

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Entwicklung von multiplen W/O/W - Nanoemulsionen mittels „Low energy emulsification“ zur dermalen Applikation von hydrophilen Arzneistoffen“

Verfasserin

Sandra Karall

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, Juni 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Claudia Valenta

Danksagung:

Bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Claudia Valenta möchte ich mich für die freundliche Betreuung meiner Diplomarbeit herzlich bedanken. Besonderes Augenmerk möchte ich hierbei auf das angenehme Arbeitsklima in ihrer Arbeitsgruppe richten, von dem ich profitieren durfte, wie auch auf die anregenden Einblicke in den Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens, die mir gewährt wurden.

Zudem möchte ich mich bei O. Univ.-Prof. Dr. Helmut Viernstein für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Department für Pharmazeutische Technologie bedanken.

Ein großes Dankeschön an Mag. pharm. Julia Schwarz für ihren tatkräftigen Beistand und die unermüdliche Gesprächsbereitschaft. Selbiges gilt auch für Dr. Mag. pharm. Victoria Klang.

Danke auch an Dr. Günter Resch, IMP-IMBA-GMI Electron Microscopy Facility, Campus Science Support Facilities GmbH, Vienna, für die Aufnahmen am Elektronen-Mikroskop.

Der herzlichste Dank gebührt meiner Familie, meinen Eltern Gerhard und Monika Karall, und meinem Bruder Jürgen Karall: Durch ihre liebevolle Unterstützung und Geduld wurde mein Studium erst ermöglicht.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1. Haut	3
2.1.1. Aufbau und Funktion	3
2.1.2. Hautdiffusion und dermale Arzneistoffaufnahme	5
2.1.3. Hautarzneiformen	6
2.2. Nanoemulsionen	8
2.2.1. Herstellungsmethoden	8
2.2.2. W/O/W-Nanoemulsionen	9
2.2.3. Emulgatoren.....	11
2.2.4. weitere Hilfsstoffe.....	16
2.2.5. Aciclovir.....	17
2.3. Physikochemische Charakterisierung	18
2.3.1. Partikelgröße.....	18
2.3.2. Zeta-Potential.....	20
2.3.3. pH-Wert.....	23
2.3.4. Cryo-TEM.....	24
3. Methoden.....	25
3.1. Niedrigenergiemethode zur Herstellung multipler Nanoemulsionen	25
3.1.1. Formulierung.....	25
3.1.2. Herstellungsvorschrift	26
3.1.3. Nomenklatur.....	27
3.2. Optimierungsstrategien.....	28
3.2.1. Ermittlung der optimalen Tensidkonzentration	28
3.2.2. Ermittlung des bestgeeignetsten Mizellbildners	30
3.2.3. Tensidmischungen.....	31
3.2.4. Vorgehensweise mit S-1670	32
3.2.5. Physikochemische Charakterisierung	34
3.3. Herstellung der arzneistoffhaltigen Formulierungen.....	35
3.3.1. Vorversuche zu Arzneistoffen	35
3.3.2. Formulierungen.....	35

3.3.3. Physikochemische Charakterisierung	37
3.4. In vitro Untersuchungen auf der Haut.....	38
3.4.1. Franz-Diffusionszellen	38
3.4.2. Tape Stripping Experimente	40
3.5. Arzneistoffanalytik	40
3.5.1. HPLC-Analytik von Aciclovir	40
4. Ergebnisse	43
4.1. Vorversuche	43
4.1.1. Vorversuche zur Auswahl eines geeigneten Arzneistoffs	43
4.1.2. Vorversuche zur Auswahl eines geeigneten Mizellbildners	43
4.1.3. Vorversuche zu Tensidmischungen	44
4.2. Physikochemische Charakterisierung und Stabilitätsuntersuchungen	45
4.2.1. Grundformulierungen	45
4.2.2. Arzneistoffhaltige Formulierungen	47
4.2.3. Cryo-TEM	49
4.3. in vitro Hautstudien	50
4.3.1. Franz-Diffusionszellen	50
4.3.2. Tape Stripping Versuche	52
5. Diskussion	53
6. Zusammenfassung	56
7. Anhang	58
7.1. Tabellen zu in vitro Hautstudien	58
7.2. Tabellen zur physikochemischen Stabilität	60
7. 3. Abstracts	66
7.3.1. Deutsch	66
7.3.2. English	67
7. 4. Poster	68
8. Literatur	69
9. Lebenslauf	74

1. Einleitung

Emulsionen und Dispersionen im Nanometer-Bereich, wie Nanopartikel, Nanoemulsionen und Liposomen, waren dank ihrer vielseitigen Verwendbarkeit in den letzten Jahrzehnten von großem Interesse. Neben ihrem Einsatz in Kosmetik und chemischer Industrie, dienen sie nicht zuletzt als Trägersysteme für Arzneistoffe [1].

Den einfachen W/O- oder O/W-Systemen untergeordnet, haben sich Emulsionsformen etabliert, die multiplen Emulsionscharakter aufweisen. Nach ihrem Aufbau unterscheidet man W/O/W- und O/W/O-Systeme. Besondere pharmazeutische Bedeutung haben W/O/W-Systeme derzeit als Zwischenprodukt bei der Herstellung einer Reihe von partikulären Arzneiformen, wie zum Beispiel der Erzeugung von Mikro- und Nanopartikeln. Als eigenständige Emulsions-Systeme sind sie im Gegensatz dazu immer noch Gegenstand der Forschung. Im Bereich der dermalen Applikationsformen bieten sie jedoch eine Vielzahl interessanter Aspekte. Beispiele dafür wären die modifizierte Wirkstoffverteilung in der Haut, wie auch die durch Scherkräfte induzierte Wirkstofffreisetzung. Außerdem könnten Nanoemulsionen im Vergleich mit klassischen Trägersystemen für hydrophile Arzneistoffe, wie zum Beispiel ethanolhaltigen Hydrogelen, eine Alternative für die sensible Haut darstellen. Mit Hilfe der W/O/W-Emulsionen sollte es möglich sein, die Vorteile von Nanoemulsionssystemen, welche hauptsächlich als Träger von lipophilen Arzneistoffen zum Einsatz kommen, auch mit hydrophilen Arzneistoffen zu kombinieren. Dies ist ein Bereich, in dem bis jetzt kaum auf Forschungsergebnisse zurückgegriffen werden kann.

Ein wichtiger Aspekt bei der Herstellung, zieht man eine längerfristige Anwendung am Menschen in Betracht, ist aber auch die Suche nach Alternativen zu den klassischerweise verwendeten Hilfsstoffen, insbesondere der Emulgatoren, welche sich im Moment nicht immer durch eine optimale Verträglichkeit auszeichnen. Lösungsansätze dafür könnten aus der Lebensmittelindustrie kommen [2] [3].

Ziel dieser Arbeit war es, multiple Emulsionen vom W/O/W-Typ mittels einer Niedrigenergiemethode herzustellen, die dazu geeignet sind, einen hydrophilen Arzneistoff aufzunehmen, und in weiterer Folge deren Formulierung und Prozessparameter zu optimieren. Als geeignete Methode wurde die Phasen-Inversions-Temperatur Methode, kurz PIT-Methode ausgewählt. Basierend auf den speziellen Eigenschaften polyethoxylierter, nichtionischer Tenside ist es mittels PIT-Methode grundsätzlich möglich, auf energiesparende und unkomplizierte Weise Nanoemulsionen zu erzeugen. Da dafür jedoch relativ große Mengen an ethoxylierten Tensiden zum Einsatz kommen, lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit darin, sowohl die kleinstmögliche Tensidmenge zu finden, bei der sich noch zuverlässig W/O/W-Systeme bilden, als auch andere Arten von Tensiden, in diesem Fall die gut umweltverträglichen Sacharoseester, auf ihre Funktionalität zu prüfen. Die Qualitätskontrolle sollte durch langfristige Stabilitätsstudien, welche die Vermessung von Partikelgröße, PDI, Zeta-Potential und pH-Wert inkludierten, erfolgen. Zur Bestätigung der Ergebnisse der Studien wurden Aufnahmen mittels Cryo-TEM herangezogen. Als Modell-Arzneistoff diente das hydrophile Aciclovir.

Nach Ermittlung der optimalen Tensidkonzentration sollte versucht werden, Teile des Emulgators durch verschiedene Zuckerester zu ersetzen. Diese finden Einsatz in der Lebensmitteltechnologie und sollten die Hautverträglichkeit der Formulierungen bei gleichbleibender, physikalischer Stabilität, verbessern. Auch hier sollten langfristige Stabilitäts-Untersuchungen durchgeführt werden, um Aussagen über die Qualität treffen zu können.

Mit dem Ziel, die Überlegenheit von W/O/W-Systemen gegenüber herkömmlichen Formulierungen bei dermalen Applikation zu demonstrieren, sollte die Permeation von Aciclovir aus den hergestellten Formulierungen in Franz-Zell-Studien und Tape-Stripping-Experimenten untersucht werden [4].

2. Allgemeiner Teil

2.1. Haut

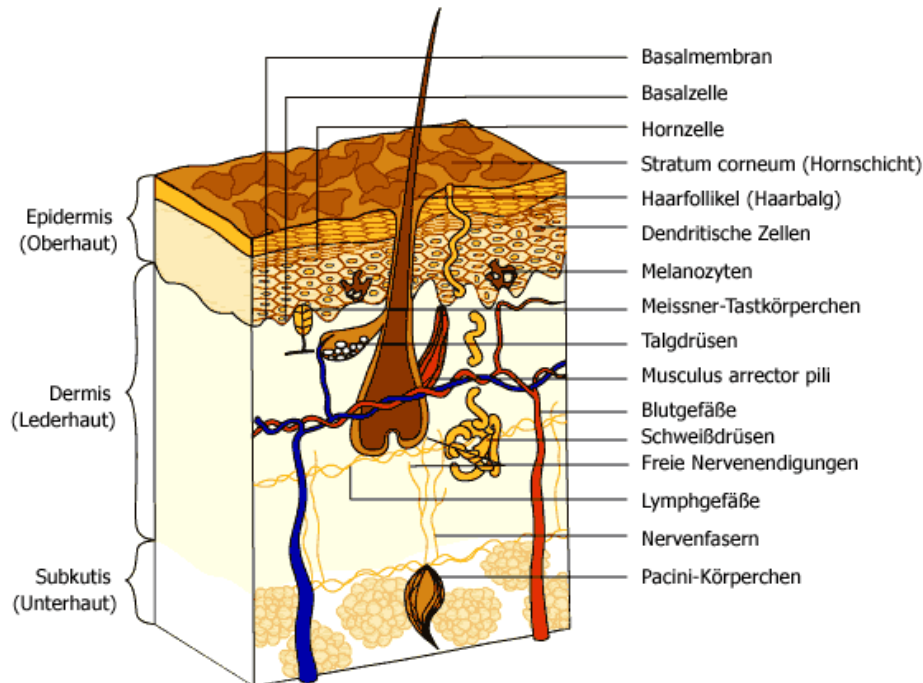


Abb. 1: Aufbau der Haut [5]

2.1.1. Aufbau und Funktion

Die menschliche Haut, mit einer Dicke von 1 bis 4 mm und einer Fläche von bis zu 2,0 m², besitzt einen schichtförmigen Aufbau. Diese Schichten lassen sich grob unterteilen in: die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subkutis (Unterhaut). (Abbildung 1)

Epidermis und Stratum Corneum:

Wesentlicher Bestandteil der Epidermis sind die Keratinozyten, welche nach ihrer Bildung im Stratum basale binnen weniger als 30 Tagen an die Hautoberfläche wandern. Dabei durchlaufen sie in den verschiedenen Schichten der Epidermis mehrere Differenzierungsstadien, bis sie als zellkernlose, keratinisierte Keratinozyten in die äußerste, verhornte Schicht der Epidermis, das Stratum corneum, gelangen. In

diesem Stadium enthalten die nunmehr als Korneozyten bezeichneten Zellen rund 80% Keratin und nur 10-15% Wasser. Ihre Fähigkeit, Wasser aufzunehmen, ist jedoch enorm: Korneozyten können bis zum Fünffachen ihres Eigengewichts an Wasser speichern. Im Stratum corneum sind die Korneozyten in 10 bis 20 Schichten angeordnet, welche durch ein Lipidgemisch stabilisiert werden. Dieses setzt sich hauptsächlich aus Ceramiden, Fettsäuren und Cholesterol zusammen und bildet sozusagen den Kitt zwischen den Zellen. Dementsprechend wurde zur Beschreibung dieser zwei Kompartimente auch das brick and mortar-, oder Ziegel-und-Mörtel-Modell etabliert (Abbildung 2) [6][7][8].

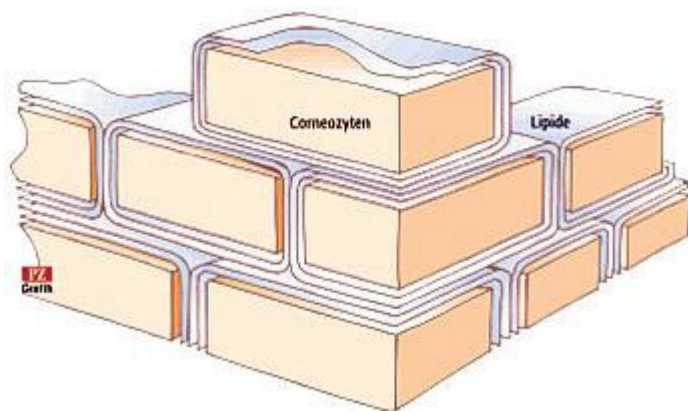


Abb. 2: Brick and mortar-Modell [7]

Barrierefunktion der Haut:

Hauptaufgabe des 10 bis 15 μm dicken Stratum corneum, auch Hornschicht genannt, ist seine Barrierefunktion. Da es die Grenzfläche des Organismus zur Außenwelt darstellt, dient es sowohl als Schutz vor schädlichen Einflüssen aus der Umwelt, wie auch der Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes für die lebensnotwendige Homöostase. Zudem verfügt es über eine große, mechanische Festigkeit. Diese Eigenschaft lässt sich allerdings nicht ausschließlich durch das brick and mortar-Modell erklären. Weitere funktionelle Gegebenheiten, die hierbei zum Tragen kommen sind: hakenähnliche Strukturen der Korneocyten, Corneodesmosomen, tight-junctions und das Stratum corneum-Lipidgemisch, welches Doppelschichten (Bilayer) ausbildet [7][8].

2.1.2. Hautdiffusion und dermale Arzneistoffaufnahme

Das Stratum corneum stellt auch die Hauptbarriere für die Wirkstoffdiffusion dar. Einer großen Anzahl von Wirkstoffen ist es nicht möglich, die Hornschicht zu überwinden. Grundvoraussetzung für einen Durchtritt durch diese Barriere ist eine gewisse Lipophilie. Als einzige Transportform gilt die passive Diffusion, da bislang keine aktiven Transportmechanismen durch das Stratum corneum bekannt sind [6][7].

Prinzipiell bieten sich für den Wirkstoff vier verschiedene Möglichkeiten, die Hornschicht zu durchdringen. Der transglanduläre und der transfollikuläre Weg sind von geringer Bedeutung, da der Anteil von Schweißdrüsen und Haarfollikeln an der Gesamtoberfläche der Haut nur 1% beträgt. Erwähnung finden diese Transportformen jedoch in Zusammenhang mit Wirkstoffen, welche sehr langsam diffundieren und in der Initialphase der Penetration. Erfolgt der Transport transepidermal, bieten sich im Hinblick auf das brick and mortar-Modell zwei Möglichkeiten: Der intrazelluläre Transport und der transzelluläre Transport [8]. (Abbildung 3)

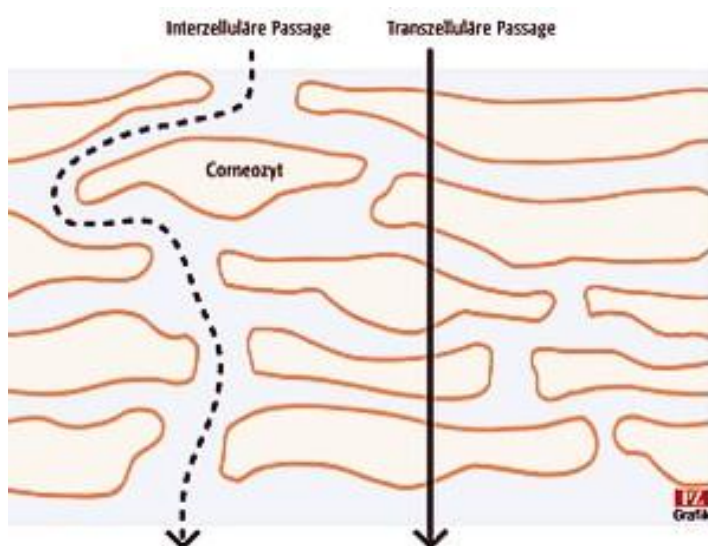


Abb.3: Intrazellulärer und transzellulärer Transport [7]

Unter intrazellulärem Transport versteht man den Durchtritt zwischen den Zellen, während transzellulärer Transport die Passage durch die Zellen und Lipid-Bilayer meint. Sowohl der geringe Wassergehalt der Korneocyten, als auch die dichte Packung des Keratins machen Letzteren im Stratum corneum unwahrscheinlich [9].

Der Transport durch die Hornschicht ist nicht nur von der Beschaffenheit des zu transportierenden Moleküls, sondern auch von einer Reihe anderer Faktoren abhängig. Dazu zählen: der Hydratisierungsgrad der Hornschicht, der Hauttyp (seborrhoisch, sebastatisch), der Behaarungsgrad und vor allem die Hautregion [10]. (Abbildung 4)

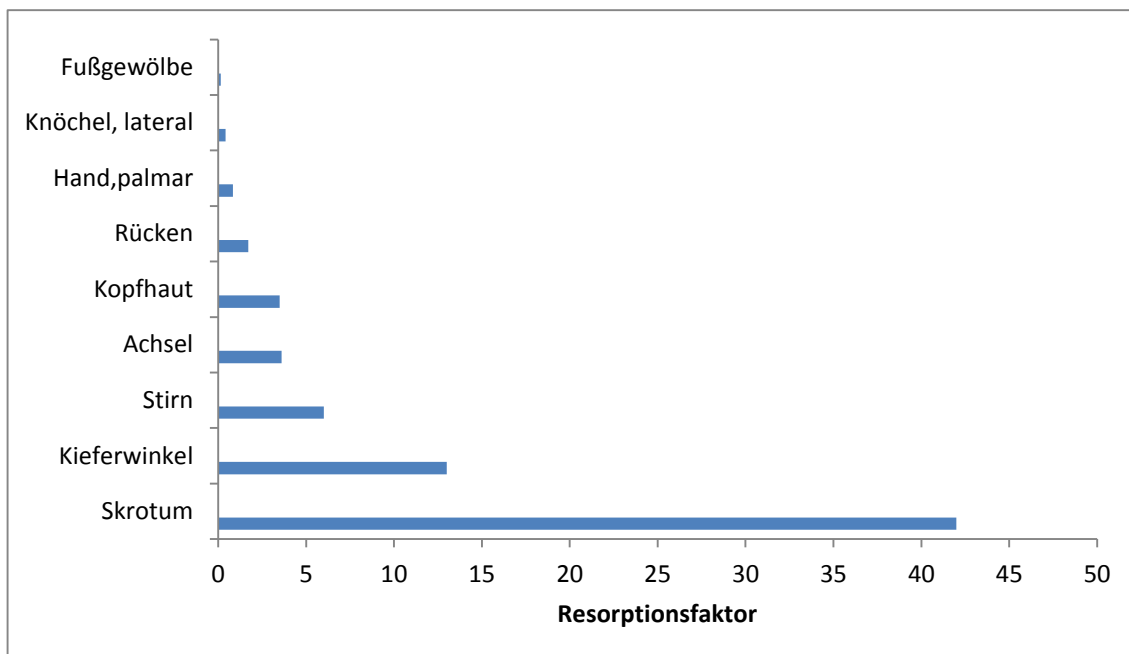


Abb.4: Einfluss der Hautregion auf die perkutane Resorption von Hydrocortison, Grafik nach [10]

2.1.3. Hautarzneiformen

Unter Hautarzneiformen versteht man Arzneistoffe, die zur dermalen Applikation in einen Träger, auch als Vehikel oder Grundlage bezeichnet, eingearbeitet sind. Bei kaum einer anderen Anwendungsart setzt sich der Patient so intensiv mit dem Arzneimittel und dessen Applikation auseinander, wie bei dieser. Arzneiformen zur

dermalen Pharmakotherapie sind vielschichtig und oft schwer abzugrenzen. Neben den klassischen Salben, Cremen und Gelen existieren heute auch Systeme mit modifizierter Wirkstofffreisetzung, wie zum Beispiel Nanoemulsionen und Liposomen [10].

