



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

F-DPPC Formulierung als Arzneistoffträger:
Untersuchung seiner Arzneistoffpermeation
und -penetration in vitro

verfasst von

Ruth Franziska Kieweler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Claudia Valenta

Danksagung

Mein allergrößter Dank gebührt a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Claudia Valenta für die Ermöglichung meiner Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie. Mit Ihrer kompetenten Betreuung konnte ich viele interessante Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten erlangen.

Bei o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Department bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Mag. Denise Mahrhauser für die Zusammenarbeit während meiner Diplomarbeit.

Bei Mag. Corinna Nagelreiter und Dr. Magdalena Hoppel möchte mich ich für die hilfreiche Unterstützung bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums, für die Unterstützung in schwierigen Zeiten und meinem Bruder, Mag. iur. Friedrich Kieweler, für die wertvollen Ratschläge während meines Studiums.

Abschließend möchte ich meinem Freund Christoph ein großes Dankeschön aussprechen. Er stand mir mit viel Geduld und Verständnis zur Seite und hat mich in allen technischen Fragen großartig unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
2	ALLGEMEINES	7
2.1	DIE HAUT	7
2.1.1	<i>Aufbau und Struktur der Haut</i>	<i>7</i>
2.1.2	<i>Aufnahme von Arzneistoffen</i>	<i>11</i>
2.2	LIPOSOMEN	12
2.2.1	<i>Definition</i>	<i>12</i>
2.2.2	<i>Verwendete Komponenten</i>	<i>13</i>
2.2.3	<i>Anwendungsgebiete</i>	<i>16</i>
2.3	MIKROEMULSIONEN	17
2.3.1	<i>Definition</i>	<i>17</i>
2.3.2	<i>Verwendete Komponenten</i>	<i>18</i>
2.3.3	<i>Anwendungsgebiete</i>	<i>20</i>
2.4	MODELLWIRKSTOFFE	21
2.4.1	<i>Fluconazol</i>	<i>21</i>
2.4.2	<i>Na-Fluorescein</i>	<i>22</i>
3	METHODEN	24
3.1	HERSTELLUNG DER LIPOSOMEN	24
3.2	HERSTELLUNG DER MIKROEMULSION	26
3.3	STABILITÄTSUNTERSUCHUNG	27
3.4	FRANZ ZELLEN	29
3.4.1	<i>Versuchsanordnung</i>	<i>30</i>
3.5	TAPE STRIPPING	32
3.5.1	<i>Versuchsanordnung</i>	<i>33</i>
3.6	PRÄPARATION HORIZONTALER HAUTSCHNITTE UND WIRKSTOFFEXTRAKTION	35
3.7	FÄRBUNG DER HAUTSCHNITTE	37
3.8	ANALYTIK	38
3.8.1	<i>HPLC</i>	<i>38</i>
3.8.2	<i>Fluorimetrie</i>	<i>40</i>
3.8.3	<i>NMR-Spektroskopie</i>	<i>43</i>
4	ERGEBNISSE	44
4.1	STABILITÄTSUNTERSUCHUNG	44
4.2	FRANZ ZELL VERSUCHE	49
4.2.1	<i>Vorversuche mit fluconazolhaltigen F-DPPC und DPPC Liposomen</i>	<i>49</i>
4.2.2	<i>Vergleich von Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC Liposomen mit Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen und 0,1% Na-Fluorescein Lösung</i>	<i>51</i>
4.3	TAPE STRIPPING	52
4.3.1	<i>Vorversuch mit einer fluconazolhaltigen Mikroemulsion</i>	<i>52</i>
4.3.2	<i>Vergleich von Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC Liposomen mit Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen und NaFI-Lösung</i>	<i>53</i>
4.4	PRÄPARATION HORIZONTALER HAUTSCHNITTE UND WIRKSTOFFEXTRAKTION	55

4.4.1 Vergleich von Na-fluoresceinhältigen F-DPPC Liposomen mit Na-fluoresceinhältigen DPPC Liposomen mit NaFI-Lösung.....	55
4.5 FÄRBUNG DER HAUTSCHNITTE	56
5 DISKUSSION	59
6 ZUSAMMENFASSUNG	66
7 ANHANG	69
7.1 MESSWERTE ZUR STABILITÄTSUNTERSUCHUNG.....	69
7.2 MESSWERTE ZUR IN VITRO HAUTPERMEATIONSSTUDIE MITTELS FRANZ ZELLEN ...	75
7.3 MESSWERTE ZUR IN VITRO HAUTPENETRATIONSSTUDIE MITTELS TAPE STRIPPING	80
7.4 MESSWERTE ZUR PRÄPARATION HORIZONTALER HAUTSCHNITTE UND WIRKSTOFFEXTRAKTION.....	86
8 VERZEICHNIS	89
8.1 LITERATURVERZEICHNIS	89
8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	92
8.3 TABELLENVERZEICHNIS	94
9 ABSTRACT	96
10 LEBENS LAUF	98

1 EINLEITUNG

Die Haut stellt den Kontakt zwischen Organismus und Umwelt her [1]. Sie ist mit einer Fläche von 1,50-2,00 m² und einem Gewicht von 11 kg nach der Skelettmuskulatur das größte Organ des Menschen [2]. Die Haut hat eine wichtige Abwehr- und Schutzfunktion gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen. Sie steuert außerdem die Wasserabgabe, die Wärmeregulierung und den Tastsinn [1].

Transdermale Arzneistoffträger zeigen viele Vorteile gegenüber der peroralen Applikation. Sie vermeiden einen Metabolismus in der Leber. Die Verabreichung ist einfacher für den Patienten und führt zu einer erhöhten Compliance. Eine sofortige Unterbrechung der Therapie ist möglich. Trotz all dieser Vorteile sind nur wenige Medikamente auf dem Markt erhältlich. Eine der Hauptgründe stellt die Barrierefunktion der Haut gegenüber Wirkstoffen dar [3].

Liposomen sind ideale dermale Arzneistoffträger. Sie sind in der Lage die Bioverfügbarkeit eingebauter Arzneistoffe zu verändern. Die längerfristige Stabilität von Liposomen ist ungenügend. Obwohl die Penetrationsmechanismen noch nicht vollständig bekannt sind, können Liposomen für lokale und transdermale Applikationen verwendet werden [4]. Im pharmazeutischen Bereich sind Liposomen schon lange von großem Interesse. Sie sind eine vielversprechende Möglichkeit für systemisch und lokal wirkende Medikamente in der therapeutischen Anwendung bei Mensch und Tier [5].

Wichtige Voraussetzungen für liposomale Arzneistoffträger sind die Möglichkeit, spezifische Arzneistoffe zu verkapseln, eine bessere Verträglichkeit mit Geweben und eine verlängerte Stabilität im Blutgefäßsystem zu gewährleisten. Liposomen, die aus Phosphatidylcholin und fluorierten Gruppen aufgebaut sind, erfüllen diese Voraussetzungen [6].

Monofluorierte Phospholipide können für die Analyse mit der ¹⁹F-NMR-Spektroskopie verwendet werden, um die Eigenschaften von Membranproteinen zu überprüfen [7].

Das Ziel der Diplomarbeit war es, F-DPPC Liposomen als Arzneistoffträger zu verwenden und die Arzneistoffpermeation und -penetration mit Hilfe der Franz Zell Technik und mittels Tape Stripping Versuchen zu bestimmen. Zum Vergleich und zur Beurteilung der Ergebnisse wurden neben F-DPPC auch DPPC Liposomen, eine Mikroemulsion und eine Na-Fluorescein Lösung (NaFI) hergestellt. Fluconazol und Na-Fluorescein wurden als Modellwirkstoffe in die Formulierungen eingearbeitet.

Weiterhin wurde die Arzneistoffpenetration über das Stratum corneum hinaus in die lebende Epidermis mit dem Kryo-Mikrotom untersucht und anschließend die Struktur der porcinen Haut unter dem Mikroskop beobachtet.

Aufgrund der oben genannten Problematik wurde die physikalische Stabilität von Liposomen über einen Beobachtungszeitraum von 14 Wochen überprüft. Es folgte ein Vergleich zwischen wirkstofffreien und wirkstoffhaltigen Zubereitungen in der Partikelgröße und dem Polydispersitätsindex.

2 ALLGEMEINES

2.1 Die Haut

Die Haut bietet Schutz gegenüber äußeren Einflüssen wie UV-Licht, Chemikalien, Hitze und Kälte. Aus ästhetischen und kosmetischen Gründen wollen wir den Zustand der Haut erhalten und verbessern, doch die Haut ist mehr als nur eine optisch sichtbare Hülle. Sie dient als Produktionsort für Fette und fettlösliche Vitamine und spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des Körpers [8].

2.1.1 Aufbau und Struktur der Haut

Die Haut ist aus drei Schichten aufgebaut: der Oberhaut (*Epidermis*), der Lederhaut (*Dermis*) und der Unterhaut (*Subcutis*) [1][2][8][9]. Daneben befinden sich Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen in der Haut [9].

Die Epidermis lässt sich weiter unterteilen:

- Stratum corneum (Hornschicht)
- Stratum granulosum (Körnerzellenschicht)
- Stratum spinosum (Stachelzellenschicht)
- Stratum basale (Basalschicht) [1]

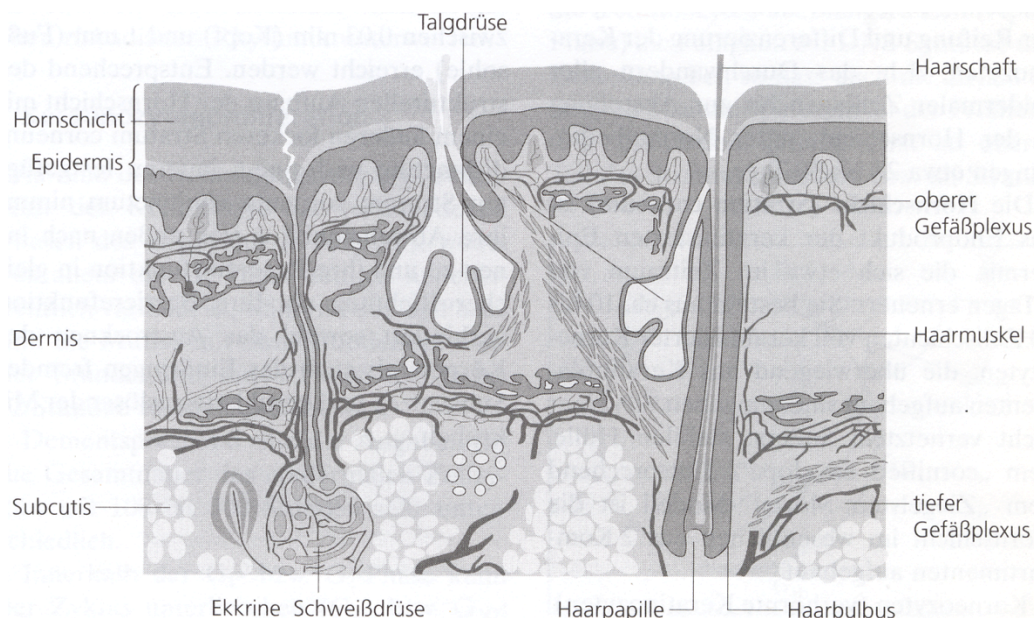


Abb. 2.1: Aufbau und Struktur der menschlichen Haut [1]

Die Subcutis ist aus traubenförmig angeordneten Fettzellen aufgebaut. Sie dient als Wärmeschutz, Nährstoff- und Wasserspeicher. Daneben ragen Haarfollikel und Schweißdrüsen in die Subcutis hinein [1].

Die Epidermis bietet einen Schutz vor Umwelteinflüssen [8]. Sie ist für die ständige Erneuerung der äußersten Hautschicht verantwortlich [9]. Die Epidermis wird von der darunter liegenden Dermis mit Nährstoffen versorgt, da sie selbst keine Blutgefäße besitzt. Die Grenze zwischen Epidermis und Dermis ist die Basalschicht. Durch die wellenförmigen Ausstülpungen der Basalschicht wird die Kontaktfläche zwischen den beiden Schichten vergrößert. Eine bessere Versorgung der Epidermis mit sauerstoffreichem Blut wird dadurch gewährleistet [8].

Die Dermis ist von Nerven, Blut- und Lymphgefäßen durchzogen. Als Teil des Bindegewebes bildet die Dermis, mit seinen aus kollagenen und elastischen Fasern bestehenden Gerüstproteinen, ein stützendes Netzwerk. In der Dermis sind circa 57% des körpereigenen Wassers gespeichert. Das nicht an Makroproteinmoleküle, den Proteoglycanen, gebundene Wasser wird der Epidermis zur Verfügung gestellt. Das an Makromoleküle gebundene Wasser prägt das Aussehen der Haut bezüglich ihrer Spannkraft und Jugendlichkeit [8].

Die unterste Schicht der Epidermis stellt das Stratum basale dar. Im Stratum basale befinden sich die Basalzellen. Diese bilden durch Proliferation Keratinozyten. Die Keratinozyten werden durch die Basalschicht nach oben geschoben [8]. Der Informations- und Substanz Austausch zwischen den Keratinozyten erfolgt über sogenannte gap-junctions [1]. Auf dem Weg zur Hautoberfläche verändern die Keratinozyten ihr morphologisches Aussehen. Dieser Prozess beginnt im Stratum spinosum, der Stachelzellenschicht. Durch die Produktion von Keratin verhornen die Keratinozyten, werden flacher und verlieren ihren Zellkern. Es entstehen die Korneozyten (Hornzellen) [8].

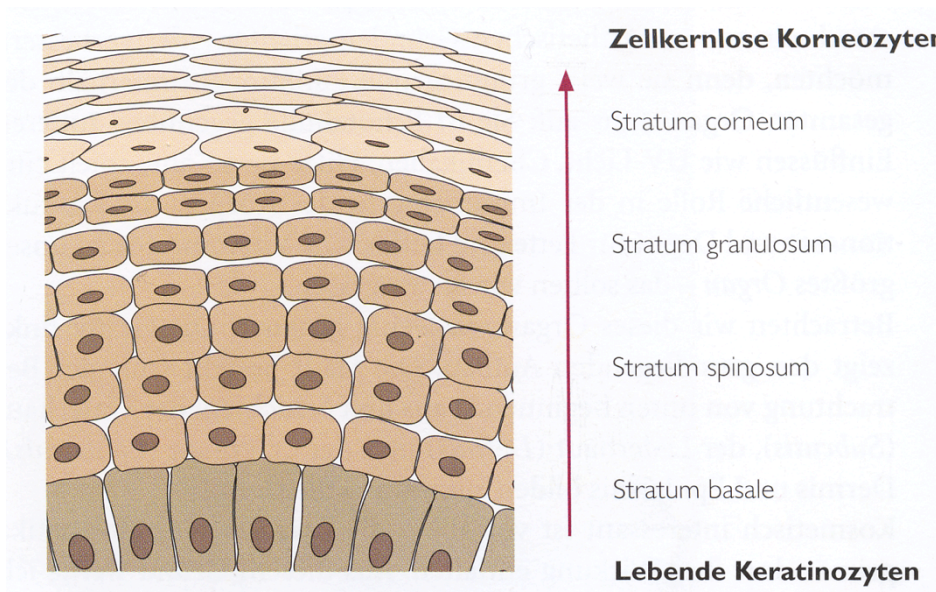


Abb. 2.2: Entstehung der Korneozyten [8]

Der Prozess der Verhornung wird als Keratinisierung bezeichnet und beginnt im Stratum granulosum, der Körnerzellenschicht, da die Zellen zunehmend granuliert aussehen. Die Keratinozyten entleeren aus den sogenannten Odland Bodies ihren lipiden Zellinhalt in den interzellulären Raum. Der Zellinhalt besteht aus Phospholipiden, Cholesterin, Ceramiden und freien Fettsäuren. Unter den Odland Bodies versteht man Zellorganellen mit der Aufgabe Membranlipide zu bilden. Aus den Lipiden entsteht die Lipidschicht des Stratum corneum, in die die Korneozyten eingebettet sind. Die Lipidschicht ist eine wichtige Barriere, um vor Wasserverlust zu schützen und das Eindringen unerwünschter Stoffe zu verhindern [8].

Von der Entstehung der Keratinozyten, im Stratum basale, bis hin zur beginnenden Verhornung, im Stratum granulosum, dauert es ca. 14 Tage bevor die Korneozyten die Hautoberfläche erreichen. Bis zu Abschilferung der Korneozyten vergehen weitere 14 Tage. An der Hautoberfläche befinden sich im Stratum corneum ca. 15-25 Schichten aus Korneozyten. Bei gesunder Haut schilfern sich die Korneozyten unbemerkt ab. Die Korneozyten besitzen keine Zellmembran mehr und bestehen aus einer Hornhülle mit einer hohen Wasserbindung. Bis zu 50% ihres Volumens können Korneozyten Wasser aufnehmen und bis auf das Fünffache aufquellen. An der Außenseite sind Korneozyten lipophil und gehen gerne Bindungen mit Lipiden ein, wie z.B. Ceramiden und Fettsäuren. Die Vernetzung der Korneozyten untereinander und der stabile Zusammenhalt werden durch die sogenannten Corneodesmosomen gewährleistet. Corneodesmosomen bestehen aus hydrophilen Proteinen und werden bereits an den lebenden Keratinozyten im Stratum basale gebildet [8].

Das Stratum corneum selbst kann noch einmal in das Stratum corneum conjunctum und in das Stratum corneum disjunctum unterteilt werden. Das Stratum corneum conjunctum besteht aus einem dichten Zellverband, während im Stratum corneum disjunctum die Korneozyten locker aufeinander liegen und nur nach und nach abgeschilfert werden. Die Ablösung der Hornzellen wird durch proteolytische Enzyme bewirkt, die die Bindungsstellen der Corneodesmosomen lösen und so das Abstoßen der Hornzellen ermöglichen. Durch den Sauerstoffkontakt im oberen Bereich des Stratum corneum werden die Enzyme aktiviert und können ihre proteolytische Wirkung zeigen [8].

Als Funktionsstruktur des Stratum corneum hat sich das Zweikompartimentmodell durchgesetzt [1]. Peter Elias beschrieb das Stratum corneum als ein Ziegelstein-Mörtel Modell, bei dem die toten Korneozyten, mit dem Stützprotein Kera-
tin, den Ziegelstein und die intrazellularen Lipide den Mörtel darstellen [9].

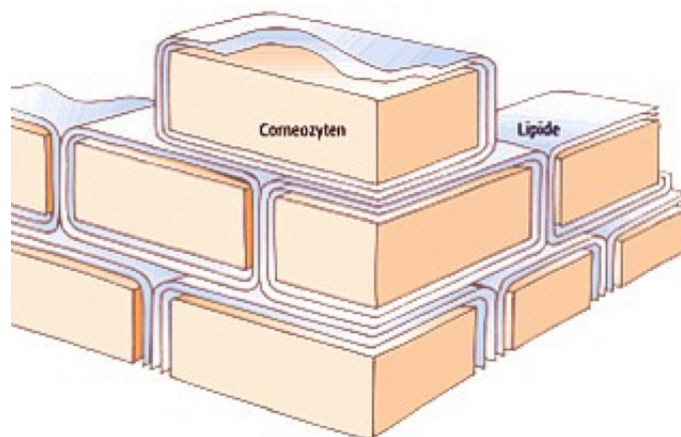


Abb. 2.3: Ziegelstein-Mörtel Modell des Stratum corneum [9]

Die Korneozyten liegen in Schichten aus Lipiden. Die Lipide werden während des Verhornungsprozesses im Stratum granulosum aus den Odland Bodies in den Interzellularraum entleert [8].

Zu den drei wichtigsten Fraktionen der Lipide zählen Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterol [9]. Die Lipide ordnen sich im Stratum corneum zu einem System aus parallel angeordneten Doppellipidschichten [8]. Besonders wichtig scheinen hier Ceramide zu sein, die mit einer Linolsäure verestert sind [9]. Diese Moleküle greifen in benachbarte Doppelmembranen und stabilisieren diese. Daraus resultiert eine Undurchlässigkeit der Hornschicht und verhindert, dass zu viel Wasser von innen nach außen verloren geht [8].

Auf der Hautoberfläche befindet sich neben der Hornschicht auch ein Hydro-Lipidfilm. Dieser ist aus Talgdrüsenfetten, freigesetzten Fetten der verhornten Keratinozyten, Keratin, Proteinen und Bestandteilen des Schweißes zusammengesetzt. Der Hydro-Lipidfilm überzieht die Haut schützend. Die Fettsäuren und organische Säuren aus dem Schweiß regulieren den pH-Wert der Haut auf einen Wert zwischen 4,5-6,5. Dieser leicht saure pH-Wert schafft optimale Bedingungen für die hauteigene Mikroflora und weist eine antimikrobielle Wirkung auf [8].

2.1.2 Aufnahme von Arzneistoffen

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten für einen Wirkstoff in die Haut aufgenommen zu werden.

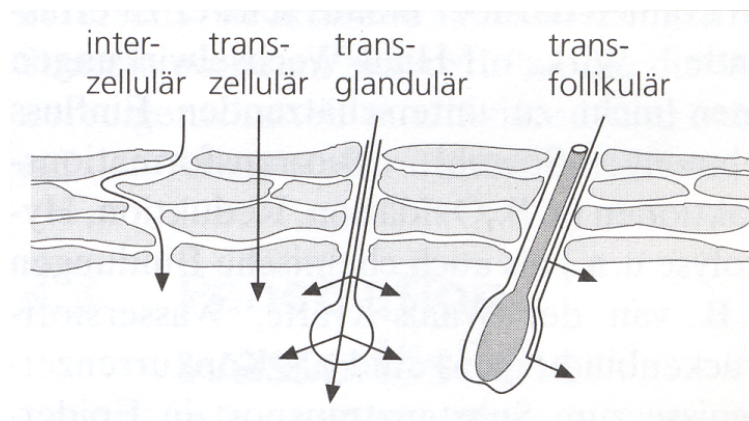


Abb. 2.4: Aufnahme von Arzneistoffen durch das Stratum corneum [1]

Arzneistoffe können entlang der Zwischenräume der Korneozyten in die Haut gelangen. Diese Möglichkeit beschreibt den interzellulären Weg [8].

Andererseits können Substanzen auch durch die Zellen in die Haut aufgenommen werden. Hierbei handelt es sich um den transzellulären Weg. Auch durch die Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen kann eine Wirkstoffaufnahme erfolgen [8]. Diese Penetrationswege spielen eine eher untergeordnete Rolle [1][8].

Der transzelluläre Weg erscheint unwahrscheinlich, da durch die Doppellipidschicht hydrophile und lipophile Barrieren überwunden werden müssten. Eine Wirkstoffaufnahme entlang der Corneodesmosomen ist möglich [8].

Die Wirkstoffaufnahme in die Haut unterliegt einem passiven Prozess und dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz [10]. Die Aufnahme des Arzneistoffes folgt einem Konzentrationsgefälle [2]. Es wird solange Wirkstoff aufgenommen, bis sich ein

Gleichgewicht einstellt und dieselbe Konzentration zwischen innen und außen vorliegt [8].

2.2 Liposomen

2.2.1 Definition

„Liposomen sind kolloidale, kugelförmige Lipidvesikel mit Durchmessern von etwa 20 nm bis zu einigen μm “ [2].

Liposomen wurden von Bangham entdeckt als er mit Phospholipiden arbeitete und eine Beobachtung über den spontanen Zusammenschluss der Phospholipide zu multilamellaren Vesikel in wässriger Lösung machte [5].

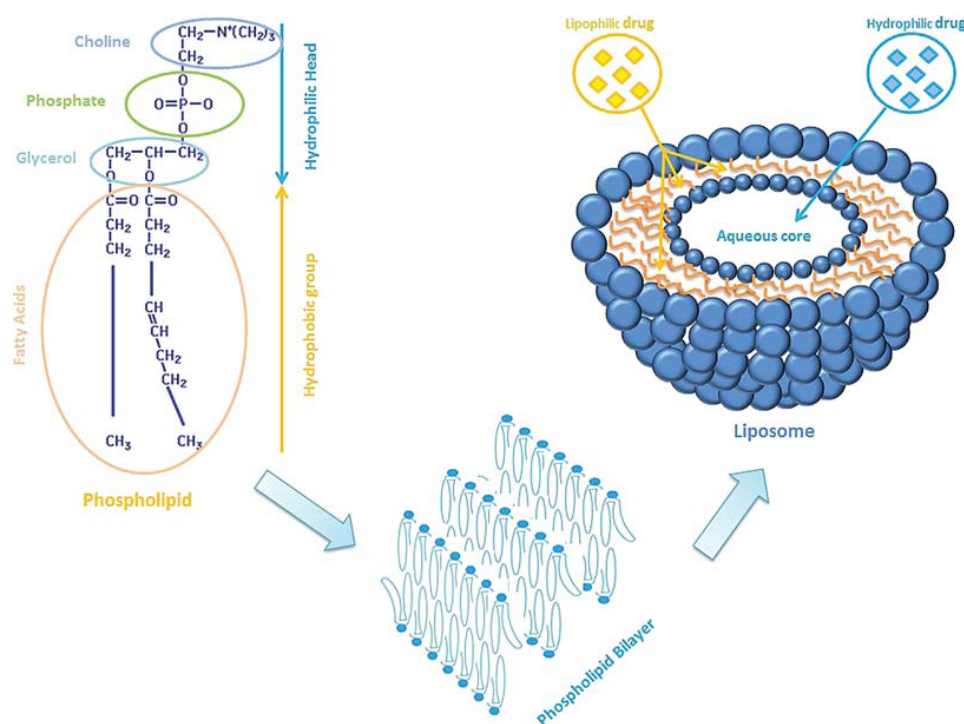


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Struktur von Liposomen [5]

Liposomen bilden, räumlich betrachtet, Kugeln mit einem Hohlraum [8]. Im wässrigen Innenraum der Vesikel können hydrophile Stoffe transportiert werden. Die lipophilen Wirkstoffe werden in der Membran eingeschlossen und amphiphile Stoffe an die Membranoberfläche adsorbiert. Die Hülle der Liposomen ist aus ein oder mehreren Lipiddoppelschichten aufgebaut, vorwiegend aus Phospholipiden [2]. Die Liposomenzusammensetzung umfasst natürliche und synthetische Phospholipide (wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol). Phosphatidylcholin (auch bekannt als Lecithin) und Phosphatidylethanolamin sind die beiden wich-

tigsten strukturellen Bestandteile biologischer Membranen. Cholesterin wird zur Optimierung von Lipiddoppelschichten eingesetzt. Es kommt zu einer Verbesserung der Membranfluidität, der Stabilität und einer Verringerung der Durchlässigkeit wasserlöslicher Moleküle durch die Membran [5]. Modifizierte natürliche (hydriertes Phosphatidylcholin) und halbsynthetische (veränderte Acylketten) Phospholipide finden Verwendung bei der Herstellung von Liposomen. Vollsynthetische Phospholipide besitzen eine nicht native Kopfgruppe (PEG, Zuckerreste). Allen Verbindungen ist gemeinsam, dass sie bei Kontakt mit Wasser spontan Lipiddoppelschichten ausbilden [1]. Somit werden entropisch ungünstige Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Acylketten und der wässrigen Umgebung minimiert. Dieser Effekt wird auch noch durch verschiedene intramolekulare Kräfte, wie elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waals Kräfte und Dispersionskräfte begleitet [5]. Ihr Aufbau gleicht strukturell dem der Lipidschichten im Stratum corneum [8].

Liposomen können in Bezug auf deren Zusammensetzung und deren Mechanismen der intrazellulären Freigabe in konventionelle, pH-sensible, kationische, lang zirkulierende und immunologische Liposomen unterteilt werden. Die Größe der Vesikel sowie die Anzahl der Lipiddoppelschichten beeinflussen die Verkapselung von Arzneistoffen in die Liposomen. In Bezug auf Größe und Anzahl der Doppelschichten werden Liposomen in folgende Typen unterteilt:

- | | |
|---|-------------|
| • Kleine unilamellare Vesikel (SUV): | 20-100nm |
| • Große unilamellare Vesikel (LUV): | >100 nm |
| • Gigantische unilamellare Vesikel (GUV): | >1000 nm |
| • Oligolamellare Vesikel (OLV): | 100-500 nm |
| • Multilamellare Vesikel (MLV): | >500 nm [5] |

2.2.2 Verwendete Komponenten

Phospholipide

Für die Herstellung der Liposomen wurden DPPC und F-DPPC verwendet.

Liposomen können aus natürlichen und synthetischen Phospholipiden aufgebaut werden [5]. Phospholipide sind Phosphodiester. Die Phosphorsäure ist mit einem Cholin, Ethanolamin, Serin, Inosit oder Glycerin verestert. Phospholipide sind Zwitterionen, deren Phosphatgruppe eine negative Ladung trägt. Die hydrophilen Kopfgruppen Cholin, Ethanolamin und Serin bestehen aus einem positiv geladenen Stick-

stoff. Der hydrophobe Schwanz besteht aus einer langen Kohlenwasserstoffkette [11].

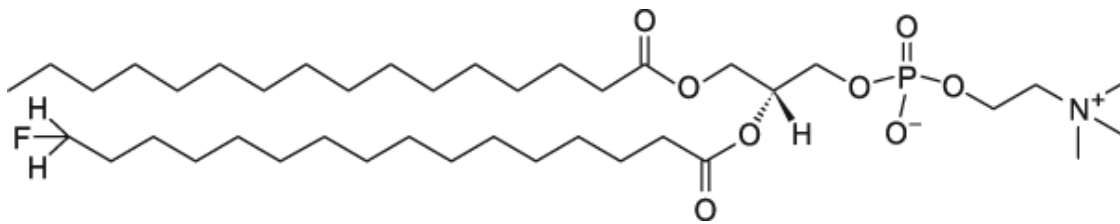


Abb. 2.6: Chemischer Aufbau des F-DPPC: 1-palmitoyl-2-(16-fluoropalmitoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine [12]

Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) ist ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen. Es zählt zu den Hauptkomponenten des Lungen-Surfactants und ist aufgrund seiner neutralen Ladung und Inertheit das Hauptphospholipid für die Liposomenherstellung. Fluorierte Phospholipide sind von biologischem Interesse. Die hohe Sensitivität des Fluors bietet die Möglichkeit in Membranen identifiziert zu werden [6]. Eine Analyse von F-DPPC kann mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie erfolgen [7].

