

**NEUE MISCHMIZELLARE SYSTEME AUF BASIS VON
PHOSPHOLIPIDEN ZUR SOLUBILISIERUNG SCHLECHT-
WASSERLÖSLICHER ARZNEISTOFFE**

**DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADS
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT
ZU KIEL**

**VORGELEGT VON
CHRISTOPHER RUPP**

KIEL 2010

Referent: Prof. Dr. H. Steckel
Korreferent: Prof. Dr. K. Schwarz
Tag der Disputation: 19.07.2010
Zum Druck genehmigt: 19.07.2010

gez. Prof. Dr. L. Kipp
(Dekan)

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

ORIGINALBEITRÄGE

Rupp, C., Steckel, H. und Müller, B.W., 2010; Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures; International Journal of Pharmaceutics, 387, 120–128

Rupp, C., Steckel, H. und Müller, B.W., 2010; Solubilization of poorly water soluble drugs by mixed micelles based on hydrogenated phosphatidylcholine; International Journal of Pharmaceutics, 395, 272-280

Rupp, C., Müller, B.W. und Steckel, H., 2010; Stability of Mixed Micelles composed of hydrogenated phosphatidylcholine and sucrose esters; Pharmaceutical Research (submitted)

Rupp, C., Müller, B.W. und Steckel, H., 2010; A novel method to determine the cmc in mixed micellar systems based on hydrogenated phosphatidylcholine; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (submitted)

ABSTRACTS/ POSTERBEITRÄGE

C. Rupp und B.W. Müller; Mixed micelles based on Phospholipids structural influence of sucrose esters on micelle formation; 6th World Meeting of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, Spain (2008)

C. Rupp und B.W. Müller; Mixed micelle formation of polyglycerol esters and hydrogenated phosphatidylcholine; 5th German-Polish Symposium “New Challenges for Pharmaceutical Sciences”, Poznań, May 16th, 2009

Rupp, C., Steckel, H. und Müller, B.W.; A promising model for the formation of mixed micelles composed of a surfactant and

phosphatidylcholine; 7th World Meeting of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valletta, Malta (2010)

Rupp, C., Steckel, H. und Müller, B.W; Solubilization of poorly soluble drugs by means of mixed micellar systems; 7th World Meeting of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valletta, Malta (2010)

Meinen Eltern und
Geschwistern gewidmet

Es ist nicht genug, zu wissen, man muß auch anwenden; es ist nicht genug, zu wollen, man muß auch tun.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung	3
2	Theoretischer Teil	5
2.1	Organisationsverhalten amphiphiler Substanzen	5
2.1.1	Einleitung und Grundlagen	5
2.1.2	Mizellbildung.....	9
2.1.3	Vesikel und Liposomen	11
2.1.4	Vesikel-Mizell-Transformierungen	13
2.2	Mischmizellen (MM)	15
2.2.1	Einleitung.....	15
2.2.2	Klassische Mischmizellen	17
2.2.3	Mischmizellen als Arzneistoffträger	19
2.2.4	Suche nach neuen MM.....	24
2.2.4.1	Einleitung und Status Quo	24
2.2.4.2	Theoretischer Ansatz einer MM-Bildung	29
2.3	Schlecht lösliche Arzneistoffe	31
2.3.1	Einführung	31
	Methoden zur Verbesserung der Sättigungslöslichkeit.....	32
2.3.2	Modifizierung der festen Phase	32
2.3.3	Chemische Modifizierung	36
2.3.4	Methoden der Lösungsvermittlung	37
3	Methoden und Materialien	45
3.1	Phospholipide (PL)	45
3.1.1	Gesättigte Phospholipide.....	46
3.1.2	Ungesättigte Phospholipide	47
3.1.3	PEGylierte Phospholipide	49
3.2	Tenside	50
3.2.1	Tenside mit keiner spezifischen Trennung im Molekülbau	50

3.2.1.1	Polysorbate	50
3.2.1.2	Solutol HS 15	51
3.2.1.3	Blockcopolymere	51
3.2.1.4	Gallensalze.....	52
3.2.2	Tenside mit spezifischer Trennung im Molekülbau	54
3.2.2.1	Sucroseester	54
3.2.2.2	Polyglycerolester	54
3.2.3	Zusammenfassung und Kurzübersicht	56
3.3	Schlecht wasserlösliche Arzneistoffe.....	58
3.3.1	Diazepam und Tetrazepam	58
3.3.2	Estradiol.....	59
3.3.3	Erythromycin.....	60
3.3.4	Cinnamate	60
3.4	Herstellung von Mischmizellen (MM)	61
3.4.1	Filmbildungsmethode	62
3.4.2	Direkte Dispergierung	62
3.4.3	Bewertung der Methoden	63
3.5	Herstellung von MM-Systemen zur Untersuchung der Langzeitstabilität	65
3.6	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	66
3.6.1	Einleitung.....	66
3.6.2	Messprinzip	66
3.6.3	Theorie der DLS und Autokorrelation	68
3.6.4	Messaufbau.....	71
3.6.5	Auswertungsparameter: Polydispersitätsindex	71
3.7	UV/VIS Spektroskopie	73
3.7.1	Licht-Transmission.....	73
3.8	Fluorimetrie	74
3.9	Oberflächenspannungsmessungen.....	75
3.10	H-NMR-Spektroskopie	76

3.11	Viskositätsmessungen	77
3.11.1	Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde	77
3.11.2	Vibrations-Viskosimeter.....	78
3.12	Lyophilisation.....	78
3.13	Trübungspunkt-Bestimmung	79
3.14	Photographie zur Visualisierung	80
	Praktischer Teil	81
4	Evaluierung spezieller Methoden.....	81
4.1	DLS-Methode.....	81
4.1.1	Volumengewichteter Durchmesser	81
4.1.2	Messdauer eines DLS-Experiments	83
4.1.3	Probenpräparation für die DLS-Messungen	84
4.1.4	Viskositätseinfluss auf DLS-Messungen.....	86
4.1.5	Angewandte Messeinstellungen	90
4.2	Hochdruckhomogenisation	91
4.2.1.1	Einleitung und Methode	91
4.2.1.2	Ergebnisse und Zusammenfassung.....	91
5	Entwicklung und Charakterisierung von neuartigen Mischmizellen	94
5.1	Phosphatidylcholine + Tenside mit keiner spezifischen Trennung im Molekülbau.....	94
5.1.1	Kombinationen von hPC bzw. uPC mit Gallensalzen	94
5.1.1.1	Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen	94
5.1.1.2	DLS-Experimente	98
5.1.1.3	CMC-Bestimmungen	101
5.1.2	Kombination von Phosphatidylcholinen mit Polysorbaten	103
5.1.2.1	Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen	103
5.1.2.2	DLS-Experimente	105
5.1.2.3	CMC-Bestimmungen	107
5.1.3	Kombination von Phosphatidylcholinen mit Solutol HS 15 bzw. Poloxamer 188	109

5.1.3.1	Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen	109
5.1.3.2	DLS-Experimente	112
5.1.3.3	CMC-Bestimmungen	113
5.2	Phosphatidylcholine + Tenside mit spezifischer Trennung im Molekülbau	114
5.2.1	Kombinationen von hydriertem Phosphatidylcholin mit Polyglycerolestern	114
5.2.1.1	Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen	114
5.2.1.2	DLS-Experimente	117
5.2.1.3	CMC-Bestimmungen	120
5.2.2	Kombinationen von hydriertem Phosphatidylcholin mit Sucroseestern	122
5.2.2.1	Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen	122
5.2.2.2	DLS-Experimente	126
5.2.2.3	CMC-Bestimmungen	129
5.3	Einfluss der Hydrophilie der Kopfgruppe des Tensids	132
5.3.1	Trübungspunktmessungen zur Evaluierung des Ausmaßes der Hydrophilie der Kopfgruppe	134
5.4	Einfluss des PL-Typs auf die Fähigkeit, MM mit Sucroselaurat zu bilden	136
5.4.1	Abhängigkeit der Fettsäurekettenlänge des PC-Typs auf die Ausbildung von klaren Lösungen mit SL	136
5.4.2	Vergleich von unterschiedlichen PL-Typen mit Einfluss von ungesättigten Fettsäuren auf eine MM-Bildung mit SL	146
5.4.3	Einfluss von PEGylierten PL auf die MM-Bildung mit SL	149
5.5	Zusammenfassung: Struktureinfluss des Tensids bzw. PL auf die Fähigkeit zur Bildung von MM	152
6	Solubilisierung von wasserunlöslichen Wirkstoffen	156
6.1	Einleitung	156
6.2	Evaluierung der Beladungsmethode	157
6.3	Solubilisierung von Diazepam	159

6.4	Solubilisierung von Tetrazepam.....	163
6.5	Solubilisierung von Estradiol	166
6.6	Solubilisierung von Erythromycin durch MM (UV/VIS-Studie)	169
6.7	Einfluss der Wirkstoffsolubilisierung auf die Größe der MM.....	171
6.8	Zusammenfassung: AS-Solubilisierung.....	179
7	Vorstellung einer neuen Methode zur Bestimmung der CMC von MM.....	181
7.1	Einleitung	181
7.2	CMC-Bestimmungen	182
7.2.1	MM-System hPC+SL WF0.5 ± Diazepam	182
7.2.2	MM-System DPPC+SL WF0.5 ± Diazepam	186
8	Ternäre MM-Systeme	191
8.1	Einleitung	191
8.2	Kombination zweier Tenside mit hPC.....	192
8.2.1	Physikochemische Eigenschaften	192
8.2.2	Solubilisierung von hydrophoben Arzneistoffen.....	198
8.3	Kombination zweier Phospholipide mit SL	201
9	Stabilität von MM-Systemen.....	206
9.1	Langzeitstabilität	206
9.1.1	Einleitung.....	206
9.1.2	Einfluss der Lagerzeit auf die Klarheit von MM-Lösungen und die Größe der Mischmizellen.....	207
9.1.3	Einfluss der Lagerzeit auf Solubilisierungskapazität von MM-Systemen für den Modellarzneistoff Diazepam	217
9.1.3.1	Einleitung und Versuchsplanung.....	217
9.1.3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	217
9.1.4	Zusammenfassung und Diskussion: Langzeitstabilität	221
9.2	pH-Stabilität.....	223
9.2.1	Einleitung.....	223
9.2.2	Klassische MM-Systeme	224
9.2.3	pH-Einfluss auf das MM-System hPC und SL	228

9.2.4	Zusammenfassung	228
9.3	Stabilität gegenüber verschiedenen Additiva	236
9.3.1	Einleitung und Versuchsplanung	236
9.3.2	Ergebnisse und Diskussion	237
9.3.3	Zusammenfassung	247
9.4	Lyophilisation von MM-Systemen	249
9.4.1	Einleitung und Versuchsplanung	249
9.4.2	Ergebnisse und Diskussion	250
9.5	Lokalisation von Arzneistoffmolekülen in ausgewählten MM-Systemen	254
9.5.1	Einleitung und Versuchsplanung	254
9.5.2	Ergebnisse und Diskussion	255
9.6	Trübungspunkt-Optimierung	262
9.6.1	Einleitung und Versuchsplanung	262
9.6.2	Ergebnisse und Diskussion	262
10	Diskussion: Mischmizellen oder Vesikel?.....	271
11	Zusammenfassung der Arbeit.....	274
12	Abstract.....	278
13	Anhang	282
13.1	Abkürzungsverzeichnis und Begriffsklärung	282
13.2	Weitere verwendete Substanzen	284
13.3	HPLC-Methoden	284
13.3.1	Diazepam.....	285
13.3.2	Tetrazepam.....	285
13.3.3	Estradiol	286
13.4	Colorimetrische Bestimmung von Erythromycin.....	286
14	Literaturverzeichnis	288

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Neu entwickelte Arzneistoffe weisen zunehmend eine erhöhte Lipophilie auf. Die besseren Strukturaufklärungen der biochemischen Ziele der Arzneistoffe bestimmen in zunehmendem Ausmaß die Arzneistoff-Entwicklung (Perrett und Venkatesh, 2006). Dies führt dazu, dass hoch potente Arzneistoffe stärker hydrophobe Bereiche aufweisen müssen, um etwa eine verbesserte Zellpermeabilität zu erreichen oder aber um mit hydrophoben Zielstrukturen, wie hydrophoben Rezeptordomänen, wechselwirken zu können (Lipinski et al., 2001; Perrett und Venkatesh, 2006; Torchilin, 2007). Bis zu 70% der neu synthetisierten Wirkstoffmoleküle weisen eine schlechte Wasserlöslichkeit auf (Keck et al., 2008). Mehr als 40% der Arzneistoffe, die ein High Throughput Screening erfolgreich durchlaufen haben und folglich einen potentiell hohen pharmakologischen Nutzen besitzen, erreichen nie die Stufe einer Formulierungsentwicklung, da ihre Wasserlöslichkeit zu gering ist (Perrett und Venkatesh, 2006; Li und Zhao, 2007; Torchilin, 2007). Eine ausreichende Wasserlöslichkeit ist Voraussetzung, damit die Arzneistoffmoleküle sich in den wässrigen Körperflüssigkeiten und im Blut als wässrigem Transportmedium lösen können. Die geringe Wasserlöslichkeit dieser Arzneistoffe resultiert oft in einer schlechten Absorption und einer geringen Bioverfügbarkeit (Amidon et al., 1995; Löbenberg und Amidon, 2000; Torchilin, 2007).

Eine Vorgabe zu der Erstellung dieser Arbeit war, ein Trägersystem für schwer wasserlösliche Arzneistoffe zu entwickeln, dass auf Phospholipiden basiert. Phospholipide (PL) sind nicht toxische, parenteral sehr gut verträgliche amphiphile Hilfsstoffe, die in vielen unterschiedlichen Arzneistoff-haltigen Formulierungen, wie Liposomen oder parenteralen Fettemulsionen eingesetzt werden. Die Bilayer-Struktur der Liposomen bedingt jedoch, dass der im

Inneren eingeschlossene „Laderaum“ eine hydrophile, wässrige Phase einschließt, so dass Liposomen nicht als effektives Transportvehikel für schlecht lösliche Arzneistoffe genutzt werden können. Hydrophobe Moleküle können nur zwischen die hydrophoben Domänen der Bilayer intergriert werden, was zu Membrandestabilisierungen führt (Sharma und Sharma, 1997). PL sind aufgrund ihrer zylindrischen Molekülgeometrie selbst nicht in der Lage Mizellen bilden, jedoch können sie zusammen mit Gallensalzen thermodynamisch stabile Mischmizellen (MM) bilden. Solche mizellaren Systeme weisen eine hydrophobe Kernregion auf, die mit schwer wasserlöslichen Arzneistoffen beladen werden kann. Am weltweiten Pharmamarkt gibt es verschiedene Arzneimittel, die MM als Transportvehikel zur oralen oder parenteralen Applikation von hydrophoben Arzneistoffen nutzen. Jede dieser Formulierungen basiert auf klassischen Gallensalz/Lecithin-Mischmizellen. Seit der ersten Patentierung der Gallensalz/Lecithin-MM im Jahr 1965 (Lappe und Eikermann, 1965) folgten weitere Patente, die klassische MM zur oralen, parenteralen und topischen Applikation beschreiben. Im Bereich der Parenteralia haben sich Arzneimittel mit oberflächenaktiven Hilfsstoffen wie Cremophor EL oder alkoholischen Lösungsmitteln zur Löslichkeitsverbesserung hydrophober Arzneistoffe als eher schlecht verträglich erwiesen (Lorenz et al., 1982; Gaudy et al., 1987), da es u.a. zu allergischen Reaktionen kam. Die klassischen MM zeigen dagegen eine gute Verträglichkeit, die auf die Verwendung der gut verträglichen PL zurückzuführen ist (Steffen und Schmidt, 1978; Martin und Marriott, 1981). Die Gallensalz/Lecithin-MM weisen jedoch auch mehrere Nachteile auf. Eine Veränderung der Konzentration, z.B. durch Verdünnung einer Lösung aus klassischen MM, kann zu einer Umwandlung in der Morphologie der MM oder zu einer Transformation zu Vesikeln (Schurtenberger et al., 1984) führen. Ebenso verhält es sich bei Variation des eingesetzten Verhältnisses von Phospholipid zu Gallensalz. Sobald sich der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in dem verwendeten Phospholipid ändert, kommt es zu einer Transformation von MM zu Vesikeln. Zudem

lassen sich Gallensalz/Lecithin-MM nur bei Verwendung ungesättigter Phosphatidylcholins herstellen (Cohen und Carey, 1991; Booker et al., 1992), was die Zugabe eines Antioxidans erfordert.

Trotz dieser Nachteile der Gallensalz/Lecithin-MM ist bis heute kein alternatives MM-System am Pharmamarkt präsent, das andere Tenside als Gallensäuren verwendet. In der Literatur finden sich mehrere Studien, die den Versuch beschreiben, alternative Tenside mit PL zu optisch klaren MM-Lösungen zu kombinieren. Jedoch ist bisher kein System beschrieben worden, in dem ein relativ hoher Anteil von etwa 50% an natürlichen, wasserunlöslichen PL von einem Tensid in einer optisch klaren, kolloidalen Lösung solubilisiert wird (Jackson et al., 1982; Goni et al., 1986; Paternostre et al., 1988; Lasch et al., 1990; Hammad, 1998; Hunien, 2005).

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein neuartiges Mischmizellensystem auf Basis von Phospholipiden (PL) zu entwickeln. Nachdem bisher nur die Gruppe der Gallensäuren – mit einem für Tenside eher untypischem steroidalem Grundgerüst – dafür bekannt ist, mischmizellare Lösungen mit hohen Anteilen an natürlichen PL zu bilden, soll herausgefunden werden, ob andere Tenside als die Gallensalze ebenfalls zur MM-Bildung mit PL befähigt sind. Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit das Organisationsverhalten der wasserunlöslichen, membranbildenden Phospholipide durch eine Kombination mit einem geeigneten Tensid dahingehend beeinflusst werden kann, dass eine MM-Bildung forciert wird. Eine systematische Auswahl strukturell unterschiedlicher Tensidklassen soll Aufschluss über den Einfluss der Molekülgeometrie der Tenside auf die Fähigkeit geben, möglichst große Mengen an natürlichem PL in Form einer klaren mischmizellaren Lösung zu solubilisieren. Daneben sollen strukturell unterschiedliche Phospholipide auf ihre Fähigkeit untersucht werden, Mischmizellen mit bestimmten Tensiden zu bilden. Zum einen sollte der Anteil an physiologisch

sehr gut verträglichen PL möglichst hoch sein, zum anderen sollten auch bei höheren Gesamtkonzentrationen noch isotrope klare Lösungen gebildet werden können. Da die zu entwickelnden MM-Systeme neben schwer wasserlöslichen Arzneistoffen hohe Anteile an wasserunlöslichen PL in einem wässrigen System enthalten, muss der Stabilität bzw. Stabilisierung solcher Systeme besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Die fertige, stabile Formulierung soll den hydrophoben Arzneistoff in Mischmizellen von einem hydrodynamischen Durchmesser im unteren nm-Bereich (< 50 nm) eingeschlossen halten, wobei möglichst eine streng monomodale Partikelgrößenverteilung vorliegen soll.

2 Theoretischer Teil

2.1 Organisationsverhalten amphiphiler Substanzen

2.1.1 Einleitung und Grundlagen

Das Ziel dieser Arbeit ist, das Organisationsverhalten der Phospholipide dahingehend zu beeinflussen, dass eine Mischmizellbildung (Kapitel 2.2) aus zwei unterschiedlichen Komponenten bzw. Spezies (PL+Tensid) forciert werden kann. Damit ist die Kenntnis der verwendeten Stoffklassen eine Grundvoraussetzung für ein Erreichen dieses Ziels.

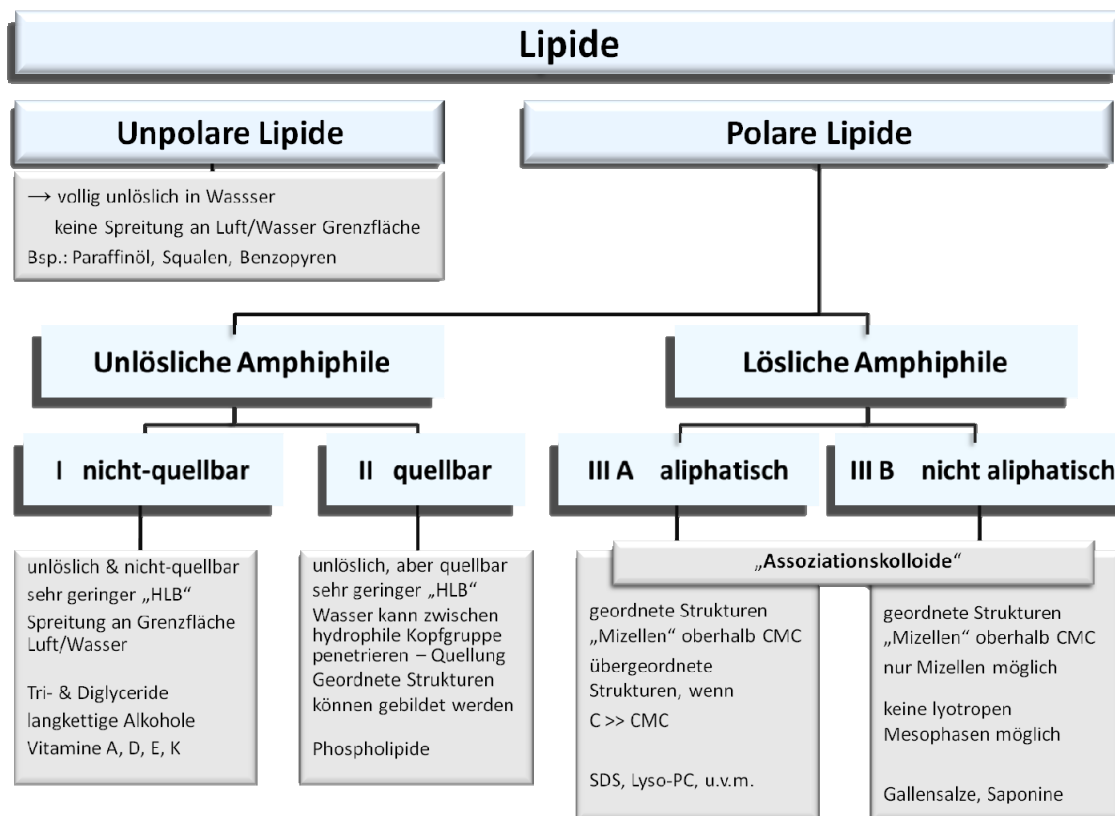


Abbildung 2.1: Einteilung der Lipide (nach Small, 1968)

Der Oberbegriff Lipide ist eine Sammelbezeichnung für ganz oder zumindest größtenteils wasserunlösliche (hydrophobe) Naturstoffe, die sich aufgrund ihrer geringen Polarität gut in hydrophoben bzw. lipophilen Lösungsmitteln lösen. Zu den Lipiden gehören die verschiedensten

Stoffklassen wie Fettsäuren, Triglyceride, Wachse, Glycerolipide (wie PL), Eicosanoide oder Isoprenoide (wie z.B. Gallensäuren). Die etablierte Klassifizierung der einzelnen Lipidklassen nach Small (1968) liegt dieser Arbeit zu Grunde und ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Mischmizellen im eigentlichen Sinne bestehen aus zwei unterschiedlichen amphiphilen Substanzen, die beide zur Klasse der polaren Lipide zählen. Nach Small bestehen Mischmizellen aus mehr als einer lipid-artigen Komponente (Small, 1968a; Carey und Small, 1970). Eine Komponente ist wasserunlöslich (jedoch in Wasser quellbar), die andere Komponente ist wasserlöslich (Klasse IIIA oder IIIB nach Carey und Small (1970) und Lichtenberg et. al (1983)). Amphiphil bedeutet, dass ein Molekül sowohl einen hydrophilen, polaren Bereich aufweist, als auch einen apolaren, hydrophoben Bereich. Eine solche Beschaffenheit verleiht diesen Substanzen die Eigenschaft, je nach Bau und Struktur der entsprechenden Bereiche, geordnete Assoziate auszubilden, sofern sie von einem wässrigen Milieu umgeben sind. Natürliche Phospholipide (Klasse II) sind auf der einen Seite wasserunlöslich (Byrne und Chapman 1964; Luzzati et al., 1968), auf der anderen Seite bedingt die hydrophile Kopfgruppe eine Penetration von Wasser zwischen einzelne PL-Moleküle, so dass es zu einer Quellung kommt (Carey und Small, 1970; Huang und Mason, 1986). Dabei bleiben die hydrophoben Acylreste der Fettsäuren zueinander orientiert und ein Kontakt zur hydrophilen Wasserphase ist ausgeschlossen. Ein Transfer der Lipidmoleküle mit ihren hydrophoben Bereichen in eine Wasserphase würde zu einer energetisch ungünstigen Entropieabnahme führen, da Wassermoleküle im Bereich der Acyl- bzw. Alkyl-Reste zu einer Umorientierung und damit einer Einbuße an H-Brücken gezwungen würden. Folge des sog. hydrophoben Effektes (Tanford, 1978) ist eine spontante Ausbildung von übergeordneten Strukturen, die zum Ziel haben, die Gesamtentropie des wässrigen Systems möglichst hoch zu halten. Die gebildeten Assoziate oder Überstrukturen werden sich folglich derart ausbilden, dass die Berührungsfläche zwischen den hydrophoben Ketten und dem umgebenden Wasser möglichst klein ist, um so keinen energetisch ungünstigen Zwang auf das Wasser auszuüben (Tanford, 1979; Chandler, 2005). Für die unterschiedlichen Phospholipide sind ebenso verschiedene

Möglichkeiten einer Assoziatbildung realisierbar, welche neben dem strukturellen Aufbau der PL auch von äußeren Bedingungen abhängt. Der hydrophobe Effekt bedingt auch, dass sich die löslichen Amphiphilen der Klasse IIIA und IIIB in Wasser ab einer bestimmten Konzentration zu Mizellen zusammenlagern (vgl. Kapitel 2.1.2). Die Selbstorganisation von löslichen Amphiphilen im wässrigen Milieu ist in der Regel ein spontaner und thermodynamisch getriebener Prozess, der wesentlich von der Molekülgeometrie der amphiphilen Komponente abhängt. Das Organisationsverhalten einer amphiphilen Komponente (Spezies) zu geordneten Strukturen wurde eingehend untersucht (Bangham, 1968; Luzzati et al., 1968; Israelachvili et al., 1976; Israelachvili et al., 1977; Menon et al., 1996; Corkery, 2002; Hu et al., 2006) und es wurde ein molekulares Packungs-Parameter-Konzept von Israelachvili et al. (Israelachvili et al., 1976) vorgestellt, welches in Abbildung 2.2 dargestellt ist. Dieses Konzept basiert auf dem geometrischen Molekülbau einer amphiphilen Substanz und ermöglicht eine Vorhersage über die Gestalt und Größe einer übergeordneten Assoziatbildung mehrerer Moleküle derselben Spezies. Der Packungsparameter PP ist eine dimensionslose Größe, die das Verhältnis zwischen lipophilen Volumen (v) des hydrophoben Restes zur Länge des lipophilen Restes (l) und der equilibrierten Querschnittsfläche der polaren Kopfgruppe (A_0) in der Grenzfläche ausdrückt. An dieser Stelle ist anzumerken, dass es sich bei der „equilibrierten“ Querschnittsfläche A_0 der polaren Kopfgruppe nicht um eine einfache geometrische Größe handelt, sondern um einen „sich im Gleichgewicht befindlichen“ Parameter, der unter thermodynamischen Gesichtspunkten von verschiedenen Bedingungen wie der Temperatur oder der Salzkonzentration abhängt (Segota und Tezak, 2006). Das Ausmaß der gebildeten Hydrathülle ist durch die Hydrophilie der Kopfgruppe determiniert und bedingt die Größe des Terms A_0 ebenso entscheidend. In der Literatur ist weiterhin beschrieben, dass selbst die Art des hydrophoben Restes (l) Einfluss auf die tatsächliche „equilibrierte“ Kopfgruppe nimmt (Nagarajan, 1985). Auch die Packung der hydrophoben Bereiche untereinander kann Einfluss auf den Term A_0 nehmen.

$$PP = \frac{V}{A_o \cdot l}$$

V = Volumen des hydrophoben Molekülteils
 A_o = Querschnittsfläche der equilibrierten hydrophilen Kopfgruppe
 l = Länge der lipophilen Kette

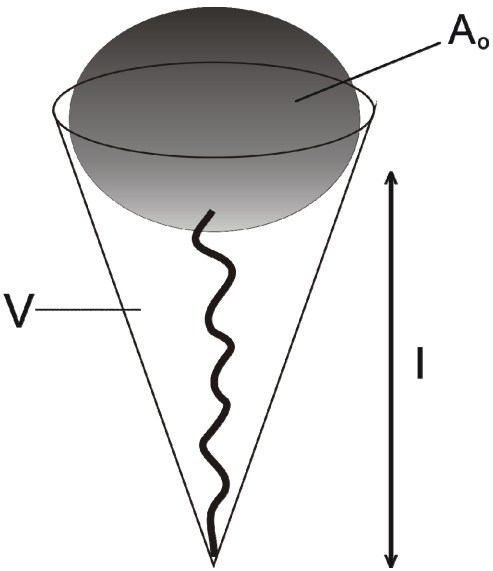


Abbildung 2.2: Packungsparameterkonzept (PPC) nach Israelachvili

Packungsparameter	Form des Querschnitts	
<1/3	Konus 	Kugelförmige Mizelle
1/3 - 1/2	Kegelstumpf 	Stäbchen-Mizelle
1/2 - 1	Kegelstumpf 	Flexibler Bilayer
≈ 1	Zylinder 	Planarer Bilayer

Abbildung 2.3: Packungsparameter und die zugehörigen zu erwartenden Assoziatformen

Amphiphile Moleküle können sich zu verschiedensten Assoziaten, wie Mizellen (PP < 0.5), Inversmizellen, flüssigkristallinen Strukturen, Bilayer-Lamellen, Vesikel oder Liposomen zusammenlagern. Eine Übersicht der

Aggregatformen in Abhängigkeit von PP liefert die Abbildung 2.3. Die Anwendung des PPC ermöglicht eine Vorhersage, ob sich aus einer Vielzahl amphiphiler Moleküle einer Spezies eher Mizellen (vgl. Kapitel 2.1.2) oder aber Vesikel (vgl. Kapitel 2.1.3) bilden, die beide zu den wichtigsten, durch Selbstaggregation gebildeten Assoziaten zählen.

2.1.2 Mizellbildung

Eine Mizellbildung, d.h. eine Bildung von Assoziationskolloiden aus löslichen amphiphilen Molekülen, lässt sich durch den beschriebenen hydrophoben Effekt erklären. Nach Einbringen einer geringen Menge an amphiphilen, grenzflächenaktiven Substanzen in ein mit Wasser gefülltes Gefäß werden sich diese an der Grenzfläche Luft/Wasser und Gefäßwand/Wasser anlagern. Die hydrophilen Molekülteile stehen dabei in Wechselwirkung mit dem Dipol Wasser, wohingegen die hydrophoben Molekülteile dem Wasser möglichst abgewandt orientiert sind. Schon diesem Phänomen liegt der hydrophobe Effekt zu Grunde, der auf einem ungünstigen Entropieverlust des Wassers beim Lösen einer (teil-) hydrophoben Substanz beruht. Mit einem Anstieg der Tensidkonzentration werden die Grenzflächen mit Tensid-Monomeren abgesättigt. Dies hat zur Folge, dass zwangsläufig mehr Tensidmoleküle in der Wasserphase molekulardispers gelöst werden. Damit ist jedoch ein ordnender Prozess für die Wassermoleküle verbunden, die gezwungen sind, die hydrophoben Bereiche abzuschirmen, indem sie sich entsprechend umorientieren. Diejenigen Wassermoleküle, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den hydrophoben Molekülen befinden, haben eine geringere Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken als die übrigen freien Wassermoleküle (Némethy, 1966). Je mehr lösliche amphiphile Moleküle sich im Inneren der Lösung aufhalten, umso stärker sinkt die Entropie des Systems. Für lösliche Amphiphile (Klasse IIIA und IIIB nach Small) resultiert der hydrophobe Effekt in einer Mizellbildung, wenn der Entropieverlust des Wassers ab einer bestimmten Konzentration einen kritischen Wert erreicht hat. Bereits vor Erreichen der ersten Mizellbildung führt die erzwungene Ordnung der Wassermoleküle zu einer Zusammenlagerung prä-mizellarer Aggregate (Dimerbildung oder Trimerbildung). Dabei treten nun Van-der-Waals'sche Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Molekülteilen in

den Vordergrund. Beim Mizellbildungsprozess drängen die hydrophoben Molekülteile des Amphiphils, getrieben vom Wasser, zunehmend zusammen und bilden ein Aggregat (Mizelle), welches im Inneren über Van-der-Waals Kräfte und nach außen über polare Wechselwirkungen zwischen Wasser und polarem Molekülteil stabilisiert wird. Der Mizellbildungsprozess läuft spontan ab, d.h. ihm liegt ein thermodynamisches Gleichgewicht zugrunde. Die treibende Kraft dabei ist die Freisetzung von Wassermolekülen, die zuvor mit den amphiphilen Molekülen assoziiert waren, wodurch die Entropie des Wassers wieder zunimmt. Die Entropieänderung ist trotz der Zusammenlagerung mehrerer Moleküle positiv, da die Wassermoleküle, die sonst die einzelnen Tensidmoleküle solvatisieren müssten, mehr Freiheitsgrade erlangen, um sich gegenseitig mit Wasserstoffbrücken zu binden. Eine mizellare Lösung stellt ein System dar, dem ein stöchiometrisches Gleichgewicht zu Grunde liegt. Folglich steht der Anteil an freien Monomeren des amphiphilen Stoffes mit dem zu Mizellen assoziierten Anteil im Gleichgewicht. Der beschriebene Bereich, bzw. der Konzentrationsbereich ab dem eine Mizellbildung nachweisbar wird, wird als „Kritische Mizellbildungskonzentration“ (CMC) bezeichnet. In der Literatur wird die CMC meist als „Phasen-Separations-Modell“ beschrieben, bei dem sich, nach Erreichen der CMC, neben einer Monomeren-Phase eine kolloidale mizellare Phase als Pseudo-Phase bildet (Wennerström und Lindman, 1979). Andererseits gibt es das sog. „equilibrium model“, welches die Mizellbildung als chemisches Gleichgewicht betrachtet. So konnte eine Mizellbildung auch unterhalb den Werten der CMC nachgewiesen werden (Wennerström und Lindman, 1979). Die CMC ist daher als die Konzentration anzusehen, bei der die Mizellen stabiler und nachweisbar werden. Mizellare Lösungen sind optisch klar, isotrop und thermodynamisch stabil. Mit Erreichen der CMC ändern sich einige physikochemische Eigenschaften der Lösung sprunghaft. Dazu zählen Eigenschaften wie Lichtstreuung, Leitfähigkeit, Oberflächenspannung, Gefrierpunkt oder auch das Einschlussvermögen (Solubilisierung) für apolare Substanzen (Leuenberger, 2002), die teilweise zur Bestimmung der CMC genutzt werden. Die Gestalt der Mizellen ist wiederum von den geometrischen Gegebenheiten des amphiphilen

Moleküls (Kettenlänge, Kopfgruppe, Ladung, Konzentration) abhängig, worüber teilweise das PPC Aufschluss gibt.

2.1.3 Vesikel und Liposomen

Amphiphile Moleküle können sich in Wasser nicht nur zu Mizellen organisieren; abhängig von Ihrer Molekülgeometrie (vgl. PPC), der Konzentration, den äußeren Bedingungen wie der Temperatur (Schurtenberger et al., 1986) oder der Art der Herstellungsmethode (Segota und Tezak, 2006) können auch vesikuläre Assoziate gebildet werden. Vesikel sind durch eine Doppelmembran, einem sogenannten Bilayer, charakterisiert, wobei mindestens ein geschlossener Bilayer einen kugelförmigen Vesikel umgrenzt. Die Doppelmembran ist so beschaffen, dass die polaren Kopfgruppen des Amphiphils nach außen ragen. Der Vesikel erscheint dadurch sowohl nach außen als auch nach innen hydrophil. In der Folge bildet sich im Inneren eine hydrophile (wässrige) Phase. Liposomen sind Vesikel, die aus Phospholipiden aufgebaut sind. Nach ihrem Entdecker, A.D. Bangham (1961), „sind Liposomen die kleinsten künstlichen Vesikel von sphärischer Form, die aus natürlichen, nicht-toxischen Phospholipiden und Cholesterol aufgebaut sind.“ Heutzutage versteht man unter dem Begriff Vesikel alle kugelförmigen Assoziate, die einen oder mehrere lamellare Bilayer aufweisen und von unterschiedlichsten Amphiphilen gebildet werden (Segota und Tezak, 2006). Vesikel oder auch Liposomen können nach Ihrer Größe, der Anzahl der Bilayer oder der Oberflächenladung charakterisiert werden. Die Abbildung 2.4 zeigt Vesikel als Liposomen, die nach unterschiedlichen Größen klassifiziert sind. Im Gegensatz zu Mizellen, die spontan gebildet werden, muss bei der Formierung von Vesikeln in der Regel ein externer Energieeintrag erfolgen, damit sich entsprechende vesikuläre Strukturen überhaupt bilden (Segota und Tezak, 2006). Eine spontane Vesikelbildung wurde bisher nur in Einzelfällen gefunden, so für bestimmte kationische Vesikel oder auch in Abhängigkeit vom gewählten pH-Bereich beim Dispergieren von ungesättigten Fettsäuren wie Ölsäure („Ufaomes“) in Wasser (Gebicki und Hicks, 1973).

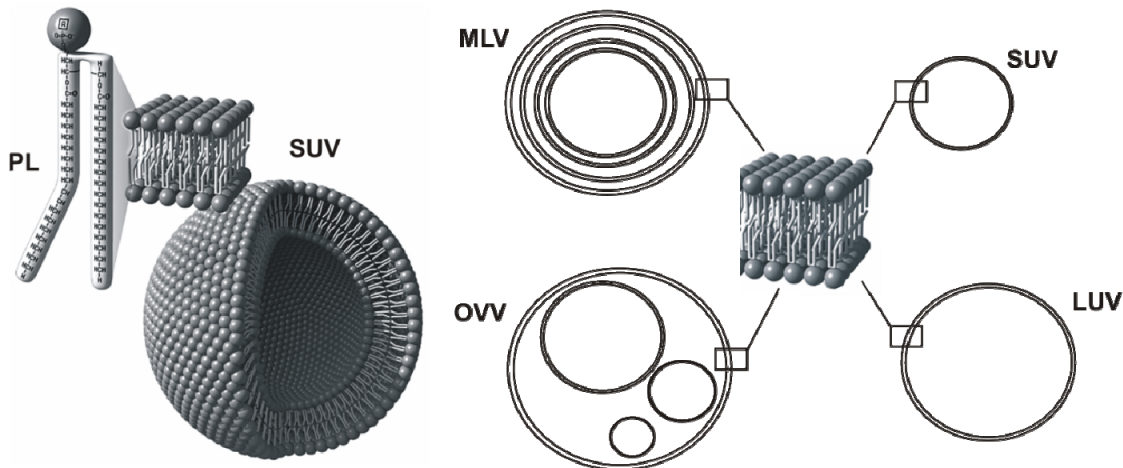


Abbildung 2.4: Vesikel (hier Liposomen) klassifiziert nach Ihrer Größe und der Anzahl an Bilayern. PL = Phospholipid, SUV = kleiner unilamellarer Vesikel, LUV = großer unilamellarer Vesikel, MLV = multilamellarer Vesikel, OVV = oligo-vesikulärer Vesikel

Herstellungsmethoden für Vesikel sind daher die Hochdruck-Extrusion (Mayer et al., 1986), die Druck-Filtration, die Ultraschallbehandlung von lamellaren Phasen oder die Filmbildungsmethode (Bangham, 1968) mit Evaporation des organischen Lösungsmittels sowie das Verfahren der Detergenzdialyse (Wacker und Schubert, 1998; Ollivon et al., 2000). Der hohe Energieeintrag bedingt jedoch, dass die unter Stress gebildeten Vesikel metastabile Systeme darstellen. Die Größe der gebildeten Vesikel hängt in erster Linie vom Packungsparameter und damit der kritischen Kettenlänge des verwendeten Amphiphils ab. Liegt der PP zwischen 0.5-1, so sind Bilayer und Vesikel energetisch favorisiert, soweit die equilibrierte Kopfgruppe nicht zu groß ist. Kleine unilamellare Vesikel (SUV) haben oft eine sehr hohe Membranspannung, da der Krümmungsradius des Bilayers zu hoch ist, so dass es zu einer energetisch begünstigten Umwandlung zu MLV kommt (Regev und Guillemet, 1999). Eine begünstigte Vesikelbildung geht mit einem $PP > 0.5$ einher, der durch eine kleine Kopfgruppe und einen längeren lipophilen Rest begünstigt wird (Segota und Tezak, 2006). Durch Mischungen von unterschiedlichen Typen amphiphiler Moleküle lassen sich unilamellare Vesikel herstellen. Mischungen von kationischen und anionischen Tensiden mit je zwei hydrophoben Ketten (Marques et al., 2003) oder ionische Tenside mit Cotensiden (del Burgo et al., 2007), wie auch Phospholipide mit Gallensalzen (Schurtenberger et al., 1984;

Schurtenberger et al., 1986; Andrieux et al., 2009) können in der Bildung von vesikulären Strukturen resultieren. Liposomen als vesikuläre Strukturen weisen im Vergleich zu Mizellen eine hydrophile innere Kernregion auf, die in wässrigen Systemen mit der wässrigen Phase gefüllt ist. Damit bieten Liposomen als Transportvehikel im inneren „Laderaum“ keinen Platz für schlecht wasserlösliche Arzneistoffe. Diese müssen zwischen die Bilayer-Membran integriert werden, was zu Membrandestabilisierungen führen kann (Sharma und Sharma, 1997; Crosasso et al., 2000; Krishnadas et al., 2003). Sofern dennoch größere Anteile an schlecht wasserlöslichem Arzneistoff integriert werden sollen, müssen multilamellare Liposomen eingesetzt werden. Diese wiederum weisen eine deutlich erhöhte Partikelgröße auf und damit verschiedene negative Effekte. So werden größere Liposomen schneller aus dem Blut eliminiert und der EPR-Effekt (erhöhte Permeabilität und Retention) tritt ab einer bestimmten Größe ab etwa 200 nm nicht mehr auf, so dass die Vorteile eines passiven drug targetings z.B. in der Tumorthherapie entfallen (Mayer et al., 1989; Marjan und Allen, 1996). Der EPR-Effekt ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Haag und Kratz, 2006) und sei hier nur kurz erläutert: Die Pathophysiologie bestimmter Krankheiten, wie der Krebserkrankung, bringt mit sich, dass es im erkrankten Bereich (z.B. Tumorgewebe) zu einer Veränderung bestimmter Gewebstypen kommt. So unterscheidet sich das Gefäßendothel eines Tumors von gesundem Endothelgewebe durch eine starke Fenestrierung, die dazu führt, dass die Blutgefäße des Tumors porös erscheinen. Dadurch können bestimmte Makromoleküle und Nanopartikel in das Tumorgewebe eindringen, während sie das Gefäßendothel gesunder Zellen nicht passieren können. Liposomen müssen kleiner 200 nm sein, um diesen EPR-Effekt nutzen zu können; für größere Liposomen (oder Partikel) sind die Lücken im Gefäßendothel zu klein (Gabizon, 1995; Marjan und Allen, 1996; Nagayasu et al., 1999). Der EPR-Effekt wurde erstmals von den Japanern Yasuhiro Matsumura und Hiroshi Maeda beschrieben und entdeckt (Maeda et al., 1984).

2.1.4 Vesikel-Mizell-Transformierungen

Sobald amphiphile Moleküle unterschiedlicher Spezies nebeneinander in einer wässrigen Phase vorliegen, kann es zu Vesikel-Mizell-Umwandlungen

kommen. Dieses Phänomen wurde ausgiebig an vesikulären Systemen untersucht, denen Tenside zur (Membran-)Solubilisierung hinzugegeben wurden (Lichtenberg et al., 1983; Vinson et al., 1989; Edwards et al., 1993; Ollivon et al., 2000; Ahyayauch et al., 2006). Es kommt zur Integration der Tensidmoleküle in die Bilayer der Vesikel, die ab einer bestimmten Konzentration gesättigt sind. Diese Konzentration ist sowohl von der Art des PL als auch von den Eigenschaften des Tensids abhängig. Oberhalb dieser Sättigung kommt es zum Abschälen von Mischmizellen (MM), bis bei deutlichem Überschuss an Tensid eine vollständige Solubilisierung der Vesikel(membranen) durch die Tensidmoleküle stattgefunden hat. Zuvor liegt ein Koexistenzbereich von Mischvesikeln und Mischmizellen vor. Die Integration der Tensidmoleküle bedingt eine Neuorientierung in der Vesikelmembran, so dass es zu einer Änderung der spontanen Krümmung in der Membran kommt. Ab einer gewissen Konzentration an Tensid wird die bisherige Assoziatgestalt (Vesikel) energetisch ungünstig und das System strebt einer Neuordnung entgegen (Andelman et al., 1994). Für Mischungen aus membranbildenden Amphiphilen (Lipidklasse II, PL) und mizellbildenden Amphiphilen (Lipidklassen IIIA,B) unterteilt Lichtenberg (1985) die Vesikel-Mizell-Umwandlung, nach steigender Tensidkonzentration, in drei Bereiche (Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 2000) ein. Es entsteht ein Vesikelbereich, in dem Mischvesikel (bzw. Vesikel) und Tensidmonomere nebeneinander vorliegen; ein Koexistenzbereich, bei dem neben Mischvesikeln und Tensidmonomeren auch Mischmizellen vorliegen und ein dritter, sog. Mischmizellbereich, indem die Tensidmoleküle eine vollständige Solubilisierung der (Misch)Vesikel erreicht haben, so dass nur Mischmizellen neben Tensidmonomeren vorhanden sind. Wie breit die jeweiligen Bereiche sind, hängt von den geometrischen Eigenschaften der eingesetzten amphiphilen Moleküle ab. Sofern Mischungen vorliegen, die eine Existenz von Vesikeln energetisch ungünstig erscheinen lassen, könnte eine Kombination aus Tensid und membran-bildendem Amphiphil zu Mischmizellen energetisch evtl. auch bei geringeren Konzentrationen vorteilhaft sein. Mit diesem Modell ließe sich folglich auch eine Vorhersage machen, wie gut ein mizellbildendes Tensid in der Lage ist, Mischmizellen mit membranbildenden Amphiphilen zu formen. Allerdings wurden in den

Untersuchungen, die dem Modell zu Grunde liegen, meist zuerst Vesikel hergestellt und diese dann mit Tensiden versetzt. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Tenside und die Phospholipide (als membranbildende Amphiphile) bereits zusammen in die wässrige Phase eingewogen. Schließlich soll ein Mischmizellensystem entwickelt werden, welches sich bestenfalls industriell mit möglichst geringem Kosten- und Zeit-Aufwand herstellen lässt.

2.2 Mischmizellen (MM)

2.2.1 Einleitung

Wie in Kapitel 2.1.1 bereits erwähnt, bestehen Mischmizellen nach Small aus mindestens zwei Komponenten, von denen zumindest eine ein lösliches Amphiphil (Abbildung 2.1) darstellt (Small, 1968a). Weiterhin definieren Carey und Small (1970) eine Mischmizelle als jede Mizelle, die aus mehr als einer lipid-artigen Spezies besteht, wobei selbstverständlich eine der verwendeten chemischen Spezies selbst fähig sein muss, allein in Wasser Mizellen zu bilden (Lipide der Klasse III, Abbildung 2.1) (Carey und Small, 1970). Eher hypothetisch werden vier Klassen von MM-Typen nach Carey und Small (1970) eingeteilt, wie in Tabelle 2.1 dargestellt ist. Genaue Untersuchungen zu mischmizellaren Systemen mit eindeutiger Kenntnis über den detaillierten morphologischen Aufbau gibt es in erster Linie nur zu den klassischen Gallensalz/Lecithin-MM (vgl. Kapitel 2.2.2). Wie die Tabelle 2.1 aufzeigt, ist es nach damaligem Kenntnisstand von Carey und Small nur den Gallensalzen vorbehalten, Lipide in einem höheren molaren Anteil in Form von MM zu solubilisieren. Der MM-Typ C ist für pharmazeutische Vehikelsysteme von größtem Interesse, da hier neben Tensiden, welche aus Verträglichkeitsgründen stets Nachteile aufweisen, sehr gut verträgliche Phospholipide zum Einsatz kommen. Die Ausführungen von Small et al. zeigen jedoch, dass zum damaligen Zeitpunkt noch nicht von einem effektiven MM-System nach Typ C, auf Basis von aliphatischen Tensiden (IIIA), die Rede sein kann. So ist Lyso-Phosphatidylcholin lediglich in der Lage einen molaren Anteil von 0.05 an Lecithin zu solubilisieren (Saunders, 1957; Small, 1968a; Gale und

Saunders, 1971), d.h. bis zu 20 Moleküle Lyso-PC werden benötigt um ein Molekül Lecithin zu solubilisieren (Small, 1968a). Daher stellt sich die Frage, ob in so einem Fall tatsächlich der Begriff Mischmizelle zutreffend ist. Vielmehr handelt es sich um eine Aufnahme von geringen Mengen an Lecithin in Mizellen aus Lyso-PC. Der MM-Typ D beschreibt einfache Mischungen aus unterschiedlichen, jedoch löslichen Amphiphilen, von denen jedes bereits selbst in der Lage ist, isotrope, klare mizellare Systeme zu bilden.

*Tabelle 2.1: MM-Typen nach Small und Carey (1970); maximale Anteile an Lipid, die sich mit einem Tensid zu einer klaren MM-Lösung kombinieren lassen (*nimmt stark mit steigenden Kettenlänge des Alkohols ab)*

Typ	Komponenten der MM; mit Beispiel	molarer Anteil Solubilisat/Tensid
A	MM mit unpolaren Lipiden (IIIA,B)	
	aliphatische Tenside (IIIA) + n-Decan Gallensalz (IIIB) + n-Decan	0,2-0,3 (IIIA) 0,00013 (IIIB)
B	MM mit polaren, unlöslichen nicht-quellbaren Lipiden	
	aliphatische Tenside (IIIA) + n-Decanol (I) Gallensalz (IIIB) + n-Decanol (I)	0,55 (IIIA + I) 3* (IIIB + I)
C	MM mit polaren, unlöslichen quellbaren Lipiden (II)	
	Lyso-PC (IIIA) + Lecithin (II) Gallensalz (IIIB) + Lecithin (II) = klassische MM	0,05 (IIIA + II) 2,0 (IIIB + II)
D	MM mit polaren, löslichen Amphiphilen (2 Tenside)	-

In den meisten wissenschaftlichen Arbeiten wird unter dem Begriff Mischmizelle das klassische Mischmizellensystem bestehend aus Gallensalzen und Lecithin aufgefasst, was eine Kombination von einer wasserunlöslichen Komponente und einem wasserlöslichem Tensid meint (Ueno et al., 1989; Hammad, 1998; Hammad und Müller, 1998c; Wacker und Schubert, 1998; Funari et al., 2001; Dongowski et al., 2005;

Sznitowska, 2008). Daher soll auch für die Nomenklatur dieser Arbeit unter Mischmizellen, im eigentlichen Sinne, ein System aus löslichen Amphiphilen (Lipid Klasse III A oder III B) und nicht wasserlöslichen, aber quellbaren Amphiphilen (Lipid Klasse II) verstanden werden (analog MM-Typ C, Tabelle 2.1).

2.2.2 Klassische Mischmizellen

Die klassischen Mischmizellen aus Gallensalzen und Lecithin sind sowohl die am besten untersuchten, als auch die am häufigsten eingesetzten MM-Systeme. In-vitro hergestellte Gallensalz/Lecithin-MM ahmen die in-vivo im Intestinaltrakt bereitgestellten MM gleicher oder ähnlicher Zusammensetzung nach. Im Dünndarm helfen diese MM bei der Verstoffwechslung von Fetten. So werden die bei der Lipolyse anfallenden Hydrolyseprodukte der Triglyceride wie Monoglyceride oder Fettsäuren sehr effektiv von den Gallensalz/Lecithin-MM solubilisiert (Small et al., 1969). Daraus lässt sich auch ihr Einsatz in pharmazeutischen Formulierungen ableiten, wo MM als Trägervehikel für schlecht-wasserlösliche Arzneistoffe eingesetzt werden. Die Abbildung 2.5 veranschaulicht Modellvorstellungen zur Struktur von Gallensalz/Lecithin-MM nach Small (Small et al., 1966; Small, 1968a), Mazer (Mazer et al., 1980) und die „neuere“ Vorstellung des Modells nach Hjelm (Hjelm et al., 1988). Das weit verbreitete und anerkannte Modell für die Gestalt von Gallensalz/Lecithin-MM wurde 1980 von Mazer vorgestellt und ist analog zu dem „disk“-Modell von Small (1968). Mazer's „mixed disk“-Modell beschreibt die Gallensalz-Moleküle nicht nur am äußeren Perimeter der „disk“ (wie bei Small), sondern einzelne Gallensalz-Moleküle sind auch im Inneren der PC-Matrix der „mixed disk“ lokalisiert (Abbildung 2.5). Im Inneren dieser MM sind die Gallensalz-Moleküle zwischen den PC-Molekülen zueinander orientiert, wobei je zwei Moleküle über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Die Untersuchungen von Hjelm et al. an den klassischen MM tragen der Tatsache Rechnung, dass die Gallensalz/Lecithin-MM je nach Zusammensetzung, also Gallensalz/Lecithin-Verhältnis, und Gesamtkonzentration in ihrer Gestalt, Form und Dimension variieren (Shankland, 1970; Mueller, 1981; Lichtenberg et al., 1983; Hjelm et al.,

1988). Es konnten zwei unterschiedliche MM-Typen nachgewiesen werden, deren Gestalt vom molaren Verhältnis von Gallensalz/Lecithin abhängig ist (Mueller, 1981).

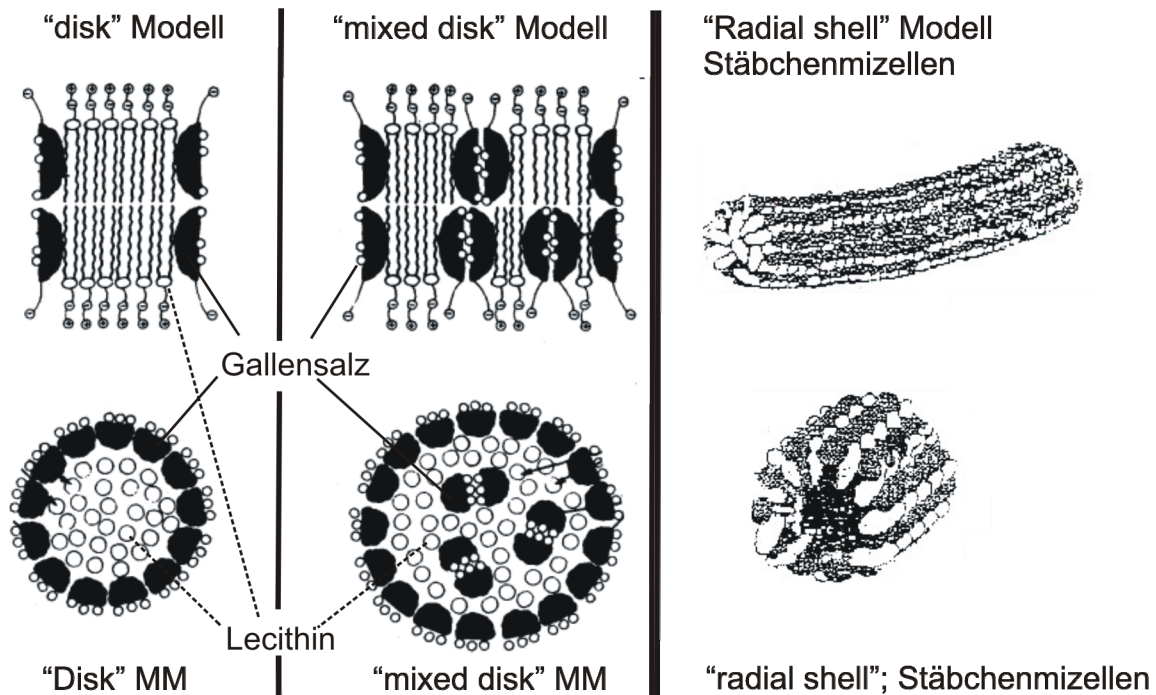


Abbildung 2.5: Modellvorstellungen zur Struktur von "klassischen" MM

Die Umwandlung tritt etwa bei einem Gallensalz/Lecithin Verhältnis von 2:1 ein. Gallensalz-reiche MM sind eher zentrisch-globulär aufgebaut und weisen eine nahezu sphärische Form auf (Mueller, 1981). Lecithin-reiche MM sind ähnlich wie die postulierte mixed-disk aufgebaut, doch sie erreichen Durchmesser von über 50 nm. Außerdem sind diese klassischen Mischmizellen aus Gallensalzen und Lecithin sehr empfindlich gegenüber Veränderungen der Gesamtkonzentration (Mueller, 1981), was als Trägersystem für Wirkstoffe von entscheidendem Nachteil sein kann. Auch Hjelm's Untersuchungen an MM-Systemen aus Glycocholsäure und Lecithin bestätigen, dass die Morphologie der MM stark von der Gesamtkonzentration an Lipiden abhängt (Hjelm et al., 1988). Nach Hjelm wird ein „radial shell“ Modell für die Gestalt von den Gallensalz/Lecithin MM wahrscheinlicher, bei dem die MM als lange flexible Stäbchen vorliegen. Neben diesen strukturellen Diskrepanzen der MM-Morphologie können Systeme aus PC (Lecithin) und Gallensalzen auch vesikuläre anstatt

mischmizellare Assoziate ausbilden (vgl. 2.1.4). Mischmizellen werden (in höheren Konzentrationen) nur gebildet, wenn der Anteil an ungesättigtem PC (uPC) im verwendeten Lecithin hoch genug ist (Cohen und Carey, 1991; Booker et al., 1992). In den wässrigen Gallensalz/Lecithin-Systemen steigt der Anteil an Vesikeln wenn das Lecithin einen hohen Anteil gesättigter Fettsäuren an der sn-1 und sn-2 Position trägt. Dagegen sind Mischmizellen die dominierende Spezies wenn hier vorwiegend mehrfach ungesättigte FS vorliegen (Cohen und Carey, 1991; Booker et al., 1992). Es wurde vermutet, dass die gesättigten PC sich besser in den geordneten Bilayer eines Vesikels integrieren lassen und dass die stärker ungesättigten PC sich in den flexibleren Mischmizellen besser verteilen, wo die PC Moleküle weniger geordnet gepackt sind als in Bilayern (Cohen und Carey, 1991).

2.2.3 Mischmizellen als Arzneistoffträger

Klassische Gallensalz/Lecithin-MM stellen ein weit verbreitetes Trägersystem für schlecht wasserlösliche Arzneistoffe von hoher pharmazeutischer Relevanz dar. Seit der ersten Patentierung 1965 durch die Firma Nattermann (Lappe und Eikermann, 1965), welche noch vor der ersten wissenschaftlichen Beschreibung der MM durch Small (Small et al., 1966) anerkannt war, werden Mischmizellen in den unterschiedlichsten Bereichen der Pharmazie eingesetzt. Neben dem Einsatz als Parenteralia (Steffen und Schmidt, 1978) wurden MM auch zur oralen (Amedee-Manesme et al., 1991) und topischen Applikation (Pittrof und Supersaxo, 1991) patentiert. Die größte Bedeutung haben Mischmizellen für die parenterale Applikation von schlecht wasserlöslichen Wirkstoffen, die als wässrige Injektionszubereitungen zum Einsatz kommen. Am Pharmamarkt sind hier die MM-Präparate Konakion[®] MM (Fachinformation, 1998), Cernevit[®] und früher auch Valium[®] MM (Mattila und Suistomaa, 1984; Fachinformation, 1999) zu nennen. Die Verwendung mischmizellarer Systeme reduziert viele der unerwünschten Begleiterscheinungen (Steffen und Schmidt, 1978; Teelmann et al., 1984) wie Thrombophlebitis, Injektionsschmerz (Mattila und Suistomaa, 1984), allergische Reaktionen oder Hämolyse, die herkömmliche Parenteralia durch Zusätze wie organische Lösungsmittel oder Tenside (z.B. Cremophor EL oder Tween

80) mit sich bringen. Die gute Verträglichkeit der MM ist vor allem auf die Anwesenheit der Phospholipide zurückzuführen. Es gibt wohl keinen oberflächenaktiven amphiphilen Hilfsstoff, der so gut verträglich ist wie Phospholipide (WHO, 1963; WHO, 1973). PL wurden bereits in der ersten sicheren metabolisierbaren Fett-Emulsion zur parenteralen Applikation eingesetzt (Schuberth und Wretling, 1961; Floyd, 1999), so dass hier etwa 50 Jahre Erfahrung im Bereich der Parenteralia die gute Verträglichkeit belegen. So wird bei den klassischen Mischmizellen der stark lytische oder hämolytische Effekt der Gallensalze durch den Zusatz an PC (Lecithin) unterdrückt (Steffen und Schmidt, 1978; Martin und Marriott, 1981). Im Vergleich zu reinen Gallensalzlösungen wirkt die Anwesenheit der PL protektiv auf intestinale Membranen (Gibaldi und Feldman, 1970). Die Firma Baxter vertreibt ein Lyophilisat auf Basis von Glycocholsäure+Lecithin-MM, welches neben wasserlöslichen auch fettlösliche Vitamine enthält und zur parenteralen Ernährung eingesetzt wird (Cernevit[®]; Fachinformation). Weiterhin werden MM zur parenteralen Applikation von nichtsteroidalen Antiphlogistika (Ferro und Steffen, 1985; Ferro und Steffen, 1988), Benzbromaron und β -Sitosterol (Eckert, 1983) eingesetzt. Neben dem Einsatz in den unterschiedlichen Parenteralia bewähren sich MM auch in der oralen Darreichungsform, wobei sie u.a. als Absorptionenhancer fungieren (Muranishi et al., 1979; Muranushi et al., 1980a; Muranushi et al., 1980b; Amedee-Manesme et al., 1991; Schreier et al., 2000; Mrestani et al., 2010). So ist beispielsweise für Lipid-Surfactant-Mischmizellen gefunden worden, dass diese die intestinale Absorption von Makromolekülen wie Heparin deutlich erhöhen, was durch in-vivo Studien belegt ist (Taniguchi et al., 1980). Die mischmizellaren Systeme sollen bereits in sehr geringer Konzentration zu einer deutlichen Steigerung der intestinalen Membranpermeabilität führen, wobei die Absorption des (normalerweise nicht permeablen) Heparins enorm verbessert wird (Taniguchi et al., 1980).

Als Produkt am Pharmamarkt sei Konakion[®] MM zu nennen, welches das fettlösliche Vitamin K als Solubilisat auf MM-Basis enthält und zur oralen Applikation eingesetzt wird (Fachinformation, 1998). Die Tabelle 2.2 listet

Beispiele aus der Literatur, die die Fähigkeit von MM als Absorptionenhancer nach oraler Gabe (verschiedener Wirkstoffe) belegen.

Tabelle 2.2: MM als Absorptionenhancer nach oraler Darreichung

Wirkstoff	Author, Jahr
Cephaosporine (z.B. Cefpirom)	(Mrestani et al., 2010)
Vitamin K	(Amedee-Manesme et al., 1991)
Leuprorelin	(van Hoogdalem et al., 1989)
Aminoglykosid-Antibiotika	(Muranishi, 1985)
Hydrocortison	(Naylor et al., 1993)
Heparin	(Taniguchi et al., 1980)

Es existieren jedoch auch einzelne wissenschaftliche Berichte, die den absorptionssteigernden Effekt einer MM-Zubereitung nicht belegen, z.B. für den Arzneistoff Chinin (Dongowski et al., 2005). Neben der Verbesserung der Absorption können MM eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit erreichen, in dem sie die Löslichkeit eines Wirkstoffes verbessern, die zu einem limitierenden Faktor der Bioverfügbarkeit werden kann (vgl. Kapitel 2.3.1). Beispiele hierfür sind Paclitaxel (Alkan-Onyuksel et al., 1994) oder Retinoide (Li et al., 1996). Die Löslichkeit von Indometacin (Hammad und Müller, 1998a), Diazepam (Hammad, 1998), Clonazepam (Hammad und Muller, 1998) und Tetrabezepam (Hammad und Müller, 1998c) konnte durch Mischmizellen gesteigert werden. Neben einem absorptionssteigernden Effekt der MM nach oraler oder intravenöser Applikation, soll der Einsatz von MM (im Vergleich zu rein mizellaren Systemen) auch zu einer signifikant gesteigerten nasalen Absorption von Peptiden führen (Tengamnuay und Mitra, 1990).