Die Anwendung topischer Arzneiformen kann diverse Vorteile bringen. Am augenscheinlichsten ist dabei die Möglichkeit einer lokal beschränkten Applikation: direkt am Wirkort, oder in dessen unmittelbarer Umgebung (Ekzeme, Gelenkentzündungen, Lippenherpes, etc.). Hinzu kommt, dass bei dermalen Applikationsformen die oft unerwünschte, systemische Wirkung in den Hintergrund tritt, und Nebenwirkungen damit gering gehalten werden können (Beispiel: Glucocorticoide). Wichtig ist auch die patientenfreundliche, nicht-invasive Handhabung einer Dermatopharmakotherapie. Andererseits wird die Arzneistoffmenge am Wirkort durch Parameter wie den Zustand der Haut (Hautgesunder, Psoriaktiker, etc.) und die applizierte Menge, welche wiederum abhängig ist von persönlichem Empfinden, Konsistenz der Formulierung, usw., beeinflusst. Dieser Effekt spielt bei Hautarzneiformen jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Oft kommt es auch zu einer Mitbehandlung der umliegenden, nicht erkrankten Hautstellen. Die Compliance des Patienten hängt maßgeblich mit der Beschaffenheit der Grundlage, aber auch mit dem Geruch der Formulierung zusammen. Hierbei gilt es, Vorlieben des Patienten bei der Auswahl einer geeigneten Arzneiform miteinzubeziehen [10].

Ebenso wichtig ist der Aspekt der Unbedenklichkeit der Hautarzneiform. Da die menschliche Haut heutzutage einer Vielzahl exogener Noxen, wie zum Beispiel starker UV-Strahlung oder auch dem übermäßigen Kontakt mit Detergentien, ausgesetzt ist, können bei Überlastung der Schutzmechanismen Hautschäden entstehen. Aufgrund der Tatsache, dass solche Reizungen auch mit dem Einsatz von Dermatika und Kosmetika in Zusammenhang stehen können, ist es von großer Wichtigkeit, dass ebenjene Zubereitungen nur Grundlagen und Inhaltsstoffe von größtmöglicher Verträglichkeit und geringem allergenen Potential beinhalten [3] [11].

2.2. Nanoemulsionen

Unter Emulsionen im Allgemeinen versteht man disperse Systeme aus zwei oder mehreren nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten. Eine klassische, natürlich vorkommende, Emulsion ist die Milch, weswegen sich auch der Begriff „Emulsion“ vom lateinischen „emulgere“, ausmelken, ableitet [12].

Unter Nanoemulsionen im Speziellen versteht man Öl-in-Wasser-Emulsionen mit einer Tröpfchengröße im Submikron-Bereich, welche durch geringe Tensidmengen stabilisiert werden. Es entstehen transparente oder transluzierende Systeme, die sich durch eine Tröpfchen-Größe von 50-1000nm auszeichnen. Im Gegensatz zu Mikroemulsionen zeigen sie die Struktur einer echten Emulsion. Ihre kinetische Stabilität wird maßgeblich durch die Partikelgröße bedingt. Als Hauptgrund für eine Instabilität gilt der kolloid-chemische Effekt der Ostwald-Reifung [13].

Dank ihrer großen Stabilität und geringen Immunogenität sind Nanoemulsionen in den letzten Jahren Gegenstand der Forschung, sei es in der Pharmazie, der Lebensmitteltechnologie oder der Kosmetik. Aufgrund ihrer Fähigkeit, lipophile Arzneistoffe in Tröpfchen einzuschließen oder oberflächenaktive Substanzen in ihrer Grenzfläche anzureichern bietet der Einsatz von Nanoemulsionen diverse Vorteile. Diese beinhalten: verbesserte Löslichkeit und Bioverfügbarkeit der aktiven Komponenten, Schutz von sensiblen Substanzen und die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen. Emulsionen im Sub-Mikron-Bereich finden somit Einsatz als parenterale, dermale, okulare, rektale, sowie orale Applikationsformen [13] [14].

2.2.1. Herstellungsmethoden

Die Herstellungsmethoden für Nanoemulsionen werden grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilt: Hochenergie („high-energy“)- und Niedrigenergie („low-energy“)-Methoden. Während bei den Hochenergiemethoden auf den Eintrag von Energie in Form starker Scherkräfte oder Ultraschall zurückgegriffen wird, um die kleinen Partikelgrößen zu erreichen, werden bei den Niedrigenergiemethoden die chemischen Eigenschaften bestimmter Emulgatoren genutzt. Dadurch kann nicht nur mit kleinen Energiemengen gearbeitet werden, es ist auch möglich, die verwendeten

Arzneistoffe vor einer potentiellen Zerstörung in Folge des Herstellungsprozesses, wie zum Beispiel durch hohen Druck, zu schützen. Unter den Niedrigenergiemethoden finden sich die spontane Emulsifikation, die Lösungsmittel-Diffusionsmethode und die Phasen-Inversions-Temperatur-Methode [13].

Phasen-Inversions-Temperatur-Methode:

Besonderes Augenmerk gilt in dieser Arbeit der Phasen-Inversions-Temperatur-Methode, kurz PIT-Methode, welche mit den speziellen Eigenschaften polyethoxylierter, nicht-ionischer Tenside arbeitet. Diese sind, abhängig von der Temperatur, entweder wasser- oder öllöslich. Bei steigender Temperatur reagieren diese hydrophilen Emulgatoren zunehmend lipophil, wobei angenommen wird, dass dies auf dem Verlust ihrer Hydrathüllen basiert. Die Temperatur, bei der dieses Phänomen auftritt, bezeichnet man als Phasen-Inversions-Temperatur. Stabilisiert man eine Emulsion mit einem solchen Emulgator in einem genau festgelegten Masseverhältnis, unterläuft sie bei Temperaturänderung eine Phasen-Inversion. Aus einer O/W-Emulsion wird durch Temperaturerhöhung eine W/O-Emulsion, welche beim Abkühlprozess durch die frei werdende Energie umgekehrt wieder in ein sehr fein verteiltes O/W-System reinvertiert wird. Die PIT-Methode wird primär dazu verwendet, besonders feindisperse O/W-Emulsionen herzustellen [13][15].

2.2.2. W/O/W-Nanoemulsionen

Generell können mittels der PIT-Methode lipophile Arzneistoffe in O/W-Emulsionen eingearbeitet werden. Da jedoch viele Arzneistoffe, wie zum Beispiel Proteine, Nukleinsäuren oder auch Krebstherapeutika, über hydrophile Eigenschaften verfügen, bietet sich die Möglichkeit, diese in reverse Mizellen verpackt zu verarbeiten, an. Die dadurch entstehenden Nano-Emulsionen sind multiple Emulsionen vom W/O/W-Typ [1].

Definition multipler Emulsionen:

Unter multiplen Emulsionen versteht man komplexe Systeme, bei denen die Tröpfchen der dispergierten Phase selbst wiederum kleinere Tröpfchen enthalten, die gleich oder verschieden der kontinuierlichen Phase sein können. Prinzipiell können dies Wasser-in-Öl-in-Wasser- oder Öl-in-Wasser-in-Öl-Systeme sein [15].

Vorteile multipler Emulsionen bei Hautarzneiformen:

W/O/W-Emulsionen vereinen aufgrund ihres Aufbaus die Eigenschaften feuchtigkeitsreicher O/W-Emulsionen mit denen der reichhaltigen W/O-Emulsionen. Somit bieten sie aktiven Hautbarriereschutz und Langzeitpflege, und versorgen nebenher die Haut mit Feuchtigkeit. Direkt nach dem Auftragen wird das Wasser der äußeren Phase an die obersten Schichten der Haut abgegeben, während die verschmelzenden Lipidtröpfchen einen Schutzfilm auf der Haut bilden. Die langsam erfolgende Freisetzung von Wasser aus der inneren Wasser-Phase sorgt für einen langfristigen „Moisturizing-Effekt“.

In Studien konnte bewiesen werden, dass eine langfristige Anwendung dieses Emulsionstyps zu einer Verbesserung des Wasserhaushalts der obersten Hautschichten führt.

Zudem bieten W/O/W-Emulsionen empfindlichen Arzneistoffen Schutz vor äußeren Einflüssen und können als Systeme mit verzögerter Freisetzung verwendet werden [15] [16].

Herstellung multipler Emulsionen:

Im Detail werden dabei die zwei Phasen der Emulsion separat hergestellt. Die lipophile Phase wird mit einem Tensid versetzt und gerührt, wodurch sich im Öl Mizellen bilden, die an ihrer Innenseite hydrophile Eigenschaften aufweisen. Wird zu dieser Mischung ein hydrophiler Arzneistoff hinzugefügt, kann sich dieser unter Rühren über wenige Stunden in den Mizellen einlagern. Es entstehen mit hydrophilem Arzneistoff beladene Tröpfchen in der Öl-Phase.

Gesondert davon wird ein Teil der Wasser-Phase aus destilliertem Wasser, einem geeigneten Emulgator und Kochsalz bereitet. Diese wird am Magnetrührer langsam auf eine Temperatur über dem Phasen-Inversionspunkt erwärmt. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wird die Öl-Phase tröpfchenweise zur Wasser-Phase

hinzugefügt, wobei die Temperatur konstant gehalten werden muss. Es entsteht eine W/O-Nanoemulsion.

Nach Zugabe der gesamten lipophilen Phase wird das Gemisch mit dem Rest des Wassers, in einem Schwall und unter starkem Rühren, ohne weitere Wärmezufuhr versetzt, wodurch die Mischung schlagartig unter den Phasen-Inversionspunkt abkühlt. Es vollzieht sich eine Phasenumkehr, die Hydrophiler-Arzneistoff-in-Öl-Tröpfchen werden von der Wasserphase umschlossen. Es resultiert ein W/O/W-System [1] [13].

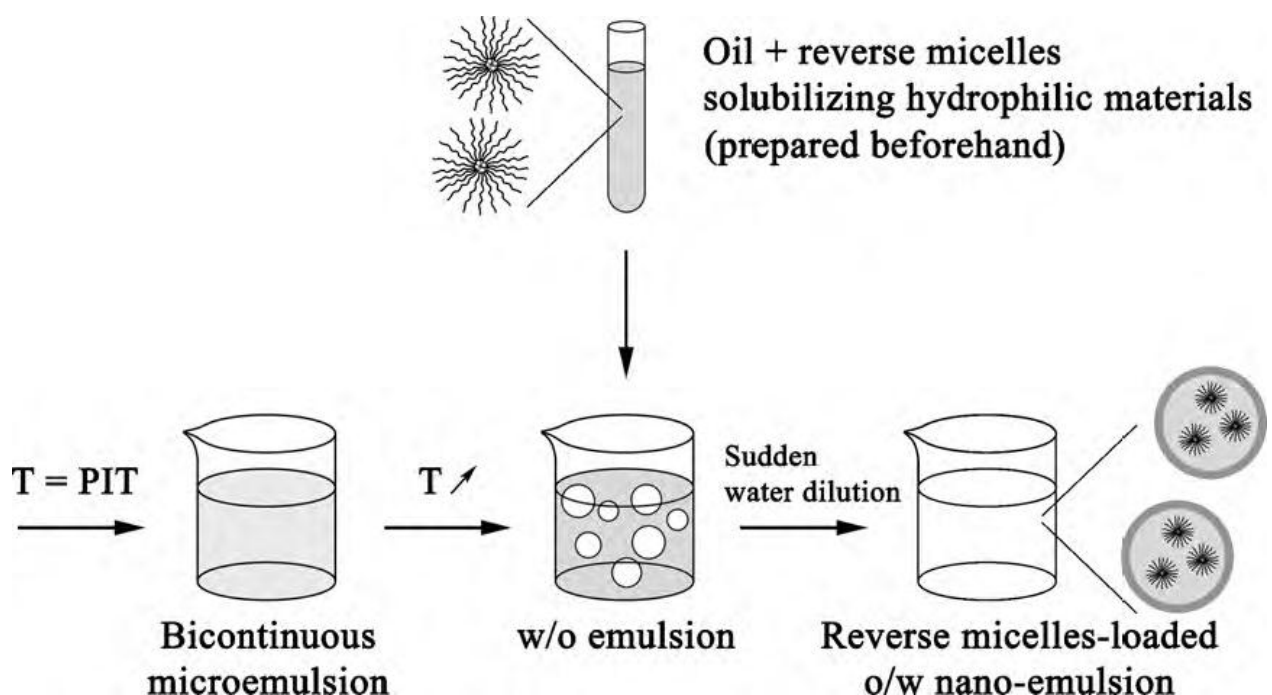


Abb.5: Herstellung von W/O/W-Nanoemulsionen: PIT-Methode [1]

2.2.3. Emulgatoren

Essentiell für die Auswahl eines geeigneten Emulgators, welche sowohl die Bildung als auch die Stabilität der Nanoemulsion maßgeblich beeinflusst, sind dessen physiko-chemische Eigenschaften. Diverse Studien haben gezeigt, dass der Einsatz von Emulgatormischungen sich positiv auf die Stabilität der Emulsion auswirken kann. Möglicherweise basiert dieser Effekt auf einer dichteren Molekulpackung an der Öl-/Wasser-Grenzfläche [17].

Im Falle der PIT-Methode ist die Auswahl des Emulgators maßgeblich dadurch beeinflusst, dass er mit zunehmender Temperatur die Fähigkeit besitzen muss, seine Hydrathülle zu verlieren und somit lipophil zu werden. Emulgatoren, die diesen Anforderungen entsprechen sind polyethoxylierte, nicht-ionische Tenside, bei denen die Affinität zur Wasser- und zur Ölphase relativ ausgeglichen ist. Unterstützend kommt ein lipophiler Co-Emulgator zur Mizellbildung zum Einsatz [13] [15].

HLB-Wert:

Zur Identifizierung eines geeigneten Tensids oder einer geeigneten Tensid-Kombination, kann deren HLB-Wert (hydrophilic/lipophilic balance) herangezogen werden. Dieser klassifiziert nicht-ionische Emulgatoren anhand ihrer chemischen Struktur: die verschiedenen Anteile an hydrophilen und lipophilen Strukturen am Gesamtmolekül führen zu unterschiedlichen Emulgatoreigenschaften in Bezug auf Löslichkeit und Verhalten an der Öl-/Wasser-Grenzfläche. [17]

Der HLB-Wert für nichtionische Tenside kann wie folgt berechnet werden (Methode nach Griffin):

$$HLB = 20 * (1 - M^1/M)$$

wobei M^1 der Molmasse des lipophilen Anteils eines Moleküls entspricht, und M der Molmasse des gesamten Moleküls. Die Zahl 20 ist ein von Griffin frei gewählter Skalierungsfaktor, durch dessen Verwendung sich eine Skala von 1 bis 20 ergibt. Dabei steht ein HLB-Wert von 1 für ein lipophiles Molekül, während ein Wert von 20 auf ein hydrophiles Molekül hinweist.

Aus der nachfolgenden Tabelle wird ersichtlich, dass W/O-Emulgatoren in einem HLB-Bereich von 3-8 angesiedelt sind, während O/W-Emulgatoren in einem Bereich von 8-18 liegen.

HLB-Wert	Verwendung
1.5 bis 3	Entschäumer
3 – 8	W/O-Emulgator
7 – 9	Netzmittel
8 bis 18	O/W-Emulgator
13 bis 15	Waschaktive Substanzen
12 bis 18	Lösungsvermittler

Abb.6: HLB-Werte und die zugeordnete Verwendung

Je näher die errechneten Werte zweier Tenside beieinander liegen, desto ähnlicher sind sie sich in ihren Eigenschaften. Die HLB-Werte bieten eine solide Grundlage bei der Auswahl, beziehungsweise beim Ersatz eines Emulgators durch einen anderen.

Ethoxylierte Tenside:

Ethoxylierte, nicht-ionische Tenside sind Produkte, die in ihrem Molekül Polyethylenglykolgruppen als hydrophile Teilstrukturen aufweisen. Ein Beispiel dafür ist Solutol HS15.

Solutol HS15:

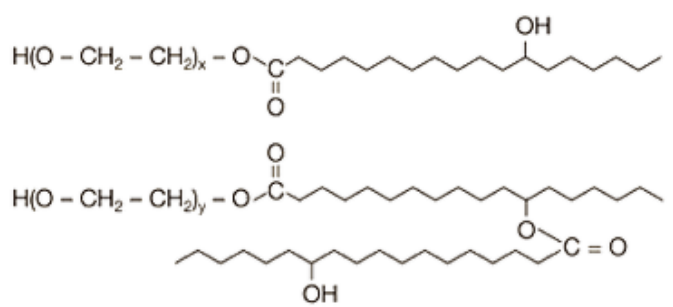


Abb.7: Strukturformel von Solutol HS 15 [18]

Der Emulgator Solutol HS 15 ist ein Polyethylenglycol-15-hydroxystearat, welches aus 1 Mol 15-Hydroxystearinsäure und 15 Mol Ethylenoxid hergestellt wird. Bei Raumtemperatur ist Solutol HS 15 von weißlicher und wachsartiger Konsistenz. Das nicht-ionische Tensid zeigt eine effektive Lösungsvermittlung für Substanzen wie fettlösliche Vitamine und andere hydrophobe Inhaltsstoffe. Zudem zeigte sich in klinischen Studien, dass Solutol HS 15 bei parenteraler Anwendung sehr gut toleriert wird. Als Polyoxyl-15-hydroxystearinsäure wurde es in das DAB (Deutsches Arzneibuch) aufgenommen, ein Eintrag ins Europäische Arzneibuch (PhEur) soll folgen. Auf dieser Basis findet das Tensid Anwendungen in zahlreichen Bereichen der pharmazeutischen Technologie, vor allem in der Herstellung von parenteralen Arzneiformen [18].

Solutol HS 15 wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Nano-Emulsionen nach PIT-Methode dazu verwendet, die Phasenumkehr bei Temperaturänderung zu bewirken. Sein HLB-Wert liegt bei 14-16.

Lipophiler Co-Emulgator:

Span®80:

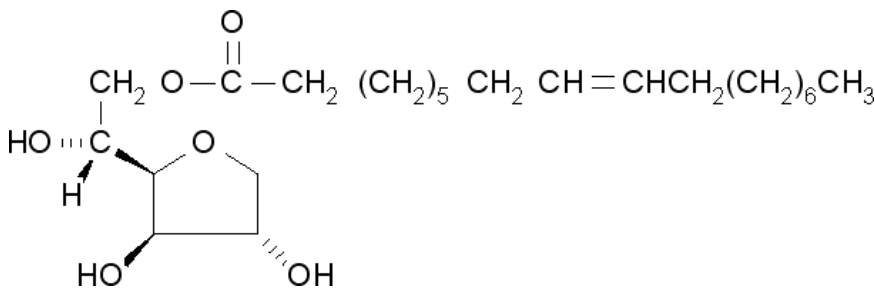


Abb.8: Strukturformel von Span®80 [19]

Bei Span®80 handelt es sich um Sorbitan-Monooleat, einen Sorbitanfettsäure-Ester. Die Herstellung erfolgt aus Sorbitanhydrid und Ölsäure [19].

Bei Raumtemperatur erscheint der Emulgator als hochviskose, leicht gelbliche Flüssigkeit. Sorbitan-Fettsäureester werden als Zusatzstoffe in der Lebensmittelindustrie, zum Beispiel zur Stabilisation von Margarineprodukten eingesetzt.

Span®80 wurde in den Versuchen dazu verwendet, den hydrophilen Arzneistoff in der Ölphase in reverse Mizellen einzuschließen. Sein HLB-Wert liegt bei 4,3.

Zuckertenside:

Im Allgemeinen zeichnen sich Zuckertenside im Vergleich zu anderen Emulgatoren durch viele positive Eigenschaften aus. Sie sind sowohl geschmack-, als auch geruchlos und ungiftig, weshalb sie sich besonders für die Lebensmittelindustrie eignen. Zudem reizen Zuckertenside weder Haut noch Augen, weswegen sie auch in der Kosmetik und der Pharmazie zum Einsatz kommen. In Anbetracht ihrer ausgezeichneten, biologischen Abbaubarkeit, bieten sie auch aus umweltpolitischer Sicht eine saubere Alternative [20] [21].