F-DPPC bildet ohne den Zusatz von Induktionsmittel wie Alkohol ineinandergreifende Doppelschichten in der Gelphase [13]. Hierbei dringen die Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren in die gegenüberliegenden Monoschichten ein. Diese Zusammenlagerung wird durch die Erhöhung der Van der Waals Kräfte verstärkt. Bei den DPPC Liposomen ist das Ineinandergreifen der Doppelschichten energetisch nicht günstig. Grund ist die hohe Spannung zwischen den hydrophoben Gruppen der Fettsäuren und dem wässrigen Medium. Durch den Einsatz von Alkohol und Druck kommt es zur Reduzierung dieser Spannung, sodass ein Ineinandergreifen der Doppelschichten in der Gelphase stattfinden kann. Die Bindung des hochpolaren Fluoratoms in F-DPPC macht das Ende der Kohlenwasserstoffkette hydrophiler [7].

In Abbildung 2.7 ist der Phasenübergang des F-DPPC von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase zu sehen. In der Gelphase ist eine stärkere Einschränkung der Kohlenwasserstoffketten in ihrer Bewegung als bei DPPC zu beobachten. Die Phasenübergangstemperatur (T_m) von F-DPPC liegt bei 50°C und ist damit circa 10°C höher als bei seinem nichtfluorierten Gegenstück, dem DPPC. Ein Übergangszustand wurde bisher nur bei DPPC beobachtet und fehlt bei F-DPPC [13]. Die Zwischenphase von DPPC erscheint bei 35°C . Die langsame Drehbewegung der Acylketten um ihre eigene Achse geht in eine hexagonal wellige Phase über. Die Zunahme der Fläche erlaubt eine schnellere Rotation [14].

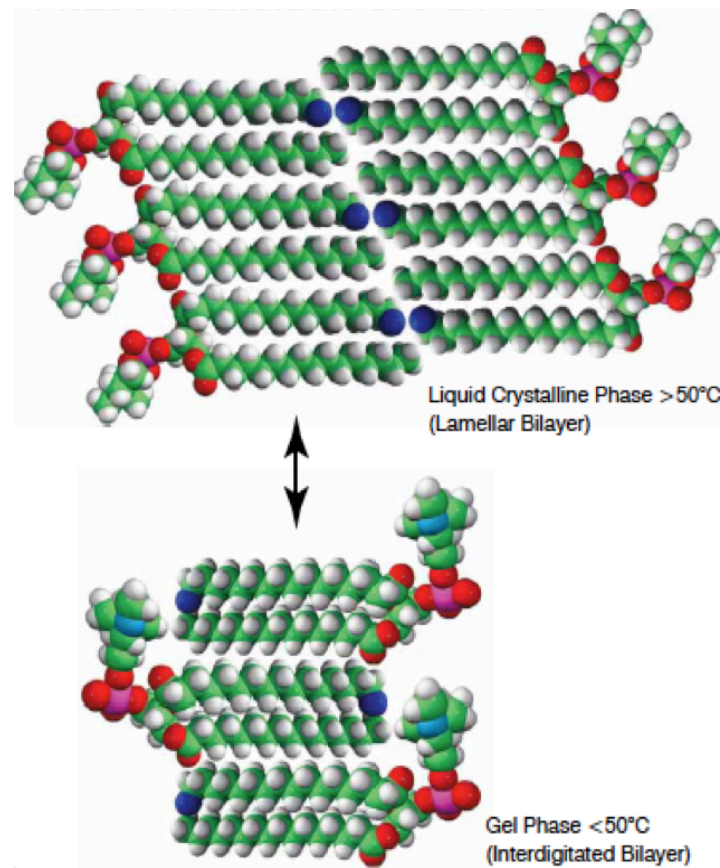


Abb. 2.7: Phasenübergangstemperatur von F-DPPC [13]

In der Gelphase liegen die Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren in einer trans Konformation vor. Beim Übergang der Lipiddoppelschichten zur flüssig-kristallinen Phase kommt es zu einem Wechsel von der trans zur gauche Konformation. Diese Veränderung führt zu einer weniger starren Struktur und zu einer Auflockerung der dichten Packung und einem größeren intramolekularen Abstand [14].

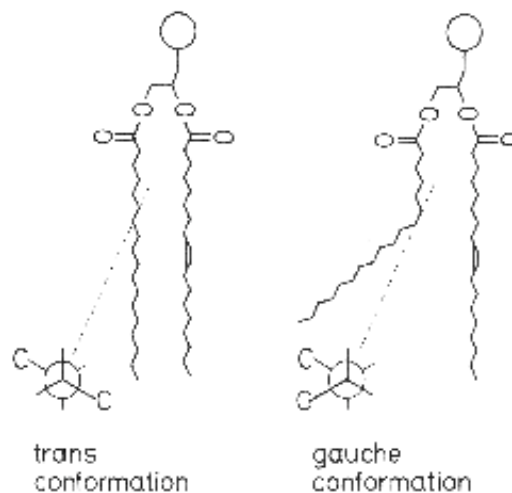


Abb. 2.8: Konformationsveränderung der Acylketten bei der Phasenübergangstemperatur [15]

Chloroform

Chloroform ist eine farblose, klare Flüssigkeit von süßlichem Geruch. Es ist wenig in Wasser löslich, aber mischbar mit Ethanol, Ether, fetten Ölen und ätherischen Ölen. Die Summenformel lautet: CHCl_3 [16].

Chloroform diente als Lösungsmittel für die Lipide DPPC bzw. F-DPPC zu Herstellung der Liposomen.

2.2.3 Anwendungsgebiete

Kolloidale Arzneistoffabgabesysteme, insbesondere Liposomen, sind als effiziente Arzneistoffträger für die Wirkstofffreisetzung auf der Haut über einen längeren Zeitraum bekannt [4].

Die Verwendung von Liposomen als systemische und topische Arzneistoffträger gewinnt zunehmend mehr an Bedeutung. Liposomen können flüssig in Form von Suspensionen, fest als Trockenpulver oder halbfest in Form von Gelen oder Cremes verabreicht werden [5].

Die Anwendung von Liposomen auf der Haut basiert auf der Ähnlichkeit zwischen den Doppelschichten der Lipidvesikel mit den natürlichen Membranen. In der Dermatologie wurden Liposomen zunächst aufgrund ihrer feuchtigkeitsspendenden und regenerierenden Wirkung eingesetzt [5]. Allein die Therapie von atopischen Hauterkrankungen mit leeren Liposomen aus nativen Phospholipiden kann zu einer Verbesserung des Hautzustandes führen [1]. Später versuchte man Arzneistoffe in Liposomen einzuschleusen und diese zu epidermalen Zellen oder sogar noch tiefere Zellschichten zu transportieren. Diese Möglichkeiten führten zu neuen Perspektiven und zu dem Schluss, dass Liposomen nützliche Arzneistoffträger für die Behandlung verschiedener Hautkrankheiten sein könnten [2].

Konventionelle Liposomen können nach der topischen Applikation das Stratum corneum nicht durchdringen [2]. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit im Aufbau der Lipidschichten im Stratum corneum fungieren Liposomen als hautanaloge Emulgatoren [8]. Sie können den Hydrationszustand der Haut verbessern und durch Okklusion die Wirkstoffpermeation erhöhen. Werden die Membranen von Liposomen durch einen hohen Anteil an Tensiden oder speziellen Lipiden fluidisiert, dann spricht man von ultraflexiblen Liposomen. Diese sind in der Lage in tiefere Hautschichten einzu-

dringen. Dispersionen von Liposomen mit einem erhöhten Ethanolgehalt (Ethasomen) bewirken ebenfalls eine erhöhte Wirkstoffpermeation in die Haut [2].

Immer mehr Unternehmen sind an der Produktion von Liposomen interessiert, aufgrund ihrer großen Effizienz als Arzneistoffträger. Die Zahl der klinischen Studien mit Liposomen steigt. Die meisten Produkte sind Zytostatika und Antimykotika, die in ihrer freien Form toxische und andere schwerwiegende Nebenwirkungen aufweisen. Die Verkapselung der Arzneistoffe in den Liposomen führt zu einer deutlichen Verringerung dieser unerwünschten Eigenschaften. Trotz alledem gibt es nur wenige pharmazeutische Produkte aus Liposomen mit Arzneistoffen, da einige Probleme wie z.B. ausreichende Stabilität, Sterilisation und Produktion größerer Chargen bestehen [5].

2.3 Mikroemulsionen

2.3.1 Definition

„Mikroemulsionen sind homogene, transparente bis schwach opaleszierende, thermodynamisch stabile Systeme, deren Bestandteile Wasser, Öl und ein Gemisch aus Tensid und Cotensid sind“ [1].

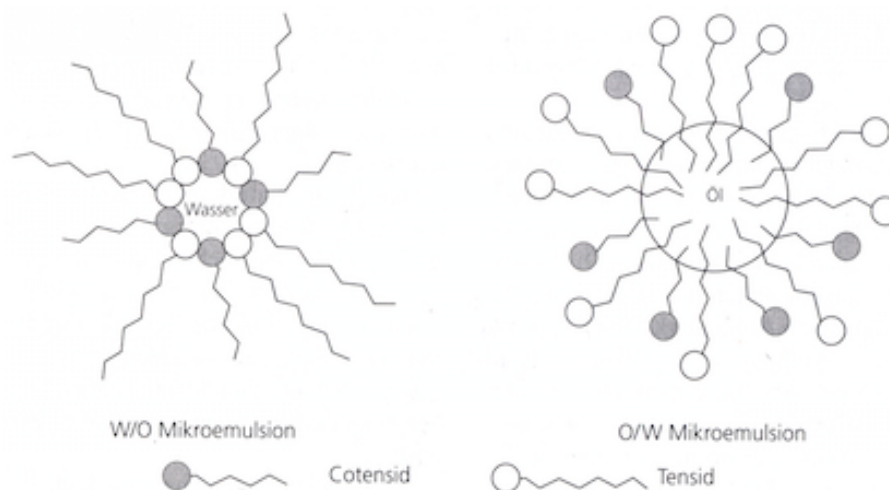


Abb. 2.9: Struktur von Mikroemulsionen [1]

Die disperse Phase liegt in einer kolloidalen Dimension vor, wodurch Mikroemulsionen optisch transparent erscheinen. Die Partikelgröße der Mikroemulsionen liegt im Bereich von 10–100 Nanometern [17].

Der Begriff Mikroemulsion wurde 1959 von Schulmann eingeführt [17]. Die Bezeichnung Mikroemulsion ist irreführend, da Emulsionen in einem Mehrphasensystem

vorliegen und Mikroemulsionen kolloidale Lösungen darstellen. Für die Dispergierung von zwei Phasen wird bei Emulsionen eine Grenzflächenenergie benötigt. Bei Mikroemulsionen stellt sich die kolloidale Lösung ohne Energie ein [2].

Im Gegensatz zu Emulsionen stellen Mikroemulsionen thermodynamisch stabile Systeme dar. Diese Stabilität ist auf eine geringe Grenzflächenspannung zurückzuführen [17]. Durch den Zusatz eines Emulgators in die Öl-Wasser Phase wird die Grenzflächenspannung verringert. Jedoch ist es nur wenigen Tensiden möglich, diese Grenzflächenspannung so zu minimieren, dass eine Bildung von Mikroemulsionen erfolgen kann. Hier ist der Zusatz eines Ko-Tensids nötig, das zwischen die Tenside wandert. Die Grenzfläche vergrößert sich und die Dispersion der Tröpfchen der inneren Phase steigt. Die innere Phase wird von den Tensidmolekülen in nanomolekularen Schichten umgeben. Darüber hinaus können auch Moleküle der Ölphase die Ausbildung der Grenzfläche beeinflussen [10].

Mikroemulsionen werden in 'Öl in Wasser' (O/W) und in 'Wasser in Öl' (W/O) Emulsionen unterschieden [1]. Die Einteilung erfolgt in Abhängigkeit des Verhältnisses von der Wasser- zur Ölphase. Die Auswahl des Tensids und des HLB-Wertes entscheidet auch über die Bildung von O/W und W/O Mikroemulsionen [10]. Der Begriff HLB steht für Hydrophilic Lipophilic Balance. Die Werte des HLB geben das Verhältnis von hydrophilen zu lipophilen Gruppen in einem Tensidmolekül an. Das HLB-System reicht von 0-20 [2]. Bei Werten von 4 bis 7 entstehen Mikroemulsionen vom W/O Typ, bei Werten zwischen 9 und 20 bilden sich O/W Systeme. Bei Erhöhung der Temperatur kann eine Phasenumkehr erfolgen [10]. Als amphiphile Moleküle lagern sich Tenside an die Grenzflächen der verschiedenen Phasen an und reduzieren die Oberflächenspannung. Tenside werden in ionische, nichtionische und amphotere Verbindungen eingeteilt. Bei ionischen Tensiden wird zwischen anionisch und kationisch unterschieden [2].

2.3.2 Verwendete Komponenten

Saccharoselaurat L-1695:

Zuckerester sind nichtionische Tenside, die die OH-Gruppen der Saccharose als hydrophile Gruppen und die über Esterbindung verbundene Fettsäure als lipophile Gruppe tragen [18].

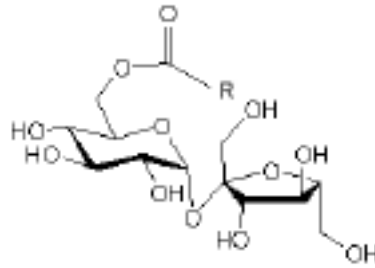


Abb. 2.10: Chemische Struktur des Zuckeresters [18]

Zuckerester werden aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt. Sie sind biologisch abbaubar und hautverträglich. Durch die positiven Eigenschaften der Saccharosester wird eine zunehmende kommerzielle Nutzung erwartet. Der HLB-Wert hängt vom Grad der Veresterung und der Art der verwendeten Fettsäuren ab [18]. Saccharoselaurat L-1695 weist hervorragende umweltschonende Eigenschaften auf [19].

Isopropanol:

Isopropanol ist eine brennbare Flüssigkeit von acetonähnlichem Geruch und ist in Wasser, Ethanol und Ether löslich. Seine Summenformel ist C_3H_8O und seine molare Masse beträgt 60,1 g/mol [16].

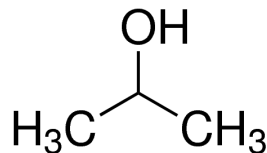


Abb. 2.11: Chemische Struktur des Isopropanols [20]

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde Isopropanol als Ko-Solubilisator zur Herstellung der Mikroemulsion verwendet.

Isopropylmyristat:

Isopropylmyristat (IPM) ist der Ester von Myristinsäure mit Isopropanol [18]. IPM ist ein farbloses, niedrig viskoses Öl und ist unlöslich in Wasser, jedoch mischbar mit Ether, Chloroform, Petrolether, flüssigen Paraffin und fetten Ölen. Seine molare Masse beträgt 270,5 g/mol und die Summenformel lautet $C_{17}H_{34}O_2$ [16].

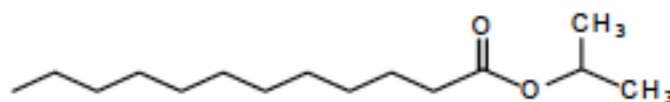


Abb. 2.12: Chemische Struktur von Isopropylmyristat [18]

In der kosmetischen Industrie wird Isopropylmyristat verwendet, um eine gute Absorption durch die Haut zu erreichen [18]. Isopropylmyristat ist ein hautverträgliches, toxikologisch unbedenkliches Lösungsmittel und besitzt ein gutes Spreitungsvermögen [16].

Der Einschluss des Isopropylmyristats in das Stratum corneum führt zu einem Ordnungsverlust der in den Korneozyten gebundenen Lipide und zu einer Auflockerung der Lipiddoppelschichten. Isopropylmyristat dient als Weichmacher und hält die Feuchtigkeit der Haut aufrecht [18]. Bei der Herstellung der Mikroemulsionen diente Isopropylmyristat als lipophiler Bestandteil [10].

2.3.3 Anwendungsgebiete

Mikroemulsionen besitzen ein hervorragendes Solubilisationsvermögen für lipophile Substanzen. Je nach Aufbau der Mikroemulsion können hydrophile und lipophile Arzneistoffe transportiert werden [1].

Als Arzneistoffträger weisen Mikroemulsionen eine hohe Permeation durch die Haut auf [19]. Aufgrund der hohen Stabilität von Mikroemulsionen ist eine einfache Lagerung möglich. Die erhöhte Permeation der Mikroemulsionen ist auf die lipophilen Bestandteile zurückzuführen und die dadurch resultierende Veränderung in der Fluidität der Lipiddoppelschichten der Haut. Die hydrophilen Bestandteile in Mikroemulsionen führen zu einer Hydratisierung des Stratum corneum und eine verbesserten Permeation für hydrophile Stoffe durch die Haut [1].

Mikroemulsionen sind interessante Wirkstoffträger für die pharmazeutische und kosmetische Industrie [19]. Die Anwendung von Mikroemulsionen ist nicht nur wegen der kostengünstigen und einfachen Herstellung von Vorteil, sondern auch aufgrund einer verbesserten Bioverfügbarkeit [3]. Durch den hohen Anteil an Tensiden können negative Effekte auf die Haut resultieren [1]. Allerdings können durch die sorgfältige Auswahl an natürlichen Tensiden mit einem niedrigen Potential für Hautreizungen und guten ökotoxikologischen Eigenschaften diese Nachteile vermieden werden [19]. Beim Transport von lipophilen Stoffen zeigen Mikroemulsionen im Vergleich zu Cremes eine tiefere Penetration in die Haut und eine höhere Wirkstofffreigabe [1].

2.4 Modellwirkstoffe

2.4.1 Fluconazol

Fluconazol ist ein Breitband-Antimykotikum [16]. Es wird zur Behandlung von oberflächlichen und systemischen Mykosen eingesetzt, die durch Hefepilzinfektionen (Candida und Kryptokokken) verursacht werden. Bei immunsupprimierten Patienten kann eine Prophylaxe in Erwägung gezogen werden [21].

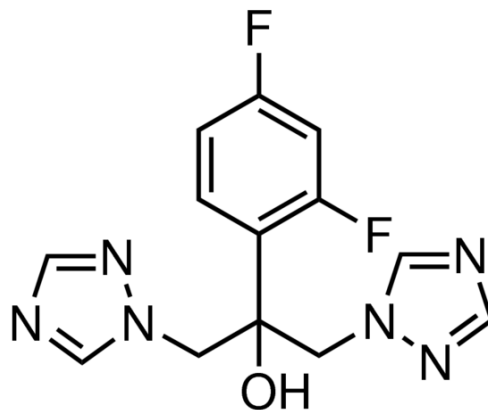


Abb. 2.13: Chemische Struktur von Fluconazol [22]

INN: 2-(2,4-Difluorphenyl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-propan-2-ol

Summenformel: $C_{13}H_{12}F_2N_6O$

Molare Masse: 306,3 g/mol

Schmelzpunkt: 138-140°C [16]

Die Plasmaproteinbindung ist gering und liegt im Bereich von 10-12%. Die Halbwertszeit beträgt ca. 30 Stunden und die Bioverfügbarkeit liegt über 90%. Fluconazol wird renal eliminiert, zu 10% metabolisiert und besitzt eine gute Wasserlöslichkeit [21]. Außerdem wird es oral und parenteral verabreicht [16].

Fluconazol ist ein Triazolantimykotikum und zählt neben Imidazol zu den Azolantimykotika. Die Wirkung der Azolantimykotika erfolgt über die Cytochrom-P450-Enzyme durch die Hemmung der Ergosterolsynthese in Pilzen. Die C14-Demethylierung von Lanosterol wird durch Hemmung der C14-Demethylase unterbunden [21]. Ergosterol sorgt für die Fluidität, die Festigkeit und die Struktur der Zellmembranen in Pilzen, um die Membranpermeabilität und die Funktion der Enzyme aufrecht zu erhalten. Zusätzlich sorgt es auch für Wachstum und Proliferation der Zellmembran. Für die

tems und Blutflusses im Augenhintergrund verwendet [26]. In der Augenheilkunde kommt Na-Fluorescein in einer Konzentration von 2% zur Detektion von Verletzungen der Hornhaut des Auges zum Einsatz [28]. Aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaft kommt es zu keiner Färbung des lipidhaltigen Hornhautepithels im Auge. Beim Fehlen des Hornhautepithels, wie es z.B. bei einem Ulkus auftreten kann, wird das hydrophile Stroma der Hornhaut durch Na-Fluorescein angefärbt. Mit dem Fluorescein-Test kann auch die Durchlässigkeit des Tränenkanals überprüft werden [29].

Na-Fluorescein wird renal ausgeschieden und führt zu einer orangen Färbung des Urins. Mit der Na-Fluoreszenzangiographie können Augenerkrankungen wie die Makuladegeneration, Retinopathia diabetica und degenerative Erkrankungen des Pigmentepithels diagnostiziert werden [26].

3 METHODEN

3.1 Herstellung der Liposomen

Die Herstellung der Liposomen erfolgte nach einer modifizierten Filmmethode [4]. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde mit 2%igen DPPC¹ bzw. F-DPPC² Liposomen mit und ohne 0,5% Fluconazol³ bzw. 0,1% Na-Fluorescein⁴ als Modellwirkstoff gearbeitet.

Die Formulierungsfindung des F-DPPC und die geeignete Konzentration des Wirkstoffes Fluconazol wurde in einer vorangegangenen Arbeit von Mag. phil. Kathrin Wiatschka durchgeführt. Es ergaben sich Formulierungen mit 0,5 % Fluconazol für die Herstellung der F-DPPC Liposomen [30].

Zu Beginn der Herstellung der Liposomen erfolgte eine Einwaage von 0,4 g DPPC bzw. F-DPPC mit und ohne 0,1 g Fluconazol bzw. 0,02 g Na-Fluorescein in einem Birnenkolben auf einer Analysenwaage⁵. Danach wurde Chloroform in der zehnfach höheren Menge hinzugefügt. Das organische Lösungsmittel wurde am Rotavapor bei 475 mbar und bei 60°C Wasserbadtemperatur abgedampft bis ein Lipidfilm entstand. Der Birnenkolben sollte hierbei mit voller Geschwindigkeit gedreht werden [30][31].



Abb. 3.1: Herstellung des Lipidfilmes am Rotavapor

¹ Lipoid (DPPC) PC 16:0/16:0, Lipoid GmbH-Ludwigshafen, Deutschland

² 16:0-16:0 (16-F) PC, Avanti Polar Lipids, USA

³ Fluconazol, *PHR1160 Fluka*, Sigma- Aldrich Co. LLC, Österreich

⁴ Na-Fluorescein, *F6377 Sigma*-Aldrich, Sigma- Aldrich Co. LLC, Österreich

⁵ M-Power, Sartorius Austria GmbH, Österreich

Die letzten Lösungsmittelreste wurden im Hochvakuum für circa zwei Stunden entfernt. Danach wurde das kurz zuvor keimfiltrierte Aqua destillata dem trockenen Lipidfilm ad 20 ml zugegeben und zweieinhalb Stunden lang am Wasserbad bei 60°C und 160 rpm hydratisiert. Die entstandene dickflüssige Emulsion wurde abkühlt und in ein Becherglas übergeführt [30][31].



Abb. 3.2: Hydratisierung des Lipidfilmes

Zum Schluss erfolgte eine 15-minütige Behandlung mit einer Sonotrode⁶ bei mindestens 15 kJ. Durch die Behandlung mit dem Ultraschallstab entstand aus der dickflüssigen Emulsion eine transparente und opaleszierende Flüssigkeit [30][31].

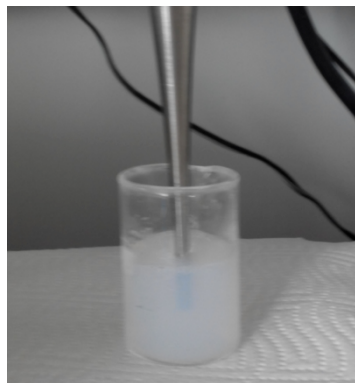


Abb. 3.3: Behandlung mit der Sonotrode

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Liposomen bei ca. 8°C im Kühlschrank in einer Schraubeprouvette aufbewahrt. Unmittelbar nach der Herstellung wurde die Partikelgröße der Liposomen mittels Zetasizer ermittelt. Die

⁶ Sonopuls HD 70, Bandelin electronic GmbH & Co. KG Berlin, Deutschland

DPPC Liposomen blieben nach der Abkühlung flüssig, die F-DPPC Liposomen jedoch erstarrten gelartig. Somit war eine Bestimmung der Partikelgröße der F-DPPC Liposomen mittels Zetasizer nicht möglich [30][31].

3.2 Herstellung der Mikroemulsion

Die Herstellung der Mikroemulsion erfolgte aus den 3 Komponenten: Wasser, Öl und einer Mischung aus einem Tensid und einem Ko-Solubilisator. Für die wässrige Phase wurde destilliertes Wasser, für die ölige Phase Isopropylmyristat⁷ verwendet. Als Tensid kam Saccharoselaurat L-1695⁸ mit einem HLB-Wert von 16 zum Einsatz. In gleicher Menge wurde Isopropanol⁹ als Ko-Solubilisator hinzugefügt. Als Wirkstoff wurde Fluconazol¹⁰ in einer Konzentration von 0,5 % gewählt [32].

Wasser	Tensid/Ko-Solubilisator	Öl
	1:1	
Aqua destillata	Saccharoselaurat L-1695/ Isopropanol	Isopropylmyristat

Tab. 3.1: Qualitative Zusammensetzung der Mikroemulsion

Wasser	Tensid/Ko-Solubilisator	Öl
20%	60%	20%
1g	3g	1g

Tab. 3.2: Mischverhältnis der Mikroemulsion

In einem Schraubgefäß mit Magnetrührstäbchen wurde der Zuckerester auf einer Analysenwaage eingewogen und die gleiche Menge Isopropanol hinzugefügt. Nach der Zugabe von Isopropylmyristat und Fluconazol wurde das Schraubgefäß auf eine Magnetrührplatte gestellt und bei 600 rpm gerührt. Das destillierte Wasser wurde mit einer Pipette tropfenweise hinzugefügt. Die Mikroemulsion blieb bis zum vollständigen Lösen auf der Magnetrührplatte stehen. Um eine Verdunstung des Ko-Solubilisators zu vermeiden, wurde das Schraubgefäß mit einem Parafilm umwickelt [30][33].

⁷ Isopropylum myristicum, Herba Chemosan AG, Österreich

⁸ Ryoto Sugar Ester L-1695, Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Japan

⁹ 2-Propanol, L-MS CHROMASOLV®, 4965 Fluka, Sigma- Aldrich Co. LLC, Österreich

¹⁰ Fluconazol , PHR1160 Fluka, Sigma- Aldrich Co. LLC, Österreich

3.3 Stabilitätsuntersuchung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stabilität von 2%igen DPPC Liposomen im Vergleich zu 2%igen DPPC Liposomen mit dem Wirkstoff Fluconazol in einer Konzentration von 0,5% mit dem Zetasizer Nano ZS¹¹ untersucht.

Die durchschnittliche Teilchengröße sowie die Größenverteilung (PDI) der Liposomen sind wichtige Parameter, insbesondere bei Liposomen zur Inhalation oder zur parenteralen Verabreichung [5]. In der pharmazeutischen Industrie wird die Partikelgröße zur Qualitätskontrolle bestimmt [34]. Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Ermittlung der Partikelgröße wie z.B. mittels Mikroskopie, der Größenausschlusschromatographie (GPC) und dynamischer oder statistischer Lichtstreuung [5].

Mit dem Zetasizer Nano ZS wird die dynamische Lichtstreuung zur Messung von Partikel- und Molekülgröße verwendet. Auch das Zetapotential kann mit dem Zetasizer gemessen werden [35].



Abb. 3.4: Zetasizer Nano ZS [36]

Die meisten kolloidalen Dispersionen tragen im wässrigen Medium eine elektrische Ladung. Für die Entstehung der Oberflächenladung bei Liposomen sind die Ionisation von Oberflächengruppen und die Adsorption von geladenen Teilchen von Bedeutung. Die Adsorption von Tensidionen an der Partikeloberfläche führt kationische Tenside zu einer positiv geladenen und anionische Tenside zu einer negativ geladenen Oberfläche. Ebenso führt die Dissoziation der sauren Gruppen auf der Partikeloberfläche zur negativen Ladung. Eine basische Oberfläche hingegen führt zu einer positiven Ladung [5].

¹¹ Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments GmbH, Deutschland

Das Zeta-Potential beschreibt die Gesamtladung eines Teilchens in einem Medium. Wenn die Partikel in einer Suspension ein hohes negatives oder positives Zeta-Potential aufweisen neigen sie dazu, sich gegenseitig abzustößen und es besteht keine Tendenz zur Aggregation [5].

Für die Messung des Zeta-Potentials wird ein Laser verwendet. Der einfallende Laserstrahl tritt durch das Zentrum der Probenzelle und das gestreute Licht wird in einem Winkel von 13° erfasst. Wird ein elektrisches Feld an die Probenzelle angelegt, führen die Bewegungen der Teilchen zu Schwankungen des detektierten Lichtes. Die Frequenz ist proportional zur Partikelgeschwindigkeit und diese Informationen werden zu einem digitalen Prozessor weitergeleitet. Dieser erfasst die Signale und leitet sie zu einem Computer weiter, der daraus das Zeta-Potential berechnet. Partikel in Suspensionen mit einem Zeta-Potential von $> +30 \text{ mV}$ oder $< -30 \text{ mV}$ werden als stabil gesehen [5].

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) dient zur Charakterisierung der Teilchengröße in kolloidalen Dispersionen [34]. Das dynamische Streulichtverfahren wird auch als Photonenkorrelationsspektroskopie bezeichnet [37]. Eine Bestimmung der Partikelgröße im Bereich von $0,3 \text{ nm}$ – $10,0 \text{ }\mu\text{m}$ ist möglich [35].

Die Moleküle oder Teilchen in einer Suspension werden mit einem Laser bestrahlt und folgen daraufhin der Brown'schen Molekularbewegung [34]. Die zeitabhängigen Schwankungen der Streulichtintensität werden in einem Winkel von 173° detektiert. Die Schwankungen werden durch Interferenzerscheinungen und der Brown'schen Molekularbewegung verursacht. Die Intensitätsschwankungen geben Rückschluss auf die Partikelgröße, da die Diffusionsgeschwindigkeit von der Partikelgröße abhängt. Je kleiner die Partikel sind, desto höher ist die Diffusionsgeschwindigkeit [37].

