis G. A viscosity study on oil-in-water microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 1990; 61:213-18.
120. Kuehn AV, Neubert RHH. Characterization of mixtures of alkyl polyglycosides (plantacare) by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pharmaceutical Research* 2004; 21:2347-2353.
121. Lademann J, Otberg N, Richter H, et al. Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances. *Hautarzt* 2003; 54:321-323.
122. Lademann J, Richter H, Teichmann A, et al. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 66:159-164.
123. Lam AC, Schechter RS. The Theory of Diffusion in Microemulsion. *Journal of Colloid and Interface Science* 1987; 120:56-63.
124. Lane BC, Miller LN, Kawai M, et al. Evaluation of Calcineurin Role in the Immunosuppressive Activity of Fk-506, Related Macrolactams, and Cyclosporine. *Transplantation Proceedings* 1993; 25:644-646.
125. Lange S, Schmaus G. E-Mail Korrespondenz Holzminden: Symrise AG, 2009.
126. Langguth P, Fricker G, Wunderli-Allenspach G. Biopharmazie Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
127. Lauerma AI, Maibach HI, Granlund H, Erkkö P, Kartamaa M, Stubb S. Inhibition of Contact Allergy Reactions by Topical Fk506. *Lancet* 1992; 340:556-556.
128. Lauerma AI, Stein BD, Homey B, Lee CH, Bloom E, Maibach HI. Topical Fk506 - Suppression of Allergic and Irritant Contact-Dermatitis in the Guinea-Pig. *Archives of Dermatological Research* 1994; 286:337-340.
129. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 45:89-121.
130. Lebwohl M, Freeman A, Chapman MS, Feldman S, Hartle J, Henning A. Proven efficacy of tacrolimus for facial and intertriginous psoriasis. *Archives of Dermatology* 2005; 141:1154-1154.
131. Lebwohl M, Freeman AK, Chapman MS, et al. Tacrolimus ointment is effective for facial and intertriginous psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2004; 51:723-730.
132. Lehmann L, Keipert S, Gloor M. Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2001; 52:129-136.
133. Lew W, Bowcock AM, Krueger JG. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and 'type 1' inflammatory gene expression. *Trends in Immunology* 2004; 25:295-305.

134. Liu J, Albers MW, Wandless TJ, et al. Inhibition of T-Cell Signaling by Immuno-philin Ligand Complexes Correlates with Loss of Calcineurin Phosphatase-Activity. *Biochemistry* 1992; 31:3896-3901.
135. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporine-a and Fkbp-Fk506 Complexes. *Cell* 1991; 66:807-815.
136. Lucangioli SE, Kenndler E, Carlucci A, Tripodi VP, Scioscia SL, Carducci CN. Relation between retention factors of immunosuppressive drugs in microemulsion electrokinetic chromatography with biosurfactants and octanol-water partition coefficients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; 33:871-878.
137. Maeder K. Pharmazeutische Anwendungen der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR). *PZ Prisma* 1998; 5 (3):202-212.
138. Maurer D, Stingl G. Atopische Dermatitis. In: Heppt W, Renz H, Röcken M, eds. *Allergologie* 185-192. Berlin Heidelberg: Springer, 1998.
139. Mehta SK, Bala K. Volumetric and Transport-Properties in Microemulsions and the Point-of-View of Percolation Theory. *Physical Review E* 1995; 51:5732-5737.
140. Meingassner JG, Aschauer H, Stuetz A, Billich A. Pimecrolimus permeates less than tacrolimus through normal, inflamed, or corticosteroid-pretreated skin. *Experimental Dermatology* 2005; 14:752-757.
141. Merck Index - an encyclopaedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station, NJ, USA: Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., INC., 2001.
142. Minghetti P, Casiraghi A, Cilurzo F, et al. Comparison of different membranes with cultures of keratinocytes from man for percutaneous absorption of nitroglycerine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1999; 51:673-678.
143. Moreno MA, Ballesteros MP, Frutos P. Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: Pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 92:1428-1437.
144. Morris R. Modes of Action of Fk506, Cyclosporine-a, and Rapamycin. *Transplantation Proceedings* 1994; 26:3272-3275.
145. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide Composition of the Psoriatic Scale. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1993; 1182:147-151.
146. Motta S, Sesana S, Monti M, Giuliani A, Caputo R. Interlamellar Lipid Differences between Normal and Psoriatic Stratum-Corneum. *Acta Dermato-Venereologica* 1994; 74:131-132.
147. Moulik SP, Paul BK. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 1998; 78:99-195.
148. Mueller B, Kleinebudde B. So-called microemulsion systems. Part 1. Drug-free systems. *Pharmazeutische Industrie* 1988; 50:370-375.
149. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer K, Schäfer-Korting M. Mikronährstoffe: Vitamine und Spurenelemente. in Mutschler *Arzneimittelwirkungen* 735-756. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001.
150. Neubert R, Wohlrab W, Marsch W. *Dermatopharmazie: Vehikel-Wirkstoffe-Pharmakologie* 178. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001.
151. Neubert RHH, Schmalfluss U, Wolf R, Wohlrab WA. Microemulsions as colloidal vehicle systems for dermal drug delivery. Part V: Microemulsions without and with glycolipid as penetration enhancer. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 94:821-827.
152. Niedner R. Erythemato-squamöse Hauterkrankungen. In: Niedner R, Ziegenmeyer J, eds. *Dermatika- Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1992.