Saccharose-Fettsäureester:

In dieser Arbeit wurden Zuckertenside der Marke Ryoto® sugar ester, vertrieben von der Mitsubishi-Kagaku foods corporation, verwendet. Dabei handelt es sich um nicht-ionische Saccharose-Fettsäureester, die vor allem als Lebensmittelzusatzstoffe eingesetzt werden. Abhängig vom Ausmaß der Veresterung des Saccharose-Moleküls und den verwendeten Fettsäuren ist ein breites Feld an unterschiedlichen HLB-Werten erhältlich [20] [22].

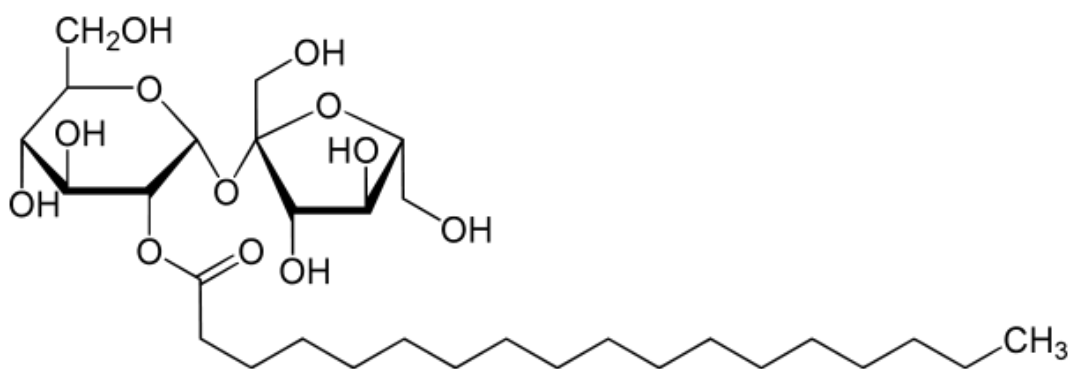


Abb.9: Beispiel für die Struktur von Saccharose-Fettsäureestern: Saccharose-Monostearat

Ryoto® sugar ester S-1670:

Bei S-1670 handelt es sich um ein Saccharose-Stearat, einen Ester der Stearinsäure, mit rund 75% Monoester-Anteil. Es wurde aufgrund seines HLB-Werts von 16 als Emulgator für die Wasser-Phase ausgewählt. S-1670 ist als weißes Pulver im Handel [20].

Ryoto® sugar ester S-270:

Wie S-1670 ist auch S-270 ein Saccharose-Stearat, allerdings mit einem viel geringeren Monoester-Anteil von nur 10%. Mit seinem HLB-Wert von 2 fungierte der Emulgator als Mizellbildner in der Öl-Phase. S-270 liegt als weißes Pulver vor [20].

2.2.4. weitere Hilfsstoffe

Miglyol 812:

Miglyol-Neutralöle sind klare, farblose Flüssigkeiten von neutralem Geruch und Geschmack. Aufgrund ihrer hohen Reinheit bieten sie klare Vorteile gegenüber natürlichen Ölen: Sie zeigen eine hohe Beständigkeit gegen Oxidation, sind bei 0°C flüssig und verfügen über sehr gute Lösungseigenschaften. Zudem lassen sie sich leicht auf der Haut verteilen, ziehen schnell ein und beeinträchtigen die Hautatmung nicht.

Bei Miglyol 812 handelt es sich um Triglyceride der fraktionierten, pflanzlichen Fettsäuren C8 und C10. Miglyol 812 entspricht den Anforderungen der Monografie Ph.Eur. (Edition 4.6) – Mittelkettige Triglyceride. Die zur Herstellung verwendeten, pflanzlichen Öle besitzen GRAS-Status [23].

Tests	810	812	818	829	840
Caproic acid (C _{6:0})	max. 2,0	max. 2,0	max. 2	max. 2	max. 2
Caprylic acid (C _{8:0})	65,0 – 80,0	50,0 – 65,0	45 – 65	45 – 55	65 – 80
Capric acid (C _{10:0})	20,0 – 35,0	30,0 – 45,0	30 – 45	30 – 40	20 – 35
Lauric acid (C _{12:0})	max. 2	max. 2	max. 3	max. 3	max. 2
Myristic acid (C _{14:0})	max. 1,0	max. 1,0	max. 1	max. 1	max. 1
Linoleic acid (C _{18:2})	-	-	2 – 5	-	-
Succinic acid	-	-	-	15 – 20	-

Tab.1: Zusammensetzung der Fettsäuren von Miglyol 810-840 [23]

Natrium-Chlorid:

Um die W/O/W-Systeme stabil zu halten, darf der eingesetzte hydrophile Emulgator während des Abkühlprozesses nicht vollständig in die Wasser-Phase re-invertieren. Die Zugabe von Elektrolyten, wie Natriumchlorid, zur Emulsion fördert diese partielle Phaseninversion während der Herstellung, indem sie ein teilweises Aussalzen des hydrophilen Emulgators an der Grenzfläche bewirkt [15].

2.2.5. Aciclovir

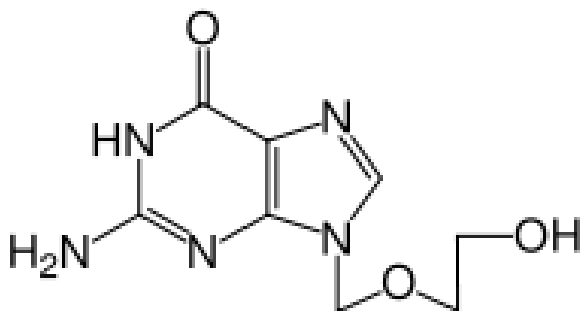


Abb.10: Strukturformel von Aciclovir

Aciclovir ist ein weißes, kristallines Pulver, welches in Wasser und Methanol löslich ist. Seine molekulare Masse beträgt 225,21g/mol.

Aus pharmakologischer Sicht handelt es sich bei Aciclovir um ein Virustatikum, welches zur Behandlung von Herpesinfektionen, insbesondere HSV (Herpes-Simplex-Virus)- und VZV (Varizellen-Zoster-Virus)-Infektionen, eingesetzt wird. Strukturell leitet sich Aciclovir vom Guanosin ab, wobei es jedoch vom Nucleosid durch eine acyclische Seitenkette, anstelle der Ringstruktur der Desoxyribose, abweicht. Um seine antivirale Wirksamkeit zu erreichen, muss Aciclovir in sein Triphosphat umgewandelt werden. Dieser Schritt erfolgt in den virusinfizierten Wirtszellen durch eigene Enzyme [24].

Im Handel ist Aciclovir in Form von Tabletten, Suspensionen, Infusionslösungskonzentraten, Augensalben und einer 5 %igen Creme, welche in

Deutschland und Österreich zur Behandlung des Lippenherpes in Apotheken rezeptfrei erhältlich ist. Zahlreiche Generika sind auf dem Markt.

2.3. Physikochemische Charakterisierung

2.3.1. Partikelgröße

Zur Vermessung der Partikelgröße (mean droplet size - MDS) im Sub-Mikron Bereich wurde die Methode des DLS („dynamic light scattering“) herangezogen. DLS misst die Brown'sche Molekularbewegung und stellt diese in ein Verhältnis mit der Partikelgröße. Die Brown'sche Molekularbewegung ist jene zufällige Bewegung, die ein Partikel vollführt, nachdem es zu einem Zusammenstoß mit einem Lösungsmittelmolekül gekommen ist. Je größer das Teilchen ist, desto langsamer wird es diese Bewegung ausführen, während sich kleine Teilchen schneller und weiter bewegen. Die Geschwindigkeit der Brown'schen Bewegung wird mit dem translationalem Diffusionskoeffizienten D angegeben. Die Berechnung erfolgt durch die Stokes-Einstein Gleichung. DLS beschäftigt sich normalerweise mit Partikeln in Suspension, kann aber auch für Emulsions-Systeme verwendet werden. Bei DLS-Messungen ist es ausgesprochen wichtig, genauestens auf die Umgebungstemperatur einzugehen, da diese die Viskosität des Suspensionsmediums beeinflusst [25].

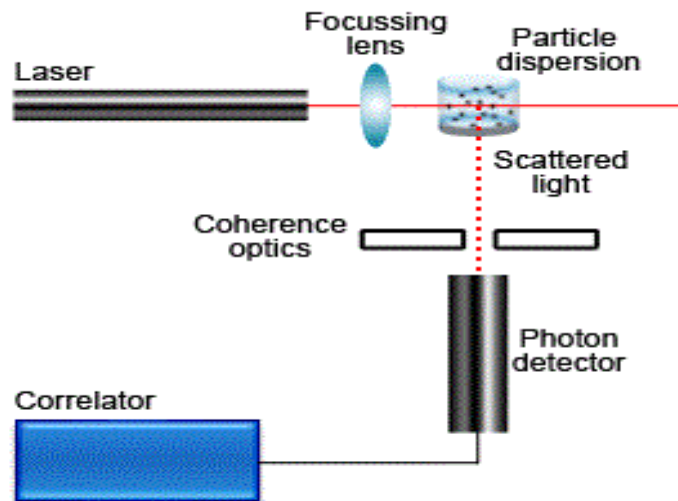


Abb.11: Schematische Darstellung der Messanordnung [26]

Der „hydrodynamic diameter“:

Bei der Berechnung der Partikelgröße gilt es zu beachten, dass der durch DLS ermittelte Durchmesser abhängig ist von der Diffusion des Partikels im Medium, sodass es sich beim Messwert um den hydrodynamischen Durchmesser, handelt. Das Partikel hat somit den gleichen Durchmesser wie eine Sphäre, die denselben translationalen Diffusionskoeffizienten besitzt. Dieser ist aber nicht nur von der Größe des Partikelkerns abhängig, sondern auch von dessen Oberflächenstruktur, sowie der Beschaffenheit und Menge der Ionen im umgebenden Medium [25].

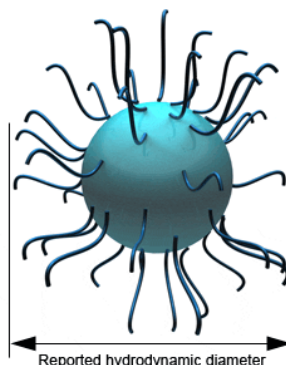


Abb.12: Hydrodynamischer Durchmesser [27]

Das Ergebnis einer Partikelgrößenmessung gibt, für sich, einen Eindruck, in welchem Größenbereich sich die Teilchen bewegen, reicht allein aber nicht aus, um diese zu charakterisieren. Dazu wird der Polydispersitätsindex, kurz PDI, hinzugezogen. Dieser gibt an, wie sich die Partikelgrößen verteilen. Anhand einer Gauß'schen Verteilung wird ermittelt, wie viele Teilchen von der als Mittel angenommenen Größe abweichen, dabei gilt, je kleiner der PDI, desto homogener ist die Partikelgröße.

2.3.2. Zeta-Potential

Das Zeta-Potential ist ein elektrokinetischer Effekt. Es handelt sich dabei um jenes elektrische Potential, dass an der Abscherschicht eines geladenen Teilchens in Suspension besteht.

Rund um geladene Partikel in Suspension lagern sich Ionen aus dem Suspensionsmedium an, welche alle Partikelladungen kompensieren. Das Teilchen erscheint aus der Entfernung als elektrisch neutral. Die innerste, fest gebundene Ionen-Schicht um das Teilchen nennt sich Helmholtz-Schicht, außerhalb dieser liegt eine diffuse Schicht aus locker gebundenen Ionen.

Legt man ein elektrisches Feld an, bewegt sich das geladene Teilchen, wodurch ein Teil der diffusen Schicht abgeschert wird. Das Partikel erscheint nicht mehr als elektrisch neutral, sondern verfügt wieder über ein Potential, welches Zeta-Potential genannt wird. Die aus dem angelegten, elektrischen Feld resultierende Geschwindigkeit des Teilchens ist dabei ein Maß für das Zeta-Potential [28][29].

Allgemein gilt: Je höher das Zeta-Potential und die Oberflächenladung einer Emulsionen, desto höher ist deren Stabilität. Der Grund dafür ist die elektrostatische Abstoßung gleichsinnig geladener Partikel. Bei einer geringen Oberflächenladungsdichte ist diese Abstoßung wenig vorhanden, und die Stabilität damit gering.

In der folgenden Aufstellung ist eine Übersicht über Zeta-Potential und Stabilität gegeben.

Zetapotential	Stabilität
+60 bis +80	gute Stabilität
-5 bis +5	maximale Ausflockung
-15 bis -10	untere Grenze der Ausflockung
-60 bis -30	mittlere Stabilität
≤ -61	sehr gute Stabilität

Als erstrebenswert gelten Zeta-Potential-Werte von über +60/- 30 mV [29].

Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die physikalische Stabilität einer Emulsion nicht ausschließlich von deren Zeta-Potential abhängig ist. Bei Emulsionen ist für die physikalische Stabilität die Festigkeit des Tensidfilmes von großer Bedeutung. Diese ist maßgeblich abhängig vom verwendeten Emulgator. Besteht ein Tensidfilm von hoher Festigkeit, so werden die Tröpfchen in Emulsion bei Zusammenstoß voneinander abprallen, während bei geringer Festigkeit einzelne Tropfen dazu neigen, sehr leicht zu koaleszieren [29].

Zur Messung des Zeta-Potentials wurde ein Zeta Sizer®¹ verwendet. Ein elektrisches Feld wird angelegt, wobei die geladenen Teilchen zur entgegengesetzt geladenen Elektrode wandern. Die von den Teilchen erreichte Geschwindigkeit ist dabei direkt

¹Nano ZS von Malvern Instruments Inc., UK

proportional zur Magnitude des Zeta-Potentials. Die Technik, die die Geschwindigkeit misst, ist die Laser-Doppler-Anemometrie [29].



Abb.13: Zetasizer®

Die Messung des Zeta-Potentials erfolgt in speziellen Messzellen. Dazu wurden aus den Nanoemulsionen Verdünnungen hergestellt, diese in die Messzellen überführt und am Zetasizer® vermessen.

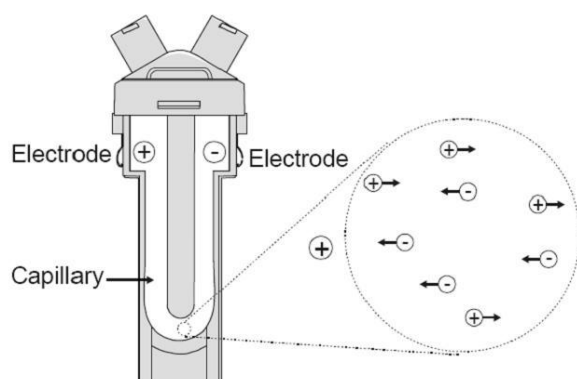


Abb.14: Schematische Darstellung einer Messzelle zur Zetapotentialbestimmung [30]

Um eine konstante Leitfähigkeit des Dispersionsmediums zu gewährleisten, wurde die Messlösung mit einem eingestellten Medium, in diesem Fall mit 0,01mM NaCl-Lösung verdünnt [29].

Es wurden verschiedene Verdünnungsstufen (1:100, 1:400, 1:1000) vermessen, um festzustellen, bei welcher Probenkonzentration eine optimale Messung erzielt wird. Dazu wurde bestimmt, ab welcher Verdünnung die Messungen gleich bleibende Werte zeigen. Während sich zwischen den Verdünnungen 1:100 und 1:400 noch Schwankungen feststellen ließen, waren die Werte zwischen 1:400 und 1:1000 konstant.

Die optimale Verdünnung für die Messungen war 1:400 mit einer 0,01mM NaCl-Lösung.

2.3.3. pH-Wert

Ein weiterer Parameter für die Stabilität einer Nanoemulsion ist der pH-Wert. Schwankungen können auf unzureichende chemische Stabilität hinweisen, wie sie zum Beispiel bei Kontamination mit Mikroorganismen, bei unzureichendem Lichtschutz etc. auftritt. Die dabei entstehenden Abbauprodukte können eine pH-Wertänderung bedingen.

Der pH-Wert wurde unmittelbar nach Herstellung und während der gesamten Periode der Stabilitätsmessungen (24 Wochen) in denselben Intervallen wie Partikelgröße und Zeta-Potential mittels pH-Meter kontrolliert. Die Messung erfolgte dabei direkt im Aufbewahrungsgefäß.

2.3.4. Cryo-TEM

Die Überprüfung der Partikelgrößen, die mittels dynamischer Laserlichtstreuung bestimmt wurden, wurde von Dr. Günter Resch² durchgeführt.

Die Überprüfung der Daten mit Hilfe eines bildgebenden Verfahren ist wichtig, da die Werte, die mittels DLS erhalten werden, nicht genügend Einblick in die Morphologie der Emulsion gewähren. Zudem macht es die Cryo-TEM möglich, Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheit der Emulsionströpfchen zu treffen, welche wiederum in direktem Zusammenhang zur Stabilität des Systems gesehen werden kann [31].

² Electron Microscopy Facility, Campus Science Support Facilities GmbH, Dr. Bohr-Gasse 3, 1030 Vienna, Austria

3. Methoden

3.1. Niedrigenergiemethode zur Herstellung multipler Nanoemulsionen

Wie zuvor dargelegt, wurde zur Herstellung der W/O/W-Emulsionen die Phasen-Inversions-Temperatur-Methode angewandt, durch welche es möglich ist, ohne Hochdruckhomogenisation oder Ultraschall, Nanoemulsionen zu produzieren. Sowohl bei der Auswahl der verwendeten Hilfsstoffe als auch bei der Vorgehensweise, orientierte man sich an den Vorgaben der Literatur nach Anton et al. [1].

3.1.1. Formulierung

Um sich die Methode zu erarbeiten, wurde eine Nanoemulsion nach nachfolgender Rezeptur hergestellt. Es handelt sich dabei um eine Anfertigung mit einem Tensidgehalt von 4,35%.

Basisformulierung	%
Solutol HS15	4,35
Aqua dest.	19,90
Miglyol 812	8,50
Span 80	q.s.
NaCl	0,60
Aqua dest	66,65

Tab.2: Basisformulierung: Komponenten der Wasserphase (hellblau), davon Aqua dest. zur Phasenumkehr (hellgrau), Komponenten der Ölphase (hellrot)

Hierbei handelt es sich um eine W/O/W-Nanoemulsion mit leeren Mizellen, also ohne eingearbeiteten Arzneistoff. Diese Variante wurde in Folge immer dann gewählt, wenn es galt, die Grundformulierung zu verbessern, ohne, dass die Beladung der

Mizellen dabei eine Rolle gespielt hätte. Hierdurch war es möglich, kostengünstiger und schneller zu arbeiten und es fielen geringere Mengen des Arzneistoffs als Abfall an.

Bei der nachfolgenden Arbeitsvorschrift handelt es sich um die vollständige Variante, welche die Einarbeitung von Arzneistoff in die Mizellen berücksichtigt:

3.1.2. Herstellungsvorschrift

Miglyol wird mit Span 80 in ein Becherglas eingewogen und mit dem Magnetrührer so lange gerührt, bis der Tensidtropfen verschwunden ist. Der Wirkstoff wird auf einem Kartenblatt eingewogen und hinzugefügt. Danach wird das Becherglas mit Folie verschlossen und 2h lang bei Raumtemperatur gerührt.

Solutol HS15 wird mit einem Teil des destillierten Wassers und NaCl in ein Becherglas eingewogen, mit Folie verschlossen und bei Raumtemperatur gerührt, bis alles gelöst ist. Danach wird langsam auf ca. 85° C erhitzt, dabei wird der Ansatz stark gerührt. Durch ein Loch in der Folie wird mittels einer Eppendorf-Pipette die Ölphase zugetropft und dabei immer wieder die Temperatur kontrolliert. Nach vollständiger Zugabe der Ölphase wird noch einige Minuten lang bei 85° C weitergerührt.

Danach wird das Becherglas mit den vereinigten Phasen auf eine kalte Rührplatte überführt, stark gerührt und in einem Guss mit dem restlichen Wasser versetzt. Unter weiterem Rühren lässt man auf Raumtemperatur abkühlen. Danach wird die Nanoemulsion zur Aufbewahrung in eine Epruvette umgefüllt. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank bei 8° C oder bei Raumtemperatur.

Während der Herstellung war zu beobachten, dass die zuerst klare Lösung von NaCl und Solutol HS15 in Aqua dest. mit zunehmender Temperatur ein immer milchigeres Aussehen erreichte. Nach vollständiger Zugabe der Ölphase war das Gemisch cremig und undurchsichtig weiß. Die abschließende Wasserzugabe führte zu einer erneuten Änderung des Erscheinungsbildes: Die dadurch entstandene W/O/W-Nanoemulsion zeigte sich als milchige, leicht bläulich opaleszierende Flüssigkeit.

Die physikochemische Überprüfung ergab eine durchschnittliche Teilchengröße von 136,47 nm.