Bis heute ist der genaue Mechanismus einer gesteigerten Permeation bzw. Absorption von hydrophoben Arzneistoffen aus mizellaren oder mischmizellaren Systemen durch intestinale Membranen nicht genau

aufgeklärt. Nach Applikation der Tensid-haltigen Systeme wird ein Teil der grenzflächenaktiven Moleküle auch die Grenzflächen vorhandener Lipidmembranen absättigen. Dadurch werden Tensidmonoschichten an der Lipidmembranoberfläche entstehen. Hier werden die Membranlipide mit der Lösung in Kontakt gebracht. Es existieren unterschiedliche Modellvorstellungen, wie eine erhöhte Permeation der hydrophoben Arzneistoff-Moleküle durch die Lipidmembran erreicht werden kann. Eine Vorstellung geht davon aus, dass es zunächst zu einer Kollision zwischen der mit AS-beladenen Mizelle bzw. MM und der Monoschicht an der Lipidmembran kommen muss, um dann einen Transport des hydrophoben AS-Moleküls über die Membran zu ermöglichen. Stark hydrophobe AS können hierbei nur über direkten Kontakt der Mizellen oder MM mit der Membran aufgenommen werden, da der hohe Verteilungskoeffizient der hydrophoben AS in diesen Systemen bedingt, dass die hydrophoben Moleküle nahezu ausschließlich im Inneren der MM lokalisiert sind (Karth et al., 1985a; Karth et al., 1985b; Hunien, 2005). Andere Arbeiten lassen vermuten, dass es zur Aufnahme der gesamten intakten Mizelle oder MM kommt (Hoffman, 1970).

Der Einsatz neuer analytischer Methoden wie die Anwendung der Fluoreszenz Mikroskopie im Zell-Modell führte in den letzten Jahren zu neuen Erkenntnissen. Verschiedene Studien berichten über eine Internalisierung von Mischmizellen oder Mizellen über einen endocytotischen Signalweg (Zastre et al., 2004; Dabholkar et al., 2006).

Hierbei könnten Phospholipide in MM als Mediator fungieren, die eine Internalisierung der gesamten MM einleiten (Engelmann und Wiedmann, 2010). Allerdings bedarf es hier noch weiterer Studien zur genauen Aufklärung. Andererseits kann es durch die Gegenwart oberflächenaktiver Substanzen auch zu einem Herauslösen von Membranbestandteilen wie Phospholipiden kommen, so dass diese Membranen durchlässiger für die hydrophoben Moleküle werden (Scott Swenson und Curatolo, 1992).

Eine Vielzahl der aktuellen Forschungsprojekte an mizellaren oder auch mischmizellaren Systemen (vgl. Kapitel 2.2.4.1) verfolgt das Ziel, die Bioverfügbarkeit von schlecht-wasserlöslichen Arzneistoffen, wie die von dem Zytostatikum Paclitaxel, nach oraler Gabe zu erhöhen (Dabholkar et

al., 2006; Bromberg, 2008; Kim et al., 2008). Es wird berichtet, dass die schlechte Bioverfügbarkeit des Paclitaxel nach oraler Gabe durch den im GIT stark exprimierten Efflux-Transporter p-Glycoprotein (P-gp) begründet ist, der zur „multi-drug-resistance“ führt. Das P-gp ist ein 170 kD großes transmembranäres Protein, das einen ATP abhängigen Pumpmechanismus unterhält. Sinn und Zweck dieses Proteins ist eine natürliche Detoxifikation von Zellen, indem es vorwiegend hydrophobe Substanzen aus dem Cytosol nach außen transportiert (Gottesman und Pastan, 1993; Gottesman und Ling, 2006). Es wird berichtet, dass Zellen über P-gp eine erhöhte Empfindlichkeit für bestimmte hydrophobe Substanzen, darunter verschiedene Zytostatika wie Paclitaxel, entwickeln können. Auf diese Weise werden diese Zellen dann „chemoresistent“, da das P-gp die Zytostatika aus der Zelle schleust. Arzneistoffsysteme, die auf Tensiden basieren, wecken zur Zeit die Erwartung, dieser Resistenz entgegenzukommen. Für bestimmte nicht-ionische Tenside wurde eine Inhibition des P-gp dokumentiert (Dintaman und Silverman, 1999; Bansal et al., 2009; Wempe et al., 2009). Auch für bestimmte MM-Systeme wurde eine Inhibition von P-gp bestätigt (Zastre et al., 2004; Dabholkar et al., 2006). Nicht zuletzt zeigen auch diese Erkenntnisse, dass die Entwicklung gut verträglicher mizellarer oder mischmizellarer Systeme ein vielversprechender Ansatz sein kann, um die Bioverfügbarkeit von schlecht-wasserlöslichen Arzneistoffen zu erhöhen. Bereits in älteren Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte Tenside in mizellaren Systemen die Aufnahme von hydrophoben Substanzen in das Innere von Zielzellen in stärkerem Ausmaß erhöhen als dieselben Tenside in einer Emulsion (Hoffman, 1970).

In der Pharmazie gibt es prinzipiell drei unterschiedliche flüssige bzw. halbfeste Trägersysteme für schlecht-wasserlösliche Arzneistoffe auf Basis von Lipiden und Tensiden (Abbildung 2.6). MM weisen im Vergleich zu Emulsionen eine höhere physikalische Stabilität und im Vergleich zu Mikroemulsionen eine geringere Tensidkonzentration auf, um nur wesentliche Vorteile der MM aufzuzählen. Weitere Unterschiede zeigt die Abbildung 2.6, sowie das Kapitel 2.3.4.

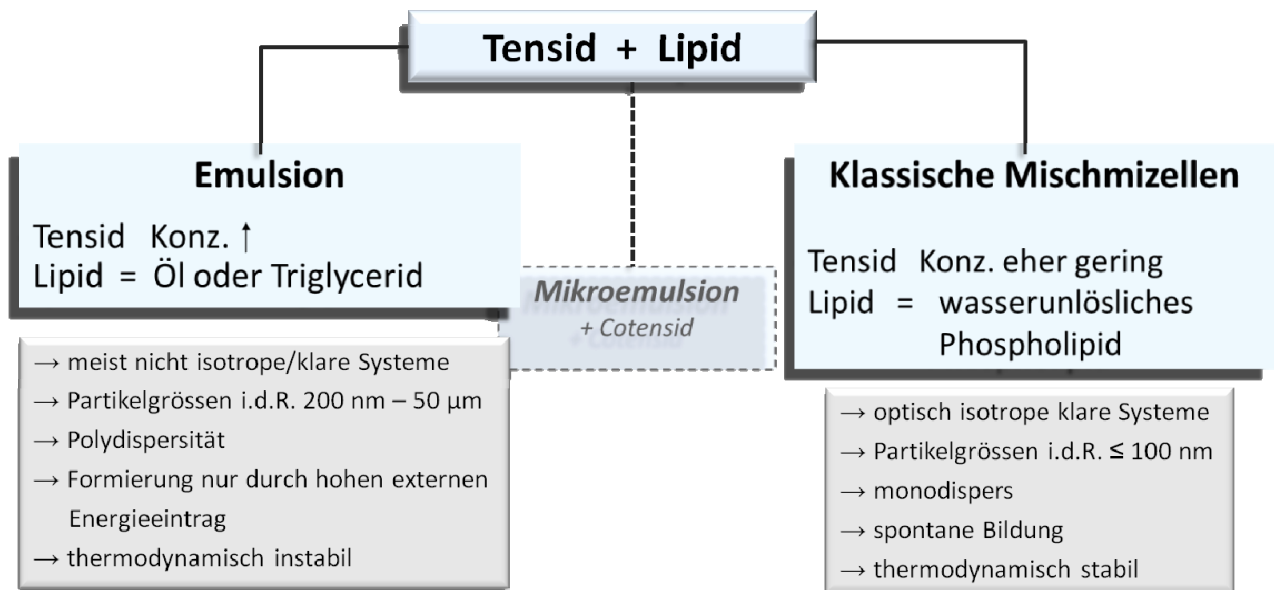


Abbildung 2.6: Pharmazeutische Trägersysteme auf Lipid-Basis für schlecht-wasserlösliche Wirkstoffe

Das Antimykotikum Amphotericin B bildet als amphiphiler Arzneistoff mit dem biologischen Tensid Cholesterol-Sulfat thermodynamisch stabile kolloidale Partikel im nm-Größenbereich, die von dem Erfinder als Mischmizellen bezeichnet werden (Lasic, 1992; Schreier et al., 2000).

2.2.4 Suche nach neuen MM

2.2.4.1 Einleitung und Status Quo

Auch wenn nach Carey und Small mehrere MM-Typen theoretisch möglich sind, d.h. aus unterschiedlichen Komponenten aufgebaute MM-Systeme denkbar sind (vgl. Kapitel 2.2.1 und Tabelle 2.1), so sind doch klassische Gallensalz/Lecithin-MM die einzigen MM-Systeme, die sich am Pharmamarkt durchgesetzt haben. Alle beschriebenen MM-Systeme sind neben Gallensalzen aus Lecithin (PC) oder Fettsäuren aufgebaut. Die Pharmaka, die MM als Vehikelsystem nutzen und am Pharmamarkt präsent sind, enthalten zudem ungesättigtes Lecithin, welches empfindlicher gegenüber oxidativen Abbau ist und einen Zusatz an (synthetischen) Antioxidantien erforderlich macht. Trotzdem ist das Interesse an mischmizellaren Systemen im Pharmabereich wohl auf die sehr gut verträglichen Phospholipide zurückzuführen. Jede menschliche Körperzelle

wird von einer Membran aus PL umschlossen. Eine allergische Reaktion oder Unverträglichkeit scheint damit für diese Stoffklasse sehr unwahrscheinlich. Die gute Verträglichkeit der PL begründet ebenso ihren Einsatz als liposomales Trägervehikel. Jedoch können Liposomen nicht als effektives Transportvehikel für schlecht-wasserlösliche Arzneistoffe genutzt werden (vgl. 2.1.3), da die gebildeten Bilayer eine wässrige Kernregion einschließen. Natürliche Phospholipide sind nicht in der Lage Mizellen zu bilden, was durch ihren Packungsparameter begründet ist. Aufgrund der kleinen Kopfgruppe und der sowohl langen als auch voluminösen Acylketten werden PP-Werte > 0.5 erhalten (vgl. Kapitel 2.1.1). Mit Hilfe des PPC lässt jedoch auch begründen, dass bestimmte (synthetische) Phospholipid-Moleküle Mizellen bilden können, sofern die lipophile Kette mit 6-8 C-Atomen entsprechend kurz ist (Hauser, 2000; Sehgal et al., 2003) oder aber Lyso-PL Moleküle mit nur einer lipophilen Kette vorliegen (Jeannet und Hässig, 1964; Gale und Saunders, 1971). Allerdings erhalten die PL Moleküle durch diese Veränderungen einen Tensid-Charakter, der zu den typischen Unverträglichkeiten (wie Hämolyse) vieler Tenside (Jeannet und Hässig, 1964) führt. Erste Überlegungen dieser Arbeit zielten darauf ab, Phospholipid-Moleküle so zu derivatisieren, dass die hydrophile Kopfgruppe vergrößert wird. Aus Untersuchungen an Alkylglykosiden mit derivatisierten Kopfgruppen ist bekannt, dass Mizellen als bevorzugte Spezies gebildet werden, sobald mehrere Zuckerbausteine den hydrophilen Kopf ausmachen (Milkereit et al., 2005; Milkereit, 2006). Nach dem PPC wird durch einen großen hydrophilen Kopf der Term A_0 groß und damit der PP-Wert klein, was zu einer Mizellbildung führen kann. Dieser Derivatisierungsansatz wäre auch für PL-Moleküle denkbar, indem entweder mehrere Zucker oder Polyglycerole synthetisch an die hydrophile Kopfgruppe „geknüpft“ werden. Jedoch scheiterte der Versuch diese Kopfgruppen-Derivatisierung von einer Firma vornehmen zu lassen. In der Folge ist es die Grundüberlegung hinter dieser Arbeit durch Zugabe geeigneter Tenside eine Mischmizellbildung mit möglichst hohem Anteil an natürlichem Phospholipid zu erreichen. Gewissermaßen wird die Erweiterung der hydrophilen Kopfgruppe der PL zur Forcierung einer Mizellbildung bereits genutzt. Aus PEGylierten Phospholipiden werden sogenannte sterisch stabilisierte Mischmizellen gebildet, die zwar noch

nicht am Pharmamarkt präsent, doch aber Gegenstand vieler Forschungsarbeiten sind (Belsito et al., 2001; Gao et al., 2002; Torchilin, 2002; Krishnadas et al., 2003; Lukyanov et al., 2003; Torchilin et al., 2003; Ashok et al., 2004; Koo et al., 2006). Interessanterweise wurden diese Mischmizellen aus Phospholipiden und PEGylierten PL durch eine Art Zufall gefunden. Man erreichte durch einen Anteil von etwa 2% an PEGylierten Phospholipiden eine sterische Stabilisierung, die die sog. „Stealth-Liposomen“ (Blume und Cevc, 1990) länger im Blut zirkulieren ließ. Bei einem bestimmten erhöhten Anteil an PEGylierten PL kam es jedoch zur Bildung von etwa 17 nm großen Mischmizellen aus natürlichen PL und PEGylierten PL. Je nach PEG-Kettenlänge variieren die Größen der MM, so bei DSPE-PEG um 17 nm und bei DSPE-PEG 5000 bei 24 nm (Ashok et al., 2004). Ab einem PC-Mol Anteil von 25% für DSPE-PEG und 40% für DSPE-PEG 5000 kommt es zu einem Anstieg der Partikelgröße und einer multiplen Größenverteilung (Ashok et al., 2004).

An erster Stelle dieser Arbeit stand die Frage, warum bisher kein alternatives Mischmizellensystem am Pharmamarkt vorgestellt wurde, dass neben Phospholipiden ein Tensid enthält, das nicht zur Klasse der Gallensalze zählt. Es wurde eine Literaturrecherche über wissenschaftliche Arbeiten zur Mischmizellbildung aus Tensiden und Phospholipiden erstellt, deren Ergebnis die Tabelle 2.3 zeigt. In der Vergangenheit wurden verschiedene Phospholipide wie Soja-Lecithin (SPC), Ei-Lecithin (ePC), DMPC, DPPC, DOPC, hydriertes Phosphatidylcholin (hPC) oder ungesättigtes Phosphatidylcholin (uPC) auf ihre Fähigkeit untersucht, optisch klare mischmizellare Lösungen mit den verschiedensten Tensiden, wie Polysorbat 20, 40, 60, 80, SDS, Alkylglucosiden u.a. zu bilden. Die wesentlichen Ergebnisse sind tabellarisch dargestellt (Tabelle 2.3). Es konnte bislang kein Tensid gefunden werden, dass PL-Moleküle so effektiv solubilisieren kann wie die Gallensalze, was Small und andere Autoren auf die ungewöhnliche Struktur der Gallensalze als Lipide der Klasse IIIB zurückführen (Carey und Small, 1970). Die tabellierten Tenside weisen je einen recht hohen HLB Wert auf und können demnach als Solubilisatoren bezeichnet werden. Dennoch ließ sich mit keinem der eingesetzten Solubilisatoren eine klare Lösung mit höherem Anteil von etwa 50% an

einem beliebigen PL erreichen. So zeigen selbst niedrig konzentrierte wässrige Mischungen aus Polysorbat 20-80 mit verschiedenen langkettigen gesättigten PC Typen (DPPC oder DSPC) oder auch ungesättigtem DOPC (Dioleyl-PC) bimodale Verteilungen von Vesikeln und Mizellen bzw. MM (Lim und Lawrence, 2004b; Lim und Lawrence, 2004a). Bei höheren Konzentrationen von 5% sind Mischungen von Polysorbat 20 oder Polysorbat 80 bereits mit einem geringen Anteil an uPC als WF0.15 (Hunien, 2005) oder bereits bei einem minimalen Anteil von uPC als WF0.05 (Hammad, 1998) deutlich trüb. Ebenso Kombinationen von Myrj 59 oder Brij 35 mit Soja-Lecithin, bzw. uPC (Hammad, 1998; Hunien, 2005). Die besten Ergebnisse hinsichtlich der Bildung einer klaren Lösung mit Lecithinen ergab eine Kombination mit Ocyglucosid mit einem molaren Tensid/PC Verhältnis von 3-3,8 (Jackson et al., 1982; Ollivon et al., 1988; Vinson et al., 1989) bzw. mit Triton X-100 (=PEG-Octylphenylether) mit einem molaren Tensid/PC-Verhältnis von 1,3-2,5 (Goni et al., 1986; Paternostre et al., 1988; Vinson et al., 1989). Für Mischungen aus Triton X-100 und verschiedenen PC-Typen, wie DMPC, DPPC oder uPC ergaben sich kaum Änderungen in der Solbilisierungskapazität, so dass der höchste Anteil an PC hier mit $MF_{PC}0.29 - 0.44$ angegeben wird (Goni et al., 1986). Anzumerken ist, dass in den meisten der erwähnten Untersuchungen (Tabelle 2.3) zuerst reine Liposomen aus dem jeweiligen PC Typ hergestellt wurden, um diese dann mit steigenden Anteilen an Tensid zu versetzen bis eine isotrope klare Lösung erhalten wurde. Diese Literaturrecherche ergab, dass bisher noch kein alternatives Tensid (zu den Gallensalzen) gefunden wurde, welches in der Lage ist, klare mischmizellare Lösungen mit höheren Anteilen an PL zu bilden. Weiterhin wurden die besten Ergebnisse so erzielt, dass zuerst Liposomen hergestellt wurden, von denen sich nach Zugabe von Tensid mit der Zeit Mischmizellen „abschälten“ (Jackson et al., 1982; Lasch et al., 1990).

Tabelle 2.3: Kombination von unterschiedlichen Tensiden mit verschiedenen Phospholipiden mit dem Ziel einer MM Bildung (klare Lösung)

Phospholipid	Surfactant	Domierende Spezies M=Mizellen V=Vesikel	Klare Lösung bei hohem Anteil an PL?	MM mit hohem Anteil an PL?	Jahr	Author(en)
SPC (uPC)	SDS	n.u.	trüb bei WF 0.42	nein	1998	Hammad und Müller
SPC (uPC)	Alkylpolyglucosid	n.u.	trüb bei WF 0.3	nein	1998	Hammad und Müller
ePC (eggPC (uPC))	Alkylpolyglucosid	n.u.	trüb bei WF 0.45	nein	1998	Hammad und Müller
SPC (uPC)	Myrj 59 (HLB 18.8)	n.u.	trüb bei WF 0.05	nein	1998	Hammad und Müller
SPC (uPC)	Brij 35 (HLB 16.9)	n.u.	trüb bei WF 0.1	nein	1998	Hammad und Müller
SPC (uPC)	Pluronic F68	n.u.	trüb bei WF 0.01	nein	1998	Hammad und Müller
DMPC (Konz. nur 5 mg/mL)	Polysorbate 20 Polysorbate 40 Polysorbate 60 Polysorbate 80	Koexistenz von M, MM u. V M, MM u. V M, MM u. V M, MM u. V		nein nein nein nein	2004 2004 2004 2004	Lim und Lawrence Lim und Lawrence Lim und Lawrence Lim und Lawrence
DPPC (Konz. nur 5 mg/mL)	Polysorbate 20 Polysorbate 40 Polysorbate 60 Polysorbate 80	Koexistenz von M, MM u. V M, MM u. V M, MM u. V M, MM u. V		nein nein nein nein	2004 2004 2004 2004	Lim und Lawrence Lim und Lawrence Lim und Lawrence Lim und Lawrence
DSPC (Konz. nur 5 mg/mL)	Polysorbate 20 Polysorbate 40 Polysorbate 60 Polysorbate 80	Koexistenz von M, MM u. V M, MM u. V M, MM u. V M, MM u. V		nein nein nein nein	2004 2004 2004 2004	Lim und Lawrence Lim und Lawrence Lim und Lawrence Lim und Lawrence
DOPC (Konz. nur 5 mg/mL)	Polysorbate 20 Polysorbate 40 Polysorbate 60 Polysorbate 80	M, MM u. V M, MM u. V M, MM u. V M, MM u. V		nein nein nein nein	2004 2004 2004 2004	Lim und Lawrence Lim und Lawrence Lim und Lawrence Lim und Lawrence
SPC (uPC)	Polysorbate 20		trüb bei WF 0.15	nein	1998	Hammad und Müller
SPC (uPC)	Polysorbate 80		trüb bei WF 0.05	nein	1998	Hammad und Müller
	Brij® 35	n.u.	trüb bei WF 0.15	nein	2005	Hunien, B.
SPC (uPC) / Lecithin	Lyso-Lecithin	n.u.	trüb bei MF 0.05 - 0.1	nein	1957	Saunders; Small
hPC (Phospholipon 90H)	HTAB Polysorbate 20 Polysorbate 80	n.u. n.u. n.u.	trüb bei WF 0.15 trüb bei WF 0.15 trüb bei WF 0.15	nein nein nein	2005 2005 2005	Hunien, B. Hunien, B. Hunien, B.
uPC (Phospholipon 90G)	Brij® 35 HTAB Polysorbate 20 Polysorbate 80	n.u. n.u. n.u. n.u.	trüb bei WF 0.2 trüb bei WF 0.2 trüb bei WF 0.2 trüb bei WF 0.08	nein nein nein nein	2005 2005 2005 2005	Hunien, B. Hunien, B. Hunien, B. Hunien, B.
DPPC, DMPC	Triton X-100		klar: MF 0.29-0.44	nein	1986	Goni et al.
ePC (eggPC (uPC))	Triton X-100		klar: MR = 1.3-2.5	nein	1989	Lasch et al.
(geringe Konz.)	Triton X-100			nein	1988	Paternostre et al.
	Octylglucosid		klar: MF 0.21-0.25	nein	1982	Jackson et al.
	Octylglucosid		klar: MR = 3-3.8	nein	1989	Lasch et al.
	Octylglucosid			nein	1988	Ollivon et al.
	Na - Cholat	MM	klar: MR = 0.9-2	ja	1981	Müller et al.

Legende: n.u.=nicht untersucht; WF=Masseanteil an PL; MF=Molarer Anteil an PL; MR=mol. Quotient (surfactant/PL)

Myrj 59=Polyethylenglykol(100)Monostearate; Brij 35=PEG-(23)-Laurylether; HTAB=Hexadecyltrimethylammonium Bromid

2.2.4.2 Theoretischer Ansatz einer MM-Bildung

Theoretische Grundlage einer Mischmizellbildung für die folgenden Untersuchungen ist das Packungsparameterkonzept (PPC) nach Israelachvili (Abbildung 2.2). Generell beschreibt das PPC das Organisationsverhalten einer amphiphilen Spezies in der Wasserphase zu geordneten Assoziaten (Israelachvili et al., 1976). Ein Transfer des PPC auf eine Kombination zweier unterschiedlicher amphiphiler Komponenten, mit dem Ziel einer MM-Bildung, stellt die Grundidee dieser Arbeit dar. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, sind natürliche PL nicht in der Lage mizellare Strukturen zu bilden, da ihr $PP > 0.5$ ist (vgl. 2.1.3 und Abbildung 2.7). Es soll nun versucht werden, durch geeignete Tenside eine Mischmizellbildung mit Phospholipiden zu erreichen, wobei der Tensidanteil möglichst gering sein soll. Die Abbildung 2.7 verdeutlicht das Prinzip einer Mischmizellbildung aus zwei unterschiedlichen Komponenten. Dabei kommt sowohl der Molekülstruktur des gewählten Phospholipids als auch der des eingesetzten Tensids eine entscheidende Rolle zu. Es soll untersucht werden, welche strukturellen Merkmale im Molekülbau einerseits des Tensids und andererseits des PL eine MM-Bildung forcieren können. Hierbei werden folgende Merkmale besonders berücksichtigt.

- Größe der Kopfgruppe (A_0) und Ausmaß der Hydrophilie;
→ Einfluss unterschiedlicher hydrophiler Gruppen
- Länge (l) und Volumen (v) des lipophilen Restes
- Molekülgeometrie und Polarität(sdifferenzen)
- HLB-Wert(Hydrophilie-Lipophile Verhältnis)
- Packung in dem MM-Assoziat

Prinzipiell muss das Tensidmolekül geometrisch eine Keilform aufweisen, um selbst in der Lage zu sein Mizellen zu bilden. Mit diesen geometrischen Voraussetzungen könnte es in den Mischassoziaten (z.B. MM) eine entsprechende Krümmung erzwingen, so dass auch die PL-Moleküle, trotz ihrer kegelstumpfen Form, eine mizellare Assoziatform einnehmen (Abbildung 2.7). Es sind unterschiedliche homologe Tensidreihen von unterschiedlichen Tensidklassen mit steigenden Anteilen an Phospholipiden kombiniert worden, um in den resultierenden Systemen ggf. eine Mischmizellbildung nachzuweisen.

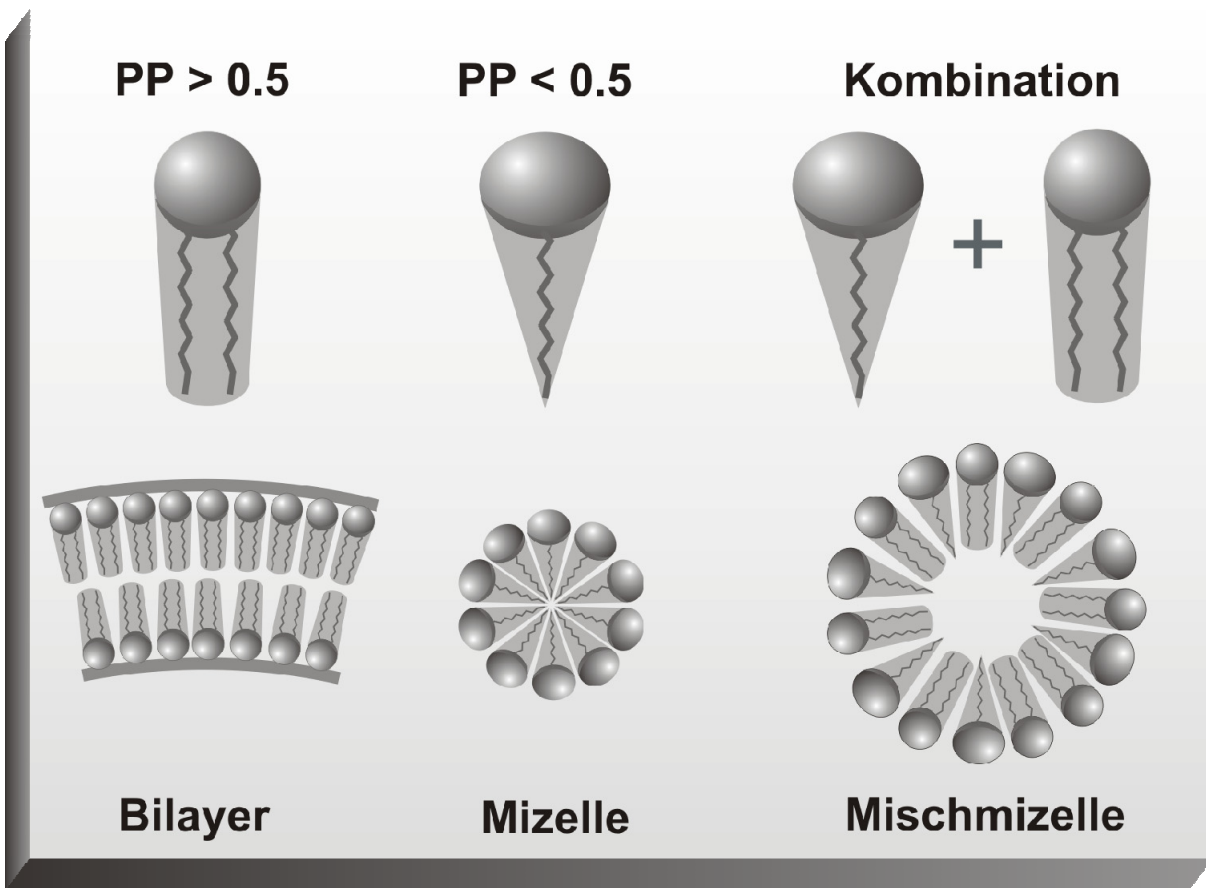


Abbildung 2.7: Schematisch Darstellung des (transferierten) PPC als Basismodell zur Bildung von Mischmizellen

2.3 Schlecht lösliche Arzneistoffe

2.3.1 Einführung

Die Zahl neuer Arzneistoffe mit schlechter Wasserlöslichkeit nimmt in den letzten Jahren stetig zu (vgl. Einleitung). Die Löslichkeit eines Arzneistoffes bedingt seine Liberation (Freisetzung) und indirekt seine Absorption, wodurch der Löslichkeit eines Arzneistoffes eine Schlüsselrolle für seine Bioverfügbarkeit zugeschrieben werden muss. Eine ausreichende Wasserlöslichkeit wird zum einen für die Absorption benötigt, da meist nur gelöste Stoffe absorbiert werden können, zum anderen muss das absorbierte Arzneistoffmolekül die Zielzelle über das Blut (als wässriges Transportmedium) erreichen. Um absorbiert werden zu können, muss der Arzneistoff molekulardispers gelöst vorliegen (Panchagnula und Thomas, 2000). Diese Voraussetzung ist unabhängig von Mechanismus der Absorption, egal ob passive Diffusion, Ionenpaar-Transport oder aktiver Transport vorliegen. Lediglich im Fall der Pinocytose (kommt in der Regel selten vor; lediglich bei fettlöslichen Vitaminen A, D, E, K und einigen Lipiden) ist die vollständige Auflösung des Arzneistoffes nicht Grundvoraussetzung einer Resorbierbarkeit (Panchagnula und Thomas, 2000). Sofern ein schlecht wasserlöslicher Arzneistoff vorliegt, ergibt sich ein Problem der Löslichkeit und/oder der Absorption, da der Einstrom über der intestinalen Membran proportional zum Konzentrationsgefälle zwischen apikaler und basolateraler Seite des Lumens des Gastrointestinaltraktes (GIT) ist. Daher stellt die Löslichkeit eines Arzneistoffes einen zentralen Parameter dar, der die Wirkung einer Arzneimittelformulierung entscheidend bedingt. So zeigen Arzneistoffe mit einer Wasserlöslichkeit $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ meist eine zu geringe Bioverfügbarkeit. Das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (kurz: BCS) nach Amidon et al. (1995) stellt die in-vitro Löslichkeit von Arzneistoffen mit den in-vivo resultierenden Bioverfügbarkeiten in Zusammenhang. Hier konnte festgehalten werden, dass sowohl die Wasserlöslichkeit als auch die gastrointestinale Permeabilität des Arzneistoffes als zwei fundamentale Parameter Schnelligkeit und Ausmaß der Absorption bestimmen. Das BCS teilt Arzneistoffe in vier Klassen ein (Tabelle 2.4). Arzneistoffe der Klasse I sind sowohl gut löslich als auch permeabel gegenüber biologischen

Membranen, wodurch keine Probleme im Erreichen einer hohen oralen Bioverfügbarkeit zu erwarten sind, sofern eine hohe chemische Stabilität der AS gegeben ist (z.B. Vermeidung einer sauer katalysierten Hydrolyse im Magensaft). Bei Arzneistoffen der Klasse II kann durch eine Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit ein rascher Anstieg der AS-Konzentration im Blut erreicht werden. Unter Löslichkeit versteht man die Sättigungslöslichkeit eines Stoffes, d.h. der maximale Anteil des zu lösenden Stoffes der in einem bestimmten Anteil an Lösungsmittel bei einer definierten Temperatur gerade noch (molekulardispers) gelöst vorliegt.

Tabelle 2.4: Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (BCS)

Klasse	Löslichkeit	Permeabilität
I	gut	gut
II	schlecht	gut
III	gut	schlecht
IV	schlecht	schlecht

Methoden zur Verbesserung der Sättigungslöslichkeit

2.3.2 Modifizierung der festen Phase

Durch eine Modifizierung der festen Phase einer festen Substanz kann zum einen die Löslichkeit zum anderen die Lösungsgeschwindigkeit erhöht werden. Eine Partikelzerkleinerung, durch Mikronisieren oder Nanonisieren und eine Einflussnahme auf die Kristallform (Polymorphie, Pseudopolymorphie, Amorphisierung durch feste Dispersionen und feste Lösungen) sind hierbei verbreitete technologische Verfahrensansätze. Im Folgenden soll eine Übersicht über Methoden gegeben werden, die die Löslichkeit eines Arzneistoffes beeinflussen.

Nach Noyes-Whitney (Noyes und Whitney, 1897) resultiert aus einer Oberflächenvergrößerung ein Anstieg der Lösungsgeschwindigkeit. Auf diesem Zusammenhang basiert die Mikronisierung von Arzneistoffen, die eingehend untersucht wurde (Rasenack und Müller, 2002; Rasenack und

Müller, 2004) und weitverbreitete Anwendung findet (Rasenack et al., 2003; Cunha-Filho et al., 2008). Zudem weisen Partikel mit stark verkleinerter Größe eine schmalere Diffusionsgrenzschicht h auf, was zu einem beschleunigten Abtransport der gelösten Moleküle von der Partikeloberfläche und damit zur Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit führt (Bisrat und Nyström, 1988; Hintz und Johnson, 1989). Dieser Effekt wurde auch für kaum wasserlösliche Arzneistoffe bestätigt (Bisrat und Nyström, 1988; Bisrat et al., 1992), macht sich jedoch erst deutlich bemerkbar, wenn die Partikel deutlich kleiner als $5\ \mu\text{m}$ sind, was vornehmlich nanopartikuläre Systeme ausnutzen. Über eine Mikronisierung wird jedoch noch keine Steigerung der Sättigungslöslichkeit erreicht.

Nanonisieren

Erst wenn eine Partikelzerkleinerung unter $2\ \mu\text{m}$ erreicht wird, ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen so groß, dass die Sättigungslöslichkeit steigen kann. Erklärt werden kann dieses Phänomen vor allem durch die starke Zunahme des Lösungsdrucks, der einen Anstieg der Sättigungslöslichkeit zur Folge hat, sofern stärker zerkleinerte Nanopartikel vorliegen. Eine genaue Erklärung der verbesserten Löslichkeit von kleinen Teilchen liefert die Anwendung der Kelvingleichung (Thomson as Lord-Kelvin, 1871; Skinner und Sambles, 1972), welche eine Abhängigkeit der Sättigungslöslichkeit (als Verhältnis der Löslichkeit von sehr kleinen zu sehr großen Tröpfchen) zur Teilchengröße beschreibt. Überträgt man die Vergrößerung der Oberfläche Flüssigkeit/Gas auf ein fest/flüssig-System, wie es erstmalig von Ostwald (1900) und etwas später korrigiert von Freundlich (1909) vorgenommen wurde (Ostwald-Freundlich), so kann man einen Vergleich zur Erhöhung des Lösungsdruckes kleiner fester Teilchen ziehen (Skinner und Sambles, 1972; Wu und Nancollas, 1998), wie es zusammenfassend in Formel 2-1 dargestellt ist.

Formel 2-1 Ostwald-Freundlich-Gleichung

$$\frac{C_s}{C_{s_0}} = \exp\left(\frac{2 \cdot \gamma \cdot V}{R \cdot T \cdot r}\right)$$

$$\frac{C_s}{C_{s_0}} = \text{Verhältnis der Sättigungslöslichkeiten}$$

von sehr kleinen und sehr großen Teilchen

γ = Grenzflächenspannung (fest / flüssig)

V = Molares Volumen (Molekulargewicht/Dichte)

R = Allgemeine Gaskonstante

T = Absolute Temperatur

r = Teilchenradius

Vereinfacht kann man unter Einbeziehung der LaPlace Gleichung folgern, dass die Kelvin Gleichung die Abhängigkeit des Dampfdruckes von der Partikelkrümmung beschreibt (Formel 2-2).

Formel 2-2 LaPlace Gleichung / Einfluss der Partikelgröße auf den Lösungsdruck

$$\Delta p = \frac{2\sigma}{r}$$

p = Lösungsdruck

σ = Oberflächenspannung

r = Teilchenradius

Kleine (runde) Partikel (< 2 μm) weisen eine stärker gekrümmte Oberfläche auf, was zu einem erhöhten Dampf- bzw. Lösungsdruck führt. Denn gemäß der LaPlace Gleichung verhält sich der Lösungsdruck umgekehrt proportional zur Teilchengröße (Formel 2-2). Weiterhin macht sich die deutliche Verkleinerung der Diffusionsschicht um die sehr kleinen Nanopartikel wesentlich stärker bemerkbar als bei mikronisierten Partikeln, wodurch die Auflösungs geschwindigkeit erhöht ist. Nanopartikel für pharmazeutische Zwecke können auf verschiedenste Weise hergestellt werden (Böhm, 1999; Jacobs et al., 2000; Keck und Müller, 2006; Scherließ, 2008). Herkömmliche angewandte Verfahrenstechniken sind u.a. die Vermahlung oder auch die Hochdruckhomogenisation (vgl. Kapitel 4.1.1).

Amorphe Formen

Neben der Verwendung der metastabilen kristallinen Formen kann ggf. auch die nichtkristalline amorphe Form einer Substanz verwendet werden, da diese die größeren freien Energien beim Lösen in Wasser aufweist. Solche amorphen Formen haben die beste Löslichkeit und höchste Lösungsgeschwindigkeit in Wasser. Im Gegensatz zu den kristallinen Formen zeigen amorphe Feststoffe keine Fernordnung in der molekularen Konformation, sondern lediglich eine Nahordnung und damit eine höhere Flexibilität in der Anordnung der Moleküle (Yu, 2001). Im Vergleich zu den vorgestellten kristallinen Formen benötigt der Auflösungsprozess hier deutlich weniger Energie, da die Moleküle bzw. Atome nicht aus einem geordneten Kristallgitter herausgelöst werden müssen, um vom Lösungsmittel solvatisiert zu werden. Auf der anderen Seite sind die amorphen Feststoffe physikalisch und chemisch instabiler als ihre korrespondierenden Kristalle, was auf ihren hohen Energieinhalt zurückzuführen ist. Dies zeigt sich u.a. an der erhöhten Absorptionsfähigkeit für Wasser (Hygroskopizität), was wiederum eine unerwünschte Neigung zur Rekristallisation zur thermodynamisch stabileren kristallinen Modifikation I zur Folge haben kann und Stabilisierungsmaßnahmen erfordert (Yu, 2001). Ein weiterer Nachteil der Verwendung amorpher Arzneistoffe ist das Auskristallisieren der Substanz nach partiellem In-Lösung-gehen. So kann es nach Kontakt mit Wasser infolge einer lokalen Übersättigung zu einer Kristallisation kommen, die eine verschlechterte in-vivo Bioverfügbarkeit zur Folge haben kann. Amorphe Feststoffe können durch verschiedenste pharmazeutische Standardverfahren produziert werden. Angewandte Verfahrenstechniken sind u.a. Gefriertrocknung (Craig et al., 1999) und Sprühtrocknung (Yonemochi et al., 1999), aber auch mechanischer oder chemischer Stress durch Vermahlung oder Nassgranulierung kann kristalline in amorphe Feststoffe umwandeln (Yonemochi et al., 1999; Yu, 2001). Die Dehydratisierung von kristallinen Hydraten bei leicht erhöhten Temperaturen, z.B. von 60°C (Saleki-Gerhardt et al., 1995) im Vakuum, ermöglicht ebenso eine Umwandlung in die amorphe Form. In einer sog. festen Lösung liegt der Arzneistoff molekulardispers verteilt in einer

Polymer-Matrix (z.B. PVP oder PEG) vor, so dass hier ebenfalls von einem amorphen Feststoff gesprochen werden kann (Yu, 2001; Rasenack, 2003). Derartige feste Lösungen oder auch feste Dispersionen können z.B. durch Verfahren wie Schmelzextrusion (Sekiguchi und Obi, 1961; Hülsmann et al., 2000) oder Sprühtrocknung (-einbettung) erhalten werden. So konnten u.a. die Löslichkeiten von Etoposid (Shah et al., 1995), Itraconazol (Van Eerdenbrugh et al., 2009), Indometacin (Takeuchi et al., 2005) und anderen Arzneistoffen durch Einbettung in hydrophilen Trägern ermöglicht werden.

2.3.3 Chemische Modifizierung

Für organische Arzneistoffe, die ionisierbar sind, kann eine Einstellung des pH-Wertes der Lösung die einfachste Methode sein, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Handelt es sich bei dem Arzneistoff um keine ionisierbare Substanz, hat der pH-Wert nur geringen Einfluss auf die Löslichkeit. Weiterhin ist hierbei zu berücksichtigen, bei welchem pH-Wert der Auflösungsprozess erwünscht ist (Magensaftresistente Formulierung, Retard-Formulierung), sodass hier eine optimale pH-Einstellung (z.B. durch eine gepufferte Lösung) nur bedingt anwendbar sein kann. Auch die Wahl einer geeigneten Salzform ist eine Möglichkeit die Löslichkeit zu verbessern (Agharkar et al., 1976). Als ein Beispiel zur Löslichkeitsverbesserung eines Arzneistoffes durch Salzbildung sei Aminophyllin (Theophyllin-Ethylendiamin) aufgeführt, bei dem schlecht lösliches Theophyllin ein gut wasserlösliches Salz mit Ethylendiamin bildet (NRF; (Müller und Moser, 2005)). Die Verwendung chemisch synthetisierter „Prodrugs“ kann in einigen Fällen eine sehr überzeugende Strategie sein, die schlechte Wasserlöslichkeit bzw. schlechte Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu erhöhen. Ein Prinzip kann hier sein, polare funktionelle Gruppen in das Molekül einzubauen, um so die Wasserlöslichkeit eines hydrophoben Moleküls zu erhöhen. Sofern ionisierbare Gruppen eingeführt werden, muss beachtet werden, dass dadurch die Membranpermeabilität des Arzneistoffes negativ beeinflusst werden kann. Eine Übersicht über angewandte Prodrug-Strategien bieten Stella und Nti-Addae (Stella und Nti-Addae, 2007). Sulindac ist ein gutes Beispiel für ein Prodrug, bei dem durch Einführung einer Sulfoxid-Gruppe eine erhöhte Wasserlöslichkeit erreicht wird. Erst nach Metabolisierung zum Sulfid (Reduktion) wird es in

seine pharmakologisch aktive Wirkform umgewandelt. Die Einführung von Phosphat-Estern ist eine ebenso effektive Prodrug-Strategie.

2.3.4 Methoden der Lösungsvermittlung

Unter Lösungsvermittlung sind verschiedene Methoden zu verstehen, die es ermöglichen, die Löslichkeit von schwerlöslichen Substanzen zu verbessern. Im Folgenden werden Prinzipien erläutert, die sich auf wässrige Systeme beziehen. Einige der aufgeführten Methoden zielen auf eine Veränderung der Polarität des Lösungsmittels Wasser ab. Sofern die Polarität des Wassers herabgesetzt wird, steigt die Löslichkeit für wenig polare Substanzen, die für polare Substanzen nimmt hingegen ab. Zu beachten ist ferner, dass nicht jede Substanz, die schlecht wasserlöslich ist, auch gleichzeitig unpolar sein muss (vgl. Kapitel 2.3.1). Den Methoden der Lösungsvermittlung ist gemein, dass über Zugabe eines Hilfsstoffes die Löslichkeit einer Verbindung ohne chemische Veränderung deutlich verbessert wird (List et al., 1985).

Kosolvatation

Eine Veränderung der Lösungsmiteleigenschaften des Wassers kann durch die Mischung mit anderen Lösungsmitteln (Kosolventien) wie Glycerol, PEG, Ethanol und Propylenglycol erreicht werden (Jouyban-Gharamaleki et al., 1999; Ruckenstein und Shulgin, 2003), die eine Änderung der Polarität des LM bewirken. Diese Methode der Zugabe von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln zur Wasserphase ist eine der ältesten und populärsten Methode der Lösungsvermittlung. So werden in 13% der von der FDA genehmigten Pharmaka zur parenteralen Anwendung, Kosolventien verwendet (Millard et al., 2002). Die meisten Kosolventien weisen sowohl Wasserstoffbrückenbindungs-Donator und/oder -Akzeptor Gruppen, als auch kleinere Kohlenwasserstoffregionen auf. Die hydrophilen Wasserstoff-bindungsstellen gewährleisten die Mischbarkeit mit Wasser, die hydrophoben Kohlenwasserstoffregionen dagegen unterbrechen die intermolekularen Anziehungskräfte zwischen den Wassermolekülen. Damit werden die Clusterstrukturen (s.u.) des Wassers gestört und die Eigenschaft des Wassers, nicht polare, hydrophobe Strukturen zu verdrängen (da diese nicht in das hydrophile Dipol Netzwerk passen) nimmt ab. Vereinfacht bedeutet dies lediglich, dass

das polare Milieu des Wassers durch Zugabe des Kosolvens etwas unpolarer gemacht und dadurch die Löslichkeit für unpolare hydrophobe Stoffe verbessert wird. Kosolventien senken die Löslichkeit polarer Stoffe, wie Aminosäuren, (Millard et al., 2002). Zur Zeit werden etwa 20 unterschiedliche Kosolventien in parenteralen Zubereitungen eingesetzt, darunter Alkohole wie Ethanol, Propylenglykol, Glycerol, Polyethylenglykol oder auch Sorbitol (Hirakura et al., 2006). Neben dem gewünschten Effekt einer Löslichkeitsverbesserung schlechtlöslicher Arzneistoffe kommt es jedoch in einigen Fällen zur Hämolyse oder zur Wechselwirkung zwischen den reaktiven Alkoholgruppen mit den Arzneistoffmolekülen (Akers, 2002). Alkohole stellen eine labile molekulare Spezies dar, die verschiedenste Reaktionen mit organischen Molekülen eingehen kann und deren Folge ein Abbau des Arzneistoff nach sich ziehen oder auch die Stabilität der Zubereitung beeinflussen kann (Hirakura et al., 2006). In vielen pharmazeutischen Formulierungen werden Kosolventien (wie Ethanol) mit Tensiden (wie Polysorbat 80, Poloxamer 188 oder Cremophor EL) zusammen eingesetzt, um die Löslichkeit schlecht wasserlöslicher Arzneistoffe zu verbessern (Singla et al., 2002). Der größte Nachteil beim Einsatz von Kosolventien zur Verbesserung der Löslichkeit schlecht wasserlöslicher AS ist das Auftreten einer AS-Präzipitation nach parenteraler Applikation. Nach Mischen (und Verdünnen) mit dem wässrigen Blut kann eine AS-Präzipitation mehrere Nachteile haben, wie: Injektionsschmerz, Thrombophlebitis oder schwankende Plasmaspiegel (Li und Zhao, 2007).

Komplexbildung

Bei einer Komplexbildung wird aus einer schwer löslichen Substanz und einem geeigneten Lösungsvermittler in stöchiometrischer Reaktion ein Komplex mit verbesserter Wasserlöslichkeit gebildet (Bauer et al., 2002). Dabei sollte die Komplexbildung spezifisch und reversibel sein, um die Arzneistoffwirkung weiterhin gewährleisten zu können. Als Komplexbildner können Natriumbenzoat, Natriumsalicylat aber auch bestimmte Strukturbrecher wie PVP eingesetzt werden. Das kaum wasserlösliche Antimalariamittel Halofantrine konnte durch eine 1:1 Komplexbildung mit Coffein besser wasserlöslich gemacht werden (Lim und Go, 2000). Als

weiter Komplexbildner seien EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und Ferrocen (Eisen(II)-Kation und zwei Cyclopentadienylanionen ($C_5H_5^-$) als ungeladener Sandwich-Komplex) oder auch anorganische Substanzen wie Iodid genannt.

Einschlussverbindungen (Cyclodextrine)

Beim enzymatischen Abbau von Stärke durch das Enzym Cyclodextrin-Glykosyltransferase (CGT) fallen cyclische Oligomere (Cyclodextrine) an. Cyclodextrine (CD) sind nicht reduzierende, kristalline, wasserlösliche, cyclische Oligosaccharide. Sie bestehen üblicherweise aus sechs bis acht Glucosemonomeren, die in einer Ring- bzw. Donut-Konformation angeordnet sind. Drei native CD sind α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin und γ -Cyclodextrin. Moleküle oder funktionelle Gruppen von Molekülen, die weniger hydrophil sind als Wasser, können in Gegenwart von Wasser unter bestimmten Voraussetzungen in das Innere der CD aufgenommen werden. Die Eigenschaften der CD lassen sich durch Substitutionen an den freien Hydroxylgruppen variieren. Auf diese Weise lassen sich z.B. Methyl-, Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl-, Succinyl-, oder Glucosyl-cyclodextrine darstellen (Brauns und Müller, 1984; Uekama et al., 1998). In der Regel haben diese Derivate eine höhere Wasserlöslichkeit als die nativen CD. Cyclodextrineinschluss-Verbindungen stellen zwar gewissermaßen ebenfalls Komplexe dar und werden in manchen Literaturstellen als solche aufgeführt, sollen hier aber getrennt beschrieben werden. Ein Unterschied im Vergleich zu den herkömmlichen Komplexbildnern ist, dass Cyclodextrine nicht erst nach Interaktion mit dem Arzneistoffmolekül als Komplex bereitstehen. Bei Cyclodextrinen besteht die Kavität bereits vor Zugabe des Arzneistoffes und erst nach dessen Zugabe kommt es ggf. zur Integration der AS-Moleküle in die Kavität. Voraussetzung für das Zustandekommen einer Cyclodextrin-Einschlussverbindung ist, dass das AS-Molekül aufgrund seiner Molekülgröße und Lipophilie, begünstigt durch entsprechende intermolekulare WW zwischen Cyclodextrin und Gastmolekül, in der Kavität festgehalten werden kann. Die meisten Arzneistoffmoleküle bilden 1:1-Einschlussverbindungen mit Cyclodextrinen, jedoch sind auch 1:2-Komplexe möglich (Rajewski und Stella, 1996). Zwar soll der Arzneistoff eine entsprechend hohe Affinität zur inneren Kavität des

CD besitzen, jedoch muss das Arzneistoffmolekül diese auch wieder verlassen, um resorbiert werden zu können. Weiterhin kann es zu einer Verdrängung des Arzneistoffmoleküls aus der Kavität durch Fremdmoleküle kommen. So kann dies einerseits die gleichzeitige Nahrungsaufnahme (Magen-Darm-Füllung) als auch die flüssige Arzneistoffzubereitung betreffen (Konservierungsmittel Abwanderung in Kavität). Eine Verwendung von CD in parenteralen, oralen, nasalen, ophthalmischen aber auch dermalen, rektalen oder pulmonalen Darreichungsformen ist in der Literatur beschrieben (Rajewski und Stella, 1996; Uekama et al., 1998). Die Lösungsvermittlung durch Cyclodextrine ist sehr eingehend untersucht und beschrieben worden, so dass an dieser Stelle auf entsprechende Literaturstellen verwiesen sei (Brewster et al., 1988; Albers und Müller, 1995; Brewster und Loftsson, 2007). Ein wesentlicher Nachteil ist, dass nur bestimmte Arzneistoffe aufgrund ihrer Molekülstruktur in die Kavität der CD passen.

Hydrotroper Effekt und Wasserstruktur

Unter Hydrotropie ist eine Steigerung der Löslichkeit einer schlecht wasserlöslichen (meist lipophilen) Substanz durch eine geeignete zweite Komponente zu verstehen, wobei letztere selbst kein Lösungsmittel darstellt. Hydrotrope Substanzen können selbst einen amphiphilen Molekülbau aufweisen, da einige der üblicherweise eingesetzten hydrotropen Substanzen sowohl hydrophile als auch lipophile Molekülteile tragen. Jedoch sind diese hydrophoben Bereiche strukturell nicht in der Lage geordnete Assoziate wie Mizellen zu bilden (Hodgdon und Kaler, 2007). Der hydrotrope Effekt der verwendeten Substanzen lässt sich zum einen durch einen Einfluss auf die Wasserstruktur erklären, zum anderen ermöglichen die leicht amphiphilen Substanzen bzw. deren hydrophoben Bereiche eine Art Brückenbildung zwischen der schlecht wasserlöslichen Substanz und dem hydrophilen Wasser. Folglich kann es einerseits zu hydrophoben Wechselwirkungen (z.B. Van-der-Waals Kräfte) und andererseits zur Ausbildung von H-Brückenbindungen zwischen dem zu lösenden Stoff und dem Lösungsvermittler kommen. Für Indomethacin wurde die hydrotrope Lösungsvermittlung durch verschiedene Additiva, z.B. Nicotinamid und Harnstoff, untersucht.

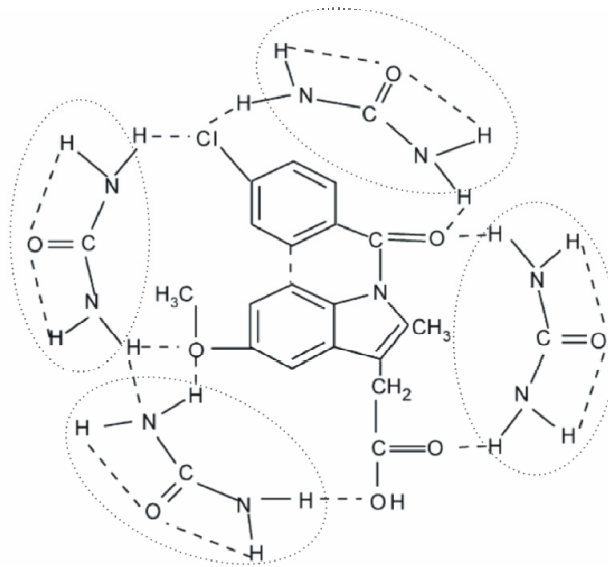


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Hydrotropen Effektes von Harnstoff auf Indomethacin nach Jain (2008) (Quelle: Jain, 2008)

In Abbildung 2.8 ist schematisch dargestellt, wie der hydrotrope Lösungsvermittler Harnstoff als Brückenbildner zwischen der Wasserphase und des zu lösenden Indometacins fungiert (Jain, 2008). Neben vermittelnden Effekten zwischen schlecht wasserlöslicher Substanz und Wasser wird die Struktur des Lösungsmittels Wasser mehr oder weniger entscheidend beeinflusst. Wasser zeigt die Fähigkeit zur Ausbildung von Clusterstrukturen (Nemethy und Scheraga, 1962a; Nemethy und Scheraga, 1962b; Hagler et al., 1972), wobei mehrere Wassermoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen untereinander ein Netzwerk zusammen ausbilden. Diese geordneten Molekülverbände weisen je nach Temperatur eine unterschiedliche Größe auf. Mit steigender Temperatur nimmt die mittlere Clustergröße ab, so dass bei 100°C etwa 21,4% der OH-Gruppen des Wassers nicht über H-Brücken verbunden sind. Die Lösungsmiteigenschaften des Wassers werden durch diesen strukturellen Aufbau ebenso stark beherrscht. So steigt die Löslichkeit polarer Substanzen in Wasser mit der Anzahl freier OH-Gruppen. Geringe Clustergrößen und damit verbunden viele nicht-abgesättigte Nebervalenzen machen das Wasser „hydrophiler“. Auf diese Weise lässt sich auch die teilweise schwankende Temperaturabhängigkeit einiger Substanzen in Wasser erklären. Gelöste Substanzen treten in

Wechselwirkung mit den freien Valenzen (potentiellen H-Bindungsstellen) und beeinflussen so den Gesamtzustand des Wassers. Für das „In-Lösung-gehen“ einer kaum wasserlöslichen Substanz bedeutet dies, dass u.a. die Polarität bedingt, ob dieser über ausreichende Nebervalenzen von Wassers in Lösung gehalten wird. Sofern die Substanz polare Gruppen aufweist, können diese mit „aufgebrochenen“ Clustern wechselwirken und in Lösung gehalten werden. Jedoch bedingt nicht nur der Temperatureinfluss die Clustergröße des Wassers und damit dessen Lösungsmitelegenschaften, sondern auch die Zugabe von bestimmten Stoffen. So genannte Strukturbrecher bauen im gelösten Zustand die mittlere Clustergröße ab, wodurch es zu einer Verbesserung der Lösungseigenschaften des Wassers für polare Stoffe kommt (sog. Einsalzeffekt). Dagegen gibt es auch sog. Strukturbildner, die einen ordnenden Einfluss auf die Wasserstruktur haben und die mittlere Clustergröße erhöhen (sog. Aussalzeffekt). Besonders der Einsatz von Elektrolyten beeinflusst die Wasserstruktur. Nicht alle Ionen bedingen einen Aussalzeffekt oder zeigen strukturbildende Eigenschaften. Man unterscheidet zwischen Kosmotropen und Chaotropen. Kosmotrope sind kleine Ionen mit hoher Ladungsdichte, die Wassermoleküle sehr stark binden und somit als starke Strukturbildner bezeichnet werden können, z.B. Li^+ , Na^+ , F^- (Collins, 1997). Demgegenüber sind Chaotrope große monovalente Ionen mit geringer Ladungsdichte wie Cs^+ , Br^- oder I^- , die Wasser nur schwach binden (kleine Hydrathülle). Anzumerken sei an dieser Stelle, dass in Wasser gelöste Substanzen durch ihren Einfluss auf die Wasserstruktur nicht nur die Löslichkeit schlechtlöslicher Stoffe beeinflussen können, sondern auch die Mizellbildung bzw. die Solubilisierung durch Mischmizellen. Denn auch in mizellaren Systemen wird die Morphologie der Mizell-„Aggregate“ durch Interaktionen der hydrophoben Molekülteile in Wasser (hydrophober Effekt) in Relation zu der Solvation der hydrophilen Kopfgruppe determiniert (vgl. hydrophober Effekt und Packungsparameterkonzept; Kapitel 2.1.2 und 2.2.4.2). So wird sowohl die Gestalt oder Form, sowie die Größe der Mizellen als auch die Lage der CMC durch hydrotrope Substanzen beeinflusst (Kumar et al., 2004; Maiti et al., 2009; Abezgauz et al., 2010; Patel et al., 2010). Der größte Nachteil des Hydrotropie Effektes besteht in den sehr hohen

einzusetzenden Konzentrationen, die eine Isotonie-Einstellung unmöglich machen.

Solubilisierung

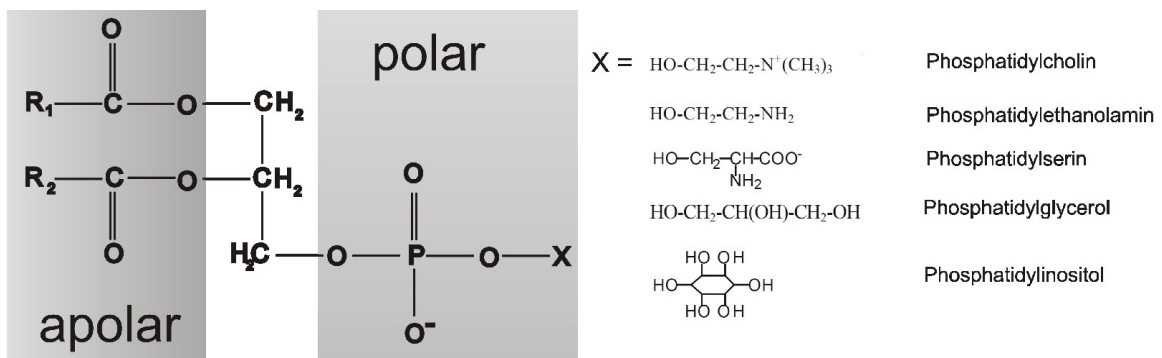
Unter Solubilisierung wird eine Verbesserung der Löslichkeit einer schlecht wasserlöslichen Substanz durch den Einsatz von Tensiden in der Form verstanden, wobei eine isotropisch klare Lösung entsteht (Lichtenberg et al., 1983). Es sind unterschiedliche Solubilisierungssysteme bekannt, an deren Aufbau Tenside maßgeblich beteiligt sind. So werden mizellare und mischmizellare Systeme an anderer Stelle beschrieben (Kapitel 2.1.2 und 2.2.3), im Folgenden sei kurz auf Mikroemulsionen verwiesen.

Mikroemulsionen sind opaleszente frei-fließende Mischungen aus üblicherweise vier Bestandteilen. Zwei der Bestandteile sind nicht miteinander mischbar (Öl und Wasser). Die wichtigste Komponente der Mikroemulsion stellt das Tensid dar, welches in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt wird. Neben dem eigentlichen Tensid werden sogenannte Cotenside eingesetzt, die eine bessere Löslichkeit in der Ölkomponente aufweisen (kleinerer HLB-Wert) als das eigentliche Tensid. Die genaue Struktur der Mikroemulsionen ist bis heute nicht eindeutig aufgeklärt. Es wird u.a. vermutet, dass bikontinuierliche Strukturen vorliegen (Scriven, 1976). Wichtige Eigenschaften der Mikroemulsionen sind ihre thermodynamische Stabilität, die sie von Makroemulsionen abgrenzt und die optische Transparenz. Mikroemulsionen sind ausführlich in der Literatur beschrieben (Scriven, 1976; Kleinebudde, 1987; Müller, 1998; Lawrence und Rees, 2000; Date und Nagarsenker, 2008). Einer der größten Nachteile der Mikroemulsionen ist sicherlich der sehr hohe Tensidanteil, der Membranirritationen unumgänglich macht. Trotzdem wird auch versucht parenteral verfügbare Formulierungen zu entwickeln, die nur verträgliche Tenside verwenden (Date und Nagarsenker, 2008). Ein weiteres Problem besteht darin, dass viele Mikroemulsionen nur bei einer expliziten Zusammensetzung der unterschiedlichen Komponenten ein entsprechend stabiles transparentes System bilden. Bei Verdünnung mit Wasser, z.B. im Magen könnte es zu einer Zerstörung des solubilisierenden Systems kommen.

3 Methoden und Materialien

3.1 Phospholipide (PL)

Phospholipide stellen die Basiskomponente der zu entwickelnden MM-Systeme dar. In jedem lebensfähigen höheren Organismus kommen PL in der Zellmembran vor. Unter dem Oberbegriff Phospholipide sind unterschiedliche phosphorhaltige amphiphile Lipide zu verstehen, die auch als Membranlipide bezeichnet werden. Man unterscheidet Phosphoglyceride, die ein Glycerol-Grundgerüst enthalten und Sphingolipide, die vom Sphingosin abgeleitet sind. Die Glycerophospholipide lassen sich aufgrund der Struktur der hydrophilen Kopfgruppe in Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol einteilen (Abbildung 3.1).



R₁ = Acylrest von zu meist gesättigten Fettsäuren
 R₂ = Acylrest von zu meist ungesättigten Fettsäuren
 X = Chemische Gruppe, die für jedes PL charakteristisch ist

Abbildung 3.1: Grundstruktur der Phosphoglyceride

Typischerweise sind natürliche Phospholipide zur Hälfte mit ungesättigten Fettsäuren meist an der sn-2 Position (R₂) und zu etwa 50% aus gesättigten Fettsäuren an der sn-1 Position (R₁) des Glycerols zusammengesetzt (Lichtenberg et al., 1983). Einige Ausnahmen sind bekannt. So findet man z.B. in den Membranen der Lungen-Alveolen vorwiegend gesättigtes Dipalmitoyl-phosphatidylcholin (DPPC).

Entsprechend einer EG-Richtlinie wird unter Lecithin (E 322) ein Gemisch von mind. 60% polaren Lipiden (wie PL) und Neutrallipiden (z.B. Triglyceride, freie Fettsäuren) verstanden (Meyer, 1973). Fälschlicherweise wird die Bezeichnung Lecithin auch in der wissenschaftlichen Sprachweise oft als Trivialname für ein bestimmtes Phospholipid, das Phosphatidylcholin (PC) verwendet. Jedoch ist dadurch nicht eindeutig festgelegt, ob es sich um (natürlich vorkommendes) ungesättigtes Phosphatidylcholin (uPC) oder hydriertes (gesättigtes) Phosphatidylcholin (hPC) handelt. Deswegen wird für diese Arbeit eine andere präzise Bezeichnung für das jeweils untersuchte Phospholipid gewählt (vgl. Kapitel 3.1). Lecithine können aus Eigelb (griechisch: Lekitos) oder aus Soja gewonnen werden. Eilecithin enthält ca. 75% Phosphatidylcholin und 15% Phosphatidylethanolamin sowie als Fettsäurekomponenten überwiegen Palmitin- (35-37 %) und Ölsäure (33-37%). Sojalecithin enthält neben Phosphatidylcholin (ca. 30%) größere Mengen an Phosphatidylethanolamin (22%), Phosphatidylinosit (18%) und Glykolipiden (14%). Es überwiegen Linolsäure (54%), Palmitin- und Ölsäure (je 7%) sowie Linolensäure (7%). Lecithine sind nach der FDA (Food and Drug Administration) mit dem GRAS-Status (Generally Recognized As Safe) qualifiziert worden und als untoxisch für Mensch und Tier befunden worden. Daneben ist der Einsatz über lange Zeit und in hohen Dosen auch zur Infusion erlaubt. Lecithine aus Soja können trotz Aufreinigungsschritten noch geringe Mengen an Sojaproteinen enthalten, die Allergien auslösen können. Allerdings haben in den USA lediglich 0,2% der Bevölkerung eine Soja-Allergie (Kuznesof, 2006). Phospholipide weisen als oberflächenaktive amphiphile Hilfsstoffe eine sehr gute Verträglichkeit auf (vgl. Kapitel 2.2.3).