153. Osborne DW, Ward AJI, Oneill KJ. Microemulsions as Topical Drug Delivery Vehicles - Invitro Transdermal Studies of a Model Hydrophilic Drug. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1991; 43:451-454.
154. Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 122:14-19.
155. Paller AS, Lebwohl M, Fleischer AB, et al. Tacrolimus ointment is more effective than pimecrolimus cream with a similar safety profile in the treatment of atopic dermatitis: Results from 3 randomized, comparative studies. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005; 52:810-822.
156. Paolino D, Ventura CA, Nisticone S, Puglisi G, Fresta M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 244:21-31.
157. Pardeike J, Hommoss A, Mueller RH. Lipid nanoparticles in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 366:170-184.
158. Park SJ, Won JH, Lim JC, Kim AH, Park S. Phase behavior and characterization of W/O microemulsion systems containing sodium dodecyl sulfate/butyl lactate/isopropyl myristate/water. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2005; 11:20-26.
159. Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, et al. Allergen-Specific and Bacterial Antigen-Specific T-Cell Clones Established from Atopic Donors Show a Different Profile of Cytokine Production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88:4538-4542.
160. Pastore S, Corinti S, La Placa M, Didona B, Girolomoni G. Interferon-gamma promotes exaggerated cytokine production in keratinocytes cultured from patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998; 101:538-544.
161. Peltola S, Saarinen-Savolainen R, Kiesvaara J, Suhonen TM, Urtti A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 254:99-107.
162. Ph.Eur. Europäisches Arzneibuch, Amtliche deutsche Ausgabe, Band 1 Allgemeiner Teil & Monographiengruppen, Kapitel 1.4. Monographien Stuttgart, Eschborn: Deutscher Apotheker Verlag, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH, 2008.
163. Pillai R, Schmaus G, Lange S, Roeding J. 1,2-Pentanediol - a multifunctional ingredient for personal care applications. *SOFW Journal* 2005; 131:13-17, 20-22.
164. Podlogar F, Gasperlin M, Tomsic M, Jamnik A, Rogac MB. Structural characterization of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 276:115-128.
165. Podlogar F, Rogac MB, Gasperlin M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40 (R)-Imwitor 308 (R)-IPM microemulsions on ketoprofen release. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 302:68-77.
166. Prince LM. *Microemulsions - theory and practice* New York, San Francisco, London: Academic Press, 1977.
167. Produktinformation Cetiol B. Düsseldorf: Cognis GmbH.
168. Produktinformation Myritol 318. Düsseldorf: Cognis GmbH, 2009.
169. Produktinformation Plantacare 1200 UP. Düsseldorf: Cognis GmbH, 2006.
170. Produktinformation Spezialöl 107. Witten: Sasol Germany GmbH, 2005.
171. Produktinformation Tegocare CG 90. Essen: Evonik Goldschmidt GmbH, 2002.