3.1.3. Nomenklatur

Durch die Vielfalt der hergestellten Formulierungen zur Optimierung der Rezeptur war es bald nötig, ein geeignetes Nomenklatursystem zu entwickeln. Von zentralem Interesse dabei war es, alle maßgeblichen Inhalte auf den ersten Blick übersichtlich darzustellen.

Prinzipiell gestaltete sich der Aufbau wie folgt:

Haupttensid (%) - [mizellbildendes Tensid] – Wirkstoff (- ohne beladene Mizellen)

Der Anschaulichkeit halber hier ein Beispiel:

Sol(4,35)-[Span]

wäre die Nomenklatur der zuvor beschriebenen Basisformulierung; Würde man einen Arzneistoff, z.B. Aciclovir in die Mizellen der Ölphase einarbeiten, erhielte man:

Sol(4,35)-[Span]-ACV

Wird Aciclovir zugefügt, ohne dabei die Mizellen der Ölphase zu beladen, ergibt sich:

Sol(4,35)-[Span]-ACV-oMi

oMi	ohne beladene Mizellen
ACV	Aciclovir
Sol	Solutol HS 15
Span	Span 80

Tab.3: Verwendete Abkürzungen

3.2. Optimierungsstrategien

3.2.1. Ermittlung der optimalen Tensidkonzentration

Von primärem Interesse war es nun, jene Bereiche abzugrenzen, in denen eine Änderung der Tensidkonzentration zu einem brauchbaren Ergebnis führt. Zum einen durfte eine Mindestmenge an Tensid, die uns ein reproduzierbares Ergebnis mit guter Teilchengröße und deren gleichmäßiger Verteilung garantierte, nicht unterschritten werden. Zum anderen wollte man die negativen Begleiterscheinungen, die mit einem Überschuss an Tensid einhergehen, möglichst gering halten. Je mehr oberflächenaktive Substanzen eine dermale Applikationsform enthält, desto stärker ist ihre Wirkung an biologischen Membranen, was sich in einer verstärkten Irritation der Haut bemerkbar macht. Dennoch ist es notwendig, durch den gezielten Einsatz von Tensiden, die Stabilität einer Formulierung zu gewährleisten.

Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Formulierungen unterschiedlicher Tensidkonzentration ohne Arzneistoff hergestellt, miteinander verglichen und 24 Wochen lang auf deren Stabilität untersucht.

Die dabei untersuchten Tensidkonzentrationen waren 1,65%, 3,35%, 4,35%, 5% und 6,7%, von denen jeweils drei Ansätze hergestellt wurden. Direkt nach der Produktion wurden Teilchengröße, PDI, Zeta-Potential und pH-Wert gemessen und die Proben für die folgenden Stabilitätsuntersuchungen bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.

Erstrebenswert waren generell eine Teilchengröße von ca. 100 nm und ein PDI von unter 0,2. In der nachstehenden Tabelle lässt sich deutlich erkennen, dass ab einer Tensidkonzentration von 5% (in der Tabelle gelb unterlegt) Teilchengröße und PDI sehr gute Werte erreichen. Das gemessene Zeta-Potential, welches normalerweise einen Parameter für die Stabilität der Nanoemulsion darstellt, steht in keiner Relation zu jenen, die bei durch Hochdruckhomogenisation hergestellten Nanoemulsionen erzielt werden. Da jedoch über einen Zeitraum von 24 Wochen bei den untersuchten Formulierungen eine sehr gute Stabilität nachgewiesen werden konnte, entschieden wir uns, das Zeta-Potential für die weitere Bewertung nicht zusätzlich in Betracht zu

ziehen. Möglicherweise stellt das Zeta-Potential für die Beurteilung von W/O/W-Systemen nicht die Methode der Wahl dar.

Die Formulierungen mit 1,65% Tensidgehalt fanden keinen Eingang in die nachstehende Tabelle, da sich bei dieser Konzentration keine stabilen Nanoemulsionen bildeten.

	MDS [nm]	SD	PDI	SD	ZP [mV]	SD
Sol(3,35)-[Span]	175,62	9,64	0,352	0,002	-14,08	2,3
Sol(4,35)-[Span]	136,47	5,63	0,150	0,050	-15,73	6,6
Sol(5)-[Span]	104,54	3,53	0,070	0,007	-6,19	5,5
Sol(6,65)-[Span]	62,64	0,99	0,049	0,007	-13,62	3,5

Tab.4: Teilchengröße (MDS), PDI und Zeta-Potential (in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration)

Die gelb unterlegte Nanoemulsion wurde als Grundformulierung ausgewählt. Sie diene als Basis für die geplanten Modifikationen, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden. Ausgehend von einer Gesamtmenge von 5% Tensid bestand die Aufgabe nun darin, Teile des eingesetzten Emulgators sowohl der Öl- als auch der Wasserphase durch ein natürliches Tensid aus der Klasse der Zuckerester zu ersetzen. In diese modifizierte Grundformulierung sollte dann ein Arzneistoff eingearbeitet werden.

3.2.2. Ermittlung des bestgeeignetsten Mizellbildners

Nach Verwendung von Span 80 als Mizellbildner in der Ölphase wurde der Versuch unternommen, dieses durch ein Zuckertensid zu ersetzen. Die Vorversuche wurden mit einem Sucrose-Stearat (S-270) und einem Sucrose-Laurat (L-195) durchgeführt. Die eingesetzte Menge Zuckertensid orientierte sich an der vorher verwendeten Menge Span 80 von 1% Masseanteil der Ölphase (50 mg/5 g Miglyol 812), mit der ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt wurde. Zu Vergleichszwecken wurden auch Versuche mit der doppelten Menge Zuckertensid unternommen (100 mg/5 g Miglyol 812). Demnach ergaben sich 4 Ansätze: S-270 (50 mg), S-270 (100 mg), L-195 (50 mg) und L-195 (100 mg).

Im ersten Schritt sollten sich leere Mizellen in der Ölphase bilden. Nach Einwaage des Miglyols in ein Becherglas wurde mit der entsprechenden Menge Sucrose-Stearat beziehungsweise -Laurat versetzt, mit Alufolie abgedeckt, und eine Stunde unter Beobachtung auf dem Magnetrührer stark gerührt. Da sich bei dem Ansatz S-270 (100 mg) während des Beobachtungszeitraums keine vollständige Lösung einstellte, wurde die Zeit um eine weitere Stunde verlängert und dabei leicht erwärmt. Nach Ablauf der zweiten Stunde zeigte sich die Lösung von S-270(50 mg) als klar, S-270 (100 mg) war auch weiterhin nicht vollständig gelöst, was möglicherweise auf eine Sättigung hinwies. Bei den Lösungen des Sucrose-Laurats L-195 wiesen sowohl die niedrigere als auch die höhere Konzentration eine leichte Trübung auf, ohne das Partikel mit freiem Auge erkennbar gewesen wären.

Zur Weiterverarbeitung wurden demnach S-270 (50 mg), sowie L-195 (50 mg) und L-195 (100 mg) ausgewählt.

Im zweiten Schritt erfolgte die Einarbeitung von Aciclovir in die Mizellen. Nach Einwaage und Zugabe von jeweils 200 mg Aciclovir wurde, ebenfalls unter Verwendung einer Folie, 2 Stunden lang am Magnetrührer stark gerührt. Danach

wurde nach Arbeitsvorschrift weitergearbeitet. Die Ergebnisse wurden mittels Überprüfung von Teilchengröße, PDI und Zeta-Potential beurteilt.

S-270 (50 mg) erwies sich als Ansatz mit dem größten Potential. Durch den Einsatz von Sucrose-Stearat in dieser Konzentration konnten ähnlich gute Eigenschaften der Nanoemulsion wie mit Span 80 erzielt werden. Die Teilchengröße war mit weniger als 100 nm sogar noch geringer. Demnach lag es nahe, in der Herstellung auf das hautfreundliche Zuckertensid umzusteigen.

Auch bei Verwendung von L-195 (50 mg) kam es zu zufriedenstellenden, jedoch weniger deutlich ausgeprägten Verbesserungen, wodurch dem Stearat für die weitere Testung der Vorzug gegeben wurde.

3.2.3. Tensidmischungen

Wie zuvor erwähnt, wurde die optimale Tensidkonzentration in der Wasserphase mittels einer Testreihe ermittelt, und in Folge dessen auf einen Gehalt von 5% der Gesamtemulsion festgelegt.

Im nächsten Schritt wurde der Versuch unternommen, das dabei verwendete Solutol HS15 teilweise durch ein Zuckertensid mit den bekannten Vorteilen zu ersetzen. Der vollständige Ersatz des etoxylierten Tensids war in diesem Fall nicht möglich, da diese spezielle Klasse von Tensiden über die physikochemische Eigenschaften verfügt, die für die angewendete Methode von essentieller Bedeutung sind. Die vorhergegangenen Versuche zur Verwendung eines Zuckeresters zur Mizellbildung wurden hierbei ebenso berücksichtigt, weswegen ausschließlich S-270 in der Ölphase zum Einsatz kam.

Bei der Auswahl des Zuckeresters für die Wasserphase galt es vor allem ein Kriterium zu erfüllen: Sein HLB-Wert sollte dem des Solutol HS-15 möglichst ähnlich sein, um optimale Emulgatoreigenschaften in der gewünschten Phase zu

gewährleisten. Vorversuche, bei denen jeweils 2% des Stamm-Tensids, bei ansonsten gleichbleibender Vorgehensweise, durch das Zuckertensid ersetzt wurden, wurden mit drei Estern der Saccharose mit unterschiedlichen Fettsäuren durchgeführt: S-1670, ein Stearat, L-1695, ein Laurat und P-1670, ein Palmitat.

Sowohl die Verwendung des Palmitats, als auch des Laurats führte schon während der Herstellung zu nicht zufriedenstellenden Ergebnissen und in Folge dessen zu sehr hohen Partikelgrößen und einer ungleichmäßigen Partikelgrößenverteilung in der physikalischen Prüfung. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine Inkompatibilität der einzelnen Emulgatorkomponenten. Zur weiteren Testung wurde das Stearat S-1670 ausgewählt, welches sowohl in der Verarbeitung, trotz seiner schlechten Löslichkeit, als auch nach den gemessenen Parametern als am besten geeignet erschien.

3.2.4. Vorgehensweise mit S-1670

Die Konzentrationen für die Versuche wurden wie folgt festgelegt:

Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]

Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]

Sol(5)-[S270]

Sämtliche Ansätze wurden ohne Zugabe von Aciclovir, also mit leeren Mizellen, bereitet.

Um der im Vergleich zu Solutol HS15 schlechteren Löslichkeit des Zuckeresters, und dem damit verbundenen zeitlichen Mehraufwand, entgegenzuwirken, wurde die Herstellungsvorschrift bei Verwendung von S-1670 als Emulgator geringfügig modifiziert. Ein Teil des Wassers, welches bei herkömmlicher Herstellung zum Schluss hinzugefügt wurde, sollte durch Zugabe zur Ausgangslösung für eine verbesserte Löslichkeit sorgen. Diese Vorgehensweise erwies sich als zielführend, zumal beim Endprodukt keine Abweichungen von dem nach herkömmlicher Methode

hergestellten Ergebnis beobachtet werden konnten, die Lösungsgeschwindigkeit aber deutlich erhöht wurde.

Modifizierte Herstellungsvorschrift:

Miglyol wird mit S-270 in ein Becherglas eingewogen und auf dem Magnetrührer so lange gerührt, bis sich der Zuckerester gelöst hat. Der Wirkstoff wird auf einem Kartenblatt eingewogen und hinzugefügt. Danach wird das Becherglas mit Folie verschlossen und 2h lang bei Raumtemperatur gerührt.

Das Wasser, welches im letzten Schritt zugegeben werden soll wird in ein Becherglas eingewogen und im Kühlschrank bei 8 °C vorgekühlt.

Solutol und S-1670 werden mit einem Teil des Wassers und NaCl in ein Becherglas eingewogen, mit Folie verschlossen und bei Raumtemperatur gerührt, bis alles gelöst ist. Danach wird langsam auf ca. 85 °C erhitzt, dabei wird der Ansatz stark gerührt.

Durch ein Loch in der Folie wird mittels einer Eppendorf-Pipette die Ölphase zugetropft und dabei immer wieder die Temperatur kontrolliert. Nach vollständiger Zugabe der Ölphase wird noch einige Minuten lang bei knapp 90 °C weitergerührt und das vorbereitete Wasser aus dem Kühlschrank geholt.

Danach wird das Becherglas mit den vereinigten Phasen auf eine kalte Rührplatte überführt, stark gerührt und in einem Guss mit Wasser versetzt. Unter weiterem Rühren lässt man auf Raumtemperatur abkühlen.

3.2.5. Physikochemische Charakterisierung

	MDS [nm]	SD	PDI	SD	ZP [mV]	SD
Sol(5)-[S270]	88,73	3,35	0,064	0,011	-15,07	1,80
Sol/S1670(4,35/0,65) -[S270]	63,34	0,19	0,080	0,006	-20,30	4,10
Sol/S1670(3,35/1,65) -[S270]	653,22	332,55	0,895	0,087	-30,60	10,18

Tab.5: Teilchengröße (MDS), PDI und Zeta-Potential (in Abhängigkeit von der verwendeten Tensidkombination)

Wie aus der Tabelle ersichtlich konnten bei Ersatz von 0,65% Solutol, bezogen auf die Gesamtmasse der Emulsion, durch S-1670 bei geringfügig höherem PDI, kleinere Teilchen produziert werden, als bei der Verwendung von reinem Solutol HS-15. Wurden jedoch größere Mengen, in diesem Fall 1,65% der Gesamtmasse, durch das Zuckertensid ersetzt, konnten sich keine stabilen W/O/W-Systeme mehr bilden. Setzte man also Solutol und S-1670 in einem Masseverhältnis von 13:2 als Co-Tenside ein, so ergab sich eine synergistische Wirkung, die bei Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten des Zuckeresters wieder verloren ging. Ein Masseverhältnis von 10:5 dagegen führte zu Strukturverlusten innerhalb der Nanoemulsion, und in weiterer Folge zu Instabilität.

3.3. Herstellung der arzneistoffhaltigen Formulierungen

3.3.1. Vorversuche zu Arzneistoffen

Die zwei Hauptkriterien bei der Auswahl der zu testenden Arzneistoffe waren zum einen die Hydrophilie des Moleküls, zum anderen der Nutzen einer dermalen Applikationsform des jeweiligen Pharmakons. Es wurden dementsprechend Substanzen ausgewählt, die bereits in dermalen Zubereitungen auf dem Markt waren, welche aber ihrer Hydrophilie wegen ein Problem bei der Verarbeitung darstellen. Diese Arzneistoffe waren Aciclovir, Minoxidil, Fluconazol und Coffein.

Die Vorversuche beschränkten sich bei Coffein auf die Herstellung der Ölphase und den Versuch, den Arzneistoff unter starkem Rühren am Magnetrührer mindestens zwei Stunden lang in Mizellen einzuarbeiten. Von Aciclovir, Minoxidil und Fluconazol wurden jeweils die vollständigen Nanoemulsionen produziert.

Während sich Aciclovir als sehr gut geeignet erwies, war es mit den anderen Substanzen nicht möglich, eine ausreichende Aufnahme in die Mizellen zu erreichen. Dies beruht möglicherweise auf einer unzureichenden Wasserlöslichkeit der verwendeten Arzneistoffe.

3.3.2. Formulierungen

Folglich wurden sämtliche arzneistoffhaltigen Formulierungen mit dem Virostatikum Aciclovir hergestellt. Als Grundformulierungen wählten wir:

Sol(5)-[Span]

Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270]

Sol(5)-[S-270]

Ausgehend von diesen Formulierungen wurde jeweils eine arzneistoffhaltige Formulierung mit und ohne beladene Mizellen bereitet, wobei jene ohne Mizellen als Vergleich dienen sollten. Die Unterschiede in der Beladung wurden durch

unterschiedliche Herstellungsverfahren erreicht. In Folge wird von Formulierungen „oMi“ die Rede sein, wenn bei deren Herstellung auf den Schritt der Mizell-Beladung verzichtet, und das Aciclovir der Wasserphase beigelegt wurde.

Es entstanden insgesamt 6 verschiedene Formulierungen, von denen jeweils drei Ansätze hergestellt wurden.

Formulierung	Solutol			Miglyol		Aqua		
	HS15	S1670	Span 80	S270	812	NaCl	dest.	ACV
Sol(5)-[Span]	5.00	-	0.25	-	8.35	0.60	84.80	-
Sol(5)-[Span]-ACV	5.00	-	0.25	-	8.35	0.60	84.80	1.00
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	5.00	-	0.25	-	8.35	0.60	84.80	1.00
Sol(5)-[S270]	5.00	-	-	0.25	8.35	0.60	84.80	-
Sol(5)-[S270]-ACV	5.00	-	-	0.25	8.35	0.60	84.80	1.00
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	5.00	-	-	0.25	8.35	0.60	84.80	1.00
Sol/S1670(6,35/0,35)-[S270]	4.30	0.70	-	0.25	8.35	0.60	84.80	-
Sol/S1670(6,35/0,65)-[S270]-ACV	4.30	0.70	-	0.25	8.35	0.60	84.80	1.00
Sol/S1670(6,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	4.30	0.70	-	0.25	8.35	0.60	84.80	1.00

Tab.6: Zusammensetzung der ausgewählten Formulierungen und ihrer Grundformulierungen (w/w%)

3.3.3. Physikochemische Charakterisierung

Sol(5)-[Span]-ACV und Sol(5)-[Span]-ACV-oMi:

	MDS [nm]	SD	PDI	SD	ZP [mV]	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	108,12	0,26	0,189	0,131	-15,88	0,59
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	125,29	24,25	0,236	0,231	-13,24	1,98

Tab. 7: Teilchengröße (MDS), PDI und Zeta-Potential (basierend auf Grundformulierung Sol(5)-[Span])

Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270]-Acic und Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270]-Acic-oMi:

	MDS [nm]	SD	PDI	SD	ZP [mV]	SD
Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270]-Acic	74,61	4,40	0,283	0,110	-20,60	2,73
Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270]-Acic-oMi	122,26	56,34	0,295	0,136	-29,65	6,01

Tab. 8: Teilchengröße (MDS), PDI und Zeta-Potential (basierend auf Grundformulierung Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270])

Sol(5)-[S-270]-Acic und Sol(5)-[S-270]-Acic-oMi:

	MDS [nm]	SD	PDI	SD	ZP [mV]	SD
Sol(5)-[S-270]-Acic	99,02	2,74	0,091	0,024	-13,17	1,59
Sol(5)-[S-270]-Acic-oMi	114,51	11,03	0,270	0,169	-10,80	3,81

Tab. 9: Teilchengröße (MDS), PDI und Zeta-Potential (basierend auf Grundformulierung Sol(5)-[S-270])

Anhand der Tabellen (7-9) lässt sich erkennen, dass bei Einarbeitung von Aciclovir in allen drei Fällen erstrebenswerte Teilchengrößen entstehen. Während diese jedoch bei Formulierung Sol(5)-[S-270]-Acic mit einem PDI von 0,091 in einem sehr engen Bereich anzutreffen sind, zeigten sich bei den anderen beiden Formulierungen breitere Verteilungen.

3.4. In vitro Untersuchungen auf der Haut

Die in vitro Untersuchungen wurden auf Schweinehaut durchgeführt, die bei -18° C für maximal 6 Monate tiefgekühlt gelagert wurde. Für die Franz-Zell Experimente diente dermatomisierte Schweinebauchhaut mit einer Dicke von 500 µm als Modell-Membran, während für die Tape-Striping Versuche naturbelassene Schweineohren verwendet wurden.

3.4.1. Franz-Diffusionszellen

Die bereits auf eine Dicke von 500 µm vorgeschnittene, und für die Versuche frisch aufgetaute Schweinebauchhaut wurde mit Krepppapier trockengetupft und in Stücke von passender Größe zerteilt. Diese wurden in die Franz-Zellen eingespannt. Nach der Befüllung mit dem Akzeptormedium (Phosphatpuffer pH 7.4, 0.012 M) wurden die Zellen mit jeweils 50 µg der Formulierung beschickt. Die Zellen wurden mit Alufolie verschlossen und in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37° C überführt.

Die Probennahme erfolgte jeweils nach 2, 4, 6 und 8 Stunden. Die Quantifizierung von Aciclovir erfolgte mittels HPLC

.