3.1.1 Gesättigte Phospholipide

Das in dieser Arbeit am häufigsten eingesetzte Phospholipid ist hydriertes Phosphatidylcholin (hPC) als Phospholipon[®] 100H der Phospholipid GmbH (Köln, Deutschland). Bei hPC handelt es sich um 99% reines PC, dessen Acylreste zu 98% aus Stearin- oder Palmitinsäure bestehen. Weitere eingesetzte gesättigte Phospholipide sind Di-Laurinsäure-Phosphatidylcholin (DLPC), Di-Myristinsäure-Phosphatidylcholin (DMPC) und Di-Palmitinsäure-Phosphatidylcholin (DPPC), welche von der Firma

Lipoid (Ludwigshafen, Deutschland) bezogen wurden. Entsprechend der Ausgangsanalyse der Firma Lipoid handelt es sich bei den genannten PC-Typen zu 100% um Reinsubstanzen. Die chemischen Strukturformeln und die Molekülgeometrie der in dieser Arbeit eingesetzten Phospholipide sind in Abbildung 3.2 gezeigt.

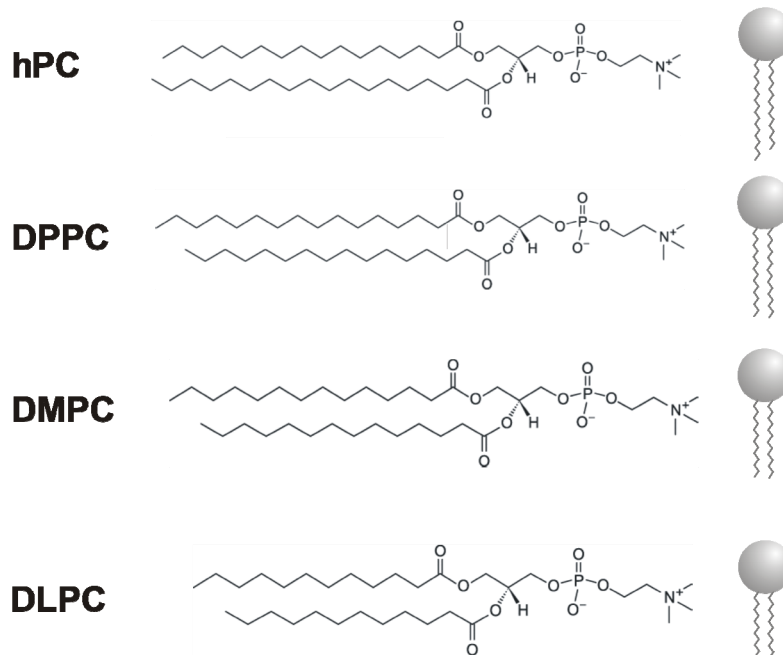


Abbildung 3.2: eingesetzte gesättigte PL; chemische Strukturformel und schematische Molekülgeometrie

Gesättigte PL zeigen eine höhere Stabilität gegenüber oxidativem Abbau als ungesättigte PL. Deshalb müssen wässrige Zubereitungen gesättigter Phospholipide nicht mit einem Antioxidans versetzt werden.

3.1.2 Ungesättigte Phospholipide

Natürliche PL sind in der Regel ungesättigt. Die am deutschen Pharmamarkt präsenten arzneistoffhaltigen Formulierungen auf Basis von MM verwenden ohne Ausnahme ungesättigte PL, da diese eine Grundvoraussetzung für eine MM-Bildung mit Gallensalzen sind (Booker et al., 1992). Der größte Nachteil der ungesättigten PL liegt in der hohen Oxidationsempfindlichkeit, so dass entsprechende Zubereitungen mit einem Antioxidans versetzt werden müssen. Auch in dieser Arbeit wurden, vor allem zu Beginn, ungesättigte PL eingesetzt. Das hier am häufigsten

verwendete ungesättigte PL ist ungesättigtes Phosphatidylcholin (uPC) als Phospholipon[®] 90G von der Phospholipid GmbH (Köln, Deutschland). Die Abbildung 3.3 zeigt uPC, wobei zu beachten ist, dass die Anwesenheit der Doppelbindung (Ölsäure) einen „sterischen Knick“ (am C₉) der Fettsäure an sn-2 Position mit sich bringt.

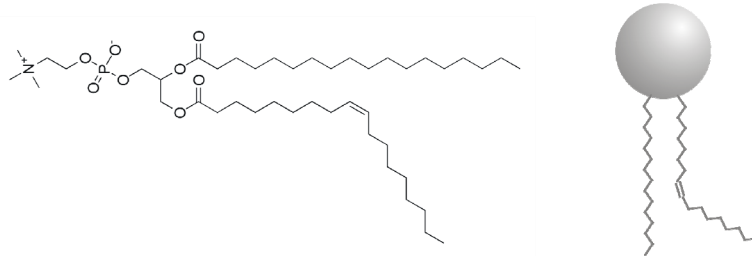


Abbildung 3.3: ungesättigtes PL: uPC (auch in Lecithin)

Es wurden weiterhin Lecithin- bzw. PL-Derivate untersucht, die unterschiedliche Mischungen aus Phospholipiden mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren darstellen. Zum Einsatz kamen Milchphospholipide (MPL) mit der Handelsbezeichnung Lacprodan[®] PL-75 der Firma Arla (Dänemark); ein Produkt der Firma Biofer (Medolla, Italien), welches zu 70% aus PC und 25% aus Distelöl besteht, sowie ein weiteres PL, welches zu 70% mit Laurinsäure als Fettsäurerest verestert wurde (C₁₂-PL). Genauere Angaben über dieses zuletzt genannte Produkt sind nicht bekannt. Dennoch sollte es in einer Versuchsreihe mit untersucht werden. Die Tabelle 3.1 zeigt die Zusammensetzung der MPL, bei denen vergleichsweise wenig PC enthalten ist. Stattdessen besteht das Gemisch zu etwa einem Viertel aus Sphingomyelin und zu etwa einem Viertel Phosphatidylethanolamin. Der Einsatz dieses Gemisches diente einem Vergleichszweck, indem mit diesem Produkt eine natürliche Mischung verschiedener Membranlipide zur Fähigkeit der MM-Bildung mit Tensiden untersucht werden konnte.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der verwendeten Milch-Phospholipide (MPL)

Produkt	MPL
Sphingomyelin	23,6%
Phosphatidylethanolamin	24,5%
Phosphatidylcholin	13,2%
Phosphatidylinositol	8,1%
Phosphatidylserin	6,6%
Anteil ungesättigter Fettsäuren	50,0%

Es wurde auch reines Phosphatidylethanolamin (PE) der Firma Lipoid eingesetzt, welches ungesättigte Fettsäuren enthält.

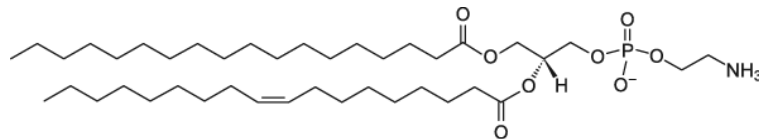


Abbildung 3.4: Phosphatidylethanolamin (PE)

3.1.3 PEGylierte Phospholipide

Mit PEGyliertem Di-Stearinsäure-Phosphatidylethanolamin (DSPE-PEG 2000) wurde ein PEGyliertes Phospholipidderivat eingesetzt.

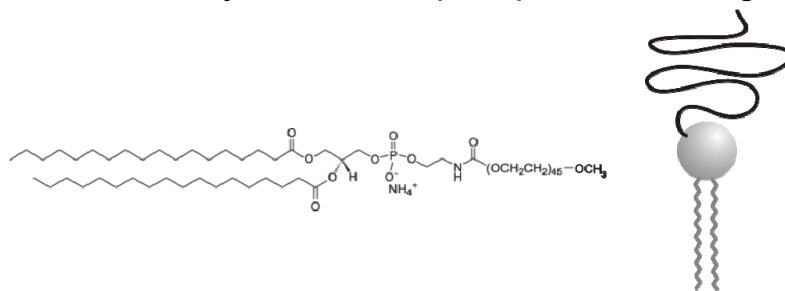


Abbildung 3.5: Chemische Struktur und schematische Darstellung der Molekülgeometrie vom eingesetzten DSPE-PEG 2000

Hierbei handelt es sich um DSPE-PEG 2000 (PEG-PE) der Firma Lipoid (vgl. Abbildung 3.5) mit einer Reinheit von 99,8% (laut Ausgangsanalyse des Herstellers).

3.2 Tenside

3.2.1 Tenside mit keiner spezifischen Trennung im Molekülbau

3.2.1.1 Polysorbate

Die Gruppe der Polysorbate stellen Polyethylenoxid(PEG)-Sorbitan-Fettsäureester dar. Es wurden mit Polysorbat 20 (Laurinsäureester) ein kurzkettiger und mit Polysorbat 80 (Ölsäureester) ein längerkettiger Vertreter der nicht ionischen Tensidklasse eingesetzt. Der Handelsname der Polysorbate ist u.a. Tween, wobei die Kennzahl sowohl für die Handelstypen wie auch für die im Ph.Eur. monographierten Polysorbate identisch ist.

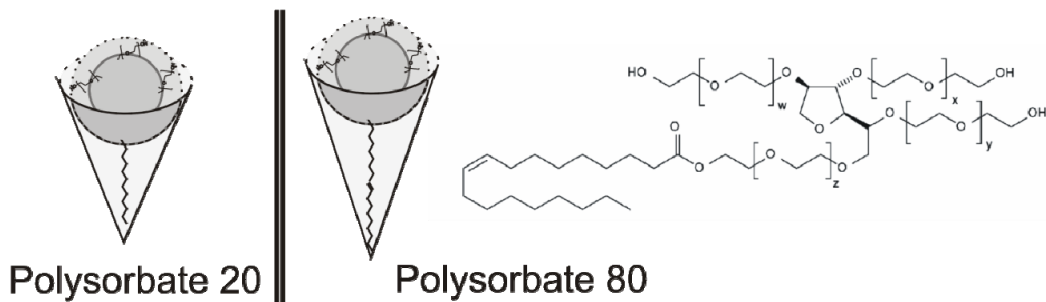


Abbildung 3.6: Struktur von Polysorbate 20 (Tween 20) und Polysorbate 80 (Tween 80)

Die Polysorbate nehmen gewissermaßen eine Zwischenstellung nach der in dieser Arbeit vorgenommenen Klassifizierung der Tenside ein. Einerseits deutet die Fettsäure im Molekülbau auf einen klar definierten hydrophoben Rest hin. Andererseits ist die hydrophile Kopfgruppe durch drei PEG-Polymerketten gekennzeichnet, die über Etherbindungen an den Hydroxylgruppen des Sorbitan gebunden sind und sich eher diffus -und nicht klar definiert- über das gesamte Molekül erstrecken (vgl. auch Kapitel 5.3; Abbildung 5.40).

3.2.1.2 Solutol HS 15

Solutol HS 15 stellt ein nichtionisches Tensid der Firma BASF dar. Es handelt sich chemisch um PEGylierte Mono- und Diester der 12-Hydroxystearinsäure (Polyoxyethylen-660-12-hydroxystearat). Zudem ist ein recht hoher Anteil an freiem PEG in dem Gemisch enthalten. Der HLB-Wert liegt nach Herstellerangaben zwischen 14 und 16 und die CMC bei 0,005 bis 0,02%. Das eingesetzte Solutol HS 15 entspricht den Anforderungen der Monographie „Macrogol-12-Hydroxystearat“ der Ph.Eur. Durch die Anwesenheit der Hydroxylgruppe an der C₁₂-Gruppe der hydrophoben Kette ist eine klare Trennung in der Polarität des Molekülbaus aufgehoben. Mit dieser Hydroxylgruppe enthält der lipophile Rest ein polares hydrophiles Element (siehe Abbildung 3.7). Solutol HS 15 wird auf Grund seiner geringen Toxizität und guten Verträglichkeit in verschiedenen Parenteralia eingesetzt (Buszello und Mueller, 1996; Jumaa und Müller, 2002).

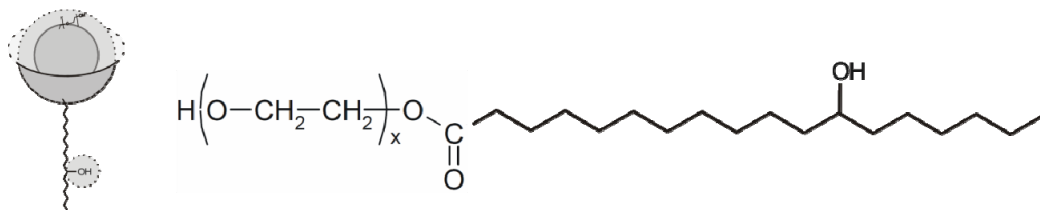


Abbildung 3.7: Molekülbau und chemische Struktur von Solutol HS 15

3.2.1.3 Blockcopolymere

Das eingesetzte Poloxamer 188 stellt einen Vertreter der Blockcopolymere dar, der in vielen verschiedenen Formulierungen, u.a. auch in Parenteralia, zum Einsatz kommt (Gaspar und Duncan, 2009; Joshi und Müller, 2009; Yan et al., 2010). Ein zentraler (lipophiler) Block ist das Polypropylenoxid (PPO), welches mit zwei endständigen PEG-Blöcken verethert ist (Abbildung 3.8). Poloxamer 188 (Pluronic F68) besitzt eine PPO-Kette mit einem Molekulargewicht von 1800 g/mol und zweier PEG-Ketten mit einem Masseanteil von 80%. Die Gruppe der Blockcopolymere wird zur Bildung von „polymeric micelles“ eingesetzt, die zur Solubilisierung von schlecht-

wasserlöslichen Arzneistoffen eingesetzt werden (Chiappetta und Sosnik, 2007).

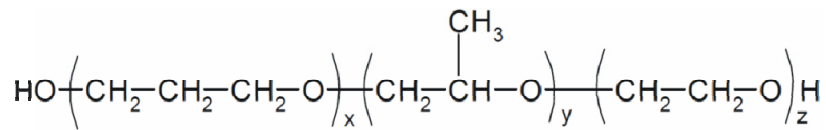


Abbildung 3.8: Struktur von Poloxamer 188

Der Mechanismus der Mizellbildung unterscheidet sich von demjenigen der typischen Tenside, die Mizellen entsprechend der sog. Keilbildung bilden. Jedoch orientieren sich die Moleküle der Blockcopolymeren auch ab einer bestimmten Konzentration (CMC), entsprechend dem hydrophoben Effekt (s.o.), zu Assoziaten (Mizellen) zusammen, die eine Kontaktfläche des Wassers mit apolaren Gruppen (PPO) möglichst gering halten (Kwon und Okano, 1996). Im Gegensatz zu klassischen Mizellbildnern sind die Blockcopolymeren (Polymermizellbildner) nur wenig toxisch bzw. hämolytisch aktiv (Grindel et al., 2002). Aufgrund ihrer emulgierenden Eigenschaften werden Blockcopolymeren in pharmazeutischen Emulsionen als sog. Blockemulgator (Lindenstruth, 2003) oder Stabilisatoren eingesetzt. Ein Problem sind die Verunreinigungen, die während der Synthese der Blockcopolymeren anfallen können und im Tierversuch schon zu einer erhöhten Letalität geführt haben (Davis, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Poloxamer 188 als Gegenbeispiel zu den klassischen bzw. typischen Tensiden mit klar definierter Trennung im Molekülbau eingesetzt, da Blockcopolymeren geometrisch nicht in einer konischen Molekülgeometrie erscheinen.

3.2.1.4 Gallensalze

Nach der Definition von Small und Carey stellen die Gallensäuren und ihre Salze eine besondere Form von Amphiphilen dar. Sie gehören zu den Klasse-IIIB-Lipiden (Carey und Small, 1970). Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Gallensalze nur mizellare Assoziatformen annehmen können und nicht wie andere „typische“ Amphiphile auch lyotrope Mesophasen bei entsprechend höherer Konzentration, jedoch konnte diese Annahme widerlegt werden. Ihr molekularer Aufbau zeigt,

dass sie nicht wie andere Tenside konisch (Keilform) erscheinen, sondern ein steroidales Grundgerüst tragen (Abbildung 3.9). Die verwendeten Gallensalze gehören zu den Steroiden und zeigen ein Cyclopentanophenanthren-Grundgerüst.

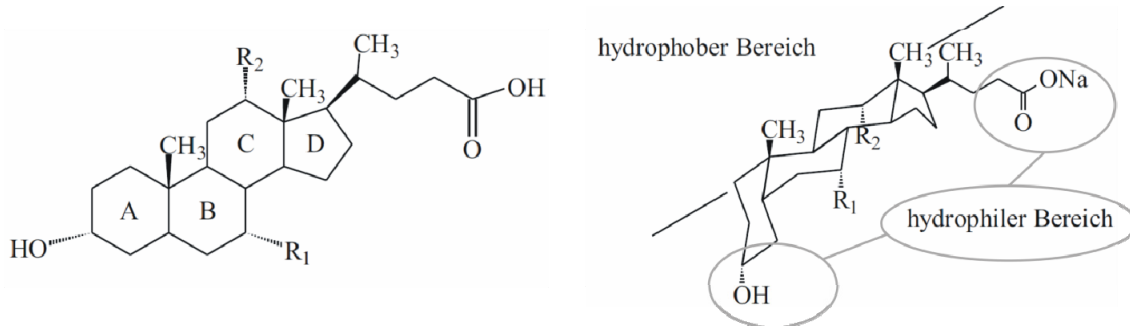


Abbildung 3.9: Struktur der Gallensalze; Bsp.: Cholsäure (Na-) mit $R_1=R_2=H$

Es wurden vor allem Cholsäure-Natrium (CS) und Gycocholsäure-Natrium (GCS) als Vertreter der Gallensalze eingesetzt.

3.2.2 Tenside mit spezifischer Trennung im Molekülbau

3.2.2.1 Sucroseester

Die Klasse der Sucroseester (SE) stellt vom strukturellen Aufbau genau die Klasse an Tensiden dar, die für diese Arbeit gesucht wurde. Durch die Anwesenheit der Saccharose-Einheit ist eine stark polare Kopfgruppe vorhanden, die durch mehrere Hydroxylgruppen eine sehr hohe Hydrophilie aufweist. Jedes der verwendeten Sucroseester trägt mit Saccharose dieselbe Kopfgruppe, variiert jedoch in der Lipophilie der Kette, welche durch unterschiedlich lange Fettsäureketten determiniert ist.

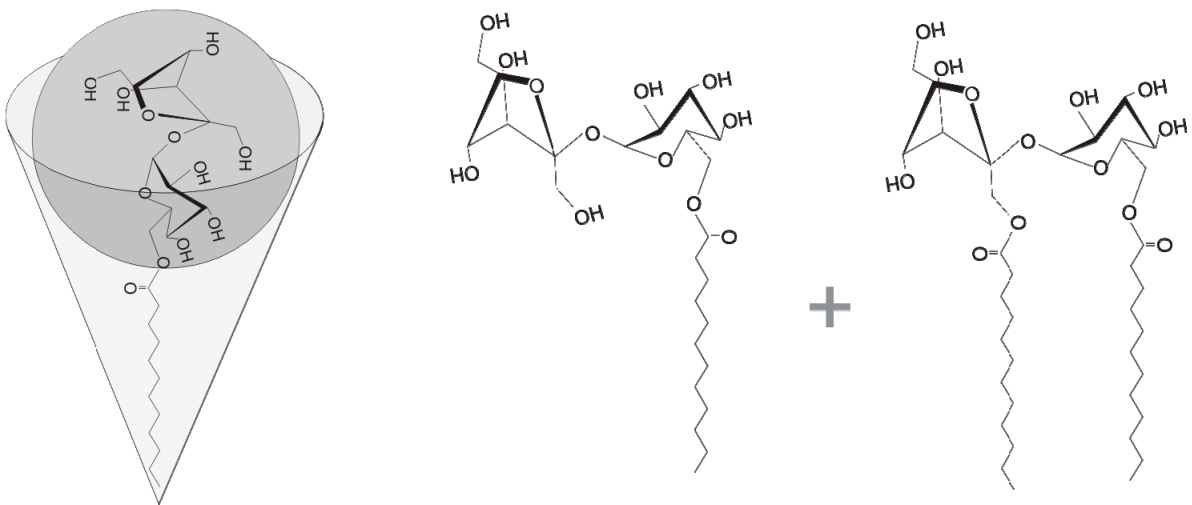


Abbildung 3.10: *Sucroselaurat (Mono- und Diester im Gemisch) als Beispiel für ein Sucroseester*

Es sind Sucroselaurat (SL) als Surfhope D-1216, Sucrosemyristat (SM) als Ryoto-Sugar-Ester M-1216 und Sucrosepalmitat (SP) als Ryoto-Sugar-Ester S-1616 der Firma Mitsubishi Chemical Corporation aus Japan (Tokyo) zum Einsatz gekommen. Bei den verwendeten SE handelt es sich um Mischungen aus Mono- und Diestern (ca. 70T und 30T). Der Anteil an potentiell mizellbildenden Substanzen liegt nach Herstellerangaben bei etwa 95%; der Rest (5%) besteht überwiegend aus freier Saccharose und Wasser.

3.2.2.2 Polyglycerolester

Die Polyglycerolester ähneln vom strukturellen Aufbau den Sucroseestern. Eine stark hydrophile Kopfgruppe ist über eine Esterbindung mit ein oder

zwei Fettsäuren verknüpft. Dabei besteht der hydrophile Kopf jeweils aus einer Decaglyceroleinheit (10•Glycerol). Allerdings ist nicht genau bekannt, ob die zehn Glyceroleinheiten dendrimerisch oder linear verknüpft sind. Es wurde auch bei den Polyglycerolestern (PGE) eine homologe Tensidreihe untersucht, die in der Hydrophilie von Decaglycerollaurat (L-7D) über Decaglycerolmyristat (M-10D) zu Decaglycerolstearat (SWA-10D) abnimmt.

Tabelle 3.2: HLB-Werte eingesetzter Decaglycerolester (Herstellerangaben)

Decaglycerol Ester	Fettsäure	HLB
RYOTO Polyglycerolester L-7D	Laurin-	17
RYOTO Polyglycerolester M-10D	Myristin-	15
RYOTO Polyglycerolester SWA-10D	Stearin-	14

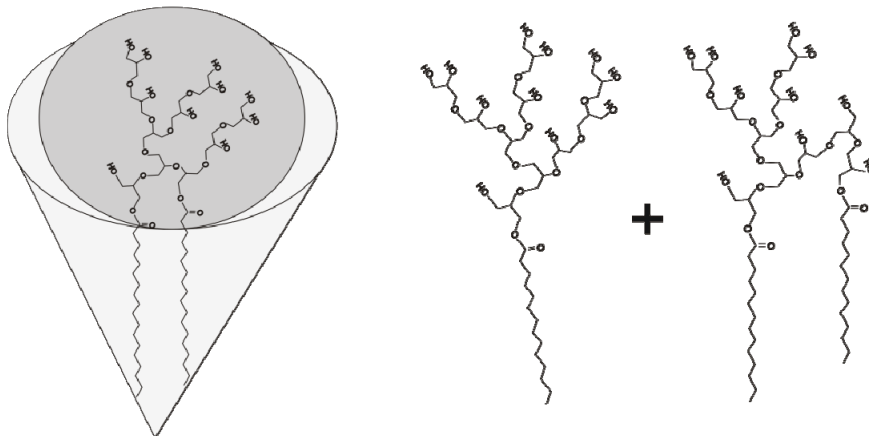


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Polyglycerolester unter Annahme einer dendrimerischen Verknüpfung der Glyceroleinheiten

Die PGE stellen wie die SE Mischungen aus Monoestern und Diestern dar, die laut Herstellerangaben zu 95% rein sind (mizellbildender Anteil 95%). Der Anteil an potentiell mizellbildenden Substanzen von 95% wurde bei der Einwaage der PGE (wie der der SE) zur Probenherstellung entsprechend berücksichtigt.

3.2.3 Zusammenfassung und Kurzübersicht

Die Abbildung 3.12 zeigt eine kategorische Zusammenfassung der eingesetzten Tenside in einer Übersicht. Die verwendeten Tenside lassen sich generell in zwei unterschiedliche Grundtypen einteilen, wobei sich die beiden Typen wesentlich im Bau der Molekülgeometrie und der Polaritätsdifferenz zwischen Kopf und Rest unterscheiden. Es werden Tenside mit streng konischer Struktur von solchen ohne klar definierte Keilform unterschieden. Anhand dieser strukturellen Unterschiede werden die Tenside auf ihre Fähigkeit isotrope klare mischmizellare Lösungen mit Phospholipiden zu bilden untersucht.

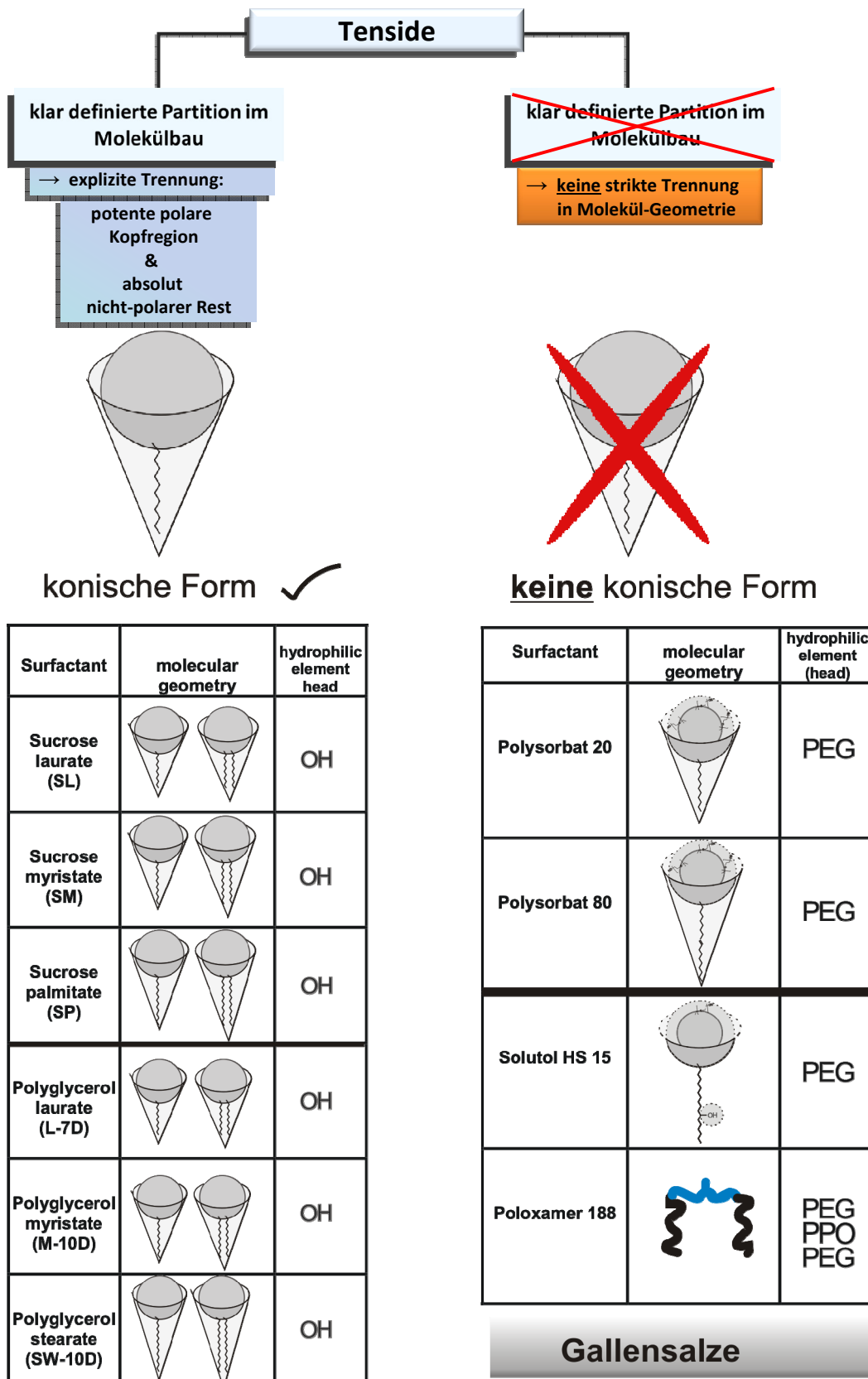


Abbildung 3.12: Übersicht der eingesetzten Tenside (Surfactants); Einteilung nach Molekülgeometrie

3.3 Schlecht wasserlösliche Arzneistoffe

3.3.1 Diazepam und Tetrazepam

Als Modellsubstanz für schlecht wasserlösliche Arzneistoffe wurde in dieser Arbeit zumeist Diazepam eingesetzt. Dieser Arzneistoff wurde bereits in einer Vielzahl von Studien zur mischmizellaren Solubilisierung untersucht und die jeweils gefundenen Solubilisierungskapazitäten der unterschiedlichen MM-Systeme für Diazepam sind bekannt. Zudem stellt Valium[®] MM eines der am weitesten verbreiteten MM-Systeme dar, welches Diazepam zur intravenösen Applikation in mischmizellarer Form enthält. Jedoch wurde dieses etablierte Arzneimittel vor einiger Zeit vom Pharmamarkt genommen.

Ein weiterer Grund zur Verwendung von Diazepam als Modellarzneistoff ist die recht unkomplizierte und in der Literatur beschriebene (Hammad, 1998; Hammad und Müller, 1998c) Analytik zur Quantifizierung des Diazepamgehalts in wässrigen Systemen. Aus demselben Grund wurde auch Tetrazepam als ein weiteres Benzodiazepin-Derivat eingesetzt. Abbildung 3.13 zeigt die Strukturformeln der beiden eingesetzten Benzodiazepine (BDZ).

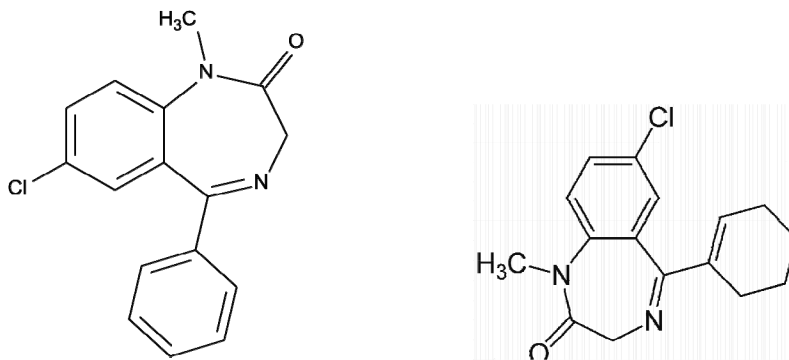


Abbildung 3.13: Chemische Strukturformeln: Diazepam (links) und Tetrazepam (rechts)

Die Identität bzw. Reinheit wurde mittels DSC überprüft (Abbildung 3.14), wobei der gefundene Schmelzpunkt von 132°C genau mit dem in der Literatur (132°C) übereinstimmt (Chu und Yalkowsky, 2009).

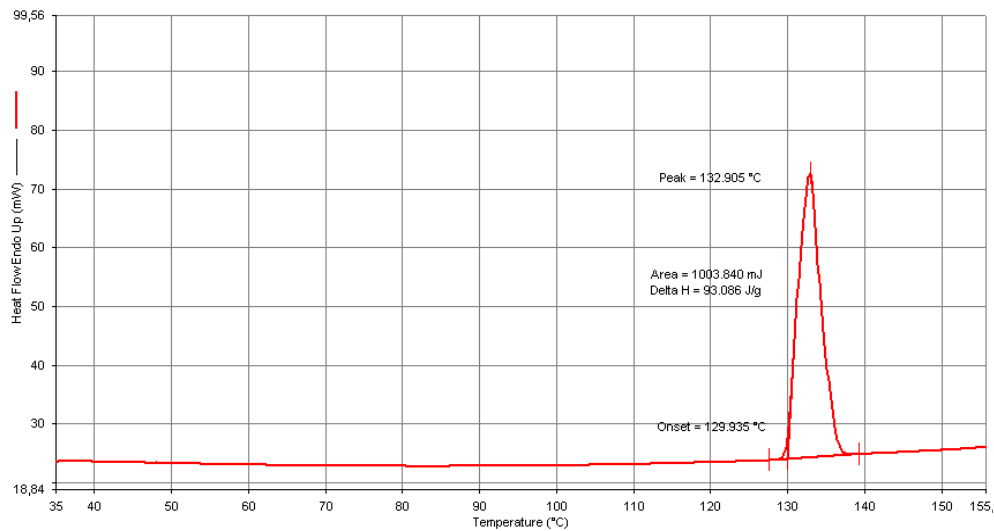


Abbildung 3.14: Schmelzpunkt von Diazepam mittels DSC ermittelt (Identitätsprüfung)

Das UV-Spektrum (nicht dargestellt) belegt ebenso die Identität. Das eingesetzte Diazepam stammt von der Firma Synopharm (Hamburg, Deutschland) und Tetrazepam wurde von Sanofi-Aventis (München, Deutschland) bezogen.

3.3.2 Estradiol

Um die Fähigkeit der neu entwickelten MM-Systeme zur Solubilisierung von schlecht wasserlöslichen Arzneistoffen zu beurteilen, ist mit Estradiol eine schlecht wasserlösliche Substanz einer weiteren Stoffklasse, der Steroide, eingesetzt worden.

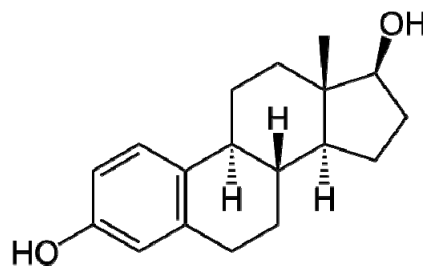


Abbildung 3.15: Strukturformel Estradiol

Das verwendete Estradiol wurde von der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bereitgestellt.

auf die Größe der Mizellen bzw. Mischmizellen zu evaluieren. Hierbei kamen verschiedene Cinnamate zum Einsatz. Es sind insbesondere Methyl-, Benzyl- und Phenyl-cinnamate verwendet worden.

3.4 Herstellung von Mischmizellen (MM)

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Herstellung von Mischmizellen beschrieben worden. Am häufigsten wurden die Filmbildungs- oder auch Kopräzipitationsmethode (Steffen und Schmidt, 1978; Lichtenberg, 1979; Mazer et al., 1980; Ferro und Steffen, 1985; Alkan-Onyuksel et al., 1994; Pittrof und Steffen, 1996; Hammad und Müller, 1998b) und die Methode der direkten Dispergierung (Lappe und Eikermann, 1965; Small et al., 1966; Michel et al., 1990; Sznitowska, 2008) angewandt. Diese zwei Methoden kamen auch im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz und werden im Folgenden genauer beschrieben. Eine weitere Methode, die in der Literatur an mehreren Stellen zitiert ist, beschreibt die Herstellung von MM aus Liposomen-Dispersionen, denen ein Tensid zur Solubilisierung der Liposomen-Bilayer hinzugegeben wird (Lichtenberg et al., 1983; Goni et al., 1986; Partearroyo et al., 1992). Jedoch ist diese Art der MM-Herstellung nicht im Rahmen dieser Arbeiten eingesetzt worden, da hierbei erst eine aufwendige Herstellung der liposomalen Dispersionen notwendig ist.

Um der Tatsache zu begegnen, dass die meisten verwendeten Tenside Mischungen aus Mono- und Diestern (Sucroseester und Polyglycerolester) darstellen oder es sich um nicht aufgereinigte Tenside (Polysorbate, Solutol HS 15, Poloxamer 188) handelt, wurde der Gewichtsanteil und nicht der molare Anteil angegeben, um das Verhältnis von Phospholidid zu Tensid zu beschreiben. Das Kürzel „WF“ steht im Folgenden für den Gewichtsanteil (engl. weight fraction) an PL. Die hergestellten Systeme weisen einen Gewichtsanteil an PL von 0-80% (m/m) auf, was als $WF_{PL}0.0-0.8$ ausgedrückt wurde.

3.4.1 Filmbildungsmethode

Bei dieser Methode wurden die entsprechenden Mengen an PL und Tensid in einer Mischung aus Dichlormethan:MeOH (2:1) in einem mit Schliffhals versehenen Rundkolben gelöst, dieser in ein auf 55°C temperiertes Wasserbad getaucht und das Lösungsmittelgemisch mittels eines Rotationsverdampfers unter Vakuum vollständig abgedampft. Dadurch entstand ein Film an der inneren Wand des Kolbens. Dieser wurde in einem 0,067 M Phosphatpuffer pH 7,4 (Hammad, 1998) bei 55°C gelöst, bis die Lösung klar wurde (etwa 20 min.). Dabei musste der Kolben mit einem Glasstopfen dicht verschlossen werden, um eine Verdunstung zu vermeiden. Über die verwendete Menge an Puffer ist die Konzentration der MM-Lösung eingestellt worden.

Es ist Dichlormethan als weniger toxisches LM für die PL gewählt worden obwohl die in der Literatur beschriebenen Methoden fast ausschließlich mit Chloroform arbeiten.

3.4.2 Direkte Dispergierung

Die direkte Dispergierung ist eine sehr einfache und unkomplizierte Herstellungsmethode, nach der im Rahmen dieser Arbeit sowohl mizellare als auch mischmizellare Systeme hergestellt wurden. Hierbei wurde das Phospholipid als wasserunlösliche Komponente zusammen mit dem Tensid in ein Schraubglasgefäß von genügend großem Rauminhalt eingewogen. Die gewünschte Konzentration ist dann durch Zugabe von 0,067 M Phosphatpuffer pH 7.4 (Hammad, 1998), der zuvor einen Membranfilter (Celluloseacetat) passierte (Porenweite 0,2 µm), eingestellt worden und lag je nach Ansatz im Bereich von 1-80 mg/ml. Der verwendete Puffer wurde in den letzten Studien vor der Verwendung in 500 ml Glasflaschen im Autoklaven unter gesättigtem, gespanntem Dampf sterilisiert. Die Glasflaschen mit Puffer wurden (zugebördelt) im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Zugabe eines Rührfisches wurde das Schraubglas mit einem Stopfen und einem Deckel luftdicht verschlossen. Die Dispergierung erfolgte zunächst für etwa 5 Stunden bei einer erhöhten Temperatur von etwa 55°C auf einem beheizbaren Magnetrührer (vgl. Abbildung 3.17). Nach dieser Zeit erfolgte eine weitere Dispergierung bei RT bzw. 37°C. Die gewählte Temperatur muss anfangs oberhalb der Phasenübergangstemperatur der

eingesetzten Phospholipide liegen (Lichtenberg et al., 1983), um eine optimale Hydratation zu gewährleisten. Für die eingesetzten Phospholipide liegt der Transitionsunkt in jedem Fall unterhalb 60°C, bei den ungesättigten PL sogar deutlich unterhalb dieser Temperatur.



Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der direkten Dispergierung (dD)

Sofern ungesättigte PL verwendet worden sind, wurde etwas α -Tocopherolacetat als Antioxidans hinzugegeben. Die Dauer der Dispergierung hängt stark von den verwendeten Substanzen ab. So kann es bereits nach wenigen Stunden zur Ausbildung einer klaren Lösung kommen oder aber es dauert bis zu 24 Stunden. Es hat sich als sehr günstig herausgestellt die Proben über Nacht bei 37°C in einem bewegten Schüttelbad zur Equilibrierung zu belassen. In einigen Fällen wurde statt der verschließbaren Glasvials ein 100 ml-Messkolben eingesetzt.

3.4.3 Bewertung der Methoden

Zu Beginn der Arbeiten wurde die Herstellungsmethode etabliert; hierbei existierte jedoch noch kein neu entwickeltes MM-System und lediglich klassische Gallensalz/Lecithin-MM waren bekannt, was das Arbeiten erschwerte. Sowohl die Herstellungsmethode der direkten Dispergierung (dD) als auch die der Filmbildung zeigten keine Unterschiede bezüglich der Generierung einer relativ klaren Lösung aus ungesättigten PC (uPC) und verschiedenen Gallensalzen. Diese Erkenntnisse decken sich mit entsprechenden Literaturangaben (Lichtenberg, 1979). An anderer Stelle ist jedoch festzuhalten, dass die direkte Dispergierung bei der Herstellung klassischer Gallensalz/Lecithin-MM einige Nachteile mit sich bringt; so benötigen die Lösungen aus Gallensalz und Lecithin eine wesentlich längere Zeit (von mehreren Tagen), um dann trotzdem nicht deutlich klar zu

werden. Weiterhin zeigen die über direkte Dispergierung erhaltenen klassischen MM einen Durchmesser von ca. 340 nm statt von etwa 10 nm (Michel et al., 1990). Es ist fraglich, ob hier eher Vesikel statt MM beschrieben worden sind. Trotzdem wird das direkte Dispergierungsverfahren zur Herstellung von MM eingesetzt (Lappe und Eikermann, 1965; Sznitowska, 2008).

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit ist es, ein neuartiges MM-System zu entwickeln. Dieses System sollte möglichst einfach herzustellen sein und bestmöglichst auch unter geringem Kostenaufwand industriell im Großmaßstab produziert werden können. Aus diesem Grund und wegen der vielen Nachteile der Filmbildungsmethode, die im Folgenden kurz aufgelistet sind, ist die direkte Dispergierung als Herstellungsmethode für Mischmizellen präferiert worden.

Nachteile der Filmbildungs- oder Evaporationsmethode:

- Verwendung von organischen Lösungsmitteln (LM)
- Rückgewinnung der organischen LM
- Gewährleistung einer rückstandslosen Entfernung der organischen LM aus dem gebildeten Film bzw. Produkt
- Höherer apparativer Aufwand
- Höherer Energieeintrag
- Die Filmbildungsmethode ist eine Standardmethode zur Herstellung von Liposomen. Hier sind die PL in Bilayern angeordnet was durch diese Herstellungsmethode begünstigt wird. Mischmizellare Systeme sollten spontan entstehen (vgl. hydrophober Effekt) und keinen Energieeintrag benötigen.

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse wurden mit MM-Systemen erhalten, die nach der direkten Dispergierungsmethode hergestellt wurden.

Eine Variation der direkten Dispergierung ermöglicht die Verwendung eines Ultra Turrax (T25 basic, Ika Werke GmbH & Co; Staufen, Deutschland) der eine Vordispergierung der PL bei Temperaturen $> 50^{\circ}\text{C}$ erlaubt. Dadurch werden Substanzagglomerate der wasserunlöslichen Phospholipide schneller zerkleinert und durch die feinere Dispergierung wird eine

Hydratation erleichtert. In der praktischen Anwendung kam es jedoch kaum zu einem schnelleren „Klarwerden“ der MM-Systeme. Zu berücksichtigen ist ferner, dass die hohen Scherkräfte einen zusätzlichen Energieeintrag bedingen, der eine Vesikelformation begünstigen kann.

3.5 Herstellung von MM-Systemen zur Untersuchung der Langzeitstabilität

Unter Rücksichtnahme der Erkenntnisse der ersten Versuchsreihe zur Untersuchung der Stabilität (siehe Kapitel 9.1) wurden im Folgenden alle Stabilitätsproben unter aseptischen Bedingungen in Räumlichkeiten mit reduzierten Partikel- und Keimzahlen hergestellt. Hierzu wurden die MM-Systeme zunächst nach der etablierten direkten Dispergierungsmethode (siehe Kapitel 3.4) hergestellt. Die hierfür eingesetzten Glasgefäße wurden vor ihrer Verwendung bei 180°C für drei Stunden hitzesterilisiert und der Puffer über einen Membranfilter der Porenweite 0,2 µm unter Laminar-Flow zugegeben. Nachdem die Systeme equilibriert und ggf. mit Arzneistoff nach dem etablierten Beladungsverfahren (vgl. Kapitel 6.2) beladen worden sind, erfolgte eine Filtration (0,45 µm) der MM-Proben unter Laminar-Flow in zuvor sterilisierte Glasgefäße. Die Glasgefäße sind direkt nach dem Filtrationsschritt noch unter Laminar-Flow im keimarmen Bereich mit sterilisierten Deckeln zugebördelt worden. Die so erhaltenen geschlossenen Systeme wurden bei einer entsprechenden Temperatur gelagert und die Proben zur Analyse wurden in geeigneten Zeitabständen unter der Laminar-Flow-Bank mit Hilfe sterilen Kanüle (und Spritze) entnommen.

Bei den Untersuchungen zur pH-Stabilität der MM-Systeme sind die entsprechenden pH-Werte der Untersuchungslösungen (nach Herstellung der MM (dD) und Equilibrierung) mit NaOH oder H₃PO₄ eingestellt worden.

3.6 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

3.6.1 Einleitung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) stellt eine der am häufigsten angewandten Analytiken dar und wird deshalb im Folgenden ausführlich dargestellt. Bei der DLS, auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genannt, handelt es sich um eine Methode, bei der das Streulicht eines Laserstrahls an einer gelösten bzw. dispergierten Probe analysiert wird. Durch die Wechselwirkung der einfallenden elektromagnetischen Wellen mit dem zu analysierenden Teilchen (Streuer) werden Streuwellen emittiert, die miteinander interferieren. Die so entstehenden Streulichtschwankungen werden detektiert und zeitabhängig analysiert. Auf diese Weise werden Informationen über die Partikeldynamik und schließlich über den hydrodynamischen Partikeldurchmesser erhalten. Nach Herstellerangaben zum verwendeten Zetasizer ZS Nano ermöglicht das DLS-Gerät die Partikelgrößenbestimmung im Durchmesserbereich von etwa 0,6 nm bis 6 μm . In diesem Größenbereich existieren als Alternativ-Methoden lediglich die Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS), die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) bzw. die Elektronenmikroskopie. Ein Nachteil herkömmlicher elektronenmikroskopischer Aufnahmen ist, dass lediglich trockene Proben analysiert werden, deren Probenaufbereitung zudem präparativ aufwändiger und zeitintensiver ist. Zwar ist die Analyse flüssiger Proben mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) theoretisch möglich, jedoch war diese Messmethode im Rahmen dieser Arbeit nicht zugänglich. Eine Anfertigung eines Gefrierbruchs der wässrigen Probe wäre für die Durchführung einer TEM-Messung erforderlich, was zudem keine Analyse der „nativen“ Probe unter Realbedingungen darstellt.

3.6.2 Messprinzip

Die Grundlage der Partikelgrößenbestimmung mittels DLS basiert auf der Messung der Diffusionsgeschwindigkeit von Partikeln. Anfang des 20. Jahrhunderts stellte Albert Einstein eine Gleichung auf, die die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten ermöglicht.

Formel 3-1 Stokes-Einstein Gleichung

$$r = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

r: Partikelradius

k: Boltzmannkonstante

T: absolute Temperatur

D: Diffusionskoeffizient

 η : dynamische Viskosität

Dieser Gleichung (Formel 3-1) liegt die Brownsche Molekularbewegung zu Grunde. Unter der Brownschen Molekularbewegung versteht man die zufällige und ungeordnete Bewegung von Partikeln in flüssiger oder gasförmiger Umgebung. Mittels DLS gilt es die Brownsche Molekularbewegung von Partikeln zu bestimmen, um hieraus auf den Diffusionskoeffizienten der Partikel(bewegung) zu schließen und somit die Partikelgröße zu bestimmen. Je größer Partikel sind, desto langsamer bewegen sie sich. Die Geschwindigkeit wird mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten D beschrieben. Kleine Partikel werden durch die Solvensmoleküle stärker angeregt und bewegen sich schneller. Die Tatsache, dass die Brownsche Molekularbewegung ungeordnet und zufällig ist, setzt dem Messprinzip Grenzen. Ist die Partikelbewegung nicht ungeordnet, z.B. durch eine überlagerte Vibration, dann ist die DLS nicht anwendbar. Daraus folgt weiterhin, dass Partikel, die aufgrund einer zu hohen Dichte sedimentieren, nicht analysiert werden können. Auch wenn in der Probe nur wenige sedimentierende Partikel dispergiert sind werden diese eine Vorzugsrichtung aufweisen und folglich kleinere Partikel daran hindern, sich ungehindert zu bewegen. Jedoch weisen die in dieser Arbeit zu analysierenden Partikel, als Mizellen, Mischmizellen oder Vesikel so geringe Dichten auf (sehr ähnlich der Dichte von Wasser), dass selbst 10 μm große Vesikel noch zu analysieren sind (Malvern-Instruments, ; Rawle und Nitzsche). Je höher die Temperatur ist, desto schneller werden sich die Partikel aufgrund höherer kinetischer Energie bewegen (Term T, absolute Temperatur). Auch die Wahl des richtigen Solvens muss berücksichtigt werden, da die Viskosität für die Durchführung eines DLS-Experiments bekannt sein muss (η -Term). Eine Sedimentation kann folglich

nur durch die Wahl eines Solvens mit höherer Dichte bei konstanter Viskosität eingeschränkt werden.

3.6.3 Theorie der DLS und Autokorrelation

Der Laser arbeitet als monochromatische Lichtquelle und sendet elektromagnetische Strahlung bekannter Frequenz als Strahlungswellen, die auf die Probenpartikel treffen. Nun kommt es zur Lichtstreuung am Partikel, da die Strahlungswelle durch die Wechselwirkung mit der äußeren Hülle des Teilchens von seiner ursprünglichen Richtung in eine andere umgelenkt wird. Die Wechselwirkung der einfallenden elektromagnetischen Wellen mit dem zu analysierenden Teilchen (Streuer) führen zur Emission von Streuwellen, die miteinander interferieren. Da sich die Teilchen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung in alle Raumrichtungen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten bewegen, kommt es zu Fluktuationen der Streulichtintensität. Die so entstehenden Intensitätsschwankungen des Streulichts werden detektiert und zeitabhängig analysiert (Abbildung 3.18).

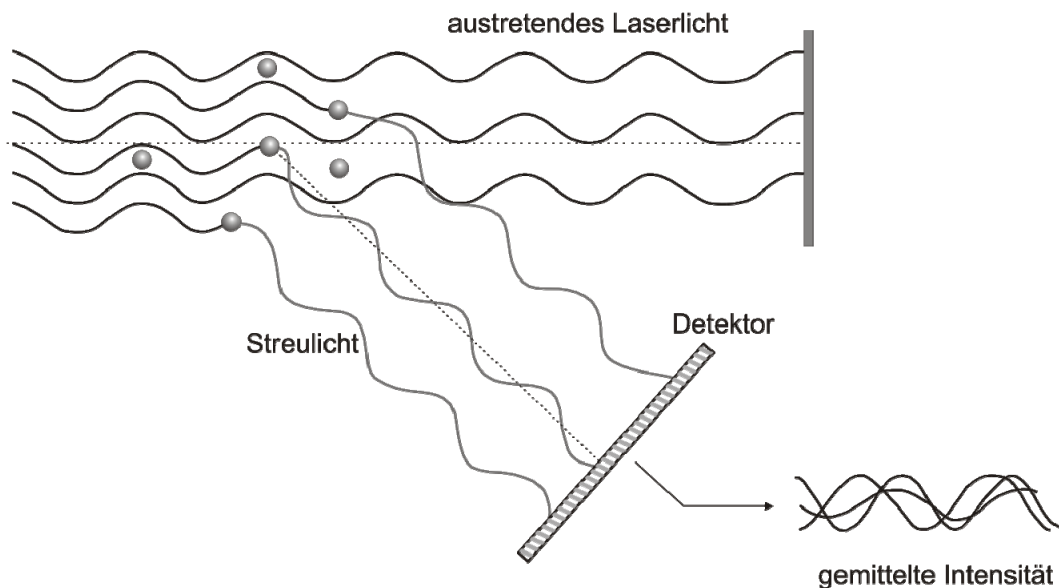


Abbildung 3.18: Streuung von Laserlicht an sphärischen Partikeln; Detektor fängt interferierende Streuwellen auf, deren Intensität gemittelt wird; Abbildung modifiziert nach Rawle und Nitzsche

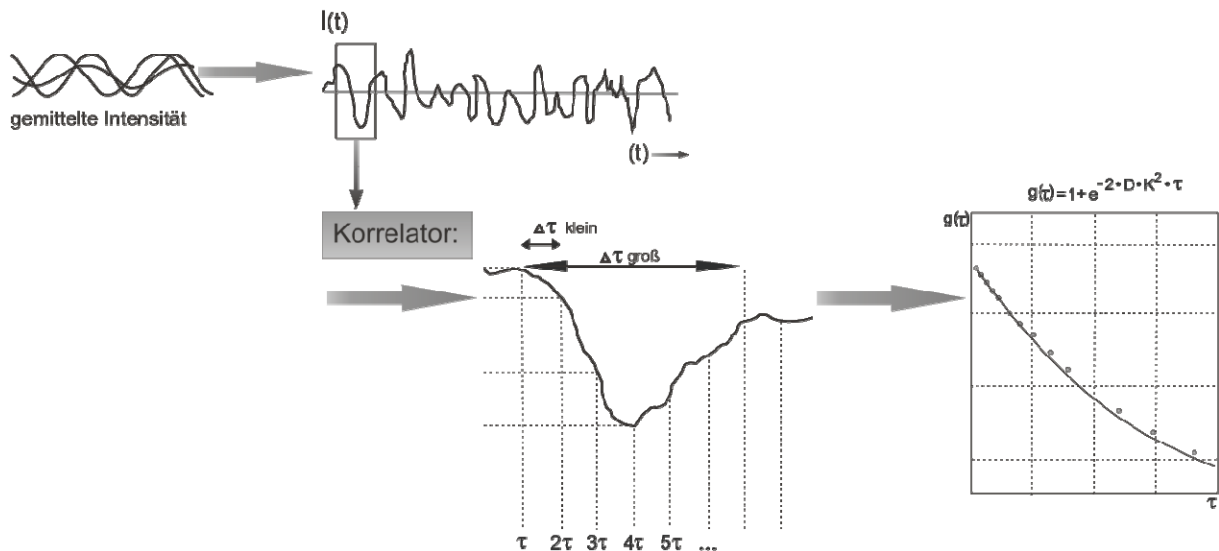


Abbildung 3.19: Korrelator Funktion der DLS Technik; Vergleich der Intensitätsfluktuationen der Streustrahlung zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Zeitabhängigkeit der Streulichtintensität $I(t)$ ähnelt einem Rauschen, das mit einer gewissen Fluktuationsperiode um einen mittleren Wert I schwankt (Abbildung 3.19). Die Intensität wird über die Messzeit gemittelt, die im Vergleich zu einer Fluktuationsperiode (ns-Bereich) sehr lang ist und folglich einen zuverlässigen Wert für die mittlere Intensität liefert. Der Korrelator, als Herzstück einer DLS, vergleicht nun die am Detektor empfangenen Intensitätsfluktuationen der Streustrahlung hoch zeitaufgelöst miteinander. Vergleicht der Korrelator die Signalintensität zur Zeit t mit der Intensität sehr kurze Zeit später ($t + \tau$) dann besteht eine deutliche Relation zwischen den Intensitäten beider Signale. Bei größeren τ -Werten, d.h. bei einem zeitlich großen Abstand zwischen zwei Messpunkten, ist die Korrelation gering. Je weiter zwei Messpunkte voneinander entfernt sind, umso weniger gut werden die Intensitätssignale miteinander korrelieren (Abbildung 3.19), denn die Ähnlichkeit bezüglich Position, Geschwindigkeit und Bewegungsrichtung der Teilchen (und damit die Messgrößen $I(t)$ und $I(t + \Delta\tau)$) wird mit zunehmendem $\Delta\tau$ sehr klein.

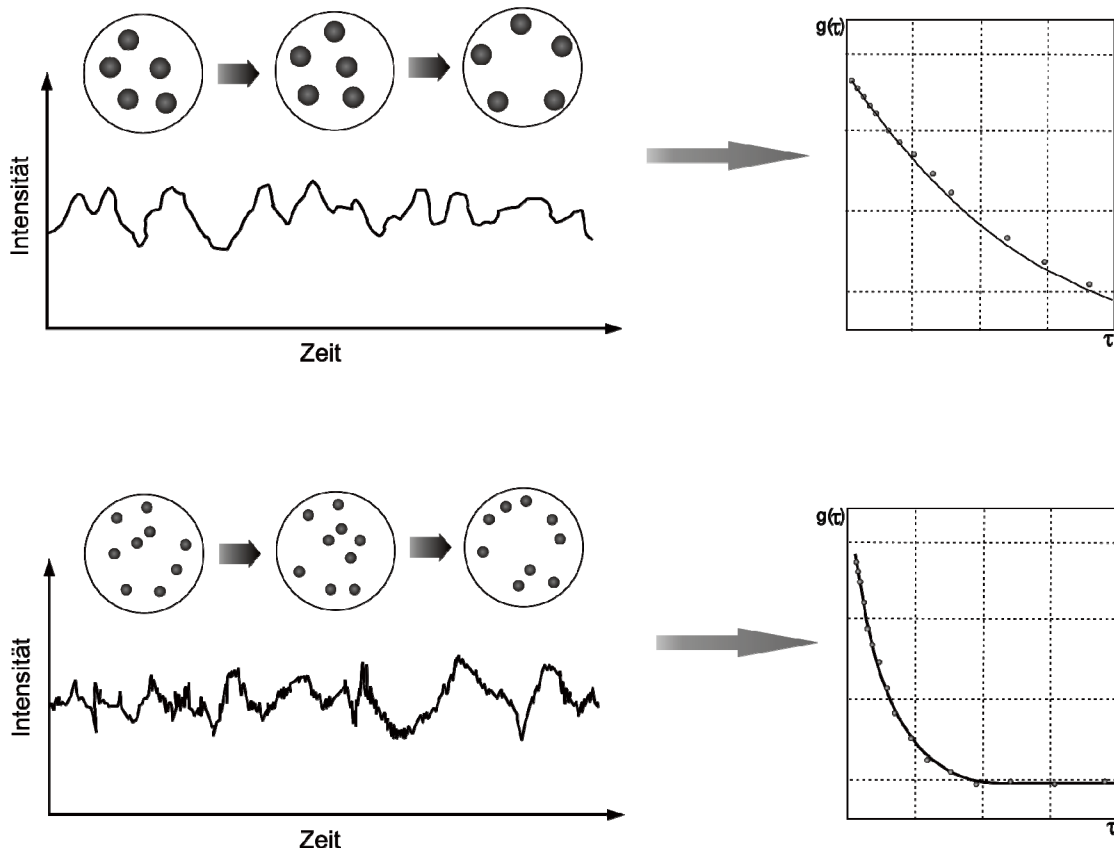


Abbildung 3.20: Gemittelte Streulicht-Intensitätsfluktuationen und entspr. Korrelationsfunktionen für große Partikel (oben) und kleine Partikel (unten);
Abbildung modifiziert nach Rawle und Nitzsche

Eine abnehmende Korrelation erfolgt mit zunehmender Zeit bei Signalvergleichen von $I(2\tau)$, $I(3\tau)$, $I(4\tau)$ etc. mit dem Signal bei $\Delta\tau$, so dass bei $\Delta\tau = \infty$ schließlich überhaupt keine Korrelation mehr vorliegt (Abbildung 3.19). Monodisperse Partikeldispersionen zeigen, dass die Korrelationsfunktion exponentiell gegen $\tau(\infty)$ abfällt. In der Praxis wird diese Funktion wie folgt gebildet. Der Messwert eines Signals beim Zeitpunkt t wird mit dem Wert beim Zeitpunkt $(t+\tau)$ verglichen und das Produkt $I(t) \cdot I(t+\tau)$ über einen größeren Zeitraum von τ gemittelt. Dieser Mittelwert $(I(t) \cdot I(t+\tau))$ entspricht der Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$. Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20 verdeutlichen die Abhängigkeit der Autokorrelation vom t -Wert. Das Signal großer Partikel wird sich zeitlich langsamer ändern als das kleiner Partikel. Die Korrelationsfunktion wird langsam abfallen. Kleine Partikel bewegen sich schnell und die Korrelationsfunktion zeigt einen steiler abfallenden Verlauf (Abbildung 3.20).

3.6.4 Messaufbau

Ein Helium-Neon Laser durchstrahlt die Messzelle mit der Probe (in einer temperierbaren Probenhalterung) mit einer Wellenlänge von 633 nm. In einem Winkel von 173° wird das von den Partikeln zurückgestreute Licht von einem Detektor aufgefangen und das Signal mit einem Photomultiplier verstärkt.

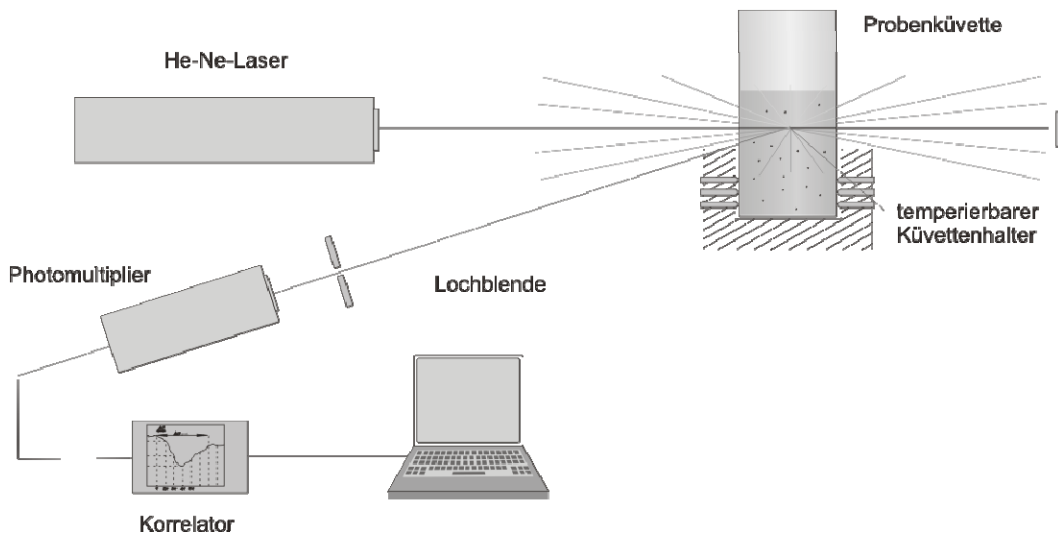


Abbildung 3.21: Messaufbau des verwendeten DLS-Geräts

Die erhaltenen Signale werden in dem Korrelator über die Zeit, in der sie auftreten, miteinander verglichen und eine entsprechende Korrelationsfunktion erstellt. Die Abbildung 3.21 zeigt den Aufbau des verwendeten Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern. Die Messung in einem Winkel von 173° (und nicht wie üblich 90°) wird als „Non Invasive Backscattering Detection“ (NIBS) bezeichnet und soll die Analyse höherkonzentrierter Proben ermöglichen. Begründet wird dies durch einen kürzeren Weg des Streulichts durch die Probe, wodurch es zu einer reduzierten Mehrfachstreuung kommen soll.

3.6.5 Auswertungsparameter: Polydispersitätsindex

Wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben, wird durch den Korrelator aus den zeitlichen Schwankungen der Streulichtintensität eine Autokorrelationsfunktion erstellt und an eine theoretische Korrelationsfunktion $g(\tau)$ (siehe Abbildung 3.19) angepasst. Bei Anpassung

einer exponentiellen (theoretischen) Korrelationsfunktion an die gemessene Autokorrelationsfunktion liefert die DLS als Ergebnis u.a. den Polydispersitätsindex (PDI). Der PDI beschreibt mathematisch den Unterschied der gemessenen Autokorrelationsfunktion zur angepassten Korrelationsfunktion und ist ein dimensionsloses Maß für die Breite der Verteilung (Kumulanten-Analyse). Um eine Partikelgrößenverteilung zu erhalten, werden mehrfach Exponentialfunktionen an die Autokorrelationsfunktion angepasst (Methode nach CONTIN).

Tabelle 3.3: Verteilungsbreite und PDI-Werte

PDI-Wert	Verteilung
< 0.05	streng monodispers
0.1-0.2	enge Verteilung
0.2-0.5	breite Verteilung
0.5-0.7	sehr breite Verteilung
> 0.7	nicht mehr auswertbar

Für eine ideale monodisperse Probe liegen alle Messpunkte der gemessenen Autokorrelationsfunktion genau auf der theoretischen Korrelationsfunktion ($PDI = 0$), was in der Praxis jedoch nicht vorkommt. Der PDI-Wert ist eine entscheidende Größe, mit der erst beurteilt werden kann, ob die Messungen auswertbar sind (vgl. Tabelle 3.3). So sollten die erhaltenen PDI-Werte möglichst kleiner als 0.3 sein, so dass das Partikelkollektiv nicht zu breit verteilt ist, um eine Aussage über die Partikelgröße zu erlauben.

Weitere Auswertungsparameter wie die gemessene Teilchengröße sowie die genaue Probenaufbereitung und die verwendeten Einstellungen zur Durchführung einer DLS-Messung sind für die zu analysierenden Systeme evaluiert worden und im Praktischen Teil (Kapitel 4.1) aufgeführt.

3.7 UV/VIS Spektroskopie

UV/VIS-spektroskopische Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit primär zur Messung der Transmission der Proben eingesetzt. In einem Fall diente das UV/VIS-Spektrometer zur Identitätsprüfung von Diazepam. Hier ist ein entsprechendes UV/VIS-Spektrum aufgenommen worden. Zudem diente eine colorimetrische Methode der Quantifizierung der solubilisierten Menge an Erythromycin (siehe Anhang).