Bei den Messungen mit der Photonenkorrelationsspektroskopie erhält man als Ergebnis den Polydispersitätsindex und den mittleren Durchmesser der Teilchen (Z-Average). Der Polydispersitätsindex gibt die Größenverteilung der Partikel an [37]. Der PDI (Polydispersitätsindex) ist eine mathematische Definition zur Berechnung des relativen Fehlers zwischen der Kurvenanpassung und den experimentellen Werten. Der PDI beschreibt die Qualität disperser Systeme. Werte unter 0,2 deuten auf eine enge Größenverteilung kolloidaler Lösungen. Die Literatur berichtet hingegen kaum von Werten unter 0,2. Im Falle von Liposomen spiegeln Werte unter 0,3 eine

hervorragende Monodispersität wieder [4]. Ab einem PDI-Wert von 0,5 ist keine verlässliche Aussage über die Größenverteilung zu machen [37].

Die Partikelgrößen der Liposomen wurden über einen Beobachtungszeitraum von 14 Wochen lang mittels Zetasizer untersucht. Die Liposomen wurden dicht verschlossen im Kühlschrank bei einer Temperatur von ca. 8°C aufbewahrt. Die Herstellung der Liposomen erfolgte nach der im Kapitel 3.1 beschriebenen Filmmethode.

Zur Vermessung im Zetasizer wurde 1 ml der Liposomen in einem 10 ml Messkolben mit 9 ml frisch keimfiltriertem Aqua destillata in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Danach erfolgte eine Durchmischung mit einem Vortexmischer. Die Probe wurde in eine Kunststoffküvette gefüllt und mit dem Zetasizer die Partikelgröße und der Polydispersitätsindex gemessen. Jede Messung wurde zweimal wiederholt. Der Mittelwert wurde jeweils aus den drei Messungen pro Liposomenzubereitung berechnet [31].

3.4 Franz Zellen

Es wurde die Hautdiffusion von DPPC bzw. F-DPPC Liposomen und der Mikroemulsion in in vitro Hautstudien untersucht und verglichen. Als Modellwirkstoffe wurden 0,5% Fluconazol und 0,1% Na-Fluorescein gewählt.

Die Diffusion durch die Haut wurde mittels Franz Zellen und die Hautpenetration mittels Tape-Stripping verfolgt.

Unter dem Begriff Penetration versteht man das Eindringen einer Substanz in und durch das Stratum corneum. Die Permeation beschreibt das Durchwandern eines Arzneistoffes der Haut [38].

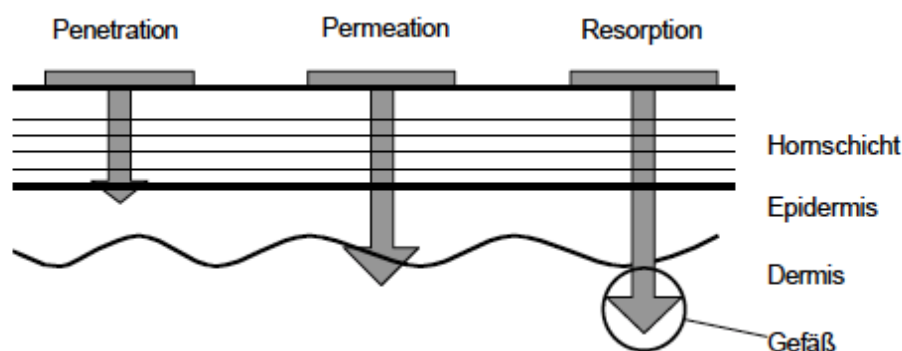


Abb. 3.5: Aufnahme von Arzneistoffen in die Haut [38]

Da Schweinehaut der menschlichen Haut hinsichtlich der Zusammensetzung sehr ähnlich ist, wird sie für in vitro Permeations- und Penetrationsstudien verwendet [39].

Die Franz Zelle besteht aus einer Glaskammer und einem Glasring. Die Glaskammer ist temperierbar [38]. Sie ist mit einem Akzeptormedium gefüllt und enthält ein Magnetrührstäbchen zur Durchmischung der Akzeptorflüssigkeit. Somit wird das Auftreten möglicher Diffusionsschichten vermieden [40]. Auf die Glaskammer wird das Hautstück mit der epidermalen Seite nach oben gelegt und mit dem Glasring befestigt. Glaskammer und Glasring werden mit Metallklammern fixiert [38]. Die entsprechende Formulierung wird im Glasaufsatz auf die Oberseite der Haut aufgetragen. Mit dem Parafilm wird der Glasring verschlossen. Flüchtige Substanzen werden vor Verdunstung geschützt und ausreichende Hydrationsbedingungen ermöglicht [40].

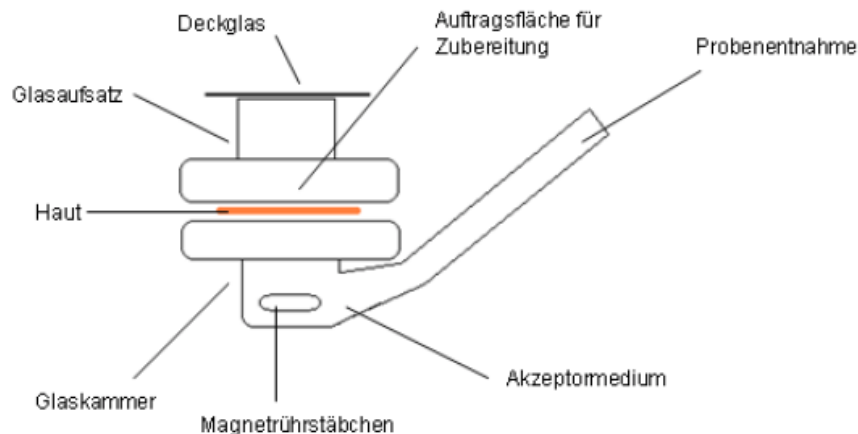


Abb. 3.6: Schematische Ansicht der Franz Zelle [40]

3.4.1 Versuchsanordnung

Die folgende Versuchsanordnung wurde in der Arbeitsgruppe durch vorangegangene Arbeiten erarbeitet und im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendet [31][40].

Für jede der fluconazolhaltigen DPPC bzw. F-DPPC Liposomen wurden mindestens sieben Franz Zellen vorbereitet ($n \geq 7$). Für die Na-fluoresceinhaltige Lösung, die F-DPPC Liposomen ohne Wirkstoff und die Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC bzw. DPPC Liposomen wurden mindestens fünf Franz Zellen angesetzt ($n \geq 5$).

Zur Vorbereitung wurde die Schweinehaut mit einem Dermatome¹² in 700 µm dünne Hautstücke geschnitten. Die Lagerung erfolgte bei -18°C in der Tiefkühltruhe. Die Hautstücke wurden hierbei in Alufolie eingepackt, um eine Kälteverbrennung der Haut zu vermeiden.

20-30 Minuten vor Beginn des Versuches wurde die dermatomisierte, porcine Haut aufgetaut und mit einem Skalpell so zugeschnitten, dass die Permeationsfläche aus circa 1 cm² großen Hautstücken bestand. Die Hautstücke wurden mit der epidermalen Seite nach oben zwischen Glasring und Glaskammer gespannt. Die Glaskammer und der Glasaufsatz wurden mit Metallklammern fixiert. So wurde ein möglicher Flüssigkeitsaustritt aus dem Akzeptormedium verhindert. Nun wurde die untere Glaskammer luftblasenfrei mit dem Akzeptormedium bis zu der entsprechenden Markierung befüllt. Ein 0,012 molarer Phosphatpuffer¹³ mit einem pH-Wert von 7,4 diente als Akzeptormedium. Durch den Phosphatpuffer werden die physiologischen Bedingungen des Blutes simuliert.

Nach der Überprüfung der Dichtheit der Franz Zellen erfolgte die Auftragung von 50 mg der Formulierungen auf die Hautfläche jeder Zelle. Die obere Öffnung des Glasringes wurde mit einem Parafilm und einer Alufolie dicht verschlossen. Die Franz Zellen wurden anschließend im Wasserbad auf eine Magnetrührplatte gestellt. Um die Temperatur der Hautoberfläche nachzuahmen, wurde das Wasserbad auf 32°C temperiert. Eine sorgfältige Durchmischung des Akzeptormediums erfolgte mit einem Magnetrührstäbchen bei 32°C.



Abb. 3.7: Franz Zelle mit Na-Fluorescein Lösung als Donor

Die Entnahme der Proben erfolgte nach 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden. Hierbei wurden 2 ml mit einer Glaspipette aus dem Akzeptormedium entnommen und in ein Eppen-

¹² Dermatome GB 228R, Aesculap

¹³ 0,012 molarer Phosphatpuffer pH 7,4: KH₂PO₄ 1,70 g, Na₂HPO₄ 1,78 g, Aqua dest. ad 1000 ml

dorfgefäß pipettiert. Anschließend wurde die untere Glaskammer wieder luftblasenfrei mit dem Phosphatpuffer befüllt.

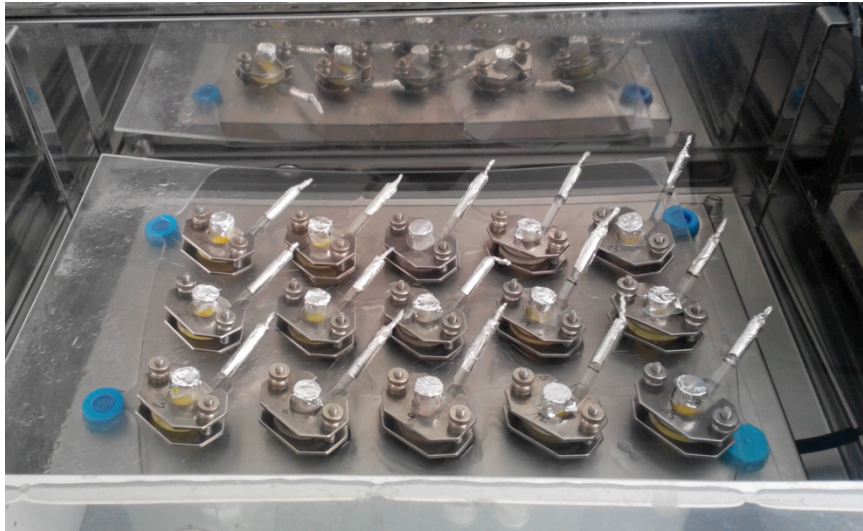


Abb. 3.8: Franz Zellen im Wasserbad auf einer Magnetrührplatte

Die Eppendorfgefäße wurden für sechs Minuten bei 12 000 rpm zentrifugiert. 1 ml des Überstandes der fluconazolhaltigen Proben wurde für die anschließende Analyse in HPLC-Vials pipettiert. Die Wirkstoffpermeation der Na-fluoresceinhaltigen Formulierungen wurde mittels Tecan Reader ermittelt. Die F-DPPC Liposomen wurden mit der NMR-Analytik untersucht.

3.5 Tape Stripping

Das Tape Stripping ist eine gute und etablierte Methode, um die Hautpenetration von topisch applizierten Substanzen zu überprüfen [41]. Aussagen über die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen in der Haut können getroffen werden [42].

Für das Tape Stripping wird Schweineohrhaut verwendet [43]. In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich, dass eine gute in vitro und in vivo Korrelation zwischen Schweinehaut und Humanhaut besteht [41].

Die Schichten des Stratum corneum werden mit einem Klebestreifen entfernt und auf deren Arzneistoff- und Proteinmenge analysiert. Zur Überprüfung der Korneozytenmenge der entfernten Klebestreifen hat sich die NIR-Densitometrie bewährt [41]. Diese Messung ist für die Bestimmung der Penetrationstiefe des Arzneistoffes in das Stratum corneum notwendig [44]. Die Ergebnisse der NIR-Densitometrie sind unabhängig vom Alter der Haut, der Hautfeuchtigkeit, dem pH-Wert der Haut und den verschiedenen Hautstellen mit der zur testenden Substanz [45]. Das NIR-

Densitometer SquameScan 850¹⁴ ist mit einer lichtemittierenden Diode mit einer Wellenlänge von 850 nm ausgestattet. Der Messbereich liegt zwischen 0-40% der Absorption mit einer Auflösung von 0,1% [45]. Das Gerät misst die Abnahme der Lichtintensität eines kreisförmigen Lichtstrahles mit einer Wellenlänge von 850 nm. Diese sogenannte Pseudo-Absorption ist aus der Reflexion, Streuung und Beugung des Lichtes der Korneozyten zusammengesetzt und wird nicht durch andere Bestandteile der Haut gestört. Der Pseudo-Absorptionswert der Korneozyten wird gegen die Pseudo-Absorption eines leeren Klebestreifens mit demselben Gerät korrigiert. Der in Prozent erhaltene Wert wird dann in die entsprechende Proteinmenge pro Strip in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ umgewandelt. Aus der Korneozytenmenge kann auf die Dicke des Stratum corneum geschlossen werden [46].

3.5.1 Versuchsanordnung

Mit den in den Franz Zellen durchgeführten Versuchen mit Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC bzw. DPPC Liposomen wurden auch die folgenden Tape Stripping Penetrationsversuche durchgeführt. Zuvor gab es Vorversuche mit fluconazolhaltigen Mikroemulsionen.

Die folgenden Angaben zur Versuchsanordnung wurden in vorangegangenen Arbeiten ausgearbeitet und sind für diese Diplomarbeit herangezogen worden [31][32][33].

Das Schweineohr wurde zu Beginn des Versuches langsam aufgetaut. Nach dem Abspülen und dem Reinigen mit kühlem Leitungswasser wurde das Schweineohr mit Küchenrolle trocken getupft. Mit einem Skalpell wurde der Knorpel des porcinen Ohrs entfernt, um beim Tape Stripping in einer Ebene zu liegen. Die dorsale Seite des Schweineohrs wurde ebenfalls mit dem Skalpell abgetrennt. Die Größe der Klebestreifen betrug 2x2 cm. Für das Tape Stripping wurde zwei Stellen auf der Haut ausgesucht mit Platz für jeweils zwei intakte Stellen. Die Flächen wurden mit einem Dreieck eingezeichnet und abgemessen. Mit den berechneten Flächen konnte die Auftragemenge für die entsprechende Formulierung ermittelt werden. Die beiden Flächen wurden mit dem Skalpell zugeschnitten und auf zwei zuvor zugeschnittenen Styroporplatten mit Stecknadeln befestigt. Auf die vorbereiteten Hautstücke wurden die Zubereitungen aufgetragen und in Petrischalen mit 1-2 ml eines 0,012 molaren

¹⁴ SquameScan 850, Heiland electronic Wetzlar, Deutschland

Phosphatpuffers mit pH-Wert 7,4 in ein Wasserbad von 32°C gestellt. Die Petrischalen wurden zusätzlich mit einem Becherglas beschwert.

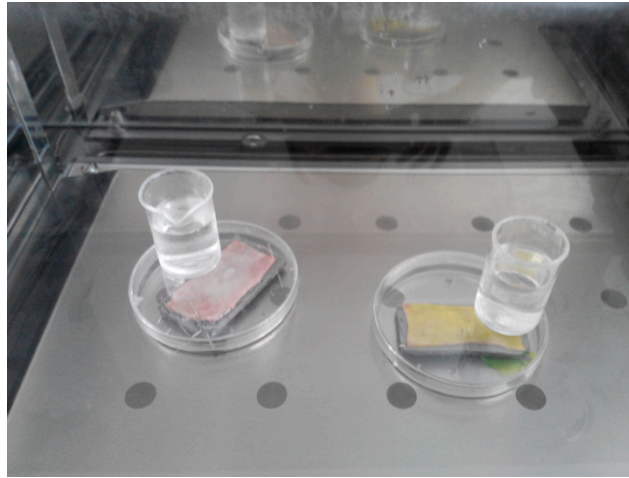


Abb. 3.9: Inkubation der Hautstücke im Wasserbad

Nach einer Einwirkzeit von zwei Stunden konnte mit dem Abziehen des Stratum corneum begonnen werden. Die auf dem Styropor befestigten Hautstücke wurden auf eine Waage gelegt und ein Tape Strip¹⁵ auf eine der markierten Flächen gelegt. Die Klebestreifen wurden mit einem rollenden Daumendruck von 5 kg immer auf dieselbe Hautstelle aufgebracht und in einem Zug wieder vom Schweineohr abgezogen. Beim Entfernen des Klebestreifens wurde auf eine gleichmäßige Geschwindigkeit und auf einen konstanten Winkel geachtet. Dieser Vorgang wurde bis zur vollständigen Entfernung des Stratum corneum durchgeführt. Die Menge der Korneozyten wurde mit einem NIR-Densitometer bestimmt. Eine direkte Sonnenbestrahlung des Gerätes wurde vermieden, um falsche Messergebnisse vorzubeugen. Es wurden solange Tape Strips an der markierten Hautstelle abgezogen bis ein Wert von unter 0,3 erreicht wurde.

¹⁵ Corneofix®, CKelectronic Cologne, Deutschland



Abb. 3.10: NIR-Densitometer für Klebestreifen

Nach jeder Messung wurden die Klebestreifen mit Hilfe einer Pinzette entweder einzeln oder gebündelt zu je fünf Tape Strips in ein Eppendorf Gefäß übergeführt, um mögliche Unterschiede in der Analytik feststellen zu können.

Bei den fluconazolhaltigen Formulierungen wurden die nicht gebündelten Strips mit 2 ml Methanol versetzt. Die nicht gebündelten Na-fluoresceinhaltigen Klebestreifen wurden in den Eppendorf Gefäßen mit 2 ml Phosphatpuffer, die gebündelten mit 4 ml Phosphatpuffer versetzt. Die Tape Strips der Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC Liposomen wurden zur NMR Analyse im deuterierten Methanol¹⁶ gelöst. Die Eppendorf Gefäße wurden zwölf Minuten lang im Ultraschallbad behandelt und anschließend für sechs Minuten bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Gehalt an Fluconazol wurde mittels HPLC bestimmt. Hierbei wurde zur Messung der Überstand der Eppendorf Gefäße in HPLC-Vials pipettiert. Der Überstand der Na-fluoresceinhaltigen Eppendorf Gefäße wurde in Mikrotiterplatten pipettiert und die Fluoreszenz mittels Tecan infinite M200 Fluorimeter¹⁷ vermessen.

3.6 Präparation horizontaler Hautschnitte und Wirkstoffextraktion

In der Diplomarbeit wurde die weitere Wirkstoffpenetration Na-fluoresceinhaltiger F-DPPC Liposomen im Vergleich zu Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen über das Stratum corneum hinaus in die Epidermis mit Hilfe eines Kryo-Mikrotoms¹⁸ untersucht.

¹⁶ Methanol D1, D015, Euriso-Top®, Frankreich

¹⁷ Tecan infinite M200, Tecan Trading AG, Schweiz

¹⁸ Slee medical Cryostat MNT, SLEE Mainz GmbH, Deutschland

Nach dem Tape Stripping wurden die Hautstücke in einer Alufolie bei -80°C gelagert. Die markierten Hautstücke wurden mit einer Stanze in zehn Kreise gestanzt und mit einem Einbettmedium¹⁹ auf dem Objektring befestigt. Die Größe der Tape Strips betrug $2 \times 2 \text{ cm}$. Die Stanzen hatten einen Durchmesser von 5 mm . Die Berechnung der Kreisfläche erfolgte mit der Formel $A = r^2 \pi$. Die Kreisfläche der Stanzen ergab $19,635 \text{ mm}^2$ pro Stanze und für die zehn gestanzten Kreisflächen $1,9635 \text{ cm}^2$.

Die Dicke der Epidermis ohne Stratum corneum beträgt circa $60\text{--}85 \text{ }\mu\text{m}$, einschließlich der Reteleisten circa $151\text{--}176 \text{ }\mu\text{m}$ [43]. Unter den Reteleisten werden die Fortsätze der Epidermis in die Dermis verstanden [47].

Die Fläche der Hautstücke wurde mit dem Kryo-Mikrotom in $40 \text{ }\mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten. Jeder Schnitt wurde in ein Eppendorf Gefäß mit 1 ml Methanol übergeführt. Fünf Schnitte zu je $40 \text{ }\mu\text{m}$ wurden durchgeführt, sodass die Dicke der lebenden Epidermis erreicht wurde.

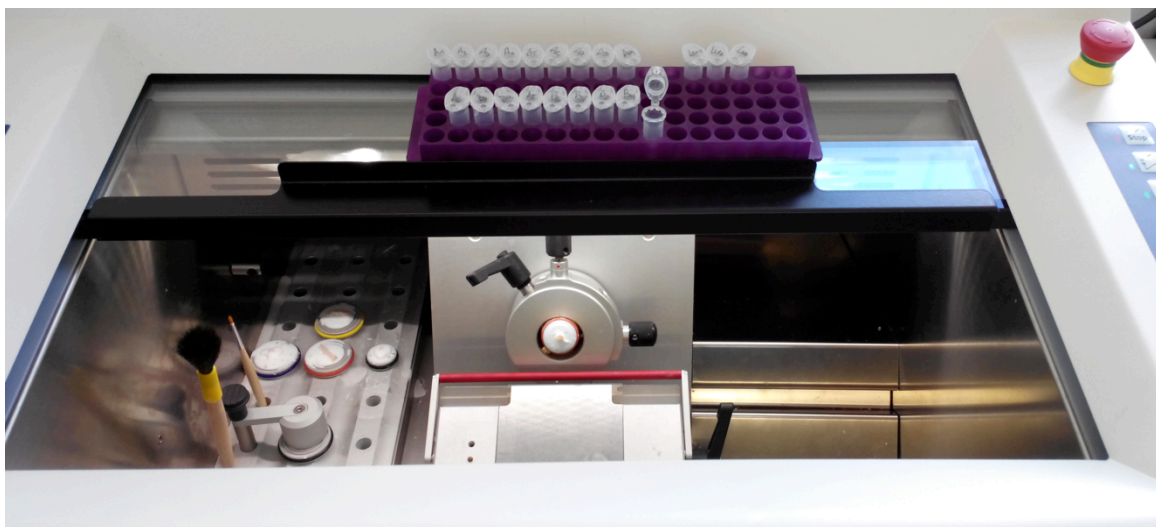


Abb. 3.11: Präparation horizontaler Hautschnitte mit dem Kryo-Mikrotom

Die Eppendorf Gefäße wurden zwölf Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. Dadurch konnte eine bessere Wirkstoffextraktion der Schnitte aus den Hautstücken erreicht werden. Im Anschluss wurden die Eppendorf Gefäße in der Zentrifuge bei 12000 rpm für zwölf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Fluoreszenz mit dem Tecan Reader vermessen.

¹⁹ CryoGlue, SLEE Mainz GmbH, Deutschland

3.7 Färbung der Hautschnitte

Mit jeder markierten Hautstelle wurden neben den Flächenschnitten auch Querschnitte vor und nach dem Schneiden mit dem Kryo-Mikrotom angefertigt. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung [48]. Bei dieser Färbemethode handelt es sich um eine Übersichtsfärbung. Zunächst erfolgte eine Färbung mit Hämatoxylin und dann eine Gegenfärbung mit dem Xanthenfarbstoff Eosin [49].

Hämatoxylin wird in die basischen Bestandteile des Gewebestückes aufgenommen und führt in den Querschnitten zu einer Färbung von Zellkernen und DNA in blau-violett. Eosin reagiert mit sauren Verbindungen und gibt den Proteinen eine rote Färbung [48]. Bei der progressiven Färbung mit Hämatoxylin wird erst am Schluss des Vorganges mit Leitungswasser gebläut und haltbar gemacht. Bei der regressiven Färbemethode wird der Überschuss an Hämatoxylin in sauren Differenzierungsschritten entfernt. Anschließend erfolgt auch hier ein Bläuen mit Leitungswasser, wodurch die Färbung haltbar gemacht wird. Die Kerne werden in dieser Methode besser ersichtlich [49].



Abb. 3.12: Dehydrierung der Querschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe

Die Färbung der Querschnitte erfolgte für drei Minuten in einer Hämatoxylinlösung²⁰. Danach wurde mit Leitungswasser gespült. Die Objektträger²¹ mit den Querschnitten

²⁰ Hematoxylin Solution, Harris Modified, HHS80, Sigma- Aldrich Co. LLC, Österreich

²¹ Superfrost Plus Objektträger, Gerhard Menzel GmBH, Deutschland

wurden für eine Sekunde in eine Salzsäure-Alkohol Lösung getaucht und mit Leitungswasser gespült. Nach dem Eintauchen in Ammoniumwasser für 20 Sekunden, erfolgte eine Spülung mit Leitungswasser. Nun wurden die Querschnitte für sieben Minuten mit Eosin gefärbt. Hierauf kam es zu einem kurzen Eintauchen in 70%igen EtOH, da Eosin²² wasserlöslich ist. Im Anschluss wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) dehydriert. Dann folgte zuerst ein einminütiges, dann ein zweiminütiges und nochmals ein zweiminütiges Eintauchen in Xylol und das Eindecken in ein Einbettmedium²³ [48][49]. Die Auswertung der Querschnitte erfolgte mit einem Mikroskop²⁴.

3.8 Analytik

3.8.1 HPLC

Die quantitative Analyse des Fluconazols wurde mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) durchgeführt.

Bei der HPLC handelt es sich um eine Säulenchromatographie. Das Elutionsmittel fließt mit Hilfe von Pumpen von oben nach unten durch die Trennsäule. Die Trennsäule ist mit einer stationären Phase gefüllt. Die Trennung von Substanzgemischen in der Säule zur qualitativen und quantitativen Analyse ist stark abhängig von der Partikelgröße und Partikelverteilung in der stationären Phase. Je kleiner und gleichmäßiger die Teilchen geformt sind, desto höher ist die Trennleistung. Die Intensität des Signales wird vom Detektor in einem bestimmten Zeitraum registriert [50]. Folgendes Gerät wurde verwendet [51]:

Apparatur	Perkin Elmer Serie 200 mit einem Säulenofen und einer Zweikanalpumpe
Detektor	Perkin Elmer Diode Array Detektor 235C
Autosampler	Perkin Elmer 200 Series
Säule	Nukleosil 100-5 C18, Firma Machery Nagel
Vorsäule	CC 8/4
Analysensoftware	Totalchrom Version 6.2.0

Tab. 3.3: HPLC [51]

²² Eosin Y Solution, 318906 Sigma-Aldrich, Sigma- Aldrich Co. LLC, Österreich

²³ Entellan® Neu, Merck KGaA, Deutschland

²⁴ Olympus BX53, DP72 (Kamera), Olympus Europa SE &CO.KG

Für die Quantifizierung von Fluconazol wurde auf die entwickelten Parameter vorangegangener Arbeiten zurückgegriffen [51]:

Mobile Phase	50 ml Phosphatpuffer pH7/ 450 ml Methanol und 1 ml Octansulfonsäure
Flussrate	1ml/min
Ofentemperatur	50°C
Injektionsvolumen	20 µl
Druck	3000 PS
Wellenlänge	260 nm
Retentionszeit	ca. 4 Minuten

Tab. 3.4: Geräteparameter HPLC [51]

Für die quantitative Bestimmung von Fluconazol war die Erstellung einer Eichgerade notwendig. Hierbei wurde Fluconazol in Methanol gelöst und eine Stammlösung von 1030,00 µg/ml erstellt. Alle folgenden Verdünnungen wurden im Verhältnis 1:2 hergestellt, wodurch sich folgende Eichlösungen ergaben [51].

	Probe	Menge [µg/ml]	Peakfläche
V0	Stammlösung	1030,00	2026307,49
V1	1:2	515,000	1017355,33
V2	1:2	257,500	512404,63
V3	1:2	128,750	249783,27
V4	1:2	64,375	123678,48
V5	1:2	32,188	57180,72
V6	1:2	16,094	29236,46
V7	1:2	8,047	15326,63
V8	1:2	4,023	6650,57
V9	1:2	2,012	2957,03
V10	1:2	1,006	1589,39
V11	1:2	0,503	n.d
V12	1:2	0,251	n.d
V13	1:2	0,126	n.d
V14	1:2	0,063	n.d

Tab. 3.5: Verdünnungsreihe Fluconazol in Methanol, n.d= nicht detektierbar

In Abbildung 3.13 ist ersichtlich, dass sich eine lineare Korrelation ergab.

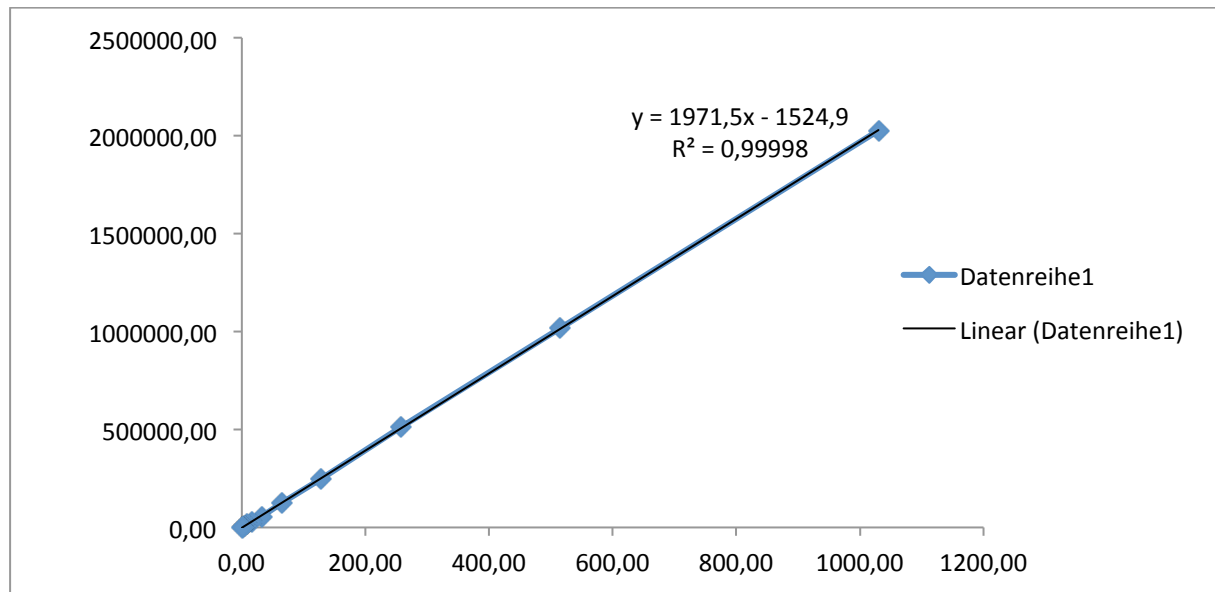


Abb. 3.13: Eichgerade von Fluconazol mit Geradengleichung und Varianz , V1-V10

In der Abbildung 3.14 ist ein charakteristisches Chromatogramm von Fluconazol in Methanol zu sehen.