Abb.15: Franz-Zelle im Detail



Abb.16: Franz-Zell Experimente

3.4.2. Tape Stripping Experimente

Die Tape-Stripping Experimente wurden auf unbehandelten Schweineohren durchgeführt. Die Behaarung wurde mit einer Schere sorgfältig gekürzt. Um die Intaktheit der Barrierefunktion zu testen, wurde der transdermale Wasserverlust, kurz TEWL gemessen. Danach wurden von der Formulierung 5mg cm^{-2} auf eine genau bezeichnete Stelle aufgetragen, und nach einer Stunde Einwirkzeit 20 Tape-Strips abgerissen. Von jedem Abriss wurde der Gehalt an Arzneistoff und die Menge an Korneocyten bestimmt. Nach Beendigung des Tape-Stripping wurde erneut der TEWL gemessen, wobei sich die Werte durch den Verlust des Stratum Corneum deutlich erhöhten [32].

Die Quantifizierung der Korneocyten erfolgte mittels Squame Scan 850A (Heiland electronics, Deutschland) im nahen Infrarot-Bereich. Der Gehalt an Aciclovir wurde durch HPLC-Analytik ermittelt, wobei dasselbe System wie bei den Franz-Zell Experimenten angewendet wurde [32].

3.5. Arzneistoffanalytik

3.5.1. HPLC-Analytik von Aciclovir

Die Quantifizierung von Aciclovir erfolgte mittels HPLC (high performance liquid chromatography). Für diese Arbeit wurde folgendes HPLC-System verwendet:

Apparatur: Perkin Elmer (USA) Series 200, Säulenofen und 4-Kanal-Pumpe ISS-200

Autosampler: Perkin Elmer ISS-200

Vorsäule: Nucleosil 100-5 C18 (40mm x 4mm, Macherey-Nagel, USA)

Säule: Nucleosil 100-5 C18 (250mm x 4mm, Macherey-Nagel, USA)

Detektion: Perkin Elmer Diodenarraydetektor 235C

Analysensoftware: TotalChrom Navigator Software

Nachstehende Parameter wurden für die Detektion des Aciclovir gewählt: Als mobile Phase diente Methanol/Wasser (10/90) und als Detektions-Wellenlänge wurden 280 nm festgelegt.

Es wurde eine Eichgerade zur Ermittlung des Aciclovir-Gehaltes erstellt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe, ausgehend von einer Einwaage von 9,49 mg Aciclovir in 10 ml Methanol, angelegt und im Verhältnis 1:2 verdünnt, wodurch folgende Konzentrationen erhalten wurden:

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Peakfläche	Verdünnung
949,00 $\mu\text{g / ml}$	35374476,88	V0
474,50 $\mu\text{g / ml}$	19126469,69	V1
237,25 $\mu\text{g / ml}$	9640995,73	V2
118,63 $\mu\text{g / ml}$	4857717,13	V3
59,31 $\mu\text{g / ml}$	2415985,63	V4
29,66 $\mu\text{g / ml}$	1198886,03	V5
14,83 $\mu\text{g / ml}$	607607,44	V6
7,41 $\mu\text{g / ml}$	305225,01	V7
3,71 $\mu\text{g / ml}$	155144,18	V8
1,85 $\mu\text{g / ml}$	76985,01	V9
0,93 $\mu\text{g / ml}$	39749,91	V10
0,46 $\mu\text{g / ml}$	18205,91	V11

Tab.10: Verdünnungsreihe von Aciclovir zur Erstellung der Eichgerade

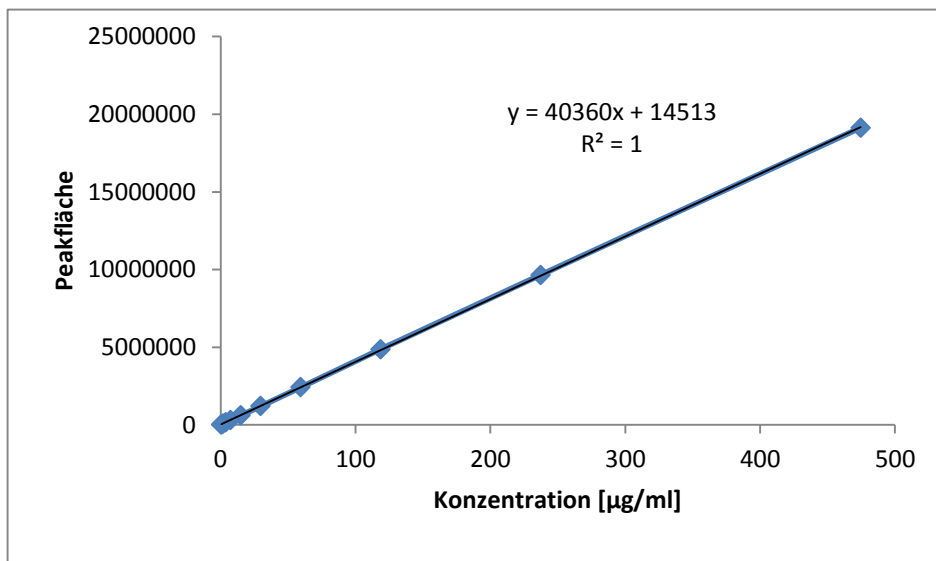


Abb.17: Eichgerade von Aciclovir

Wie aus Abb. 17 ersichtlich ergab sich eine lineare Korrelation der Peakfläche zur Konzentration von Aciclovir.

Die Einwaage für die Gehaltsbestimmung betrug 10 mg der Formulierung.

4. Ergebnisse

4.1. Vorversuche

4.1.1. Vorversuche zur Auswahl eines geeigneten Arzneistoffs

Die optische Prüfung nach Einarbeitung in die Mizellen (2 h am Magnetrührer) führte zu folgendem Ergebnis: Coffein konnte nicht ausreichend in die Mizellen aufgenommen werden, die Versuche mit Aciclovir, Minoxidil und Fluconazol ergaben, in der angegebenen Reihenfolge, mehr bis weniger transparente Emulsionen.

Nach Herstellung der W/O/W-Systeme mit Minoxidil wurden Partikelgrößen um die 400 nm und PDI-Werte über 0,3 gemessen, welche nach vierwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur auf über 0,8 angestiegen waren, die Partikelgrößen erreichten zu diesem Zeitpunkt Werte von bis zu 1000 nm.

Fluconazol lieferte schon am Tag der Herstellung, bei einer Partikelgröße von rund 150 nm, PdIs von mehr als 0,4. Die weitere Vermessung wurde unterlassen.

Die genauen Werte für Aciclovir sind in Tab. A4, Anhang 7.2. ersichtlich. Zusammenfassend ergaben sich Partikelgrößen von knapp über 100 nm, bei einem wünschenswerten PDI von unter 0,2.

4.1.2. Vorversuche zur Auswahl eines geeigneten Mizellbildners

Die optische Beurteilung der 4 Ansätze fiel zugunsten von S270 (50 mg) aus, da sowohl L195 (50 mg), als auch L195 (100 mg) eine bestehenbleibende Trübung aufwiesen, welche möglicherweise auf in der Ölphase verbliebenen Arzneistoff hindeuten könnte. Der Emulgator S270 (100 mg) konnte schon im Vorfeld ausgeschlossen werden, weil sich diese Konzentration als unzureichend löslich erwies. In Anbetracht der guten Ergebnisse, die mit S270 (50 mg) erzielt wurden, wird als Ursache dafür eine Übersättigung der Lösung angenommen.

Nanoemulsionen 5% Tensid	MDS	PDI	ZP	Cond	pH
Mizellen mit					
Span 80 50mg	106,40	0,074	-13,0	0,0698	6,31
S270 50mg	99,95	0,130	-14,7	0,0520	6,10
L195 50mg	103,77	0,095	-10,6	0,0468	6,19
L195 100mg	114,27	0,082	-14,1	0,0452	6,36

Tab.11: Vergleich von S270 (50 mg), L195 (50 mg) und L195 (100mg) als Mizellbildner anhand der Parameter MDS, PDI, ZP und pH.

Wie in der obenstehenden Tabelle ersichtlich, zeigten alle drei verbleibenden Ansätze (im Vergleich mit Mizellen aus Span 80, siehe Tabelle 11, 1. Abschnitt) zufriedenstellende Partikelgrößen und PDIs. Der Emulgator S-270 (50 mg) liefert eine Teilchengröße unter 100 nm.

4.1.3. Vorversuche zu Tensidmischungen

Die Verwendung des Saccharose-Palmitats P1670 als partieller Ersatz für Solutol HS15 führte zu Veränderungen des Aussehens der Nanoemulsion während und nach der Herstellung. Die Messungen zeigten für diese Kombination sehr hohe PDI-Werte, welche die Angabe einer realistischen Partikelgröße unmöglich machen.

Auch S1670 wies, bei deutlich erniedrigter Teilchengröße, einen etwas erhöhten PDI auf.

Solutol 4,35% +	MDS	PdI	ZP	Cond	pH
P1670 0,65%	133,93	0,595	-13,5	0,0468	6,14
S1670 0,65%	83,21	0,235	-13,4	0,0499	6,22

Tab.12: Vergleich der Tensidmischungen Sol + P1670 und Sol + S-1670 anhand der Parameter MDS, PDI, ZP und pH.

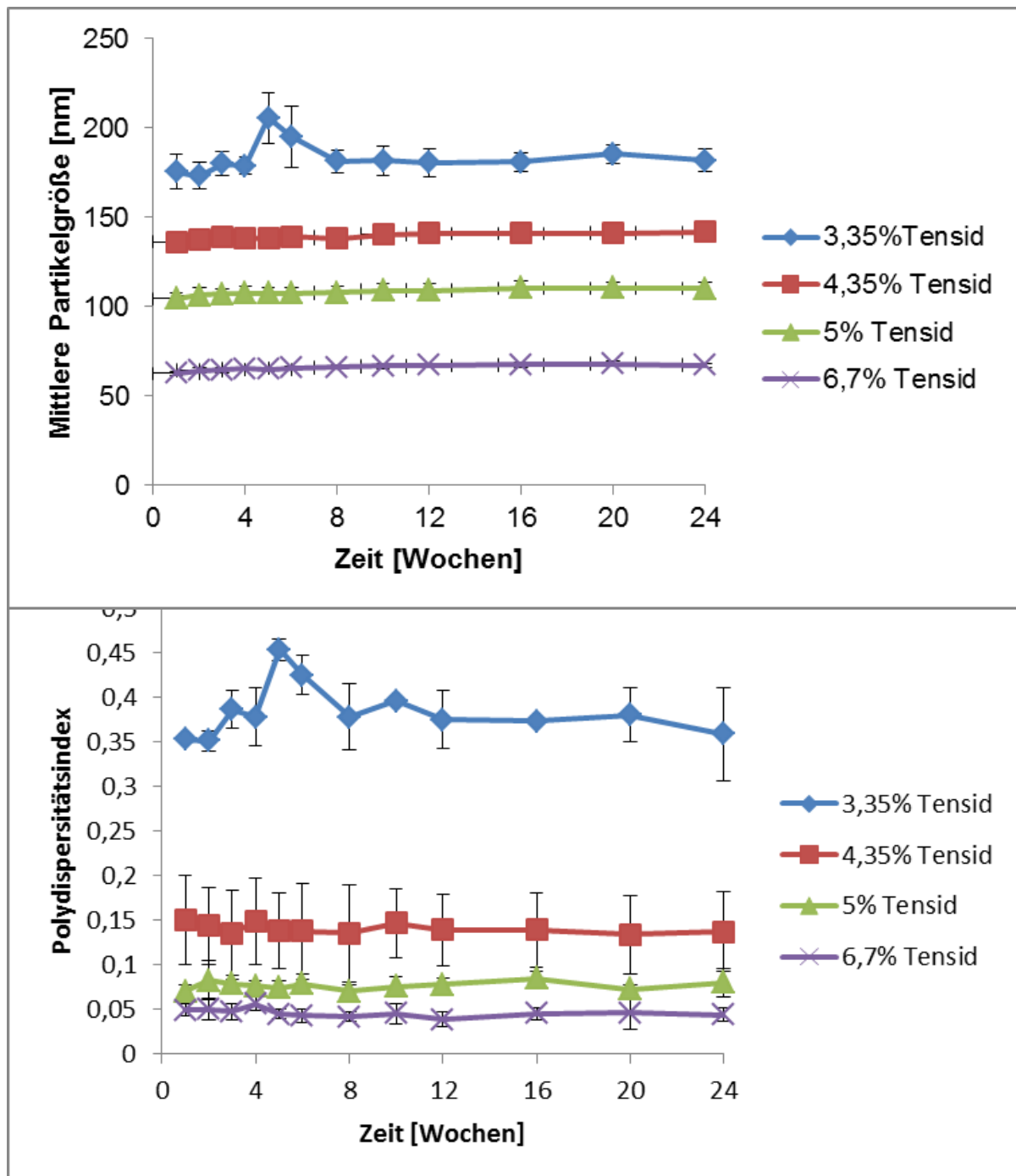
4.2. Physikochemische Charakterisierung und Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsstudien, welche die Messung von MDS, PDI, Zeta-Potential und pH-Wert beinhalteten, wurden über einen Zeitraum von 16-24 Wochen durchgeführt. Die Lagerung erfolgte dabei bei Raumtemperatur (Aciclovir-hältige Formulierungen) oder 8 °C (Grundformulierungen auf Basis Solutol/Span). Für die Zeta-Potential-Messungen lag die Leitfähigkeit der Proben unter 0.05 mS cm⁻¹.

4.2.1. Grundformulierungen

Alle Formulierungen auf Basis von Solutol HS15 und Span80 zeigten eine ausgezeichnete Langzeit-Stabilität. Die Partikelgrößen sowie der PDI blieben über den gesamten Zeitraum konstant. Auch die anderen Werte zeigten keine nennenswerten Schwankungen. (siehe Tabelle A2, Anhang 7.2.). Sol(5)-[Span] erreichte nach 24 Wochen eine Partikelgröße von 110,19nm bei einem PDI von 0,080 (Anfangswerte: 104,54nm und 0,070). Mit Ausnahme der Formulierung Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270], bei der die Messung von Partikelgröße und PDI abgebrochen werden musste, weil diese Größen inakzeptable Werte erreichten, konnten bei allen Formulierungen über einen Zeitraum von 24 Wochen zufriedenstellende Ergebnisse erhalten werden.

Die untenstehenden Grafiken sollen nochmals verdeutlichen, in welchem Maße sich die Grundformulierungen vom Typ Solutol/Span, abhängig von der eingesetzten Tensidmenge, in ihren Eigenschaften bezüglich Partikelgröße und PDI veränderten und als stabil erwiesen (siehe Abb.18 und 19):



Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270] und Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270] zeigt deutlich die Abhängigkeit der Partikelgröße und des PDI von der eingesetzten Menge an S1670: Die Partikelgröße stieg ab einem Anteil von mehr als 0,65% Saccharoseester an der Gesamtmasse drastisch an, die in der Grafik unten enthaltenen Fehlerindikatoren zeigen deutlich, dass die Partikelgröße als stark unregelmäßig und nicht bestimmbar eingestuft werden kann (siehe Abb.20).

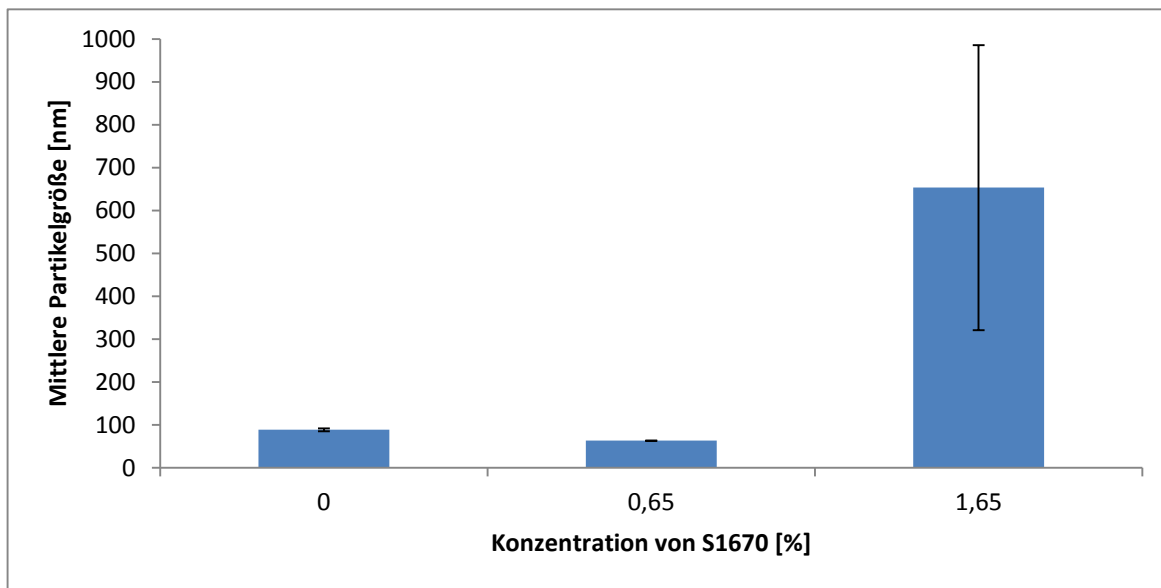


Abb.20: Abhängigkeit der Partikelgröße vom Anteil an S1670 (w/w%) an der Gesamtmasse

4.2.2. Arzneistoffhaltige Formulierungen

Die Stabilitätsstudien betreffend der Aciclovir-haltigen Formulierungen erbrachten das Ergebnis, dass jene Formulierungen mit in Mizellen verkapseltem Aciclovir signifikant bessere Werte zeigten als jene ohne Mizellen. Über einen Zeitraum von 20 Wochen zeigten die Formulierungen mit Mizellen konstant kleinere Partikelgrößen mit einer engeren Größenverteilung. Besonders bei der Formulierung Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV viel ein sehr starker Größenunterschied auf. Die MDS der arzneistoffhaltigen Formulierungen mit Mizellen lag zwischen 5-10 nm über derer der Grundformulierungen ohne Aciclovir. (siehe Abbildung 22)

Bei den unterschiedlichen Formulierungen ergab sich in Bezug auf die Partikelgröße für die Formulierung Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV ein Vorteil. Die kleinere Partikelgröße war jedoch mit einer höheren Standardabweichung verbunden. Auffällig ist die extrem enge Größenverteilung innerhalb Formulierung Sol(5)-[S270]-ACV. (siehe Abbildung 21)

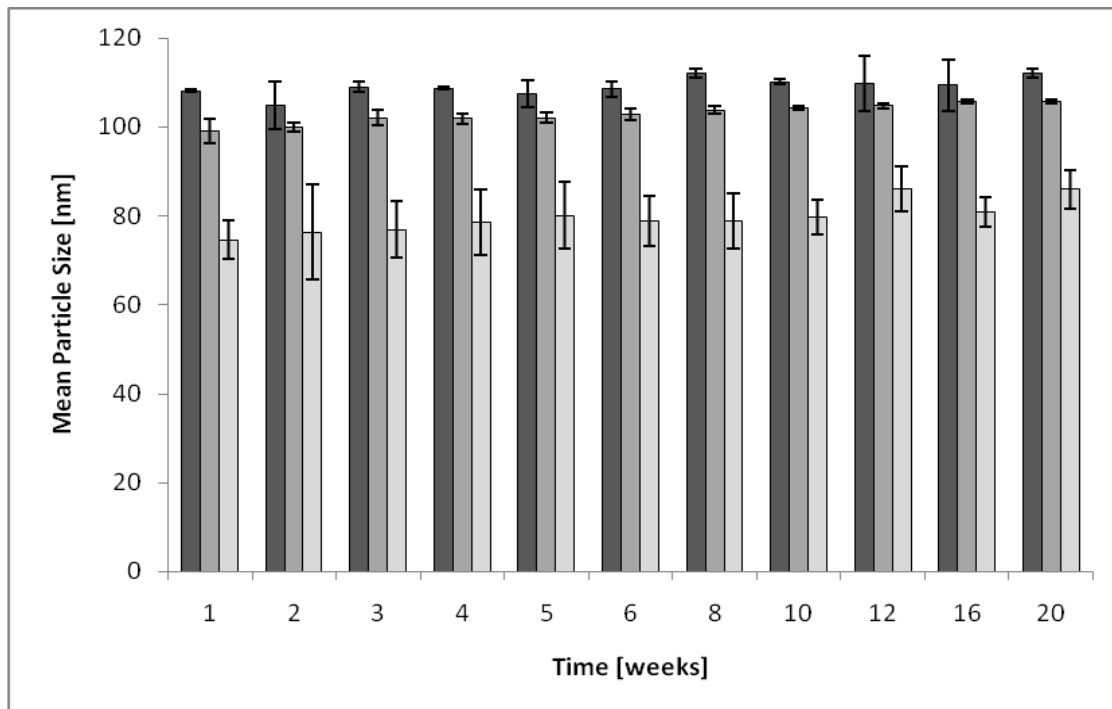


Abb. 21: MDS (Partikelgröße) der Aciclovir-hältigen Formulierungen über 20 Wochen: Sol-(Span)-ACV (dunkelgrau); Sol-(S270)-ACV (mittelgrau); Sol-S1670-(S270)-ACV (hellgrau)