3.7.1 Licht-Transmission

Die Messung der Licht-Transmission stellt eine einfache aber sehr wesentliche Methode dar. Nach Definition von Small stellen MM-Systeme optisch isotrope klare Lösungen dar (Small et al., 1969; Carey und Small, 1970). Eine vollständige Solubilisierung des wasserunlöslichen PL in Form von MM zeigt sich in der Bildung einer klaren isotropen Lösung (Lichtenberg, 1979; Rosoff und Serajuddin, 1980). Das eingesetzte Tensid muss somit einen möglichst hohen Anteil an wasserunlöslichem Phospholipid in einer klaren Lösung halten, was durch eine Lichttransmission von 100% oder unwesentlich weniger (Hammad, 1998) angezeigt wird. Für die Untersuchungen wurde die Lichttransmission der Probe gegen doppelt destilliertes Wasser oder Pufferlösung bei einer Wellenlänge von 660 nm bestimmt (Hammad und Müller, 1998b; Hunien, 2005). Weiterhin musste ausgeschlossen werden, dass das jeweilige Tensid bei der entsprechenden Wellenlänge einen Chromophor mit Eigenabsorption darstellt. Folglich wurde die Transmission eines jeden Tensids auch in Puffer (ohne PL) vermessen. Mischmizellen sind in der Regel kleiner 60 nm, d.h. sie sind bei den Transmissionsmessungen deutlich kleiner als die Wellenlänge des anregenden Lichtes (660 nm). Die Streuung an solchen Partikeln, die wesentlich kleiner als die Wellenlänge des Lichtes sind, wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Solche Lösungen zeigen bläuliches Streulicht. Damit soll an dieser Stelle gleich festgehalten werden, dass es bei vielen MM-Lösungen zu einer bläulichen Opaleszenz-Erscheinung kam, die von einer Trübung zu unterscheiden ist. Teilchen, die eine weißliche Trübung hervorrufen sind größer als die Wellenlänge des anregenden Lichtes und zeigen kein Streuverhalten nach Rayleigh. Die Transmissionsmessungen wurden an 1%igen Lösungen bei RT mit einem

UV/VIS-Spektrometer (Uvikon 930, Kontron Instruments, München, Deutschland) durchgeführt. Die Untersuchungslösungen wurden vor der Messung nicht filtriert, um die Proben dadurch nicht zu verfälschen und nicht solubilisiertes PL abzutrennen.

3.8 Fluorimetrie

Mit Erreichen der CMC ändern sich viele physikochemische Eigenschaften der Lösung (Bauer et al., 2002; Leuenberger, 2002). Auf dieser Tatsache beruhen die meisten Verfahren zur Bestimmung der CMC. Jedoch wird dabei nicht die Mizellbildung direkt, sondern die Änderung einer bestimmten physikochemischen Eigenschaft der Lösung untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur CMC-Bestimmung genutzt, die es erlaubt eine Mizellbildung direkt nachzuweisen, indem den zu untersuchenden Lösungen ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt wird. Hierbei wird die Erhöhung der Fluoreszenz von einem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff verfolgt (Jackson et al., 1982; Chattopadhyay und London, 1984). Dabei macht man sich zu Nutze, dass der lipophile Fluoreszenzfarbstoff in wässriger Umgebung kaum Fluoreszenz zeigt. Befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff in einem Medium, das ein Detergens in einer geringeren Konzentration enthält als seine CMC beträgt, wird die Fluoreszenz des Farbstoffes kaum beeinflusst. Ist das Tensid jedoch in einer Konzentration gelöst, die oberhalb seiner CMC liegt, so bilden sich Mizellen, in deren hydrophoben Bereiche sich der lipophile Fluoreszenzfarbstoff einlagern kann, was zu einem starken Fluoreszenzanstieg führt.

Es wurde eine DPH (1,6-Diphenyl-hexatrien)-Stammdispersion von 2×10^{-7} M hergestellt, mit der die zu untersuchenden Tensid-haltigen Stammlösungen (mizellar oder mischmizellar) verdünnt wurden. Die Lösungen wurden über Nacht in einer dunklen Kammer zur Equilibrierung gelagert. Die DPH-Fluoreszenz wurde an dem Fluoreszenz-Plattenlesegerät Polarstar optima der Firma BMG LABTECH GmbH (Offenburg, Deutschland) vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 355 nm, die Emissionswellenlänge 428 nm. Vor und während der Messungen wurde die Temperatur von 25°C gehalten. Zur Auswertung wird

die Fluoreszenzintensität gegen die jeweilige Gesamtkonzentration an oberflächenaktiven Substanzen des mizellaren oder mischmizellaren Systems aufgetragen. Die Bestimmung der CMC erfolgt durch Ermittlung des sprunghaften Fluoreszenzanstiegs bei steigender Tensidkonzentration, der durch die Solubilisierung des DPH in den gebildeten Mizellen oder Mischmizellen begründet ist. Die Messungen wurden dreifach durchgeführt und alle gezeigten Daten sind die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Proben.

3.9 Oberflächenspannungsmessungen

Die Messung der Oberflächenspannung einer Verdünnungsreihe von Lösungen mit oberflächenaktiven Substanzen stellt die klassische Methode zur Bestimmung der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) dar. Die hergestellten Stammlösungen der mizellaren oder mischmizellaren Systeme wiesen eine Konzentration von 5 bzw. 10 mg/ml auf. Basierend auf diesen Stammlösungen wurden Verdünnungen hergestellt und bei RT über 24 Stunden zur Equilibrierung gelagert bevor eine Messung gestartet wurde. Die Lösungen mit amphiphilen Substanzen, deren Konzentration oberhalb der jeweiligen CMC lagen, brauchten 6 Stunden zur Equilibrierung, die geringer konzentrierten Lösungen benötigten 24 Stunden zur Equilibrierung. Die Oberflächenspannungsmessungen wurden für jede Stammlösung und jede Verdünnung dreimal wiederholt ($n = 3$). Die equilibrierte Oberflächenspannung wurde nach der Wilhelmy-Platten-Methode mit einem K12-Tensiometer der Firma Krüss (Hamburg, Deutschland) gemessen. Die Bestimmung der CMC erfolgte durch Auftragen der Oberflächenspannung gegen den Logarithmus der Konzentration an oberflächenaktiven Substanzen. Aus dem Schnittpunkt der beiden Abschnitte über und unter der CMC erhält man die kritische Mizellbildungskonzentration. Alle gezeigten Daten sind die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Proben (je $n = 3$). Bei der Probenpräparation musste darauf geachtet werden, dass nur Glasgefäße zum Einsatz kommen, da sich zeigte, dass die verwendeten oberflächenaktiven Substanzen an Plastikbehältnissen adsorbierten. Ferner sollten die Glasgefäße nicht mit Tensidlösungen (Spülmittel) gewaschen

werden. Nach dem Spülmachinengang wurden die Gefäße noch zweimal mit heißem Aqua bidest. gewaschen.

3.10 H-NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR = nuclear magnetic resonance) ermöglicht die Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome und der Wechselwirkungen mit seinen Nachbaratomen. Diese Analytik ist eine weit verbreitete Methode zur Strukturaufklärung von Molekülen. Bei der ^1H -NMR-Spektroskopie werden Wasserstoffkerne betrachtet.

Die ^1H -NMR-Spektroskopie wurde verwendet, um Aussagen über die Lokalisierung des Modellarzneistoffes Diazepam in mischmizellaren Systemen zu ermöglichen. In der Literatur ist die Anwendung dieser Analytik zu eben diesem Zweck für mizellare und mischmizellare Systeme beschrieben (Gupta et al., 2000; Wei et al., 2009). In Anlehnung an diese Methoden wurde eine ^1H -NMR-Analyse an ausgewählten MM-Systemen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst unbeladene und zusätzlich mit Diazepam-beladene MM-Systeme untersucht.

Die Durchführung einer ^1H -NMR-Analyse an mischmizellaren Lösungen bedarf einer besonderen Probenaufbereitung. Hierzu wurden die zu untersuchenden MM-Systeme zunächst mit einer geeigneten Methode lyophilisiert (vgl. Kapitel 3.12). Nach der Gefriertrocknung erfolgte die Rekonstitution einiger Proben in deuteriertem Wasser und weiterer Proben in deuteriertem Chloroform. Nach der Rekonstitution im entsprechenden Lösungsmittel wurden die Proben in die Untersuchungskapillaren eingefüllt (je 600 μl) und ein ^1H -NMR-Spektrum wurde jeweils aufgenommen. Als Messgerät ist ein Kernresonanzspektrometer Avance III 300 (Bruker, Rheinstetten) verwendet worden. Die Messfrequenz für die ^1H -NMR-Proben betrug 300,13 MHz. Sämtliche Messungen wurden bei konstanter Temperatur (300 K) durchgeführt.

3.11 Viskositätsmessungen

3.11.1 Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde

Der über die DLS-Messungen zu bestimmende Diffusionskoeffizient und damit die ermittelte Teilchengröße (vgl. Stokes-Einstein) sind von der Viskosität der Probe abhängig (vgl. Kapitel 3.6.2). Damit ist die Kenntnis der Viskosität der mittels DLS zu vermessenden Proben ist eine Voraussetzung für ein erfolgreiches DLS-Experiment. Die Viskositäten ausgewählter mizellarer und mischmizellarer Lösungen wurden u.a. mit Hilfe eines Kapillarviskosimeters bestimmt. Es wurde ein Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde (Schott AVS 350) verwendet, mit dem die Viskosität idealviskoser Flüssigkeiten bestimmt werden kann. Bei der Messung wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Auslaufgeschwindigkeit einer idealviskosen Flüssigkeit aus einer Kapillare der Viskosität umgekehrt proportional ist (Bauer et al., 2002). Die Auslaufgeschwindigkeit folgt dabei dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz. Mit Hilfe des Kapillarviskosimeters erhält man die kinematische Viskosität der Probe, die über die Dichte der Lösung in die dynamische Viskosität umgerechnet werden kann.

Von jeder Probe wurden drei Messungen durchgeführt. Insgesamt wurden pro System je zwei Proben untersucht, so dass sechs Messungen vorgenommen wurden. Bei einer Messung wurden Schwankungen von bis zu 1,5% akzeptiert (z.B. drei Sekunden bei Durchflusszeiten > 300 s) und nach jeweils drei Messungen wurde die Kapillare nach Säuberung erneut befüllt.

Der größte Nachteil der Viskositätsmessungen mit dem Kapillarviskosimeter ist, dass ein Aufschäumen der Tensid-haltigen Untersuchungslösungen unvermeidbar ist. Die Tensidlösungen mussten zuerst durch die Kapillare hochgepumpt werden, bevor ihre Auslaufgeschwindigkeit bestimmt werden kann. Hierbei kam es zur Schaumbildung, welche zum einen das Auslaufen behinderte und zum anderen ein genaues Auslösen des Start- und Endzeitpunktes (optischer Sensor) erschwerte. Der größte Nachteil dieser Methode ist, dass für jede Messung große Probepolumina von ca. 40 ml benötigt werden und dass die Säuberung und Durchführung der Messungen mit schäumenden Tensidlösungen problematisch sind.

3.11.2 Vibrations–Viskosimeter

Das verwendete Schwingplatten–Viskosimeter SV-10 (Malvern-Instruments) ist ein Vertreter einer neueren Generation von Viskosimetern, die entwickelt wurden, um die Viskosität von Flüssigkeiten zu bestimmen.

Zwei dünne Sensorplatten mit einem Durchmesser von je 12 mm tauchen in 10,0 ml der Untersuchungslösung ein. Angetrieben von einem elektromagnetischen Antrieb werden die Schwingplatten mit einer konstanten Frequenz von 30 Hz in Schwingung versetzt. Die Amplitude der Vibration wird detektiert und ein hinreichender Strom wird zum elektromagnetischen Antrieb geleitet, um eine konstante Amplitude aufrecht zu erhalten. Die Viskosität der Untersuchungslösung stellt dem freien Schwingen nun einen Widerstand entgegen, der die Vibration dämpft. Um die Vibrationsamplitude nun aufrecht zu erhalten, ist ein Stromfluss zum elektromagnetischen Antrieb erforderlich. Die Viskosität der Untersuchungslösung ist proportional zum Verhältnis aus dem zugeführten „Additiv“-Strom und dem Widerstand der viskosen Untersuchungslösung. Damit misst das verwendete SV-10 Vibrationsviskosimeter die Viskosität durch Erkennung des elektrischen Stroms, der erforderlich ist, um die beiden Sensorplatten mit einer konstanten Frequenz von 30 Hz und einer Amplitude von weniger als 1 mm schwingen zu lassen.

Viskositäten, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, sind zumeist mit dem Schwingplatten–Viskosimeter SV-10 ermittelt worden. Die größten Vorteile gegenüber dem Kapillarviskosimeter sind das deutlich geringere Probenvolumen von 10 ml, die genaue und einfache Überwachung der Temperatur, die geringe Störanfälligkeit, die einfache Reinigung und vor allem die Möglichkeit Tensidlösungen ohne Schaumbildung zu vermessen. Der größte Nachteil ist, dass die Messwerte in der zweiten Nachkommastelle schwanken.

3.12 Lyophilisation

Die Gefriertrocknung stellt eine sehr effektive Methode dar, um die Stabilität einer wässrigen Formulierung durch Entfernung des Wassers zu erhöhen. Da die eingesetzten Hilfsstoffe wie PL oder Zuckerester chemisch Ester darstellen, können diese in Folge einer Hydrolyse im wässrigen Milieu

gespalten werden (vgl. Kapitel 9.1). Somit ermöglicht die Lyophilisation eine Erhöhung der chemischen Stabilität (vgl. Kapitel 9.1 und 9.4). Ferner bedingt der Entzug von Wasser eine verbesserte mikrobiologische Haltbarkeit. Die Gefriertrocknung von Arzneistoff-haltigen, mischmizellaren Lösungen wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob sich entsprechende MM-Zubereitungen nach erfolgreicher Lyophilisation wieder in Wasser rekonstituieren lassen und dabei die Solubilisation des Wirkstoffs erhalten bleibt. Kernfrage war somit, ob es gelingt, die mit Arzneistoff-beladenen MM in der Weise zu gefriertrocknen (und ggf. zu stabilisieren), dass das Solubilisat (MM+AS) auch nach Rekonstitution in Wasser eine stabile klare Lösung darstellt. Die Mischmizellen wurden mit der direkten Dispergierungsmethode hergestellt und ggf. mit Diazepam als Modellarzneistoff (siehe Kapitel 6.2) beladen. Zu einigen der equilibrierten MM-Proben wurden Hilfsstoffe zur Stabilisierung gegeben. Hier kamen Mannitol, Saccharose und Glucose in getrennten Ansätzen und unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz. Je 2,0 ml der entsprechenden MM-Lösung wurden in ein geeignetes Glas-Vial überführt, welches mit einem Spezialstopfen versehen wurde. In dem Gefriertrockner Alpha 1-4 (Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) wurden die Proben (n = 3) zunächst bei -30°C über 24 Stunden eingefroren. Die Primärtrocknung dauerte insgesamt etwa 30 Stunden und begann bei -25°C . Anschließend erfolgte eine schrittweise Erhöhung der Temperatur auf 0°C . Während der Sekundärtrocknung wurde die Temperatur schrittweise für etwa 15 Stunden von 0°C auf 30°C angehoben. Nach Beendigung des Zyklus wurden die Vials umgehend dicht verschlossen und bis zur Verwendung trocken gelagert. Die Rekonstitution erfolgte in bidestilliertem Wasser.

3.13 Trübungspunkt-Bestimmung

Eine 1%ige Tensid- oder Mischmizell-Lösung von mindestens 8 ml wurde in Wasser oder Puffer hergestellt bzw. entsprechend verdünnt (zu 1%). Rein mizellare Lösungen wurden in der Regel in Aqua bidest. hergestellt, wohingegen die mischmizellaren Lösungen gepuffert waren. Unter Rühren wurden die Lösungen soweit erwärmt bis eine deutliche Trübung als

Präzipitation des Tensids oder des PL festzustellen war. Kurz nach Auftreten der Trübung wurde die Lösung wieder abgekühlt und der Punkt notiert, an dem sie wieder klar wurde. Der Mittelwert der Temperatur, an der die Lösung trüb wurde und der, an der sie wieder klar wurde, entspricht dem Trübungspunkt (Jumaa und Müller, 1998). Die Messungen wurden insgesamt mindestens dreimal durchgeführt ($n = 3$). Sofern der Trübungspunkt (TP) des Systems oberhalb des Siedepunktes von reinem Wasser lag, wurden aufsteigende Konzentrationen an NaCl (5%-20%) zugegeben, um den TP in Anwesenheit des Strukturbildners zu senken.

3.14 Photographie zur Visualisierung

Während dieser Arbeit wurde eine Nikon D80-Digitalkamera genutzt, um zu visualisieren, inwieweit eine Kombination unterschiedlicher Komponenten in der Ausbildung einer klaren (mischmizellaren) Lösung resultiert. Diese schnell durchführbare Methode liefert, ähnlich wie die Transmissionsmessungen, Informationen über den Grad der Trübung in den hergestellten Systemen und ermöglicht einen schnellen objektiven Vergleich der verschiedenen Systeme.

Praktischer Teil

4 Evaluierung spezieller Methoden

4.1 DLS-Methode

4.1.1 Volumengewichteter Durchmesser

Die Software des verwendeten DLS-Instruments liefert neben dem PDI als Primärergebnis einer Messung die Partikelgröße als intensitätsgewichteten hydrodynamischen Partikeldurchmesser. Eine intensitätsgewichtete Auswertung der Messungen sollte jedoch nur dann bevorzugt werden, wenn die Probe streng monodispers verteilt vorliegt (Malvern-Instruments, ; Rawle und Nitzsche). Weiteres ist ferner zu beachten, wenn kleine Partikel wie Mizellen detektiert werden sollen. Für diesen Fall liegt eine Rayleigh-Approximation zur Auswertung vor (wenn $\text{Partikel} < \lambda/10$), die besagt, dass die Streulichtintensität um mit sechster Potenz vom Partikeldurchmesser abhängt (d^6 -Term). Sofern eine Probe neben sehr vielen kleinen Mizellen ($< 20 \text{ nm}$) auch nur wenige Vesikel oder Agglomerate ($> 200 \text{ nm}$) enthält, ist die Messung nicht mehr präzise auswertbar, da die Streulichtintensität der vielen kleinen Streuer von den wenigen dafür aber großen (großer Durchmesser = hohe Streulichtintensität) Teilchen deutlich überdeckt wird (Rawle und Nitzsche). In so einem Fall bietet die Software eine Auswertung der Daten nicht nach Rayleigh, sondern nach der Mie-Theorie und somit eine Umrechnung der Intensitätsverteilungsdaten in eine Volumenverteilung. Abbildung 4.1 zeigt diesen Zusammenhang anhand der Auswertung einer bimodal-verteilten Probe, die neben vielen Mischmizellen von etwa 27 nm Durchmesser noch eine zweite Spezies von etwa 140 nm Durchmesser aufweist. Die intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung (Abbildung 4.1 a) zeigt, dass die größere Spezies mit einem Durchmesser von 142 nm etwa 90% der Signalintensität ausmacht. Folglich scheint es so, dass 90% der Probe aus vermeintlichen Vesikeln oder Agglomeraten bestehen und nur ein

geringer Anteil der Probe (10%) aus Partikeln, die einen Durchmesser von „mizellarer“ Größe aufweisen. Hierfür ist die erhöhte Streuintensität der größeren Partikel verantwortlich (d^6 -Term).

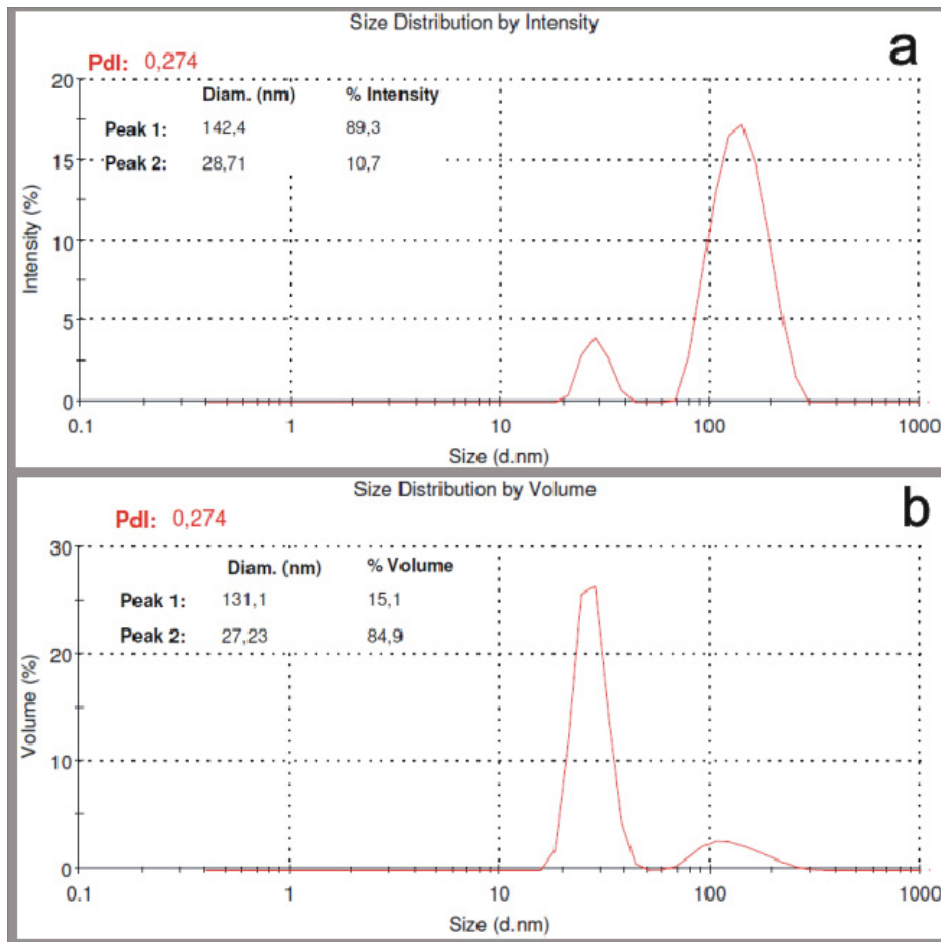


Abbildung 4.1: Unterscheidung zwischen intensitätsgewichteter (a) und volumengewichteter (b) Auswertung einer DLS Messung

Die volumengewichtete Partikelgrößenverteilung (Abbildung 4.1 b) zeigt ein genau entgegengesetztes Ergebnis. Hier wird deutlich, dass etwa 85% der Probenpartikel nur etwa 27 nm klein sind. Aufgrund dieser Tatsache wird im Folgenden eine volumengewichtete Darstellung der Partikelgrößen gewählt, die für mizellare und MM-Systeme eine gebräuchliche Standarddarstellung ist (Dabholkar et al., 2006; You et al., 2007; Alani et al., 2010).

4.1.2 Messdauer eines DLS-Experiments

Generell hat die DLS Technik den Vorteil, dass eine Messung wenig Zeit beansprucht und das Messergebnis nach sehr kurzer Zeit vorliegt. Jedoch erhöht sich mit der Messdauer auch die Qualität des Ergebnisses, da mit der Messdauer die Auflösung steigt. Wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben, vergleicht die Autokorrelationsfunktion Signale innerhalb sehr kurzer Zeitabstände über einen bestimmten Messzeitraum miteinander. Bei längerer Messzeit werden folglich wesentlich mehr Signale in die Korrelation mit einbezogen und die Streuung der Signale untereinander sinkt. Je kleiner die Partikel sind, umso weniger stark sind ihre Signale, da die Streuintensität des Lichtes mit der sinkender Partikelgröße abnimmt. Die Messdauer zur DLS-Analyse kleiner Teilchen sollte relativ hoch sein im Vergleich zur Analyse größerer Teilchen. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde die Messzeit wie folgt evaluiert.

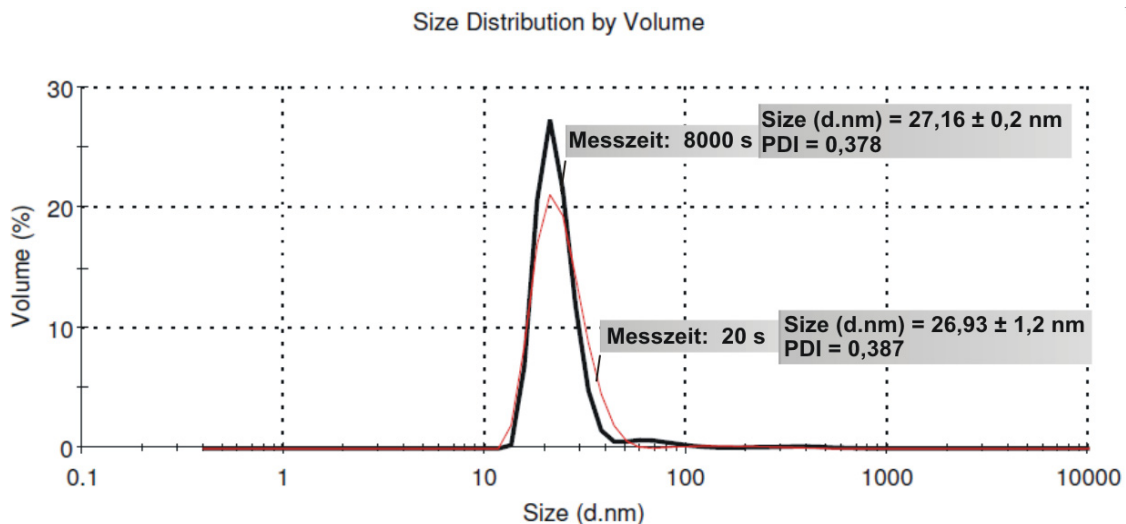


Abbildung 4.2: Einfluss der Messzeit auf die Auflösung des Messergebnisses eines DLS Experiments

Es konnte gefunden werden, dass kein entscheidender Einfluss einer sehr hohen Messzeit auf das Messergebnis vorliegt (Abbildung 4.2). Dieselbe Probe eines MM-Systems wurde zuerst für eine Zeit von 20 Sekunden pro Messung bei 10 Messungen je Durchlauf (Run) und insgesamt zwei Durchläufen vermessen (20 Sekunden/Messung bei 10 Messungen/Run und 2 Runs). Danach wurde dieselbe Probe über einen

längeren Zeitraum von 8000 Sekunden pro Messung bei 10 Messungen pro Durchlauf und insgesamt zwei Durchläufen vermessen. Die Ergebnisse zeigen zwar eine erhöhte Auflösung bei längerer Messdauer, jedoch äußert sich dies nur in einer etwas engeren Partikelgrößenverteilung, wobei die gefundenen PDI-Werte nur in der zweiten Nachkommastelle voneinander abweichen, und es führt nicht zu einer Änderung des gefundenen Durchmessers der Mischmizellen (vgl. Abbildung 4.2).

4.1.3 Probenpräparation für die DLS-Messungen

Bei der Probenpräparation und bei der Durchführung der DLS Messung ist größte Sorgfalt zu beachten. Staubpartikel und Verunreinigungen in der Probe sind um ein Vielfaches größer als die zu messenden Partikel (Mizellen oder MM), damit erzeugen sie wesentlich mehr Streulicht als die „Zielobjekte“ (Mizellen oder MM) und überdecken deren Signal. Folglich sind saubere (fremdpartikelfreie) und filtrierte Lösungsmittel essentiell. Für jede Probe wurde das zur Herstellung verwendete Wasser (Aqua bidest.) oder aber der Puffer durch einen 0,22 µm-Filter gegeben. Weiterhin wurde die Küvette mit der Untersuchungslösung vor Beginn einer Messung mind. 5 min lang in Ruhe im DLS-Gerät bei 25°C temperiert, damit keine Konvektionsströme während der Messung aufkommen. Zu beachten ist ferner, dass die Anwesenheit sehr großer Partikel zu einer unerwünschten Sedimentation führen würde, die eine Vorzugsrichtung aller vorhandenen Partikel beeinflusst.

Eine Probenfiltration bringt eine Abtrennung größerer Partikel mit sich und erhöht damit die Ergebnisqualität. Problematisch ist jedoch, dass dadurch gewissermaßen die Probe in der Art verfälscht wird, dass einige größere Komponenten „wegfiltriert“ werden. Deshalb sind zumeist erst unfiltrierte Proben vermessen worden, um anschließend eine filtrierte Probe zu analysieren. Je nachdem, was mit der DLS-Messung zu untersucht ist, kann eine Probenfiltration notwendig sein oder nicht. Die Art der Probenpräparation bedingt damit die Ergebniss-Interpretation und dementsprechend die Auswertung des DLS-Experiments. In vielen Fällen wurden unfiltrierte Proben untersucht, da die Gesamtheit aller auftretenden Komponenten (Mizellen, Mischmizellen, Vesikel,

Agglomerate) entscheidend für eine Interpretation der Messergebnisse waren. Die Abbildung 4.3 zeigt wie sich eine Probenfiltration bei Verwendung unterschiedlicher Filter auf das Ergebnis von DLS-Messungen an einer monomodal verteilten mischmizellaren Probe auswirkt.

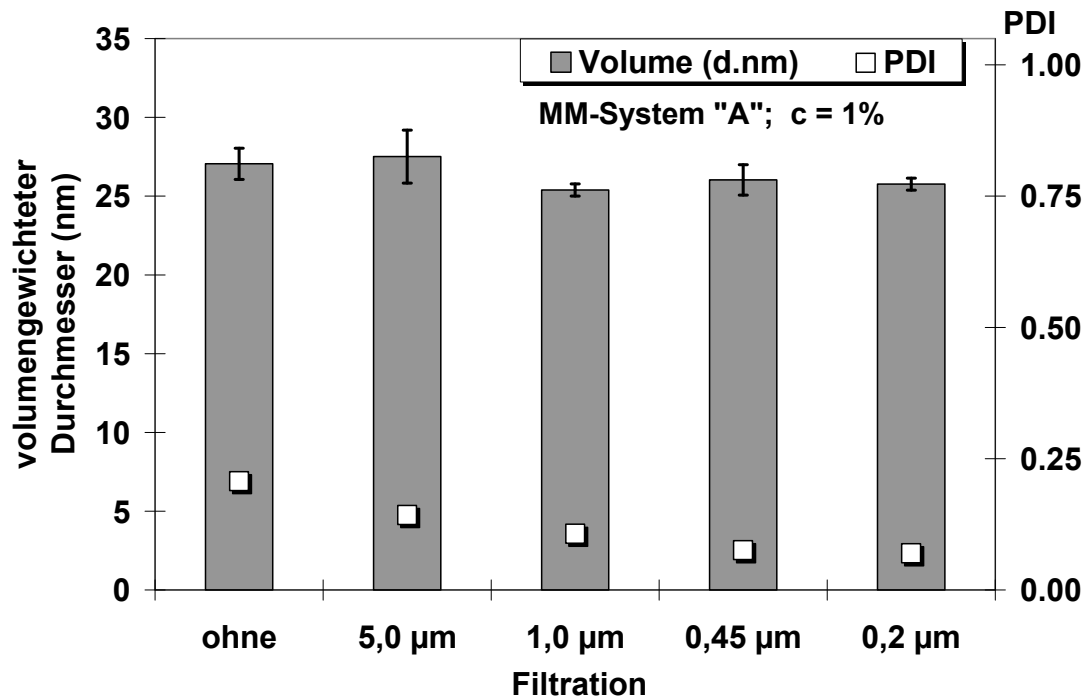


Abbildung 4.3: Einfluss der Probenfiltration auf das Ergebnis von DLS-Messungen an einem ausgewählten MM-System; Gesamtkonzentration $c = 1\%$

Unabhängig davon, ob eine Probenfiltration durchgeführt wurde lieferten die DLS-Messungen nahezu unveränderte hydrodynamische MM-Durchmesser bei der untersuchten mischmizellaren Probe. Durch die Probenfiltration kommt es jedoch mit kleinerem Porendurchmesser der Filter zu einer leichten Verkleinerung der PDI-Werte. Durch die Filtration werden wenige größere Streuer, wie Staubpartikel, Verunreinigungen oder kleinere Agglomerate zerstört oder aber aus der zu analysierenden Probe entfernt.

4.1.4 Viskositätseinfluss auf DLS-Messungen

Eine besondere Rolle bei der Durchführung und Auswertung eines DLS Experiments nimmt die Probenviskosität ein. Die DLS misst die Größe von Teilchen durch eine Analyse der zufälligen Bewegung, die der Brownschen Molekularbewegung folgt (vgl. Kapitel 3.5). Für sphärische Partikel, die nicht sedimentieren, hängt diese Bewegung neben der Partikelgröße nur von der Viskosität der Lösung und der absoluten Temperatur ab.

$$d_h \sim 1/\eta \cdot D$$

d_h = hydrodynamischer Durchmesser

η = Viskosität

D = Diffusionskoeffizient

Abbildung 4.4: Abhängigkeit des Teilchendurchmessers von der Viskosität

Die Temperierung der Proben muss exakt erfolgen, weil die Viskosität stark von der Temperatur abhängig ist und eine Änderung von 1°C der Probentemperatur eine Viskositätsänderung um etwa 2,4% hervorruft. Eine temperierbare Probenkammer ermöglicht die exakte Temperatureinstellung. Voraussetzung für die Durchführung eines DLS-Experiments ist die Kenntnis der Probenviskosität, welche über die Software eingegeben werden muss. Sobald die Viskosität einer Probe 10% zu hoch ist, wird die ermittelte Partikelgröße 10% zu klein sein (Malvern Instruments, 2008). Dieser einfache theoretische Sachverhalt wurde für eine exemplarische mischmizellare Probe untersucht und bestätigt (Abbildung 4.5). Die untersuchten Mischmizellen zeigen eine Größe von ca. 22 nm, wenn sie gegen die Viskosität von Wasser (0,8872 mPas) vermessen werden. Wird nun eine 10-fach erhöhte Viskosität am Gerät als Probenviskosität vor dem Start einer Messung eingegeben, so sinkt die gefundene Teilchengröße ebenfalls um das 10-fache, auf 2,2 nm (Abbildung 4.5).

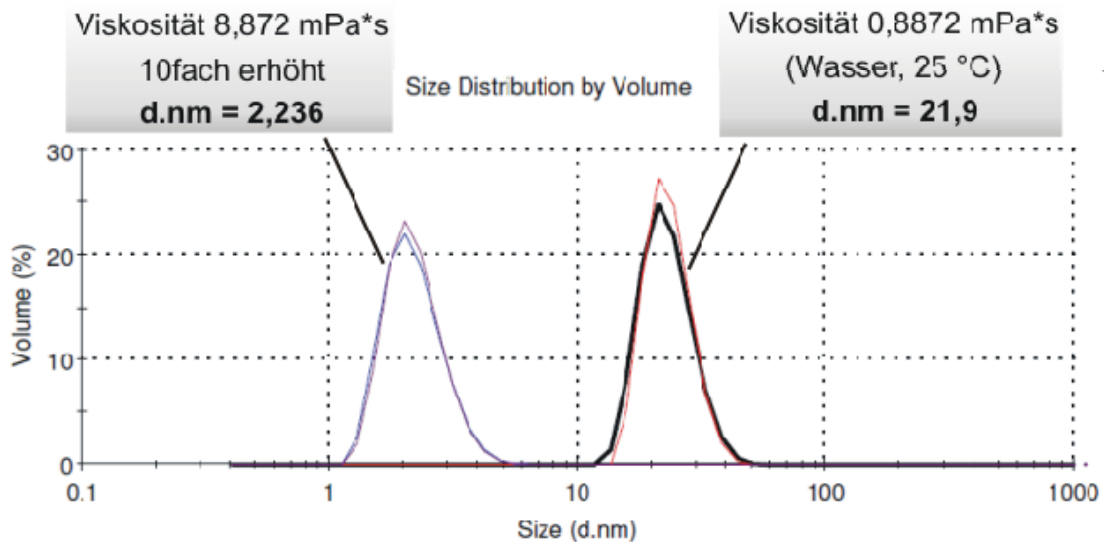


Abbildung 4.5: Einfluss einer 10-fach erhöhten Viskosität auf die mittels DLS gefundene Größe von Mischmizellen

Durch eine ausreichend starke Verdünnung mit Wasser bzw. Puffer könnte eine erhöhte Probenviskosität zwar vernachlässigt werden, jedoch ist es gerade ein Problem der bekannten Gallensalz/Lecithin-MM, dass diese in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration in Form, Größe und Gestalt variieren (Shankland, 1970; Lichtenberg et al., 1983). Ferner kann es in PL/Tensid-Systemen in Abhängigkeit von der Konzentration zu Mizell-Vesikel Umlagerungen kommen (Mueller, 1981; Andelman et al., 1994; Ollivon et al., 2000; Leng et al., 2003). Insofern wurden verschieden konzentrierte Lösungen desselben MM-Systems untersucht, um etwaige Veränderungen festzustellen. Zur adäquaten Interpretation der Ergebnisse ist die Bestimmung der Viskosität der Proben bei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt wurden und der Einfluss der Probenviskosität auf ein DLS-Experiment evaluiert worden. Mit Hilfe des Kapillarviskosimeters wurden die Viskositäten für unterschiedlich konzentrierte Polyglycerollaurat Lösungen mit und ohne einem Anteil von 50% (m/m) hPC (MM) bestimmt. Die Viskosität nimmt bei erhöhter Konzentration sowohl bei den reinen Tensidlösungen als auch im Gemisch mit hPC (MM) im gleichen Ausmaß zu. Jedoch tritt dieser Effekt erst oberhalb einer Konzentration von 1% in Erscheinung.

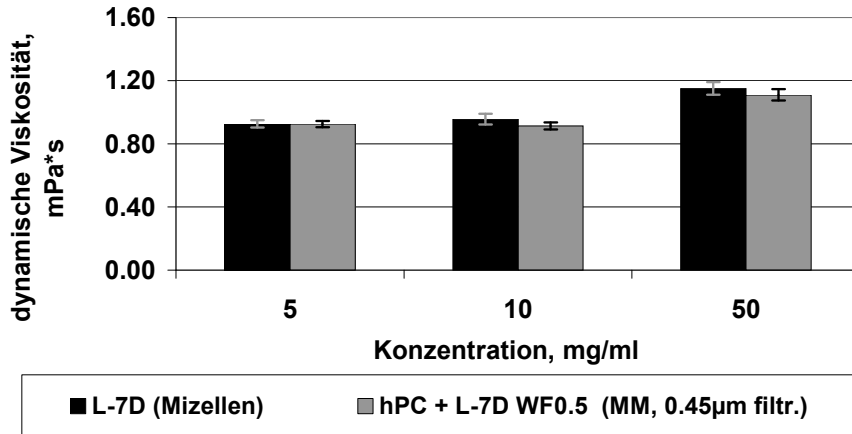


Abbildung 4.6: Dynamische Viskositäten verschieden konzentrierter mizellarer und mischmizellarer Proben

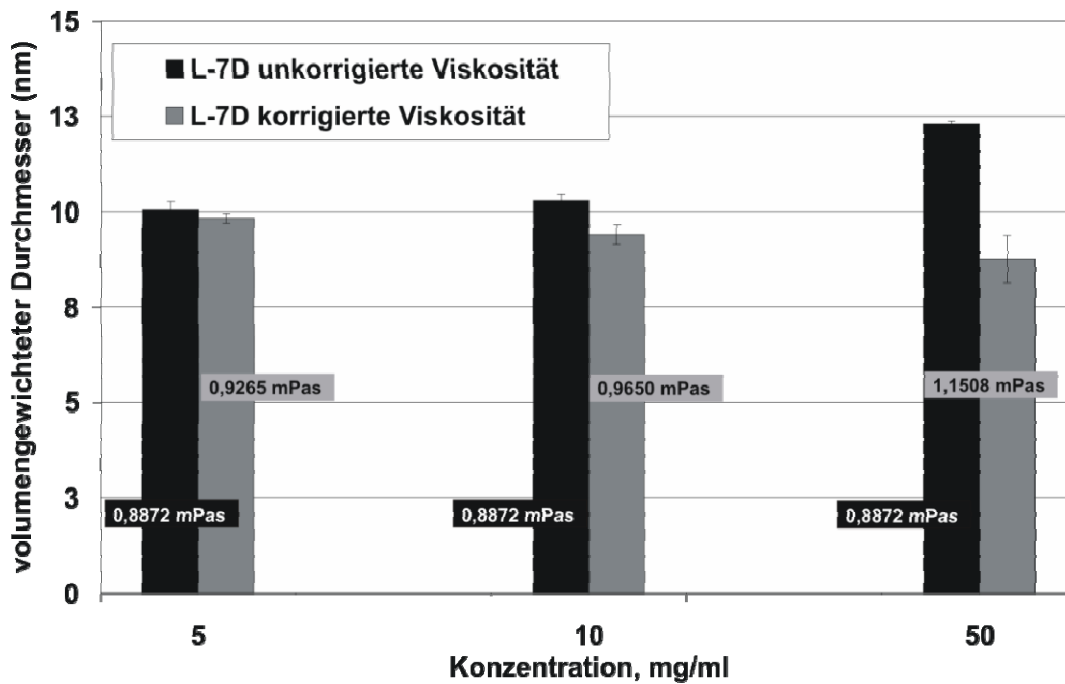


Abbildung 4.7: Größe von L-7D Mizellen (DLS) vermessen gegen die Viskosität von Wasser und der korrigierten Viskosität

Abbildung 4.7 zeigt die mittels DLS erhalten Größen von L-7D Mizellen in unterschiedlichen Konzentrationen, wobei zuerst nach Software Vorgabe die Viskosität von Wasser zu Grunde gelegt war (schwarze Balken) und anschließend die mittels Kapillarviskosimeter

ermittelte wahre Viskosität eingegeben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die durch DLS-Messungen ermittelten Mizellgrößen bei höherer Viskosität, hier gleichbedeutend mit höherer Konzentration (vgl. Abbildung 4.8), zu hohe Werte ergaben, wenn eine nicht-korrigierte Viskosität angenommen wird. Sobald die Konzentration einen genügend hohen Wert, größer 10 mg/ml, übersteigt tritt der Viskositätseinfluss deutlich in Erscheinung. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen einer Studie, in der Latex-Partikel einer definierten Größe von 200 nm in unterschiedlich konzentrierten Poloxamer-Lösungen dispergiert vorlagen und mittels DLS-Technik untersucht wurden. Die Viskosität der Lösungen nahm mit höherer Poloxamerkonzentration zu, wodurch ebenfalls die gemessene Größe der Latex-Teilchen zunahm, wenn gegen die Viskosität von Wasser vermessen wurde. Durch Verwendung der korrigierten (wahren) Viskosität wurden wiederum 200 nm große Latexteilchen detektiert (Fillafer et al., 2007). In Anbetracht dieser Abhängigkeit wurden die Viskositäten der zu untersuchenden Lösungen in den meisten Fällen bestimmt – sofern ausreichende Probevolumina zur Verfügung standen. Je höher konzentriert eine Probe ist, umso stärker steigt ihre Viskosität und somit wurden im Rahmen dieser Arbeit zumeist 1%ige Lösungen mittels DLS untersucht. Hier macht sich der beschriebene Einfluss nicht so deutlich bemerkbar, da die Viskositäten nahe der von Wasser liegen. Die hergestellten mizellaren oder mischmizellaren Systeme wiesen zumeist eine Konzentration von 1% (10 mg/ml) oder 5% (50 mg/ml) auf. An Systemen mit diesen Konzentrationen wurden zudem die meisten Untersuchungen durchgeführt. Um den Einfluss der Viskosität auf das DLS Messergebnis zu berücksichtigen, wurden mehrere mizellare und mischmizellare Systeme hergestellt und ihre Viskosität bei 25°C mit dem Vibrationsviskosimeter bestimmt. Jedoch wurden für entsprechende Messungen immer noch mind. 10 ml Probelösung benötigt. Nicht von jeder Substanz war eine entsprechende Menge vorhanden, um die Viskositätsmessungen durchzuführen (z.B. PEG-PL). Zudem schwanken die Viskositätswerte unterschiedlicher Chargen eines MM-Systems gleicher Konzentration recht deutlich untereinander, so dass es kaum zu Unterschieden im Vergleich zu MM-Systemen aus anderen

Komponenten gleicher Konzentration kam. Schließlich wurden die Viskositäten mehrerer unterschiedlicher MM-Chargen mit einem Anteil an hPC von 50% ($WF_{hPC}0.5$) in den Konzentrationen 1% und 5% ermittelt und miteinander verglichen (Tabelle 4.1). Aus diesen Untersuchungen wurden Werte für die Viskosität gemittelt, die standardmäßig für verschiedene MM-Systeme mit einem $WF_{PC}0.5$ bei der Durchführung eines DLS-Experiments verwendet wurden. Bei MM-Systemen mit einem $WF_{PC}0.5$ und der Konzentration von 1% wurde eine dynamische Viskosität von 0,95 mPas und bei 5%igen Systemen eine dynamische Viskosität von 1,24 mPas verwendet, sofern die tatsächliche Viskosität nicht für das entsprechende System ermittelt wurde.

Tabelle 4.1: Viskositäten verschiedener MM-Systeme (je ein anderes System oder eine andere Charge) mit einem $WF_{PC} 0.5$, $c = 1\%$ oder 5%

MM-System, 1%	Viskosität, mPas	MM-System, 5%	Viskosität, mPas
hPC+SL WF0.5	0,93	hPC+SL WF0.5	1,24
hPC+SL WF0.5	1,01	hPC+SL WF0.5	1,25
hPC+SL WF0.5	0,95	hPC+SL WF0.5	1,29
hPC+SL WF0.5	1,00	hPC+SL WF0.5	1,10
hPC+SL WF0.5	0,92	DPPC+SL WF0.5	1,39
DPPC+SL WF0.5	0,95	DPPC+SL WF0.5	1,24
DPPC+SL WF0.5	0,92	hPC+L-7D WF0.5	1,16
DPPC+SL WF0.5	1,02		
hPC+L-7D WF0.5	0,92		

4.1.5 Angewandte Messeinstellungen

Die DLS-Messungen wurden wie folgt durchgeführt:

Bei 25°C und nach 5 min Equilibrierzeit wurde jede Probe dreimal ($n = 3$) vermessen. Insgesamt wurden die meisten Proben dreimal, unabhängig

voneinander hergestellt, so dass die gezeigten Werte die Mittelwerte dreier unabhängiger Proben sind, die jeweils dreimal vermessen wurden. Für eine Messung wurde 1,0 ml einer Probe verwendet. Ein DLS-Experiment umfasst drei Mess-Durchläufe, wobei jeder Durchlauf (run) 10 Messungen mit einer Messzeit von 200 Sekunden impliziert.

4.2 Hochdruckhomogenisation

4.2.1.1 Einleitung und Methode

Obwohl das Verfahren der Hochdruckhomogenisation (HDH) eher zur Herstellung von Liposomen eingesetzt wird, sollte untersucht werden, inwieweit es sich zur Herstellung von MM eignet. Eventuell könnte durch die HDH ein Erwärmen der Lösung oberhalb des Phasentransitionspunktes des PL vermieden werden oder aber die Dauer der Herstellung und Equilibrierung ließe sich reduzieren. Hintergrund ist weiterhin ein System namens „Nano-Solve“, welches ein flüssiges „transparentes emulsionsartiges System“ auf Basis von PL darstellt, die in einer Polyol-Matrix mittels HDH zu 15–75 nm großen Tröpfchen dispergiert vorliegen (Wajda, 2004b; Wajda, 2004a).

Es wurden Untersuchungen an zwei unterschiedlichen PL-Typen, uPC und hPC, durchgeführt indem diese zu unterschiedlichen Anteilen entweder mit Sucroselaurat oder Sucrosemyristat kombiniert wurden. Die Substanzen wurden in ein Glasgefäß eingewogen und eine Konzentration von 5 oder 10 mg/ml mittels Puffer pH 7,4 (s.o.) eingestellt. Mit einem Ultra Turrax (T25 basic, Ika Werke GmbH & Co; Staufen, Deutschland) wurden die Dispersionen vordispergiert. Daraufhin wurde jeweils der gesamte Ansatz in die Probengefäßkammer des Hochdruckhomogenisators eingebaut. Mit einem Druck von 500 bzw. 900 bar wurde die Dispersion durch den Spalt gepresst. Dieser Vorgang wurde mit jedem Ansatz 20mal wiederholt und nach 5 Durchläufen wurden Proben gezogen, die mittels DLS analysiert wurden.

4.2.1.2 Ergebnisse und Zusammenfassung

Das Verfahren der Hochdruckhomogenisation ließ sich nicht zufriedenstellend auf eine Mischmizell-Herstellung in Systemen aus uPC oder hPC mit Sucroselaurat oder -myristat übertragen. Die

Auswertungen mittels DLS zeigen, dass es auch nach 20 Durchläufen bei hohen Drücken von 900 bar nicht zu einer monomodalen Partikelgrößenverteilung der Proben kam. Dies kann zum einen daran liegen, dass neben MM auch Vesikel gebildet wurden, da der hohe Energieeintrag bei der Zwangdispergierung der PL eine Bilayer-Assoziation im wässrigen Milieu begünstigen kann. Zudem deuten die gefundenen Partikelgrößen von 150-350 nm auf eine Vesikelbildung hin. Zum anderen bringt die Herstellungsmethode einige Nachteile in der Durchführung mit sich. Die unlöslichen PL liegen als Agglomerate in Wasser dispergiert vor, deren Durchmesser wesentlich größer als der des HDH-Spaltes ist, bevor sie den Spalt passieren. Die Agglomerate könnten einen freien Strom durch die Düse behindert haben, da bei der Durchführung zwar keine Verstopfung der Düse, wohl aber einzelne Agglomerate im Bereich vor der Düse beobachtet wurden. Dennoch konnte durch erhöhten Druck (900 bar) und eine mehrfache Wiederholung der Spalt-Durchläufe eine einsetzende Homogenisierung der untersuchten Dispersionen erreicht werden, was sich in sinkenden PDI-Werten (von ca. 0,7 auf 0,3) zeigte. Auch der Anteil an gefundenen MM (Peak 1, Tabelle 4.2) stieg auf diese Weise. Die Tabelle 4.2 zeigt die gefundenen Trends einer Anwendung der HDH zur MM-Bildung. Durch die HDH konnte jedoch kein MM-System mit einer monomodalen Partikelgrößenverteilung generiert werden. Die besten Ergebnisse mit einem PDI-Wert von ca. 0,3 lieferte eine Herstellung nach 20 Durchläufen bei 900 bar.

Tabelle 4.2: Einfluss einer Modifizierung der HDH-Methode auf die Homogenität einer Dispersion aus PL und Sucroseestern

	PDI	Signalanteil Peak 1 (%) *
Druckanstieg 500 bar → 900 bar	↓	↑
Anzahl der Durchläufe steigt 5 runs → 20 runs	↓	↑
<p>* bimodale Verteilung liegt vor; gezeigt ist nur der Signalanteil der durch die kleinere Spezies verursacht wurde</p>		

5 Entwicklung und Charakterisierung von neuartigen Mischmizellen

5.1 Phosphatidylcholine + Tenside mit keiner spezifischen Trennung im Molekülbau

5.1.1 Kombinationen von hPC bzw. uPC mit Gallensalzen

5.1.1.1 Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen

Kombinationen von Lecithinen und Gallensalzen stellen die klassischen MM-Systeme dar, die bereits eingehend untersucht und beschrieben worden sind (vgl. Kapitel 2.2.2). Die zur Herstellung klassischer MM verwendeten Phosphatidylcholine müssen jedoch einen gewissen Anteil an ungesättigten Fettsäuren aufweisen, um MM bilden zu können (Cohen und Carey, 1991; Booker et al., 1992). Das in dieser Arbeit vorwiegend verwendete hydrierte Phosphatidylcholin (hPC) wurde in steigendem Anteil mit Cholsäure-Na (CS) als Vertreter der Gallensalze kombiniert, um die Eignung dieses Systems zur Bildung klarer Lösungen zu untersuchen. Die Herstellung erfolgte nach dem Verfahren der direkten Dispergierung. Die erhaltenen Dispersionen bzw. kolloidalen Lösungen waren direkt nach der Herstellung relativ klar, jedoch wurden sie nach etwa 24 Stunden deutlich trüb. Die Ergebnisse der Transmissionsmessungen an den 1%igen equilibrierten Systemen sind in der Abbildung 5.1 dargestellt. Zudem zeigt die Abbildung Systeme, bei denen CS mit steigendem molaren Anteil (MF) an ungesättigtem PC (uPC) kombiniert wurden. Die in der Literatur beschriebenen Befunde konnten hier bestätigt werden. Während CS mit ungesättigtem PC klare Lösungen bis zu einem molaren Anteil von etwa 50% bildet ($MF_{uPC}0.5$), zeigt eine Kombination mit nur wenig Masseanteilen an hydriertem PC (hPC) eine Abnahme der Transmission (Abbildung 5.1) und damit eine Zunahme der Trübung (vgl. Abbildung 5.2). Man nimmt an, dass die ungesättigten PL, die sterisch einen Knick aufweisen, sich nicht optimal in geordnete Strukturen wie einen Phospholipid-Bilayer in einem Vesikel integrieren lassen (Cohen und Carey, 1991).

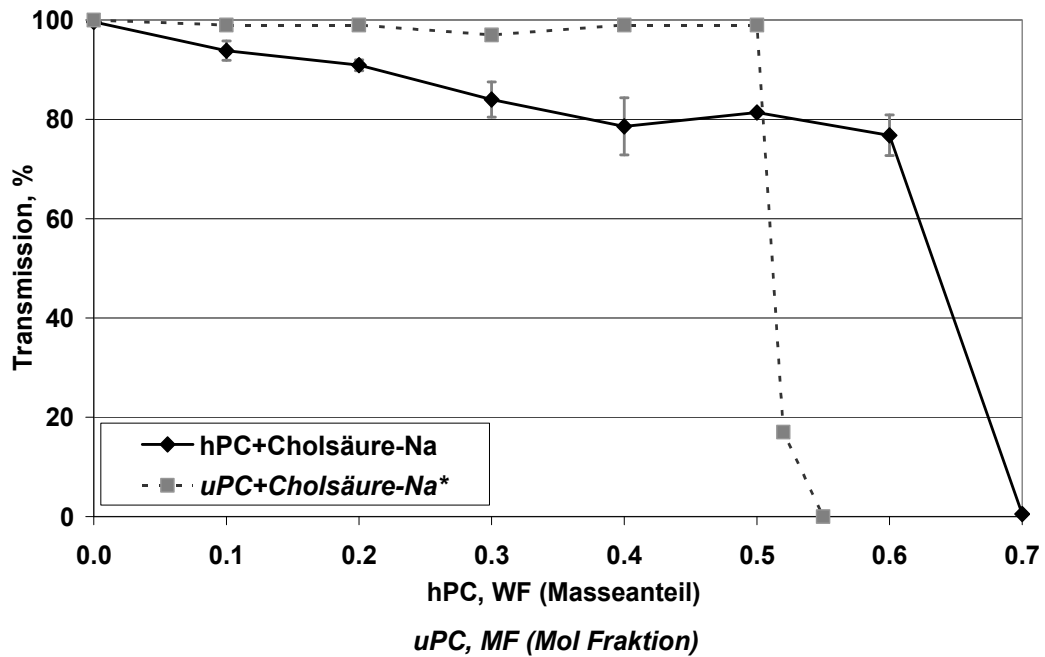


Abbildung 5.1: Fähigkeit von Cholsäure-Na klare Lösungen mit steigenden Anteilen an hPC oder uPC zu bilden; * die Daten der ungesättigtem Systeme sind der Literatur (Hammad, 1998) entnommen

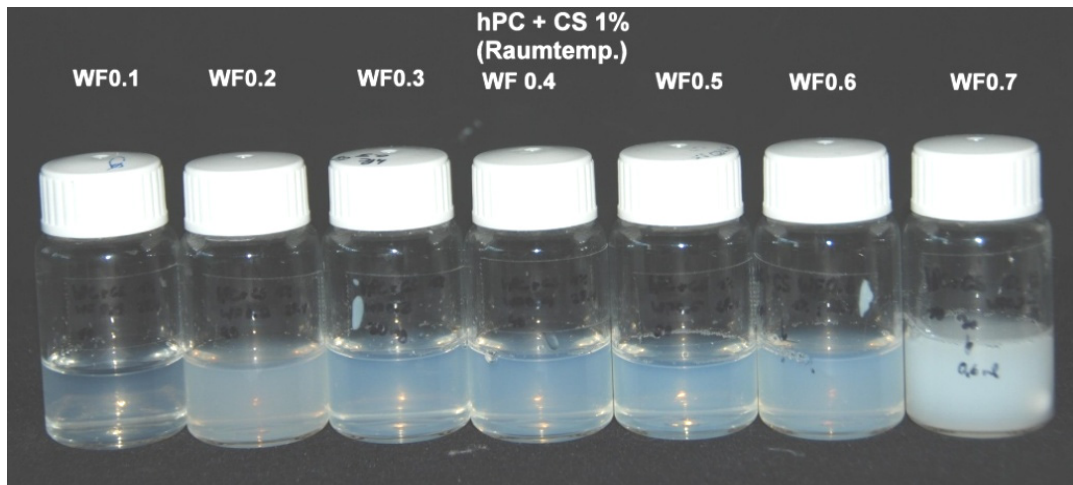


Abbildung 5.2: Visualisierung der Fähigkeit von Cholsäure-Na klare Lösungen mit steigenden Anteilen an hPC zu bilden

Stattdessen sollen sich ungesättigte PC-Moleküle in den flexibleren Mischmizellen besser verteilen, da die PC-Moleküle in MM weniger geordnet gepackt sind als in den Bilayern eines Vesikels (Cohen und Carey, 1991). Dieser Zusammenhang lässt sich auf die gefundenen

Ergebnisse der Systeme auf hPC+CS übertragen und bestätigen (Abbildung 5.1 und 5.2). Auch wenn ungesättigte PL in der Lage sind, klare Lösungen mit Gallensalzen zu bilden (Abbildung 5.1), besteht der größte Nachteil dieser klassischen MM-Systeme in der Empfindlichkeit der gefundenen Partikelgröße in Abhängigkeit zum Anteil an ungesättigtem PL (Shankland, 1970). Eine geringe Variation im Verhältnis von Phospholipid zum Gallensalz führt zu einer Variation in der gefundenen Partikelgröße, wie von Shankland am Beispiel von Lecithin/CS-Systemen untersucht und detailliert beschrieben wurde (Shankland, 1970).

Entscheidend für ein mischmizellares System ist das Vermögen, bei höheren Gesamtkonzentrationen an unlöslichem PL und Tensid, klare Lösungen zu bilden. Während eine Kombination von CS mit 50% Masseanteil uPC ($WF_{uPC}0.5$) auch bei höheren Gesamtkonzentrationen von 5% klare Lösungen bildet (Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4a), werden entsprechend hoch konzentrierte Lösungen von CS mit hPC bei gleichem $WF_{hPC}0.5$ deutlich trüb (Abbildung 5.3 und 5.4b). Das in Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4a gezeigte MM-System aus uPC+CS $WF_{uPC}0.5$ stellt ein optimales klassisches Gallensalz/Lecithin-MM dar und wurde im Rahmen dieser Arbeit mehrfach hergestellt, um als ein Referenzsystem zu dienen.

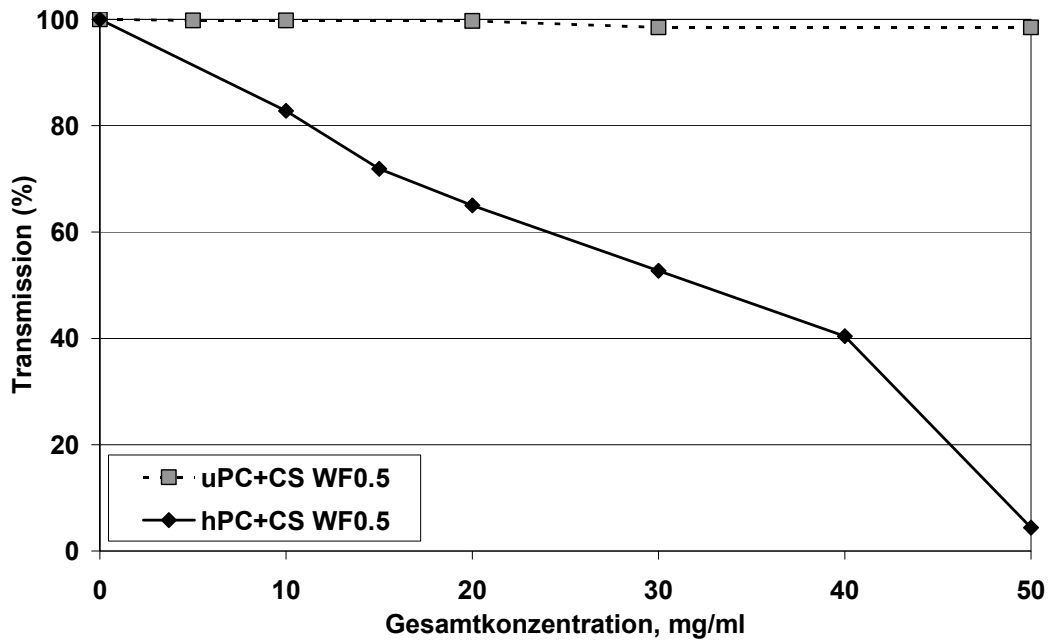


Abbildung 5.3: Fähigkeit von Systemen aus CS und PC klare Lösungen bei steigender Gesamtkonzentrationen zu bilden

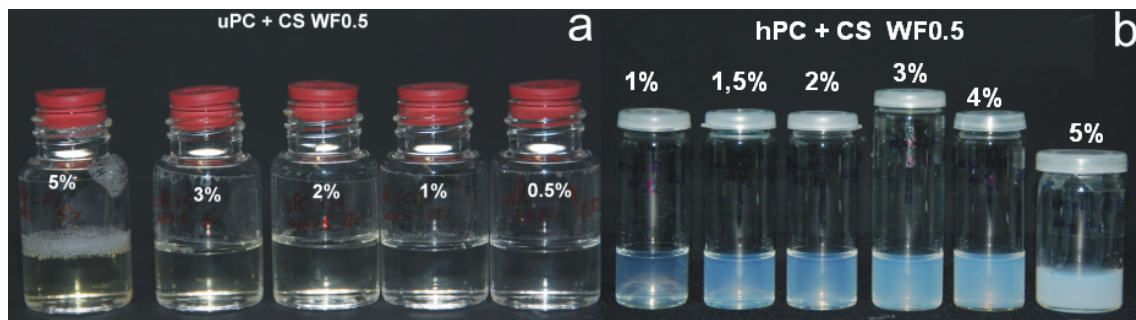


Abbildung 5.4: Visualisierung der Fähigkeit des MM-Systems $uPC+CS WF_{uPC}0.5$ (a) bzw. $hPC+CS WF_{uPC}0.5$ (b) klare Lösungen bei höheren Gesamtkonzentrationen zu bilden

Das erste Patent zur Herstellung von MM liefert bereits einen Hinweis, dass der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in dem verwendeten Lecithin (PC) mindestens 80% betragen sollte (Lappe und Eikermann, 1965). Die Gegenwart der ungesättigten Verbindungen macht die klassischen MM-Systeme jedoch anfällig gegenüber oxidativer Zersetzung. Die bisherigen (publizierten) Versuche, gesättigte, natürliche PL zur MM-Bildung mit Gallensalzen einzusetzen, scheinen bisher nicht erfolgreich gewesen zu

sein. Es existiert ein Patent der Hoffmann-La Roche AG, welches die Verwendung synthetischer, gesättigter aber verzweigt-kettiger PL zur MM-Bildung mit Gallensalzen beschreibt (Pittrof und Steffen, 1996).

5.1.1.2 DLS-Experimente

Gallensalz-Moleküle bilden sehr kleine Mizellen aus (Small, 1968b; Josip, 1984), was für das verwendete CS als Vertreter der Gallensalze durch DLS-Messungen bestätigt werden konnte (Abbildung 5.5).

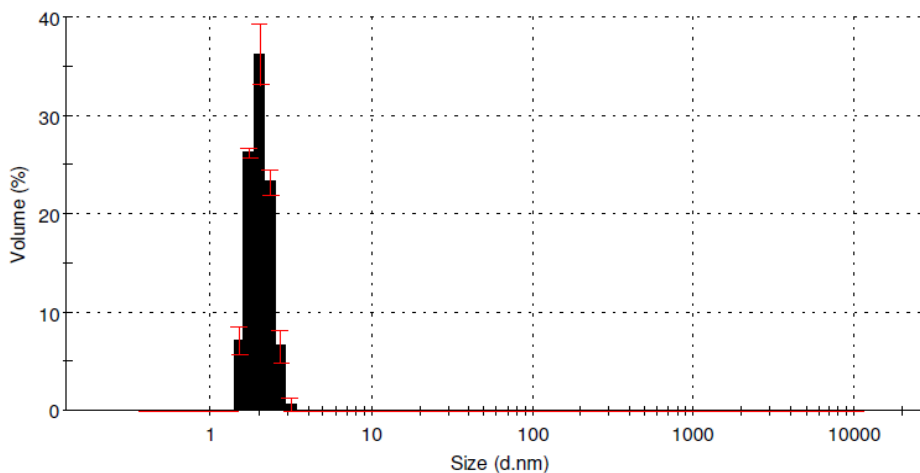


Abbildung 5.5: volumengewichteter Durchmesser der CS-Mizellen; $c = 1\%$

Der mittels DLS gefundene volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser der CS-Mizellen liegt nur bei etwa 2,5 nm (Abbildung 5.5). Wurden Mischungen aus CS mit hPC hergestellt, führte dies zu einem Anstieg in der gefundenen Partikelgröße, wie es Abbildung 5.6 für das System aus hPC+CS $WF_{hPC}0.5$ aufzeigt. Interessanterweise konnten in dem System bei einer Konzentration von 10 mg/ml nach der Herstellung zuerst kleine Partikel mit einem Durchmesser von etwa 9,5 nm gefunden werden. Nach Equilibrierung der Probe über etwa vier Tage, zeigte sich ein Anstieg in der mittels DLS gefundenen Partikelgröße auf etwa 37 nm (Abbildung 5.6). Bei steigender Gesamttensidkonzentration kam es zudem zu einem Anstieg in der gefundenen Partikelgröße. Als Referenzsystem konnte mit uPC+CS $WF_{uPC}0.5$ ein klassisches MM-System hergestellt werden, welches bei einer Variation in der

Gesamtkonzentration keine Schwankungen in der gefundenen Partikelgröße zeigte (Abbildung 5.7).