172. Produktinformation Tegosoft CI. Essen: Evonik Goldschmidt GmbH, 1999.
173. Proksch E, Holleran WM, Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Barrier Function Regulates Epidermal Lipid and DNA-Synthesis. *British Journal of Dermatology* 1993; 128:473-482.
174. Qin Y, Zhang GY, Zhang J, Zhao YM, Zhao JL. Primary aerobic biodegradation of linear and oxo alcohol alkylpolyglucosides (APG). *Journal of Surfactants and Detergents* 2006; 9:227-230.
175. Raney S, Lehman P, Franz T. 30th Anniversary of the Franz Cell Finite Dose Model: the crystal ball of topical drug development. *Drug Delivery Technology* 2008; 8:32-34, 36-37.
176. Raufast V, Mavon A. Transfollicular delivery of linoleic acid in human scalp skin: permeation study and microautoradiographic analysis. *International Journal of Cosmetic Science* 2006; 28:117-123.
177. Reinhard E. *Pharmazeutische Biologie* 594. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001.
178. Reitamo S. Tacrolimus: A new topical immunomodulatory therapy for atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 107:445-448.
179. Remitz A, Reitamo S, Erkkö P, Granlund H, Lauerma AI. Tacrolimus ointment improves psoriasis in a microplaque assay. *British Journal of Dermatology* 1999; 141:103-7.
180. Rincker R. Herstellung und Qualitätskontrolle der Dermatika. In: Niedner R, Ziegenmeyer J, eds. *Dermatika- Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie* 517-633. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1992.
181. Roguet R, Lotte C, Berrebi C, et al. In vivo Distribution of Linoleic-Acid in Hairless Rat Skin Following Topical Administration. *Archives of Dermatological Research* 1986; 278:503-506.
182. Rowe R, Sheskey P, Weller P. *Handbook of pharmaceutical excipients* Bath: The Bath Press, 2003.
183. Ruebe A. Development and physico-chemical characterization of nanocapsules. Dissertation: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2006.
184. Rupprecht H. *Immunsuppression* München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer, 2005.
185. Rustin MHA. The safety of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis: a review. *British Journal of Dermatology* 2007; 157:861-873.
186. Ruth HS, Attwood D, Ktistis G, Taylor CJ. Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 116:253-61.
187. Ruzicka T, Bieber T, Schopf E, et al. A short-term trial of tacrolimus ointment for atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine* 1997; 337:816-821.
188. Saint Ruth H, Attwood D, Ktistis G, Taylor CJ. Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 116:253-261.
189. Scheuplein RJ. Percutaneous absorption after twenty-five years: or "old wine in new wineskins". *J Invest Dermatol* 1976; 67:31-8.
190. Schneider IM, Wohlrab W, Neubert R. Fatty acids and the epidermis. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 1997; 48:303-10.
191. Schubert C. Frequently diagnosed inflammatory dermatoses. *Pathologe* 2002; 23:9-19.
192. Schubert C, Rudolph P. Entzündliche Hauterkrankungen (nicht infektiös) (Superfizielles, superfizielles und tiefes Infiltrat; Follikulitis und Perifollikulitis; Pannikulitis). In: Cardesa A, Rudolph P, Mentzel T, Sloatweg P, eds. *Pathologie* 3

- Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut 613-699. Berlin Heidelberg: Springer, 2009.
193. Schulman JH, Stoeckenius W, Prince LM. Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. *Journal of Physical Chemistry* 1959; 63:1677-1680.
  194. SciFinderScholar. Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris, TM 2007.
  195. Scriven LE. Equilibrium Bicontinuous Structure. *Nature* 1976; 263:123-125.
  196. Serhan CN, Jain A, Marleau S, et al. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *Journal of Immunology* 2003; 171:6856-6865.
  197. Shukla A, Janich M, Jahn K, Krause A, Kiselev MA, Neubert RH. Investigation of pharmaceutical oil/water microemulsions by small-angle scattering. *Pharm Res* 2002; 19:881-6.
  198. Shukla A, Krause A, Neubert RHH. Microemulsions as colloidal vehicle systems for dermal drug delivery. Part IV: investigation of microemulsion systems based on a eutectic mixture of lidocaine and prilocaine as the colloidal phase by dynamic light scattering. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2003; 55:741-748.
  199. Sicherheitsdatenblatt Phospholipon 90G. Köln: Phospholipid GmbH, 2004.
  200. Simonetti O, Hoogstraate AJ, Bialik W, et al. Visualization of Diffusion Pathways across the Stratum-Corneum of Native and in-Vitro-Reconstructed Epidermis by Confocal Laser-Scanning Microscopy. *Archives of Dermatological Research* 1995; 287:465-473.
  201. Singalavanija S, Noppakun N, Limpongsanuruk W, et al. Efficacy and safety of tacrolimus ointment in pediatric Patients with moderate to severe atopic dermatitis. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* 2006; 89:1915-22.
  202. Sintov AC, Shapiro L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *Journal of Controlled Release* 2004; 95:173-183.
  203. Souto EB, Almeida AJ, Muller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2007; 3:317-331.
  204. SPC. Fachinformation Linola Fett; Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel, 2008.
  205. Spornath A, Aserin A, Garti N. Phase transition induced by water dilution in phospholipid U-type food-grade microemulsions studied by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2006; 83:297-308.
  206. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. Fk-506 for Liver, Kidney, and Pancreas Transplantation. *Lancet* 1989; 2:1000-1004.
  207. Steber J, Guhl W, Stelter N, Schroeder FR. Alkyl polyglycosides - ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside, Surfactants, Detergents* 1995; 32:515-21.
  208. Steele JA, Choi C, Kwong PC. Topical tacrolimus in the treatment of inverse psoriasis in children. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005; 53:713-716.
  209. Stingl G. IgE-mediated, Fc epsilon RI-dependent allergen presentation: A pathogenetic factor in atopic dermatitis? *Journal of the American Academy of Dermatology* 2001; 45:S17-S20.
  210. Strey R. Microemulsion Microstructure and Interfacial Curvature. *Colloid and Polymer Science* 1994; 272:1005-1019.