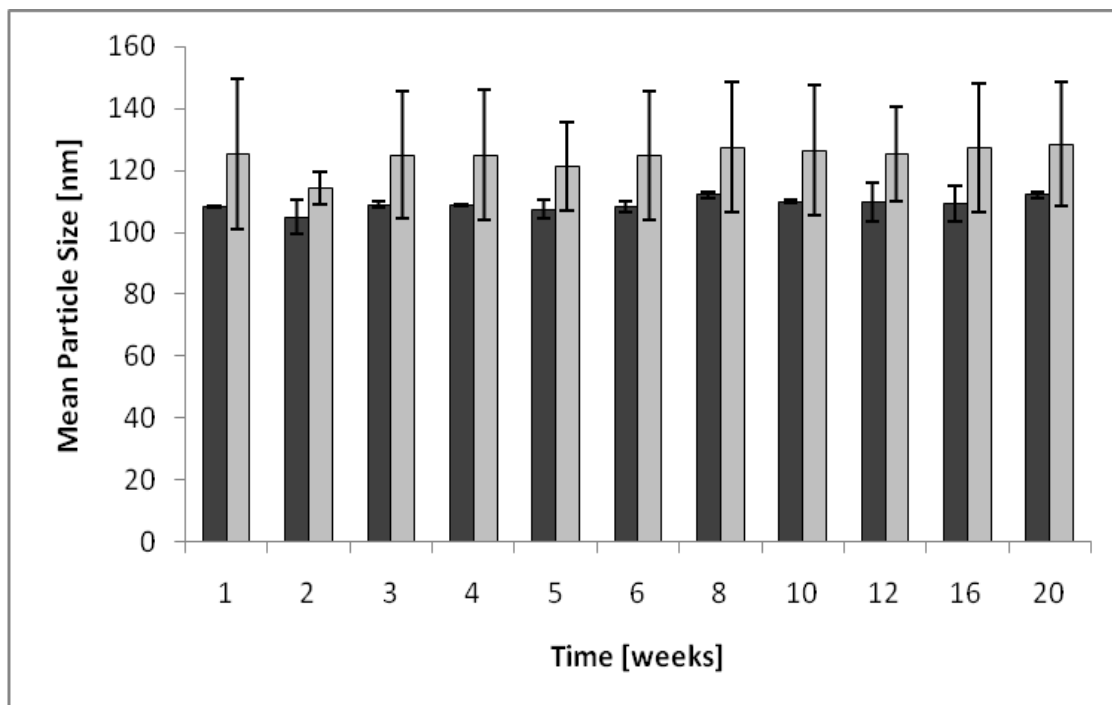


Abb. 22: MDS (Partikelgröße) der Formulierungen Sol-(Span)-ACV (dunkelgrau); Sol-(Span)-ACV-oMi (hellgrau) über 20 Wochen

4.2.3. Cryo-TEM

Da DLS bei der Beurteilung der Teilchengröße von Nanoemulsionen gewissen Einschränkungen unterliegt, diente die Cryo-TEM als Kontrolle. Die aus den Cryo-TEM-Untersuchungen entstandenen Bilder konnten im Wesentlichen die Ergebnisse zur Untersuchung der Teilchengröße durch DLS bestätigen. Auch die Gleichmäßigkeit in der Größenverteilung, die man aus den kleinen Werten des Polydispersitätsindex gefolgert hatte, konnte bestätigt werden. Die Öl-Tröpfchen verteilten sich gleichförmig in der Wasserphase, eine Darstellung der inneren Phase war mit dieser Technik nicht möglich, da die reversen Mizellen zu klein sind.

Anbei zeigte sich auch, dass die Mizellen der Formulierung Sol/S1670-[S270]-ACV eine besonders glatte Oberflächenstruktur aufweisen. Dies mag auf der Tatsache beruhen, dass Filme aus Tensidmischungen über eine erhöhte Oberflächen-Flexibilität verfügen.

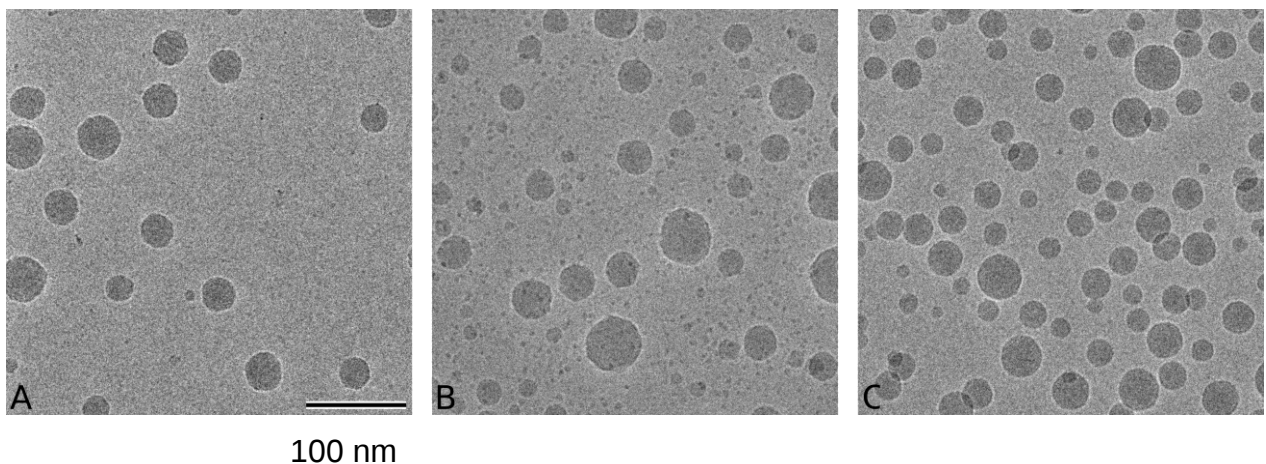


Abb. 23: Cryo-TEM-Aufnahme von den Formulierungen **A**: Sol-[Span]-ACV, **B**: Sol-[S270]-ACV, **C**: Sol/S1670-[S270]-ACV

4.3. *in vitro* Hautstudien

4.3.1. Franz-Diffusionszellen

Anhand der Franz-Zell-Studien konnte festgestellt werden, dass die Nanoemulsionen eine signifikant bessere Diffusion durch die Modellmembran aufweisen als eine wässrige Lösung von Aciclovir mit gleicher Wirkstoffkonzentration.

Die W/O/W-Nanoemulsionen zeigten eine geringfügig größere Potenz als die Vergleichsformulierungen ohne Mizellen (O/W). Dieser Unterschied ließ sich statistisch jedoch nicht bestätigen.

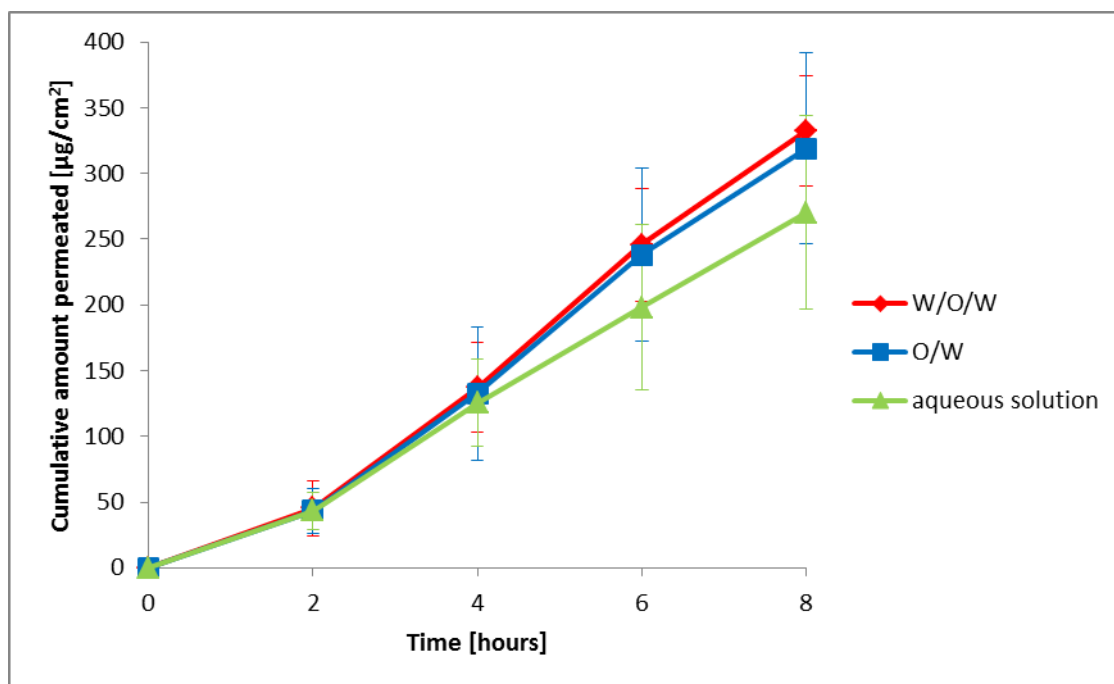


Abb. 24: Diffusionsprofile von ACV im Vergleich: W/O/W, O/W, wässrige Lösung

Innerhalb der verschiedenen Formulierungen waren die Unterschiede jedoch von keiner Signifikanz. Die gemessenen, diffundierten Arzneistoffmengen staffelten sich wie folgt:

Sol-[S270]-ACV > Sol-[Span]-ACV > Sol/S1670-[S270]-ACV

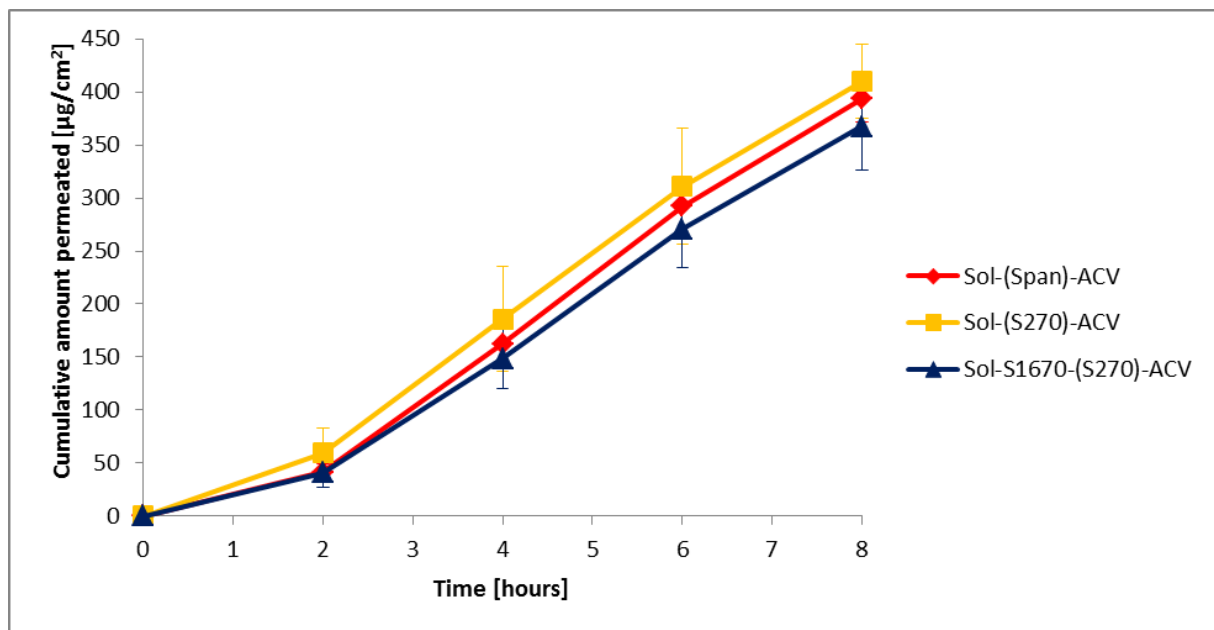


Abb. 25: Diffusionsprofile von ACV im Vergleich: Sol-[Span]-ACV, Sol-[S270]-ACV, Sol/S1670-[S270]-ACV

4.3.2. Tape Stripping Versuche

Generell zeigten die Penetrationsstudien den gleichen Trend wie die Franz-Zell-Experimente. Das aufgezeigte Penetrationsprofil ist repräsentativ für die Formulierung Sol(5)-[Span]-ACV. Es wies eine Eindringtiefe bis auf 75% der Hornschichtdicke auf. Die Formulierung Sol(5)-[S-270]-ACV verhielt sich ähnlich, während die Formulierung Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270]-ACV eine etwas geringere Penetrationstiefe zeigte. Die Unterschiede zwischen den Formulierungen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

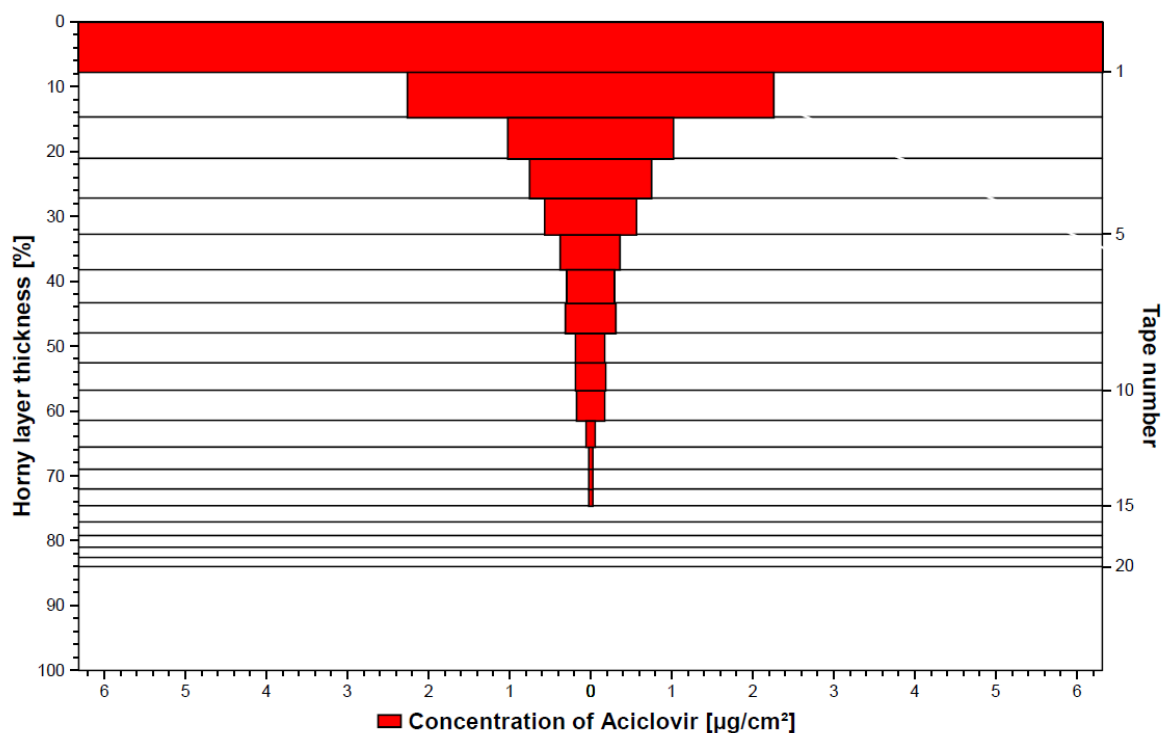


Abb. 26: Penetrationsprofil Sol(5)-[Span]-ACV

5. Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war es, mithilfe der Phasen-Inversions-Temperatur-Methode multiple Nanoemulsionen zur dermalen Applikation hydrophiler Arzneistoffe herzustellen, die Prozessparameter der Herstellungsmethode zu optimieren, sowie deren Anwendung anhand von in vitro-Studien zu bewerten. Im ersten Schritt wurden dazu Grundformulierungen nach den Angaben von Anton et al. [1][13] mit verschiedenen Tensidgehalten hergestellt, und nach den Parametern Teilchengröße, PDI und Zeta-Potential bewertet. Dabei stellte sich heraus, dass das Zeta-Potential der W/O/W-Formulierungen Werte annimmt, welche bei herkömmlichen Nanoemulsionen auf ungenügende Stabilität hinweisen. Da sich diese Annahme während der darauf folgenden Stabilitätsstudien, welche über einen Zeitraum von 24 Wochen an den Grundformulierungen durchgeführt wurden, nicht bewahrheitete, kamen wir zu dem Schluss, dass die Messung des Zeta-Potentials zur Bewertung der Stabilität bei W/O/W-Systemen keine ausreichende Aussagekraft besitzt. Unter den verschiedenen Tensid-Konzentrationen, die jeweils im Dreifach-Ansatz hergestellt wurden, zeigte sich die Formulierung Sol(5)-[Span] mit einer Teilchengröße von im Mittel 104,54 nm, als jene mit dem größten Potential. Sämtliche andere Partikelgrößen und PDI-Werte sind in Tabelle A2, Anhang 7.2. nachzuvollziehen.

Im nächsten Schritt wurde, ausgehend von Sol(5)-[Span], versucht, den Mizellbildner, Span 80, durch ein hautverträgliches, bio-abbaubares Zuckertensid auszutauschen. Im Zuge der Vorversuche mit Saccharose-Laurat L-195 und Saccharose-Stearat S-270, welche beide aufgrund ihres, dem Span 80 ähnlichen, HLB-Wertes ausgewählt wurden, zeigte sich vor allem mit S-270 die angestrebte Mizellbildung. Auch sonst konnten keine Nachteile auf partikulärer Ebene durch den Ersatz von Span 80 durch die Zuckerester festgestellt werden. Einzig die Verarbeitungszeit wurde leicht erhöht. Die benötigte Tensidmenge blieb gleich. Es entstand die neue Grundformulierung Sol(5)-[S-270] mit mittleren Teilchengrößen von 88,73nm (ersichtlich in Tabelle A3, Anhang 7.2.)

In weiterer Folge wurde versucht, auch das Tensid in der Wasserphase, welches für die Bildung der multiplen Emulsion verantwortlich ist, zu ersetzen. Da jedoch der Einsatz eines ethoxylierten Tensids, in diesem Fall Solutol HS15, bei der PIT-

Methode bindend ist und in Folge dessen ein vollständiger Ersatz undenkbar wäre, beliefen sich die Ansätze auf 4,35+0,65 und 3,35+1,65 Teile Solutol + Zuckerester S-1670, bezogen auf die Gesamtmenge. Wie in Tabelle A3, Anhang 7.2. ersichtlich, konnte mit der Formulierung Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270] eine weitere Verringerung der mittleren Teilchengröße auf 63,34 nm erreicht werden, während die Ergebnisse von Sol/S-1670(3,35/1,65)-[S-270] nicht zufriedenstellend waren. Es wird davon ausgegangen, dass diese größeren Mengen an Zuckertensid den Prozess der multiplen Emulsionsbildung nachhaltig negativ beeinflussen. Im Zuge der Versuche, ein Zuckertensid zum Einsatz zu bringen, wurde die herkömmliche Herstellungsmethode leicht abgeändert. Dadurch konnte eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht werden.

Im letzten Schritt der Optimierung wurden, ausgehend von den Grundformulierungen mit den jeweils besten Werten, arzneistoffhaltige Formulierungen mit und ohne Mizellen hergestellt, wobei die Formulierungen ohne Mizellen Kontrollzwecken dienten. Als Arzneistoff diente Aciclovir, da die Vorversuche mit Coffein, Fluconazol und Minoxidil zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen führten. Dabei zeigte sich, dass jene Formulierungen mit Aciclovir-beladenen Mizellen hinsichtlich der Parameter Partikelgröße und PDI gegenüber jenen ohne Mizellen deutlich im Vorteil waren, und, damit verbunden, die Überlegenheit der mizellbeladenen Formulierungen in Bezug auf deren Stabilität. Die Ergebnisse der diesbezüglichen Stabilitätsstudien sind in Tab. A4-A6, Anhang 7.2. nachzulesen.