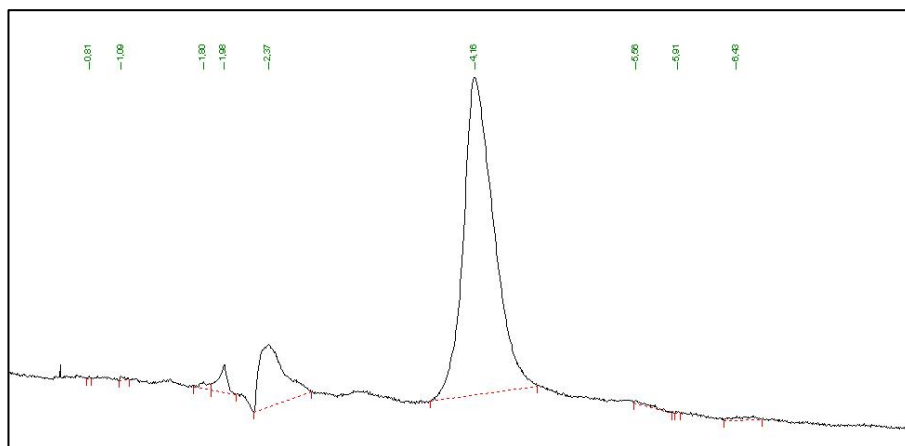


Abb. 3.14: Chromatogramm von Fluconazol in Methanol

3.8.2 Fluorimetrie

Die quantitative Analyse von Na-Fluorescein erfolgte mit dem Fluorimeter Tecan infinite M200 Reader [52].

Ein Fluorimeter ist folgendermaßen aufgebaut [50]:

- Lichtquelle
- Anregungsmonochromator
- Küvette mit der zu messenden Substanz
- Absorptionsmonochromator
- Empfänger zur Messung der Absorption

- Emissionsmonochromator
- Empfänger zur Messung der Emission (Fluoreszenz)

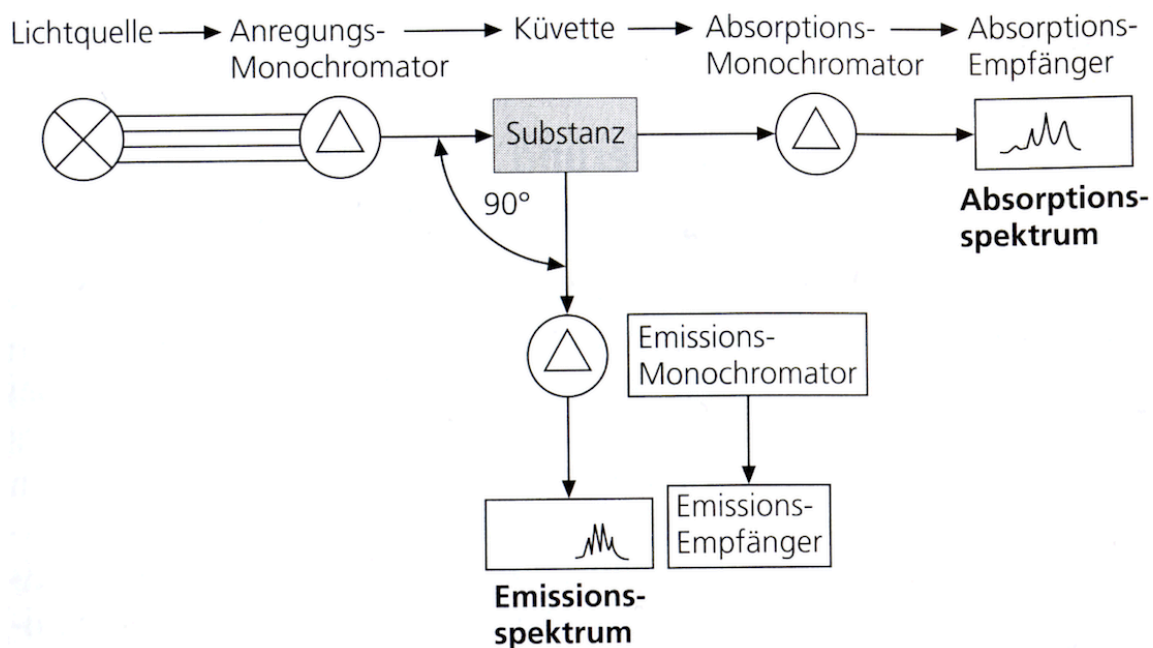


Abb. 3.15 Aufbau eines Fluorimeters [50]

Die Wellenlänge liegt im Bereich des Absorptionsmaximums der zu untersuchenden Substanz. Da die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zur Intensität des Anregungslichtes ist, sollte die Strahlungsintensität konstant gehalten werden. Die Anregung der Probe erfolgte mit monochromatischem Licht. Der Emissionsmonochromator dient zur Messung der Fluoreszenz senkrecht zur Durchstrahlrichtung. Zur Entfernung der Reste des Anregungslichtes (z.B. Streulicht) wird ein Spektralfilter verwendet. Die Photomultiplier dienen als Empfänger [50].

Folgende Parameter wurden zur Messung der Fluoreszenz verwendet:

Mode	Fluorescence Bottom Reading
Excitation Wavelength	485 nm
Emission Wavelength	535 nm
Excitation Bandwidth	9 nm
Emission Bandwidth	20 nm
Gain	78 Manual
Number of Reads	25
Integration Time	20 μ s
Lag Time	0 μ s
Settle Time	0 ms

Tab. 3.6: Geräteparameter des Fluorimeters

Die Wellenlänge der Exzitation lag bei 485 nm, bei der Emission bei 535 nm und mit einem Gain bei 78 nm. Zur quantitativen Bestimmung von Na-Fluorescein wurde eine Eichgerade erstellt. Hierbei wurde Na-Fluorescein in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 gelöst, sodass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1000 µg/ml erstellt wurde. Die Stammlösung wurde 1:100 verdünnt. Alle weiteren Eichlösungen wurden im Verhältnis 1:2 verdünnt [52]. Die Verdünnung und die zu untersuchenden Proben wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Tecan infinite M200 Reader bei einer Wellenlänge von 485/535 nm (Exzitation/Emission) [26].

	Menge [µg/ml]	Peakfläche
V0	1000	
V1	10	46838,00
V2	5	25294,00
V3	2,5	13198,33
V4	1,25	6308,00
V5	0,625	3155,33
V6	0,3125	1509,33
V7	0,156	750,33
V8	0,078	380,67
V9	0,039	191,00
V10	0,0195	125,33

Tab. 3.7: Verdünnungsreihe Na-Fluorescein in Phosphatpuffer

Wie in Abbildung 3.16 ersichtlich, ergab sich eine lineare Korrelation.

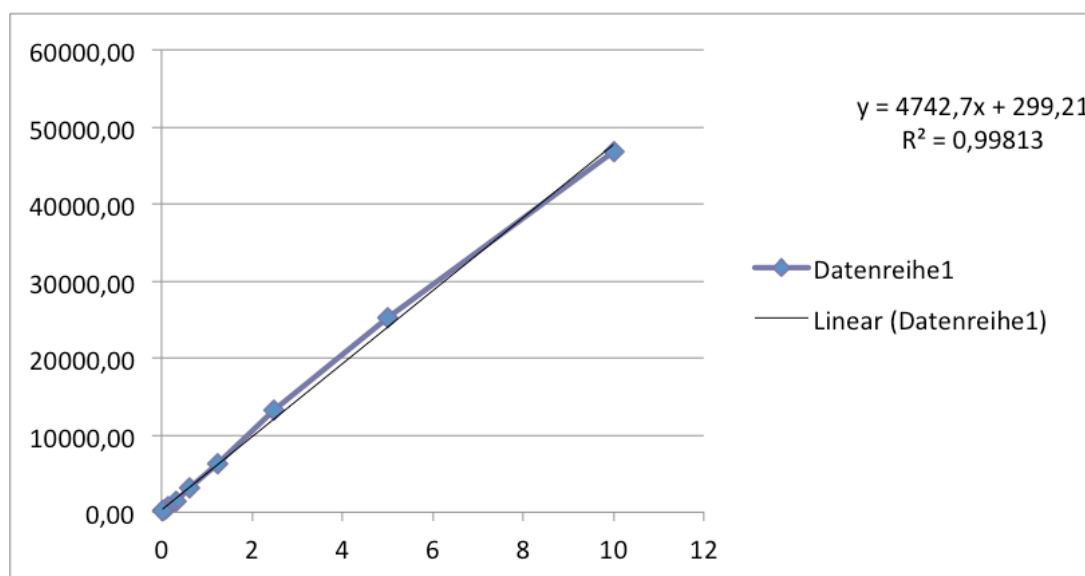


Abb. 3.16: Eichgerade von Na-Fluorescein mit Geradengleichung und Varianz, V1-V10

3.8.3 NMR-Spektroskopie

Die Analytik der F-DPPC Liposomen mit ^{19}F -NMR wurde von unserem Kooperationspartner Ass. Prof. Dr. Hanspeter Kählig durchgeführt. Die qualitative sowie die quantitative Analyse mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde bereits in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und erwies sich als geeignet [33].

Für die Ausführung von Kernresonanzmessungen ist ein permanent magnetisches Moment notwendig. Das atomare Magnetfeld ist auf die Drehung der Atomkerne um die eigene Achse, den Kernspin, zurückzuführen. Das Proton eines Wasserstoffkernes baut ein Magnetfeld auf und verhält sich wie ein Stabmagnet mit Nord- und Südpol. Der Kernspin bestimmt die Richtung des Magnetfeldes und wird durch Pfeile beschrieben. Zwei Atomkerne mit der gleichen Spinrichtung werden als parallel ($\uparrow\uparrow$) beschrieben. Bei entgegengesetzter Spinrichtung werden zwei Atomkerne als antiparallel ($\downarrow\downarrow$) bezeichnet. Neben dem Wasserstoffkern besitzen auch andere Atome einen Kernspin und sind für die Messungen mit der Kernresonanz geeignet: ^2D , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{23}Na , ^{29}Si , ^{31}P , ^{77}Se [50].

Die Atomkerne nehmen die zugeführte Energie nur dann auf, wenn diese ausreicht um sie in einen energiereicheren Zustand zu überführen. Die notwendige Energie hängt von den Bindungsverhältnissen der Atomkerne ab. Die aufgenommene Energie wird im Kernresonanzspektrum registriert und gegen die eingebrachte Energie des äußeren Magnetfeldes aufgetragen. Mit der Lage der Signale im Spektrum und der möglichen Aufspaltung in Teilsignale (Spin-Kopplung) kann die Anordnung und die Eigenschaft der Atomkerne innerhalb von organischen Molekülen abgeleitet werden [50].

Die ^{19}F -NMR hat eine Kernspin-Quantenzahl von 0,5. Der Resonanzbereich liegt bei organischen Verbindungen von 300 bis 400 ppm. Bei anorganischen Fluorverbindungen ist der Resonanzbereich um den Faktor 10 breiter [53].

4 ERGEBNISSE

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPadPrism3® verwendet [31]. Bei der Bewertung von normalverteilten Daten kam der t-Test, bei nicht parametrisch verteilten Daten kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz [54]. Das Signifikanzniveau zur Beurteilung der parametrischen und nicht-parametrischen Tests betrug 5% ($\alpha=0,05$) [31].

4.1 Stabilitätsuntersuchung

Die physikalische Stabilität von Liposomen wurde über einen Beobachtungszeitraum von 14 Wochen untersucht. Die im Kapitel 3.3 beschriebenen Parameter, wie Partikelgröße und Polydispersitätsindex, sind mit dem Zetasizer Nano ZS erfasst worden.

Es wurden jeweils drei Ansätze von 2%igen DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff hergestellt. Diese wurden in weiterer Folge als Liposomenchargen 1, 2 und 3 bezeichnet. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt ($n=3$). In der Grafik 4.1 ist der Vergleich der Partikelgröße von Liposomen mit und ohne Wirkstoff abgebildet.

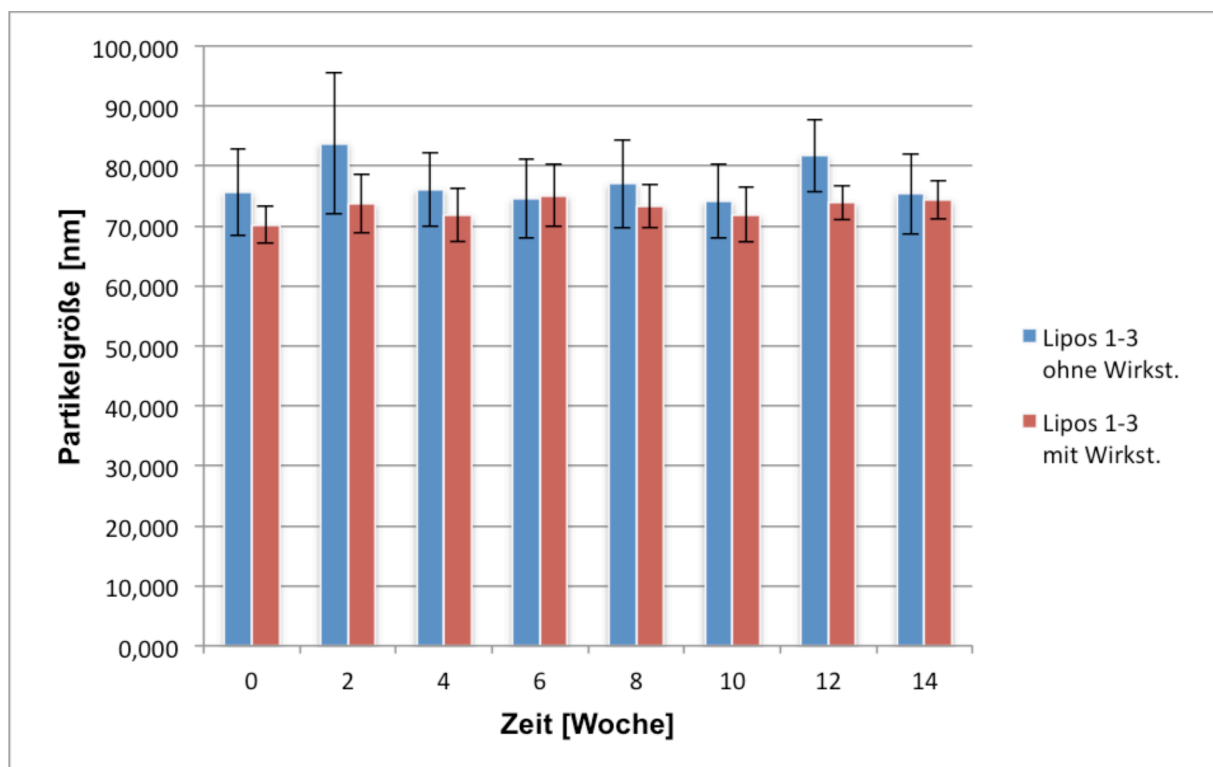


Abb. 4.1: Partikelgröße, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff

Kurz nach der Herstellung hatten die DPPC Liposomen mit dem Wirkstoff Fluconazol eine ähnliche Partikelgröße wie die DPPC Liposomen ohne Arzneistoff. Nach 14 Wochen waren die Messwerte beider Formulierungen immer noch vergleichbar. Die Liposomen mit Wirkstoff hatten über den Beobachtungszeitraum von 14 Wochen annähernd konstante Werte. Bei der letzten Messung war ein geringfügiger Anstieg in der Partikelgröße zu erkennen. In der zweiten Woche ist bei den Zubereitungen ohne Wirkstoff eine große Standardabweichung beobachtet worden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich beide Formulierungen über den Beobachtungszeitraum von 14 Wochen in ihrer Partikelgröße ähnlich waren und als stabil angesehen werden konnten. Die Abbildung 4.1 ist aus den Mittelwerten aller Liposomen mit und ohne Wirkstoff erstellt worden. Die Messwerte sind im Kapitel 7.1 aufgelistet.

Die Grafik zum Polydispersitätsindex ist in Abbildung 4.2 zu sehen.

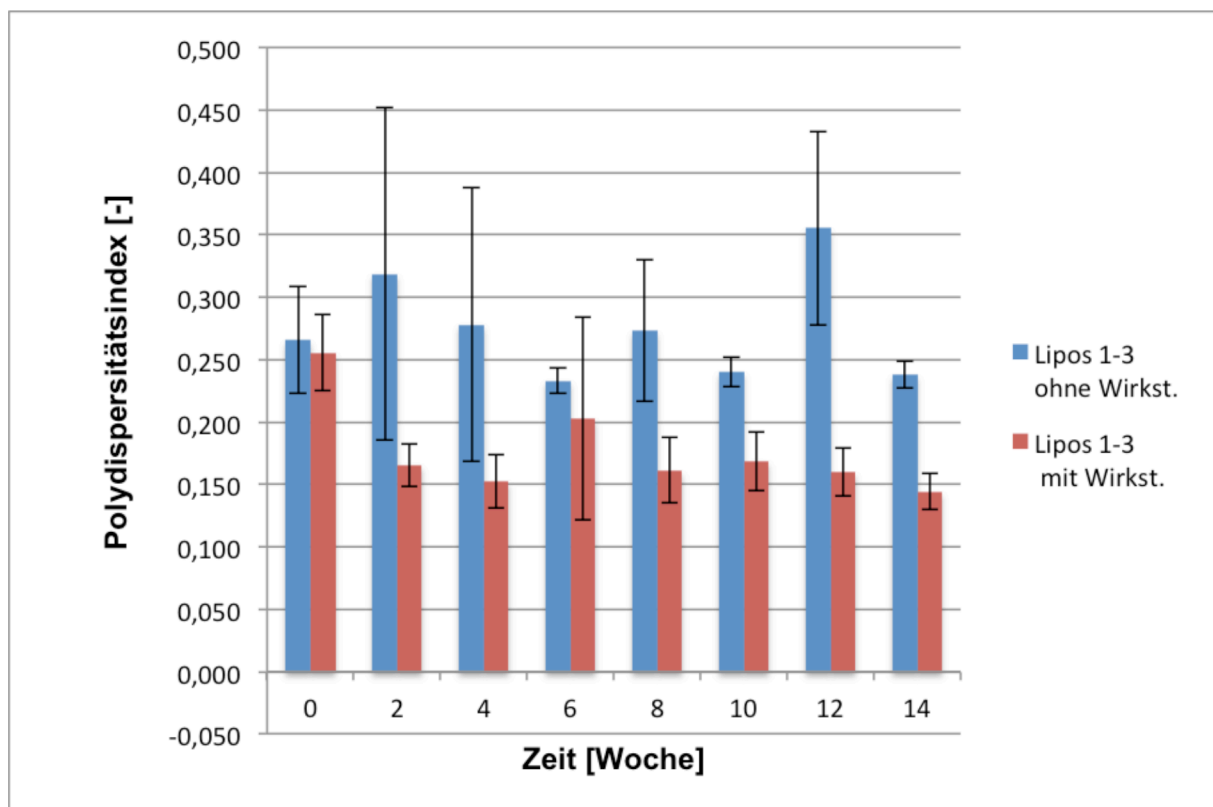


Abb. 4.2: Polydispersitätsindex, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff

Bei den Liposomen mit und ohne Wirkstoff war zu Beginn der Herstellung ein PDI von ca. 0,250 gemessen worden. Wie in Abbildung 4.2 ersichtlich, bewirkte die Inkorporation von Fluconazol eine deutliche Verkleinerung des Polydispersitätsindexes innerhalb des Beobachtungszeitraumes. In der 14. Woche war ein Wert kleiner als

0,150 zu beobachten. Demgegenüber zeigten die wirkstofflosen Liposomen deutliche Schwankungen in der Größenverteilung (PDI). Für die Auswertung der Grafik 4.2 wurden die Tabelle 7.11 und 7.12 verwendet.

In den folgenden Abbildungen werden die einzelnen Liposomenchargen mit und ohne Wirkstoff hinsichtlich des Polydispersitätsindex und der Partikelgröße verglichen.

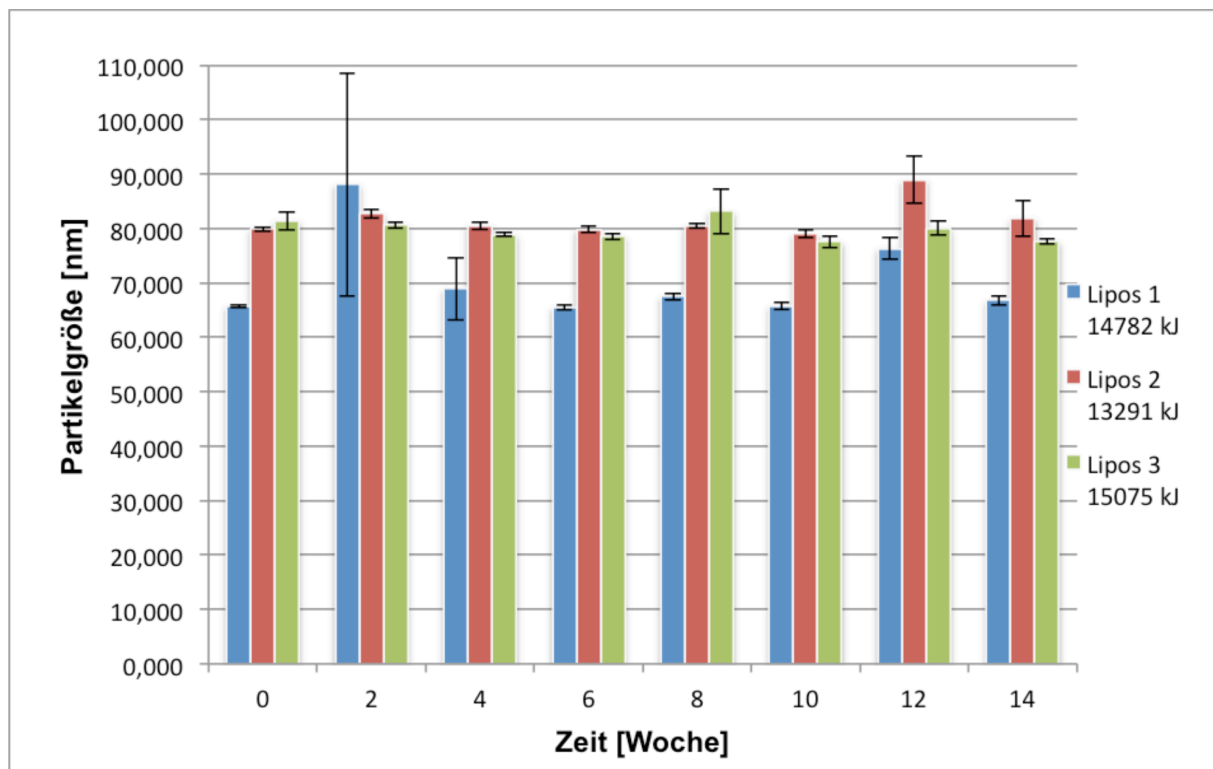


Abb. 4.3: Partikelgröße der 2%igen DPPC Liposomen ohne Wirkstoff, n=3

Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich, zeigten die Partikelgrößen der 2%igen DPPC Liposomenchargen über den gesamten Beobachtungszeitraum eine ausgezeichnete Stabilität. Die Partikelgröße lag über den Beobachtungszeitraum von 14 Wochen zwischen 65 und 89 nm.

Die Liposomenchargen 2 und 3 besaßen über den Beobachtungszeitraum der Stabilitätsuntersuchungen eine ähnlich große Partikelgröße. Die Liposomencharge 1 war zu Beginn deutlich kleiner und zeigte in der zweiten Woche eine große Standardabweichung. Für die Erstellung der Grafik 4.3 wurden die Mittelwerte der Messungen herangezogen. Die Werte sind in den Tabelle 7.5 und 7.6 abgebildet.

Ein Vergleich der einzelnen Liposomenchargen mit 0,5% Fluconazol bestätigte, dass die Partikelgrößen gleichmäßig waren. Die Partikelgröße zeigte Werte zwischen 66 und 81 nm.

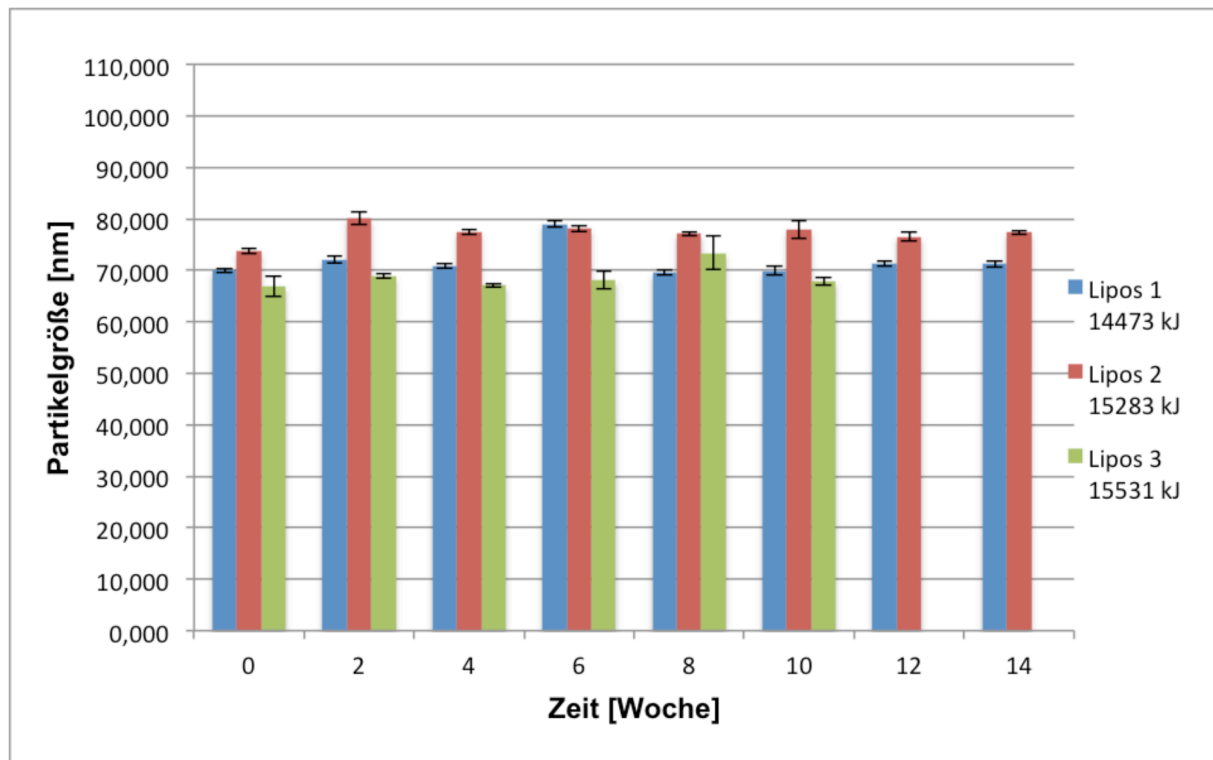


Abb. 4.4: Partikelgröße der 2%igen DPPC Liposomen mit 0,5% Fluconazol, n=3

Die Partikelgröße der Liposomencharge 1 blieb über den Beobachtungszeitraum von 14 Wochen konstant bei 70 nm. Nur in Woche 6 war ein Anstieg der Partikelgröße auf 79 nm zu sehen. Ein ähnlicher Anstieg der Messwerte war bei der Liposomencharge 2 schon nach zwei Wochen zu beobachten. Ab Woche 4 blieben die Messwerte konstant.

Die Liposomencharge 3 stand nur über einen Beobachtungszeitraum von zehn Wochen zur Verfügung, da für die Messungen in Woche 12 und 14 nicht genügend Probe vorhanden war. Die Liposomecharge 3 blieb in ihrer Partikelgröße ebenfalls stabil. Für die Erstellung der Abbildung 4.4 wurden die Mittelwerte der Rohdaten verwendet. Die Messungen sind in den Tabellen 7.5 und 7.6 aufgelistet.