211. Stryer L. Stoffwechselenergie: Erzeugung und Speicherung: Der Fettstoffwechsel. Biochemie 465-711. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1996.
212. Subramanian N, Ghosal SK, Acharya A, Moulik SP. Formulation and physico-chemical characterization of microemulsion system using isopropyl myristate, medium-chain glyceride, polysorbate 80 and water. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 2005; 53:1530-1535.
213. Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, et al. Structure of Fk506 - a Novel Immunosuppressant Isolated from Streptomyces. Journal of the American Chemical Society 1987; 109:5031-5033.
214. Taylor LJ, Lee RS, Long M, et al. Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol. International Journal of Pharmaceutics 2002; 249:157-164.
215. Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U, et al. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2007; 67:699-706.
216. Thevenin MA, Grossiord JL, Poelman MC. Sucrose esters cosurfactant microemulsion systems for transdermal delivery: Assessment of bicontinuous structures. International Journal of Pharmaceutics 1996; 137:177-186.
217. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Ernährung. in Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen 313-338. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999.
218. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): Molecular and cellular mechanisms. Therapeutic Drug Monitoring 1995; 17:584-91.
219. Thong HY, Zhai H, Maibach HI. Percutaneous penetration enhancers: An overview. Skin Pharmacology and Physiology 2007; 20:272-282.
220. Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration - A review. Skin Pharmacology and Physiology 2006; 19:106-121.
221. Trotta M, Morel S, Gasco MR. Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from O/W microemulsions. Pharmazie 1997; 52:50-53.
222. van de Kerkhof P. Psoriasis. In: Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, eds. Dermatology. Vol. 1125-149. Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St Louis Sydney Toronto: Mosby, 2003.
223. Viefhaus A, Goldscheider A. Handbuch- Cognis Kit für Haushalt und Kosmetik, Düsseldorf: Cognis Deutschland GmbH & Co. KG.
224. Wasserbauer N, Ballow M. Atopic Dermatitis. American Journal of Medicine 2009; 122:121-125.
225. Wepf R, Neubert R. Stratum corneum - Struktur und Morphologie einer hoch effizienten Barriere. Pharmazeutische Zeitung 2007; 17:14.
226. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. Advanced Drug Delivery Reviews Breaking the Skin Barrier 2004; 56:603-618.
227. Wohlrab J. Der Einfluss von L-Arginin auf die Regulation der epidermalen Arginase Halle: Martin Luther University Halle-Wittenberg, 2001.
228. Wohlrab J. Calcineurin inhibitors for topical therapy in psoriasis. Hautarzt 2006; 57:685-689.
229. Wokalek H. Die Haut. In: Niedner R, Ziegenmeyer J, eds. Dermatika- Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1992.

230. Yagmur A, Aserin A, Garti N. Phase behavior of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: effect of polyols and short-chairs alcohols. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 2002; 209:71-81.
231. Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y. Stratum-Corneum Lipid Abnormalities in Atopic-Dermatitis. *Archives of Dermatological Research* 1991; 283:219-223.
232. Yamamoto T, Nishioka K. Topical tacrolimus is effective for facial lesions of psoriasis. *Acta Dermato-Venereologica* 2000; 80:451-451.
233. Yamamoto T, Nishioka K. Successful treatment with topical tacrolimus for oral psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2006; 20:1137-8.
234. Yoshida H, Tamura S, Toyoda T, Kado K, Ohnishi N, Ibuki R. In vitro release of Tacrolimus from Tacrolimus ointment and its speculated mechanism. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 270:55-64.
235. Yuan Y, Li SM, Mo FK, Zhong DF. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 321:117-123.
236. Zhang J, Purdon CH, Smith EW. Solid lipid nanoparticles for topical drug delivery. *American Journal of Drug Delivery* 2006; 4:215-220.
237. Ziegenmeyer J. Transdermale Applikation von Arzneistoffen. *Pharmazeutische Zeitung* 1989; 134:1085-1091.
238. Ziegenmeyer J. Biopharmazeutische Aspekte bei der Anwendung von Dermatika. In: Niedner R, Ziegenmeyer J, eds. *Dermatika-Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie* 342-307. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1992.
239. Zonneveld IM, Rubins A, Jablonska S, et al. Topical tacrolimus is not effective in chronic plaque psoriasis - A pilot study. *Archives of Dermatology* 1998; 134:1101-1102.

---

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die Anteil am Entstehen dieser Arbeit hatten.

Bedanken möchte ich bei Prof. Dr. Dr. R. Neubert für die Betreuung, Unterstützung sowie zahlreichen Anregungen und der mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung der Problematik meines interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. J. Wohlrab danke ich für die Beratung und Unterstützung sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung der Penetrationsstudien und der HET CAM-Untersuchungen an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Besonderer Dank gilt dabei auch seinen beiden Mitarbeiterinnen Frau U. Schramm und Frau K. Hölsken für ihre technische Assistenz.