Abschließend lassen sich die Ergebnisse der Optimierungsversuche wie folgt zusammenfassen: Die verwendete Menge an Gesamttensid sollte, hinsichtlich der angestrebten Teilchengröße und deren Verteilung, 5%, bezogen auf die Gesamtmasse, nicht unterschreiten. Eine weitere Steigerung der Tensidmenge führt zwar vorhersehbarer Weise zu noch kleinerer Partikelgröße, ein Vorteil in Bezug auf die Stabilität konnte jedoch nicht bestätigt werden (Tab.A2, Anhang 7.2.). Der Einsatz von Zuckertensiden erwies sich als sinnvoll, da sich die Partikelgröße verbesserte. Gerade bei der Formulierung Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270]-ACV war diese Verbesserung jedoch nur unter deutlichem Anstieg des PDI zu erreichen.

Die in vitro-Hautstudien bestätigten die Annahme, dass Aciclovir-hältige Nanoemulsionen über bessere Penetrations- und Permeationseigenschaften verfügen, als eine wässrige Lösung von Aciclovir. Unterschiede zwischen einer

herkömmlichen O/W-Nanoemulsion und den W/O/W-Systemen konnten jedoch statistisch nicht bestätigt werden. Auch innerhalb der W/O/W-Gruppe lagen die Ergebnisse der einzelnen Formulierungen nahe beieinander. Durch die hydrophilen Eigenschaften des Arzneistoffs war in den Franz-Zell-Experimenten bei allen drei Formulierungen schon nach 8 Stunden eine rund 80%ige Diffusion durch die Modellmembran erreicht.

Anders verhielt es sich bei den mittels Cryo-TEM entstandenen Aufnahmen. Sol/S-1670(4,35/0,65)-[S-270]-ACV zeigte eine glattere Oberflächenstruktur an den Emulsionströpfchen als jene Formulierungen, bei denen in der Wasserphase nur ein einzelner Emulgator verarbeitet wurde. Dieser Effekt kommt wahrscheinlich durch die in Emulgator-Gemischen erhöhte Dichte der Molekülpackung in der Grenzfläche zustande.

6. Zusammenfassung

Nachdem sich in letzter Zeit diverse Studien mit der Verkapselung von hydrophilen Modell-Substanzen, wie zum Beispiel Natrium-Fluoreszin, in multiple W/O/W-Nanoemulsionssysteme mittels PIT-Methode [1] beschäftigt hatten, lag der Gedanke nahe, diese neuartige Technologie auch in Zusammenhang mit pharmazeutischen Zubereitungen zu etablieren. Primäres Ziel dieser Diplomarbeit war es, Nanoemulsionen zur dermalen Applikation von Aciclovir herzustellen und bezüglich der Formulierung und der Prozessparameter zu optimieren. Das Hauptaugenmerk lag dabei bei der Auswahl der am besten geeigneten Emulgatoren. Im Zuge dieser Arbeit war es möglich, jene Zuckertenside zu identifizieren, die als teilweiser Ersatz für die bei der PIT-Methode unumgängliche Verwendung von polyethoxylierten, nicht-ionischen Tensiden, dienen konnten. Die Verwendung zweier Saccharose-Stearate als Mizellbildner und Co-Tensid führte nicht nur zu einer verbesserten Hautverträglichkeit und biologischen Abbaubarkeit der Formulierungen, es konnten dadurch auch Nanoemulsionen hergestellt werden, welche sich durch eine kleinere Partikelgröße im Vergleich zu den mit herkömmlichen Inhaltsstoffen hergestellten W/O/Ws auszeichneten (110 nm zu 80 nm). In der Ölphase konnte die gesamte Menge des Mizellbildners Span 80 durch eine äquivalente Menge Saccharose-Stearat S-270 ausgetauscht werden. In der Wasserphase war es zumindest möglich, die zuvor auf 5% festgelegte Gesamtmenge an Tensid, die zu den zufriedenstellendsten Ergebnissen bei der physikochemischen Beurteilung der Grundformulierungen ohne Arzneistoff geführt hatte, zu 0,65% durch das Saccharose-Stearat S-1670 zu ersetzen. Größere Mengen an S-1670 im Verhältnis zu Solutol HS15 führten dazu, dass das Prozessieren der multiplen Nanoemulsionen nicht mehr erfolgreich war, was sich durch ein Ansteigen der Partikelgröße auf das bis zu 10-fache bemerkbar machte. Sowohl die Grundformulierungen ohne Arzneistoff, als auch die arzneistoffhaltigen Formulierungen mit beladenen Mizellen zeichneten sich durch eine exzellente Langzeitstabilität, basierend auf der Vermessung kritischer Formulierungsparameter, aus. Sowohl Partikelgröße als auch PDI waren, abgesehen von kleineren Schwankungen, über einen Beobachtungszeitraum von 16 bis 24 Wochen konstant. Jene arzneistoffhaltigen Formulierungen, bei denen Aciclovir in die äußere Wasserphase eingearbeitet wurde

und die als Kontrollgruppe dienten, verfügten über eine wesentlich geringere, physikalische Stabilität. Sie zeigten bald eine Zunahme der Partikelgröße und des PDI.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde anhand von In-Vitro-Hautstudien auch gezeigt, dass sich W/O/W-Nanoemulsionen bestens als Vehikel für hydrophile Arzneistoffe, wie zum Beispiel Aciclovir, eignen. Sowohl die Franz-Zell-Studien als auch die Tape-Stripping-Experimente deuteten auf eine zufriedenstellende Permeation des Arzneistoffs, aus dem Vehikel in die Haut, hin.

Zukünftig würde es sich anbieten, weiterführende Studien zur pharmakologischen Wirksamkeit der Formulierungen durchzuführen. Möglicherweise ließen sich auch ähnliche Systeme für andere, hydrophile Arzneistoffe entwickeln.

7. Anhang

7.1. Tabellen zu *in vitro* Hautstudien

Tab. A1: Kumulation von Aciclovir in Franz-Zell-Studien bei Probenahme nach 2, 4, 6 und 8 Stunden

Sol(5)-[Span]-Acic		n=5					
Kumulation							
Stunden		Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Mittelwert SD
0		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0 0
2		42,97	42,65	36,95	32,75	52,87	41,64 7,58
4		167,12	163,78	161,90	138,02	181,05	162,37 15,55
6		297,14	287,90	300,59	259,68	314,89	292,04 20,53
8		402,04	381,47	407,51	361,83	412,96	393,16 21,18

%							
Stunden		Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Mittelwert SD
0		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0 0
2		8,57	8,71	7,25	6,56	10,37	8,30 1,47
4		33,34	33,46	31,79	27,66	35,51	32,35 2,94
6		59,29	58,82	59,02	52,05	61,77	58,19 3,63
8		80,22	77,93	80,01	72,53	81,00	78,34 3,44

Sol(5)-[S270]-Acic							
Kumulation							
Stunden		Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Mittelwert SD
0		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0 0
2		81,06	32,82	85,92	43,18	54,25	59,44 23,28
4		225,43	127,19	245,60	155,29	175,91	185,89 49,02
6		353,20	239,53	376,23	286,22	299,54	310,94 54,52
8		429,23	325,44	448,94	382,18	378,22	392,80 48,33

%							
Stunden	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Mittelwert	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
2	16,05	6,49	17,35	8,62	10,90	11,88	4,69
4	44,65	25,16	49,59	31,01	35,36	37,15	9,95
6	69,95	47,38	75,96	57,15	60,21	62,13	11,17
8	85,01	64,37	90,64	76,31	76,02	78,47	10,01

Sol/S1670(6,35/0,65)-
[S270]-Acic

Kumulation							
Stunden	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Mittelwert	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
2	34,64	61,07	31,69	28,94	47,39	40,74	13,38
4	138,51	193,00	128,38	123,82	157,94	148,33	28,21
6	261,12	330,15	247,35	238,05	276,17	270,57	36,29
8	364,97	435,00	338,43	334,15	362,50	367,01	40,45

%							
Stunden	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Mittelwert	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
2	6,87	12,31	6,35	5,81	9,40	8,15	2,70
4	27,47	38,89	25,73	24,85	31,32	29,65	5,73
6	51,78	66,54	49,58	47,77	54,77	54,09	7,43
8	72,37	87,67	67,83	67,06	71,90	73,37	8,34

7.2. Tabellen zur physikochemischen Stabilität

Tab. A2: Stabilität der Grundformulierungen mit einem Tensidgehalt von 3,35%, 4,35%, 5% und 6,7% Solutol HS15 und Span80 als Mizellbildner

Tab. A3: Stabilität der Grundformulierungen mit einem Tensidgehalt von 5% Solutol HS15, 4,35% Solutol HS15/0,65% S1670 und 3,35% Solutol HS15/1,65% S1670 und S270 als Mizellbildner

Tab. A4: Stabilität von Sol(5)-[Span]-ACV im Vergleich zu Sol(5)-[Span]-ACV-oMi

Tab. A5: Stabilität Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV im Vergleich zu Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi

Tab. A6: Stabilität von Sol(5)-[S270]-ACV im Vergleich zu Sol(5)-[S270]-ACV-oMi

Tabelle A3:

	Woche 1									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	175,62	9,64	0,352	0,002	-14,08	2,33	0,0540	0,0053	6,2	0,1
Sol(4,35)-Span	136,47	5,63	0,150	0,050	-15,73	6,63	0,0474	0,0016	6,2	0,1
Sol(5)-Span	104,54	3,53	0,070	0,007	-6,19	5,50	0,0459	0,0071	6,1	0,2
Sol(6,7)-Span	62,64	0,99	0,049	0,007	-13,62	3,53	0,0473	0,0004	6,2	0,0
	Woche 2									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	173,27	7,64	0,351	0,012	-14,08	2,33	0,0540	0,0053	6,0	0,0
Sol(4,35)-Span	137,28	5,31	0,143	0,043	-15,73	6,63	0,0474	0,0016	6,1	0,0
Sol(5)-Span	106,44	3,99	0,083	0,022	-6,19	5,50	0,0459	0,0071	6,0	0,0
Sol(6,7)-Span	64,36	1,29	0,050	0,011	-3,65	0,51	0,0481	0,0009	6,0	0,0
	Woche 3									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	180,12	6,58	0,386	0,021	-9,69	6,66	0,0612	0,0094	5,8	0,0
Sol(4,35)-Span	138,90	5,47	0,135	0,048	-10,45	7,09	0,0457	0,0007	6,0	0,2
Sol(5)-Span	107,21	3,15	0,079	0,004	-7,02	2,74	0,0495	0,0027	5,9	0,1
Sol(6,7)-Span	64,73	1,47	0,047	0,009	-14,01	5,94	0,0643	0,0037	6,3	0,0
	Woche 4									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	178,93	5,04	0,377	0,033	-12,20	2,36	0,0526	0,0002	6,2	0,1
Sol(4,35)-Span	138,54	4,96	0,148	0,048	-14,63	4,99	0,0634	0,0126	6,2	0,2
Sol(5)-Span	107,42	4,15	0,076	0,006	-14,79	4,32	0,0625	0,0089	6,3	0,1
Sol(6,7)-Span	65,37	0,96	0,056	0,008	-8,41	4,69	0,0462	0,0024	6,2	0,0
	Woche 5									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	205,55	14,45	0,453	0,012	-11,27	3,15	0,0495	0,0025	6,2	0,4
Sol(4,35)-Span	138,29	4,33	0,138	0,042	-8,65	5,30	0,0478	0,0052	6,3	0,3
Sol(5)-Span	107,49	3,62	0,074	0,009	-8,35	0,73	0,0540	0,0048	6,3	0,3
Sol(6,7)-Span	64,95	1,23	0,044	0,005	-7,87	1,25	0,0462	0,0020	6,0	0,1
	Woche 6									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	195,10	16,92	0,424	0,022	-10,55	0,12	0,0501	0,0020	5,8	0,4
Sol(4,35)-Span	139,32	5,45	0,138	0,054	-7,82	2,60	0,0525	0,0089	6,3	0,1
Sol(5)-Span	107,63	2,88	0,079	0,011	-6,54	0,61	0,0481	0,0019	6,2	0,5
Sol(6,7)-Span	65,61	1,27	0,043	0,008	-12,85	4,35	0,0487	0,0061	6,0	0,2
	Woche 8									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	181,45	6,39	0,378	0,037	-12,60	0,66	0,0535	0,0048	5,8	0,3
Sol(4,35)-Span	138,08	5,11	0,135	0,055	-9,90	1,11	0,0486	0,0014	6,1	0,1
Sol(5)-Span	107,77	3,41	0,070	0,007	-9,98	2,82	0,0528	0,0022	5,9	0,3
Sol(6,7)-Span	66,20	1,14	0,042	0,005	-8,22	2,60	0,0540	0,0014	6,2	0,1
	Woche 10									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	181,68	8,27	0,396	0,000	-13,65	0,82	0,0520	0,0040	5,8	0,3
Sol(4,35)-Span	140,60	5,57	0,147	0,039	-9,79	3,58	0,0473	0,0009	6,1	0,0
Sol(5)-Span	109,25	3,69	0,075	0,012	-13,44	2,52	0,0506	0,0013	5,9	0,3
Sol(6,7)-Span	66,76	1,20	0,045	0,011	-8,89	2,73	0,0522	0,0033	6,1	0,0
	Woche 12									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	180,82	7,75	0,375	0,032	-18,21	11,58	0,0566	0,0068	6,0	0,1
Sol(4,35)-Span	141,09	5,65	0,139	0,040	-13,48	2,33	0,0580	0,0153	6,2	0,3
Sol(5)-Span	109,23	3,79	0,078	0,007	-11,63	3,90	0,0584	0,0021	6,1	0,3
Sol(6,7)-Span	67,11	1,46	0,038	0,008	-7,73	4,97	0,0537	0,0058	6,1	0,1
	Woche 16									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	181,00	5,00	0,373	0,001	-15,53	0,52	0,0551	0,0007	6,2	0,3
Sol(4,35)-Span	141,14	4,42	0,139	0,041	-14,76	4,03	0,0545	0,0055	6,1	0,3
Sol(5)-Span	110,58	4,15	0,085	0,008	-13,13	7,91	0,0617	0,0016	6,5	0,5
Sol(6,7)-Span	67,51	1,39	0,045	0,007	-10,79	3,59	0,0605	0,0017	6,1	0,1

	Woche 20									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	185,48	5,02	0,379	0,030	-16,87	4,71	0,0508	0,0031	6,2	0,1
Sol(4,35)-Span	141,32	5,17	0,133	0,045	-17,84	2,02	0,0512	0,0015	6,1	0,4
Sol(5)-Span	110,55	3,35	0,072	0,005	-8,04	5,56	0,0517	0,0023	6,4	0,4
Sol(6,7)-Span	68,09	1,28	0,046	0,018	-12,01	1,81	0,0529	0,0066	6,3	0,1
	Woche 24									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(3,35)-Span	181,93	6,55	0,358	0,052	-18,75	1,44	0,0561	0,0011	6,1	0,2
Sol(4,35)-Span	141,90	5,92	0,137	0,045	-19,62	2,68	0,0588	0,0064	6,1	0,3
Sol(5)-Span	110,19	3,53	0,080	0,015	-12,26	4,00	0,0609	0,0112	6,4	0,3
Sol(6,7)-Span	67,37	1,21	0,044	0,007	-14,30	6,08	0,0469	0,0030	5,9	0,1

Tabelle A4:

	Woche 1									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	88,73	3,35	0,064	0,011	-15,07	1,80	0,0479	0,0014	6,0	0,1
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	63,34	0,19	0,080	0,006	-20,30	4,10	0,0495	0,0052	5,9	0,0
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	653,22	332,55	0,895	0,087	-30,60	10,18	0,0527	0,0159	5,7	0,0
	Woche 2									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	91,12	3,70	0,063	0,005	-10,58	4,10	0,0517	0,0012	6,2	0,0
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	68,28	4,79	0,107	0,080	-21,17	6,89	0,0536	0,0025	6,0	0,0
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	1663,01	741,45	0,865	0,173	-32,11	3,44	0,0528	0,0042	5,7	0,1
	Woche 3									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	91,56	3,84	0,055	0,005	-13,22	2,32	0,0487	0,0037	5,8	0,0
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	68,30	3,78	0,089	0,047	-20,71	5,17	0,0665	0,0068	5,9	0,0
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	947,04	160,62	0,927	0,006	-30,03	4,14	0,0473	0,0029	5,4	0,1
	Woche 4									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	92,60	3,71	0,056	0,005	-11,88	1,48	0,0468	0,0020	5,7	0,1
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	68,60	2,88	0,089	0,046	-20,38	8,76	0,0532	0,0035	5,9	0,1
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	1453,73	587,70	1,000	0,000	-33,00	1,34	0,0494	0,0072	5,5	0,2
	Woche 5									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	93,63	3,85	0,058	0,007	-15,02	6,17	0,0497	0,0019	6,0	0,7
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	69,76	4,04	0,117	0,066	-16,84	9,27	0,0525	0,0061	5,9	0,1
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	1098,23	403,35	0,926	0,078	-33,02	0,78	0,0496	0,0030	5,5	0,2
	Woche 6									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	93,32	3,84	0,064	0,012	-16,40	3,08	0,0458	0,0009	5,7	0,0
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	69,62	3,85	0,099	0,051	-16,73	9,55	0,0564	0,0039	6,0	0,1
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	1255,20	482,65	0,893	0,093	-28,81	7,12	0,0536	0,0050	5,6	0,2
	Woche 8									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	94,58	3,88	0,060	0,004	-13,36	4,04	0,0472	0,0021	5,6	0,1
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	70,45	3,77	0,099	0,043	-22,47	3,60	0,0522	0,0058	5,8	0,1
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	799,96	299,09	0,897	0,093	-35,27	1,23	0,0477	0,0031	5,6	0,2
	Woche 10									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	93,75	3,61	0,057	0,019	-15,65	5,20	0,0513	0,0045	5,6	0,1
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	69,99	3,59	0,093	0,045	-25,00	4,52	0,0511	0,0041	5,8	0,1
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	1060,31	650,61	0,739	0,201	-34,44	2,52	0,0526	0,0054	5,6	0,1
	Woche 12									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	93,46	3,74	0,068	0,006	-19,29	8,52	0,0643	0,0145	5,6	0,2
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	70,11	2,97	0,098	0,043	-27,13	2,31	0,0540	0,0010	5,6	0,0
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	1001,69	538,08	0,810	0,115	-33,26	2,43	0,0607	0,0036	5,6	0,2
	Woche 16									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]	95,82	3,94	0,065	0,010	-15,19	4,58	0,0519	0,0025	5,6	0,2
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]	71,97	3,98	0,096	0,048	-42,97	21,30	0,1276	0,1038	5,5	0,1
Sol/S1670(3,35/1,65)-[S270]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle A5:

	Woche 1									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	108,12	0,26	0,189	0,131	-15,88	0,59	0,053	0,0084	6,3	0,1
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	125,29	24,25	0,236	0,231	-13,24	1,98	0,0485	0,0016	6,1	0,2
	Woche 2									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	104,9	5,42	0,156	0,086	-9,88	7,71	0,0553	0,0067	6,2	0,1
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	114,18	5,11	0,198	0,207	-9,33	3,35	0,0472	0,0028	6,3	0
	Woche 3									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	109,02	1,15	0,173	0,123	-15,87	6,79	0,0554	0,006	6,2	0
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	124,93	20,62	0,22	0,23	-14,87	3,23	0,0518	0,0031	6,2	0
	Woche 4									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	108,72	0,35	0,179	0,111	-14,52	0,02	0,0526	0,0003	6,1	0
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	125,02	21,14	0,223	0,229	-10,19	3,65	0,0525	0,0046	6,1	0
	Woche 5									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	107,48	2,93	0,131	0,092	-8,25	0,96	0,0492	0,0021	6,4	0,2
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	121,29	14,18	0,213	0,232	-7,97	1,1	0,048	0,0012	6,1	0,4
	Woche 6									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	108,51	1,75	0,14	0,096	-12,55	2,3	0,0489	0,0026	6,3	0,2
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	124,72	20,74	0,223	0,227	-9,89	1,59	0,0495	0,0028	6,7	0,3
	Woche 8									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	112,11	0,95	0,144	0,096	-12,02	2,42	0,0467	0,003	6,3	0,3
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	127,64	20,9	0,223	0,232	-11,33	1,8	0,0459	0,0012	6,3	0,1
	Woche 10									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	110,07	0,58	0,146	0,102	-13,57	3,9	0,0507	0,0044	6,2	0,3
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	126,5	20,86	0,212	0,235	-13,3	2,84	0,0504	0,0041	6,1	0
	Woche 12									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	109,79	6,19	0,13	0,079	-14,51	3,24	0,0488	0,0035	6,2	0,3
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	125,33	15,19	0,223	0,23	-14,92	0,65	0,0513	0,0023	6,1	0,1
	Woche 16									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	109,39	5,84	0,132	0,078	-15,91	4,37	0,0545	0,0102	6	0
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	127,34	20,6	0,22	0,227	-19,5	1,98	0,0578	0,0019	6,2	0,1
	Woche 20									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	112,19	1,03	0,141	0,1	-17,37	4,55	0,0509	0,0058	6,1	0,4
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	128,41	20,06	0,218	0,227	-17,83	1,76	0,0477	0,0035	6	0,1
	Woche 24									
	MDS (d.nm)	SD	Pdl	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[Span]-ACV	110,82	3,34	0,136	0,09	-18,52	6,95	0,0493	0,002	5,6	0,1
Sol(5)-[Span]-ACV-oMi	122,62	11,46	0,214	0,225	-17,2	1,38	0,0486	0,0021	5,7	0,1