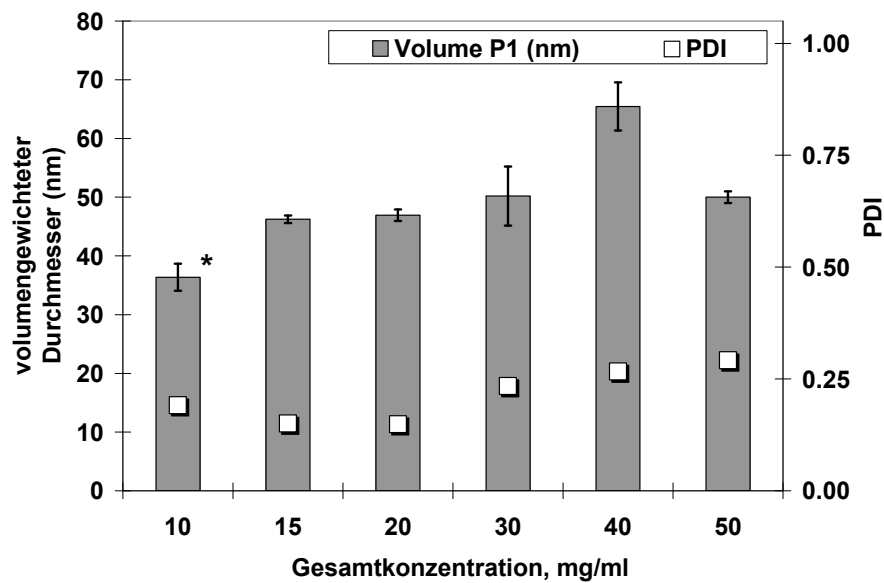


Abbildung 5.6: Einfluss einer erhöhten Gesamtkonzentration auf die Partikelgröße und den PDI im MM-System aus hPC+CS WF_{hPC}0.5; * Werte nach 4 tägiger Equilibrierung; zuvor waren die MM etwa 9,5 nm klein; n = 3

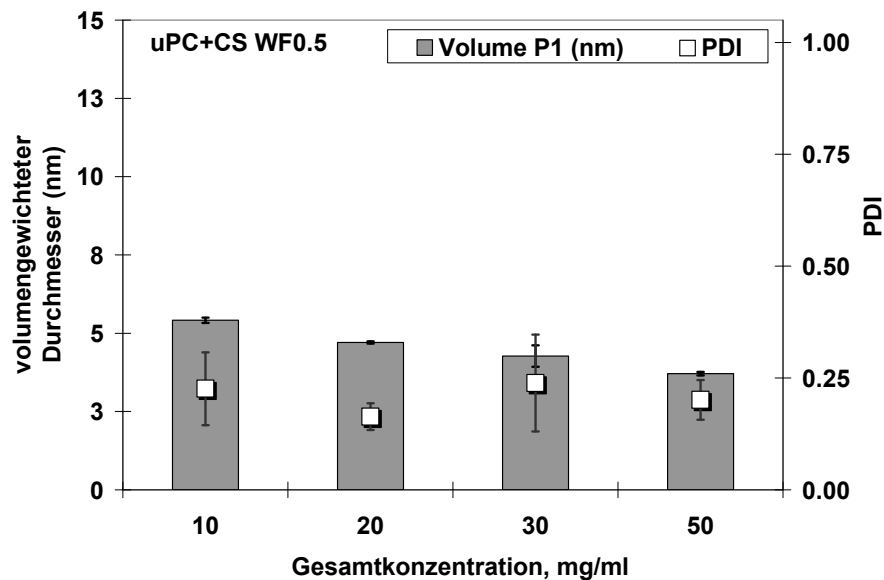


Abbildung 5.7: Einfluss einer erhöhten Gesamtkonzentration auf die Partikelgröße und den PDI im MM-System aus uPC+CS WF_{uPC}0.5; n = 3

Wie die Abbildung 5.7 zeigt, führte eine Erhöhung der Gesamtkonzentration im System aus uPC+CS $WF_{uPC}0.5$ nicht zu einer Änderung der Partikelgröße. Die illustrierte minimale Abnahme der Größe der MM (Abbildung 5.7) ist darin begründet, dass die Proben gegen die Viskosität von 1,02 mPa•s vermessen wurden und die tatsächliche Viskosität nicht berücksichtigt wurde (vgl. Kapitel 4.1).

Das am Pharmamarkt am häufigsten eingesetzte klassische MM-System beinhaltet jedoch neben uPC das Natriumsalz der Glycocholsäure (GCS). In diesem System, welches ebenfalls mehrfach als weiteres Referenzsystem hergestellt und untersucht wurde, konnte eine Abhängigkeit der mittels DLS gefundenen Partikelgröße von der Gesamtkonzentration gefunden werden. So wurde für die klassischen Mischmizellen in der hergestellten Stammlösung mit einer Konzentration von 5% ein hydrodynamischer Durchmesser von etwa 6 nm mittels DLS bestimmt. Nach einer 1:5-Vedünnung auf 10 mg/ml wurde noch zwei Tage nach dem Vedünnungsschritt eine bimodale Partikelgrößenverteilung gefunden (Abbildung 5.8).

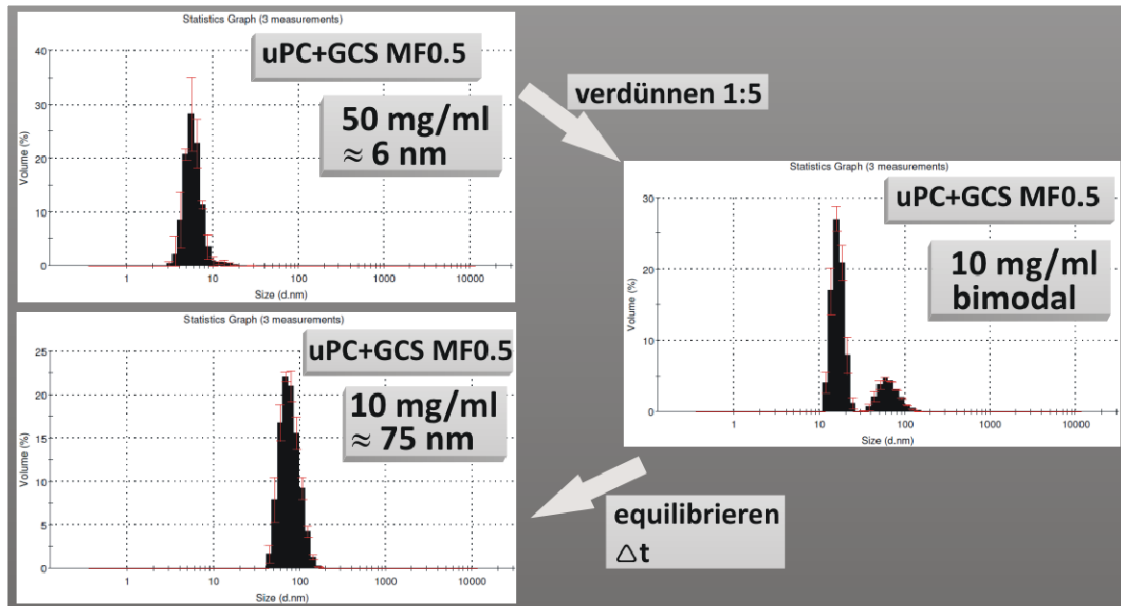


Abbildung 5.8: Einfluss der Änderung der Gesamtkonzentration auf die Partikelgröße im MM-System aus uPC+GCS $MF_{uPC}0.5$

Die CMC wurde bei dem Verdünnungsschritt nicht unterschritten (vgl. Abbildung 5.9). Nach einer längeren Equilibrierungszeit von weiteren zwei Tagen konnte eine monomodale Partikelgrößenverteilung gefunden werden, die nun jedoch eine Spezies mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 75 nm zeigte (Abbildung 5.8). Infolge der Konzentrationsänderung kam es zu einer Umwandlung in dem untersuchten GCS/uPC-MM-System, was sich in einem deutlichen Anstieg der gefundenen Partikelgröße zeigte.

Diese Veränderung in der gefundenen Partikelgröße kann möglicherweise in einer Umwandlung von sphärischen Mischmizellen zu wurmartigen bzw. stäbchenförmigen Mischmizellen begründet sein. Solche Systeme sind in der Literatur für bestimmte Mischsysteme bei spezifischen Konzentrationen beschrieben (Acharya und Kunieda, 2006; Kato et al., 2007; Shrestha et al., 2008). Eine veränderte Konzentration könnte theoretisch zu einer solchen Umorientierung der Mizellform führen. Allerdings sind zusätzliche Untersuchungen z.B. mittels einer DLS-Analyse bei unterschiedlichen Winkeln nötig, um genauere Strukturaufklärungen zu ermöglichen. Stäbchenförmige MM sind gerade auch für klassische Gallensalz/Lecithin-MM bekannt (vgl. Kapitel 2.2.2) und wurden nach Hjelm im sog. „radial shell“ Modell beschrieben (Hjelm et al., 1988). Ferner ist eine Umwandlung zu vesikulären Strukturen nicht auszuschließen (vgl. Kapitel 2.1.4).

5.1.1.3 CMC-Bestimmungen

Die mittels Oberflächenspannungsmessungen bestimmte CMC für das verwendete Natriumsalz der Cholsäure (CS) liegt mit etwa 5,0 mg/ml bei 0,5% (Abbildung 5.9). In dem klassischen, mischmizellaren System aus CS und uPC mit einem Masseanteil von 0.5 ($WF_{uPC}0.5$) liegt die CMC bei etwa 0,35 mg/ml (Abbildung 5.9). Die Anwesenheit von 50% Masseanteil an ungesättigtem Phospholipid führte zu einer deutlichen Reduktion der CMC, was sowohl durch Oberflächenspannungsmessungen als auch durch Messung der Fluoreszenzintensität von DPH bestätigt wurde (Abbildung 5.10). In dem verwendeten MM-Referensystem aus

uPC+GCS MF_{uPC}0.5 konnte eine CMC von etwa 0.28 mg/ml bestimmt werden (Abbildung 5.9).

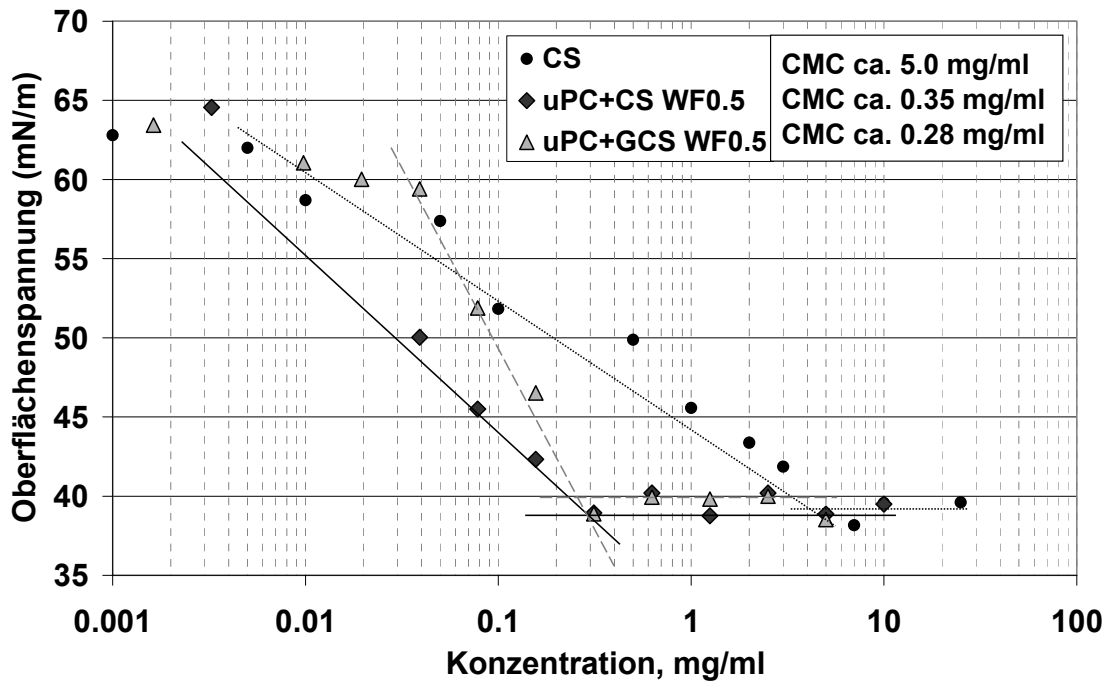


Abbildung 5.9: CMC-Bestimmung durch Oberflächenspannungsmessungen an CS-Lösungen und den MM-Systemen aus uPC+CS WF0.5 und uPC+GCS MF0.5

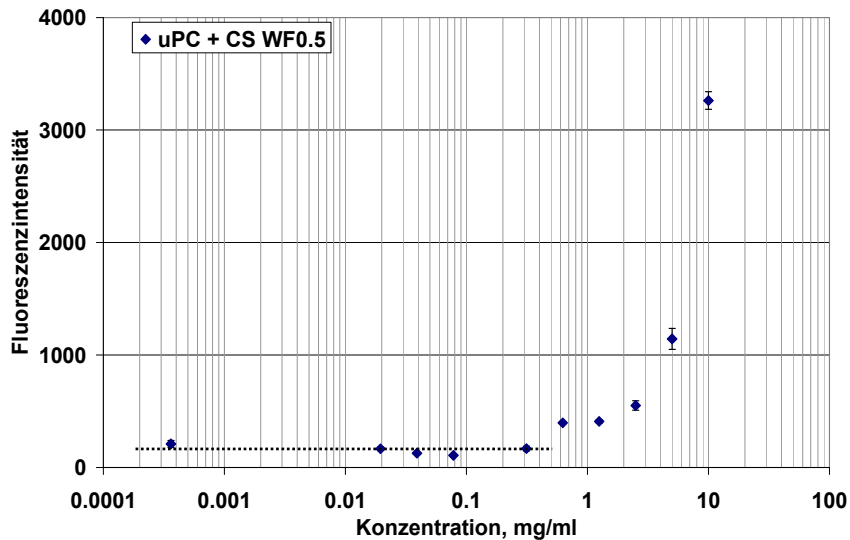


Abbildung 5.10: CMC-Bestimmung durch Messung der Fluoreszenzintensität von DPH in dem MM-System aus uPC+CS WF0.5

5.1.2 Kombination von Phosphatidylcholinen mit Polysorbaten

Polysorbate stellen eine Klasse an Tensiden dar, die in vielen pharmazeutischen Systemen Anwendung findet. Im folgenden Abschnitt wird erörtert, inwieweit sich Polysorbat 20 und Polysorbat 80 dazu eignen, optisch klare Lösungen mit natürlichem hydriertem Phosphatidylcholin (hPC) zu bilden. Mischungen verschiedener Polysorbate und zuvor hergestellter Vesikel aus unterschiedlichen PC-Typen sind von Lim et al. eingehend beschrieben worden (Lim und Lawrence, 2004b; Lim und Lawrence, 2004a). Lim et al. untersuchten an niedrig konzentrierten Systemen, welche maximale Menge eines Polysorbat-Typs sich gerade noch in PC-Vesikeln integrieren lässt, bevor Mischmizellen die prädominante Spezies in diesen Systemen darstellen. Je höher der Anteil an Polysorbat in den jeweiligen Systemen ist, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit mizellare Systeme zu erhalten. Jedoch zeigen länger-kettige PL wie DPPC oder DSPC (Distearyl-PC) eine wesentlich schlechtere Fähigkeit, MM mit Polysorbaten zu bilden als kürzer-kettige PC-Typen wie DMPC (Lim und Lawrence, 2004a). Systeme aus DSPC und Polysorbat 20 oder 80 zeigen einen weiten Koexistenzbereich von MM und Vesikeln. Die Untersuchungen von Lim et al. beschränkten sich vorwiegend auf Untersuchungen an sehr niedrig konzentrierten (5 mg/ml) Systemen aus einem PC-Typ und einem Polysorbat-Typ. Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen primär natürliche gesättigte PL (wie hPC), die mit unterschiedlich langen Fettsäuren (C_{16} und C_{18}) verestert sind. Hierbei wurde vor allem die Eignung des Polysorbat 80 zur MM-Bildung mit PC-Typen untersucht, da dieses Tensid bereits in mehreren hundert pharmazeutischen und kosmetischen Produkten eingesetzt wird und eine relativ geringe Toxizität (LD_{50} in Mäusen (i.v.) $> 1,8$ g/kg Körpergewicht) aufweist (Simões et al., 2005).

5.1.2.1 Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen

Systeme aus Polysorbat 20 oder 80 und hPC bildeten über einen weiten Bereich von bis zu 50% an hPC ($WF_{hPC}0.5$) relativ klare Lösungen bzw. Dispersionen (Abbildung 5.11 und 5.12).

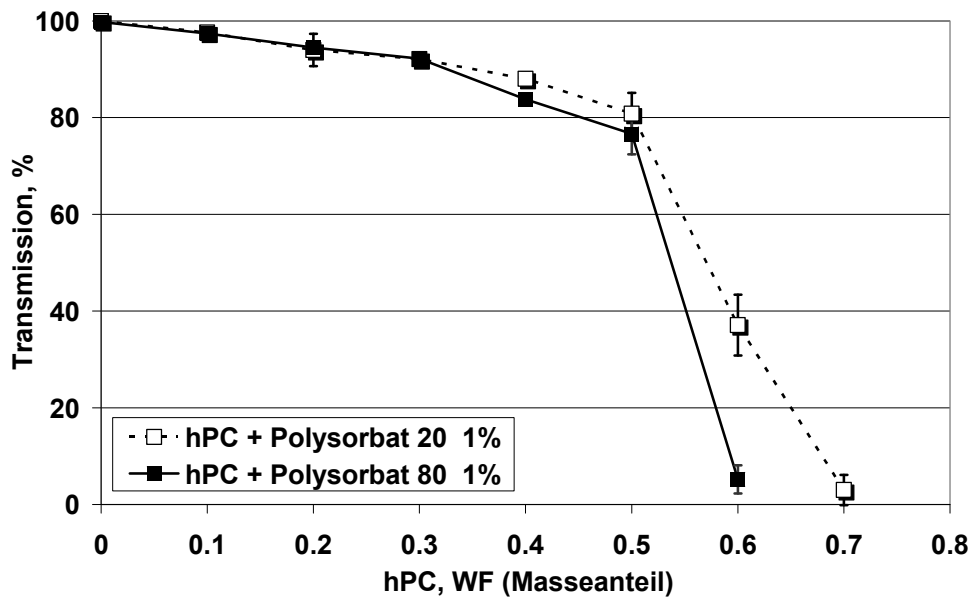


Abbildung 5.11: Fähigkeit von Systemen aus Polysorbat 20 oder 80 und hPC klare Lösungen bei einer Gesamtkonzentrationen von 1% zu bilden; $n = 2$

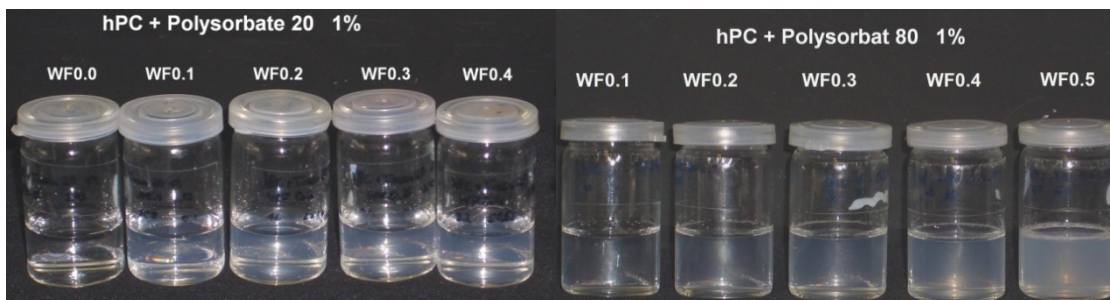


Abbildung 5.12: Visualisierung der Fähigkeit von Polysorbat 20 (links) bzw. Polysorbat 80 (rechts) klare Lösungen mit steigenden Anteilen an hPC zu bilden

Hierbei zeigte das hydrophilere Polysorbat 20 eine leicht verbesserte Fähigkeit klare Lösungen mit hohen Anteilen an hPC zu bilden (Abbildung 5.11 und 5.12). Zu beachten ist die mit 1% (10 mg/ml) relativ geringe Gesamtkonzentration von PL und Polysorbat in den beschriebenen Systemen. Bei einer erhöhten Gesamtkonzentration von bis zu 50 mg/ml, die für die Anwendung als Arzneistoffträgersystem benötigt wird, kam es zu einer Abnahme der Transmission und einer deutlichen Zunahme der Trübung (Abbildung 5.13 und Abbildung 5.14).

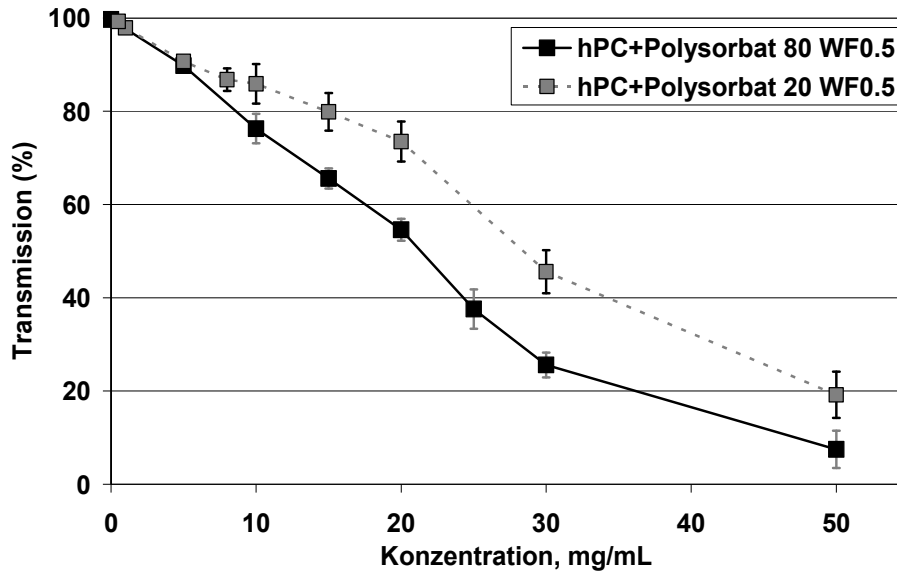


Abbildung 5.13: Fähigkeit von Systemen aus Polysorbat 20 oder 80 und hPC klare Lösungen bei höheren Gesamtkonzentrationen zu bilden; $n = 2$

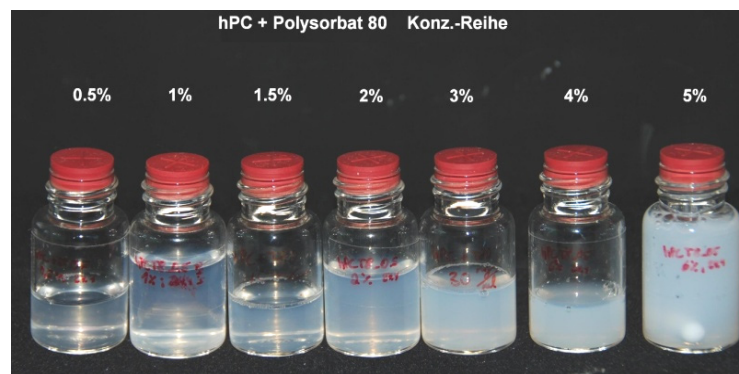


Abbildung 5.14: Fähigkeit des Systems hPC+Polysorbat 80 $WF_{hPC}0.5$ klare Lösungen bei höheren Gesamtkonzentrationen zu bilden

Systeme aus hPC und Polysorbat 20 mit $WF_{hPC}0.5$ zeigten bei erhöhten Konzentrationen eine weniger starke Abnahme der Transmission als Systeme aus hPC+Polysorbat 80 $WF_{hPC}0.5$ (Abbildung 5.13). Die Abbildung 5.14 zeigt eine Zunahme der Trübung mit steigender Gesamtkonzentration im System hPC+Polysorbat 80 $WF_{hPC}0.5$.

5.1.2.2 DLS-Experimente

Nach Untersuchungen von Lim et al. an Systemen aus Polysorbat 20 oder 80 und länger-kettigen PC-Typen wie Distearoylphosphatidylcholin

gibt es einen großen Mischungsbereich von Polysorbat/PC, in dem Vesikel und Mischmizellen koexistieren (Lim und Lawrence, 2004a). Während DLS-Messungen an Polysorbat 20-Lösungen ergaben, dass der mittlere hydrodynamische Durchmesser der gefundenen monomodal verteilten Mizellen etwa 6,5 nm beträgt, führte die Kombination mit nur 0.1 Massanteilen an hPC ($WF_{hPC}0.1$) bereits zur Ausbildung eines bimodal verteilten Systems (Abbildung 5.15). In dem System aus hPC+Polysorbate 20 $WF_{hPC}0.1$ konnten neben den Polysorbat 20-Mizellen mit einem Durchmesser von etwa 6,5 nm weitere Teilchen mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 38 nm nachgewiesen werden (Abbildung 5.15).

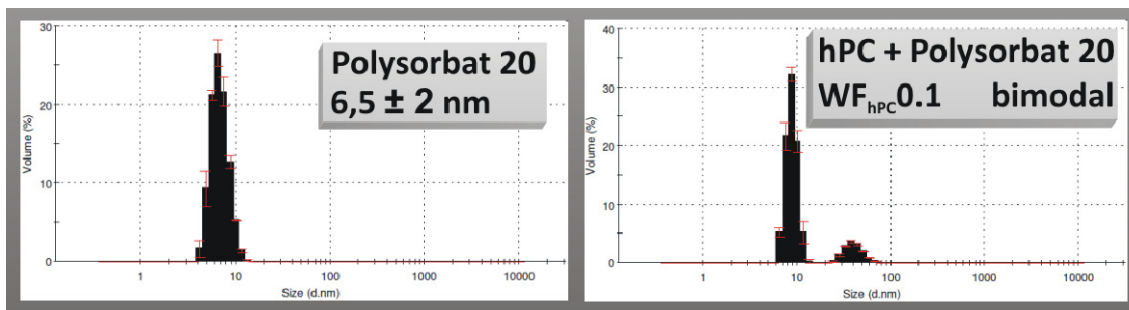


Abbildung 5.15: Mittels DLS bestimmter Durchmesser von Polysorbat 20 Mizellen und gefundene Partikelgrößen im System aus hPC+Polysorbat 20 bei einem $WF_{hPC}0.1$; $c = 1\%$, $n = 3$

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass auch für das System aus hPC (mit unterschiedlich langen Fettsäureresten) und Polysorbat 20 Mizellen und Vesikel koexistieren. In Abbildung 5.16 sind die Ergebnisse der DLS-Messungen an unterschiedlich konzentrierten Proben des Systems aus hPC+Polysorbat 80 $WF_{hPC}0.5$ (vgl. Abbildung 5.14) gezeigt. Mit steigenden Gesamtkonzentrationen kam es zu einer deutlichen Verschlechterung des gefundenen PDI-Wertes auf 1,0 ab einer Konzentration größer als 1%. Diese schlechten PDI-Werte belegen, dass keine monomodal verteilte Partikelgrößenverteilung mehr vorlag und dass neben Teilchen von mizellarem Durchmesser (Abbildung 5.16) noch Agglomerate von nicht-assoziiertem PC oder größeren Vesikeln in der Probe enthalten waren. Jedoch schränken die hohen PDI-Werte die

Aussagekraft bzw. die Interpretation der Messergebnisse ein (vgl. Kapitel 3.6.5). Mischungen aus Polysorbat 80 und höherem Anteil hPC eignen sich nicht, um klare Lösungen zu erzeugen, die ausschließlich MM mit monomodaler Partikelgrößenverteilung aufweisen.

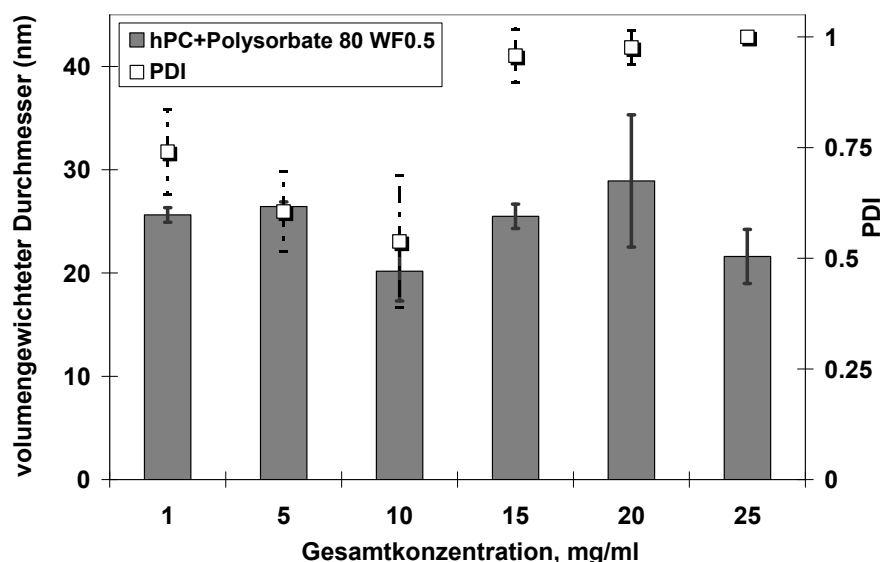


Abbildung 5.16: Einfluss einer erhöhten Gesamtkonzentration auf die Partikelgröße und den PDI im System aus hPC+Polysorbat 80 $WF_{hPC}0.5$; $n = 3$

Untersuchungen an Systemen aus ungesättigten Phospholipiden und Polysorbaten werden hier nicht präsentiert oder diskutiert, da vorherige Untersuchungen ergaben, dass solche Systeme vornehmlich eine Generation von Tensid-haltigen Vesikeln, nicht aber von mischmizellaren Systemen ermöglichen (Lim und Lawrence, 2004b; Lim und Lawrence, 2004a).

5.1.2.3 CMC-Bestimmungen

Das weniger hydrophile Polysorbat 80 zeigte eine CMC von etwa 0,008 mg/ml, die wie nach der Traub'schen Regel zu erwarten (Traube, 1891), unterhalb der CMC des hydrophileren Polysorbat 20 mit etwa 0,01 mg/ml liegt (Abbildung 5.17). Die gefundenen CMC-Werte der verwendeten Polysorbate korrelieren recht gut mit den Literaturwerten (Wan und Lee, 1974). Weiterhin wurde das System aus hPC+Polysorbate 80 $WF_{hPC}0.5$ hinsichtlich der Lage der CMC mittels Oberflächenspannungsmessungen

untersucht. Hierzu wurde die entsprechende Stammlösung durch einen 0,45 µm-Filter gegeben, um dann entsprechend verdünnt zu werden. Interessanterweise kam es in diesem System mit hPC bei einem $WF_{hPC}0.5$ nicht zu einer Senkung der CMC wie bei den klassischen MM, sondern zu einem Anstieg der gefundenen CMC auf etwa 0,2 mg/ml nach Oberflächenspannungsmessungen (Abbildung 5.17), bzw. auf etwa 0,35 mg/ml nach Messung der Fluoreszenzintensität von DPH (Abbildung 5.18).

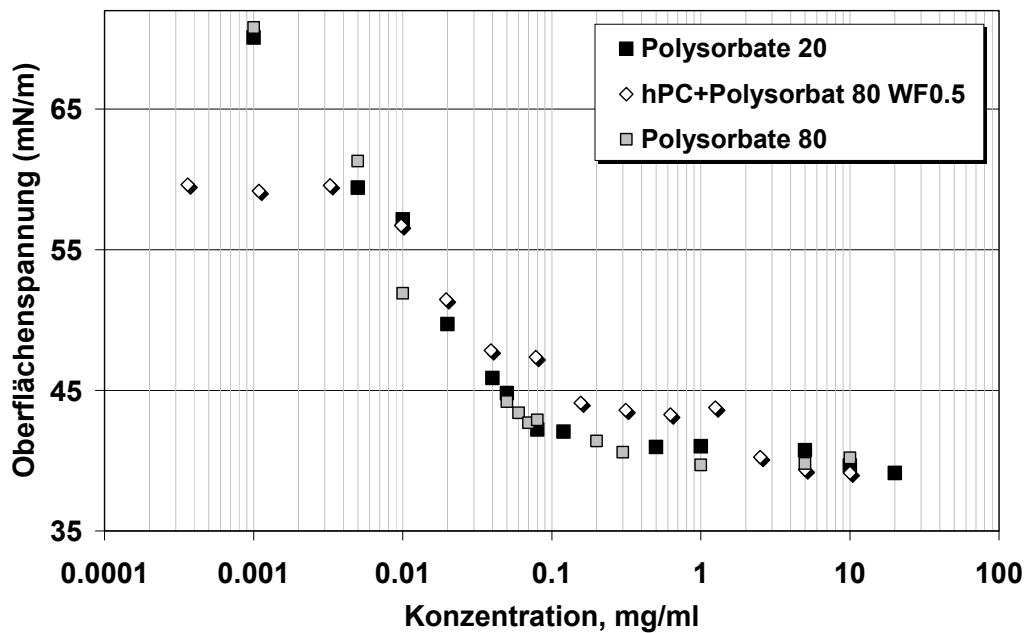


Abbildung 5.17: CMC-Bestimmung durch Oberflächenspannungsmessungen an Polysorbat 20/80-Lösungen und dem MM-System aus hPC+Polysorbat 80 $WF_{hPC}0.5$

Verglichen mit den Erkenntnissen aus den Untersuchungen an klassischen Gallensalz/Lecithin MM-Systemen (vgl. 5.1.1), bei denen die CMC durch die Anwesenheit des PL weiter absinkt (Hammad, 1998), zeigte das System hPC+Polysorbat 80 $WF_{hPC}0.5$ ein umgekehrtes Verhalten. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass Polysorbat 80 keine mischmizellaren Systeme mit hPC bildet, sondern Mischsysteme aus Mizellen neben Vesikeln oder Agglomeraten. Der geringe CMC-Wert könnte ebenso darin begründet sein, dass das nicht vollständig solubilisierte hPC zu Agglomeraten präzipitierte, deren Oberfläche von

dem Polysorbat 80 abgesättigt wurde. Somit wäre ein Teil des Polysorbat 80 durch Benetzung der PC-Agglomerate nach dem Filtrationsschritt aus dem System entfernt worden. In der Folge wären weniger Polysorbat-Moleküle in der filtrierten Stammlösung vorhanden, so dass eine CMC bei vermeintlich höheren Konzentrationen zu erwarten wäre.

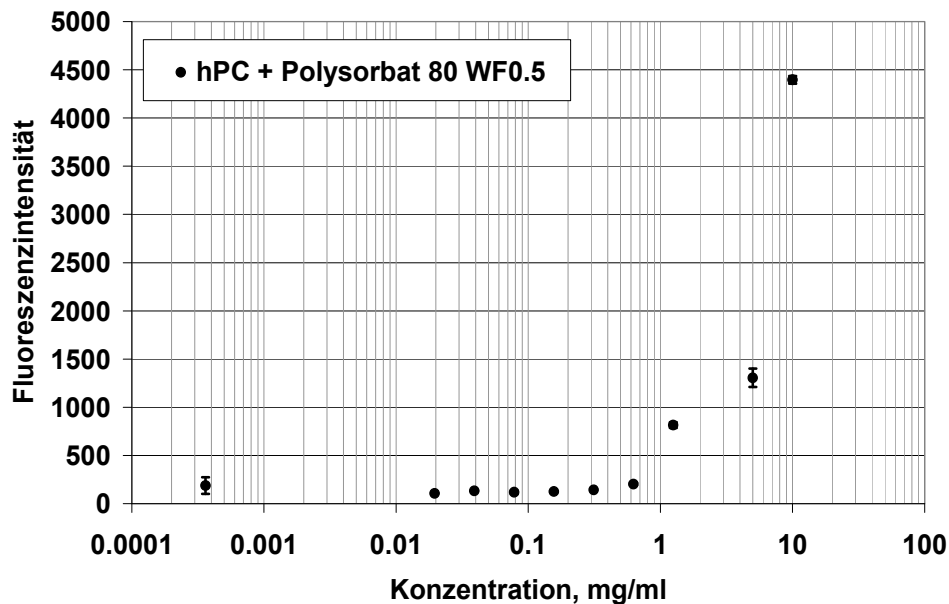


Abbildung 5.18: CMC-Bestimmung durch Messung der Fluoreszenzintensität von DPH in dem MM-System aus uPC+Polysorbat 80 $WF_{hPC}0.5$; $n = 3$

Weitere Ausführungen zur Eignung der Polysorbate, MM mit Phospholipiden auszubilden, werden in Kapitel 5.2.1.1 aufgeführt, wobei hier besonders auf die strukturellen Gegebenheiten der Polysorbat-Moleküle eingegangen wird.

5.1.3 Kombination von Phosphatidylcholinen mit Solutol HS 15 bzw. Poloxamer 188

5.1.3.1 Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen

Solutol HS 15 war weder mit hPC noch mit uPC (in keinem Verhältnis) in der Lage, optisch klare Lösungen zu bilden. Nicht einmal ein Massenanteil von 0.1 ($WF_{PC}0.1$) an wasserunlöslichem Phosphatidylcholin ließ sich in Form einer klaren Lösung solubilisieren (Abbildung

5.19). Systeme mit ungesättigtem PC zeigten eine noch geringere Transmission als Systeme mit hPC.

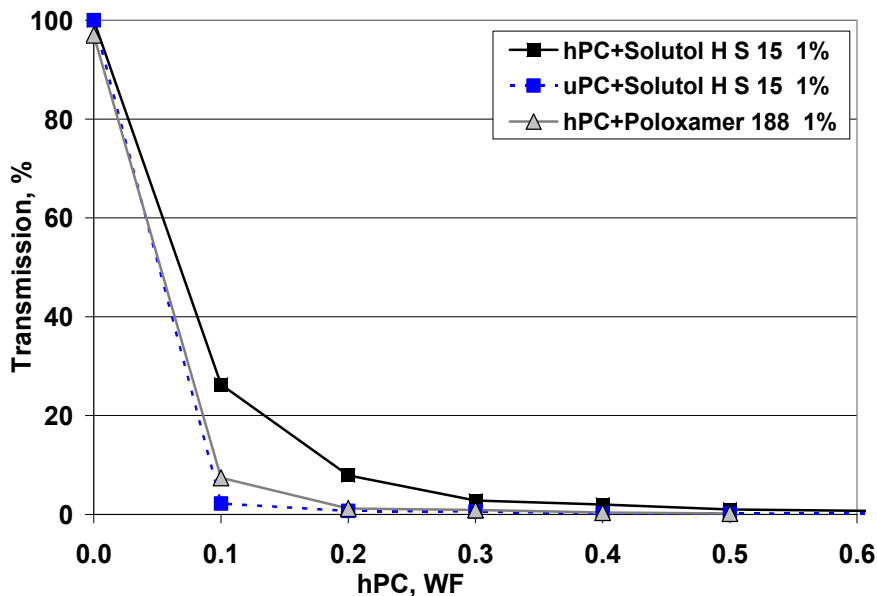


Abbildung 5.19: Fähigkeit von Systemen aus Solutol HS 15 oder Poloxamer 188 und hPC klare Lösungen mit hPC (bzw. uPC) zu bilden; $c = 1\%$

Solutol HS 15 weist im Molekülbau ein hydrophiles Element in der hydrophoben Acylkette auf. Mit der Hydroxyl-Gruppe am C₁₂ der Stearinsäure ist die strikte Trennung zwischen hydrophilen PEG-Kopf und hydrophobem Rest aufgehoben. Das hydrophile Element könnte somit eine Assoziation mit hPC – im Sinne des transferierten Packungsparameterkonzeptes (vgl. Kapitel 2.2.4.2) – verhindern, da eine Zusammenlagerung der apolaren Fettsäurereste des hPC mit der modifizierten Stearin-12-Hydroxysäure des Solutols über Van-der-Waals-Kräfte behindert wird. Über diesen theoretischen Ansatz ließe sich das Versagen des Solutol zur Bildung klarer MM-Lösungen interpretieren. Ungesättigtes PC (uPC) war schlechter geeignet als hPC, klare Lösungen mit Solutol zu bilden, was durch das Vorhandensein der Ölsäure im uPC begründet sein kann, die ein sterisches Abknicken der Fettsäure bedingt. Dadurch könnte eine optimierte Packung zu MM, in der sich die Fettsäurereste über Van-der-Waals-Kräfte dicht zusammenlagern, zusätzlich gestört werden. Die Abbildung 5.20 zeigt

Systeme aus Solutol HS 15 bzw. Poloxamer 188 mit steigenden Masseanteilen an hPC, wobei die Gesamtkonzentrationen in jedem System bei 1% liegt. Das eingesetzte Blockcopolymer Poloxamer 188 war ebenso wenig wie Solutol in der Lage klare isotrope MM-Lösungen mit hPC zu bilden (Abbildung 5.19). Die Solubilisierungskapazität des Poloxamers reichte nicht aus, um auch nur einen Masseanteil von 10% an wasserunlöslichem hPC in Form einer klaren Lösung zu halten (Abbildung 5.20, Bild unten).

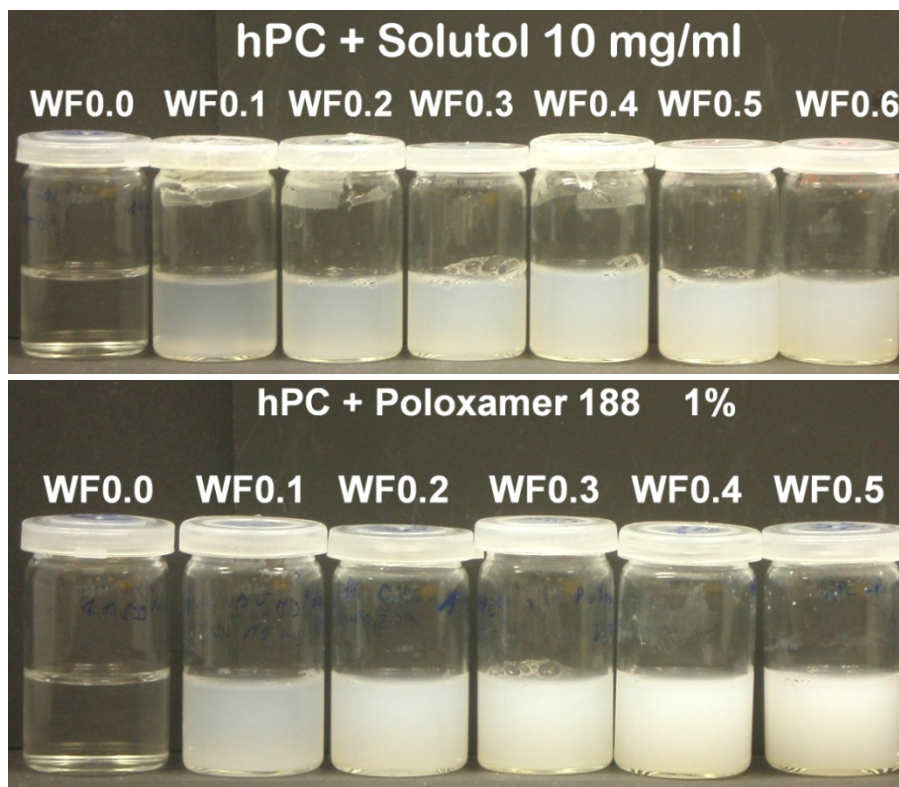


Abbildung 5.20: Visualisierung der Fähigkeit von Solutol HS 15 (oben) und Poloxamer 188 (unten) klare Lösungen mit steigenden Anteilen an hPC zu bilden

Ähnlich wie das Solutol weist das verwendete Blockcopolymer keine explizite Trennung im Molekülbau auf. Zwar besteht das Blockcopolymer aus zwei eher polaren PEG-Ketten, die in der Mitte einen etwas hydrophoberen Polypropylenoxid-Block flankieren. Dennoch erscheint das Molekül nicht in einer konischen Molekülgeometrie. Diese wird jedoch als Voraussetzung zur MM-Bildung mit PL nach dem modifizierten PPC gefordert. Somit lässt sich schlussfolgern, dass solche Moleküle,

die keine strikte Trennung im Molekülbau aufweisen und dabei keine explizite konische Form einnehmen, nicht in der Lage sind, klare isotrope Lösungen mit hydriertem Phosphatidylcholin zu bilden, auch wenn diese Tenside wie Poloxamer 188 einen sehr hohen HLB-Wert von 29 (Kabanov et al., 2002) aufweisen und selbst sehr gut wasserlöslich sind.

5.1.3.2 DLS-Experimente

Mizellen aus Solutol HS 15 zeigten einen volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser von etwa 11,7 nm, während Mizellen des Blockcopolymers mit etwa 5 nm wesentlich kleiner waren (Abbildung 5.21). Diese Ergebnisse der gefundenen mizellaren Durchmesser korrelieren gut mit den in der Literatur angegebenen Werten für Solutol HS 15-Mizellen mit 7-20 nm und für Poloxamer 188-Mizellen mit 2-6 nm (bzw. < 20 nm) (Moghimi et al., 2004; Türk und Lietzow, 2004).

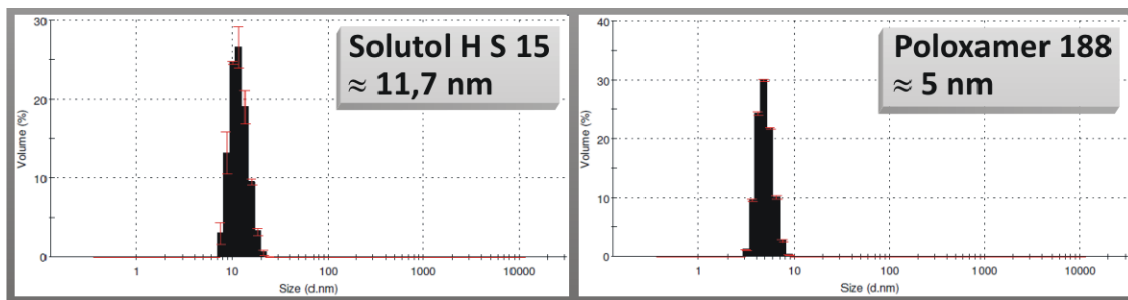


Abbildung 5.21: Volumengewichteter hydrodynamischer Durchmesser von Mizellen aus Solutol HS 15 (links) und Poloxamer 188 (rechts); ermittelt durch DLS Messungen an 1%igen Lösungen, $n = 3$

Da weder Solutol HS 15 noch Poloxamer 188 in der Lage waren, klare Lösungen mit hPC zu bilden, wurden entsprechende Misch-Systeme nicht nach ihrer Partikelgröße untersucht. Der Versuch eine solche Messung an unfiltrierten System aus hPC+Poloxamer 188 WF_{hPC}0.1 durchzuführen ist in Abbildung 5.22 exemplarisch dargestellt.

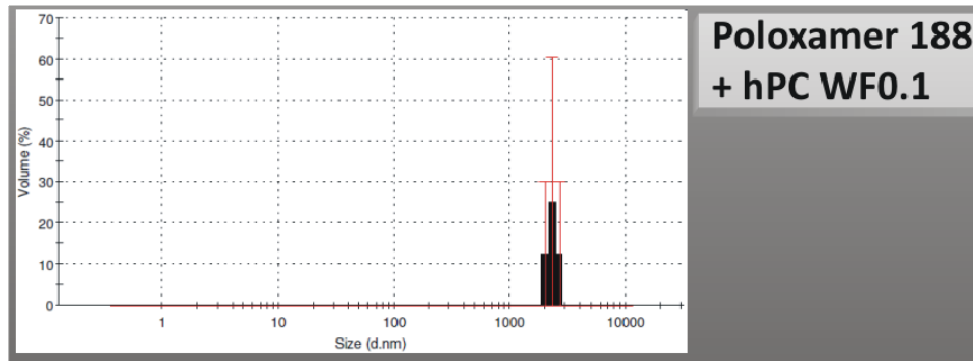


Abbildung 5.22: DLS-Messungen am System aus hPC+Poloxamer 188 $WF_{hPC}0.1$ bei $c = 1\%$; $n = 3$

Die Dispersionen waren bereits bei einer Konzentration von 1% zu trüb, um mittels DLS ausgewertet werden zu können. Man erkennt Partikel von mehreren μm -Durchmesser (Abbildung 5.22), welche vermutlich agglomeriertes hPC darstellen. Es ist fraglich, ob Poloxamer 188-Mizellen noch vorhanden waren, deren Streulicht von der enormen Streulichtintensität des präzipitierten hPC überdeckt wurde, oder ob sämtliches Poloxamer an der Oberfläche des präzipitierten hPC adsorbiert vorlag.

5.1.3.3 CMC-Bestimmungen

Da hPC weder mit Poloxamer 188 noch mit Solutol HS 15 mischmizellare Systeme bildet, konnte keine entsprechende CMC bestimmt werden. Lediglich die reinen Tensidlösungen ohne PL wurden mittels Oberflächenspannungsmessungen untersucht. Für Solutol HS 15 ergab sich eine CMC von ca. 0,14 mg/ml (0,014%), was den Herstellerangaben (CMC bei 0,005-0,02%) entspricht. Die CMC von dem verwendeten Poloxamer 188 liegt laut Literatur bei etwa 0,9 mg/ml (0,09%) (Saettone et al., 1988; Wagenaar und Müller, 1994) wobei es auch Berichte über etwas höher gelegene CMC-Werte gibt (Moghimi et al., 2004). Die Konzentrationen in den untersuchten Systemen aus hPC+Poloxamer 188 lag in jedem Fall ($WF_{hPC} \leq 0.5$; $c = 1\%$) oberhalb der CMC. Die CMC-Bestimmung von Poloxamer 188 mit den herkömmlichen Methoden erwies sich als problematisch, was durch Angaben in der Literatur bestätigt wird (Moghimi et al., 2004).

5.2 Phosphatidylcholine + Tenside mit spezifischer Trennung im Molekülbau

5.2.1 Kombinationen von hydriertem Phosphatidylcholin mit Polyglycerolestern

5.2.1.1 Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen

Die Ergebnisse der Auswertungen der Transmissionsmessungen an Systemen, die neben den unterschiedlichen Polyglycerolestern (PGE) steigende Masseanteile an hPC enthielten, sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

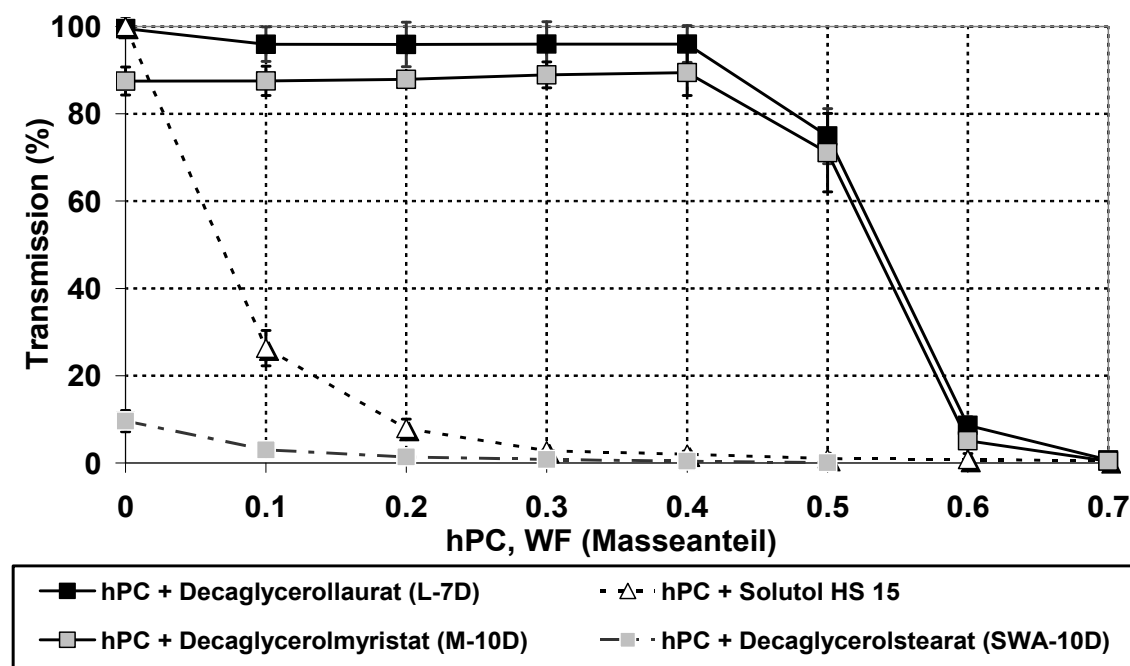


Abbildung 5.23: Fähigkeit von Polyglycerolestern im Vergleich zu Solutol HS 15 klare Lösungen mit steigenden Massanteilen an hPC zu bilden; $c = 1\%$, $n = 4$

Die Fähigkeit der PGE, klare Lösungen mit hPC zu bilden, nimmt mit steigender Lipophilie der PGE ab. Während die stärker hydrophilen PGE - Polyglycerollaurat (L-7D) und -myristat (M-10D) - in der Lage waren mit hPC bis zu einem Masseanteil von $WF_{hPC} 0.4$ (40%) klare Lösungen ohne Abnahme der Transmission zu bilden, ließen sich mit dem lipophileren Polyglycerolstearat (SWA-10D) in keinem Verhältnis optisch klare Lösungen mit hPC herstellen. Systeme, die L-7D anstatt M-10D enthielten, erschienen generell etwas klarer, wie die Abbildung 5.24b

verdeutlicht. Die Bildung von Mischmizellen aus einem wasserunlöslichen PL (hPC) und einem Tensid resultiert in der Ausbildung einer klaren Lösung (Carey und Small, 1970; Lichtenberg, 1979; Hammad und Müller, 1998b). Mit steigender Kettenlänge der Fettsäure nimmt das lipophile Volumen des PGE zu, wodurch die Fähigkeit der PGE, klare Lösungen mit hPC zu bilden, abnimmt. Die Anwendung des modifizierten Packungsparameterkonzepts (PPC) lässt den Schluss zu, dass das größere lipophile Volumen der länger-kettigen PGE eine optimale Packung mit den nicht-konischen hPC-Molekülen zu MM verhindert (vgl. Kapitel 2.2.4.2). Zum Vergleich ist in der Abbildung 5.23 die Transmissionskurve für das System aus Solutol HS 15 als Tensid mit keiner strikten Trennung im Molekülbau und hPC aufgezeigt. Auch das Solutol, welches durch die Hydroxylgruppe am C₁₂ der Stearinsäure ein „störendes“ hydrophiles Element in der hydrophoben Kette, und dadurch keine explizite konische Form aufweist, ist nicht in der Lage MM mit hPC zu bilden.

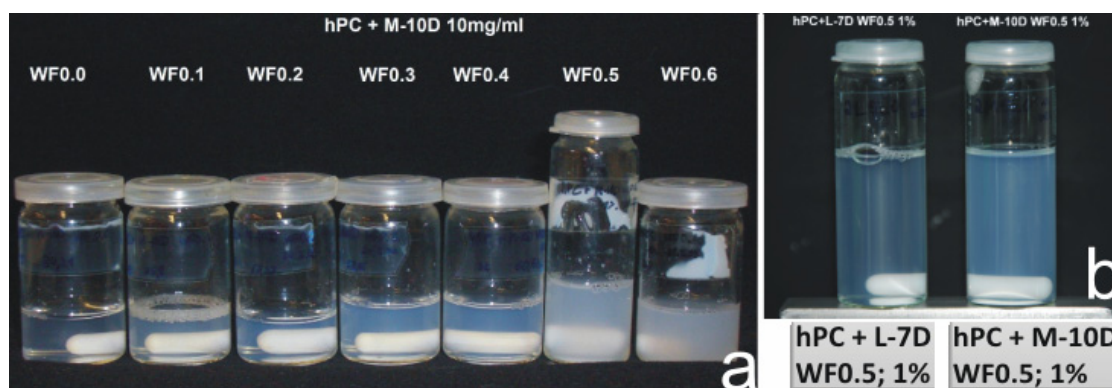


Abbildung 5.24: Visualisierung der Fähigkeit von M-10D klare Lösungen mit steigenden Masseanteilen an hPC zu bilden (a) und Vergleich der MM-Systeme aus hPC und L-7D oder M-10D bei einem $WF_{hPC}0.5$ (b); jeweils $c = 1\%$

Die Abbildung 5.25 zeigt die Fähigkeit des Systems aus L-7D und hPC bei einem $WF_{hPC}0.4$ im Vergleich zu anderen hPC-haltigen (MM-)Systemen klare Lösungen bei höheren Gesamtkonzentrationen zu bilden. Das hydrophile Polyglycerolderivat L-7D war deutlich besser geeignet als Polysorbat 20, Polysorbat 80 oder auch als das Gallensalz CS bei höheren Konzentrationen klare Lösungen mit

wasserunlöslichem hPC zu bilden. Systeme aus hPC und Polysorbat 20 bei $WF_{hPC}0.5$ zeigten einen recht steilen linearen Abfall in der Transmission, d.h. derartige Lösungen werden mit zunehmender Konzentration an präzipitiertem, wasserunlöslichem hPC deutlich trüb (Abbildung 5.25).

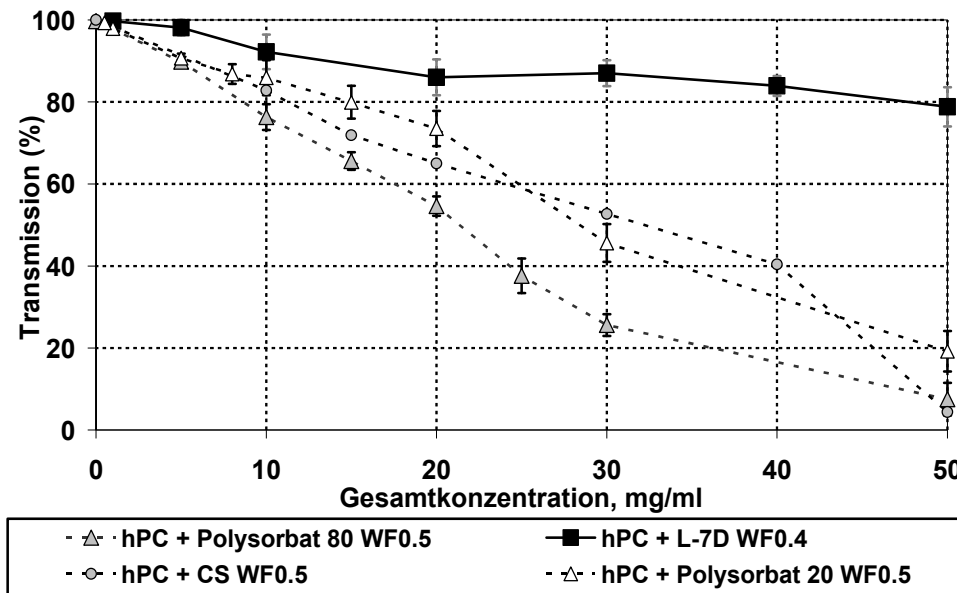


Abbildung 5.25: Einfluss einer erhöhten Gesamtkonzentration des MM-Systems aus hPC+L-7D $WF_{hPC}0.4$ auf die Fähigkeit klare Lösungen zu bilden

Auch diese Ergebnisse lassen sich durch Anwendung des modifizierten PPC hinreichend interpretieren. Polysorbat 20 stellt chemisch einen PEG-Sorbitanlaurylsäureester dar. Damit ist der hydrophobe Teil des Moleküls mit dem von L-7D (Decaglycerollaurinsäureester) chemisch identisch. Angemerkt sei, dass es sich bei L-7D um eine Mischung aus Mono- und Diestern handelt. Folglich unterscheiden sich diese zwei Tenside in dem Aufbau der hydrophilen Kopfgruppe. Bei L-7D liegt eine stark ausgeprägte Hydrophilie der Kopfgruppe vor, welche durch mehrere Hydroxylgruppen der zehn verknüpften Glyceroleinheiten gekennzeichnet ist. Im Vergleich dazu ist die Hydrophilie der PEG-Kopfgruppe der Polysorbate zum einen eher schwach, da neben Ethergruppen nur drei endständige Hydroxylgruppen vorhanden sind, und zum anderen liegen die drei PEG-Ketten des Polysorbats eher diffus

über das gesamte Molekül verteilt vor. Dadurch kann vermutet werden, dass die Hydrophilie der PEG-Gruppe nicht stark genug ausgeprägt ist, um eine konische Form des Polysorbat-Moleküls im Wässrigen zu erzwingen, was jedoch nach dem modifizierten PPC eine Voraussetzung für eine MM-Bildung mit PL ist. Die Abbildung 5.26 zeigt die visuelle Darstellung des MM-Systems aus hPC+L-7D WF0.4 bei unterschiedlichen Gesamtkonzentrationen.

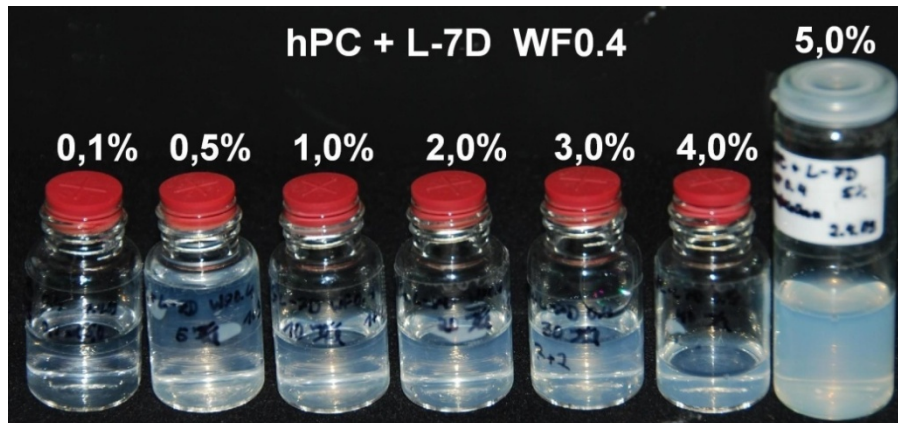


Abbildung 5.26: Visualisierung der Fähigkeit des MM-Systems hPC+L-7D $WF_{hPC}0.4$ klare Lösungen bei höheren Gesamtkonzentrationen zu bilden

5.2.1.2 DLS-Experimente

Decaglycerollaurat-Mizellen (bei einem $WF_{hPC}0.0$, Abbildung 5.27a) waren mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 8,5 nm etwas kleiner als Decaglycerolmyristat-Mizellen mit einem Durchmesser von etwa 10,5 nm. Dies ist durch die längere Fettsäure von M-10D (C_{14}) im Vergleich zu der Laurinsäure in L-7D begründet. Die Anwesenheit von hPC führte wie erwartet zu einem größeren mittleren Durchmesser der Mischmizellen. Bei einer Gesamtkonzentration von 1% (10 mg/ml) war die MM-Größe von hPC+L-7D mit einem $WF_{hPC}0.2-0.6$ im Bereich von 19-24 nm unabhängig vom hPC-Anteil. Wurde M-10D als Tensid neben hPC verwendet, stieg die Partikelgröße auf 24-29 nm, wenn der Masseanteil an hPC zwischen $WF_{hPC}0.1$ und $WF_{hPC}0.6$ lag.