Ein Vergleich der PDI-Werte der 2%igen DPPC Liposomenchargen ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

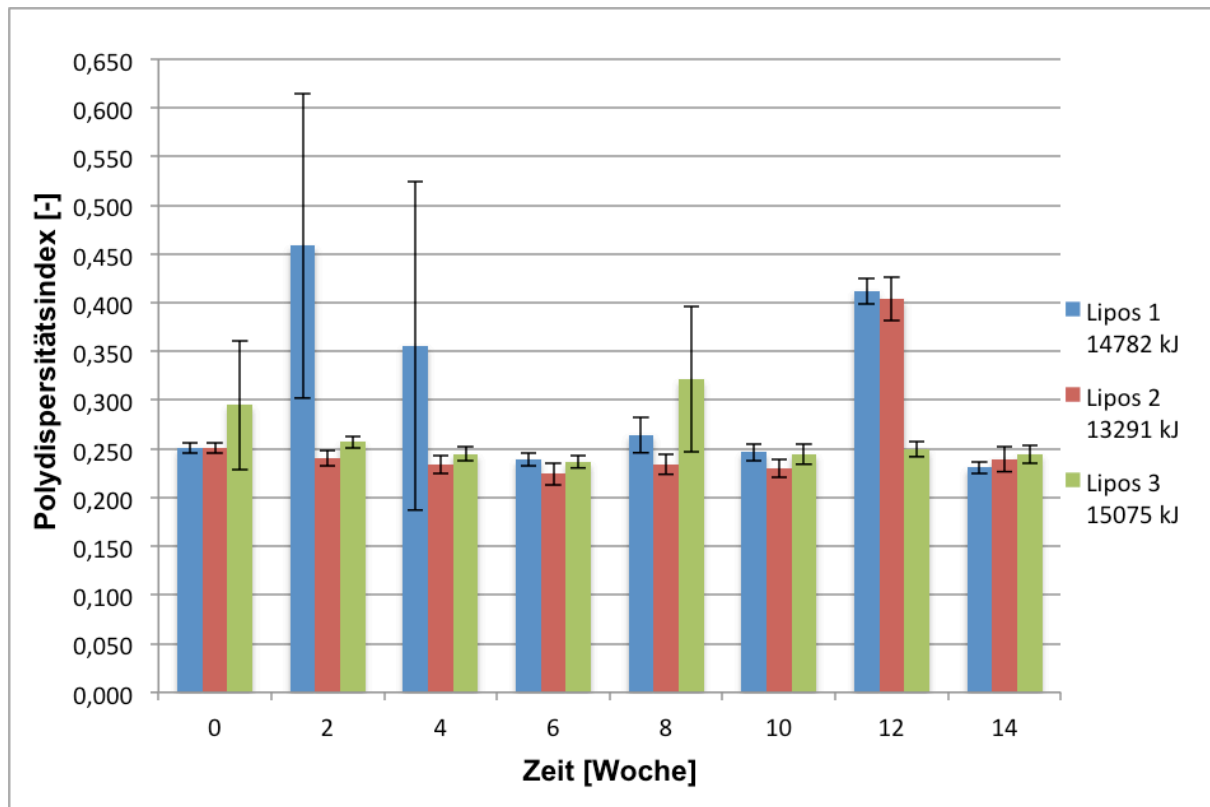


Abb. 4.5: Polydispersitätsindex der 2%igen DPPC Liposomen ohne Wirkstoff, n=3

Wie in Abbildung 4.5 ersichtlich, zeigte sich, dass die Größenverteilung der Liposomencharge 1 über den Beobachtungszeitraum die größten Unterschiede aufwies. Demgegenüber zeigten die übrigen Liposomenchargen einen gleichmäßigen Polydispersitätsindex mit Ausnahme der Liposomencharge 2 in der 12. Woche. Hier war eine deutliche Zunahme des PDI zu erkennen. Die Mittelwerte der Messungen wurden zur Erstellung der Grafik 4.5 verwendet. Die Rohdaten sind in der Tabelle 7.7 und 7.8 zu finden.

In der nächsten Abbildung sind die PDI-Werte der fluconazolhaltigen Liposomenchargen 1,2 und 3 dargestellt.

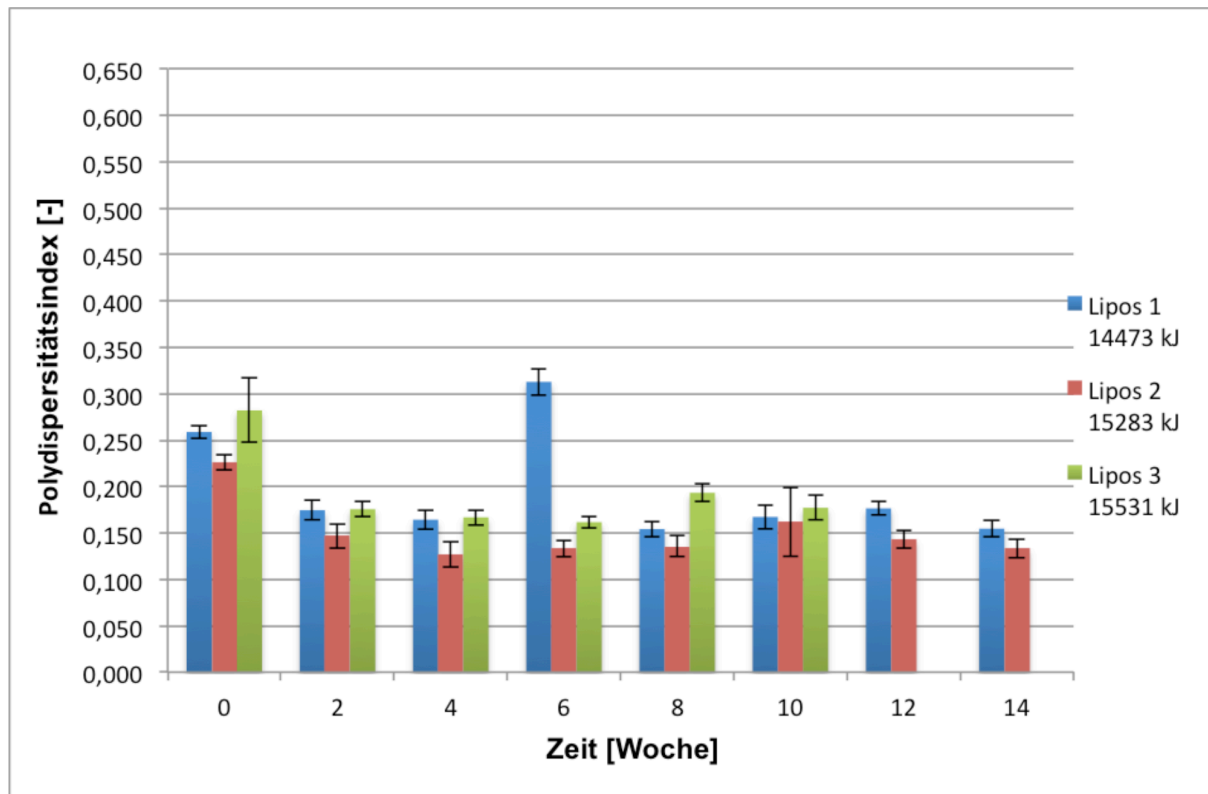


Abb. 4.6: Polydispersitätsindex der 2%igen DPPC Liposomen mit 0,5% Fluconazol, n=3

Wie in Abbildung 4.6 ersichtlich, wurde die wesentlich bessere Größenverteilung der wirkstoffhaltigen Liposomenchargen bestätigt. Hier war eine deutliche Abnahme der Teilchengrößenverteilung sogar auf Werte unter 0,2 zu beobachten.

Die Mittelwerte der Messungen wurden zur Erstellung der Grafik 4.6 verwendet. Die Rohdaten sind in der Tabelle 7.7 und 7.8 zu finden.

4.2 Franz Zell Versuche

Die Franz Zell Versuche wurden mit F-DPPC und DPPC Liposomen über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Fluconazol und Na-Fluorescein dienten als Modellwirkstoffe.

4.2.1 Vorversuche mit fluconazolhaltigen F-DPPC und DPPC Liposomen

Die Eigenschaft von F-DPPC als Arzneistoffträger wurde im Vergleich zu DPPC untersucht.

Die Permeation von Fluconazol durch die Schweinehaut zeigte bei F-DPPC und DPPC Liposomen einen ähnlichen Verlauf. Nach 24 Stunden konnte die höchste Permeation von Fluconazol durch die Schweinehaut gemessen werden. Die Freisetzung von Fluconazol bei den F-DPPC Liposomen betrug 83%, bei DPPC 94%. Zu

diesem Zeitpunkt bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Formulierungen.

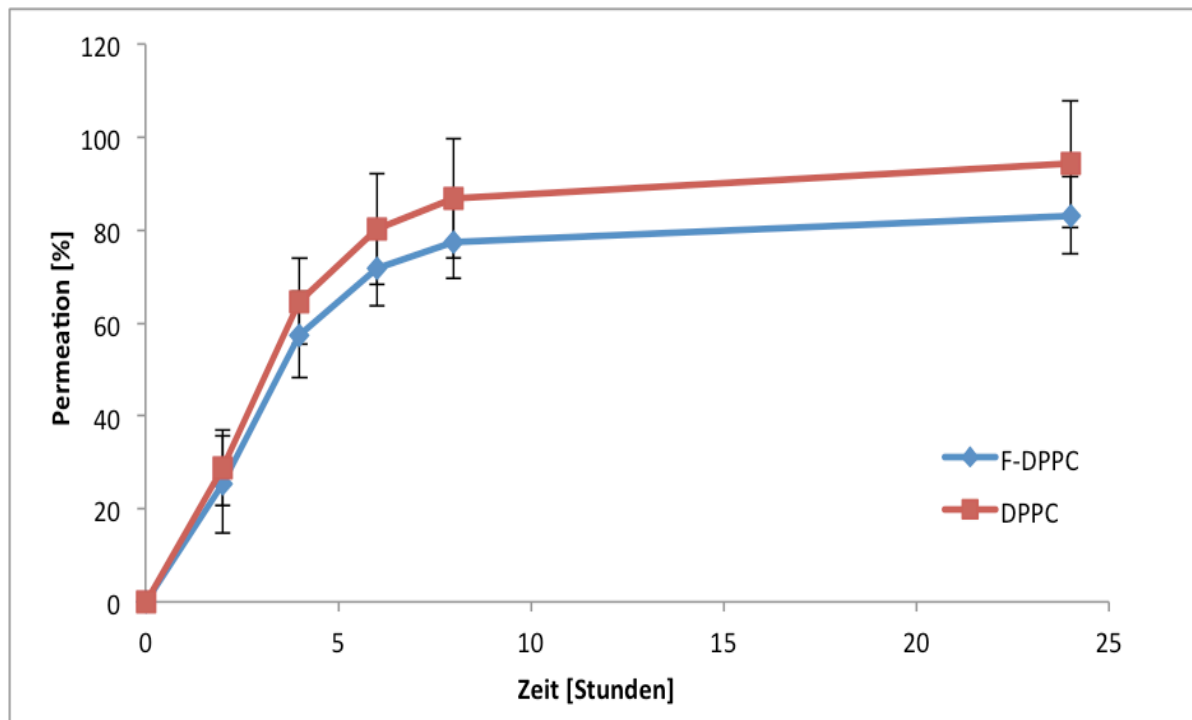


Abb. 4.7: Vergleich der Permeation von Fluconazol durch die Haut aus F-DPPC und DPPC Liposomen

Die Grafik 4.7 ist aus den Messwerten erstellt worden. Die Rohdaten sind im Kapitel 7.2 aufgelistet.

4.2.2 Vergleich von Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC Liposomen mit Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen und 0,1% Na-Fluorescein Lösung

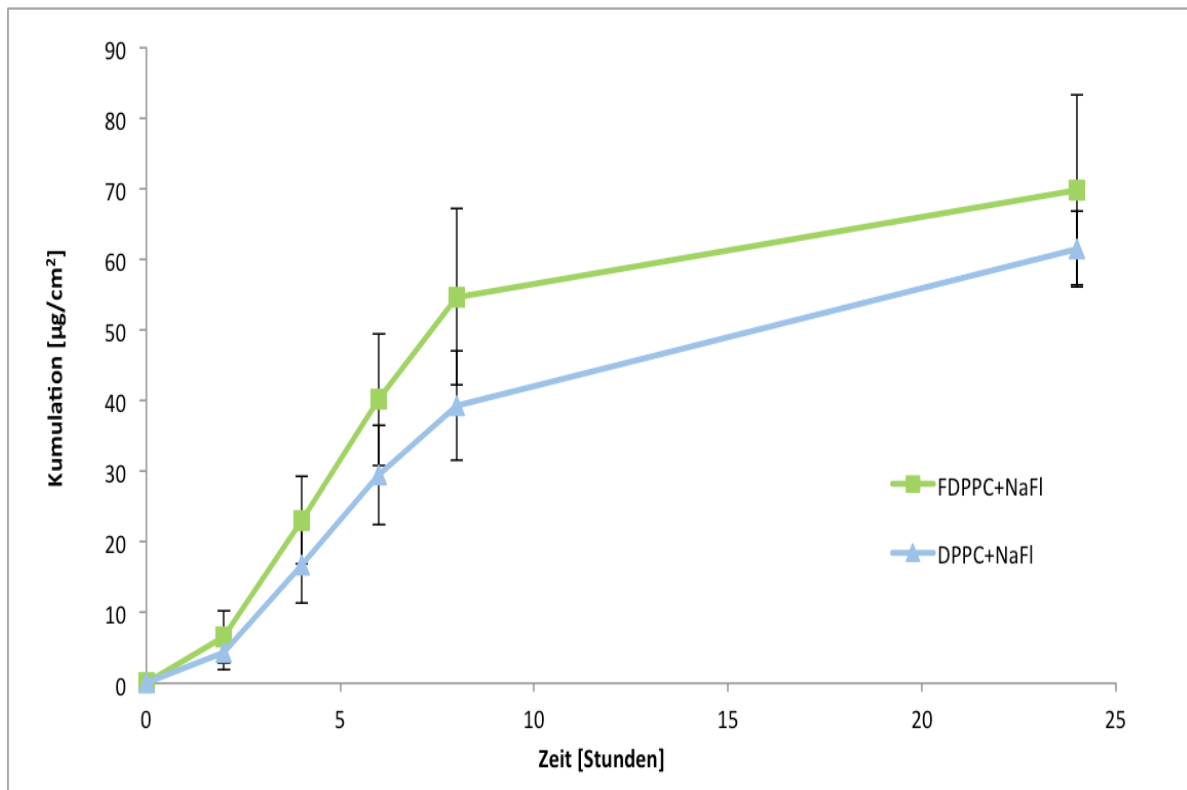


Abb. 4.8: Vergleich der Hautpermeation von Na-Fluorescein aus F-DPPC und DPPC Liposomen

Die Permeation von Na-Fluorescein aus F-DPPC und DPPC Liposomen zeigte keinen signifikanten Unterschied nach 24 Stunden. Die Auswertung wurde mit dem t-Test und der Welch correction durchgeführt.

Die Kumulation für Na-Fluorescein bei F-DPPC betrug nach 24 Stunden $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, bei DPPC $61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die Messwerte sind im Kapitel 7.2 aufgelistet.

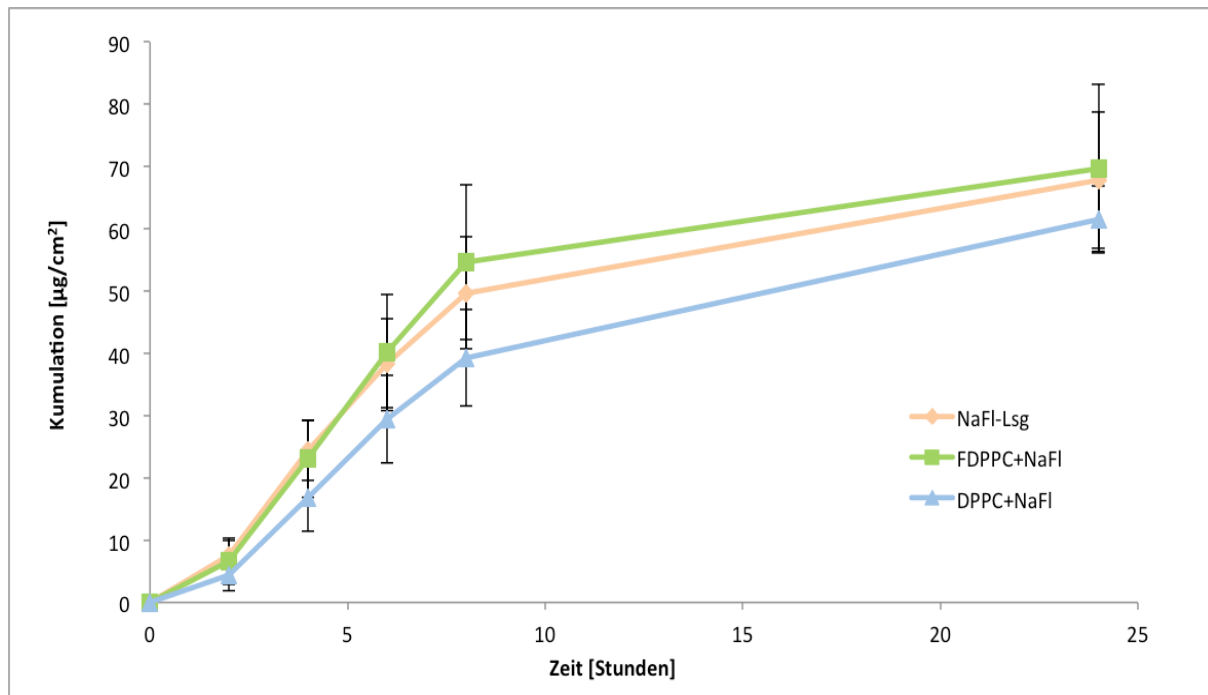


Abb. 4.9: Vergleich der Hautpermeation von Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC Liposomen mit Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen und einer NaFI-Lösung

Ein Vergleich der Hautpermeation von NaFI aus der NaFI-Lösung, DPPC und F-DPPC Liposomen zeigte nach 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied. Die Auswertung der Daten erfolgte hier mittels t-Test und Welch correction.

Die Kumulation von Na-Fluorescein betrug bei der NaFI-Lösung $68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Die Messwerte zu den Abbildungen 4.8 und 4.9 sind im Kapitel 7.2 aufgelistet.

4.3 Tape Stripping

4.3.1 Vorversuch mit einer fluconazolhaltigen Mikroemulsion

Neben der Hautpermeation wurde die Penetration von Fluconazol mittels Tape Stripping Versuchen überprüft. Hierbei wurde eine Mikroemulsion mit einer Zusammensetzung aus 20% Aqua destillata, 20% Isopropylmyristat und 60% eines Gemisches gewählt, das zu 50% aus Saccharoselaurat L-1695 und zu 50% aus Isopropanol bestand.

Pro Ohr wurden zwei repräsentative Stellen für das Tape Stripping gewählt. Zur Entfernung des Stratum corneum wurden pro Stelle an die 60 Strips abgezogen. In der folgenden Abbildung 4.10 lässt sich erkennen, dass Fluconazol zu 100% in das Stratum corneum penetrierte. Daher konnte keine weitere Wirkstoffpenetration von Fluconazol über das Stratum corneum hinaus untersucht werden.

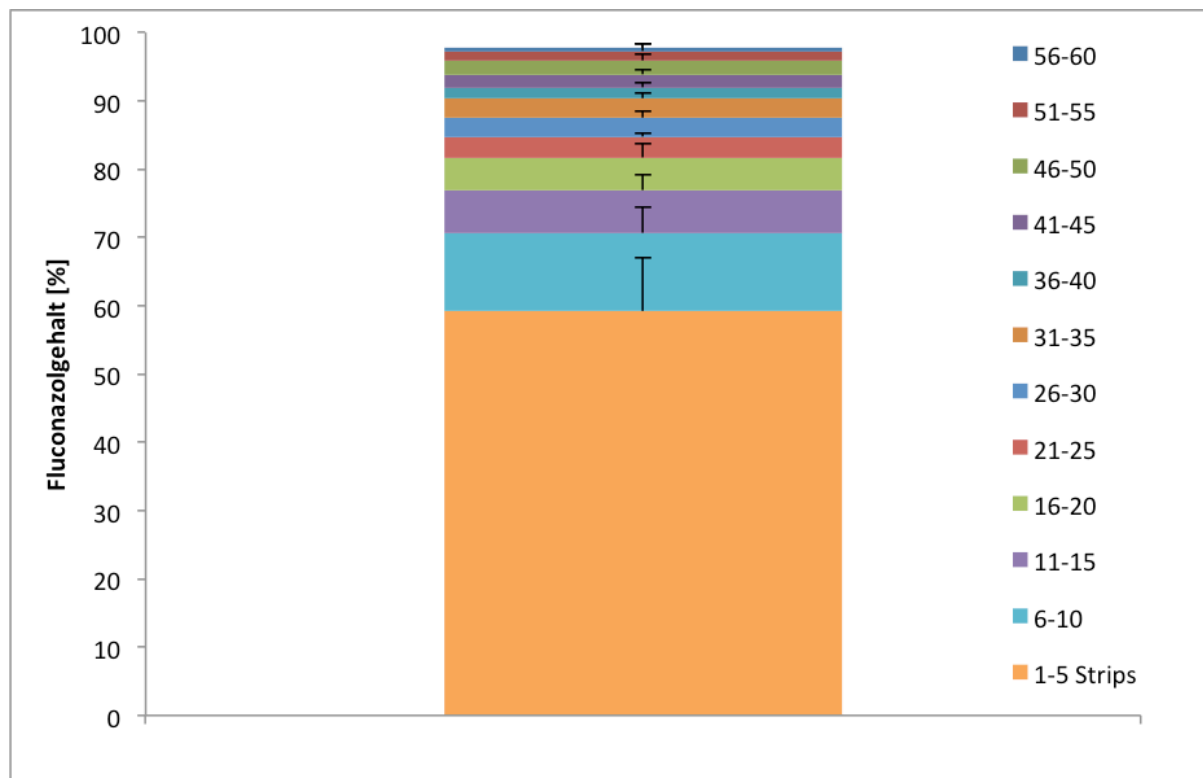


Abb. 4.10: Hautpenetration von Fluconazol, Mikroemulsion

Die Rohdaten zur Erstellung der Grafik 4.10 sind im Kapitel 7.3 aufgelistet.

4.3.2 Vergleich von Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC Liposomen mit Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen und NaFI-Lösung

Bei den F-DPPC Liposomen wurde Na-Fluorescein mit deuteriertem Methanol aus den Strips für die Analyse mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie gelöst. Bei den DPPC Liposomen wurde Phosphatpuffer als Lösungsmittel verwendet.

Wie in Abbildung 4.12 und 4.13 ersichtlich ist, bestand hinsichtlich der Penetration von den Na-Fluoresceinhaltigen F-DPPC Liposomen in Methanol und der DPPC Liposomen in Phosphatpuffer ein Unterschied.

Um einen Unterschied der beiden Lösungsmittel mit Sicherheit ausschließen zu können, wurden weitere Tape Stripping Versuche mit Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen in Methanol durchgeführt.

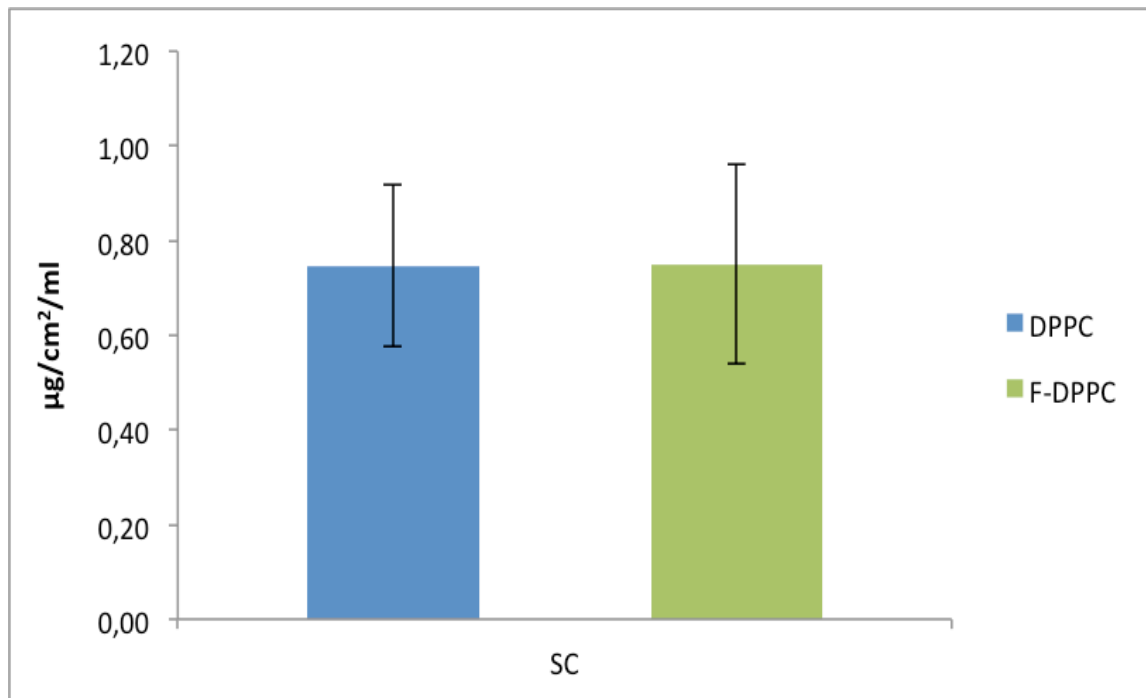


Abb. 4.11: Hautpenetration von Na-Fluorescein in Methanol, F-DPPC Liposomen und DPPC Liposomen

Abbildung 4.11 zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Hautpenetration von Na-Fluorescein in Methanol aus DPPC und F-DPPC Liposomen. Es zeigte sich, dass etwa eine gleich große Menge an Na-Fluorescein aus beiden Formulierungen in das Stratum corneum penetrierte. Die dazugehörigen Messwerte zur Abbildung sind im Kapitel 7.3 aufgelistet.

Zwischen den F-DPPC Liposomen und der NaFI-Lösung bestand ein signifikanter Unterschied in der Penetration von Na-Fluorescein in das Stratum corneum. In Abbildung 4.13 ist zu erkennen, dass bei den F-DPPC Liposomen mehr Na-Fluorescein in das Stratum corneum übergetreten war als bei der NaFI-Lösung. Hier stimmen die Ergebnisse der Penetration mit den Permeationseigenschaften von Na-Fluorescein der F-DPPC Liposomen und der NaFI-Lösung nicht überein. Bei den Franz Zell Versuchen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Formulierungen beobachtet.

Hinsichtlich der Penetration aus den Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC und DPPC Liposomen zeigte sich derselbe Trend wie in der Permeation. Hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zubereitungen gemessen worden.

4.4 Präparation horizontaler Hautschnitte und Wirkstoffextraktion

4.4.1 Vergleich von Na-fluoresceinhaltigen F-DPPC Liposomen mit Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen mit NaFI-Lösung

Nach jeder Messung wurden die Klebestreifen der Na-fluoresceinhaltigen DPPC Liposomen einzeln oder gebündelt zu je 5 Strips in ein Eppendorf Gefäß übergeführt. Dadurch konnten mögliche Unterschiede in der Analytik festgestellt werden. In Abbildung 4.12 erkennt man, dass kein signifikanter Unterschied zwischen gebündelten und nicht gebündelten Strips bestand. Daraus kann man schließen, dass die Extraktion von Na-Fluorescein bei den gebündelten Klebestreifen nicht beeinflusst und das Ergebnis nicht verfälscht wurde.

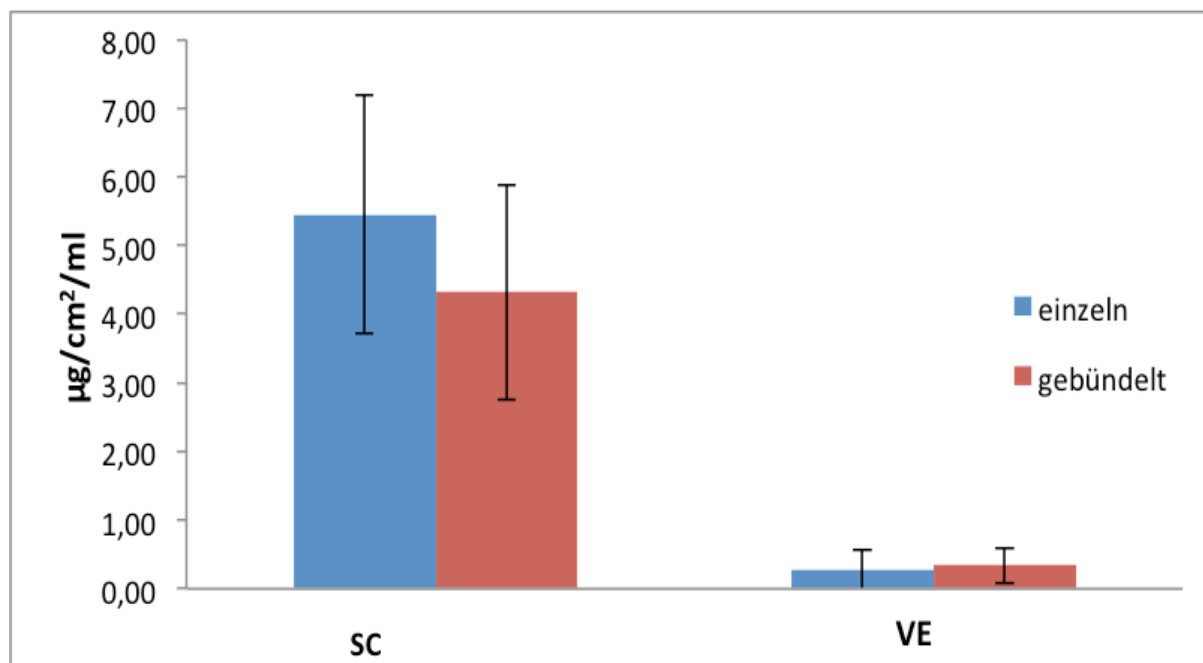


Abb. 4.12: Penetration von Na-Fluorescein, gebündelte und nicht gebündelte Strips von DPPC Liposomen

Für die Auswertung der Grafik 4.12 wurden die Mittelwerte der Messungen herangezogen. Die Rohdaten sind im Kapitel 7.4 zu finden.