Gedankt sei auch allen Arbeitsgruppen, die zur Charakterisierung der Mikroemulsionssysteme beigetragen haben. Bei Frau K. Schwarz bedanke ich mich für die Durchführung der DSC-Messungen. Vom Institut für Physik sei Herrn Dr. K. Schröter und Frau K. Herfurt der Arbeitsgruppe Polymerphysik für die rheologischen Messungen und vom Institut für Chemie sei Herrn Dr. K. Busse für die Hilfe bei der Durchführung der Lichtstreuexperimente gedankt. Herrn Dr. G. Hause vom Biozentrum, Abteilung Bildgebende Verfahren danke ich für die TEM-Aufnahmen. Prof. Dr. H.-H. Rüttinger und seinen Mitarbeiterinnen gilt mein Dank für die Unterstützung bei den CE-Experimenten. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. H. Metz für seine Hilfe bei den ESR-Messungen sowie bei deren Auswertung und seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Biopharmazie für ihre Hilfsbereitschaft sowie die freundschaftliche Atmosphäre, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Frau M. Lackner, Frau A. Nies und Frau M. Woigk sei für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente gedankt. Sandra Heuschkel gilt mein besonderer Dank für ihre unermüdliche Gesprächsbereitschaft und Hilfe bei pharmazeutischen Fragestellungen. Dr. Andrea Heinz und Aniela Mößner danke ich für die gründliche Durchsicht des Manuskripts.

Den Firmen Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel, Symrise GmbH & Co. KG, Cognis GmbH, Evonik Goldschmidt GmbH, Dr. Straetmans GmbH und Phospholipid GmbH danke ich für die Bereitstellung von Hilfsstoffmustern.

Einen herzlichen Dank richte ich an meine Familie und Freunde, insbesondere an meine Eltern und Oliver.

---

## Publikationsliste

### Patente

Göbel, A.S.B.; Novel pharmaceutical composition comprising a macrolide immunosuppressant drug; *Europäische Patentanmeldung*, eingereicht am 08.10.2009, Anmeldenummer: 09012724.2 (EP09012724)

Göbel, A.S.B.; Galenische Formulierung in kolloidaler Form; *Europäische Patentanmeldung*, eingereicht am 22.09.2009, Anmeldenummer: 09012046.0 (EP09012046)

### Fachzeitschriftenbeiträge mit Gutachtersystem

Goebel, A.S.B., Knie, U., Abels, C, Wohlrab, J, Neubert, R.H.H.; A novel microemulsion system for improved and specific skin penetration of linoleic acids; *European Journal of pharmaceutical sciences*, eingereicht 23.10.2009

Goebel, A.S.B., Wohlrab, J., Neubert, R.H.H.; Quantification of Tacrolimus in Human Skin Samples and Ointment by LC-MS; *Chromatographia*, 70: 581-584; 2009

Heuschkel, S., Goebel, A., and Neubert, R. H. H.; Microemulsions – Modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97: 603-631; 2008

Goebel, A. and Neubert, R. H. H.; Dermal Peptide Delivery Using Colloidal Carrier Systems; *Skin Pharmacology and Physiology*, 21: 3-9; 2008

### Tagungsbeiträge

Goebel, A.S.B., Knie, U., Abels, C, Wohlrab, J, Neubert, R.H.H.; Improved Skin Penetration of Linoleic Acid using a Microemulsion System; *Gordon Research Conference on Barrier Function of Mammalian Skin*; Waterville Valley, NH, USA; 2009 (Poster)

Goebel, A.S.B., Guenther, U., Neubert, R.H.H.; Permeation behaviour of diclofenac-sodium through stratum corneum model membranes; *5th Polish-German Symposium*; Poznan, Polen; 2009 (Poster)

Goebel, A.S.B., Wohlrab, J., Pillai, R., Schmaus, G., Neubert, R.H.H.; 1,2-Pentandiol Enhances Cutaneous Penetration and Bioavailability of Active Ingredients; *67th Annual Meeting of the American Academy of Dermatology*; San Francisco, USA; 2009 (Poster)