Tabelle A6:

	Woche 1									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	74,61	4,40	0,283	0,110	-20,60	2,73	0,0453	0,0007	5,8	0,0
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	122,26	56,34	0,295	0,136	-29,65	6,01	0,0497	0,0061	5,9	0,1
	Woche 2									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	76,34	10,80	0,248	0,203	-24,75	7,24	0,0533	0,0027	5,9	0,1
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	121,13	52,33	0,267	0,128	-27,07	3,11	0,0494	0,0021	5,9	0,1
	Woche 3									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	76,91	6,40	0,275	0,171	-25,80	4,53	0,0500	0,0005	6,0	0,1
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	125,07	61,00	0,281	0,114	-22,43	9,71	0,0473	0,0025	5,9	0,2
	Woche 4									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	78,58	7,48	0,284	0,166	-29,62	1,58	0,0521	0,0045	6,0	0,0
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	125,17	60,06	0,281	0,120	-28,38	1,77	0,0480	0,0018	5,9	0,0
	Woche 5									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	80,12	7,57	0,302	0,174	-29,02	7,42	0,0544	0,0008	6,1	0,0
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	127,02	59,09	0,274	0,107	-35,92	2,90	0,0499	0,0051	6,0	0,1
	Woche 6									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	78,82	5,62	0,291	0,149	-31,90	4,38	0,0549	0,0025	5,9	0,3
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	126,21	61,12	0,266	0,110	-34,83	0,28	0,0480	0,0011	5,8	0,2
	Woche 8									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	78,83	6,23	0,286	0,165	-29,47	6,03	0,0550	0,0080	6,0	0,3
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	126,21	58,68	0,250	0,109	-31,43	0,66	0,0557	0,0030	6,0	0,1
	Woche 10									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	79,68	3,88	0,275	0,137	-36,03	0,28	0,0481	0,0040	5,3	0,1
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	128,93	64,58	0,268	0,065	-20,65	14,17	0,0510	0,0029	5,4	0,2
	Woche 12									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	86,01	5,08	0,373	0,125	-31,62	2,57	0,0508	0,0048	5,5	0,4
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	127,39	58,18	0,279	0,122	-32,82	6,91	0,0484	0,0012	5,7	0,2
	Woche 16									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV	80,84	3,32	0,277	0,095	-30,92	6,86	0,0575	0,0185	5,2	0,1
Sol/S1670(4,35/0,65)-[S270]-ACV-oMi	124,14	56,23	0,236	0,110	-24,92	4,93	0,0485	0,0082	5,4	0,1

Tabelle A7:

	Woche 1									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	99,02	2,74	0,091	0,024	-13,17	1,59	0,0446	0,0031	6,1	0,1
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	114,51	11,03	0,270	0,169	-10,80	3,81	0,0468	0,0003	6,1	0,0
	Woche 2									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	99,83	1,01	0,087	0,009	-13,36	0,60	0,0451	0,0008	6,0	0,0
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	113,84	8,99	0,258	0,159	-12,72	4,62	0,0438	0,0008	6,0	0,0
	Woche 3									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	102,09	1,66	0,088	0,029	-12,60	1,61	0,0462	0,0020	6,1	0,1
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	114,13	8,94	0,262	0,164	-18,43	5,43	0,0511	0,0021	6,1	0,0
	Woche 4									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	101,91	1,15	0,083	0,012	-14,12	4,03	0,0548	0,0067	6,1	0,0
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	114,77	8,34	0,259	0,168	-16,81	0,58	0,0506	0,0028	6,1	0,0
	Woche 5									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	102,07	1,19	0,082	0,017	-27,33	10,99	0,0569	0,0164	6,1	0,1
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	115,27	8,78	0,251	0,159	-17,61	9,34	0,0557	0,0032	5,9	0,1
	Woche 6									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	102,80	1,37	0,084	0,008	-16,67	1,82	0,0524	0,0009	6,4	0,1
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	115,64	8,29	0,270	0,175	-16,70	8,05	0,0561	0,0072	6,2	0,1
	Woche 8									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	103,82	0,90	0,089	0,010	-16,53	6,34	0,0524	0,0039	6,0	0,2
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	115,94	8,60	0,261	0,166	-18,60	3,74	0,0538	0,0083	5,9	0,2
	Woche 10									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	104,33	0,49	0,088	0,008	-23,79	4,29	0,0505	0,0013	5,8	0,1
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	116,57	9,00	0,256	0,160	-22,11	3,35	0,0547	0,0025	5,8	0,2
	Woche 12									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	104,77	0,64	0,086	0,024	-19,50	3,95	0,0589	0,0044	5,8	0,2
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	116,18	10,07	0,251	0,156	-19,18	3,62	0,0561	0,0034	5,9	0,2
	Woche 16									
	MDS (d.nm)	SD	PdI	SD	ZP (mV)	SD	Cond (mS/cm)	SD	pH	SD
Sol(5)-[S270]-ACV	105,76	0,50	0,102	0,018	-24,74	2,65	0,0515	0,0041	5,8	0,2
Sol(5)-[S270]-ACV-oMi	120,21	10,79	0,244	0,157	-22,54	5,91	0,0514	0,0010	5,9	0,2

7. 3. Abstracts

7.3.1. Deutsch

Das Ziel dieser Diplomarbeit bestand darin, multiple W/O/W-Nanoemulsionen zur dermalen Applikation hydrophiler Arzneistoffe herzustellen und zu optimieren. Aciclovir diente dabei als Modell-Arzneistoff. Zur Herstellung der Nanoemulsionen bediente wir uns der Phasen-Inversionstemperatur-Methode, einer Niedrigenergiemethode, welche sich dadurch auszeichnet, dass sie ohne den Eintrag großer Energiemengen in Form von Druck oder Ultraschall auskommt. Der Herstellungsprozess wurde optimiert, wobei insbesondere die eingesetzten Tenside, sowohl in der Wasser-, wie auch der Ölphase, variiert wurden. Die ethoxylierten Tenside konnten teilweise durch hautfreundliche, natürliche Zuckertenside ersetzt werden. Die neuen, multiplen Nanoemulsionen wurden betreffend Partikelgröße, Polydispersitätsindex, Zetapotential und pH charakterisiert. Bei den optimierten Nanoemulsionen konnte eine durchschnittliche Partikelgröße von rund 100 nm und eine engen Größenverteilung, gekennzeichnet durch Polydispersitätsindices von unter 0,1, festgestellt werden. Stabilitätsstudien, welche über einen Zeitraum von 20 Wochen bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, zeigten eine hervorragende physikalische Stabilität. Des Weiteren wurden Cryo-TEM Untersuchungen durchgeführt, die die Ergebnisse der Photonenkorrelationsspektroskopie bestätigen und Einblicke in die Mikrostruktur der multiplen Systeme geben konnten. Außerdem wurde die Hautpermeation von Aciclovir aus den neuen Nanoemulsionen untersucht. Bei in vitro Experimenten auf Schweinehaut wie Franz-Diffusionszellen und Tape-Stripping-Versuchen wurden zufriedenstellende Ergebnisse erreicht.

7.3.2. English

The objective of this diploma thesis was the preparation and, as a further step, the optimization of multiple w/o/w-nanoemulsions for the dermal application of hydrophilic drugs. In the present study, aciclovir was used as a model-drug. A low energy method which allows the preparation of nanoemulsions without additional energy input, namely the phase inversion temperature method, was employed. The formulation process was optimized by varying both the lipophilic and the hydrophilic surfactants. To this end, the polyethoxylated surfactants were partly replaced by skin-friendly natural sugar surfactants. The multiple nanoemulsions were characterized in terms of droplet size and polydispersity index by dynamic light scattering as well as in terms of zeta potential and pH. The novel multiple nanoemulsions exhibited mean droplet sizes around 100 nm and polydispersity indices below 0.1, which illustrate the narrow droplet size distribution of the optimized systems. Furthermore, stability studies focusing on mean droplet size and PDI were performed at room temperature over an observation period of 20 weeks. Both parameters did not vary significantly and thus an excellent physicochemical stability could be attested. In addition, cryoTEM experiments confirmed the mean droplet sizes as determined by dynamic light scattering and gave insights in the microstructure of the w/o/w-systems. Moreover, the skin permeation of aciclovir from the novel w/o/w-nanoemulsions was analysed. Both Franz-type diffusion cell and tape stripping experiments on porcine skin showed satisfying results.

7. 4. Poster

Development of Eudermic W/O/W Nanoemulsions for Delivery of Hydrophilic Drugs

Julia C. Schwarz^a, Victoria Klang^b, Sandra Karall^b, Silvia Haberkfeld^b, Claudia Valenta^{a,b}
University of Vienna, Austria

^aResearch Platform "Characterisation of Drug Delivery Systems on Skin and Investigation of Involved Mechanisms"

^bDepartment of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics

julia.schwarz@univie.ac.at



Introduction

Low-energy emulsification techniques such as the phase inversion temperature (PIT) method serve to conveniently and rapidly produce nano-sized O/W-emulsion systems without the need for high pressure devices. Recently, the PIT technique was employed to create novel W/O/W-nanoemulsions for incorporation of hydrophilic model compounds [1]. As opposed to conventional O/W-nanoemulsions, these systems contain an additional surfactant to solubilise the hydrophilic drugs in reverse micelles distributed within the oil phase. So far, the potential of these vehicles as drug delivery systems on skin has not been investigated. Therefore, the present study focuses on the development of novel Aciclovir-loaded W/O/W-nanoemulsions with a minimum amount of surfactant and their comparison to conventional O/W-nanoemulsions.

Experimental Methods

Formulations

Reverse micelles were formed by addition of the lipophilic surfactant to the oil phase above the CMC. Subsequently, Aciclovir was added. This phase was then added dropwise to a mixture of the hydrophilic surfactant and water at about 85°C. As a last step, a sudden dilution with distilled water was performed. The amount of hydrophilic surfactant was varied, while the water-oil-ratio was kept constant at 70%. For reasons of comparison the same formulations were prepared without incorporating the drug into reverse micelles.

Physicochemical characterisation and stability

Physicochemical parameters such as particle size and polydispersity index were determined with a Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, UK).

Skin permeation

The skin permeation of Aciclovir from the formulations was examined using Franz-typed diffusion cells with phosphate buffer pH 7.4 as acceptor medium. Dermatomed porcine skin was used as a model membrane. The permeated amount of Aciclovir was determined by HPLC.

Skin penetration

The skin penetration of Aciclovir from the W/O/W-nanoemulsions in comparison to the skin penetration of the drug from an aqueous solution was determined by Tape Stripping experiments. The formulations were applied on pig ear skin for one hour. Subsequently, the uppermost layers of the stratum corneum were removed with 20 tape strips. Corneocytes and Aciclovir were quantified by NIR and HPLC, respectively.

Results

The ideal concentration of the hydrophilic surfactant was found to be 5%. The W/O/W-nanoemulsions with Aciclovir showed mean particle sizes below 110 nm and PDI values below 0.19 over an observation period of six weeks. The nanoemulsions without reverse micelles exhibited significantly larger particle sizes and higher PDI values. Satisfying skin permeation and penetration of Aciclovir from the W/O/W-nanoemulsions was achieved, which was clearly superior to the skin diffusion of an aqueous Aciclovir solution. The performance of the O/W-nanoemulsions was comparable to the W/O/W-nanoemulsion.

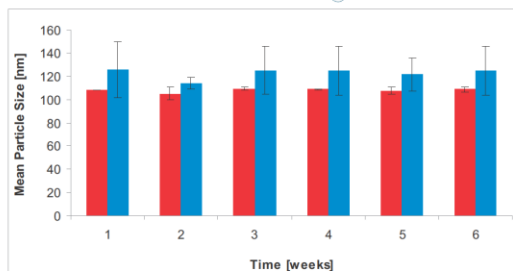


Figure 1: Mean particle sizes of W/O/W-nanoemulsions (red) and O/W-nanoemulsions (blue) with Aciclovir

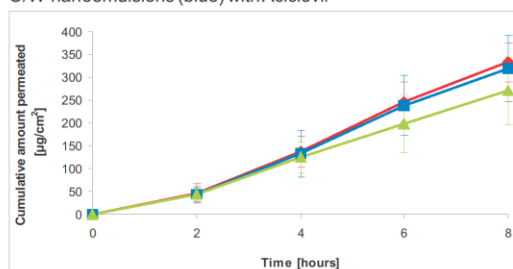


Figure 2: Skin permeation of Aciclovir from W/O/W-nanoemulsions (red), O/W-nanoemulsions (blue) and aqueous solutions (green), n = 8

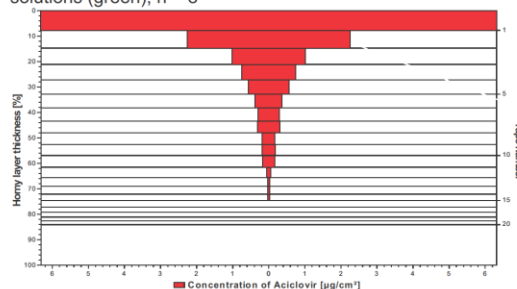


Figure 3: Skin penetration profile of Aciclovir from W/O/W-nanoemulsions, n = 6

Conclusion

The presented W/O/W-nanoemulsions are interesting candidates for dermal drug delivery due to their superior potential to incorporate hydrophilic drugs. To this end, other hydrophilic compounds are being investigated in further studies.

Acknowledgements

This work was financed by the research platform "Characterisation of Drug Delivery Systems on Skin and Investigation of Involved Mechanisms", University of Vienna.

References

[1] Anton N, Mojzisova H, Porcher E, Benoit JP, Saulnier P. Reverse micelle-loaded lipid nano-emulsions: New technology for nano-encapsulation of hydrophilic materials, Int J Pharm 398 (2010) 204-209.

Der Poster wurde auf der Konferenz Skin Forum im März 2011 in Frankfurt präsentiert.

8. Literatur

- [1] Anton, N., Mojzisova, H., Porcher, E., Benoit, J.P., Saulnier, P., Reverse micelle-loaded lipid nano-emulsions: New technology for nano-encapsulation of hydrophilic materials, *Int. J. Pharm.* 398, 204-209 (2010)
- [2] Muschiolik, G., Bunjes, H., Multiple Emulsionen, Herstellung und Eigenschaften, Behr's Verlag, 1. Auflage, 71-74, 207-266 (2007)
- [3] Bergh, M., Shao, L.P., Hagelthorn, G., Gaefvert, E., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.T., Contact allergens from surfactants. Atmospheric oxidation of polyoxyethylene alcohols, formation of ethoxylated aldehydes, and their allergenic activity, *J. Pharm. Sci.* 87, 276-282 (1998)
- [4] Schwarz, J., Klang V., Karall, S., Mahrhauser, D., Resch, G. P., Valenta, C., Optimisation of multiple W/O/W nanoemulsions for dermal delivery of aciclovir, *Int. J. Pharm.*, in press
- [5] weblink:
http://nie-mehr-akne.info/wp-content/uploads/2011/03/013_haut_aufbau_ger.gif,
(Stand November 2011)
- [6] Rosen, M.R., *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products: Technology, Applications, and Formulations*, Willam Andrew Inc., 77-100 (2005)
- [7] Pharmazeutische Zeitung Online, weblink:
<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2957> (Stand November 2011)
- [8] Elias, P.M., Friends, D.S., The permeability barrier in mammalian epidermis, *J. Cell Biol.* 20, 1-19 (1975)
- [9] Neubert, R.R.H., Wohlrab, J., Marsch, W.Ch., *Dermatopharmazie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2001)

[10] weblink:

http://www.spitalpharmazie-basel.ch/pdf/06_salben.pdf (Stand November 2011)

[11] Köpper, D., Struktur- und Stabilitätsuntersuchungen an neuartigen topischen Grundlagen aus Naturstoffen, Dissertation, Friedrich - Alexander - Universität zu Erlangen - Nürnberg (2004)

[12] Voigt, R., Pharmazeutische Technologie, Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, 10. Auflage (2006)

[13] Anton, N., Gayet, P., Benoit, J.P., Saulnier, P., Nano-Emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion, Int. J. Pharm. 344, 44-52 (2007)

[14] Patravale, V.B., Mandawgade, S.D., Novel cosmetic delivery systems: an application update, Int. J. Cosmet. Sci. 30, 19-33 (2008)

[15] Müller, R.H., Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, WVG Stuttgart, 143-155 (1997)

[16] Vrignaud, S., Anton, N., Gayet, P., Benoit, J.P., Saulnier, P., Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: A novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride, Eur. J. Pharm. Biopharm. 79, 197-204 (2011)

[17] Klang, V., Valenta, C., Lecithin-based nanoemulsions, J. Drug Del. Sci. Tech., 21 (1) 55-76 (2011)

[18] weblink:

[http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/Pharma/doc4/BASF/exact/solutol_hs_15/.pdf?title=Applications of Solutol HS 15&asset_type=pi/pdf&language=EN&urn=urn:documentum:eCommerce_sol_EU:09007bb28001ac24.pdf](http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/Pharma/doc4/BASF/exact/solutol_hs_15/.pdf?title=Applications%20of%20Solutol%20HS%2015&asset_type=pi/pdf&language=EN&urn=urn:documentum:eCommerce_sol_EU:09007bb28001ac24.pdf) (Stand Oktober 2011)

[19] weblink:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do> (Stand Oktober 2011)

[20] Mitsubishi Chemical Europe GmbH, Ryoto®sugar ester technical information (2004)

[21] Klang, V., Matsko, N., Raupach, K., El-Hagin, N., Valenta, C., Development of sucrose stearate-based nanoemulsions and optimisation through gamma-cyclodextrin, Eur. J. Pharm. Biopharm. 79, 58-67 (2011)

[22] Lim, W. H., Selangor Darul Ehsan, M., Stability, droplet size and flow behavior of O/W emulsions of sucrose esters, Tenside, Surfactants, Detergents, Carl Hanser Verlag, 104-107 (2002)

[23] weblink:

<http://abstracts.aapspharmaceutica.com/expoaaps07/Data/EC/Event/Exhibitors/263/cb63fb76-28f4-4948-a6d0-ae249dae9c30.pdf> (Stand November 2011)

[24] Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage, 867-868 (2005)

[25] weblink:

<http://www.malvern.de/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf> (Stand November 2011)

[26] weblink:

http://www.malvern.de/LabGer/technology/dynamic_light_scattering/classical_90_degree_scattering.htm (Stand November 2011)

[27] weblink:

http://www.malvern.de/LabGer/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm (Stand November 2011)

[28] Knecht, V., Risselada, H.J., Mark, A.E., Marrink, S.J., Electrophoretic mobility does not always reflect the charge on an oil droplet, J. Coll. Interface Sci. 318, 477-486 (2008)

[29] Müller, R.H., Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, WVG Stuttgart, 52-54 und 118-122 (1996)

[30] weblink:

<http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/zetasizer.html> (Stand Februar 2012)

[31] Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., Hofer, F., Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment, *Micron*. 43, 85-103 (2012)

[32] Klang, V., Schwarz, J.C., Hartl, A., Valenta, C., Facilitating in vitro Tape Stripping: Application of Infrared Densitometry for Quantification of Porcine Stratum Corneum Proteins, *Skin Pharmacol. Physiol.* 24, 256-68 (2011)

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sandra Karall
Adresse: Komzakgasse 4, 2620 Neunkirchen
Geburtsdatum: 29.06.1985
Geburtsort: Neunkirchen

Schulbildung:

1991-1995 Volksschule im Mühlfeld, Neunkirchen
1995-2003 BG und BRG Neunkirchen

Seit Oktober 2003 Studium der Pharmazie, Fakultät der
Lebenswissenschaften, Universität Wien

Berufserfahrung:

Juli 2004-2010
Februar 2007-2010 Ferialpraktikum in der Apotheke zum Heiligen Leopold,
Neunkirchen
März 2011-Februar 2012 Tutorin in den Übungen „Magistrale
Arzneimittelherstellung“ am Department für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,
Universität Wien