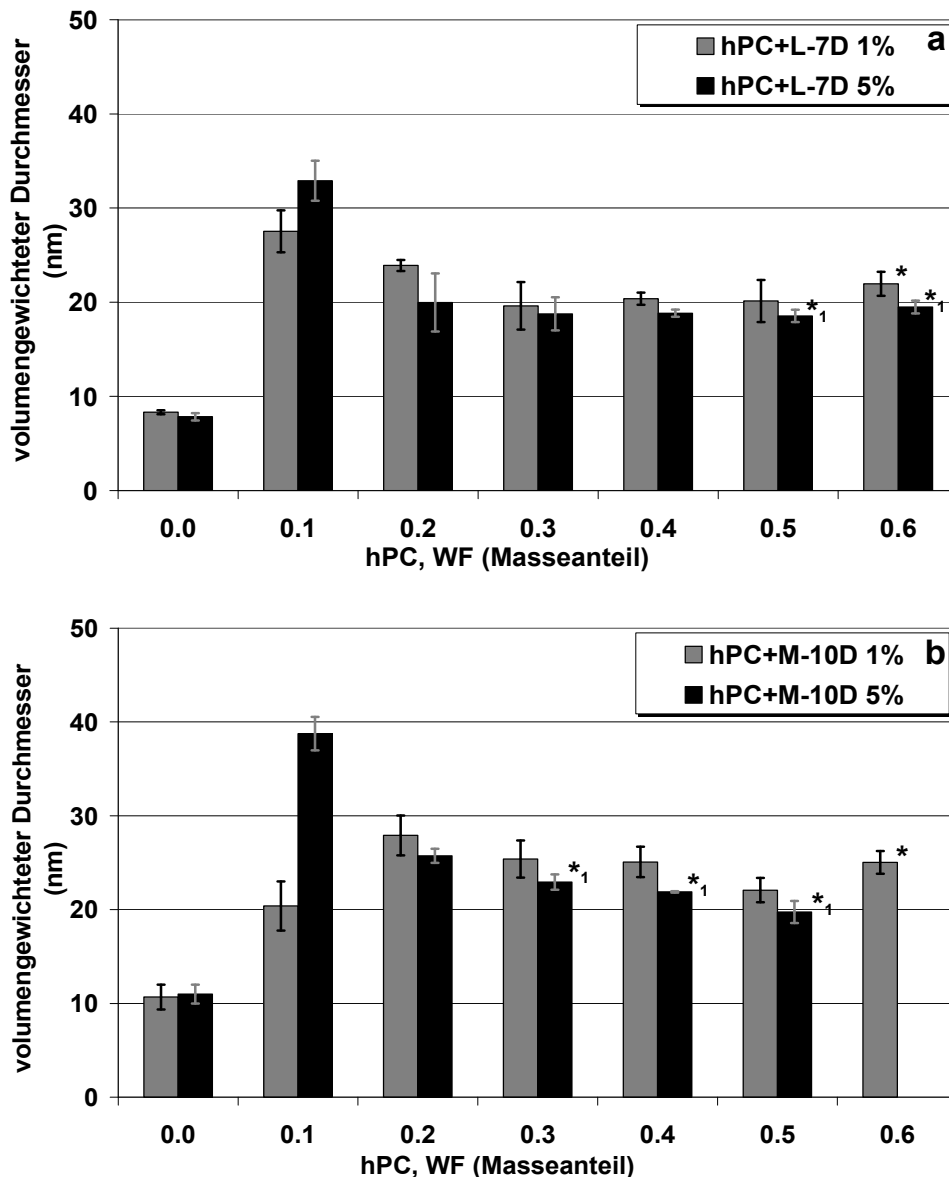


Abbildung 5.27: Einfluss der Gesamtkonzentration auf die Größe von MM in Systemen mit Polyglycerolestern und ansteigenden Masseanteilen an hPC (a) L-7D und (b) M-10D; * bimodale Verteilung; nur die kleinere Spezies ist dargestellt; *¹ bimodale Verteilung; Filtration (0,45 µm) der Probe vor DLS-Messung

Damit zeigen die Abbildung 5.27a und b, dass MM aus Decaglycerollaurat (L-7D) und hPC generell ein wenig kleiner waren als MM aus Decaglycerolmyristat (M-10D) und hPC, was wahrscheinlich in der unterschiedlichen Kettenlänge der Fettsäurereste begründet ist. Mit einem Anstieg der Gesamtkonzentration von 1 auf 5% ergab sich weder für Systeme mit L-7D noch für Systeme mit M-10D ein signifikanter

Unterschied in der mittels DLS gefundenen Partikelgröße, sofern der Masseanteil an hPC im Bereich $WF_{hPC}0.2-0.6$ lag (vgl. Abbildung 5.27). Interessanterweise kam es in beiden Systemen zu einer erhöhten Partikelgröße, wenn bei einer Gesamtkonzentration von 5% der Anteil an hPC auf $WF_{hPC}0.1$ abfiel, wobei die Werte durch die erhöhte wahre Viskosität korrigiert wurden. Der Grund hierfür könnte eine Änderung in der Vesikelform oder die Bildung von größeren Mischmizellen sein. Die mittleren Partikelgrößen und Polydispersitätsindices (PDI-Werte) des MM-Systems hPC+L-7D $WF_{hPC}0.4$ bei unterschiedlichen Gesamtkonzentrationen sind in Abbildung 5.28 dargestellt.

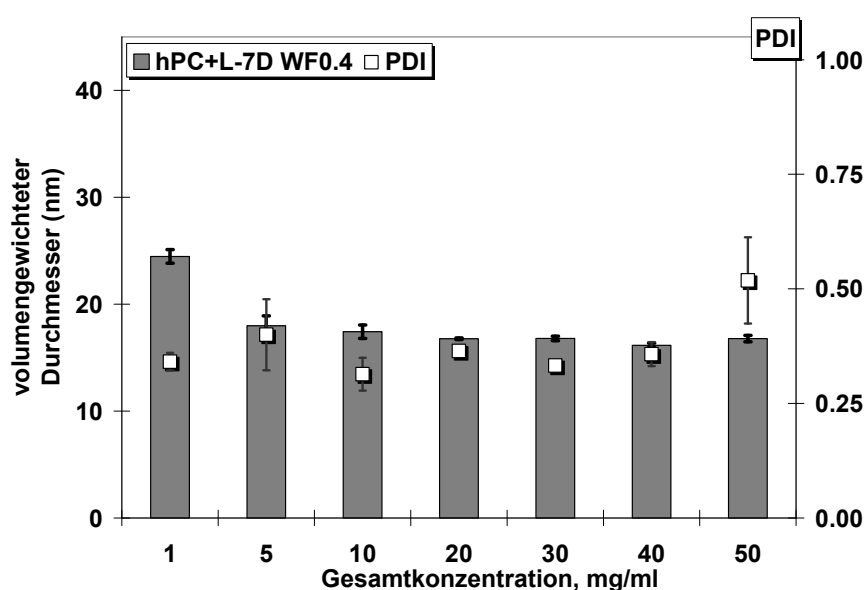


Abbildung 5.28: Einfluss einer erhöhten Gesamtkonzentration auf die Partikelgröße und den PDI im MM-System aus hPC+L-7D $WF_{hPC}0.4$

Die MM in dem System wiesen bei einer Gesamtkonzentration von 5-50 mg/ml einen konstanten hydrodynamischen Durchmesser von 19 ± 2 nm auf. Lediglich bei sehr niedrigen Konzentrationen von 1 mg/ml, nahe der CMC, konnte ein geringer Anstieg der Partikelgröße gefunden werden, der durch Verdünnungseffekte begründet sein kann. Die PDI Werte lagen in den meisten Fällen knapp unter 0.4, was auf eine breite Partikelgrößenverteilung schließen lässt. Daraus könnte abgeleitet werden, dass neben MM noch andere Spezies ähnlicher Größe oder einzelne Agglomerate mitvermessen wurden, zumal die Proben unfiltriert

analysiert wurden. Eine Ursache für die recht hohen PDI-Werte könnte sein, dass verschieden große MM nebeneinander existieren. Andererseits wiesen die MM möglicherweise keine sphärische Form auf. Bei der höchsten untersuchten Gesamtkonzentration von 50 mg/ml tritt dieser Effekt am stärksten in Erscheinung, da hier der höchste PDI-Wert von etwa 0.5 erhalten wurde (Abbildung 5.28). Bei der höchsten Konzentration sind die meisten hPC-Agglomerate zu erwarten, die für die zunehmende Trübung bei höher konzentrierten Proben verantwortlich sind.

5.2.1.3 CMC-Bestimmungen

Abbildung 5.29 zeigt die Ergebnisse der CMC-Bestimmungen durch Messung der Oberflächenspannung an Systemen aus unterschiedlichen PGE und Mischungen von PGE mit hPC. Die erhaltenen CMC-Werte sind der Tabelle 5.1 zusammengefasst. Das lipophilere M-10D weist, wie nach der Traube'schen Regel zu erwarten ist, eine geringere CMC auf als das kürzerkettige L-7D. Interessanterweise kam es nach Kombination mit hPC sowohl in dem untersuchten System mit M-10D als auch im System mit L-7D zu keiner Verringerung der CMC im Vergleich zu der CMC der jeweiligen reinen Tensidlösung. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Resultaten aus Untersuchungen an klassischen Gallensalz/Lecithin MM, wie sie in Kapitel 5.1.1.3 und in der Literatur (Hammad, 1998) dargestellt sind. Jedoch stellen die MM aus PGE und hPC ein anderes MM-System als die Gallensalz/Lecithin-MM dar. Ausschlaggebend für die CMC sollte erwartungsgemäß die besser wasserlösliche Komponente, also das eigentliche Tensid sein. Da in gleich konzentrierten Systemen mit hPC weniger Tensid vorhanden ist als in reinen Tensidlösungen derselben Konzentration, würde man einen CMC-Wert der MM auch bei höheren Konzentrationswerten erwarten, wie es in den Versuchen gefunden wurde. In Anbetracht der Lage der CMC-Werte in den Systemen aus PGE und hPC zeigt sich, dass das wasserlösliche Tensid hier jeweils die CMC-determinierende Komponente war.

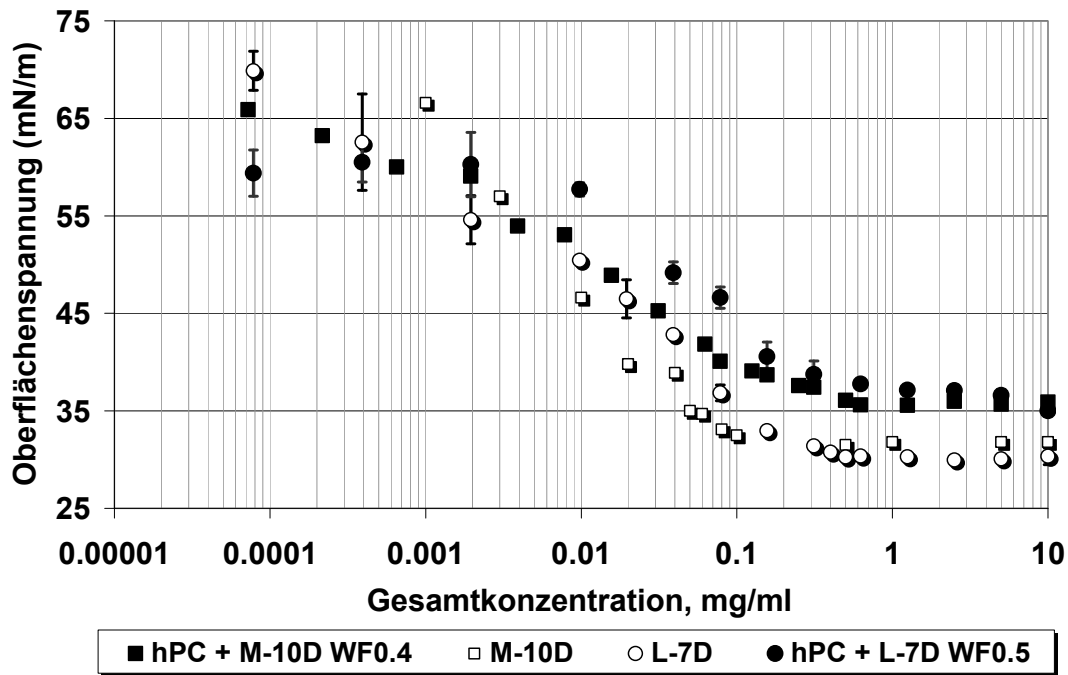


Abbildung 5.29: CMC-Bestimmung durch Oberflächenspannungsmessungen an Polyglycerolestern und Systemen aus PGE und hPC

Tabelle 5.1: CMC-Werte von Polyglycerolestern (PGE) und Systemen aus PGE und hPC ermittelt durch Oberflächenspannungsmessungen

System	CMC-Werte, mg/ml (σ -Messungen)
L-7D	0,26
hPC + L-7D WF0.5	0,29
M-10D	0,092
hPC + M-10D WF0.4	0,19

Allerdings sind die Unterschiede der CMC in reinen PGE-Systemen nur marginal kleiner als in Mischsystemen aus PGE und hPC (Tabelle 5.1).

5.2.2 Kombinationen von hydriertem Phosphatidylcholin mit Sucroseestern

5.2.2.1 Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen

Die Ergebnisse der Auswertungen der Transmissionsmessungen an Systemen, die neben den unterschiedlichen Sucroseestern (SE) steigende Masseanteile an hPC enthielten, sind in Abbildung 5.30 dargestellt. Zusätzlich zeigt die Abbildung zum Vergleich Systeme aus Polysorbat 20/80 und hPC. Für die homologe Reihe der SE konnte ein zu den PGE analoges Verhalten gefunden werden, was die Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen mit hPC betrifft. Mit zunehmender Lipophilie der Sucroseester sinkt deren Fähigkeit das wasserunlösliche hPC in einer isotropen klaren Lösung zu solubilisieren. Wie beschrieben (Kapitel 5.2.1.1) ist die Bildung einer klaren Lösung aus wasserunlöslichem PL und dem Tensid ein erstes Indiz für das Auftreten von MM-Systemen (Carey und Small, 1970; Lichtenberg, 1979; Hammad und Müller, 1998b).

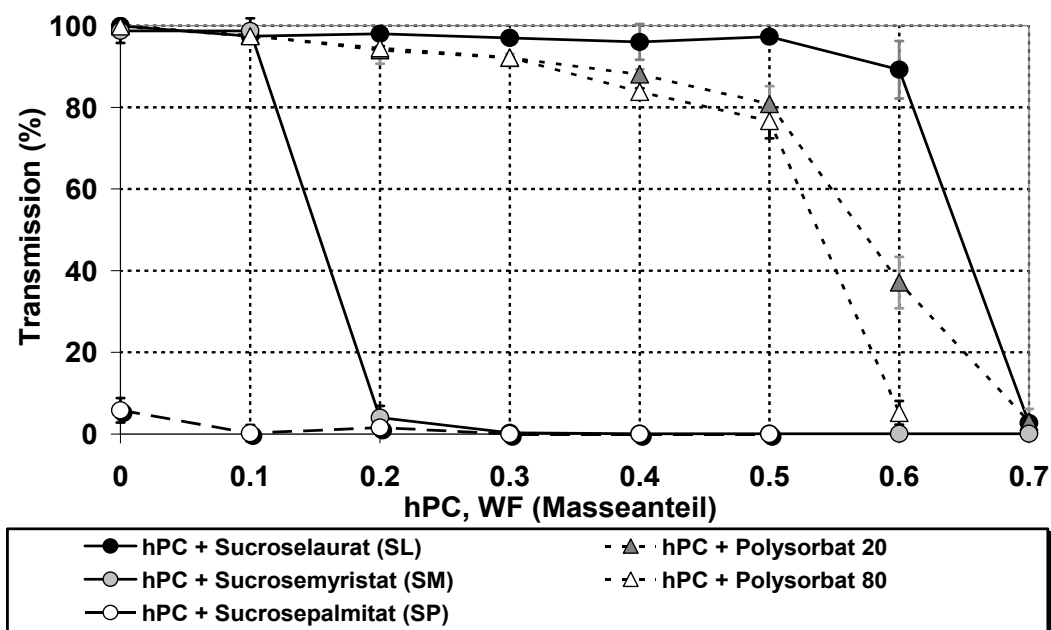


Abbildung 5.30: Fähigkeit von Sucroseestern und zum Vergleich von Polysorbat 20/80 klare Lösungen mit steigenden Masseanteilen hPC zu bilden; $c = 1\%$; $n = 3$

Der hydrophilste getestete Sucroseester, das Sucroselaurat (SL), zeigt ein außerordentlich hohes Solubilisierungsvermögen für hPC (Abbildung

5.30). Bis zu 60% (m/m) an hPC werden von SL in einer isotropen klaren Lösung gehalten, ohne dass es zu einem deutlichen Abfall der Transmission (Abbildung 5.30), bzw. einer deutlichen Trübung kommt (Abbildung 5.31).

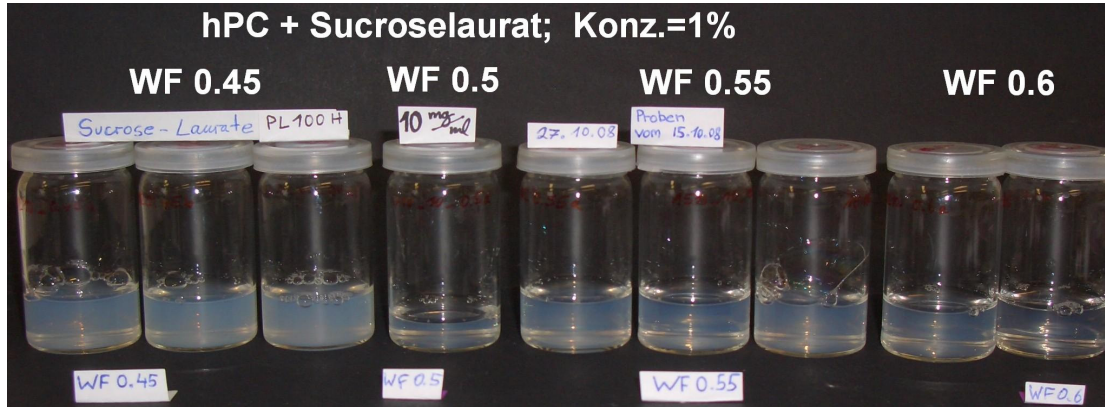


Abbildung 5.31: Visualisierung der Fähigkeit von SL klare Lösungen mit höheren Masseanteilen (WF0.45-6.0) an hPC zu bilden; Vergleich unterschiedlicher Chargen, jeweils $c = 1\%$

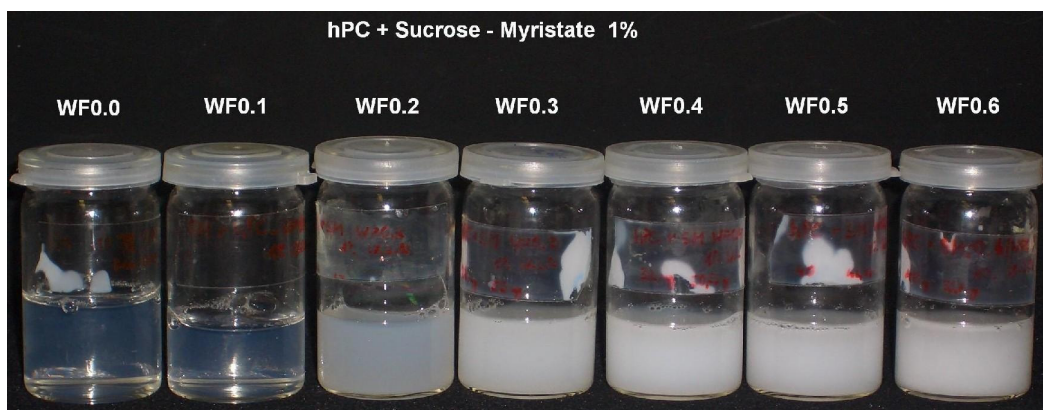


Abbildung 5.32: Visualisierung der Fähigkeit von SM klare Lösungen mit steigenden Masseanteilen an hPC zu bilden; $c = 1\%$

Das Solubilisierungsverhalten der SE für hPC in Mischmizellen lässt sich mit Hilfe des modifizierten PPC, in Analogie zu dem Verhalten der PGE, erklären. Ein Transferieren des PPC zur MM-Bildung aus wasserlöslichen Tensiden und wasserunlöslichen nicht-konischen PL Molekülen setzt eine ausgeprägte Keilform des Tensids voraus, wodurch eine MM-Bildung mit PL-Molekülen forciert wird. Je länger-kettig die

Fettsäure des Sucroseesters ist, umso größer wird das lipophile Volumen des Moleküls. Dadurch wird eine optimale Packung mit den nicht-konischen hPC-Molekülen zu MM verhindert (vgl. Kapitel 2.2.4.2), da ein großes lipophiles Volumen einer konischen Form entgegenwirkt. Im Vergleich zu den PGE zeigten die SE denselben Trend klare Lösungen mit hPC zu bilden, jedoch ist dieser unterschiedlich stark ausgeprägt. Während Myristinsäure-haltige SE kaum in der Lage waren, klare Lösungen mit höheren Masseanteilen an hPC zu bilden (Abbildung 5.30), zeigten Myristinsäure-haltige PGE ein nahezu gleich ausgeprägtes Solubilisierungsvermögen für hPC wie Laurinsäure-haltige PGE (Abbildung 5.23). Im Folgenden sind die Fähigkeiten von SL (Abbildung 5.31) und SM (Abbildung 5.32), klare Lösungen mit steigenden Masseanteilen an hPC zu bilden visuell dargestellt.

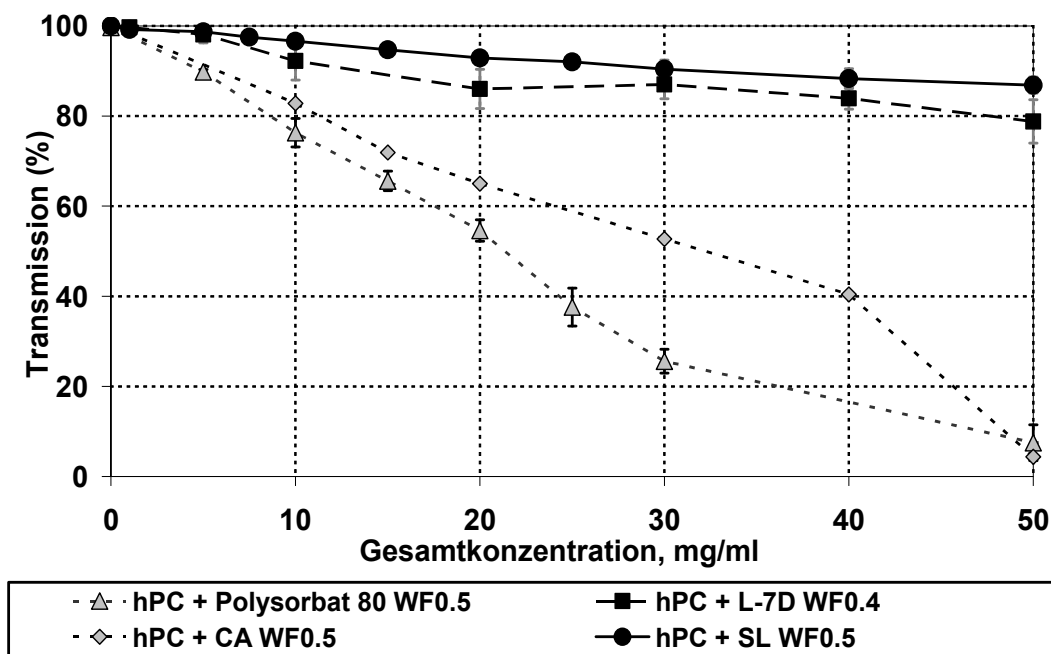


Abbildung 5.33: Einfluss einer erhöhten Gesamtkonzentration des MM-Systems aus hPC+SL WF_{hPC}0.5 auf die Fähigkeit klare Lösungen zu bilden.

Für ein MM-System mit pharmazeutischer Relevanz, ist es entscheidend, ob eine klare Lösung aus wasserlöslicher und wasserunlöslicher Komponente auch bei erhöhten Gesamtkonzentrationen aufrechterhalten werden kann. Die Fähigkeit des MM-Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 klare isotrope Lösungen bei erhöhten Gesamtkonzentrationen zu bilden, ist in

Abbildung 5.33 im Vergleich zu anderen ausgewählten hPC-haltigen Tensidsystemen graphisch dargestellt. Während Systeme aus hPC und Polysorbat 20/80 oder CS bei höheren Gesamtkonzentrationen trüb wurden, bildeten sowohl Polyglycerollaurat als auch Sucroselaurat, also jeweils die hydrophilsten Vertreter ihrer homologen Reihen, weiterhin optisch klare Lösungen.

Besonders SL ist hervorzuheben, da es im MM-System mit einem Masseanteil an hPC von 50% ($WF_{hPC}0.5$) klare Lösungen bildet. Im Gegensatz zu den anderen tensidhaltigen Systemen, in denen es bei höheren Konzentrationen zu einer Zunahme der Trübung durch Präzipitation von hPC kam, zeigt SL als Tensid mit einer expliziten Trennung in der Molekülgeometrie ein anderes Verhalten. Wie bereits ähnlich für Polyglycerollaurat beschrieben, trägt SL eine Kopfgruppe, die durch das Disaccharid Saccharose mehrere Hydroxylgruppen aufweist und dadurch eine ausgeprägte Hydrophilie mit sich bringt. In Anbetracht des schlechteren Solubilisierungsvermögens der Polysorbate für hPC und des deutlich besseren Solubilisierungsvermögens des Polyglycerollaurats und des Sucroselaurats, scheint die ausgeprägte Hydrophilie der Kopfgruppe des wasserlöslichen Tensids eine entscheidende Rolle für die Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen mit wasserunlöslichem hPC einzunehmen. Ebenso wurde sowohl für die Polysorbate als auch besonders für die homologen Reihen der PGE und SE eine Abhängigkeit in der Länge der Fettsäureketten zu Gunsten kürzerer Kettenlängen gefunden.

Die Abbildung 5.34 zeigt in visueller Darstellung, wie das favorisierte MM-System aus hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ auch bei höheren Gesamtkonzentrationen von 5% klare Lösungen mit hohem Masseanteil an hPC (50%) bildet. Der Terminus „favorisiert“ wurde verwendet, da nur dieses System von den bisher untersuchten Systemen bei einem hohen Masseanteil an hPC von 50% ($WF_{hPC}0.5$) auch in höherer Gesamtkonzentration, isotrope klare Lösungen ausbildet.

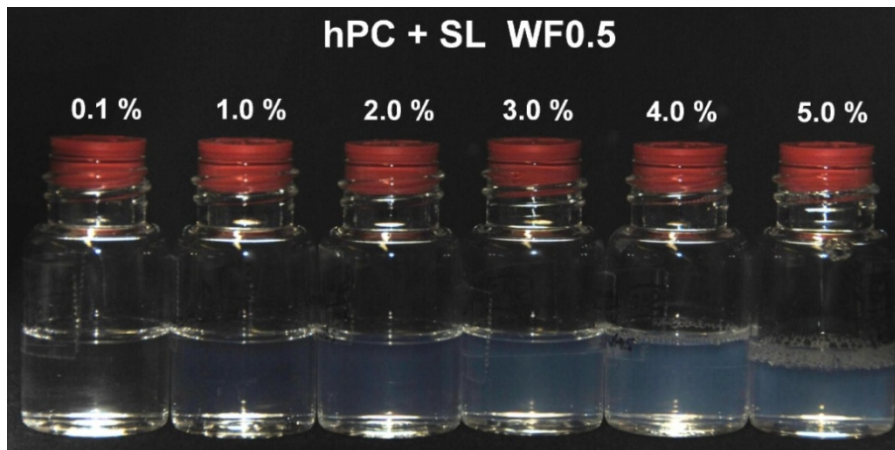


Abbildung 5.34: Visualisierung der Fähigkeit des MM-Systems $hPC+SL$ $WF_{hPC}0.5$ klare Lösungen bei höheren Gesamtkonzentrationen zu bilden

5.2.2.2 DLS-Experimente

Die Auswertungen der DLS-Messungen an SL-haltigen Systemen ergaben, dass Mizellen aus SL einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 7-8 nm aufweisen. Eine Kombination mit hPC führte generell zu einem Anstieg der mittels DLS gefundenen Partikelgröße. Systeme mit geringem Masseanteil an hPC wie $WF_{hPC}0.1$ oder $WF_{hPC}0.2$ wiesen einen hydrodynamischen Durchmesser von 9-13 nm bei einer Gesamtkonzentration von 1 und 5% auf, was durch die Integration des hPC in SL-Mizellen und der Bildung von MM bedingt ist. Ein hPC-Masseanteil von 0.3 resultierte in einer bimodalen Partikelgrößenverteilung mit einer Teilchengröße von 13 und 28 nm Durchmesser (kleinere Teilchen sind in der Abbildung 5.35 nicht gezeigt). Das System bildete bei diesem Masseanteil an hPC größere Aggregate, die nicht weiter untersucht worden sind. Bei höheren Masseanteilen an hPC ließen sich in dem System aus SL+hPC mittels DLS-Analyse Partikel-Durchmesser nachweisen, die aufgrund ihrer geringen Größe auf MM schließen lassen und unabhängig von der Gesamtkonzentration konstant blieben. Die Kombination von SL mit hPC bei einem $WF_{hPC}0.45-0.6$ und einer Gesamtkonzentration von 10 bzw. 50 mg/ml resultierte in der Ausbildung von 18,5-22 nm großen MM (Abbildung 5.35).

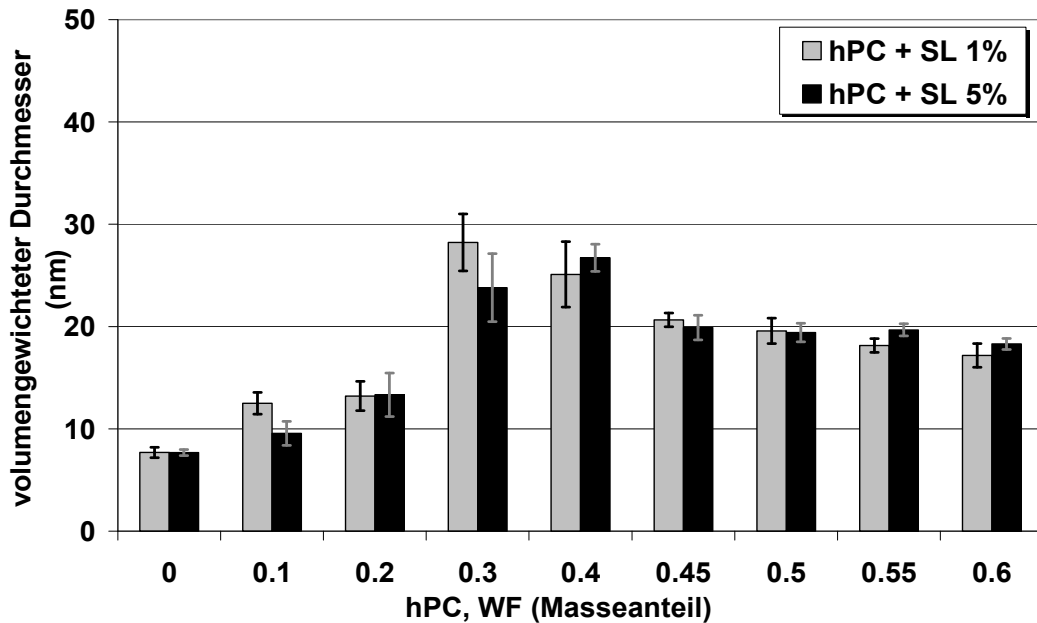


Abbildung 5.35: Einfluss der Gesamtkonzentration auf die Größe von MM in Systemen mit Sucroseestern und ansteigenden Masseanteilen an hPC

Als ein favorisiertes MM-System zeigt die Kombination von SL mit 0.5 hPC-Masseanteilen eine streng monomodale Partikelgrößenverteilung mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von etwa 20 nm, was den Schluss zulässt, dass es sich um MM handelt, die mit einem PDI < 0.1 sehr eng verteilt vorliegen (Abbildung 5.35, Abbildung 5.36). Die Abbildung 5.36 zeigt den mittleren hydrodynamischen Durchmesser und den PDI des MM-System hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ im Konzentrationsbereich von 1-80 mg/ml. Über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich lag der mittlere volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser bei etwa 20 nm, ohne dass es zu Fluktuationen in der Partikelgröße kam. Die PDI-Werte waren über diesen weiten Konzentrationsbereich weitgehend deutlich ≤ 0.1 , was auf eine streng monomodale Partikelgrößenverteilung des vorliegenden MM-Systems hinweist.

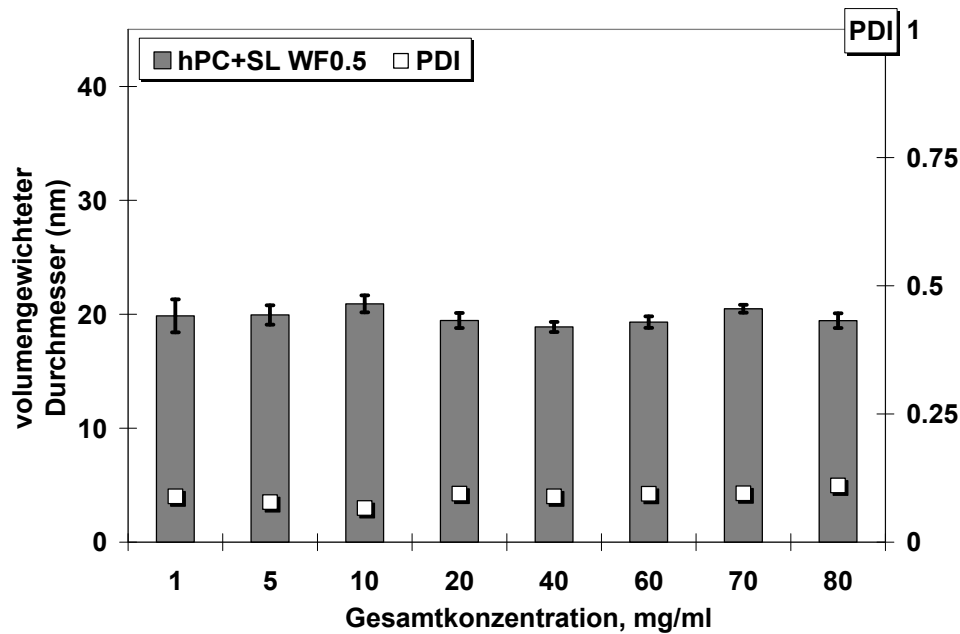


Abbildung 5.36: Einfluss einer erhöhten Gesamtkonzentration auf die Partikelgröße und den PDI im MM-System aus hPC+SL WF_{hPC}0.5

Die Abbildung 5.37 zeigt das DLS-Messergebnis einer Dreifachbestimmung am MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 bei einer geringeren (a) und höheren (b) Gesamtkonzentration als Plot, wie er direkt von der DLS-Software ausgegeben wird. Eine Änderung der Gesamtkonzentration hat keinerlei Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der gefundenen MM. Dieses Ergebnis steht in deutlichen Kontrast zu den klassischen Glycocholsäure/Lecithin-MM, die durch Verdünnen (1:5) eine Umwandlung von etwa 5 nm zu 75 nm großen Partikeln unterlaufen (vgl. Kapitel 5.1.1.2). Diese Instabilität gegenüber Verdünnungsschritten stellt einen wesentlichen Nachteil der klassischen MM (Mueller, 1981) gegenüber dem neu entwickelten MM-System aus hPC und SL dar.

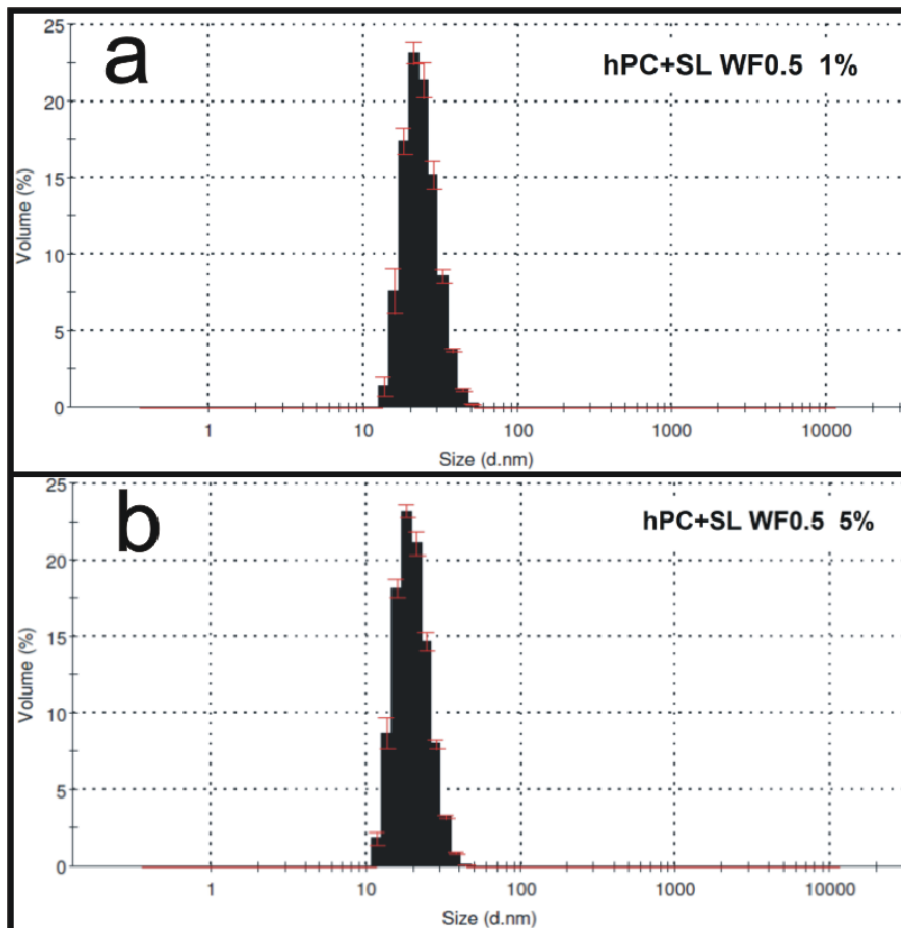


Abbildung 5.37: Partikelgrößenverteilung im MM-System aus hPC+SL WFhPC0.5 bei einer Gesamtkonz. von 1% (a) und 5% (b); DLS-Messungen nach Korrektur der wahren Viskosität; $n = 3$

5.2.2.3 CMC-Bestimmungen

Die CMC von SL beträgt etwa 0.23 mg/ml nach Auswertung der Oberflächenspannungsmessungen (Abbildung 5.38) und etwa 0,21 mg/ml nach Auswertung der Fluoreszenzintensitätsmessungen von DPH (Abbildung 5.39). Der in der Literatur genannte CMC-Wert für Sucrosemonolaurat liegt bei etwa 0,14 mg/ml (Becerra et al., 2008). Bei dem verwendeten SL handelt es sich um ein Gemisch aus Mono- und Diestern, so dass aufgrund der ausgeprägteren Lipophilie eine etwas niedrigere CMC erwartet worden ist. Jedoch stimmen die ermittelten CMC-Werte dennoch relativ gut mit den Literaturwerten überein. Die Anwesenheit von hPC als additive PL-Komponente bei einem $WF_{hPC}0.5$ resultierte in einer geringen Senkung des CMC-Wertes auf etwa

0,18 mg/ml nach Oberflächenspannungsmessungen. Diese Senkung der CMC im MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 wurde durch Fluoreszenzmessungen bestätigt (Abbildung 5.39).

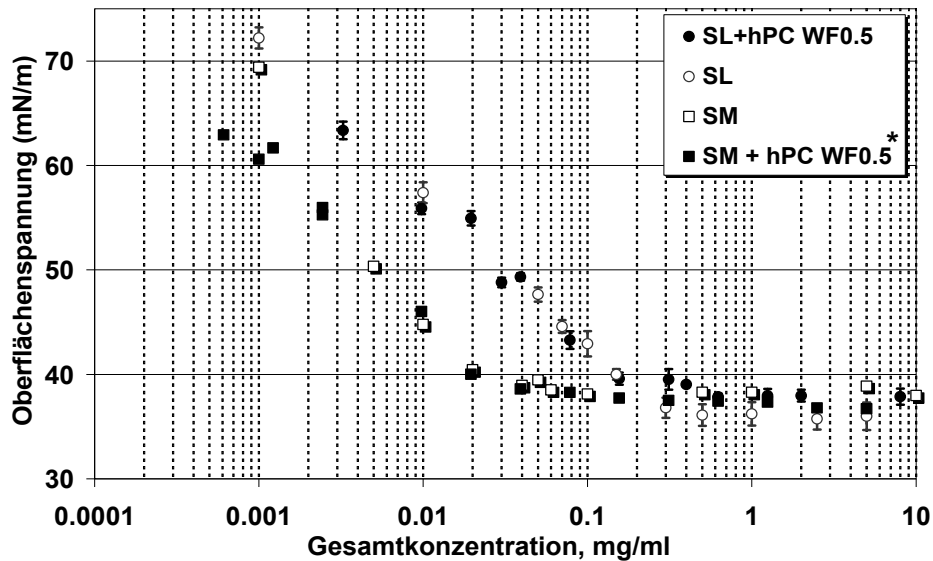


Abbildung 5.38: CMC-Bestimmung durch Oberflächenspannungsmessungen an Lösungen von Sucroseestern und Systemen aus SE und hPC

Wie beschrieben kann die Zugabe von PL zu Tensid-Lösungen zu einer MM-Bildung führen, wobei die erhaltenen MM eine erniedrigte CMC aufweisen (Hammad, 1998). So wie diese Erkenntnis an klassischen Gallensalz/Lecithin-MM gefunden worden ist (Hammad, 1998), konnte sie auch für das MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 bestätigt werden, wobei hier lediglich eine geringe Senkung der CMC durch die Anwesenheit von hPC erreicht wurde. Zudem liegen die CMC-Werte des neu entwickelten MM-Systems unterhalb der CMC der klassischen Gallensalz/Lecithin MM (0,35 mg/ml), was zu einer erhöhten Stabilität der neu entwickelten MM gegenüber Verdünnungen führt.

Das hydrophobere Sucrosemyristat weist im Vergleich zu SL eine geringere CMC auf (Abbildung 5.38 und Tabelle 5.2), wie nach der Traube'schen Regel zu erwarten war. Mischungen aus SM und hPC wurden hergestellt und anschließend filtriert (0,45 µm), um dann mittels Tensiometer vermessen zu werden. Die Resultate sind in der Abbildung

5.38 und Tabelle 5.2 aufgeführt. Allerdings handelt es sich in diesen Systemen eher um Dispersionen als um mischmizellare Systeme.

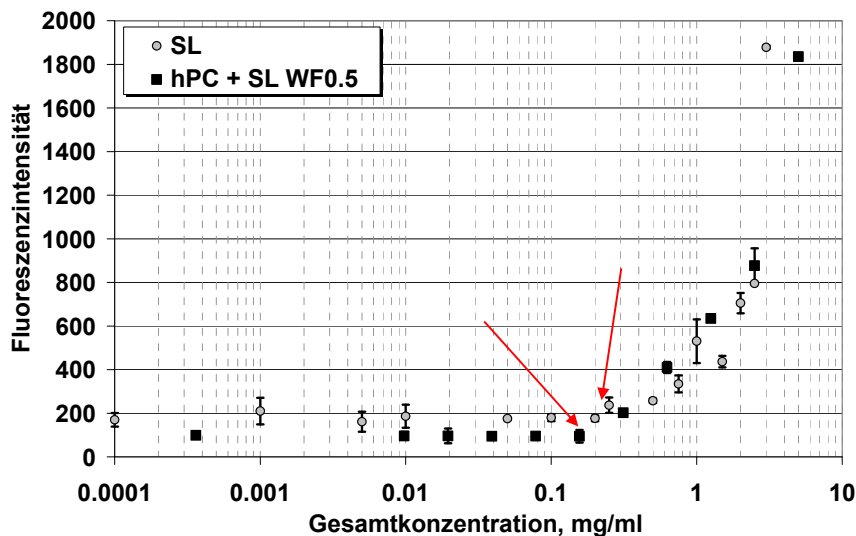


Abbildung 5.39: CMC-Bestimmung durch Messung der Fluoreszenzintensität von DPH in Lösungen von Sucroseestern und Systemen aus SE und hPC; $n = 3$

Tabelle 5.2: CMC-Werte von Sucroseestern und Systemen aus SE und hPC; ermittelt durch Oberflächenspannungsmessungen

System	CMC, mg/ml (σ - Messungen)	CMC, mg/ml (Fluoreszenzint.)
SL	0,23	0,21
hPC + SL WF0.5	0,18	0,15
SM	0,019	/
hPC + SM WF0.5; filtriert (0,45 μ m)	0,013-0,02	/
hPC + SM WF0.6; filtriert (0,45 μ m)	0,011-0,015	/
hPC + SP WF0.5; filtriert (0,45 μ m)	0,0072	/

Zudem kann der Filtrationsschritt eine Entfernung von adsorbierten Tensiden an hPC-Agglomeraten und Filtermembran zur Folge haben, weshalb diese Ergebnisse zwar aufgeführt, jedoch nicht weiter diskutiert werden. Lediglich die Tendenz einer Erniedrigung der CMC in den

lipophileren Systemen mit SM statt SL neben hPC wurde gefunden und lässt sich entsprechend der Traube'schen Regel nachvollziehen. Ferner wurde versucht, eine optisch, klare Lösung aus hPC und Sucrosemyristat (SM) durch Verwendung der Hochdruckhomogenisierung als Herstellungsmethode zu erhalten. Jedoch ermöglichte der hierbei auftretende hohe Energieeintrag keine Ausbildung einer optisch klaren MM-Lösung aus SM-Molekülen und hPC-Molekülen. Letztendlich unterstützt diese Erkenntnis jedoch nur die Tatsache, dass es sich bei mizellaren oder mischmizellaren Lösungen um thermodynamisch stabile Systeme handelt, die sich (über die Zeit) selbst equilibrieren, so dass ihre Formierung auch über die direkte Dispergierung zugänglich sein müssten. Da die Hochdruckhomogenisierung nicht die Molekülgeometrie der SM-Moleküle verändert, bleiben diese weiterhin ungeeignet, MM mit hPC zu bilden. Eine Anwendung des modifizierten PPC verdeutlicht, dass das lipophile Volumen der SM-Moleküle als Mischung aus Mono- und Diestern zu hoch ist, um eine optimale Packung mit hPC zu MM zu forcieren.

5.3 Einfluss der Hydrophilie der Kopfgruppe des Tensids

Die Untersuchungen an Mischsystemen aus unterschiedlichen Tensiden mit steigenden Anteilen an hPC führen zu der Erkenntnis, dass der hydrophilen Kopfgruppe des Tensids eine Schlüsselrolle zukommt, um eine MM-Bildung mit hPC zu forcieren. Besonders ein Vergleich der unterschiedlichen Tensidklassen der Polysorbate und der Sucroseester verdeutlicht dies. Polysorbat 20 und Sucroselaurat weisen im Molekülbau mit einer C₁₂-Fettsäure jeweils den gleichen hydrophoben Rest auf, jedoch unterscheiden sie sich im Aufbau der hydrophilen Kopfgruppe. Interessanterweise ist nur SL in der Lage, mit höheren Masseanteilen an hPC bei höheren Gesamtkonzentrationen klare, monomodal verteilte MM-Lösungen zu bilden (vgl. Kapitel 5.1.2, Kapitel 5.2.2 und Abbildung 5.33). Der Grund hierfür liegt im unterschiedlichen Aufbau der hydrophilen Kopfgruppe. Der polare Polysorbat-Kopf besteht aus PEG-Ketten, die sich eher diffus über das gesamte Molekül erstrecken. Somit weist der PEG-Kopf zum einen eine relativ geringe Hydrophilie auf, die

vornehmlich auf Ether-Gruppen zurückzuführen ist. Zum anderen wird eine definierte Keilanordnung des Gesamtmoleküls durch die diffus erscheinenden PEG-Ketten erschwert. Im Vergleich dazu weist das Sucroselaurat-Molekül eine klar definierte, strukturell abgegrenzte Kopfgruppe auf. Das Sucrose-Molekül besitzt eine außerordentlich hohe Hydrophilie, die durch das Vorhandensein mehrerer OH-Gruppen definiert ist (Abbildung 5.40).

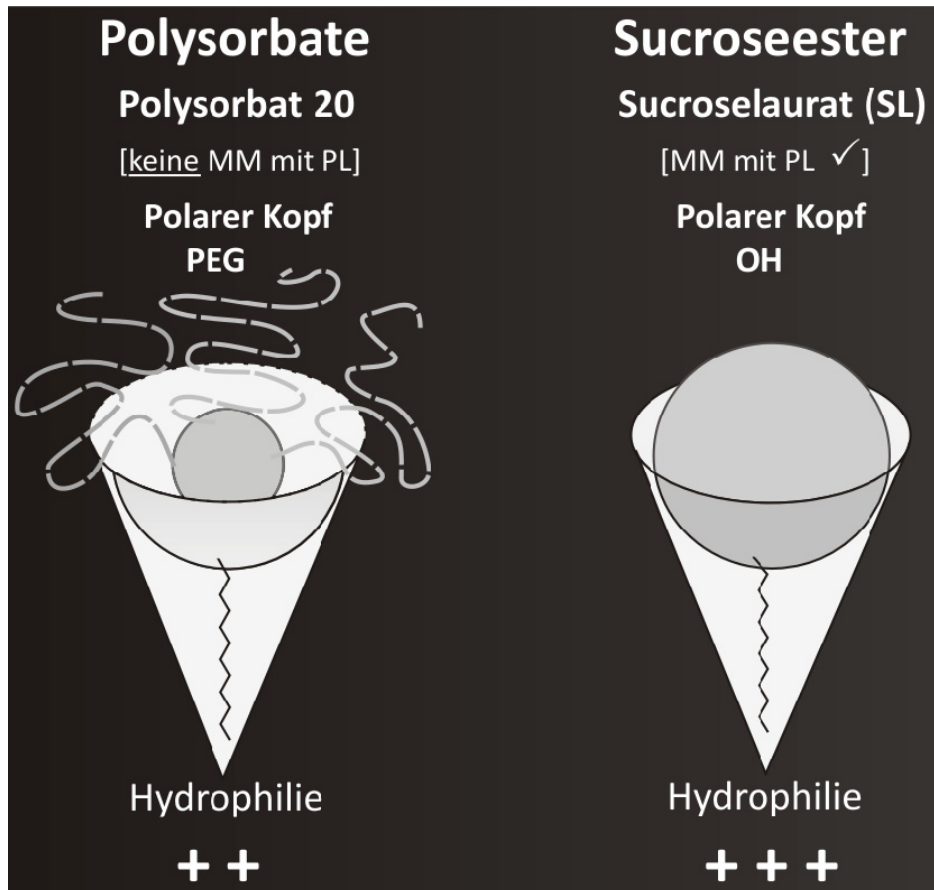


Abbildung 5.40: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Molekülgeometrien der Polysorbate mit einer diffusen PEG-Kopfgruppe im Vergleich zu den SE bzw. PGE mit einer ausgeprägten Kopfgruppen-Hydrophilie durch eine Vielzahl potenter OH-Gruppen

Die Abbildung 5.40 veranschaulicht die Unterschiede in schematischer Darstellung. Um das Ausmaß und den Einfluss der Hydrophilie genauer beschreiben zu können, wurden Trübungspunktmessungen an den unterschiedlichen Tensiden vorgenommen. Beim Trübungspunkt (TP)

liegt die hydrophile Kopfgruppe so weit desolvatisiert vor, dass es in Folge der Dehydratisierung zu einer Ausflockung des Tensids kommt. Damit kann über die Messung des Trübungspunktes der Tenside eine Aussage über deren Hydrophilie getroffen werden. Je hydrophiler das Tensidmolekül, also je hydrophiler die Kopfgruppe, umso stärker ausgeprägt wird die Hydratisierung der Kopfgruppe sein und umso höher wird der TP liegen.

5.3.1 Trübungspunktmessungen zur Evaluierung des Ausmaßes der Hydrophilie der Kopfgruppe

Die Abbildung 5.41 zeigt die Trübungspunkte einer Vielzahl der verwendeten Tenside als Balkendiagramm. Die Messungen wurden teilweise nach Zugabe von 10% oder sogar 20% NaCl als Strukturbildner durchgeführt, um den TP zu senken. Die Trübungspunkte der Polysorbate liegen deutlich unterhalb denen der SE oder auch PGE. Begründet werden kann dies durch die ausgeprägte Hydrophilie der Kopfgruppe der SE bzw. der PGE. Die Vielzahl der Hydroxylgruppen der SE oder auch der PGE bildet eine deutlich stärkere Hydrathülle aus, als es die Ethergruppen des PEG in den Polysorbaten, dem Solutol oder dem Poloxamer 188 vermögen (vgl. Abbildung 5.41). Selbst die Zugabe von 20% NaCl als Strukturbildner führte nicht zu einer ausreichenden Dehydratisierung der SL, SM, L-7D oder M-10D Moleküle. Damit konnte gezeigt werden, dass die Fettsäurenkettenlänge der untersuchten PGE oder SE keinen Einfluss auf den TP in den verwendeten NaCl-Lösungen hat. Sowohl Laurinsäure-haltige SE (SL) oder PGE (L-7D), als auch Myristinsäure-haltige SE (SM) oder PGE (M-10D) blieben in 20%igen NaCl-Lösungen klar gelöst und es kam zu keiner Ausflockung (Tabelle 5.3). Die Bestimmung der Trübungspunkte der Tenside ermöglicht eine Differenzierung zwischen der Hydrophilie der Kopfgruppe der unterschiedlichen Tensid-Moleküle. Überträgt man die Ergebnisse der TP-Untersuchungen (Kapitel 5.3.1) auf die MM-Bildung der Tenside mit Phospholipiden (vgl. Kapitel 5.2 und 5.3), so kann festgehalten werden, dass nur solche Tenside mit hohem TP (entsprechend für hohe Hydrophilie) in der Lage sind, klare mischmizellare Systeme mit hohen Anteilen an PL auszubilden.

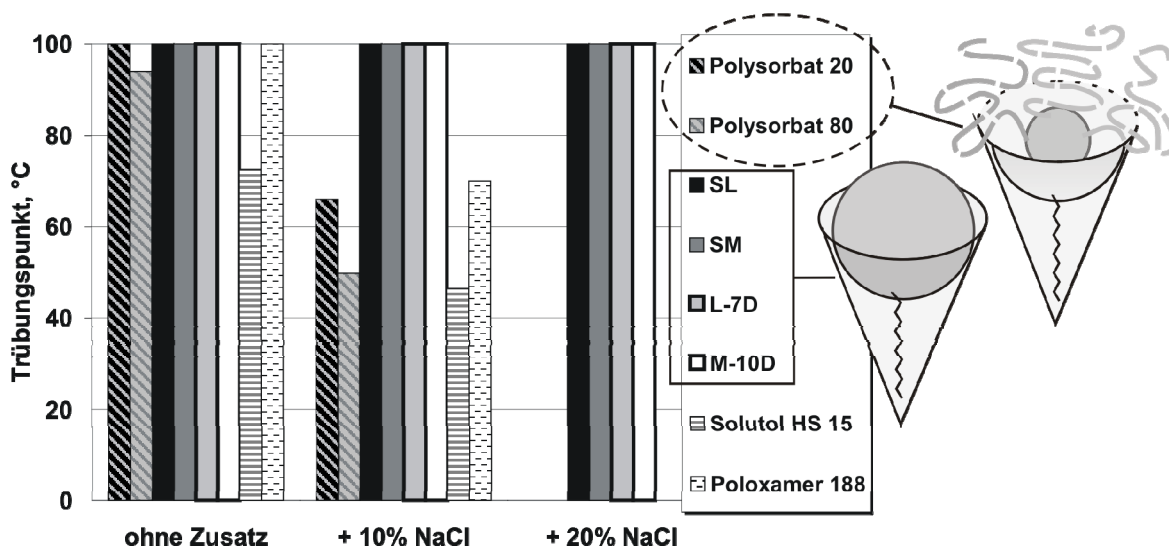


Abbildung 5.41: Trübungspunkte von 1%igen Tensidlösungen \pm NaCl-Zusatz. Dargestellt ist ferner der Einfluss einer PEG-Kopfgruppe geringer Hydrophilie und einer starken hydrophilen Kopfgruppe (OH-Gruppen in SE/PGE)

Tabelle 5.3: Trübungspunkte einiger verwendeter wasserlöslicher Tenside in Puffer ohne und mit NaCl-Zusatz; c (Tensid) = 1%

Trübungspunkt (TP), °C			
Tensid	ohne Zusatz	+ 10% NaCl	+ 20% NaCl
Polysorbat 20	ca. 98	66	/
Polysorbat 80	94	49.8	/
SL	>100	>100	>100
SM	>100	>100	>100
L-7D	>100	>100	>100
M-10D	>100	>100	>100
Solutol HS 15	72,5	46,5	/
Poloxamer 188	>100	70	/

Damit belegen die TP-Untersuchungen zur Evaluierung des Ausmaßes der Hydrophilie der Kopfgruppe die Anwendbarkeit des transferierten PPC auf eine MM-Bildung mit PL.

5.4 Einfluss des PL-Typs auf die Fähigkeit, MM mit Sucroselaurat zu bilden

5.4.1 Abhängigkeit der Fettsäurekettenlänge des PC-Typs auf die Ausbildung von klaren Lösungen mit SL

Eine Analyse der Transmissionsergebnisse ergab, dass die Länge der Fettsäurekette im verwendeten PC-Typ einen entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen mit Sucroselaurat hat (Abbildung 5.42). Allerdings besteht die Abhängigkeit nicht in einem linearen Zusammenhang, d.h. mit steigender oder sinkender Fettsäurekettenlänge steigt die Fähigkeit der PC-Typen nicht, klare Lösungen mit SL zu bilden (Abbildung 5.42). Vielmehr wurde gefunden, dass PC-Typen, die ausschließlich Palmitinsäure-Reste tragen am besten geeignet sind, klare Lösungen mit SL zu bilden. Die Fähigkeit der PC-Typen, in hohen Anteilen klare Lösungen mit SL zu bilden, nimmt in der Reihe von links nach rechts ab: DPPC > hPC > DMPC > DLPC. Systeme aus DPPC und SL benötigen zudem eine wesentlich kürzere Zeit der Equilibrierung, um klare Lösungen zu bilden. Anstatt wie bei hPC+SL-Systemen mehrere Stunden (> 10 Stunden bei 37°C), benötigten Systeme mit DPPC nur wenige Stunden (ca. 4 Stunden bei RT) zur Ausbildung einer klaren Lösung. Das verwendete hPC weist eine sehr ähnliche Zusammensetzung wie DPPC auf, da im hPC-Molekül ebenfalls die Palmitinsäure, daneben jedoch auch die Stearinsäure vorhanden ist. Folglich muss die Gegenwart der Stearinsäure einen gewissen Nachteil mit sich bringen, was die Packung mit SL zu Mischmizellen betrifft. Systeme mit einem Masseanteil von 60% DPPC neben SL zeigten im Gegensatz zu Systemen mit 60% Masseanteil an hPC neben SL keine Abnahme der Transmission (Abbildung 5.42). Der Trend einer besseren Solubilisierung der PC-Typen mit längeren Fettsäureresten (DPPC > DMPC > DLPC) könnte darin begründet sein, dass für eine effektive Packung des PC mit SL zu MM eine Zusammenlagerung der Fettsäureketten des PC und SL über Van-der-Waals-Kräfte ausschlaggebend ist. Längerkettige PC-Typen wie DPPC bieten eine größere Berührungsfläche der Fettsäuren des PC mit der Laurinsäure des SL, was sich in einer optimierten Packung zu MM

äußert. Überraschenderweise bestätigten die verwendeten C_{12} -PL (PL-Gemisch) den gefundenen Trend nicht.

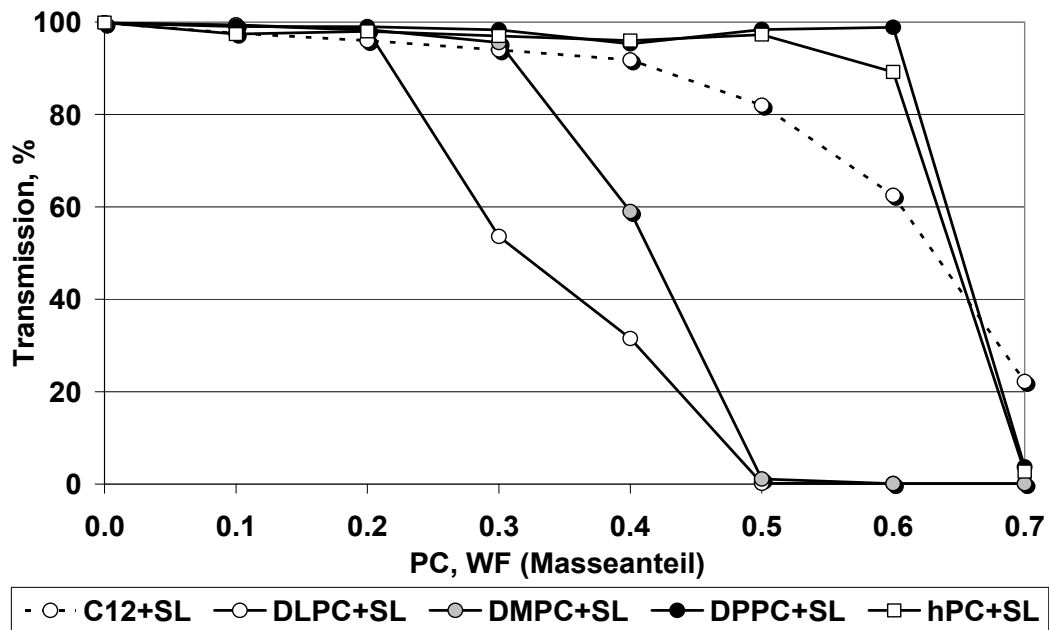


Abbildung 5.42: Fähigkeit von PC-Typen unterschiedlicher Fettsäurekettenlänge bei steigendem Masseanteil klare Lösungen mit SL zu bilden; $c = 1\%$

Allerdings ist die genaue Zusammensetzung dieses PL-Gemischs nicht bekannt. Nach Aussage des Herstellers handelt es sich nur zu 70% um Laurinsäure-haltige Phospholipide. Da die genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist, die C_{12} -PL jedoch mituntersucht werden sollten, sind die Ergebnisse im Folgenden zwar aufgeführt, werden jedoch nicht detailliert diskutiert. Die Abbildung 5.43 visualisiert die Fähigkeit der eingesetzten PC-Typen von unterschiedlicher Kettenlänge, in steigenden Anteilen, klare Lösungen mit SL zu bilden. Zu beachten ist, dass die Gesamtkonzentration in den Systemen mit C_{12} -PL, DLPC und DMPC 1% betrug (Abbildung 5.43a-c) und die gezeigten Systeme mit DPPC eine erhöhte Konzentration von 5% aufwiesen (Abbildung 5.43d). DPPC bildet in sämtlichen eingesetzten Masseanteilen bei erhöhten Gesamtkonzentrationen klare Lösungen mit SL, mit Ausnahme des Systems DPPC+SL $WF_{DPPC}0.3$ 5% (Abbildung 5.43d). In diesem System kam es bei der höheren Konzentration von 5% zu einer Trübung. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

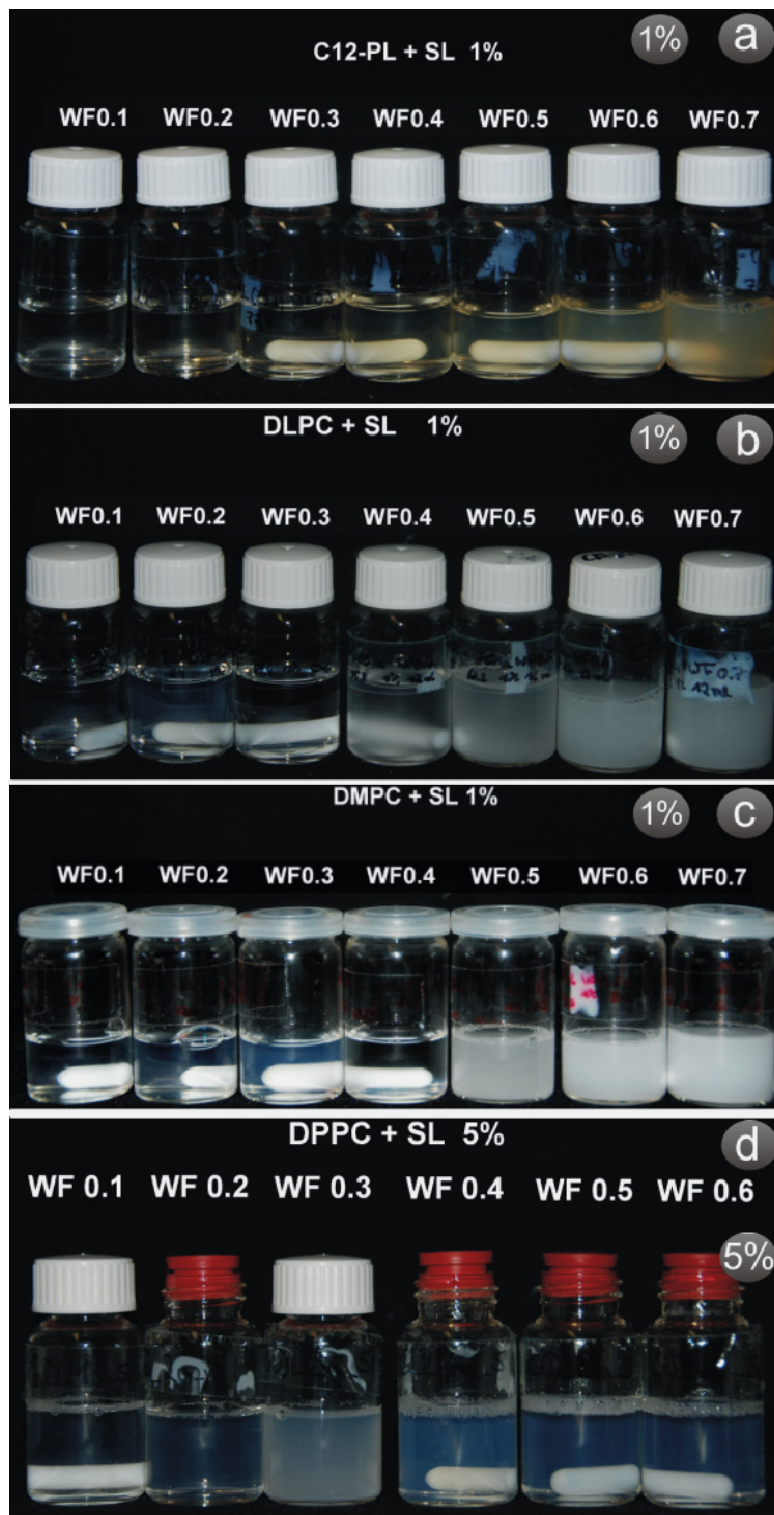


Abbildung 5.43: Visualisierung der Fähigkeit von SL klare Lösungen mit steigenden Masseanteilen an C₁₂-PL (a), DLPC (b), DMPC (c) und DPPC (d) zu bilden; c = 1% (a-c) und 5% (d)

Es könnte ein ungünstiges Verhältnis von DPPC/SL vorgelegen haben, welches eine Assoziation zu MM verhinderte oder eine Agglomeratbildung begünstigte. Allerdings wurde dieses System als Ausnahme betrachtet und nicht weiter analysiert, da ein Ziel dieser Arbeit ist, ein klares MM-System mit möglichst hohem Anteil an PL zu entwickeln und zu charakterisieren.