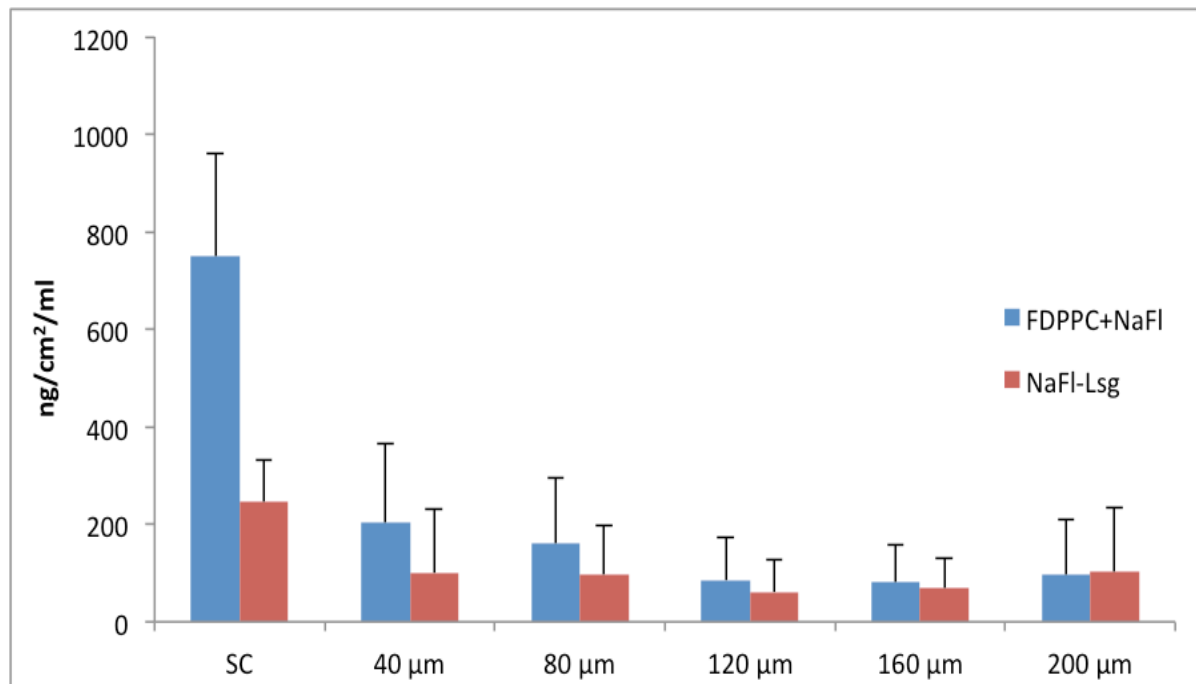


Abb. 4.13: Penetration von Na-Fluorescein, F-DPPC Liposomen und NaFI-Lösung

Zwischen den F-DPPC Liposomen und der NaFI-Lösung bestand ein signifikanter Unterschied in der Penetration von Na-Fluorescein über das Stratum corneum in die lebende Epidermis. Wie in Abbildung 4.13 ersichtlich, penetrierte eine deutlich höhere Menge an Na-Fluorescein durch die Haut.

Die dazugehörigen Messwerte der Grafik 4.13 können im Kapitel 7.4 nachgeschlagen werden.

4.5 Färbung der Hautschnitte

Von jeder markierten Hautstelle wurden nach dem Tape Stripping Flächenschnitte und Querschnitte vor und nach dem Schneiden im Kryo-Mikrotom angefertigt.

Bei den Flächenschnitten sind die Hautstücke mit dem Kryo-Mikrotom in 40 µm dicke Scheiben geschnitten worden. Fünf Schnitte zu je 40 µm wurden durchgeführt, sodass die Dicke der lebenden Epidermis erreicht wurde. Bei den Querschnitten sind 5 µm dicke Scheiben angefertigt worden.

Die Schnitte wurden nach der Hämatoxylin/Eosin Färbung unter dem Mikroskop betrachtet.

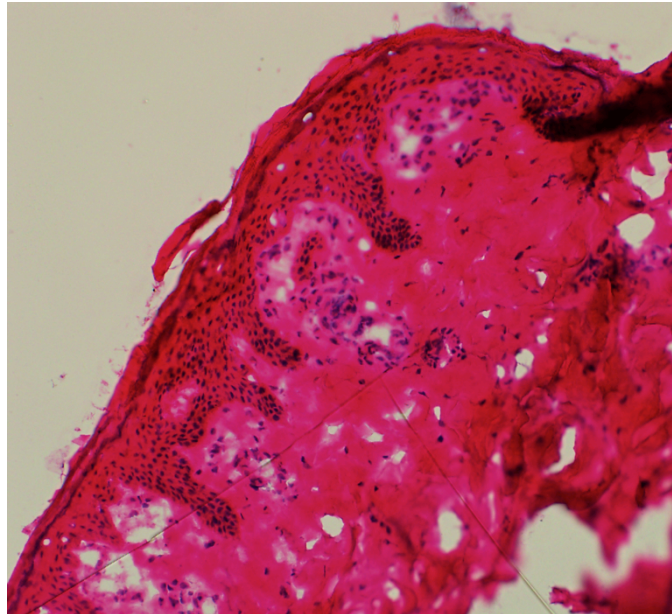


Abb. 4.14: Hautstück vor dem Tape Stripping, 20 fache Vergrößerung

In Abbildung 4.14 ist ein Stück eines Schweineohrs vor dem Tape Stripping Versuch zu sehen. Die in Kapitel 2.1.1 beschriebene Unterteilung der Haut in die Epidermis und die Dermis war ersichtlich. Das Stratum corneum war an den toten Korneozyten zu erkennen. Die Hornzellen besaßen keinen Zellkern mehr und waren durch die in Kapitel 3.7 beschriebene Hämatoxylin/Eosin Färbung nicht mehr blau gefärbt.

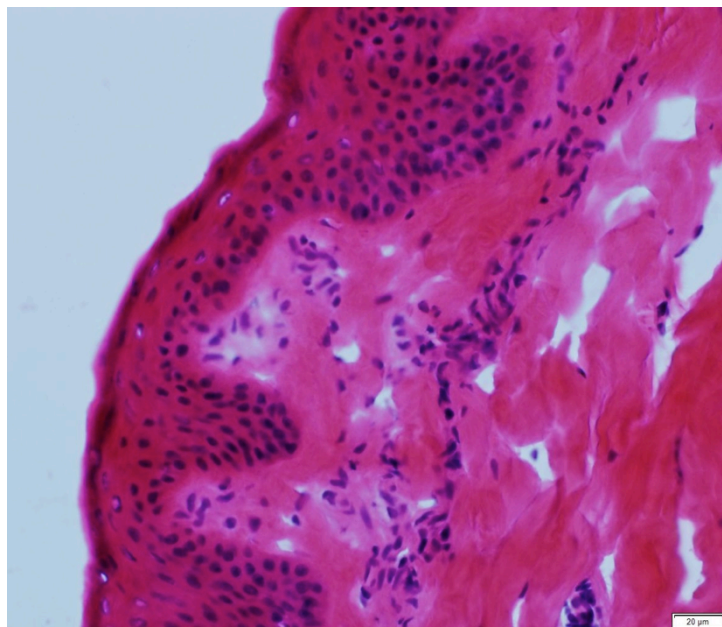


Abb. 4.15: Hautstück nach dem Tape Stripping, 40 fache Vergrößerung

In Abbildung 4.15 ist zu sehen, dass nach dem Tape Stripping das Stratum corneum abgezogen wurde.

Die dünne Schicht über dem Stratum granulosum könnte auf das Stratum lucidum hinweisen [55]. Das Stratum lucidum wird auch Glanzschicht genannt. Sie kommt nur an Körperstellen mit einer Leistenhaut wie z.B. an Händen und Füßen vor [56]. Es ist wie das Stratum corneum kernlos. Die Vorstufen des Keratins, die sogenannten Keratohyaline, werden zu Eleidin abgebaut. Eleidin ist ein azidophiles Lipoprotein und schützt die Epidermis vor wässriger Lösung [57]. Im Stratum lucidum schreitet der Vorgang der Keratinisierung fort und es kommt zu einer weiteren Abflachung der Zellen [56].

Die wellenförmigen Ausstülpungen mit den blau gefärbten Keratinozyten in Abbildung 4.15 zeigen die in Kapitel 2.1.1 beschriebene Basalschicht. Dadurch war eine klare Abgrenzung zwischen Epidermis und Dermis zu beobachten.

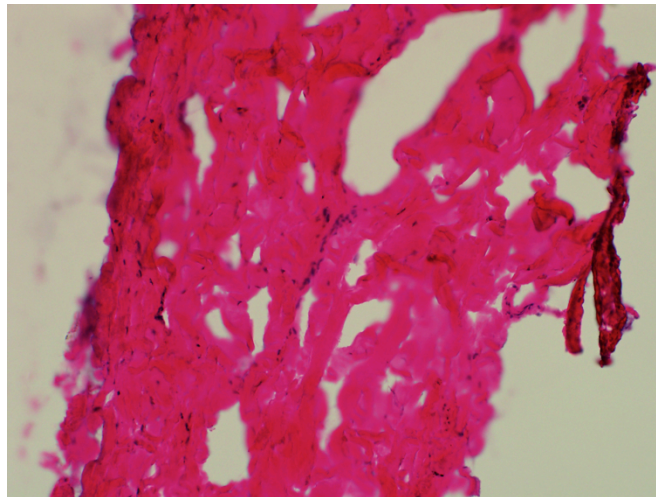


Abb. 4.16: Hautstück nach dem Schneiden im Mikrotom, 20 fache Vergrößerung

Nach dem Schneiden im Mikrotom war keine Epidermis mehr erkennbar. In Abbildung 4.16 sind keine blau gefärbten Keratinozyten mehr zu beobachten und auch die wellenförmigen Ausstülpungen der Basalschicht sind nicht mehr zu sehen.

5 DISKUSSION

Liposomen zur topischen Applikation spielen eine große Rolle in der Dermatopharmazie [1]. Sie sind wichtige Rohstoffe für die Regeneration der Haut. Liposomen spenden Feuchtigkeit und füllen die Haut mit Lipidmolekülen auf [5]. Schon diese Eigenschaften führen bei atopischen Personen zu einer Verbesserung des Hautzustandes. Daneben sind Wirkstoffklassen wie Retinoide, Glukokortikoide und Lokalnästhetika von großer Bedeutung [1][5]. In dieser Diplomarbeit wurden das Antimykotikum Fluconazol und Na-Fluorescein als Modellwirkstoffe verwendet.

Die längerfristige Stabilität der Liposomen gilt als schlecht [4]. Die Stabilität ist ein wichtiger Parameter für den Prozess der Lagerung und der Lieferung. Eine stabile Arzneiform behält ihre physikalische Unversehrtheit und beeinflusst die chemische Stabilität der gebundenen Wirkstoffe nicht nachteilig. Die erfolgreiche Einführung von Dosierungsformen hängt von einer gut organisierten Stabilitätsstudie ab. Es müssen physikalische, chemische und mikrobielle Parameter berücksichtigt und bewertet werden [5].

Im Laufe dieser Diplomarbeit wurde die physikalische Stabilität von Liposomen überprüft. Mit dem Zetasizer Nano ZS wurden die Partikelgröße und der Polydispersitätsindex (PDI) über einen Beobachtungszeitraum von 14 Wochen vermessen.

Drei Zubereitungen aus 2%igen DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff wurden hergestellt. Diese wurden als Liposomenchargen 1, 2 und 3 bezeichnet.

Die Partikelgröße der Liposomen blieb über den Beobachtungszeitraum von 14 Wochen annähernd konstant. Die Liposomen mit Wirkstoff hatten zu Beginn der Stabilitätsprüfung eine Größe von 70 nm. Dieser stieg über die Wochen, bei einer Vergrößerung von 5,8%, auf 75 nm.

Die Größe der Partikel betrug bei den Liposomen ohne Wirkstoff zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung und bei der letzten Messung 75 nm. Die größte Standardabweichung mit einem Wert von 14% war in Woche 2 zu sehen. Betrachtet man die drei Chargen der 2%igen DPPC Liposomen ohne Wirkstoff in Abbildung 4.3, dann lässt sich die hohe Standardabweichung auf die Liposomencharge 1 in der zweiten Woche verfolgen.

Bei der Liposomencharge 1 war in der zweiten Woche eine Standardabweichung von 23% zu sehen. Dabei befanden sich jedoch alle Messungen innerhalb der doppelten

Standardabweichung. Die Liposomenchargen 2 und 3 hatten kurz nach der Herstellung eine Partikelgröße von 80 nm. Über den Beobachtungszeitraum der Stabilitätsprüfung kam es zu geringen Schwankungen. Nach 14 Wochen war wieder eine Partikelgröße von 80 nm gemessen worden. Die Liposomencharge 1 waren um rund 20% kleiner als die Liposomenchargen 2 und 3 und zeigten eine Größe von 65 nm. Mögliche Ursachen könnten in der Herstellung und in der Behandlung mit der Sonotrode liegen. Hierbei hätte es zu einer starken Verkleinerung der Liposomen kommen können.

Der Polydispersitätsindex gibt die Qualität disperser Systeme an. Werte unter 0,2 bestätigen eine enge Größenverteilung. Derartig niedrige Werte werden in der Literatur kaum berichtet. Bei Liposomen hat die Erfahrung gezeigt, dass schon Werte unter 0,3 eine hervorragende Monodispersität widerspiegeln [4].

Wie schon in vorangegangenen Arbeiten kam es bei Liposomen mit Fluconazol in Woche 2 zu einer deutlichen Abnahme des Polydispersitätsindex von 35% auf einen Wert von 0,166. Danach blieb der PDI bis zur 14. Woche annähernd konstant und stabil [4].

Der Polydispersitätsindex war bei den Liposomen ohne Wirkstoff großen Schwankungen ausgesetzt. Die größten Standardabweichungen waren in Woche 2, 4 und 12 zu beobachten. Betrachtet man die einzelnen Chargen untereinander, kann man die hohe Standardabweichung in der zweiten und vierten Woche auf die Liposomencharge 1 zurückführen. In Woche 2 war eine Standardabweichung von 34% und in Woche 4 ein Wert von 48% zu beobachten. Alle Messungen lagen innerhalb der doppelten Standardabweichung.

Die Zunahme des Polydispersitätsindex bei den 2%igen DPPC Liposomen könnte auf eine Aggregation der Partikel zurückzuführen sein.

Liposomen neigen dazu zu verschmelzen und größere Vesikel zu bilden. Dadurch zeigen sie einen thermodynamisch günstigeren Zustand. Die Aggregation und das Brechen der Liposomen während der Lagerung stellt jedoch ein kritisches Problem dar, da es zu einer niedrigeren Wirkstoffverkapselung führen kann [5].

In einer vorangegangenen Diplomarbeit der Arbeitsgruppe wurde die Stabilität von 7,5%igen DPPC Liposomen über 10 Wochen untersucht. Die Partikelgröße und der Polydispersitätsindex blieben annähernd konstant und stabil. Bei beiden Parametern war ein leichter Anstieg der Messwerte über die Wochen zu sehen. Jedoch waren

diese Unterschiede statistisch nicht signifikant. Die Partikelgröße der Liposomen betrug über den Beobachtungszeitraum der Messungen zwischen 75-80 nm. Beim PDI waren zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung Werte unter 0,3 zu beobachten [31].

Bei der vorliegenden Versuchsreihe blieben die Liposomen mit und ohne Wirkstoff über den Beobachtungszeitraum von 14 Wochen in ihrer Partikelgröße stabil. Die 2%igen DPPC Liposomen ohne Wirkstoff zeigten im Rahmen der Stabilitätsuntersuchung eine Partikelgröße von 75-82 nm. Diese Werte glichen denen der 7,5%igen DPPC Liposomen. Der PDI der 2%igen DPPC Liposomen blieb über die Wochen nicht konstant und nicht stabil. Große Standardabweichungen waren zu beobachten.

Die Liposomen mit Fluconazol waren in ihrer Partikelgröße stabil und zeigten sogar beim Polydispersitätsindex Messungen von unter 0,2. Jedoch wurden vier Wochen nach der Herstellung Kristalle in den Schraubeprouvetten beobachtet. Möglicherweise waren diese Kristalle auf ein Ausfallen von Fluconazol zurückzuführen. Folglich war die Stabilität der Arzneiform nicht mehr gewährleistet und die Stabilitätsprüfung wurde nicht erfüllt. Das Auskristallisieren des Wirkstoffes bewirkte keine Zunahme der Partikelgröße und des Polydispersionsindexes.

Eine mögliche Kristallisation von Fluconazol hätte durch eine dichtere Membran verhindert oder zumindest verlangsamt werden können. Die Dichte kann durch den Zusatz von Cholesterin zu natürlichen Phospholipiden oder durch hydrierte Phospholipide erhöht werden, da diese zu weniger oxidativen Reaktionen neigen [2].

Das Stratum corneum stellt aufgrund seines geringen Wassergehaltes von nur 5% bis 15% und seiner Lipophilie eine Barriere für hydrophile Arzneistoffe dar. Unter Okklusion kommt es zu einer Erhöhung des Wassergehaltes auf bis zu 50%. Dadurch erfolgt eine bessere Aufnahme hydrophiler Substanzen in das Stratum corneum. Mikroemulsionen besitzen für schlecht lösliche Wirkstoffe ein hohes Solubilitätsvermögen. Für hydrophile Substanzen gelten Mikroemulsionen zur Überwindung der Hautbarriere als geeignete Vehikel. Der hohe Tensidanteil führt zu einer besseren Permeation und Penetration von Arzneistoffen. Bei der Auswahl der Tenside ist auf die physiologische Verträglichkeit zu achten [1].

Liposomen sind ideale Arzneistoffträger aufgrund ihrer Fähigkeit die Bioverfügbarkeit eingebauter Arzneistoffe zu verändern [4]. Hydrophile Wirkstoffe können in den wässrigen Innenraum eingebaut werden. Bei multilamellaren Liposomen kann auch

eine Einlagerung in die wässrige Zwischenschichten erfolgen. Lipophile Substanzen werden in die Lipidschichten der Liposomen eingebaut [58].

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde F-DPPC als Arzneistoffträger mit Hilfe von in vitro Hautstudien untersucht. Die Penetrations- und Permeationsfähigkeit von Fluconazol und Na-Fluorescein wurde mittels Franz Zellen und Tape-Stripping Versuchen beobachtet. F-DPPC Liposomen wurden mit einer Mikroemulsion, einer NaFI-Lösung und DPPC Liposomen verglichen.

Die Permeation von Fluconazol zeigte bei der Messung nach 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied zwischen den F-DPPC und DPPC Liposomen. In Abbildung 4.7 ist nach 24 Stunden die höchste Permeation von Fluconazol durch die Schweinehaut zu sehen. Bei den F-DPPC Liposomen konnte eine Wirkstoffkonzentration von 83%, bei den DPPC Liposomen eine Permeation von 94% beobachtet werden. Die Mittelwerte ergaben sich aus den Messungen der Franz Zell Versuche. Die Rohdaten sind im Kapitel 7.2 aufgelistet.

Bei der Permeation von Na-Fluorescein konnte zwischen den DPPC und F-DPPC Liposomen nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Hier wurde ebenfalls zu diesem Zeitpunkt die höchste Wirkstoffpermeation beobachtet.

Die NaFI-Lösung zeigte im Vergleich zu den anderen Formulierungen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Die hohe Permeation und Penetration von hydrophilen Stoffen im Vergleich zu lipophilen Wirkstoffen wurde bereits in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe beschrieben [33][41].

Bei den Franz Zell Versuchen wurde der obere Glasring mit einem Parafilm und einer Alufolie verschlossen. Über den Zeitraum von 24 Stunden hätte durch den entstehenden Okklusionseffekt die Barriere des Stratum corneum für hydrophile Stoffe besser überwunden werden können [1]. Der mögliche Okklusionseffekt ist auch durch die aufgeweichte und aufgequollene porcine Haut nach 24 Stunden zu beobachten. Die niedrige Viskosität und der hohe Wassergehalt der Liposomen führten zusätzlich zu einer hohen Permeation von Na-Fluorescein.

Bei den Tape Stripping Versuchen wurde das gesamte Stratum corneum mit Hilfe der Klebestreifen abgezogen. In Abbildung 4.10 sieht man, dass die Penetration von Fluconazol in das Stratum corneum 100% betrug.

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe wurden der hohe Anteil der Tenside und des Ko-Solubilisators Isopropylalkohol in den Mikroemulsionen als gute Penetrationsförderer beschrieben [33].

Durch die vollständige Wirkstoffpenetration der Mikroemulsion in das Stratum corneum konnte keine weitere Penetration von Fluconazol in die Epidermis beobachtet werden. Interessant wäre es gewesen, die Penetration von Fluconazol aus den Liposomen mittels Tape Stripping Versuchen zu überprüfen. Dadurch hätte auch ein Vergleich mit den Ergebnissen der Franz Zellen erfolgen können.

Nach der Wirkstoffpermeation ist die Aufnahme von Na-Fluorescein in das Stratum corneum untersucht worden. In Abbildung 4.12 ist bei den DPPC Liposomen zunächst eine Penetration des Na-Fluorescein von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$ zu beobachten. Bei den F-DPPC Liposomen hingegen ist in Abbildung 4.13 eine Aufnahme des Na-Fluorescein mit Werten von lediglich $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$ zu sehen.

Nach dem Tape Stripping wurde Na-Fluorescein bei den F-DPPC Liposomen mit deuteriertem Methanol aus den Klebestreifen gelöst. Bei den DPPC Liposomen wurde Phosphatpuffer eingesetzt. Um Unterschiede zwischen beiden Lösungsmitteln auszuschließen, wurden Tape Stripping Versuche mit DPPC Liposomen in Methanol durchgeführt.

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Penetration von Na-Fluorescein in Methanol zwischen den DPPC und F-DPPC Liposomen. Jedoch ist in Abbildung 4.11 eine geringe Wirkstoffpenetration von $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$ zu beobachten. Im Vergleich dazu wurden bei den Tape Stripping Versuchen von DPPC Liposomen in Phosphatpuffer eine Penetration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$ gemessen.

Der Farbstoff Fluorescein wird meistens als Natrium-Salz eingesetzt. Diese Struktur ist leicht in Wasser löslich und weniger gut in Alkohol [28]. Die Löslichkeit des Natrium-Salzes beträgt in Wasser $1 \text{ mg}/\text{ml}$ [59].

Die geringe Penetration von Na-Fluorescein in den Abbildungen 4.11 und 4.13 ist auf die schlechte Löslichkeit in Methanol zurückzuführen. Zwischen den DPPC und F-DPPC Liposomen war kein signifikanter Unterschied in der Penetration von Na-Fluorescein in Methanol zu beobachten.

Die Wirkstoffpenetration von Na-Fluorescein in Phosphatpuffer war bei den DPPC Liposomen um den Faktor sieben größer als in den Tape Stripping Versuchen in Methanol.

In Abbildung 4.12 ist zu erkennen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den gebündelten und nicht gebündelten Strips bestand. Für weitere Studien stellt diese Beobachtung eine Erleichterung der Arbeitsschritte dar. Bei den Versuchen wurden pro Eppendorf Gefäß fünf Tape Strips gebündelt. In den Tape Stripping Versuchen wurden zur Entfernung des Stratum corneum an die 60 Klebestreifen pro Stelle verwendet. Für die nicht gebündelten Strips wurden daher ebenso viele Eppendorf Gefäße benötigt. Für die nachfolgende Extraktion im Ultraschallbad und Zentrifugation musste ein großer Zeitfaktor eingeplant werden. Für die Überprüfung der Fluoreszenz mit dem Fluorimeter kamen bei den gebündelten Strips deutlich weniger Mikrotiterplatten zum Einsatz.

Ein weiteres Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Wirkstoffpenetration über das Stratum corneum hinaus zu beobachten. Nach dem Tape Stripping wurden die Hautstücke in je zehn Stücke gestanzt. Die Kreisflächen wurden im Kryo-Mikrotom in fünf Stücke zu je 40 μm geschnitten und im Mikroskop betrachtet. In Abbildung 4.13 ist zu beobachten, dass bei den F-DPPC Liposomen mehr Na-Fluorescein in das Stratum corneum und in die lebende Epidermis penetrierte als bei der NaFI-Lösung. Ein signifikanter Unterschied war zu sehen. Bei 200 μm erfolgte ein leichter Anstieg der Wirkstoffkonzentration.

Die Hautstücke wurden für die Lagerung im Gefrierschrank mit Stecknadeln auf Styroporplatten gespannt. Trotzdem waren beim Schneiden im Kryo-Mikrotom zu Beginn große Unebenheiten zu sehen. Die Angriffsfläche für das Scheidemesser war zu gering um die gesamte Hautfläche abtragen zu können. Deshalb wurde bei den ersten 80 μm Schnitten jedes Hautstück um 90° gedreht und geschnitten, um mögliche Unebenheiten ausgleichen zu können. Ab 120 μm wurde jede gestanzte Fläche im 180° Winkel geschnitten. Erst bei 200 μm konnte annähernd die gesamte Fläche abgetragen werden, wodurch der leichte Anstieg in der Na-Fluorescein Konzentration erklärbar ist. Interessant wäre es, weitere Möglichkeiten für die bessere Lagerung der Hautstücke zu finden, um mögliche Unebenheiten der Fläche zu verhindern. Es wäre wichtig, von Beginn an die gesamte Hautfläche im Kryo-Mikrotom abzutragen,

um dadurch mögliche Fehler der Wirkstoffkonzentrationen in den verschiedenen Schichten der Epidermis zu vermeiden.

Nach den Tape Stripping Versuchen und dem Schneiden im Kryo-Mikrotom wurden von den Hautstücken Querschnitte angefertigt. Nach einer Hämatoxylin/Eosin Färbung konnte unter dem Mikroskop festgestellt werden, dass das gesamte Stratum corneum mit Hilfe der Klebestreifen abgezogen wurde. In Abbildung 4.15 könnte die dünne Schicht über den Stratum granulosum auf das Stratum lucidum hinweisen.

Das Stratum lucidum wird nur bei sehr dicken Hautstücken beobachtet. Es ist unklar, ob diese Schicht ein Artefakt der Gewebepreparation ist und eigentlich zum Stratum corneum gehört [56].

Nach dem Schneiden im Mikrotom war im Mikroskop keine lebende Epidermis mehr zu erkennen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde die physikalische Stabilität von Liposomen über einen Beobachtungszeitraum von 14 Wochen untersucht. Die Partikelgröße und der Polydispersitätsindex (PDI) wurden mit dem Zetasizer Nano ZS vermessen.

Die 2%igen DPPC Liposomen beladen mit Fluconazol hatten eine stabile Partikelgröße und zeigten sogar eine Abnahme des PDI auf Werte unter 0,2. Jedoch war ein Auskristallisieren des Fluconazols vier Wochen nach Herstellung zu beobachten. Somit ist die Stabilitätsprüfung nicht erfüllt worden und die Lagerstabilität der Liposomen konnte nicht gewährleistet werden.

Die 2%igen DPPC Liposomen ohne Wirkstoff zeigten über die 14 Wochen eine annähernd konstante Partikelgröße. Jedoch waren beim PDI große Standardabweichungen zu beobachten.

Die Zunahme des Polydispersitätsindex könnte auf eine Aggregation der Teilchen zurückzuführen zu sein, wodurch es zum möglichen Austreten von Wirkstoff kommen kann [5]. Dadurch war die Stabilität der Liposomen trotz gleichmäßiger Partikelgröße nicht mehr gewährleistet und die 2%igen DPPC Liposomen sind in diesem Fall als Arzneistoffträger nicht geeignet.

Aufgrund der gelartigen Konsistenz der F-DPPC Liposomen bei Raumtemperatur war keine Überprüfung der physikalischen Stabilität mit dem Zetasizer Nano ZS möglich. 2%ige F-DPPC Liposomen mit 0,1% Na-Fluorescein als Modellwirkstoff wurden für in vitro Hautstudien verwendet. Zwei Wochen nach der Herstellung war beim Erwärmen der Liposomen ein Auskristallisieren des Wirkstoffes zu sehen. Aufgrund dieser Beobachtung ist von einer Instabilität der Liposomen auszugehen.

Weiters wurde F-DPPC als Arzneistoffträger in seiner Arzneistoffpermeation und -penetration in vitro untersucht. Zum Vergleich der Franz Zellen und Tape Stripping Versuche wurden neben F-DPPC auch 2%ige DPPC Liposomen, eine Mikroemulsion und eine 0,1%ige NaFI-Lösung hergestellt. Als Modellwirkstoffe wurden Fluconazol und Na-Fluorescein verwendet.

Die Permeation von Fluconazol und Na-Fluorescein zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen F-DPPC und DPPC Liposomen, sowie der NaFI-Lösung nach 24 Stunden.

Beim Tape Stripping zeigte sich derselbe Trend wie bei den Franz Zell Versuchen. In der Penetration von Na-Fluorescein konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den F-DPPC und DPPC Liposomen festgestellt werden. Jedoch konnte bei den F-DPPC Liposomen und der NaFI-Lösung ein signifikanter Unterschied in der Penetration von Na-Fluorescein dahingehend beobachtet werden, dass mehr Na-Fluorescein aus den F-DPPC Liposomen in das Stratum corneum penetrierte.

Die hohe Permeation und die niedrige Penetration von Na-Fluorescein aus der Lösung könnte auf den entstehenden Okklusionseffekt der porcinen Haut zurückzuführen zu sein, wodurch Na-Fluorescein das Stratum corneum in den Franz Zell Versuchen besser durchdringen konnte als beim Tape Stripping.

Es wurde eine weitere Wirkstoffpenetration von Na-Fluorescein über das Stratum corneum hinaus in die lebende Epidermis beobachtet. Die Hautstücke wurden in zehn Kreisflächen gestanzt und in fünf Flächenschnitte zu je 40 µm mit dem Kryomikrotom geschnitten.

Bei der Penetration von Na-Fluorescein in die lebende Epidermis bestand zwischen den F-DPPC und DPPC Liposomen kein signifikanter Unterschied. Zwischen den F-DPPC Liposomen und der NaFI-Lösung konnte jedoch ein Unterschied gemessen werden. Wie im Stratum corneum wurde auch in der lebenden Epidermis eine höhere Wirkstoffkonzentration von Na-Fluorescein aus den F-DPPC Liposomen gemessen.

Von den Hautstücken wurden nach dem Tape Stripping beziehungsweise dem Schneiden im Kryomikrotom Querschnitte angefertigt. Anschließend erfolgte eine Färbung der Hautstücke mit einer Hämatoxylin/Eosin Färbung, um den Aufbau und die Struktur der Haut besser erkennen zu können. Unter dem Mikroskop konnte das Abziehen des Stratum corneum in den Tape Stripping Versuchen beobachtet werden. Die dünne Schicht über dem Stratum granulosum könnte auf das Stratum lucidum hinweisen. Nach dem Schneiden der Hautstücke im Kryomikrotom war die lebende Epidermis im Mikroskop nicht mehr erkennbar.

Die F-DPPC Liposomen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Arzneistoffpermeation und -penetration im Vergleich mit den DPPC Liposomen. Im Vergleich mit der NaFI-Lösung konnte nur beim Tape Stripping ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Jedoch zeigte sich diese Beobachtung auch im Vergleich der NaFI-Lösung mit den DPPC Liposomen.

F-DPPC eignet sich als Arzneistoffträger und zeigt hohe Arzneistoffpermeations- und -penetrationseigenschaften. Hinsichtlich der längerfristigen Stabilität zeigten sich die F-DPPC Liposomen mit Na-Fluorescein als instabil, da es zwei Wochen nach Herstellung zu einer Auskristallisation des Modellwirkstoffes gekommen war.