Goebel, A.S.B.; Guenther, U., Neubert, R.H.H.; Barrier properties of different ceramides in stratum corneum model membranes; *Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting*, Halle (Saale), Germany; 2009 (Poster)

Goebel, A.S.B., Wohlrab, J., Neubert, R.H.H.; Cutaneous Penetration Enhancement of Tacrolimus Using Colloidal Carrier Systems; *Skin and Formulation, 3rd Symposium, Skin Forum, 10th Annual Meeting*; Versailles, France; 2009 (Vortrag, Skin Forum bursary award)

Goebel, A.S.B., Metz, H., Wepf, R., Neubert R.H.H.; Structure characterization of New Type Glycolipid Based Microemulsions for Dermal Drug Delivery; *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Bonn, Germany; 2008 (Poster)

---

Wohlrab, J., Heuschkel, S., Goebel, A., Schmaus, G., Neubert R.H.H.; Penetration Profile and Distribution of 4-(1-Phenylethyl)1,3-Benzenediol (BIO 377) in Human Skin; *6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*; Barcelona, Spain; 2008 (Poster)

Göbel, A., Wohlrab, J., Neubert R.H.H.; Penetrationsverbesserung des Immunmodulators Tacrolimus mithilfe kolloidaler Carrier; *Mitteldeutsche Doktorandentagung*, Bitterfeld, Germany; 2007 (Vortrag)

Goebel, A., Wepf R., Neubert R.H.H.; Structure Investigations of Microemulsions by Freeze Fracture Scanning Electron Microscopy; *4th Polish-German Symposium*; Halle (Saale), Germany; 2007 (Poster)

### **Wettbewerbsbeiträge**

Göbel, A.S.B., Sporn, C.; Innovative Vehikelsysteme für hautprotektive Membranlipide; *Wettbewerbsbeitrag zum IQ Innovationspreis Mitteldeutschland*; Halle, Deutschland; 2009 (3. Platz im Rahmen des Sonderpreises der Stadt Halle)

Göbel, A.; Fluctuating structures; *Wettbewerbsbeitrag zum 3. nano+art Wettbewerb*; Halle, Deutschland; 2008

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Alexandra Sabine Bärbel Göbel  
Geburtsdatum: 16. Oktober 1980  
Geburtsort: Hanau  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulische Ausbildung

1987-1991 Grundschole Bruchköbel Roßdorf  
1991-1993 Heinrich-Böll-Gesamtschole Bruchköbel  
1993-2000 Hohe Landesschole Hanau (Abitur)

## Berufsausbildung

Okt. 2000 - Okt.2004 Studium der Pharmazie, Johann-Wolfgang-Goethe  
Universität Frankfurt am Main  
Sept. 2002 1.Staatsexamen Pharmazie  
Okt. 2004 2.Staatsexamen Pharmazie  
Nov. 2004 - Apr. 2005 Pharmaziepraktikum in der Schwanenapotheke,  
Frankfurt am Main  
Mai 2005 - Nov. 2005 Pharmaziepraktikum bei sanofi-aventis Pharma GmbH  
Abteilung D & A Pharmaceutical Sciences, Frankfurt am Main  
Dez. 2005 3. Staatsexamen Pharmazie  
Dez. 2005 Erteilung der Approbation als Apothekerin  
Dez. 2005 - Aug. 2006 Mitarbeiterin in der Rathaus Apotheke, Bruchköbel Roßdorf  
Sept. 2006 - Juli 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmazie,  
Bereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Sept. 2006 - Dez. 2008 Mitglied im Exzellenznetzwerk, Nanostrukturierte Materialien,  
im Rahmen des Projektes SN3 Selbstorganisierte Nanostruktu-  
ren an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
seit August 2009 Mitarbeiterin in der Skinomics GmbH, Halle (Saale)

---

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertationsschrift habe ich an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Halle (Saale),

Alexandra Sabine Bärbel Göbel