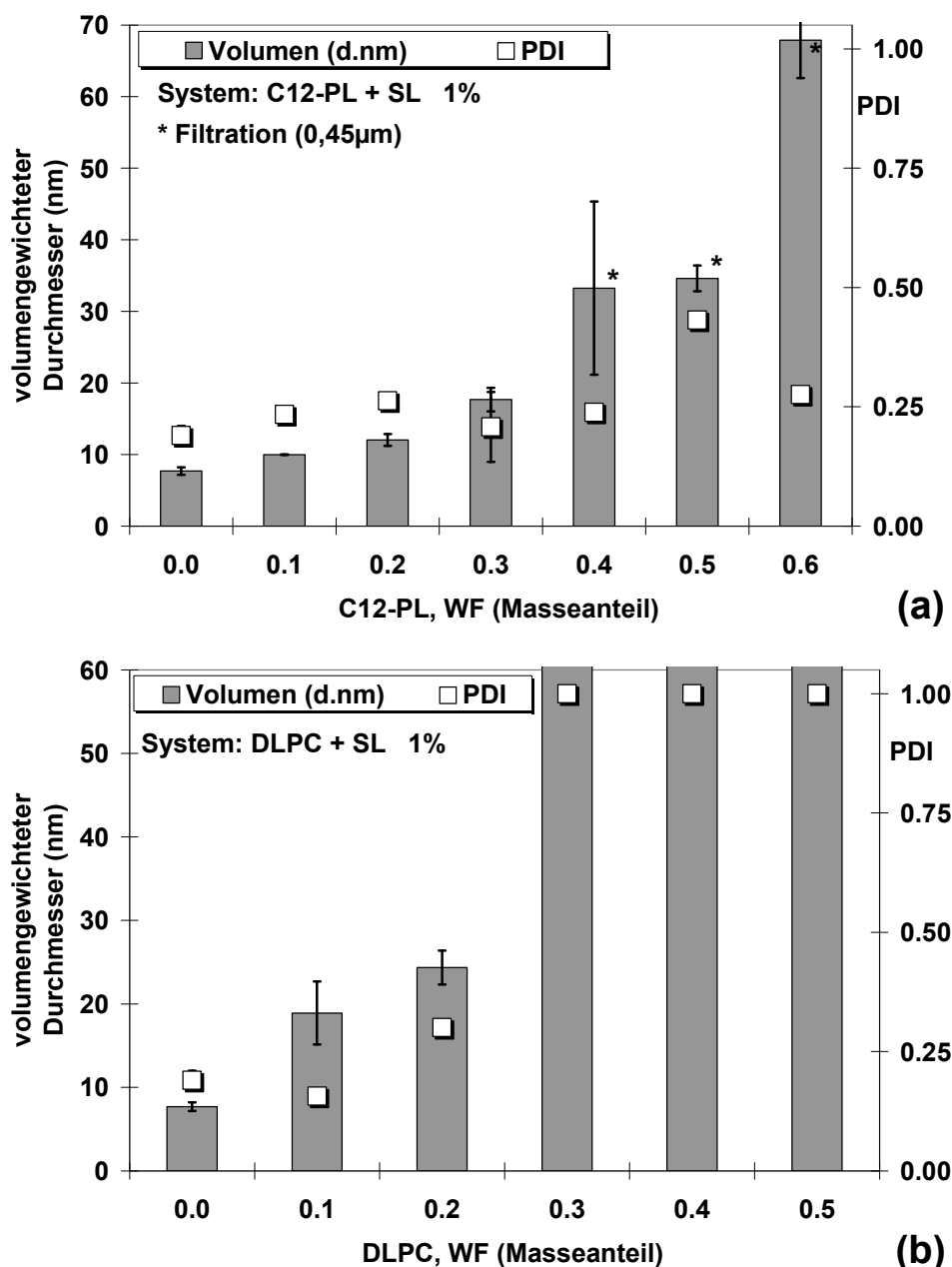


Abbildung 5.44: DLS-Messergebnisse: Hydrodynamischer Durchmesser der gefundenen Teilchen und PDI-Werte in Systemen aus SL und ansteigenden Masseanteilen an C₁₂-PL (a) bzw. DLPC (b); c = 1%

In dem gleichen System (DPPC+SL $WF_{DPPC}0.3$) kam es bei einer geringeren Konzentration von 1% nicht zu einer Trübung der entsprechenden Lösungen. Das Phospholipid-Gemisch C_{12} -PL bildete bis zu einem $WF_{PL}0.3$ klare Systeme mit SL, die einen Partikeldurchmesser von 10–20 nm ($WF_{PL}0.1-0.3$) bei einem relativ geringem PDI von ca. 0.25 aufwiesen (Abbildung 5.44a). Aufgrund der geringen Partikelgröße könnte es sich bei den gefundenen Teilchen um MM handeln. Bei höheren Anteilen an C_{12} -PL kam es zu einer Verdopplung des hydrodynamischen Durchmessers der gefundenen Partikel und zu einer Verschlechterung der PDI-Werte, obwohl die Proben filtriert (0,45 μ m) wurden. DLPC als PC-Derivat mit ausschließlich C_{12} -Fettsäureresten versagte in der Fähigkeit, klare Lösungen mit SL zu bilden (Abbildung 5.42) und folglich ergaben die DLS-Messungen, dass es bei höheren Anteilen an DLPC nicht zur Ausbildung eines monomodal verteilten MM-Systems kam (Abbildung 5.44b). Bereits die Zugabe von 0.1 Masseanteilen an DLPC führte zu einer Verdopplung des mizellaren Durchmessers auf etwa 20 nm. Wurde der Anteil an DLPC in den Systemen erhöht, resultierte dies zum einen in einem Anstieg der gefundenen Partikelgröße, zum anderen in einer Verschlechterung der PDI-Werte auf 1.0, so dass die Aussagekraft der DLS-Messungen an Systemen mit hohen DLPC-Anteilen an Gewicht verliert.

Im Gegensatz dazu war das etwas längerkettige DPPC sehr gut in der Lage, isotrope klare Lösungen mit SL zu bilden (Abbildung 5.42), wobei die hier mittels DLS gefundenen Partikelgrößen einheitlich zwischen 12 und 18 nm lagen (Abbildung 5.45b). Bei einem $WF_{DPPC}0.1-0.2$ und $WF_{DPPC}0.5-0.6$ waren die MM 12-16 nm groß. Lediglich bei einem $WF_{DPPC}0.3$ und $WF_{DPPC}0.4$ kam es zur Ausbildung größerer MM mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 17-20 nm. Aufgrund der gefundenen PDI-Werte, die kleiner als 0.2 waren, handelt es sich voraussichtlich um monomodal verteilte Systeme. Der Anteil an DPPC hat hierbei kaum einen Einfluss auf die gefundene Partikelgröße oder den PDI-Wert.

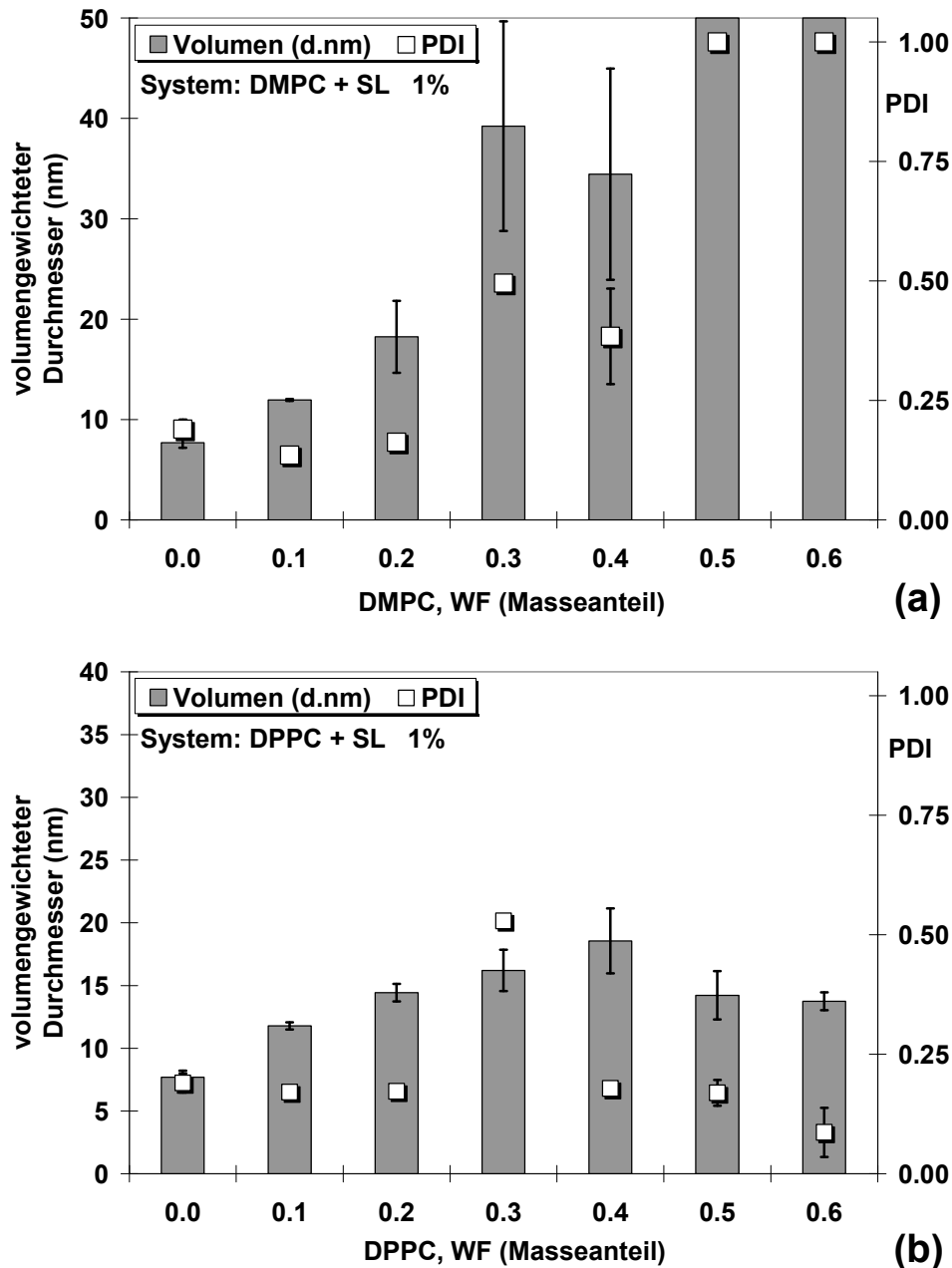


Abbildung 5.45: DLS-Messergebnisse: Hydrodynamischer Durchmesser von Partikeln und PDI-Werte in Systemen aus SL und ansteigenden Masseanteilen an DMPC (a) bzw. DPPC (b); $c = 1\%$

Lediglich das System DPPC+SL $WF_{DPPC}0.3$ zeigte einen erhöhten PDI-Wert, was erklärt, warum solche Systeme bei höheren Konzentrationen trüb erschienen (Abbildung 5.43d). In diesem System lag eine breite Partikelgrößenverteilung vor, was sich in einem PDI-Wert von 0.5 widerspiegelt. Das hier vorliegende Verhältnis von DPPC zu SL stellte

als eine ungünstige Kombination der beiden amphiphilen Substanzen heraus. Möglicherweise scheint hier neben einer MM-Bildung eine Vesikelbildung einzusetzen, was die breitere Verteilung erklären könnte. Interessanterweise liegen die gefundenen hydrodynamischen Durchmesser der Mischmizellen in den Systemen mit hohem Anteil ($WF_{PC}0.5-0.6$) an DPPC bei etwa 15 nm (Abbildung 5.45b). Damit sind diese MM um etwa 5-7 nm kleiner als entsprechende Systeme, die statt DPPC den PC-Typ hPC beeinhalteten (vgl. Kapitel 5.2.2.2). Dieser Größenunterschied der MM lässt sich nicht allein auf die unterschiedliche Kettenlänge der unterschiedlichen PC-Typen zurückführen. Hydriertes Phosphatidylcholin (hPC) besteht neben der Palmitinsäure aus der etwas länger-kettigen Stearinsäure, so dass für entsprechende Mischmizellen theoretisch nur ein Unterschied von etwa 2-3 nm zu erwarten wäre. Allerdings handelt es sich bei mischmizellaren Systemen um komplexer zusammengesetzte Assoziate. Daher lässt sich der gefundene Unterschied in der MM-Größe eher durch ein anderes Packungsverhalten des DPPC in den MM interpretieren.

Auch bei höheren Gesamtkonzentrationen bildet das System DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ mit 50% Masseanteil DPPC klare isotrope Lösungen, die eine geringere Abnahme der Transmission zeigen als das System aus hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ (Abbildung 5.46). Im Vergleich zu den optimierten, klassischen Gallensalz/Lecithin-MM aus uPC+CS $WF0.5$ zeigt das System DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ keinen Nachteil bezüglich der Fähigkeit, klare Lösungen zu generieren. Abbildung 5.47 zeigt die Fähigkeit des Systems, DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ auch bei höherer Konzentration klare Lösungen mit SL zu bilden.

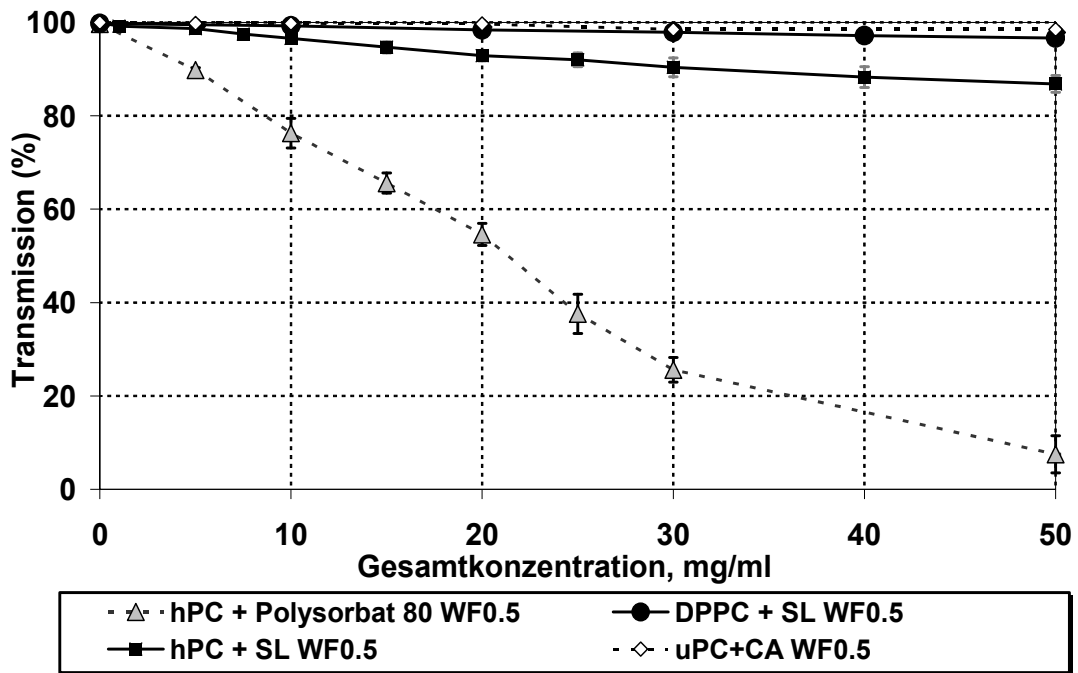


Abbildung 5.46: Fähigkeit des MM-Systems DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$, im Vergleich zu anderen MM-Systemen klare Lösungen bei höheren Gesamtkonzentrationen zu bilden

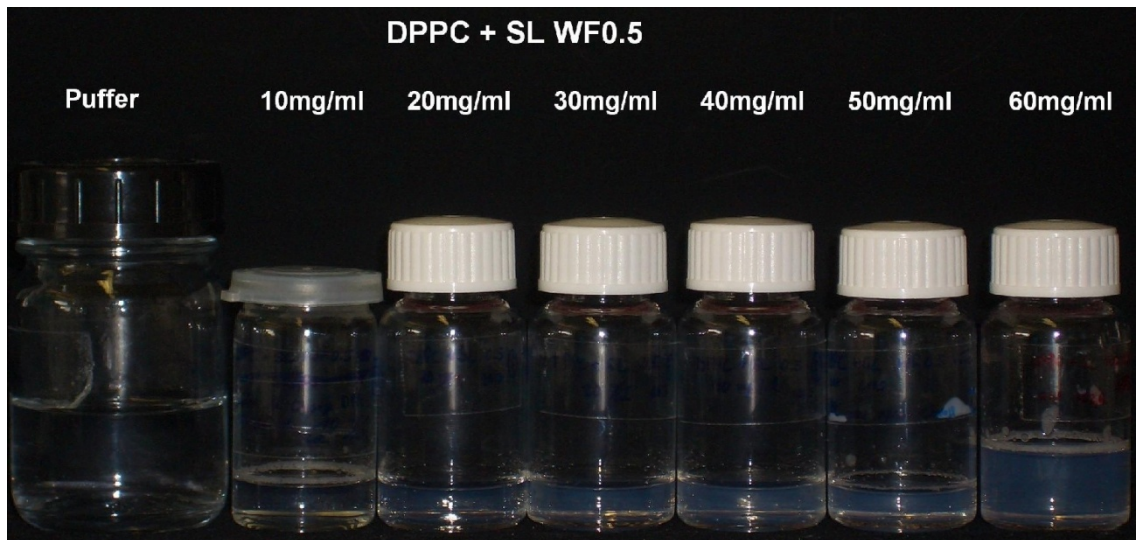


Abbildung 5.47: Visualisierung der Fähigkeit des MM-Systems DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$, klare Lösungen bei höheren Gesamtkonzentrationen zu bilden

Nachdem gefunden wurde, dass DPPC sehr gut geeignet ist, klare Lösungen mit SL zu bilden, wurde versucht weitere Sucroseester mit

DPPC zu kombinieren. Jedoch resultierte die Kombination von DPPC mit den längerkettigen Sucroseestern SM bzw. SP, wie bei hPC, nicht in der Ausbildung einer klaren Lösung. In Analogie zu den Erkenntnissen aus hPC+SM- bzw. hPC+SP-Systemen kam es bereits bei Gegenwart von 0.1 Masseanteilen an DPPC zu einer Phasentrennung, die eine Trübung des Systems hervorriefen (vgl. Abbildung 5.48 und Abbildung 5.49).

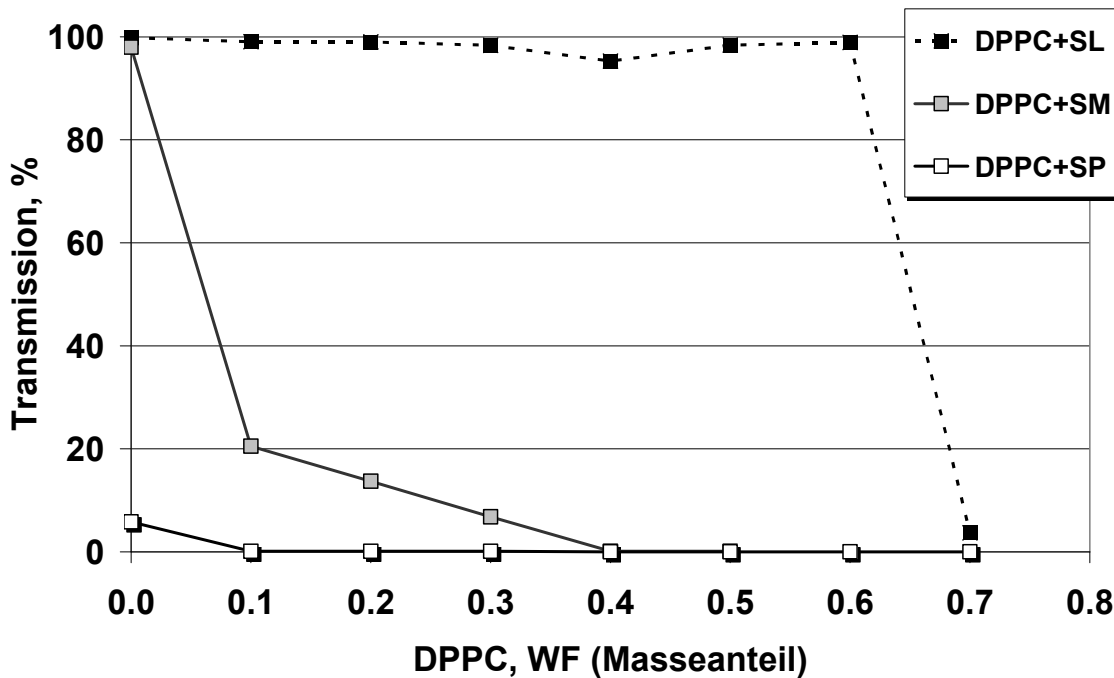


Abbildung 5.48: Fähigkeit von Sucroseestern mit steigendem Masseanteilen an DPPC klare Lösungen mit SL zu bilden; $c = 1\%$ (Gesamtkonzentration)

Aus diesen Erkenntnissen kann gefolgert werden, dass auch in Systemen mit dem im Vergleich zum hPC kürzerkettigen DPPC in der Kombination mit SE eine kritische Fettsäurekettenlänge existiert. Es lassen sich nur die kurzkettigen Sucroselaurat-Moleküle mit DPPC-Molekülen zu mischmizellaren Systemen kombinieren. Sobald die Kettenlänge der Fettsäuren der Sucroseester 12 C-Atome übersteigt, ist eine Kombination mit DPPC zu MM nicht mehr möglich. Es kommt zu einer Phasentrennung, da die wasserunlöslichen DPPC-Moleküle von den längerkettigen SE-Molekülen nicht in Form von MM in einer klaren Lösung gehalten werden können (vgl. Abbildung 5.48 und Abbildung 5.49).

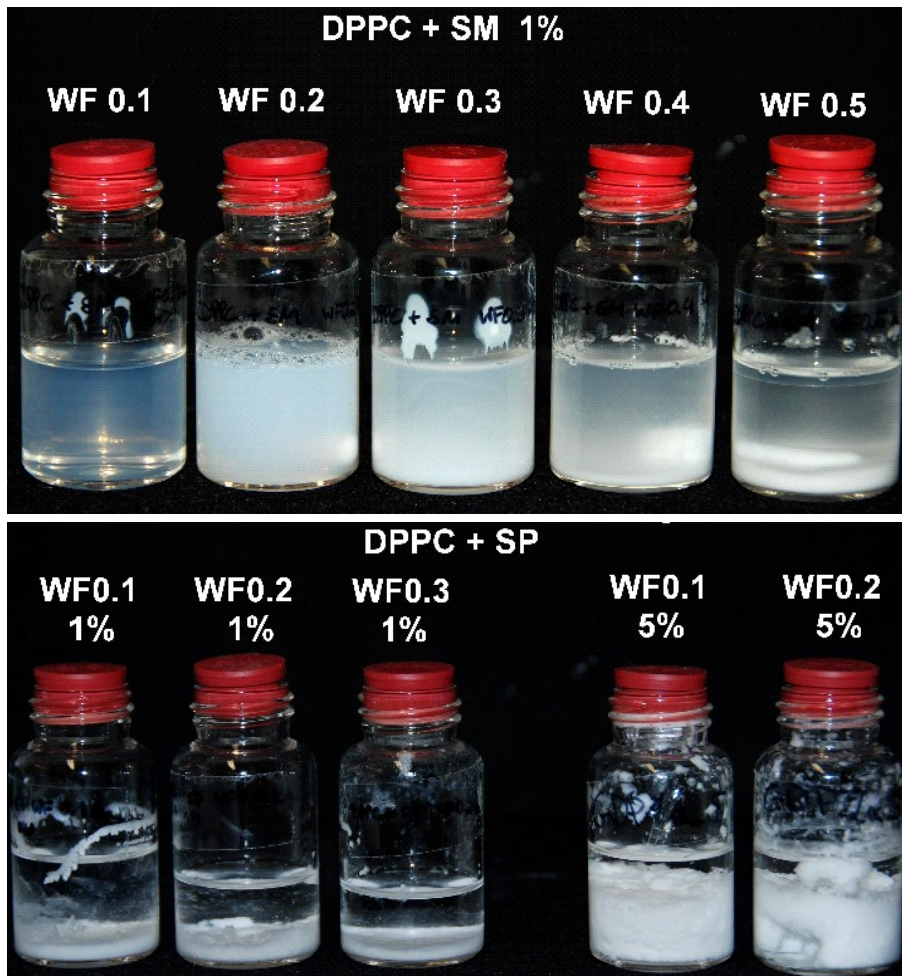


Abbildung 5.49: Visulaisierung der Fähigkeit von Sucroseestern mit steigendem Masseanteilen an DPPC klare Lösungen mit SL zu bilden; $c = 1\%$

Interessanterweise verhindert die nur um zwei Methylengruppen längere Myristinsäure im SM-Molekül (im Vergleich zu der Laurinsäure im SL-Molekül) bereits die Ausbildung einer klaren MM-Lösung nach Kombination mit hPC oder DPPC. Diese Erkenntnis wurde an drei unterschiedlichen Chargen des Systems hPC bzw. DPPC+SM $WF_{PC}0.5$ bestätigt.

5.4.2 Vergleich von unterschiedlichen PL-Typen mit Einfluss von ungesättigten Fettsäuren auf eine MM-Bildung mit SL

Die Abbildung 5.50 zeigt die Fähigkeit verschiedener ungesättigter Phospholipide, im Vergleich zu hPC klare Lösungen mit SL zu bilden.

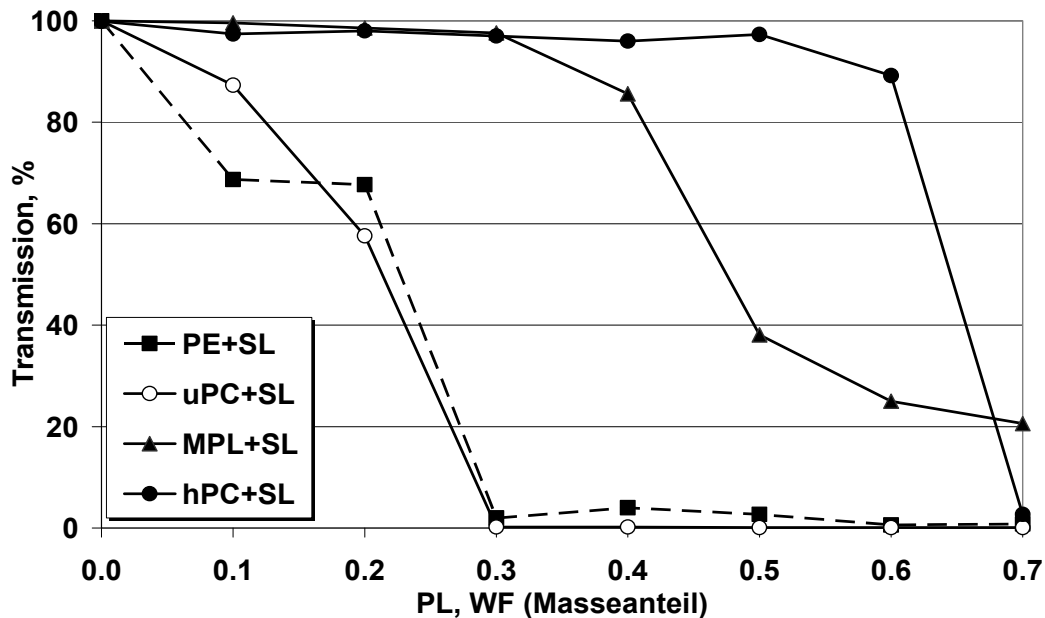


Abbildung 5.50: Fähigkeit von unterschiedlichen ungesättigten und gesättigten Phospholipiden bei steigendem Masseanteil, klare Lösungen mit SL zu bilden; $c = 1\%$; $n = 3$

Phosphatidylethanolamin (PE) war nicht in der Lage klare Lösungen mit SL zu bilden und zwar unabhängig vom Anteil an PE. Dies kann durch den weniger polaren und kleineren Kopf des PE (Suzanne und Sol M., 1997) im Vergleich zu Phosphatidylcholin begründet werden. PE und PC unterscheiden sich im Aufbau der polaren Kopfgruppe. Die drei Methylgruppen am Stickstoff des PC sind bei PE durch je ein Wasserstoffmolekül ersetzt, wodurch der Durchmesser der hydrophilen Kopfgruppe des PE so stark verkleinert ist, dass keine konische, sondern eine invers-konische Molekülgeometrie angenommen wird (Kumar, 1991; Suzanne und Sol M., 1997; Murzyn et al., 2005). Aufgrund dieses Unterschiedes weist PC einen $PP < 1$ und PE einen $PP > 1$ auf (Kumar, 1991). Die invers-konische (nicht zylindrische Form) des PE muss theoretisch zu einer erschwerten Zusammenlagerung von (dicht-

gepackten) MM führen, da eine Assoziation zu MM nach dem modifizierten PPC nur für konische oder zylindrische Moleküle möglich ist. Dies konnte durch die experimentell gefundenen Ergebnisse bestätigt werden. Die Anwendung des PPC erlaubt ebenso eine Interpretation des unterschiedlichen Solubilisierungsvermögens von SL für die ungesättigten PL uPC (ungesättigtes Phosphatidylcholin) und MPL (Milch-Phospholipide; Zusammensetzung siehe 3.1.2) im Vergleich zu hPC. Die ungesättigten Fettsäuren der verschiedenen PL in MPL und des uPC bedingen ein sterisches Abknicken und damit ein erhöhtes lipophiles Volumen v , welches den Packungsparameter erhöht. Dadurch ist die Packung mit SL zu Mischmizellen in den ungesättigten System erschwert, was experimentell wiedergefunden wurde (Abbildung 5.50). Die gesättigten längerkettigen PC-Typen DPPC (Abbildung 5.42) oder hPC (Abbildung 5.50) vermochten auch bei höheren Masseanteilen klare Lösungen mit SL zu bilden, wohingegen ungesättigte PL bereits in geringen Anteilen zu einer deutlichen Abnahme der Transmission führten (Abbildung 5.50). Die verwendeten Milch-Phospholipide (MPL) zeigten ein verbessertes Solubilisierungsverhalten als uPC. SL war in der Lage etwa 0.3-0.4 Masseanteile an MPL in einer klaren Lösung zu solubilisieren, wohingegen es nur etwa 0.05 Masseanteile für hPC waren (Abbildung 5.50). Eine Begründung erschließt sich aus der unterschiedlichen Zusammensetzung der PL-Typen. So findet sich im MPL mit 50% zum einen ein geringerer Anteil an ungesättigten Fettsäuren, zum anderen enthalten die MPL neben Phosphatidylcholin auch Sphingomyelin, PE, Phosphatidylinositol und -serin. Die Kombination dieses PL-Gemisches ermöglichte ein verbessertes Assoziationsverhalten, da höhere Anteile an MPL in einer relativ klaren Lösung gehalten wurden. Die Abbildung 5.51 visualisiert das Vermögen der MPL (a) bzw. des uPC (b) klare Lösungen mit SL bei einer Gesamtkonzentration von 1% zu bilden.

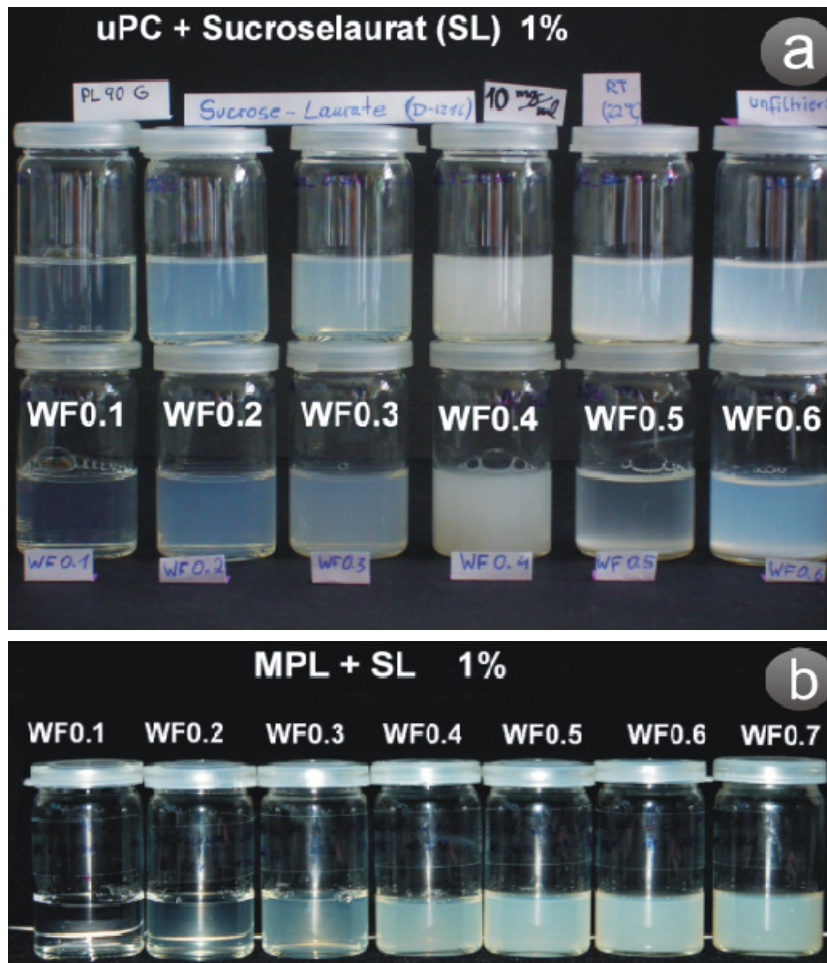


Abbildung 5.51: Visualisierung der Fähigkeit von SL klare Lösungen mit steigenden Masseanteilen an ungesättigten PL zu bilden; uPC (a) und MPL (b) bei $c = 1\%$

Ungesättigte PL wie uPC waren nicht in der Lage, mischmizellare Systeme mit SL zu bilden, wie es neben den Transmissionsmessungen auch die Ergebnisse der DLS-Messungen belegen konnten (Abbildung 5.52). Es konnten gerade 0.1 Masseanteile an uPC in einer relativ klaren Lösung von SL gehalten werden, wobei die gefundene Partikelgröße etwa 25 nm betrug. Höhere Masseanteile an uPC resultierten in einem drastischen Anstieg der Partikelgröße, da nur noch uPC-Agglomerate detektiert wurden (Abbildung 5.52). Wie bereits beschrieben (vgl. Kapitel 2.2.2 und 5.1.1), steht diese Erkenntnis in Kontrast zu den klassischen Gallensalz/Lecithin-MM, die ausschließlich mit ungesättigtem PC klare MM-Lösungen ausbilden.

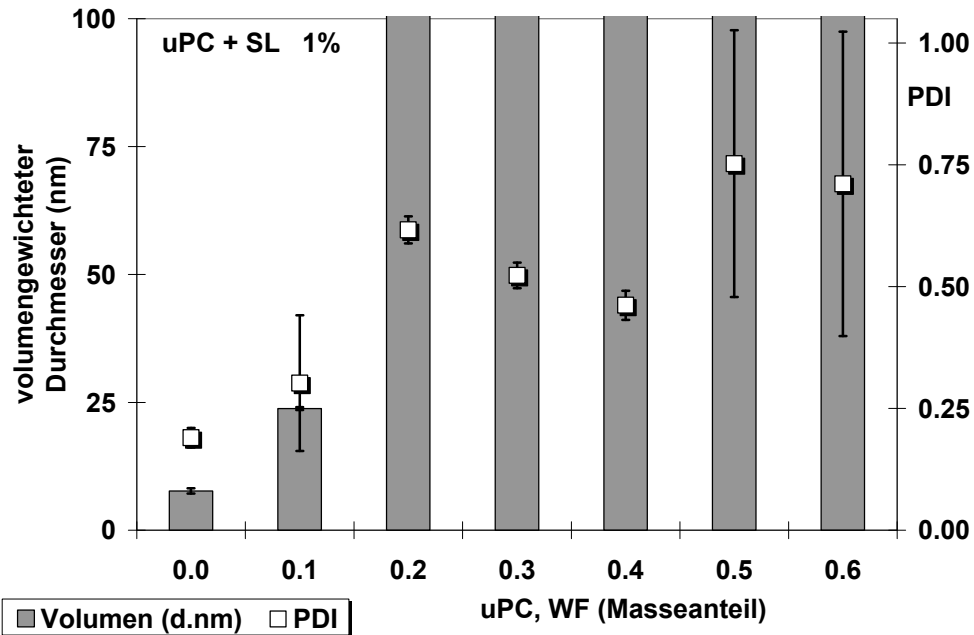


Abbildung 5.52: DLS-Messergebnisse: Hydrodynamischer Durchmesser von Partikeln und PDI-Werte in Systemen aus SL und ansteigenden Masseanteilen an uPC; $c = 1\%$; $n = 3$

5.4.3 Einfluss von PEGylierten PL auf die MM-Bildung mit SL

Das PEGylierte PL-Derivat DSPE-PEG (PEG-PE) stellt das einzige untersuchte Phospholipid dar, welches selbst eine adäquate Wasserlöslichkeit besitzt. Eine Kombination mit SL resultierte unabhängig vom verwendeten Masseanteil in der Ausbildung einer klaren Lösung (Abbildung 5.53 und Abbildung 5.54), wobei es in keinem untersuchten System zu einer Abnahme der Transmission kam (Abbildung 5.53). Die Abbildung 5.53 vergleicht das Solubilisierungsvermögen von SL für die in dieser Arbeit für am geeignetsten befundenen gesättigten Phospholipide und uPC. Es lässt sich folgende Reihe aufstellen, in der die Fähigkeit von SL zur Ausbildung klarer Lösungen mit hohen Anteilen an PL von links nach rechts abnimmt: DSPE-PEG > DPPC > hPC >> uPC.

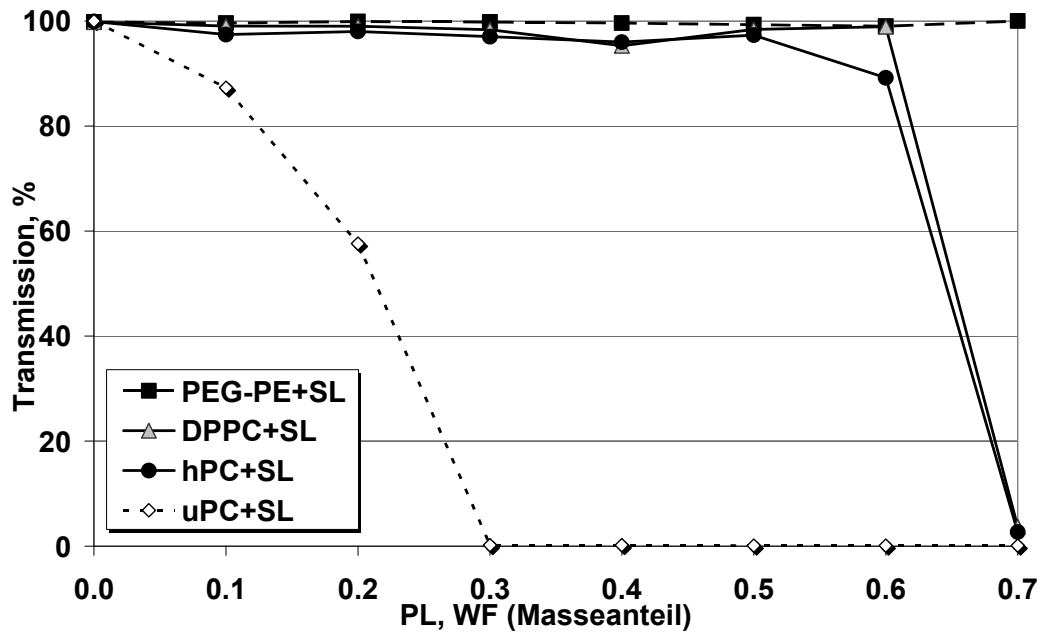


Abbildung 5.53: Fähigkeit der am besten geeigneten gesättigten PC-Typen im Vergleich zu uPC klare Lösungen mit SL zu bilden unter Berücksichtigung PEGylierter PL; $c = 1\%$; $n = 3$

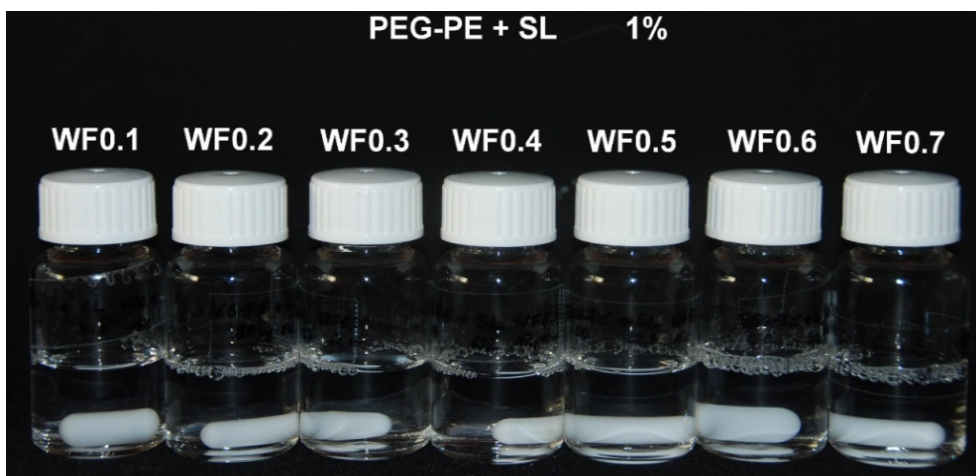


Abbildung 5.54: Visualisierung der Fähigkeit von SL klare Lösungen mit steigenden Masseanteilen an PEGylierten PL zu bilden; bei $c = 1\%$

Die Auswertungen der DLS-Untersuchungen an Systemen aus SL mit steigenden Masseanteilen an DSPE-PEG ergaben, dass sich in jedem Verhältnis mischmizellare Systeme mit einer monomodal verteilten Partikelgröße herstellen ließen (Abbildung 5.55). Mit steigendem Anteil

an DSPE-PEG in den Systemen war ein leichter Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers der Mischmizellen von etwa 9 nm ($WF_{PL}0.1$) auf etwa 12 nm ($WF_{PL}0.7$) verbunden, wobei die PDI-Werte kontinuierlich sanken (Abbildung 5.55).

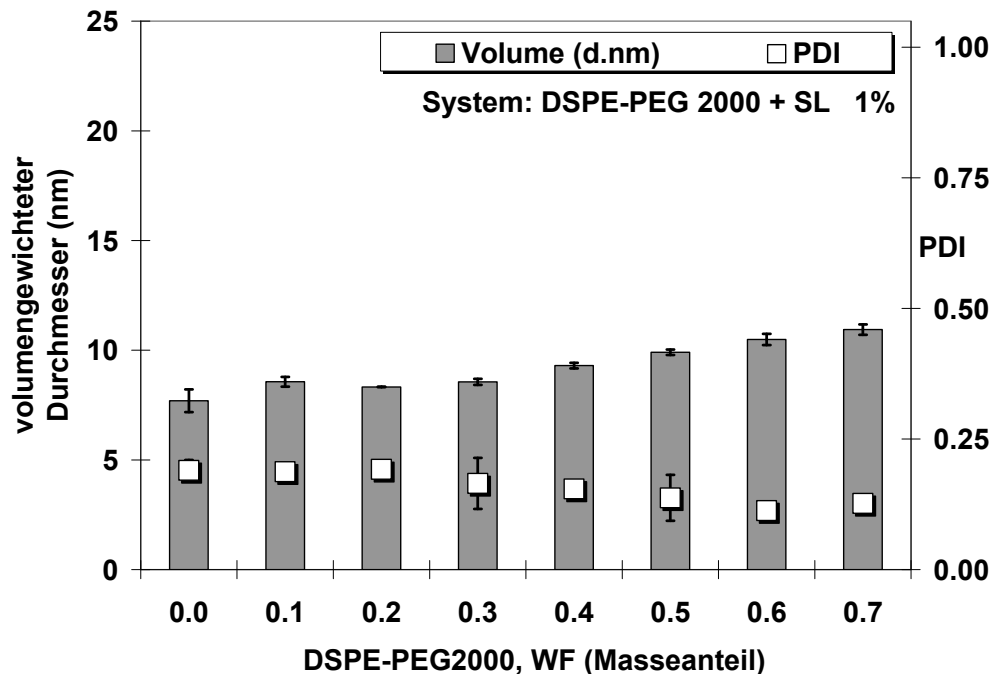


Abbildung 5.55: DLS-Messergebnisse: Hydrodynamischer Durchmesser von MM und PDI-Werte in Systemen aus SL und ansteigenden Masseanteilen an PEGylierten PL; $c = 1\%$; $n = 3$

Auch in diesem Fall lassen sich die Ergebnisse mit dem transferiertem PPC erklären. Durch die PEG-Gruppe am Kopf des PL-Moleküls wird der Packungsparameter des PEG-PE stark verkleinert (im Vergleich zu PE oder PC). Damit erscheinen die PEG-PE-Moleküle selbst nicht mehr in einer zylindrischen (oder sogar invers-konischen) Molekülgeometrie, sondern nehmen eher selbst eine eher konische Form an.

5.5 Zusammenfassung: Struktureinfluss des Tensids bzw. PL auf die Fähigkeit zur Bildung von MM

Im Folgenden sind die wichtigsten Erkenntnisse der bisherigen Untersuchungen zum Struktureinfluss der verwendeten Substanzen auf eine MM-Bildung zum einen in einer graphischen Zusammenfassung (Abbildung 5.56), zum anderen stichpunktartig zusammengefasst, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten. Das Packungsparameterkonzept (PPC) konnte erfolgreich auf die Kombination zweier unterschiedlicher amphiphiler Moleküle angewendet werden, um eine MM-Bildung mit wasserunlöslichen PL zu forcieren und zu erklären.

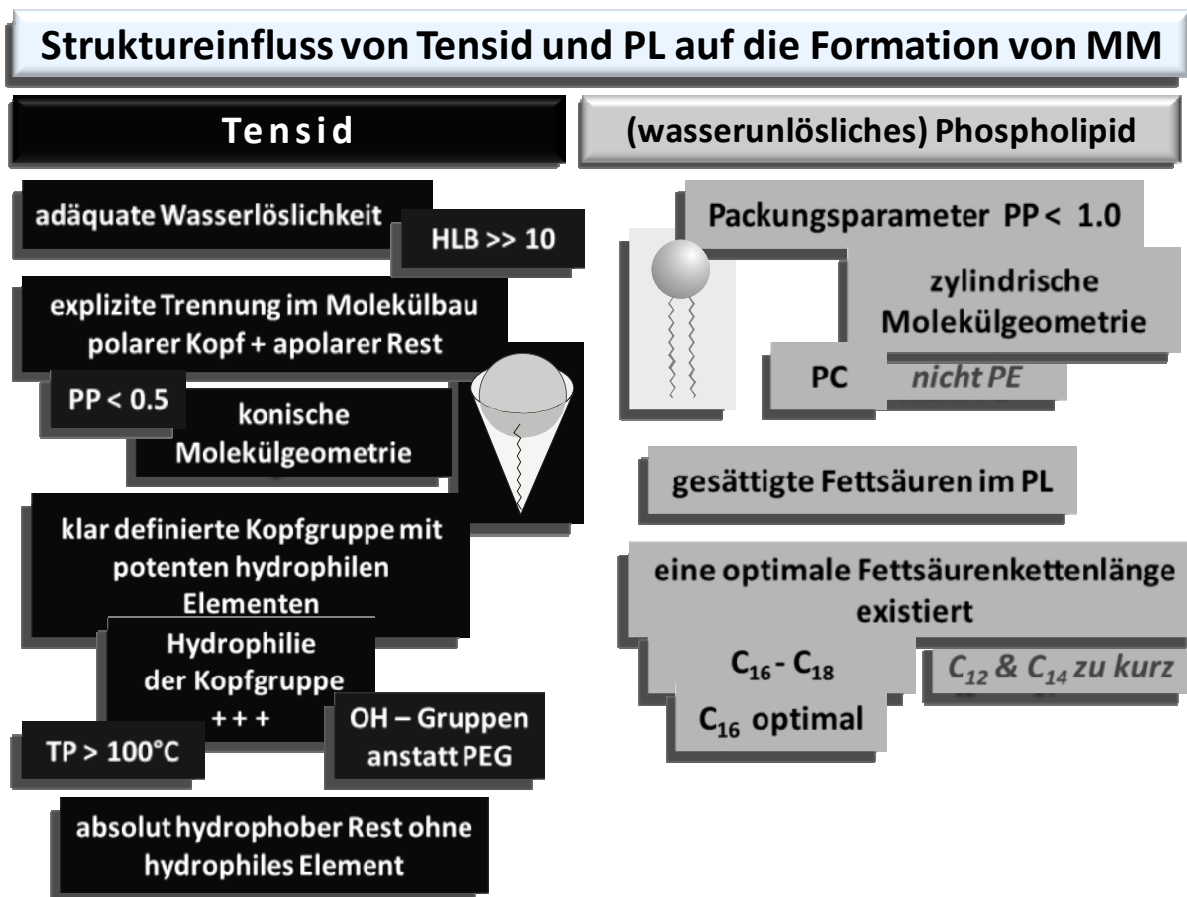


Abbildung 5.56: Darstellung der wesentlichen Erkenntnisse über den Struktureinfluss der untersuchten Tenside und Phospholipide auf eine optimierte MM-Bildung

- Gallensalz/Lecithin-MM: konzentrationsabhängige Umwandlung von 5 nm-kleinen MM zu ca. 75 nm-großen MM in 1:5-verdünnten System. Experimentell konnte hier einer der in der Literatur beschriebenen

Nachteile der klassischen MM-Systeme bestätigt werden. PPC nicht anwendbar, da diese Tenside eine nicht-konische, sondern steroidale Molekülgeometrie aufweisen – eine MM-Bildung mit gesättigten PC-Typen ist unmöglich.


- Das Blockcopolymer Poloxamer 188 zeigt keine konische Molekülgeometrie mit einer klar definierten Separation von polarem und apolarem Molekülteil; zwar weist es einen sehr hohen HLB auf, jedoch kam es in keinem Verhältnis mit hPC zu einer Ausbildung von MM oder klaren Lösungen.
- Solutol HS15 bildete in keinem Verhältnis mit hPC oder uPC klare Lösungen oder MM da es keine strikte Trennung im Molekülbau aufweist. Die 12-Hydroxystearinsäure als lipophiler Rest trägt mit der Hydroxylgruppe ein hydrophiles Element, welches die strikte Trennung in der Polarität aufhebt und eine explizit konische Molekülgeometrie verhindert. Die Hydroxylgruppe verhindert eine Packung mit den Fettsäureresten des PL zu MM, da es die Wechselwirkung über Van-der-Waals-Kräfte behindert.
- Polysorbate: PEG als Kopfgruppe weist eine zu geringe Hydrophilie auf. Ferner sind die drei PEG-Ketten eher diffus über einen weiten Bereich des Moleküls lokalisiert, so dass keine klar definierte konische Geometrie vorliegt. Es wurden weder klare isotrope Lösungen mit hPC bei höheren Gesamtkonzentrationen, noch streng monomodal-verteilte MM-Systeme gebildet.
- Die hydrophilen kurzkettigen Vertreter der SE und PGE dagegen ermöglichen aufgrund der hohen Hydrophilie der Kopfgruppe eine MM-Bildung mit hPC, die in der Ausbildung klarer Lösungen resultiert. Mehrere OH-Gruppen und kürzere Fettsäuren bedingen ein geringes lipophiles Volumen, wie es nach dem transferierten PPC gefordert wird, um MM mit PL bilden zu können. Durch das geringe lipophile Volumen wird eine optimale Packung mit den lipophilen Resten des PL zu MM ermöglicht.
- Das Ausmaß der Hydrophilie bestimmt die Fähigkeit der Tenside MM mit PL bilden zu können. Diese Hypothese konnte durch Trübungspunktmessungen bestärkt werden.

- SL erwies sich als favorisiertes Tensid, da es auch mit höheren Masseanteilen an hPC noch klare mischmizellare Lösungen bei hohen Gesamtkonzentrationen ausbildet. Eine Konzentrationsänderung in diesen Systemen führte nicht zu einer Umwandlung oder einer Änderung in der gefundenen Partikelgröße, was eine konzentrationsabhängige Vesikelbildung ausschließt.
- In den Systemen mit SL und hPC bzw. DPPC wurden MM von 20 ± 2 nm bzw. 14 ± 2 nm gefunden, die streng monomodale Partikelgrößenverteilungen mit einem PDI < 0.1 aufwiesen.
- Die CMC in diesen favorisierten MM-Systemen liegt unterhalb der CMC der klassischen Gallensalz/Lecithin-MM, was die Stabilität der neu entwickelten MM gegenüber Verdünnungen erhöht.

Eine MM-Bildung wird sowohl durch die Molekülgeometrie der Tensidmoleküle als auch durch den strukturellen Aufbau des verwendeten PL-Typs bestimmt. Die Molekülgeometrie, die Polarität der Kopfgruppe und die Art des hydrophoben Restes der eingesetzten amphiphilen Substanzen nehmen entscheidenden Einfluss auf die MM-Bildung. Das verwendete wasserunlösliche PL muss selbst zumindest eine zylindrische, Form aufweisen. Dies ist durch einen PP < 1 gewährleistet. Phosphatidylethanolamin (PE) mit einem PP > 1 (invers-konisch) war nicht in der Lage MM mit SL zu bilden. Sobald die Kopfgruppe eine sehr große hydrophile Querschnittsfläche aufweist, wird eine konische Form erzwungen, die sowohl die Fähigkeit zur MM-Bildung, als auch die Wasserlöslichkeit erhöht. Gezeigt werden konnte dieser Zusammenhang am Beispiel des verwendeten PEGylierten PL (DSPE-PEG). Besondere Bedeutung hat der Aufbau der Fettsäurereste des PL-Moleküls. Während kürzere Fettsäurereste wie in DLPC oder DMPC eine Assoziation mit SL zu klaren MM-Systemen verhindern, erwiesen sich längere Fettsäuren in den PL-Molekülen als sehr vielversprechend, was die Bildung von MM mit SL betrifft. Hierbei ist DPPC besser geeignet als hPC. Diese Erkenntnis belegt, dass eine kritische Fettsäurekettenlänge existiert, die eine optimale MM-Bildung mit SL ermöglicht. Wahrscheinlich bedingen die Palmitinsäurereste des DPPC eine optimale Packung mit den Laurinsäureresten des SL, so dass

es in diesen Systemen zu einer optimalen Stabilisierung der hydrophoben Bereiche der MM über Van-der-Waals-Kräfte kommt. Tabelle 5.4 zeigt die verwendeten PL-Typen nach ihrer Fähigkeit mit aliphatischen Tensiden klare MM-Lösungen zu bilden.

Tabelle 5.4: Eignung der untersuchten Phospholipide zur MM-Bildung; der Pfeil zeigt die abnehmende Fähigkeit der PL klare MM-Lösungen mit SL zu bilden

	Nr.	PL-Typ	Klare Lösung mit SL bis WF_{PL}
	1.	DSPE-PEG 2000	> 0.7
	2.	DPPC	0.6-0.7
	3.	hPC	0.6
	4.	C ₁₂ -PL (PL-Gemisch)	0.4-0.5
	5.	MPL	0.3-0.4
	6.	DMPC	0.3-0.4
	7.	DLPC	0.3
	8.	uPC	ca. 0.05
	9.	PE	< 0.05

6 Solubilisierung von wasserunlöslichen Wirkstoffen

6.1 Einleitung

Die maximale Konzentration eines Arzneistoffes, die sich in ein bestimmtes wässriges, Tensid-haltiges System unter Erhalt einer isotropen Phase bei einer bestimmten Temperatur inkorporieren lässt, wird Solubilisierungskapazität genannt. Damit entspricht die Solubilisierungskapazität einer gegebenen Tensidlösung der Sättigungskonzentration des Arzneistoffes (Solubilisates) in eben dieser Tensidlösung.

Es sind unterschiedliche Methoden beschrieben worden, die eine Bestimmung der Solubilisierungskapazität eines Tensid-haltigen Systems (wie MM) für einen zu lösenden Feststoff erlauben. Sofern MM mittels der Filmbildungsmethode hergestellt werden, kann der wasserunlösliche Arzneistoff bereits mit dem Lipid zusammen in der organischen LM-Phase gelöst werden, bevor die Filmbildung über Evaporation des LM eingeleitet wird (Mu et al., 2005; Wei et al., 2009). Eine Beladung der mizellaren Systeme über eine Dialyse-Methode stellt eine aufwendige Alternative dar (Kwon und Okano, 1996; Francis et al., 2003; Sezgin et al., 2006). Die einfachste Methode besteht aus der direkten Zugabe eines Überschusses an schlecht wasserlöslichem Arzneistoff zu der entsprechenden Tensidlösung, die daraufhin leicht bewegt wird, so dass sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht einstellt und zwei voneinander getrennte Phasen vorliegen (Rosoff und Serajuddin, 1980; Hammad und Müller, 1998b; Hammad und Müller, 1998c; Sznitowska, 2008). Der Anteil an nicht eingeschlossenem Arzneistoff kann über eine Filtration (Matsuoka et al., 2009) durch einen 0,22 µm Filter (Rosoff und Serajuddin, 1980) bzw. einen 0,45 µm Filter (Danhier et al., 2009; van Hasselt et al., 2009) oder Zentrifugation (Sawant et al., 2008; Sznitowska, 2008) von der Lösung abgetrennt werden. Aus dem Überstand bzw. dem Filtrat wird über eine entsprechende HPLC-Analytik der solubilierte Anteil an Arzneistoff bestimmt. Eine geeignete Methode

wurde nach Evaluierung kritischer Parameter (vgl. Kapitel 6.2) als Beladungsmethode für die Solubilisierungsversuche dieser Arbeit etabliert und angewandt (Methode, siehe Kapitel 6.2).

6.2 Evaluierung der Beladungsmethode

Verschiedene Tensid-haltige Systeme wie einfache Tensidlösungen, MM oder Dispersionen wurden zuerst über die direkte Dispergierung hergestellt und anschließend, nach Berücksichtigung der Equilibrierungszeit, mit schlecht wasserlöslichem Wirkstoff beladen. Zu evaluierende Parameter dieser Beladungsmethode sind u.a. die Art der Dispergierung des Überschusses an AS, wobei aktive Dispergierung von passiver Dispergierung zu unterscheiden ist. Hierbei wurde untersucht, wie sich eine passive Bewegung der beladenen Lösung im temperierten Schüttelbad von der aktiven Dispergierung der Lösung mittels Rührfisch in Kombination mit einem thermostatisierten Magnetrührer unterscheidet. Unabhängig von der Temperatur führte die passive Dispergierung im Schüttelbad zu einer erhöhten Einschlusseffizienz, da auf diese Weise ein etwas höherer Anteil an Arzneistoff von den MM-Lösungen solubilisiert werden konnte (Abbildung 6.1a). Möglicherweise führen die durch den Rührfisch verursachten Scherkräfte während der Beladung zu einer geringeren Beladungskapazität, da sich das System infolge der mechanischen Beanspruchung nicht optimal equilibrieren kann. Ebenso beeinflusste sowohl die Temperatur bei der Beladung, als auch die Dauer der Equilibrierungszeit (EQZ) nach Beladung die Solubilisierungskapazität der untersuchten mizellaren oder mischmizellaren Systeme für Diazepam (Abbildung 6.1b und d). Bei erhöhter Temperatur während der Beladung konnte mehr Diazepam eingeschlossen werden. Eine Stand- bzw. Wartezeit von vier Stunden nach Beladung (und vor der HPLC-Analytik) reichte nicht aus, um ein equilibriertes System zu generieren, da die Solubilisierungskapazität nach 4 Stunden EQZ noch weiter abnahm (Abbildung 6.1b).

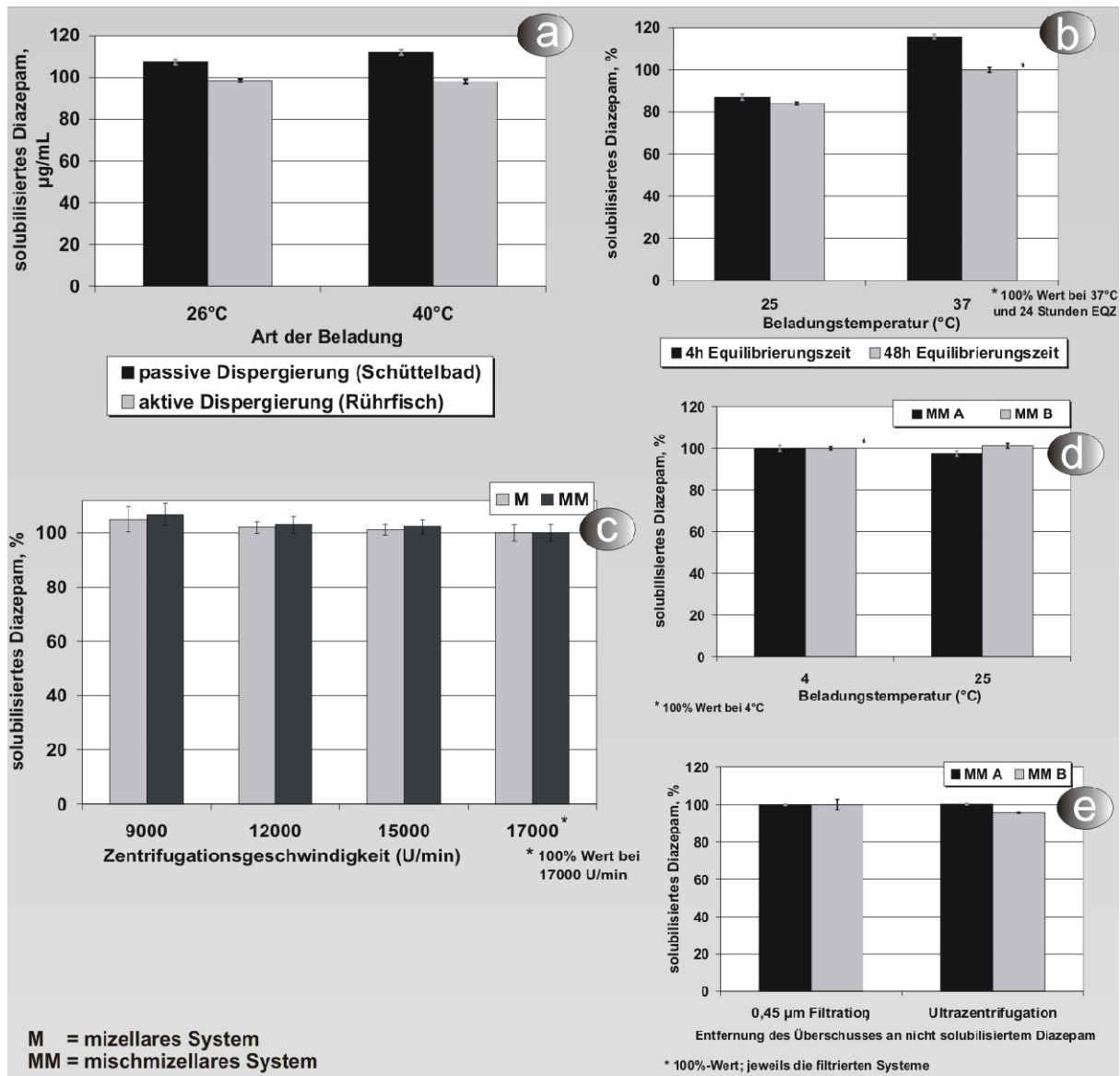


Abbildung 6.1: Evaluierung der Beladungsmethode; Einfluss der Art der AS-Dispergierung, aktiv und passiv (a); Einfluss der Beladungstemperatur und der Equilibrierungszeit (b) und (d); Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit (c) bzw. Filtration (e) zur Entfernung des AS-Überschusses

Interessanterweise konnte nach einer EQZ von 48 Std. mehr Diazepam in den MM solubilisiert werden, wenn die Beladungstemperatur bei 37°C statt bei 25°C lag (Abbildung 6.1b). Eine erhöhte Temperatur von 37°C während der Beladung führt auch nach Abbruch der Beladung und Einhalten einer EQZ von 48 Stunden bei RT noch zu einer erhöhten Solubilisierungskapazität. Es wurde kein Unterschied in der Art und Weise der Abtrennung des überschüssigen Diazepams gefunden.