7 ANHANG

7.1 Messwerte zur Stabilitätsuntersuchung

Woche	Partikelgröße [nm]					
	ohne Wirkstoff 2,0 % DPPC			mit Wirkstoff 2,0 % DPPC + 0,5 % Fluconazol		
	Lipos 1 14782 kJ	Lipos 2 13291 kJ	Lipos 3 15075 kJ	Lipos 1 14473 kJ	Lipos 2 15283 kJ	Lipos 3 15531 kJ
0	65,240	79,310	81,440	70,200	73,180	66,180
0	65,350	80,180	80,150	70,240	73,710	67,610
0	65,860	79,720	79,750	70,560	73,250	68,270
0	65,580	79,840	80,300	70,250	74,680	67,660
0	66,030	79,280	80,310	69,460	74,100	68,710
0	65,560	80,240	80,060	69,400	73,400	69,690
0	65,650	80,330	84,010	69,400	74,600	64,240
0	66,170	80,190	82,540	69,760	73,950	64,290
0	65,910	79,630	84,000	70,560	73,050	65,120
2	70,640	82,760	80,980	72,700	81,650	68,230
2	68,870	81,940	81,080	71,770	80,760	68,680
2	68,830	82,550	80,340	71,530	78,600	68,620
2	82,170	84,080	80,740	73,120	81,150	68,930
2	82,190	83,010	79,670	71,840	80,610	68,920
2	79,760	82,280	80,040	71,820	78,910	68,990
2	101,900	83,640	81,140	73,080	81,020	69,140
2	113,800	82,350	80,510	71,860	79,960	69,090
2	124,600	81,680	80,540	71,290	78,430	69,860
4	65,270	79,600	78,780	70,980	78,320	67,530
4	65,000	80,350	78,270	71,200	77,760	67,310
4	65,330	81,030	79,240	70,690	77,070	67,230
4	64,550	79,370	78,600	70,240	76,600	66,810
4	65,030	80,640	79,100	70,270	77,520	66,830
4	65,510	80,550	78,710	71,820	77,660	66,590
4	75,260	80,330	78,990	71,230	77,360	66,990
4	77,120	81,360	78,640	70,860	77,470	67,320
4	76,900	81,000	79,630	70,960	77,470	66,950
6	64,870	79,200	79,230	79,280	77,820	72,240
6	64,990	79,450	78,620	79,320	77,610	68,490
6	65,230	79,800	77,980	79,270	77,450	68,510
6	65,620	79,220	79,030	79,680	78,560	68,560
6	65,840	79,470	78,620	78,550	78,840	67,360
6	65,470	79,850	78,600	78,030	77,950	67,430
6	65,670	80,210	77,500	79,780	78,810	66,480
6	66,270	80,990	78,270	78,680	78,520	67,000
6	65,370	80,360	78,630	78,290	77,460	67,120

Tab. 7.1: Partikelgröße, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff – Woche 0-6

Woche	Partikelgröße [nm]					
	ohne Wirkstoff 2,0 % DPPC			mit Wirkstoff 2,0 % DPPC + 0,5 % Fluconazol		
	Lipos 1 14782 kJ	Lipos 2 13291 kJ	Lipos 3 15075 kJ	Lipos 1 14473 kJ	Lipos 2 15283 kJ	Lipos 3 15531 kJ
8	66,450	81,260	89,860	68,750	77,120	79,280
8	66,860	80,800	88,620	69,390	77,330	77,160
8	66,950	80,560	86,780	69,640	77,020	75,810
8	67,410	80,630	80,070	68,830	76,820	72,150
8	67,490	79,860	79,790	69,460	77,200	72,430
8	67,440	80,750	80,930	69,770	77,700	71,430
8	68,260	80,600	79,160	70,060	76,470	70,210
8	68,600	80,520	81,220	70,230	76,980	70,760
8	67,830	79,780	81,820	69,950	77,580	71,370
10	66,340	79,020	76,280	69,680	78,200	67,430
10	66,120	79,260	76,690	70,090	80,330	68,210
10	66,120	80,030	77,710	71,030	80,900	69,630
10	64,790	78,290	76,440	68,900	75,870	68,320
10	66,340	78,820	77,190	70,210	77,560	67,900
10	65,490	79,180	77,150	70,720	77,380	67,220
10	64,760	77,650	78,330	68,470	75,980	67,670
10	65,770	79,120	78,860	69,930	77,060	67,110
10	65,680	79,770	79,170	70,260	78,070	67,460
12	81,100	97,870	80,410	71,420	76,040	-
12	77,950	92,540	79,570	71,960	76,910	-
12	75,510	89,810	78,150	71,810	77,630	-
12	75,690	89,260	80,370	70,320	75,850	-
12	75,750	88,090	78,660	71,010	76,640	-
12	75,350	88,700	78,910	71,130	77,810	-
12	74,000	84,400	81,780	70,690	74,900	-
12	75,640	84,860	81,920	71,210	76,640	-
12	76,060	84,750	80,240	71,580	76,260	-
14	68,250	88,540	77,520	72,410	77,560	-
14	67,690	85,130	78,370	71,720	77,460	-
14	67,270	83,540	78,410	70,590	76,990	-
14	66,800	80,450	77,370	71,130	77,820	-
14	65,990	79,650	77,570	70,780	77,720	-
14	65,790	80,110	77,100	71,060	76,960	-
14	66,700	79,540	77,260	70,930	76,950	-
14	66,370	79,780	77,180	71,790	77,170	-
14	66,050	79,210	77,600	70,770	77,480	-

Tab. 7.2: Partikelgröße, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff – Woche 8-14

Polydispersitätsindex [-]						
Woche	ohne Wirkstoff 2,0 % DPPC			mit Wirkstoff 2,0 % DPPC + 0,5 % Fluconazol		
	Lipos 1 14782 kJ	Lipos 2 13291 kJ	Lipos 3 15075 kJ	Lipos 1 14473 kJ	Lipos 2 15283 kJ	Lipos 3 15531 kJ
0	0,254	0,254	0,255	0,270	0,230	0,275
0	0,251	0,251	0,252	0,266	0,232	0,284
0	0,248	0,248	0,257	0,264	0,222	0,288
0	0,252	0,252	0,256	0,257	0,218	0,266
0	0,242	0,242	0,246	0,250	0,224	0,344
0	0,259	0,259	0,241	0,257	0,235	0,331
0	0,255	0,255	0,380	0,261	0,221	0,253
0	0,244	0,244	0,406	0,247	0,237	0,249
0	0,254	0,254	0,360	0,258	0,214	0,249
2	0,252	0,247	0,263	0,181	0,122	0,175
2	0,256	0,237	0,251	0,182	0,133	0,179
2	0,261	0,252	0,266	0,169	0,142	0,175
2	0,605	0,242	0,255	0,171	0,144	0,189
2	0,607	0,231	0,254	0,159	0,163	0,178
2	0,583	0,232	0,252	0,164	0,149	0,160
2	0,551	0,248	0,265	0,193	0,157	0,171
2	0,529	0,241	0,257	0,174	0,147	0,171
2	0,483	0,232	0,250	0,178	0,163	0,183
4	0,237	0,234	0,249	0,167	0,146	0,153
4	0,255	0,241	0,242	0,163	0,123	0,161
4	0,246	0,237	0,240	0,160	0,136	0,164
4	0,249	0,222	0,252	0,178	0,140	0,168
4	0,234	0,231	0,237	0,163	0,116	0,167
4	0,241	0,221	0,242	0,142	0,130	0,176
4	0,583	0,227	0,234	0,160	0,103	0,166
4	0,562	0,241	0,256	0,169	0,118	0,182
4	0,597	0,248	0,249	0,177	0,128	0,165
6	0,237	0,219	0,240	0,313	0,142	0,152
6	0,246	0,198	0,238	0,335	0,147	0,160
6	0,246	0,224	0,226	0,334	0,123	0,155
6	0,238	0,226	0,240	0,308	0,130	0,160
6	0,225	0,229	0,239	0,311	0,123	0,159
6	0,240	0,237	0,237	0,316	0,132	0,171
6	0,240	0,235	0,235	0,291	0,137	0,163
6	0,233	0,230	0,228	0,300	0,125	0,168
6	0,243	0,221	0,245	0,308	0,140	0,167

Tab. 7.3: Polydispersitätsindex, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff – Woche 0-6

Polydispersitätsindex [-]						
Woche	ohne Wirkstoff 2,0 % DPPC			mit Wirkstoff 2,0 % DPPC + 0,5 % Fluconazol		
	Lipos 1 14782 kJ	Lipos 2 13291 kJ	Lipos 3 15075 kJ	Lipos 1 14473 kJ	Lipos 2 15283 kJ	Lipos 3 15531 kJ
8	0,252	0,217	0,421	0,159	0,123	0,199
8	0,260	0,231	0,410	0,146	0,123	0,206
8	0,252	0,234	0,429	0,143	0,149	0,210
8	0,261	0,251	0,271	0,167	0,126	0,192
8	0,268	0,235	0,258	0,159	0,140	0,184
8	0,260	0,223	0,285	0,160	0,143	0,187
8	0,258	0,238	0,274	0,148	0,144	0,188
8	0,257	0,233	0,271	0,161	0,148	0,185
8	0,312	0,243	0,271	0,145	0,126	0,189
10	0,242	0,241	0,241	0,179	0,205	0,178
10	0,258	0,239	0,230	0,162	0,210	0,183
10	0,244	0,236	0,243	0,184	0,215	0,195
10	0,238	0,226	0,238	0,177	0,133	0,195
10	0,259	0,212	0,252	0,153	0,132	0,159
10	0,250	0,232	0,233	0,170	0,148	0,161
10	0,238	0,220	0,249	0,150	0,145	0,173
10	0,252	0,229	0,252	0,177	0,133	0,181
10	0,237	0,230	0,262	0,154	0,134	0,170
12	0,422	0,414	0,242	0,182	0,149	-
12	0,401	0,425	0,246	0,174	0,151	-
12	0,412	0,429	0,249	0,186	0,149	-
12	0,411	0,371	0,240	0,183	0,145	-
12	0,388	0,414	0,246	0,166	0,121	-
12	0,429	0,426	0,251	0,176	0,138	-
12	0,425	0,381	0,266	0,166	0,137	-
12	0,402	0,381	0,257	0,179	0,145	-
12	0,418	0,392	0,252	0,177	0,154	-
14	0,228	0,262	0,244	0,159	0,124	-
14	0,232	0,252	0,259	0,146	0,142	-
14	0,235	0,250	0,235	0,155	0,129	-
14	0,222	0,237	0,254	0,162	0,121	-
14	0,239	0,236	0,244	0,168	0,131	-
14	0,225	0,229	0,247	0,145	0,141	-
14	0,238	0,222	0,241	0,147	0,152	-
14	0,223	0,235	0,245	0,146	0,125	-
14	0,234	0,231	0,228	0,164	0,136	-

Tab. 7.4: Polydispersitätsindex, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff – Woche 8-14

Mittelwert der Partikelgröße [nm]

Woche	ohne Wirkstoff 2,0 % DPPC			mit Wirkstoff 2,0 % DPPC + 0,5 % Fluconazol		
	Lipos 1 14782 kJ	Lipos 2 13291 kJ	Lipos 3 15075 kJ	Lipos 1 14473 kJ	Lipos 2 15283 kJ	Lipos 3 15531 kJ
0	65,706	79,858	81,396	69,981	73,769	66,863
2	88,084	82,699	80,560	72,112	80,121	68,940
4	68,886	80,470	78,884	70,917	77,470	67,062
6	65,481	79,839	78,498	78,987	78,113	68,132
8	67,477	80,529	83,139	69,564	77,136	73,400
10	65,712	79,016	77,536	69,921	77,928	67,883
12	76,339	88,920	80,001	71,237	76,520	-
14	66,768	81,772	77,598	71,242	77,346	-

Tab. 7.5: Mittelwerte der Partikelgröße, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff

Standardabweichung der Partikelgröße [nm]

Woche	ohne Wirkstoff 2,0 % DPPC			mit Wirkstoff 2,0 % DPPC + 0,5 % Fluconazol		
	Lipos 1 14782 kJ	Lipos 2 13291 kJ	Lipos 3 15075 kJ	Lipos 1 14473 kJ	Lipos 2 15283 kJ	Lipos 3 15531 kJ
0	0,310	0,401	1,709	0,481	0,606	1,987
2	20,521	0,777	0,491	0,676	1,200	0,445
4	5,685	0,654	0,403	0,491	0,471	0,303
6	0,432	0,593	0,524	0,620	0,571	1,712
8	0,682	0,458	4,112	0,516	0,377	3,205
10	0,605	0,718	1,052	0,814	1,729	0,776
12	2,053	4,318	1,314	0,525	0,898	-
14	0,832	3,255	0,481	0,602	0,336	-

Tab. 7.6: Standardabweichung der Partikelgröße, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff

Mittelwert des Polydispersitätsindex [-]

Woche	ohne Wirkstoff 2,0 % DPPC			mit Wirkstoff 2,0 % DPPC + 0,5 % Fluconazol		
	Lipos 1 14782 kJ	Lipos 2 13291 kJ	Lipos 3 15075 kJ	Lipos 1 14473 kJ	Lipos 2 15283 kJ	Lipos 3 15531 kJ
0	0,251	0,251	0,295	0,259	0,226	0,282
2	0,459	0,240	0,257	0,175	0,147	0,176
4	0,356	0,234	0,245	0,164	0,127	0,167
6	0,239	0,224	0,236	0,313	0,133	0,162
8	0,264	0,234	0,321	0,154	0,136	0,193
10	0,246	0,229	0,244	0,167	0,162	0,177
12	0,412	0,404	0,250	0,177	0,143	-
14	0,231	0,239	0,244	0,155	0,133	-

Tab. 7.7: Mittelwert des Polydispersitätsindex, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff

Standardabweichung des Polydispersitätsindex [-]

Woche	ohne Wirkstoff 2,0 % DPPC			mit Wirkstoff 2,0 % DPPC + 0,5 % Fluconazol		
	Lipos 1 14782 kJ	Lipos 2 13291 kJ	Lipos 3 15075 kJ	Lipos 1 14473 kJ	Lipos 2 15283 kJ	Lipos 3 15531 kJ
0	0,005	0,005	0,067	0,007	0,008	0,035
2	0,156	0,008	0,006	0,010	0,014	0,008
4	0,169	0,009	0,007	0,011	0,013	0,008
6	0,007	0,012	0,006	0,014	0,009	0,006
8	0,018	0,010	0,075	0,009	0,011	0,009
10	0,009	0,009	0,010	0,013	0,037	0,013
12	0,013	0,022	0,008	0,007	0,010	-
14	0,006	0,013	0,009	0,009	0,010	-

Tab. 7.8: Standardabweichung des Polydispersitätsindex, DPPC Liposomen mit und ohne Wirkstoff

Mittelwert der Partikelgröße [nm]

Woche	Lipos 1-3 ohne Wirkst.	Lipos 1-3 mit Wirkst.
0	75,653	70,204
2	83,781	73,724
4	76,080	71,816
6	74,606	75,077
8	77,048	73,367
10	74,088	71,911
12	81,753	73,878
14	75,379	74,294

Tab. 7.9: Mittelwert der Partikelgröße

Standardabweichung der Partikelgröße [nm]

Woche	Lipos 1-3 ohne Wirkst.	Lipos 1-3 mit Wirkst.
0	7,264	3,111
2	11,842	4,861
4	6,118	4,398
6	6,618	5,128
8	7,359	3,634
10	6,117	4,564
12	6,046	2,810
14	6,713	3,176

Tab. 7.10: Standardabweichung der Partikelgröße

**Mittelwert des
Polydispersitätsindex [-]**

Woche	Lipos 1-3 ohne Wirkst.	Lipos 1-3 mit Wirkst.
0	0,266	0,256
2	0,319	0,166
4	0,278	0,153
6	0,233	0,203
8	0,273	0,161
10	0,240	0,169
12	0,355	0,160
14	0,238	0,144

Tab. 7.11: Mittelwert des Polydispersitätsindex

**Standardabweichung des
Polydispersitätsindex [-]**

Woche	Lipos 1-3 ohne Wirkst.	Lipos 1-3 mit Wirkst.
0	0,043	0,031
2	0,133	0,017
4	0,110	0,021
6	0,010	0,081
8	0,057	0,026
10	0,012	0,024
12	0,077	0,019
14	0,011	0,014

Tab. 7.12: Standardabweichung des Polydispersitätsindex

7.2 Messwerte zur in vitro Hautpermeationsstudie mittels Franz Zellen

Wirkstoffkonzentration F-DPPC [%]

Stunden	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Zelle 7
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	19,86	16,86	32,65	40,00	36,22	15,70	16,25
4	52,30	50,06	59,19	72,49	67,97	49,33	51,18
6	70,50	69,96	70,34	85,31	79,09	61,47	65,66
8	78,75	79,17	74,55	89,36	83,09	65,64	71,37
24	91,42	87,06	79,80	91,49	85,68	68,39	77,92

Tab. 7.13: Permeation fluconazolhaltiger F-DPPC Liposomen

Wirkstoffkonzentration**F-DPPC [%]**

Stunden	Mittelwert	σ
0	0,00	0,00
2	25,36	10,52
4	57,50	9,37
6	71,76	8,03
8	77,42	7,78
24	83,11	8,33

Tab. 7.14: Permeation fluconazolhaltiger F-DPPC Liposomen - Mittelwert und Standardabweichung

Wirkstoffkonzentration DPPC [%]

Stunden	Zelle 8	Zelle 9	Zelle 10	Zelle 11	Zelle 12	Zelle 13	Zelle 14
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	17,16	23,11	36,53	37,86	23,75	27,31	36,35
4	49,24	57,68	72,07	71,44	60,35	67,15	74,61
6	62,30	65,97	87,95	84,07	79,01	87,31	94,63
8	67,66	71,33	93,48	88,98	87,37	97,42	101,45
24	75,36	75,26	103,64	98,12	94,31	105,93	106,87

Tab. 7.15: Permeation fluconazolhaltiger DPPC Liposomen

Wirkstoffkonzentration**DPPC [%]**

Stunden	Mittelwert	σ
0	0,00	0,00
2	28,87	8,11
4	64,65	9,23
6	80,18	11,96
8	86,81	12,80
24	94,21	13,64

Tab. 7.16: Permeation fluconazolhaltiger DPPC Liposomen - Mittelwert und Standardabweichung

Kumulation NaFl-Lösung [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]

Stunden	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	4,74	12,43	5,23	8,35	7,45
4	19,51	33,25	16,26	29,57	24,65
6	32,35	49,47	24,39	47,47	38,22
8	43,12	62,07	30,54	61,72	49,89
24	66,20	79,13	41,01	82,75	67,52

Stunden	Zelle 6	Zelle 7	Zelle 8	Zelle 9	Zelle 10
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	6,91	8,64	5,82	6,88	9,66
4	23,21	25,45	21,73	23,12	27,17
6	37,30	39,89	35,71	37,48	41,78
8	49,29	51,26	47,60	48,65	53,22
24	69,83	69,33	67,43	66,44	67,95

Tab. 7.17: Permeation von Na-Fluorescein, Na-Fluorescein Lösung

**Kumulation
NaFl-Lösung [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]**

Stunden	Mittelwert	S
0	0,00	0,00
2	7,61	2,29
4	24,39	4,88
6	38,41	7,15
8	49,74	9,00
24	67,76	10,96

Tab. 7.18: Permeation von Na-Fluorescein, Na-Fluorescein Lösung - Mittelwert und Standardabweichung

Kumulation F-DPPC+NaFI [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]

Stunden	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	5,02	4,54	4,27	5,49	3,23
4	16,77	20,42	21,02	22,60	18,16
6	25,76	35,42	36,85	37,34	34,35
8	31,44	47,79	50,18	50,51	49,24
24	39,31	64,97	70,35	70,08	69,00

Stunden	Zelle 6	Zelle 7	Zelle 8	Zelle 9	Zelle 10
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	14,52	10,28	3,78	4,52	9,90
4	22,03	33,08	19,95	21,20	35,56
6	42,87	54,46	38,06	39,20	56,94
8	59,47	71,87	54,27	56,45	75,25
24	84,65	81,36	64,78	66,76	86,40

Tab. 7.19: Permeation von Na-Fluorescein, F-DPPC Liposomen

Kumulation
F-DPPC+NaFI [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]

Stunden	Mittelwert	s
0	0,00	0,00
2	6,56	3,72
4	23,08	6,20
6	40,13	9,32
8	54,65	12,47
24	69,76	13,41

Tab. 7.20: Permeation von Na-Fluorescein, F-DPPC Liposomen - Mittelwert und Standardabweichung

Kumulation DPPC+NaFl [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]

Stunden	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,86	3,54	0,89	6,15	7,22
4	10,94	14,98	8,60	20,33	22,52
6	21,90	26,81	18,45	34,39	35,67
8	31,75	35,71	27,01	44,17	45,52
24	64,82	59,13	59,53	63,81	61,69

Stunden	Zelle 6	Zelle 7	Zelle 8	Zelle 9	Zelle 10
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	2,28	2,67	5,35	5,13	8,17
4	12,94	13,07	19,30	20,34	25,11
6	25,21	24,29	32,53	35,55	39,93
8	35,13	33,33	42,23	47,44	50,41
24	56,05	51,38	60,92	69,95	67,14

Tab. 7.21: Permeation von Na-Fluorescein, DPPC Liposomen

**Kumulation
DPPC+NaFl [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]**

Stunden	Mittelwert	s
0	0,00	0,00
2	4,33	2,44
4	16,81	5,44
6	29,47	7,06
8	39,27	7,71
24	61,44	5,39

Tab. 7.22: Permeation von Na-Fluorescein, DPPC Liposomen- Mittelwert und Standardabweichung

7.3 Messwerte zur in vitro Hautpenetrationsstudie mittels Tape Stripping

Fluconazol [$\mu\text{g/ml}$]				
(Wiederfindung 100%)				
Tape	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
1-5	38,37	39,22	36,61	29,80
6-10	1,75	0,78	10,02	4,59
11-15	1,62	1,46	5,10	2,08
16-20	1,83	2,16	3,49	3,15
21-25	1,45	2,06	3,35	1,23
26-30	1,06	2,01	1,24	1,33
31-35	1,47	2,23	0,74	1,38
36-40	1,25	2,09	0,00	0,78
41-45	1,81	1,57	0,00	1,12
46-50	2,00	2,00	0,00	0,86
51-55	2,19	1,88	0,00	0,00
56-60	1,64	0,00	0,00	0,00
S	56,45	57,44	60,56	46,31

Tape	Versuch 5	Versuch 6	Versuch 7	Versuch 8
1-5	23,27	28,59	27,45	17,50
6-10	9,06	4,24	10,46	8,63
11-15	1,18	2,30	6,59	6,31
16-20	0,87	1,13	0,98	6,37
21-25	1,24	0,86	1,95	1,75
26-30	3,07	0,00	1,16	0,92
31-35	1,61	0,00	1,85	1,29
36-40	0,73	0,00	0,66	0,00
41-45	1,21	0,00	0,84	0,00
46-50	0,97	0,00	1,21	0,00
51-55	0,00	0,00	0,65	0,00
56-60	0,00	0,00	0,00	0,00
S	43,22	37,12	53,80	42,77

Tab. 7.23: Arzneistoffkonzentration Fluconazol aus der Mikroemulsion

Fluconazol [$\mu\text{g/ml}$]

Tape	Mittelwert	s
1-5	29,17	7,75
6-10	5,64	3,78
11-15	3,08	2,34
16-20	2,36	1,94
21-25	1,51	0,43
26-30	1,37	0,96
31-35	1,40	0,70
36-40	0,79	0,73
41-45	0,94	0,71
46-50	1,00	0,82
51-55	0,68	0,96
56-60	0,23	0,62
S	48,16	

Tab. 7.24: Arzneistoffkonzentration Fluconazol aus der Mikroemulsion - Mittelwert und Standardabweichung

Korneozyten [µg]

Tape	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	Versuch 7
1	53,57	70,09	62,50	17,41	50,00	50,00	37,95
2	86,16	66,07	57,14	24,55	62,95	50,89	70,54
3	80,36	86,61	64,73	36,61	50,45	62,95	102,68
4	73,66	77,23	50,00	44,20	55,36	75,00	92,86
5	83,04	71,88	46,43	33,04	41,52	72,32	89,29
6	87,05	70,98	32,59	30,36	45,09	72,77	91,52
7	87,05	74,11	44,20	33,93	46,43	67,86	88,39
8	73,21	81,25	46,88	37,05	59,38	75,45	87,50
9	75,89	83,48	51,79	38,39	47,32	77,68	85,71
10	67,86	82,59	45,98	32,14	65,63	57,14	85,27
11	77,23	55,80	47,77	36,61	47,32	70,09	88,39
12	65,63	70,54	44,20	31,25	46,43	58,93	70,54
13	62,95	51,79	41,52	43,30	32,14	66,96	90,63
14	56,70	54,02	46,88	29,91	45,09	51,34	69,64
15	53,13	40,63	35,27	42,41	67,86	60,27	76,34
16	42,41	39,73	35,27	34,38	28,13	37,50	61,61
17	34,82	28,57	29,91	29,91	43,30	49,11	46,43
18	31,25	27,23	31,25	29,91	16,07	20,98	41,07
19	27,23	17,41	24,11	33,48	42,86	36,61	33,48
20	22,77	12,50	14,73	35,27	29,91	25,89	25,45
21	11,16	29,46	32,14	18,30	40,63	35,71	15,63
22	10,27	11,61	20,09	25,45	35,27	27,68	20,54
23	9,38	6,70	20,98	30,36	33,93	24,11	16,52
24	10,71	4,46	13,39	25,89	25,89	20,54	11,16
25	18,75	11,61	19,20	12,95	26,79	20,54	12,95
26	5,80	3,57	10,27	12,05	16,07	15,18	10,71
27	14,73	1,79	8,48	13,39	14,73	14,73	9,82
28	8,48	2,23	7,14	10,27	13,39	14,73	7,59
29	7,59	3,13	13,39	9,82	12,05	14,29	8,04
30	8,48	4,46	4,91	7,59	5,36	10,71	6,70

Tab. 7.25: Menge der Korneozyten pro Tape Strip, Fluconazolhaltige Mikroemulsion – Strip 0-30

Korneozyten [µg]

Tape	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	Versuch 7
31	10,71	2,23	4,91	8,48	4,91	9,38	8,04
32	5,36	1,79	4,46	7,14	4,46	9,38	7,59
33	8,04	1,34	9,38	6,70	8,48	9,82	9,38
34	8,04	1,79	5,36	4,02	7,14	8,04	7,59
35	6,25	10,27	7,59	4,46	6,25	6,70	6,70
36	4,02	3,57	5,80	4,02	5,36	7,59	8,48
37	4,46	5,80	5,80	8,04	5,36	8,48	5,36
38	5,36	2,23	2,23	6,25	5,80	9,38	5,36
39	4,46	4,46	3,57	3,13	6,25	6,70	4,46
40	8,04	2,23	5,80	3,13	5,80	6,70	2,23
41	4,91	0,89	4,91	5,36	9,38	4,46	0,45
42	0,00	0,45	3,13	5,36	5,36	5,36	3,13
43	6,25	1,79	2,23	4,91	4,46	4,91	1,34
44	2,23	0,00	1,79	4,46	3,57	5,36	0,89
45	4,46	0,45	0,45	4,46	3,13	3,13	1,79
46	2,23	0,89	1,79	3,13	4,91	4,02	1,79
47	3,13	1,34	0,89	3,57	4,02	6,25	1,34
48	2,23	0,89	1,34	1,34	3,57	2,23	0,89
49	1,79	0,00	0,45	3,57	2,23	2,23	1,34
50	1,34	0,89	0,00	3,57	6,25	2,23	3,13
51	3,57	0,45	0,00	5,36	0,89	3,13	0,00
52	1,79	0,00	0,00	4,91	0,89	3,57	0,00
53	4,02	0,89	0,00	4,02	0,89	3,57	0,00
54	3,13	0,89	0,00	5,36	1,34	3,13	0,00
55	1,79	0,89	0,00	3,13	1,79	3,13	0,00
56	4,46	0,00	0,00	3,57	0,00	3,13	0,00
57	1,79	0,00	0,00	3,13	0,00	3,57	0,00
58	1,79	0,00	0,00	3,57	0,00	3,57	0,00
59	3,13	0,00	0,00	9,82	0,00	3,13	0,00
60	1,34	0,00	0,00	4,02	0,00	3,57	0,00
S	1.467,41	1.287,95	1.075,00	982,14	1.259,82	1.493,75	1.636,16

Tab. 7.26: Menge der Korneozyten pro Tape Strip, Fluconazolhaltige Mikroemulsion – Strip 30-60

Korneozyten [μg]

Tape	Mittelwert	s
1	48,79	17,17
2	59,76	19,10
3	69,20	22,44
4	66,90	17,45
5	62,50	21,95
6	61,48	25,32
7	63,14	21,77
8	65,82	18,63
9	65,75	19,33
10	62,37	19,08
11	60,46	18,61
12	55,36	15,08
13	55,61	19,68
14	50,51	12,14
15	53,70	15,25
16	39,86	10,60
17	37,44	8,66
18	28,25	8,03
19	30,74	8,47
20	23,79	8,03
21	26,15	11,14
22	21,56	8,85
23	20,28	10,17
24	16,01	8,24
25	17,54	5,42
26	10,52	4,57
27	11,10	4,83
28	9,12	4,19
29	9,76	3,89
30	6,89	2,23

Tab. 7.27: Menge der Korneozyten pro Tape Strip, Fluconazolhaltige Mikroemulsion – Strip 0-30 - Mittelwert und Standardabweichung

Korneozyten [μg]

Tape	Mittelwert	s
31	6,95	3,00
32	5,74	2,50
33	7,59	2,95
34	5,99	2,39
35	6,89	1,76
36	5,55	1,89
37	6,19	1,49
38	5,23	2,47
39	4,72	1,31
40	4,85	2,31
41	4,34	3,00
42	3,25	2,30
43	3,70	1,89
44	2,61	1,94
45	2,55	1,70
46	2,68	1,41
47	2,93	1,91
48	1,79	0,96
49	1,66	1,20
50	2,49	2,08
51	1,91	2,11
52	1,59	1,96
53	1,91	1,87
54	1,98	1,98
55	1,53	1,31
56	1,59	2,03
57	1,21	1,60
58	1,28	1,70
59	2,30	3,63
60	1,28	1,79
S	1.314,60	

Tab. 7.28: Menge der Korneozyten pro Tape Strip, Fluconazolhaltige Mikroemulsion – Strip 30-60 - Mittelwert und Standardabweichung

NaFl Konzentration [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$]		
Stellen	DPPC+NaFl	FDPPC+NaFl
1	0,80	0,49
2	1,04	0,47
3	0,54	0,89
4	0,64	0,85
5	0,76	0,88
6	0,70	0,92
	DPPC+NaFl	FDPPC+NaFl
Mittelwert	0,75	0,75
s	0,17	0,21

Tab. 7.29: Penetration von Na-Fluorescein, DPPC und F-DPPC Liposomen

7.4 Messwerte zur Präparation horizontaler Hautschnitte und Wirkstoffextraktion

FDPPC+NaFl [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$]		
d [μm]	MW	SD
SC	0,75	0,21
40	0,20	0,16
80	0,16	0,14
120	0,09	0,09
160	0,08	0,08
200	0,10	0,11

Tab. 7.30: Penetration Na-Fluorescein in die Epidermis, F-DPPC Liposomen

NaFl-Lsg [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$]		
d	MW	SD
SC	0,25	0,09
40	0,10	0,13
80	0,10	0,10
120	0,06	0,07
160	0,07	0,06
200	0,10	0,13

Tab. 7.31: Penetration Na-Fluorescein in die Epidermis, NaFl-Lösung

Viable Epidermis NaFl-Lipos einzeln [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$]

Stellen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
1	0,0093	0,0250	0,1812	0,0200	0,0113	0,0465
2	0,0047	0,0296	0,1577	0,0174	0,0131	0,0587
3	0,0066	0,0191	0,0726	0,0157	0,0096	0,0188
4	0,0065	0,0160	0,0957	0,0119	0,0084	0,0140
5	0,0065	0,0140	0,1001	0,0142	0,0091	0,0167
6	0,0063	0,0149	0,0841	0,0142	0,0089	0,0960
7	0,0049	0,0166	0,0704	0,0176	0,0086	0,0267
8	0,0045	0,0135	0,0910	0,0179	0,0136	0,0269
9	0,0042	0,0097	0,0611	0,0163	0,0114	0,0289

Stratum corneum NaFl-Lipos einzeln [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$]

Stellen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
1	6,5300	2,6600	7,2100	4,5900	6,8900	4,8400

Tab. 7.32: Penetration von Na-Fluorescein in das Stratum corneum und in die viable Epidermis, nicht gebündelte Strips der DPPC Liposomen

Viable Epidermis NaFl-Lipos gebündelt [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$]

Stellen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
1	0,0302	0,0552	0,1901	0,0486	0,0214	0,0167
2	0,0187	0,0704	0,1619	0,0580	0,0283	0,0158
3	0,0128	0,0289	0,0725	0,0248	0,0521	0,0058
4	0,0126	0,0365	0,0482	0,0355	0,0094	0,0110
5	0,0132	0,0384	0,0650	0,0393	0,0470	0,0094
6	0,0148	0,0405	0,0490	0,0388	0,0223	0,0124
7	0,0151	0,0372	0,0752	0,0471	0,0302	0,0143
8	0,0111	0,0429	0,0606	0,0371	0,0209	0,0078
9	0,0126	0,0623	0,0823	0,0323	0,0279	0,0059

Stratum corneum NaFl-Lipos gebündelt [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ml}$]

Stellen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
1	6,5400	2,5100	5,9200	3,7600	3,4300	3,7400

Tab. 7.33: Penetration von Na-Fluorescein in das Stratum corneum und in die viable Epidermis, gebündelte Strips der DPPC Liposomen

	Viable Epidermis		Stratum corneum	
	einzel	gebündelt	einzel	gebündelt
Mittelwert	0,28	0,34	5,45	4,32
s	0,29	26,00	1,75	1,56

Tab. 7.34: Penetration von Na-Fluorescein in das Stratum corneum und in die viable Epidermis, Gebündelte und nicht gebündelte Strips der DPPC Liposomen - Mittelwert und Standardabweichung

8 VERZEICHNIS

Ich habe mich bemüht, sämtliche InhaberInnen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

8.1 Literaturverzeichnis

- [1] Neubert, Wohlrab, Marsch, Dermatopharmazie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart mbH, 2001
- [2] Bauer, Frömming, Führer, Pharmazeutische Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart mbH, 9. Auflage, 2012
- [3] A. Kogan, N. Garti, Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles, *Advances in Colloid and Interface Science* 123-126, 369-385, 2006
- [4] J. Schwarz, H.P. Kählig, N.B. Matsko, M. Kratzel, M. Husa, C. Valenta, Decrease of Liposomal Size and Retarding Effect on Fluconazole Skin Permeation by Lysine Derivatives, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100, 2911-2919, 2011
- [5] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayaem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art, *Journal of Colloid Science and Biotechnology* 1, 147-168, 2012
- [6] P. Toimil, G. Prieto, J. Jr Minones, F. Sarmiento, A comparative study of F-DPPC/DPPC mixed monolayers. Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers, *Physical Chemistry Chemical Physics* 12, 13323-13332, 2010
- [7] E.A. Smith, C.M. van Gorkum, P.K. Dea, Properties of phosphatidylcholine in the presence of its monofluorinated analogue, *Biophysical Chemistry* 147, 20-27, 2010
- [8] H. Käser, Naturkosmetik selber machen, Verlag Freya, 2. Auflage, 2012
- [9] <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2957>, Stand Februar, 2015
- [10] S.A. Krause, Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Arzneistoffen, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001
- [11] H. Kell, Wechselwirkung des Lipoheptapeptides Surfactin mit Lipiddoppelschichten aus DMPC und DPPC, Dissertation, Technische Universität Berlin, 2006
- [12] http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=855&Itemid=178&catnumber=880341, Stand Februar 2015
- [13] http://www.avantilipids.com/download.php?file=Brochures/Avanti_Brochure_Fluorinated_PC.pdf, Stand Februar 2015

- [14] D.J. Hirsh, N. Lazaro, L.R. Wright, J.M. Boggs, T.J. McIntosh, J. Schaefer, J. Blazyk, A new monofluorinated phosphatidylcholine forms interdigitated bilayers, *Biophysical Journal* 75, 1858-1868, 1998
- [15] J. Hahn, Einschluss des Nukleosidanalogons Gemcitabin in thermosensitive Liposomen zur temperaturgetriggerten Freisetzung– in vitro Untersuchung der Einschlussmodalitäten und Freisetzungskinetik, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität zu München, 2013
- [16] Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 7. Studienausgabe, stark erweiterte Auflage von A. Berger, H. Wachter, 1993.
- [17] G. Kutz, R. Daniels, H. Trommer, Emulsionen, Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, 2011
- [18] S. Höller, Cubic gels, microemulsions and nanoemulsions for optimised skin penetration/permeation of active molecules and improved chemical stability, Dissertation, Universität Wien, 2008
- [19] J.C. Schwarz, V. Klang, M. Hoppel, D. Mahrhauser, C. Valenta, Natural microemulsions: Formulation design and skin interaction, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 81, 557-562, 2012
- [20] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure9/019/mfcd00011674.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00011674-large.png, Stand März 2015
- [21] Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 10. Auflage, begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, 2009
- [22] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure3/156/mfcd00274549.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00274549-large.png, Stand Februar 2015
- [23] E. Yilmaz, Entwicklung phytosphingosinhaltiger, positiv geladener Nanoemulsionen zur dermalen Applikation, Dissertation, Freie Universität Berlin, 2005
- [24] https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/f6377pis.pdf, Stand März 2015
- [25] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure2/052/mfcd00167039.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00167039-medium.png, Stand März 2015
- [26] B. Herbsthofer, Einfluss verschiedener Lysine auf die Hautpermeation von Natrium-Fluorescein, Diplomarbeit, Universität Wien, 2008
- [27] <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluorescein>, Stand März 2015
- [28] <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/richter-telse-erika-2004-04-05/HTML/chapter3.html>, Stand 2015
- [29] Toth, Hollerrieder, Sotonyi, Augenheilkunde beim Pferd- Lehrbuch und Atlas, Schattauer GmbH, 2010
- [30] K. Wiatschka, Einfluss verschiedener Parameter auf die Verlässlichkeit von Tape Stripping-Experimenten und Evaluierung fluorierter Lipide zur Herstellung von Liposomen, Diplomarbeit, Universität Wien, 2015

- [31] J. Skipiol, Einfluss ausgewählter wirkstofffreier Formulierungen auf bestimmte Hauteigenschaften und Untersuchung der Wirkstoffdiffusion aus einem Mikroemulsionsgel, Diplomarbeit, Universität Wien, 2014
- [32] D.S. Mahrhauser, Entwicklung von Mikroemulsionssystemen und Charakterisierung von Wechselwirkungen mit porciner Haut mittels FTIR, Diplomarbeit, Universität Wien, 2011
- [33] M. Hoppel, Natürliche Mikroemulsionen zur dermalen Applikation: Entwicklung, Charakterisierung und Hautpenetration, Diplomarbeit, Universität Wien, 2012
- [34] M. Kaszuba, D. McKnight, M.T. Connah, F.K. McNeil-Watson, U. Nobbmann, Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering, *Journal Nanoparticle Research* 10, 823–829, 2008
- [35] <http://www.malvern.com/de/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/default.aspx>, Stand März 2015
- [36] http://www.malvern.com/de/Assets/600x400_zetasizer_nano_zs_1.jpg, Stand Februar 2015
- [37] D.P. Krickau, Abbaukinetik hydrolyseempfindlicher Arzneistoffe in parenteralen O/W-Emulsionen, Dissertation, Freie Universität Berlin, 2006
- [38] S. Riedel (geb. Franzbach), Vergleichende Untersuchungen zur dermalen Penetration und Permeation in Diffusionszellen, Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2003
- [39] A.M. Barbero, H.F. Frasch, Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review, *Toxicology in Vitro* 23, 1-13, 2009
- [40] A-M. Zimmermann, Cyclodextrin-stabilisierte Submikronemulsionen als Arzneistoffträgersystem für Progesteron auf der Haut, Diplomarbeit, Universität Wien, 2009
- [41] V. Klang, J.C. Schwarz, B. Lenobel, M. Nadj, J. Auböck, M. Wolzt, C. Valenta, In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80, 604-614, 2012
- [42] J.C. Schwarz, V. Klang, M. Hoppel, M. Wolzt, C. Valenta, Corneocyte quantification by NIR densitometry and UV/Vis spectroscopy for human and porcine skin and the role of skin cleaning procedures, *Skin Pharmacology and Physiology* 25, 142-149, 2012
- [43] U. Jacobi, M. Kaiser, R. Toll, S. Mangelsdorf, H. Audring, N. Otberg, W. Sterry, J. Lademann, Porcine ear skin: an in vitro model for human skin, *Skin Research and Technology* 13, 19-24, 2007
- [44] V. Klang, J.C. Schwarz, A. Hartl, C. Valenta, Facilitating in vitro Tape Stripping: Application of Infrared Densitometry for Quantification of Porcine Stratum Corneum Proteins, *Skin Pharmacology and Physiology* 24, 256 – 268, 2011
- [45] R. Voegeli, J. Heiland, S. Doppler, A.V. Rawlings, T. Schreier, Efficient and simple quantification of stratum corneum proteins on tape strippings by infrared densitometry, *Skin Research and Technology* 13, 242-251, 2007

- [46] V. Klang, M. Hoppel, C. Valenta, Infrared Densitometry for In Vitro Tape Stripping: Quantification of Porcine Corneocytes, in: P. Agache, P. Humbert, H. Maibach, F. Fanian, Measuring the skin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2. Auflage, 2014, submitted
- [47] <http://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/artikel?id=1181>, Stand Februar 2015
- [48] P. Baumann, Esophageal epithelial cell-cultures for Tissue Engineering, Diplomarbeit, Medizinische Universität Graz, 2009
- [49] <https://users.hepforge.org/~holsch/Doktorarbeit/Literatur/Begriffsklärung/mayers%20hämalun.pdf>, Stand Februar 2015
- [50] Rücker, Neugebauer, Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 3. Auflage, 2001
- [51] M.-T. Mangold, Einfluss von Phytosphingosin in Lecithin- Nanoemulsionen auf das physikalisch-chemische Verhalten und die Haut-Diffusion von Fluconazol und Flumethasonpivalat, Diplomarbeit, Universität Wien, 2009
- [52] B.C. Lenobel, Vergleich der Wirkstoffprofile der Modellstoffe Curcumin und Natrium-Fluoreszein aus unterschiedlichen Zubereitungen mittels Tape-Stripping, Diplomarbeit, Universität Wien, 2011
- [53] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Spektroskopische Methode in der Organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, 7. überarbeitete Auflage, 2005
- [54] <http://www.statistik-und-beratung.de/2012/09/parametrisch-oder-nichtparametrisch-das-ist-hier-die-frage/>, Stand März 2015
- [55] http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783540219651-c1.pdf?SGWID=0-0-45-130688-p32424085, Stand März 2015
- [56] H. Hardung, Semifluorierte und perfluorierte Verbindungen zur topischen und parenteralen Anwendung, Inauguraldisertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2008
- [57] C. Braem, Pharmakodynamische und Pharmakokinetische Untersuchungen von Glucocorticoiden und Charakterisierung nanopartikulärer Trägersysteme, Dissertation, Freie Universität Berlin, 2007
- [58] R. Voigt, Pharmazeutische Technologie, Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, 10. Auflage, 2006
- [59] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/f6377?lang=de®ion=AT>, Stand März 2015

8.2 Abbildungsverzeichnis

ABB. 2.1: AUFBAU UND STRUKTUR DER MENSCHLICHEN HAUT [1]	7
ABB. 2.2: ENTSTEHUNG DER KORNEOZYTEN [8]	9
ABB. 2.3: ZIEGELSTEIN-MÖRTEL MODELL DES STRATUM CORNEUM [9]	10
ABB. 2.4: AUFNAHME VON ARZNEISTOFFEN DURCH DAS STRATUM CORNEUM [1]	11
ABB. 2.5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER STRUKTUR VON LIPOSOMEN [5]	12

ABB. 2.6: CHEMISCHER AUFBAU DES F-DPPC: 1-PALMITOYL-2-(16-FLUOROPALMITOYL)-SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE [12].....	14
ABB. 2.7: PHASENÜBERGANGSTEMPERATUR VON F-DPPC [13]	15
ABB. 2.8: KONFORMATIONSVERÄNDERUNG DER ACYLKETTEN BEI DER PHASENÜBERGANGSTEMPERATUR [15].....	15
ABB. 2.9: STRUKTUR VON MIKROEMULSIONEN [1].....	17
ABB. 2.10: CHEMISCHE STRUKTUR DES ZUCKERESTERS [18].....	19
ABB. 2.11: CHEMISCHE STRUKTUR DES ISOPROPANOLS [20].....	19
ABB. 2.12: CHEMISCHE STRUKTUR VON ISOPROPYLMYRISTAT [18]	19
ABB. 2.13: CHEMISCHE STRUKTUR VON FLUCONAZOL [22]	21
ABB. 2.14: CHEMISCHE STRUKTUR VON NA-FLUORESCEIN [25].....	22
ABB. 3.1: HERSTELLUNG DES LIPIDFILMES AM ROTAVAPOR	24
ABB. 3.2: HYDRATISIERUNG DES LIPIDFILMES.....	25
ABB. 3.3: BEHANDLUNG MIT DER SONOTRODE	25
ABB. 3.4: ZETASIZER NANO ZS [36]	27
ABB. 3.5: AUFNAHME VON ARZNEISTOFFEN IN DIE HAUT [38].....	29
ABB. 3.6: SCHEMATISCHE ANSICHT DER FRANZ ZELLE [40].....	30
ABB. 3.7: FRANZ ZELLE MIT NA-FLUORESCEIN LÖSUNG ALS DONOR	31
ABB. 3.8: FRANZ ZELLEN IM WASSERBAD AUF EINER MAGNETRÜHRPLATTE	32
ABB. 3.9: INKUBATION DER HAUTSTÜCKE IM WASSERBAD	34
ABB. 3.10: NIR-DENSITOMETER FÜR KLEBESTREIFEN	35
ABB. 3.11: PRÄPARATION HORIZONTALER HAUTSCHNITTE MIT DEM KRYO-MIKROTOM	36
ABB. 3.12: DEHYDRIERUNG DER QUERSCHNITTE IN EINER AUFSTIEGENDEN ALKOHOLREIHE	37
ABB. 3.13: EICHGERADE VON FLUCONAZOL MIT GERADENGLEICHUNG UND VARIANZ , V1-V10	40
ABB. 3.14: CHROMATOGRAMM VON FLUCONAZOL IN METHANOL.....	40
ABB. 3.15 AUFBAU EINES FLUORIMETERS [50]	41
ABB. 3.16: EICHGERADE VON NA-FLUORESCEIN MIT GERADENGLEICHUNG UND VARIANZ, V1-V10.....	42
ABB. 4.1: PARTIKELGRÖßE, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF	44
ABB. 4.2: POLYDISPERSITÄTSINDEX, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF	45
ABB. 4.3: PARTIKELGRÖßE DER 2%IGEN DPPC LIPOSOMEN OHNE WIRKSTOFF, N=3.....	46
ABB. 4.4: PARTIKELGRÖßE DER 2%IGEN DPPC LIPOSOMEN MIT 0,5% FLUCONAZOL, N=3	47
ABB. 4.5: POLYDISPERSITÄTSINDEX DER 2%IGEN DPPC LIPOSOMEN OHNE WIRKSTOFF, N=3.....	48
ABB. 4.6: POLYDISPERSITÄTSINDEX DER 2%IGEN DPPC LIPOSOMEN MIT 0,5% FLUCONAZOL, N=3	49
ABB. 4.7: VERGLEICH DER PERMEATION VON FLUCONAZOL DURCH DIE HAUT AUS F-DPPC UND DPPC LIPOSOMEN.....	50
ABB. 4.8: VERGLEICH DER HAUTPERMEATION VON NA-FLUORESCEIN AUS F-DPPC UND DPPC LIPOSOMEN.....	51
ABB. 4.9: VERGLEICH DER HAUTPERMEATION VON NA-FLUORESCEINHÄLTIGEN F-DPPC LIPOSOMEN MIT NA-FLUORESCEINHÄLTIGEN DPPC LIPOSOMEN UND EINER NAFL-LÖSUNG	52

ABB. 4.10: HAUTPENETRATION VON FLUCONAZOL, MIKROEMULSION	53
ABB. 4.11: HAUTPENETRATION VON NA-FLUORESCEIN IN METHANOL, F-DPPC LIPOSOMEN UND DPPC LIPOSOMEN.....	54
ABB. 4.12: PENETRATION VON NA-FLUORESCEIN, GEBÜNDELTE UND NICHT GEBÜNDELTE STRIPS VON DPPC LIPOSOMEN	55
ABB. 4.13: PENETRATION VON NA-FLUORESCEIN, F-DPPC LIPOSOMEN UND NAFL-LÖSUNG	56
ABB. 4.14: HAUTSTÜCK VOR DEM TAPE STRIPPING, 20 FACHE VERGRÖßERUNG.....	57
ABB. 4.15: HAUTSTÜCK NACH DEM TAPE STRIPPING, 40 FACHE VERGRÖßERUNG.....	57
ABB. 4.16: HAUTSTÜCK NACH DEM SCHNEIDEN IM MIKROTOM, 20 FACHE VERGRÖßERUNG	58

8.3 Tabellenverzeichnis

TAB. 3.1: QUALITATIVE ZUSAMMENSETZUNG DER MIKROEMULSION.....	26
TAB. 3.2: MISCHVERHÄLTNIS DER MIKROEMULSION	26
TAB. 3.3: HPLC [51]	38
TAB. 3.4: GERÄTEPARAMETER HPLC [51]	39
TAB. 3.5: VERDÜNNUNGSREIHE FLUCONAZOL IN METHANOL, N.D= NICHT DETEKTIERBAR ..	39
TAB. 3.6: GERÄTEPARAMETER DES FLUORIMETERS	41
TAB. 3.7: VERDÜNNUNGSREIHE NA-FLUORESCEIN IN PHOSPHATPUFFER.....	42
TAB. 7.1: PARTIKELGRÖßE, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF – WOCHE 0-6.	69
TAB. 7.2: PARTIKELGRÖßE, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF – WOCHE 8-14	70
TAB. 7.3: POLYDISPERSITÄTSINDEX, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF – WOCHE 0-6	71
TAB. 7.4: POLYDISPERSITÄTSINDEX, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF – WOCHE 8-14	72
TAB. 7.5: MITTELWERTE DER PARTIKELGRÖßE, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF	73
TAB. 7.6: STANDARDABWEICHUNG DER PARTIKELGRÖßE, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF	73
TAB. 7.7: MITTELWERT DES POLYDISPERSITÄTSINDEX, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF	73
TAB. 7.8: STANDARDABWEICHUNG DES POLYDISPERSITÄTSINDEX, DPPC LIPOSOMEN MIT UND OHNE WIRKSTOFF	74
TAB. 7.9: MITTELWERT DER PARTIKELGRÖßE	74
TAB. 7.10: STANDARDABWEICHUNG DER PARTIKELGRÖßE	74
TAB. 7.11: MITTELWERT DES POLYDISPERSITÄTSINDEX	75
TAB. 7.12: STANDARDABWEICHUNG DES POLYDISPERSITÄTSINDEX.....	75
TAB. 7.13: PERMEATION FLUCONAZOLHÄLTIGER F-DPPC LIPOSOMEN	75
TAB. 7.14: PERMEATION FLUCONAZOLHÄLTIGER F-DPPC LIPOSOMEN - MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	76
TAB. 7.15: PERMEATION FLUCONAZOLHÄLTIGER DPPC LIPOSOMEN.....	76
TAB. 7.16: PERMEATION FLUCONAZOLHÄLTIGER DPPC LIPOSOMEN - MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	76

TAB. 7.17: PERMEATION VON NA-FLUORESCEIN, NA-FLUORESCEIN LÖSUNG	77
TAB. 7.18: PERMEATION VON NA-FLUORESCEIN, NA-FLUORESCEIN LÖSUNG - MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	77
TAB. 7.19: PERMEATION VON NA-FLUORESCEIN, F-DPPC LIPOSOMEN	78
TAB. 7.20: PERMEATION VON NA-FLUORESCEIN, F-DPPC LIPOSOMEN - MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	78
TAB. 7.21: PERMEATION VON NA-FLUORESCEIN, DPPC LIPOSOMEN	79
TAB. 7.22: PERMEATION VON NA-FLUORESCEIN, DPPC LIPOSOMEN- MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	79
TAB. 7.23: ARZNEISTOFFKONZENTRATION FLUCONAZOL AUS DER MIKROEMULSION	80
TAB. 7.24: ARZNEISTOFFKONZENTRATION FLUCONAZOL AUS DER MIKROEMULSION - MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	81
TAB. 7.25: MENGE DER KORNEOZYTEN PRO TAPE STRIP, FLUCONAZOLHÄLTIGE MIKROEMULSION – STRIP 0-30	82
TAB. 7.26: MENGE DER KORNEOZYTEN PRO TAPE STRIP, FLUCONAZOLHÄLTIGE MIKROEMULSION – STRIP 30-60	83
TAB. 7.27: MENGE DER KORNEOZYTEN PRO TAPE STRIP, FLUCONAZOLHÄLTIGE MIKROEMULSION – STRIP 0-30 - MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	84
TAB. 7.28: MENGE DER KORNEOZYTEN PRO TAPE STRIP, FLUCONAZOLHÄLTIGE MIKROEMULSION – STRIP 30-60 - MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	85
TAB. 7.29: PENETRATION VON NA-FLUORESCEIN, DPPC UND F-DPPC LIPOSOMEN	86
TAB. 7.30: PENETRATION NA-FLUORESCEIN IN DIE EPIDERMIS, F-DPPC LIPOSOMEN	86
TAB. 7.31: PENETRATION NA-FLUORESCEIN IN DIE EPIDERMIS, NAFL-LÖSUNG	86
TAB. 7.32: PENETRATION VON NA-FLUORESCEIN IN DAS STRATUM CORNEUM UND IN DIE VIALE EPIDERMIS, NICHT GEBÜNDELTE STRIPS DER DPPC LIPOSOMEN.....	87
TAB. 7.33: PENETRATION VON NA-FLUORESCEIN IN DAS STRATUM CORNEUM UND IN DIE VIALE EPIDERMIS, GEBÜNDELTE STRIPS DER DPPC LIPOSOMEN	87
TAB. 7.34: PENETRATION VON NA-FLUORESCEIN IN DAS STRATUM CORNEUM UND IN DIE VIALE EPIDERMIS, GEBÜNDELTE UND NICHT GEBÜNDELTE STRIPS DER DPPC LIPOSOMEN - MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG	88

9 ABSTRACT

Deutsch

Liposomen sind ideale dermale Arzneistoffträger, da sie in der Lage sind, die Bioverfügbarkeit eingebauter Arzneistoffe zu verändern. Monofluorierte Phospholipide können für die Analyse mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie verwendet werden. Das Ziel der Diplomarbeit war es, F-DPPC Liposomen als Arzneistoffträger zu verwenden und die Arzneistoffpermeation und -penetration mit Hilfe der Franz Zell Technik und mittels Tape Stripping Versuchen zu bestimmen.

Zum Vergleich und zur Beurteilung der Ergebnisse wurden neben F-DPPC auch DPPC Liposomen, eine Mikroemulsion und eine Na-Fluorescein Lösung (NaFI) hergestellt. Fluconazol und Na-Fluorescein wurden als Modellwirkstoffe in die Formulierungen eingearbeitet. Weiters wurde die Arzneistoffpenetration über das Stratum corneum hinaus in die lebende Epidermis mit dem Kryo-Mikrotom untersucht. Die F-DPPC Liposomen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Arzneistoffpermeation und -penetration im Vergleich mit den DPPC Liposomen. Im Vergleich mit der NaFI-Lösung konnte nur beim Tape Stripping ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die längerfristige Stabilität von Liposomen ist oft ungenügend. Aufgrund dieser Problematik wurde die physikalische Stabilität von Liposomen über einen Beobachtungszeitraum von 14 Wochen überprüft. Es folgte ein Vergleich zwischen wirkstofffreien und wirkstoffhaltigen DPPC Liposomen.

Die Partikelgröße der 2%igen DPPC Liposomen mit und ohne Fluconazol zeigte über den gesamten Beobachtungsraum eine ausgezeichnete Stabilität. Die Inkorporation von Fluconazol bewirkte eine deutliche Verkleinerung des Polydispersitätsindex. Jedoch wurde zwei Wochen nach der Herstellung ein Auskristallisieren des Fluconazols beobachtet. Demgegenüber zeigten die wirkstofflosen Liposomen deutliche Schwankungen in der Größenverteilung (PDI).

Abschließend kann festgehalten werden, dass F-DPPC sich als Arzneistoffträger eignet und hohe Arzneistoffpermeations- und -penetrationseigenschaften an der Haut zeigte.

English

Liposomes are perfect excipients because they can change the bioavailability of incorporated drugs. Monofluorinated phospholipids can be analysed by the ^{19}F -NMR spectroscopy. Therefore, the aim of the diploma thesis was to use F-DPPC for liposome preparation and to determine the permeation- and penetration behavior of incorporated drugs by Franz cell technology and Tape Stripping studies.

We prepared F-DPPC and DPPC liposomes, a microemulsion and a sodium fluorescein solution and compared their properties. As active substances fluconazol and sodium fluorescein were incorporated. Furthermore, the drug penetration across the stratum corneum into the living epidermis was investigated with the cryo-microtome. There were no significant differences between the permeation and the penetration of the drugs from F-DPPC and DPPC liposomes. However, a significant difference between the sodium fluorescein solution and F-DPPC liposomes was monitored.

The long-term stability of liposomes is mostly insufficient. Therefore, the physical stability of drug-free and drug-containing DPPC liposomes was observed over a period of 14 weeks.

The particle size of the 2% DPPC liposomes with and without fluconazole showed an excellent stability over the entire observation period. The incorporation of fluconazole resulted in a reduction of the polydispersity index whereas the liposomes without fluconazol showed significant variations in the particle size distribution (PDI). However, after two weeks from preparation, fluconazole precipitated.

In conclusion it can be stated that F-DPPC is suitable as excipient and indicated high skin permeation- and penetration qualities of the drugs.

10 Lebenslauf

Name: Ruth Franziska KIEWELER

Ausbildung

10/2007 – heute Diplomstudium der Pharmazie,
Universität Wien

09/2005-06/2007 Bundesgymnasium Wien 9,
Wasagasse 10, 1090 Wien
Schwerpunkte:

- humanistischer Gymnasialzweig

09/1998 – 06/2005 Bundesgymnasium und -realgymnasium GRG 21,
Franklinstraße 21, 1210 Wien
Schwerpunkte:

- humanistischer Gymnasialzweig

09/1994 – 06/1998 Volksschule Lavantgasse 21, 1210 Wien

Berufserfahrung

Sommersemester
2015 Tutorin für die Übungen zur magistralen Arzneimittelher-
stellung

Wintersemester
2014 Tutorin für die Übungen zur magistralen Arzneimittelher-
stellung

07/2013 Ferialpraktikum Apotheke am Schöpfwerk, 1120 Wien

07/2012 Ferialpraktikum Apotheke am Schöpfwerk, 1120 Wien

07/2011 Ferialpraktikum Apotheke am Schöpfwerk, 1120 Wien

02/2011-04/2011 Praktikum Apotheke in der Wiesen, 1230 Wien

07/2008 Ferialpraktikum Apotheke Zur Mariahilf, 1230 Wien

Fähigkeiten & Kompetenzen

Wintersemester
2014 Peer-Mentoring für Studienanfänger

EDV-Kenntnisse: Microsoft Office 2010 (Excel, Power Point, Word, Outlook)
Absolvierte Kurse am Zentralen Informatikdienst der Uni-
versität Wien:

- Excel Einführung
- LaTeX Einführung

Sprachkenntnisse Deutsch (Muttersprache)
Englisch (Maturaniveau)

Führerschein B, Code111 (=125ccm)