Sowohl eine Zentrifugation, als auch eine Filtration (0,45 µm) führten im selben MM-System zu einer Wiederfindung von 100% an solubilisiertem Diazepam (Abbildung 6.1e). Die Zentrifugationsgeschwindigkeit sollte bei mindestens 12000 U/min liegen, um eine vollständige Abtrennung des Diazepam-Überschusses zu gewährleisten (Abbildung 6.1c).

Die im Folgenden aufgeführte etablierte Beladungsmethode wurde für sämtliche vorgestellten Systeme angewandt:

Ein Überschuss an wasserunlöslichem Arzneistoff wurde der Untersuchungslösung zugegeben. Diese Dispersion wurde dann über 24-48 Stunden bei 37°C oder 25°C (bei Untersuchungslösungen mit geringem Trübungspunkt) im thermostatisierten Schüttelbad bewegt. Nach dieser Zeit erfolgte eine EQZ von 24 Stunden bei RT, bevor der Überschuss an AS mittels Ultrazentrifugation bei 12000 U/min (für mind. 12 min) abgetrennt wurde. Aus dem Überstand wurden 0,5 ml der klaren Lösung entnommen und mit einem geeigneten LM/Wasser-Gemisch (meist 70T Methanol + 30T Aqua bidest.) verdünnt, um eine entsprechende HPLC-Analytik (siehe Anhang) folgen zu lassen. Das Verdünnen mit dem LM-Gemisch ist zum einen nötig, um die MM zu zerstören; zum anderen löst sich der so freigegebene schlecht-wasserlösliche AS in dem LM-Gemisch.

6.3 Solubilisierung von Diazepam

Die Sucroseester zeigten im Vergleich zu den anderen untersuchten Solubilisierungssystemen eine erhöhte Solubilisierungskapazität für Diazepam, was durch die größere Steigung der linearen Graphen der entsprechenden Systeme angezeigt ist (Abbildung 6.2). Jedes der eingesetzten Tenside wurde über einen Konzentrationsbereich von 0,5-5% (5-50 mg/ml) untersucht, wobei jedes der verwendeten Tenside oberhalb seiner CMC eingesetzt wurde. SM war in der Lage mehr Diazepam als SL zu solubilisieren, was durch den längeren hydrophoben Rest (der Myristinsäure(n)) des SM im Vergleich zu der kürzerkettigen Laurinsäure im SL begründet werden kann. Aus dem gleichen Grund konnte Decaglycerolmyristat (M-10D) mehr Diazepam solubilisieren als Decaglycerollaurat (L-7D). Die Solubilisierungskapazitäten der

untersuchten Systeme nahmen wie folgt ab: SM > SL > Polysorbat 80 > M-10D > L-7D > HP- β -CD.

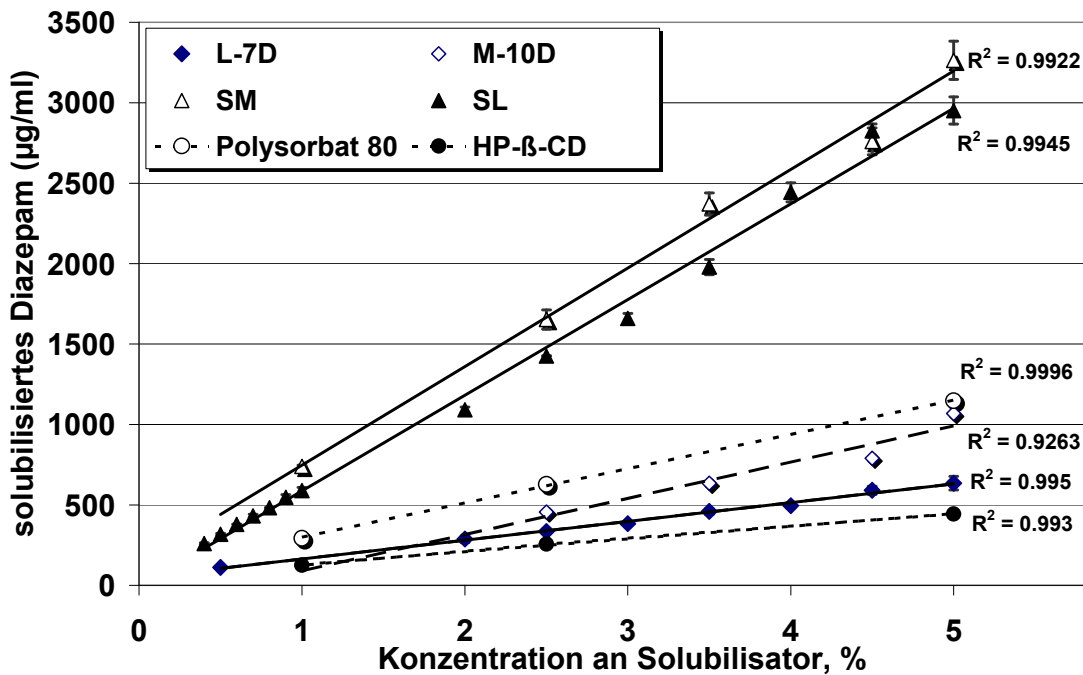


Abbildung 6.2: Solubilisierung von Diazepam durch verschiedene mizellare Systeme und HP- β -CD bei steigenden Solubilisator-Konzentrationen

In vorangegangenen Untersuchungen wurde gefunden, dass SM nur MM mit hPC bildet wenn der Masseanteil an hPC ≤ 0.2 ($WF_{hPC} 0.2$) ist (vgl. Kapitel 5.2). Bei höheren Masseanteilen an hPC konnten keine isotropen klaren Lösungen erhalten werden. Das gleiche wurde für die PGE L-7D und M-10D gefunden, sobald diese mit 0.5-0.6 Masseanteilen an hPC kombiniert wurden. Aus diesem Grund repräsentieren die markierten Balken der Abbildung 6.3 Dispersionen anstatt MM-Systeme.

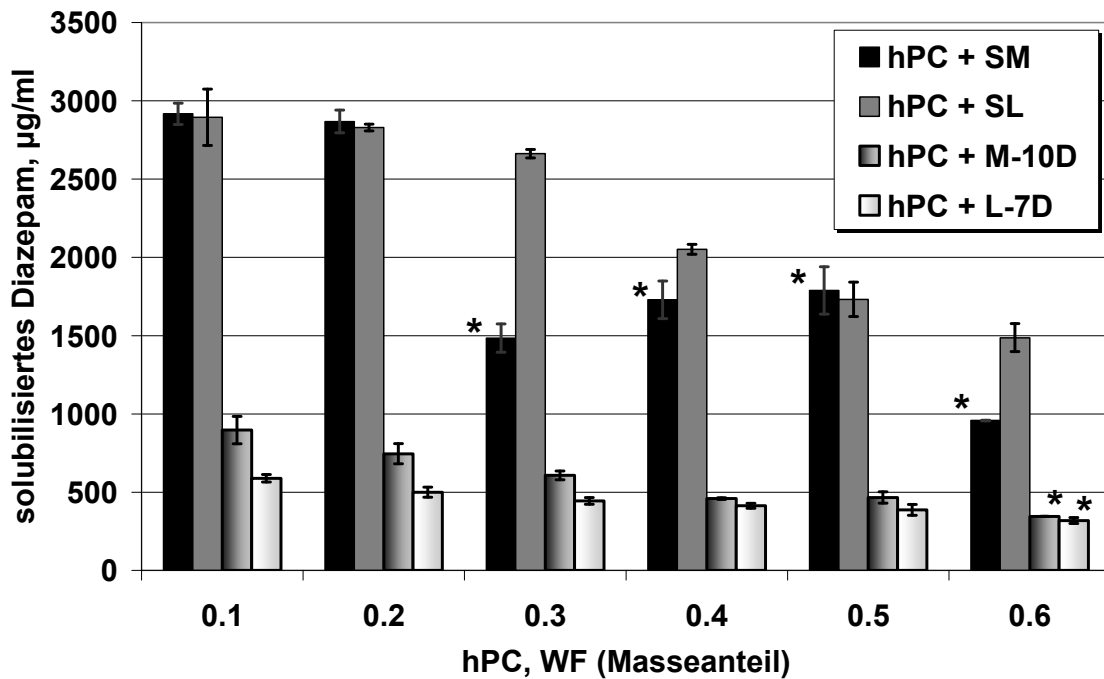


Abbildung 6.3: Solubilisierung von Diazepam durch verschiedene Tensid-haltige Systeme (MM oder Dispersionen *) bei einer Gesamtkonzentration von 5%; $n = 6$

Die Solubilisierungskapazitäten für Diazepam waren für sämtliche Solubilisierungssysteme erhöht oder zumindest gleich wenn M-10D anstelle von L-7D neben hPC eingesetzt wurde. Das lipophilere M-10D führte in Systemen mit geringeren Masseanteilen an hPC zu einer etwas höheren Solubilisierungskapazität. Generell führte eine Kombination von SE und hPC zu einer deutlich erhöhten Solubilisierungskapazität für Diazepam als die Kombination von PGE und hPC, und zwar unabhängig vom eingesetzten WF_{hPC} . Hierbei war die Solubilisierungskapazität für Diazepam bei gleichem hPC-Anteil 4 bis 6-fach erhöht sobald die MM aus SL und hPC anstatt aus PGE (L-7D oder M-10D) und hPC zusammengesetzt waren. Steigende Masseanteile an hPC in MM-Systemen aus hPC und SL hatten eine kontinuierliche Abnahme der Solubilisierungskapazität für Diazepam zur Folge. Dennoch zeigten diese Systeme aus hPC und SL auch bei hohen Anteilen an hPC ($WF_{hPC} 0.5$) eine beachtliche Solubilisierungskapazität für Diazepam. Dispersionen aus SM und hPC (z.B. bei $WF_{hPC} 0.3$)

zeigten im Vergleich zu MM-Systemen eine Abnahme in der Solubilisierungskapazität für Diazepam.

Im Folgenden werden die Solubilisierungskapazitäten der neu entwickelten MM-Systeme aus hPC bzw. DPPC und SL (bei hohem PC-Anteil) mit denen von klassischen Gallensalz/Lecithin-MM und anderen Solubilisierungssystemen verglichen.

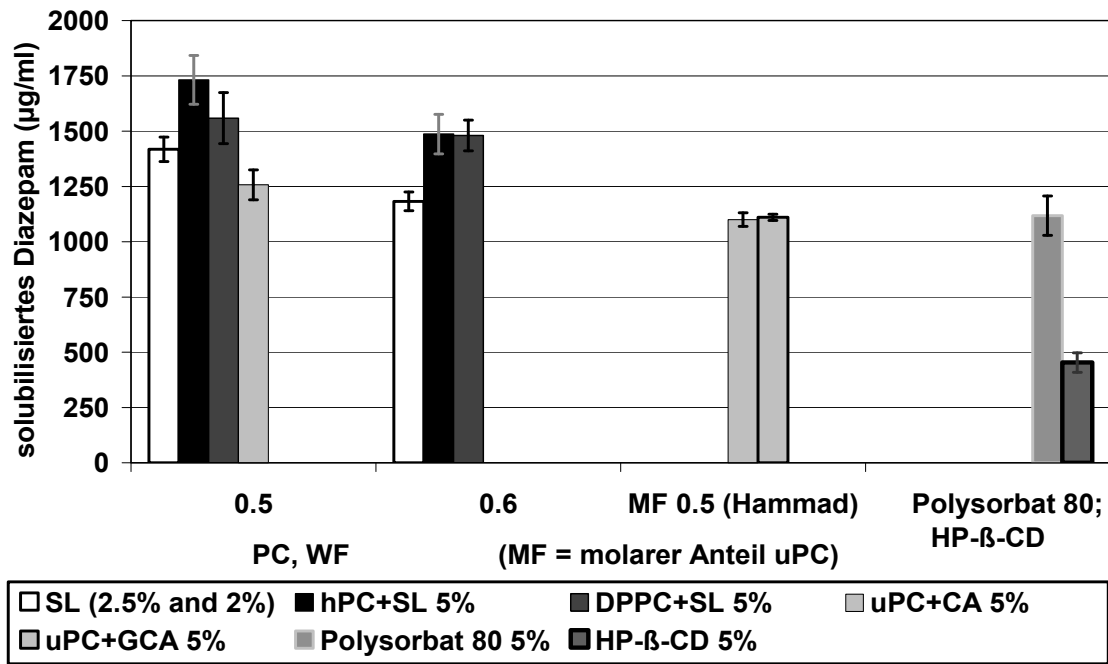


Abbildung 6.4: Solubilisierungskapazitäten von neuartigen MM-Systemen für Diazepam im Vergleich zu klassischen MM-Systemen (je $c = 5\%$) und anderen Solubilisierungssystemen ($c = 2-5\%$); $n = 6$

Bis auf die reinen SL-haltigen Systeme wurden alle in Abbildung 6.4 aufgezeigten Solubilisierungssysteme bei derselben Gesamttensidkonzentration von 5% (50 mg/ml) analysiert. Zum Vergleich wurden die Solubilisierungskapazitäten der allein SL-haltigen Lösungen bei derselben Konzentration ermittelt, wie das SL in den entsprechenden MM-Systemen (hPC/DPPC + SL $WF_{PC}0.5$ bzw. 0.6) eingesetzt wurde. Die klassischen MM-Systeme wurden sowohl mit einem molaren Anteil (MF) an uPC als auch mit einem Masseanteil an uPC von 0.5 hergestellt und analysiert. Als Gallensalze kamen Natriumcholat (CS) sowie

Natriumglycocholat (GCS) zum Einsatz. Die erhaltenen Solubilisierungskapazitäten der klassischen MM-Systeme korrelieren gut mit den in der Literatur (Hammad, 1998) beschriebenen Solubilisierungskapazitäten (vgl. Abbildung 6.4). Im Vergleich zu den klassischen Gallensalz/Lecithin MM-Systemen zeigten die neu entwickelten MM-Systeme mit hPC bzw. DPPC und SL ($WF_{PC}0.5$ or 0.6) eine deutlich erhöhte Solubilisierungskapazität für Diazepam. Der Benefit einer erhöhten Solubilisierungskapazität der neu entwickelten MM-Systeme zeigte sich nicht nur gegenüber den Gallensalz/Lecithin-MM, sondern auch im Vergleich zu den entsprechenden SL-Lösungen bei einer Konzentration von 2% und 2,5%. Damit geht durch die Gegenwart des hPC in MM-Systemen aus SL und hPC/DPPC ein signifikanter Anstieg der Solubilisierungskapazität für Diazepam einher, da dieselben Konzentrationen an SL alleine eine deutlich geringere Menge an Diazepam solubilisierten (vgl. weiße Balken in Abbildung 6.4). Als favorisiertes System solubilisierete das MM-System hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ das 3,5-fache an Diazepam im Vergleich zum Cyclodextrin-Derivat (HP- β -CD) und etwa das 1,5-fache der gleich konzentrierten Polysorbat 80-Lösung oder der klassischen Gallensalz/Lecithin-MM. Die Wasserlöslichkeit von Diazepam beträgt 49 $\mu\text{g/ml}$ (Ashok et al. 2004). Darauf bezogen steigert das MM-System hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ bei $c = 50 \text{ mg/ml}$ die Löslichkeit auf 3500%. Sterisch stabilisierte DSPE-PEG 5000/PC (80:20)-MM mit einer Konzentration von 12 mg/ml steigern die Löslichkeit von Diazepam auf 600% (Ashok et al 2004). Dementsprechend weisen die neu entwickelten MM eine verbesserte Solubilisierungskapazität für Diazepam auf, die auch einem Vergleich mit dem Solubilisierungspotential der PEGylierten-MM standhalten (Ashok et al. 2004).

6.4 Solubilisierung von Tetrazepam

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass SM nur mit geringen Anteilen an hPC klare Lösungen zu bilden vermag. Ähnliches konnte für M-10D gefunden werden. In den folgenden Untersuchungen zur Solubilisierung der Arzneistoffe Tetrazepam und

Estradiol sind diese Tenside nicht mehr berücksichtigt worden, da sie keine klaren MM-Systeme mit höheren Anteilen an hPC ausbilden können.

Die Bestimmungen der Solubilisierungskapazitäten der untersuchten Einkomponentensysteme für Tetrazepam (Abbildung 6.5) ergaben ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchungen an Diazepam (Abbildung 6.2). Für beide getesteten Benzodiazepine Diazepam und Tetrazepam nehmen die Solubilisierungskapazitäten in der Reihe ab: SL > Polysorbat 80 > L-7D > HP- β -CD, wobei die Solubilisierungskapazitäten für Diazepam ausnahmslos höher lagen als die für Tetrazepam (Abbildung 6.5).

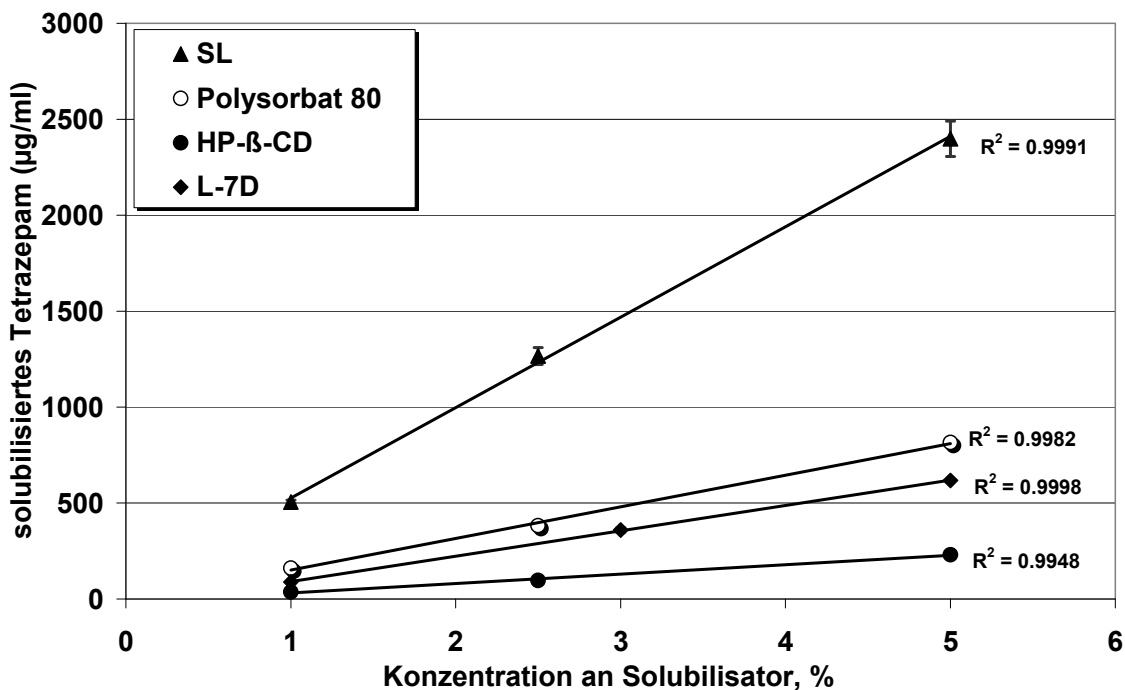


Abbildung 6.5: Solubilisierung von Tetrazepam durch verschiedene mizellare Systeme und HP- β -CD bei steigenden Solubilisator-Konzentrationen; $n = 4$

Die Abbildung 6.6 vergleicht die ermittelten Solubilisierungskapazitäten für Tetrazepam von ausgewählten neuentwickelten MM-Systemen aus hPC/DPPC und SL mit denen von klassischen Gallensalz/Lecithin-MM und anderen Solubilisierungssystemen wie Polysorbat 80 oder HP- β -CD. Das vorgestellte MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 erwies sich als das

vorteilhafteste getestete System hinsichtlich der Solubilisierung von Tetrazepam. Signifikant höhere Mengen von Tetrazepam konnten solubilisiert werden wenn der hPC-Masseanteil bei $WF_{hPC}0.5$ statt bei $WF_{hPC}0.6$ lag. Weiterhin ging ein Austausch von hPC durch DPPC mit einem Absinken der Solubilisierungskapazität für Tetrazepam einher, sobald der Masseanteil an PC bei 50% lag ($WF_{DPPC}0.5$). Dies kann durch die höhere Lipophilie der Fettsäurereste im hPC im Vergleich zu DPPC erklärt werden, da im DPPC-Molekül keine länger-kettige Stearinsäure wie im hPC-Molekül vorliegt. Der stärker hydrophobe Stearinsäurerest des hPC in den entsprechenden MM ermöglicht eine verbesserte Stabilisierung des hydrophoben Tetrazepams, welches so über zusätzliche Van-der-Waals Bindungen im Inneren der MM gehalten werden kann. Zudem bedingt die längere FS-Kette des hPC einen größeren mischmizellaren Durchmesser entsprechender MM-Systeme (vgl. Abbildung 6.14 und Abbildung 6.15), die ein größeres hydrophobes Kernvolumen einschließen. Trotzdem war das MM-System mit 0.6 Masseanteilen an hPC neben SL nicht in der Lage mehr Tetrazepam zu solubilisieren als das MM-System DPPC+SL $WF_{DPPC}0.6$. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine Sättigung der SL-haltigen MM-Systeme mit PC (hPC oder DPPC) sein, so dass die MM bereits mit dem unlöslichen PC so dicht gepackt sind, dass der Einschluss von Tetrazepam nicht mehr in optimaler Weise gewährleistet ist. Diese These wird zum einen durch die Transmissionsdaten der unbeladenen MM-Systeme belegt, bei denen eine Sättigung bei 0.6 PC-Masseanteilen gefunden wurde (vgl. Kapitel 5.2 und 5.4), zum anderen zeigten die Solubilisierungsuntersuchungen an Diazepam eine Abnahme der Solubilisierungskapazität in Systemen mit 0.6 statt 0.5 Masseanteilen an PC. Das MM-System hPC+SL $WF0.5$ solubilisierete das 6,5-fache an Tetrazepam verglichen mit HP- β -CD, und das 1,8-fache verglichen mit einer Polysorbat 80-Lösung bzw. den klassischen Gallensalz/Lecithin-MM, wobei jedes System dieselbe Gesamtkonzentration von 5% aufwies (Abbildung 6.6). Im Vergleich zu den klassischen Gallensalz/Lecithin-MM konnte durch die neuentwickelten MM bis zu 75% mehr Tetrazepam in Lösung gebracht werden, und zwar unabhängig von dem verwendeten Gallensalz und

gleichgültig ob die klassischen MM einen Mol- oder Masseanteil von 50% aufwiesen. Die reinen SL-Lösungen erreichten in den Konzentrationen wie sie in den untersuchten MM-Systemen eingesetzt wurden nur eine geringere Solubilisierungskapazität für Tetrazepam (weißer Balken, Abbildung 6.6).

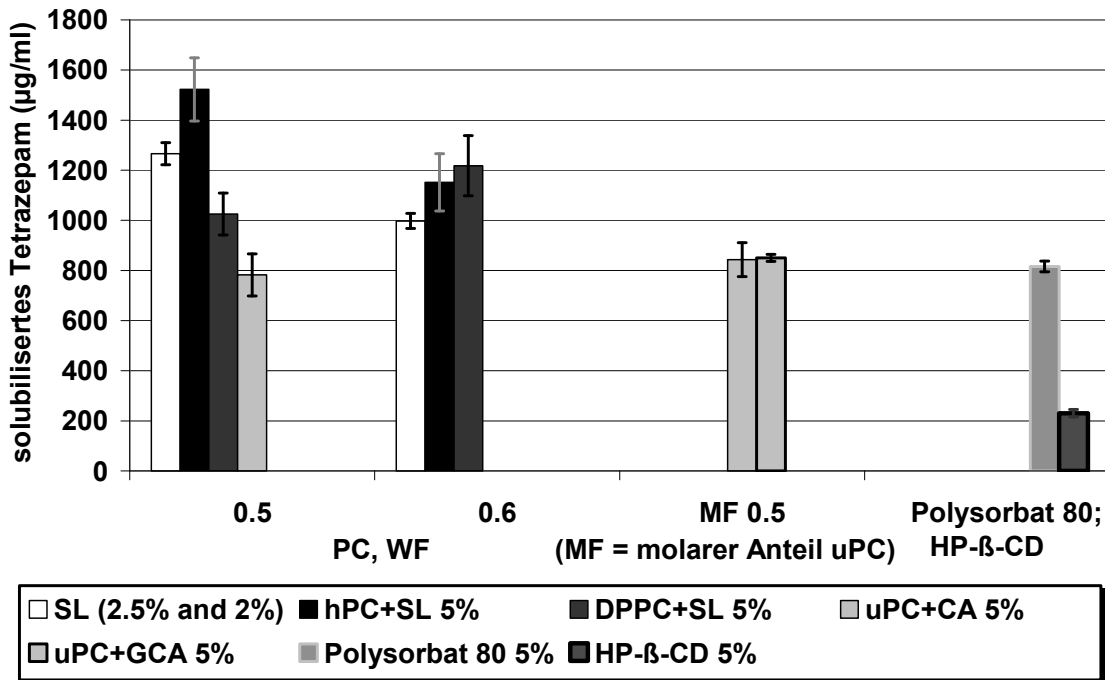


Abbildung 6.6: Solubilisierungskapazitäten von neuartigen MM-Systemen für Tetrazepam im Vergleich zu klassischen MM-Systemen (je $c = 5\%$) und anderen Solubilisierungssystemen ($c = 2-5\%$; $n = 4$)

6.5 Solubilisierung von Estradiol

Die Bestimmungen der Solubilisierungskapazitäten der untersuchten Einkomponentensysteme für Estradiol lieferten –im Vergleich zu den Untersuchungen an Diazepam bzw. Tetrazepam– unterschiedliche Ergebnisse. Für Estradiol nehmen die Solubilisierungskapazitäten in der Reihe ab: HP-β-CD >> Polysorbat 80 > SL > L-7D (Abbildung 6.7), wobei die Solubilisierungskapazitäten der Tenside für Estradiol wesentlich geringer sind als die für die BDZ. Das Cyclodextrin-Derivat HP-β-CD wies im Vergleich zu allen anderen untersuchten Solubilisierungssystemen eine deutlich erhöhte Solubilisierungskapazität für das Steroid Estradiol auf (Abbildung 6.7). Diese Erkenntnis bestätigt die bekannte,

außergewöhnliche Solubilisierungskapazität der Cyclodextrine gegenüber steroidal Substanzen (Brewster et al., 1988; Albers und Müller, 1995; Brewster und Loftsson, 2007). Die Solubilisierungskapazität des Polysorbat 80 für Estradiol übersteigt die des SL, was entgegengesetzt zu den Ergebnissen für die BDZ steht.

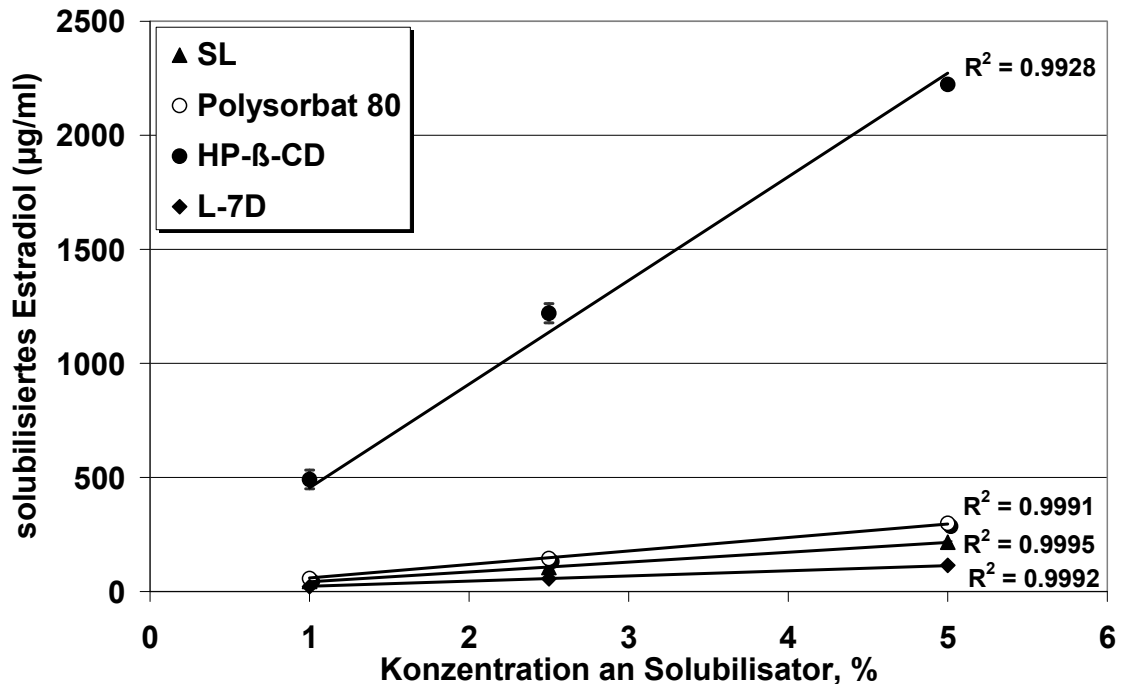


Abbildung 6.7: Solubilisierung von Estradiol durch verschiedene mizellare Systeme und HP-β-CD bei steigenden Solubilisator-Konzentrationen; $n = 4$

Die Abbildung 6.8 vergleicht die ermittelten Solubilisierungskapazitäten für Estradiol von ausgewählten neuentwickelten MM-Systemen aus hPC/DPPC und SL mit denen von klassischen Gallensalz/Lecithin-MM und anderen Solubilisierungssystemen. Die vorgestellten MM-Systeme mit SL und 0.5 oder 0.6 Masseanteilen an hPC bzw. DPPC besitzen auch für das Steroid Estradiol eine im Vergleich zu den klassischen Gallensalz/Lecithin-MM überlegene Solubilisierungskapazität (vgl. Abbildung 6.8), auch wenn der Vorteil hier nicht so ausgeprägt ist wie bei den untersuchten BDZ-Derivaten. Für die klassischen Gallensalz/Lecithin-MM konnten nahezu identische Solubilisierungskapazitäten mittels der etablierten Methode erhalten werden, wie sie in der Literatur publiziert sind (Hammad, 1998). SL allein, in denselben

Konzentrationen wie es in den MM neben hPC bzw. DPPC eingesetzt wurde, solubilisierte deutlich weniger Estradiol als die entsprechenden MM-Systeme mit demselben Anteil an SL (2% SL/WF_{PC}0.6 und 2.5% SL/WF_{PC}0.5), was den Benefit der MM-Systeme belegt.

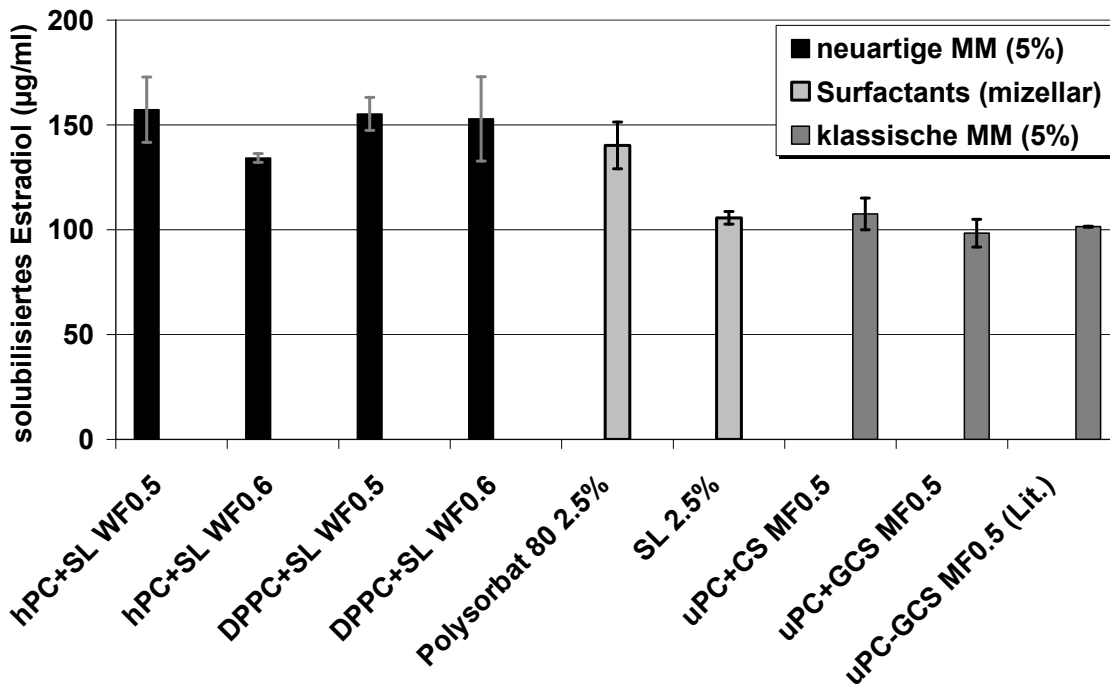


Abbildung 6.8: Solubilisierungskapazitäten von neuartigen MM-Systemen für Estradiol im Vergleich zu klassischen MM-Systemen (je $c = 5\%$) und anderen Solubilisierungssystemen ($c = 2,5\%$); $n = 4$

Jedoch zeigten alle neu entwickelten MM-Systeme mit SL ein geringeres Solubilisierungsvermögen für Estradiol als das Tensid Polysorbat 80. So wurde die Estradiol-Löslichkeit durch eine 2,5%ige Polysorbat 80-Lösung in etwa demselben Ausmaß erhöht wie durch eine 5%ige Lösung mit den entwickelten MM-Systemen (vgl. Abbildung 6.8).

6.6 Solubilisierung von Erythromycin durch MM (UV/VIS-Studie)

Zur Bestimmung der solubilisierten Erythromycinmenge wurde, im Gegensatz zu allen anderen Solubilisationsversuchen dieser Arbeit, eine UV/VIS-spektroskopische Methode eingesetzt (vgl. Kapitel 13.4). Bei dieser Analysenmethode kommt es über die Reaktion von Schwefelsäure und Erythromycin zur Entstehung eines farbigen Produkts, welches dann photometrisch bestimmt werden kann. Allerdings ist nicht genau beschrieben (Ford et al., 1953) welche chemische Reaktion zur Entstehung des farbigen Produktes führt oder aber wie die chemische Zusammensetzung des zu detektierenden Produktes ist. Allerdings ist die Reaktion sowohl zeitabhängig, als auch temperaturabhängig (Ford et al., 1953). Die erhaltenen Ergebnisse für die unterschiedlichen MM-Systeme lassen sich insofern in Relation zueinander betrachten und miteinander vergleichen. Jedoch soll mit diesen Ergebnissen keine Absolutaussage über die tatsächliche Solubilisierungskapazität der Systeme für Erythromycin getroffen werden. Die Wasserlöslichkeit von Erythromycin liegt bei etwa 1,0 mg/ml (Ōmura, 1984; Wishart, 2008) und stellt damit nach Ph.Eur. 6.0 eine schlecht wasserlösliche Substanz dar. Durch die untersuchten MM-Systeme konnte die Wasserlöslichkeit auf etwa 10 mg/ml erhöht werden. Die Solubilisierungskapazitäten der neu entwickelten MM-Systeme unterscheiden sich hierbei kaum von denen der klassischen Gallensalz/Lecithin-MM. Das Gallensalz Cholsäure-Na in den klassischen MM besitzt einen Vorteil gegenüber dem Natriumsalz der Glycocholsäure (Abbildung 6.9). Bei den neu entwickelten MM-Systemen, deren Solubilisierungskapazität insgesamt nur leicht oberhalb der der klassischen MM liegt, scheint ein höherer SL-Anteil ($WF_{PC}0.5$ statt $WF_{PC}0.6$) zu einer erhöhten Solubilisierungskapazität der MM zu führen (Abbildung 6.9). Insgesamt ist in der Erythromycinsolubilisierung durch die neu entwickelten MM-Systeme kaum ein Vorteil gegenüber den klassischen MM zu sehen. Vergleicht man die Absolutwerte der Solubilisierungskapazität der 5%igen MM-Systeme mit denen von festen Dispersionen aus β -Cyclodextrinen, PEG und Erythromycin, wodurch eine Erythromycin-Freigabe von 11 mg/ml nach 60 min erreicht wurde

(Khabriev et al., 2009), sind die Solubilisierungskapazitäten der neu entwickelten MM-Systeme, mit etwa 10 mg/ml an Erythromycin, recht vielversprechend. Allerdings ist anzumerken, dass die hier erhaltenen Werte methodenbedingt Relativmessungen darstellen. Die Untersuchungen an den Erythromycin-haltigen MM-Systemen wurden im Vergleich zu allen anderen gezeigten beladenen MM-Systemen (mind. drei Chargen) nur an einer MM-Charge anhand einer Doppelbestimmung durchgeführt.

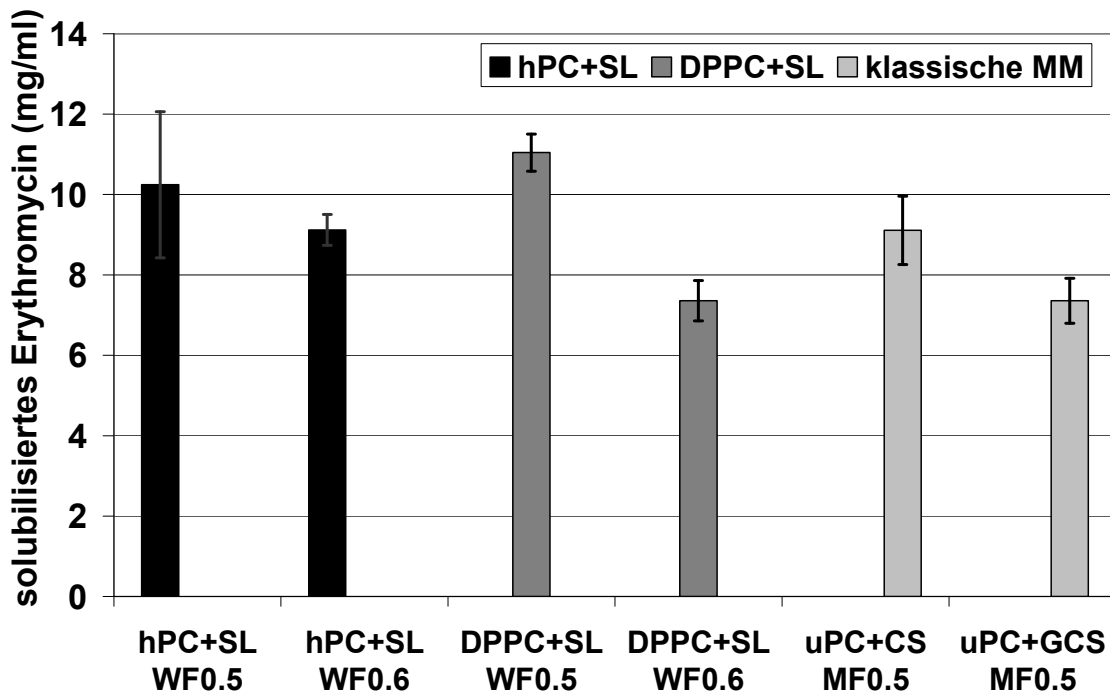


Abbildung 6.9: Solubilisierungskapazitäten von ausgewählten 5%igen MM-Systemen für Erythromycin; ermittelt über eine UV/VIS-Methode; $n = 2$

6.7 Einfluss der Wirkstoffsolubilisierung auf die Größe der MM

Die Solubilisierung einer schlecht wasserlöslichen Substanz durch mizellare Systeme sollte bestenfalls über eine Aufnahme der AS-Moleküle in den inneren hydrophoben Kern der Mizelle oder Mischmizelle erfolgen. Jedoch besteht auch die Möglichkeit einer Integration der Arzneistoffmoleküle in die Hülle der Mizellen bzw. MM oder aber dass andersartige Mizellen (z.B. stäbchenförmig) aufgebaut werden. Ferner könnte der Arzneistoff in Abhängigkeit von seinen physikochemischen Eigenschaften an der äußeren Oberfläche der Mizellen oder MM adsorbiert werden. Eine nahezu unveränderte Größe der Mizellen bzw. MM deutet auf einen Einschluss des Arzneistoffes in das Innere der Mizellen. Dies führt zu einer erhöhten Stabilität dieser Systeme, da die thermodynamisch stabilen Mizellen zum einen keinen Umbau erfahren, zum anderen liegt der Arzneistoff im hydrophoben Inneren geschützt vor etwaigen Einflüssen des hydrophilen Mediums vor. Dies kann zu einer erhöhten Stabilität des Arzneistoffes gegenüber chemischen Reaktionen wie z.B. einer Hydrolyse führen. Weiterhin ergibt sich durch die Inkorporation ein protektiver Effekt gegenüber einer möglichen Bindung der AS-Moleküle an Plasmaproteine. Eine DLS-Analyse der unbeladenen und mit Arzneistoff beladenen Systeme gibt Aufschluss bzw. Hinweise über eine mögliche Auswirkung der Solubilisat-Bildung auf die Form- und Größenänderung in solchen Systemen (Yu et al., 1998; Torchilin et al., 2004; Koo et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass Polyglycerollaurat (L-7D) zwar mischmizellare Systeme mit hPC bildet (vgl. Kapitel 5.2.1), diese Systeme jedoch nur verhältnismäßig wenig Diazepam zu solubilisieren vermögen (vgl. Kapitel 6.3). Die Solubilisierung von Diazepam durch MM-Systeme aus hPC und L-7D führte zu keiner drastischen Veränderung der Partikelgröße (siehe Abbildung 6.10). Einen signifikanten Einfluss hat die Diazepam-Beladung lediglich in den Systemen mit einem Masseanteil an hPC von 0.2 bzw. 0.3. Die Größe der MM wuchs hierbei nach Aufnahme von Diazepam von etwa 20 nm auf ca. 26 nm an. Aus der Literatur ist bekannt, dass die zur Zeit intensiv untersuchten Blockcopolymer-Mizellen nach Beladung mit

schlecht wasserlöslichen AS-Molekülen oft eine deutliche Vergrößerung (Yu et al., 1998; Jones und Leroux, 1999; Carstens et al., 2008) oder sogar Verdopplung (Kwon et al., 1997) des mizellaren Durchmessers zeigen. Für sogenannte sterisch-stabilisierte MM aus PEGylierten Phospholipiden ist ein mizellarer Größenzuwachs nach AS-Solubilisierung in diesem Ausmaß nicht bekannt (Koo et al., 2005; Mu et al., 2005; Cesur et al., 2009).

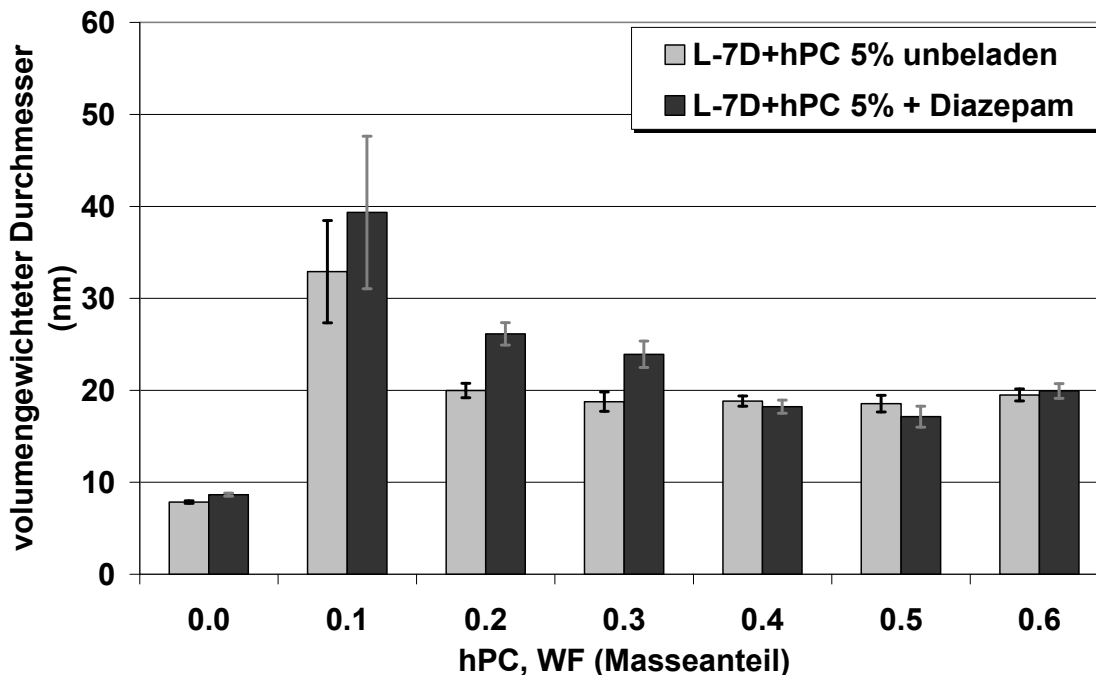


Abbildung 6.10: Mittels DLS gefundene Partikelgrößen in Systemen aus hPC und SL vor und nach der Beladung mit Diazepam; Gesamtkonzentration 5%

Die Solubilisierung von Diazepam in allein SL-haltigen Systemen führte zu einer signifikanten Vergrößerung der mittels DLS gefundenen hydrodynamischen Mizelldurchmesser. Unabhängig von der SL-Konzentration führte die Beladung mit Diazepam mindestens zu einer Verdopplung der gefundenen Partikelgröße (Abbildung 6.11). Ursache hierfür könnte ein Einbau des Diazepams in die Hülle der Mizellen oder aber eine Adsorption an den Saccharoserest des SL an der Mizelloberfläche sein. Anzumerken ist, dass die DLS-Messungen sämtlicher in Abbildung 6.11 dargestellten Systeme nicht gegen die tatsächliche Viskosität der Proben, sondern gegen die Viskosität von

reinem Wasser vermessen wurden. Die Dichteverteilungskurven der volumengewichteten Partikelgrößenanalyse für unbeladene und beladene 2%ige SL-Mizellen sind als Ausschnitt dargestellt, der den Sprung in der gefundenen Partikelgröße zeigt.

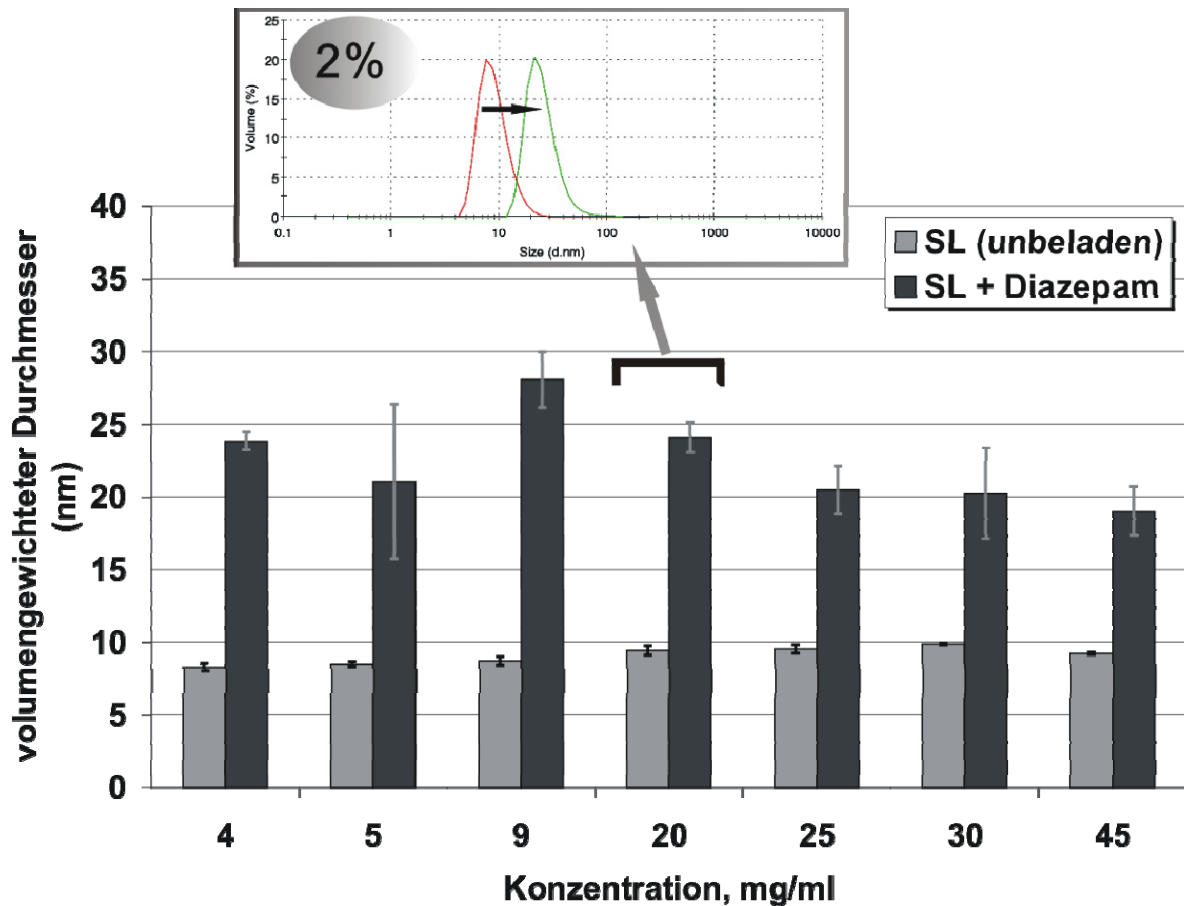


Abbildung 6.11: Einfluss der Diazepam-Solubilisierung auf die Größe der SL-Mizellen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Für das System bei $c = 2\%$ ist die Partikelgrößenverteilung als Plot dargestellt; $n = 3$

Die Abbildung 6.12 zeigt die Dichteverteilungskurven der volumengewichteten Partikelgrößenanalyse unbeladener und beladener SL-Mizellen als Histogramm, wie es von der DLS-Software ausgegeben wird. Die dargestellten Systeme haben jeweils eine SL-Konzentration von 1% und wurden gegen eine Viskosität von $0,95 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ vermessen. Eine Beladung mit den schlecht wasserlöslichen Benzodiazepinen und Cinnamaten führt zu einer Verdopplung des durchschnittlichen mizellaren Durchmessers. Die Beladung mit Tetrazepam resultiert in einer breiten

Partikelgrößenverteilung. Auf der anderen Seite ließen sich Estradiol und Erythromycin in die SL-Mizellen integrieren, ohne dass es zu einer Änderung des mizellaren Durchmessers kam (Abbildung 6.12).

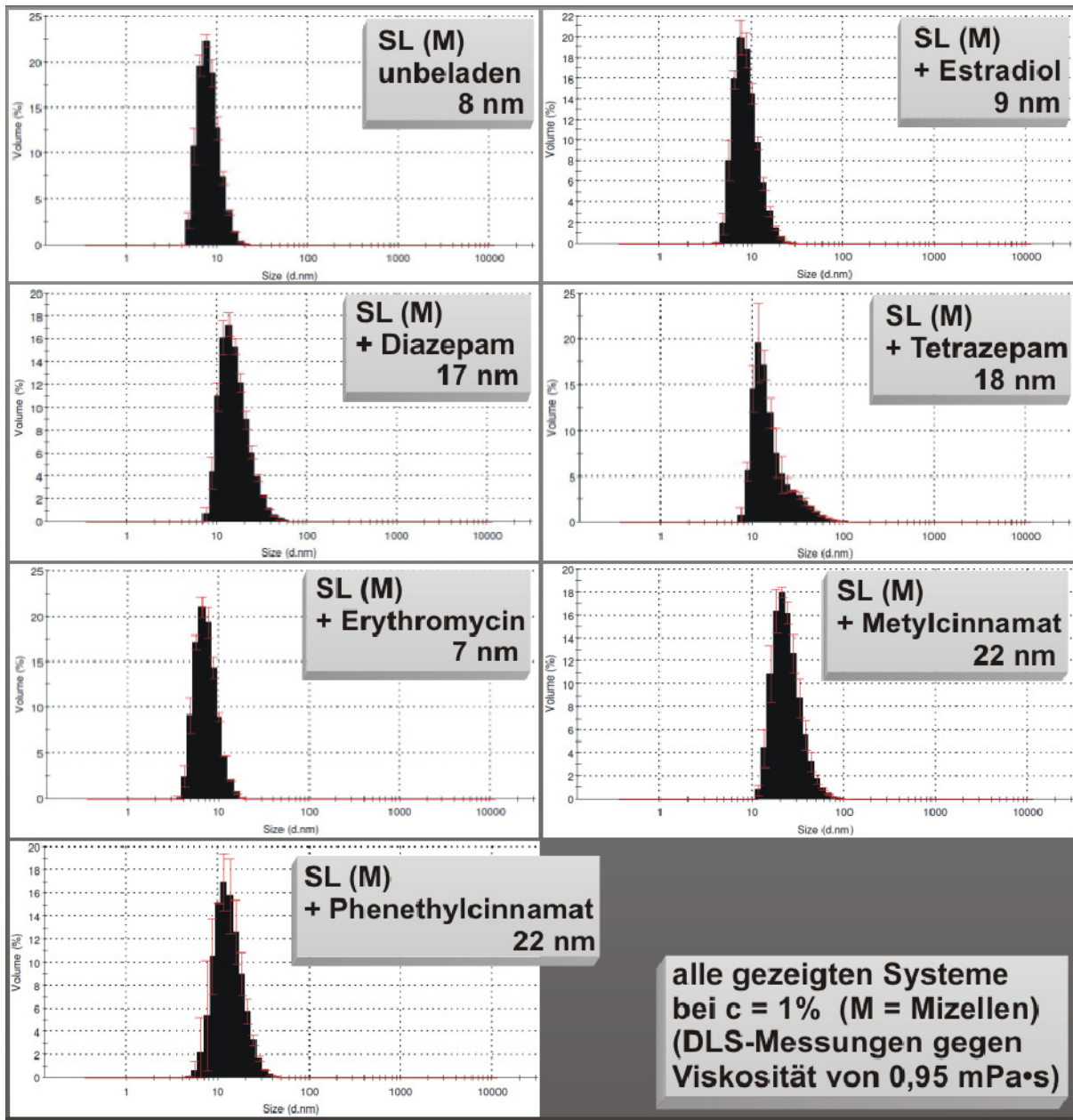


Abbildung 6.12: Mittels DLS gefundene Größen der SL-Mizellen vor und nach der Beladung mit unterschiedlichen schlechtwasserlöslichen Arzneistoffen

Diese Erkenntnis lässt den Schluss zu, dass sich die zuletzt genannten AS offenbar ins Innere der SL-Mizellen integrieren ließen.

In der Abbildung 6.13 sind die volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der mittels DLS gefundenen Partikel in unbeladenen und mit Diazepam-beladenen Systemen aus SL und steigenden Anteilen an hPC gezeigt.

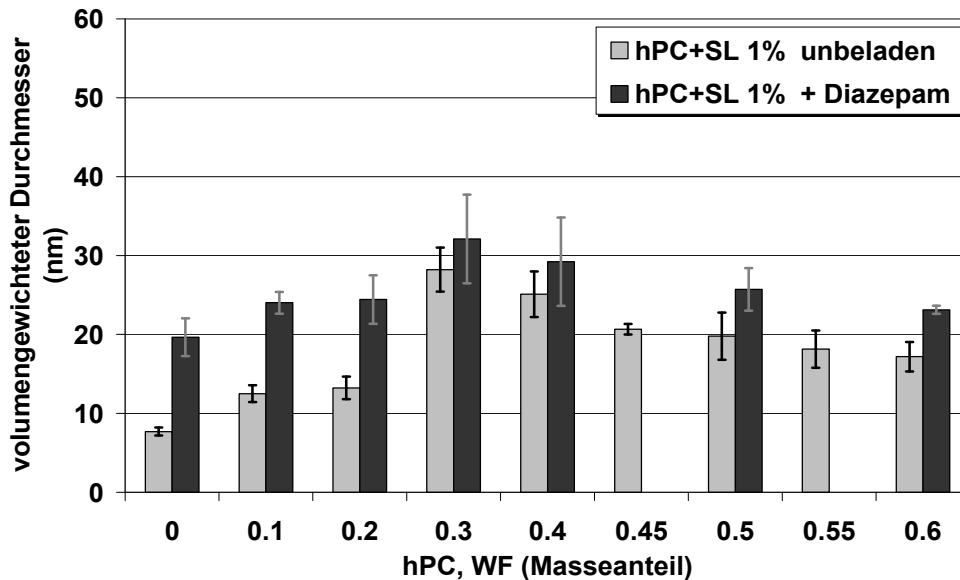


Abbildung 6.13: Mittels DLS gefundene Partikelgrößen in 1%igen Systemen aus hPC und SL vor und nach der Beladung mit Diazepam

Während die Anwesenheit von Diazepam in reinen SL-Systemen zu einer Verdopplung des Mizelldurchmessers führte, zeigten auch Systeme mit geringem Anteil an hPC ($WF_{hPC} 0.1-0.2$) einen deutlichen Anstieg in der gefundenen Partikelgröße nach der Beladung mit Diazepam (Abbildung 6.13). Dagegen führte die Beladung mit Diazepam in Systemen mit einem höheren Masseanteil an hPC von 0.3-0.6 zu einem geringeren Zuwachs der gefundenen Partikeldurchmesser. Der hydrodynamische Durchmesser des favorisierten MM-Systems hPC+SL $WF_{hPC} 0.5$ lag im unbeladenen Zustand bei etwa 20-24 nm und nach der Beladung mit Diazepam und anschließender Equilibrierung bei etwa 24-27 nm (vgl. Abbildung 6.13 und Abbildung 6.14). Dieser geringe Zuwachs der mischmizellaren Größe kann durch die Aufnahme der hydrophoben AS ins Innere der MM und dem damit verbundenen leichten Anschwellen der MM begründet werden. Keiner der untersuchten schlecht wasserlöslichen Arzneistoffe führte zu einer

deutlichen Veränderung des mischmizellaren Durchmessers der MM im System hPC+SL WF_{hPC}0.5 (vgl. Abbildung 6.14).

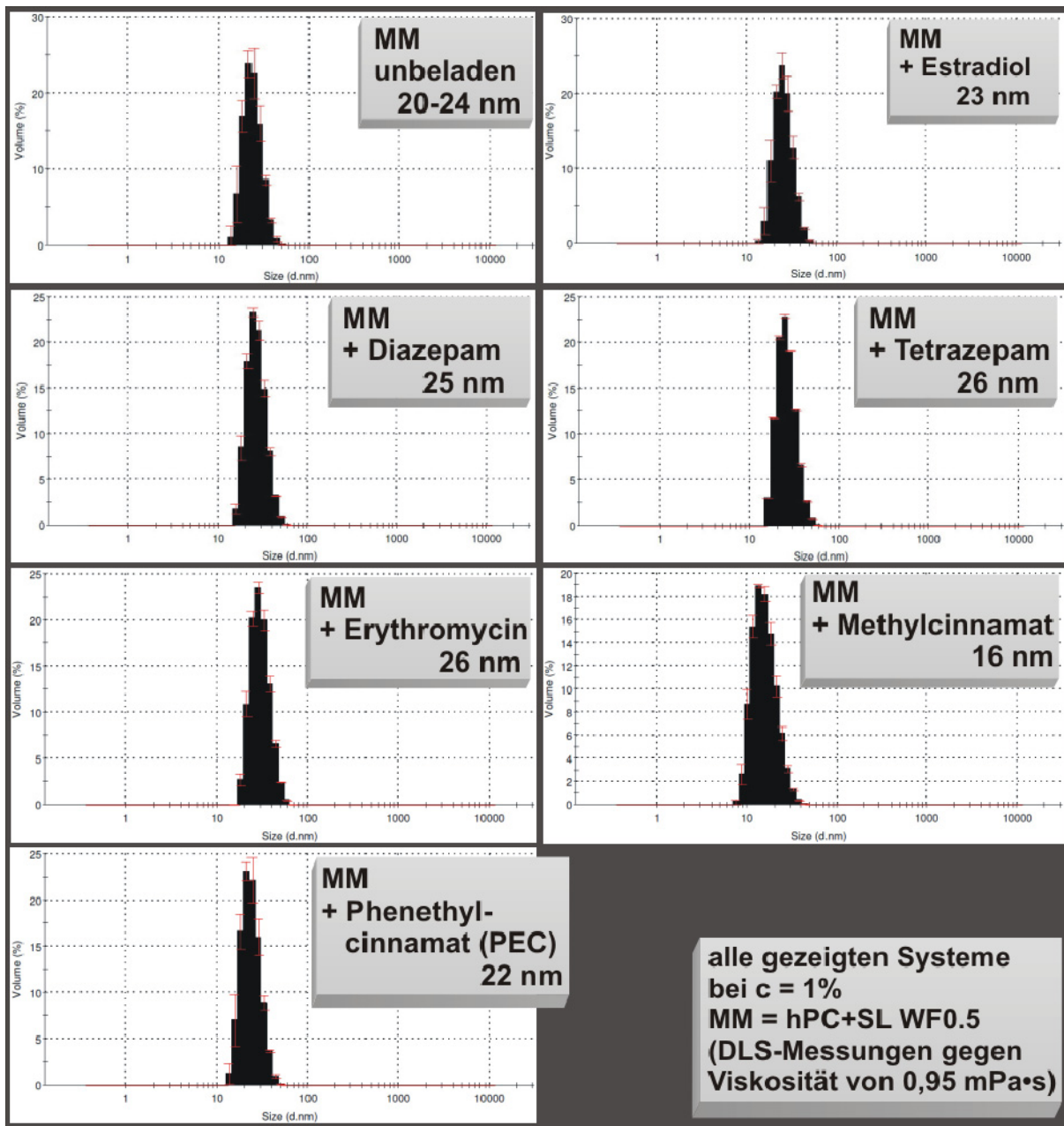


Abbildung 6.14: Mittels DLS gefundene Größen von dem neu entwickelten MM-System hPC+SL WF0.5 bei $c = 1\%$ vor und nach der Beladung mit unterschiedlichen schlecht wasserlöslichen Arzneistoffen

Nach Beladung mit Diazepam, Tetrazepam, Estradiol, Erythromycin oder Phenethylcinnamat (PEC) und anschließender Equilibrierung der Systeme blieb der hydrodynamische Durchmesser der MM zwischen 22

und 26 nm. Damit kam es lediglich zu einem marginalen Anstieg in der Größe der MM, was auf eine Integration der AS ins Innere der MM schließen lässt und damit auf eine zufriedenstellende Stabilität des Solubilisates hindeutet. Wie bereits erwähnt ist ein leichter Anstieg der MM-Größe nach AS-Beladung auch von sterisch-stabilisierten PEGylierten MM bekannt, die ebenfalls auf Phospholipiden basiert sind (Dabholkar et al., 2006). Eine Integration hydrophober Arzneistoff-Moleküle in das Innere der MM kann zu einem leichten Anschwellen der MM führen. Interessanterweise führte die Solubilisierung von Methylcinnamat (MC) zu einer Abnahme des gefundenen hydrodynamischen Durchmessers der MM. Zu erklären ist dieses Phänomen über eine Reorganisation der Bestandteile zu optimal gepackten MM, oder aber die Anwesenheit des MC bewirkt eine Reduktion des hydrodynamischen Durchmessers, indem es einen Einfluss auf die Hydrathülle der MM ausübt. Die ausgeprägte Hydrathülle der MM des Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 ist durch die stark hydrophile Sucrosegruppe des Zuckeresters bedingt. Möglicherweise schirmen die MC-Moleküle diese Hydratgruppen ab, so dass deren Einfluss auf den mittels DLS-Messung gefundenen MM-Durchmesser weniger deutlich ausgeprägt ist. Eventuell bedingen die MC-Moleküle eine Änderung der Morphologie der MM. Die MM des Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 zeigen mit 20-24 nm einen relativ großen hydrodynamischen Durchmesser, der theoretisch auch auf nicht-sphärische, sondern ellipsoide mizellare Assoziate hindeuten kann. Vielleicht bedingen die MC-Moleküle eine Assoziation zu sphärischen MM, die bei der DLS-Messung einen kleineren Durchmesser aufweisen würden. Die genaue Aufklärung der exakten Morphologie bedarf jedoch zusätzliche Untersuchungen, wie z.B. die Analyse bei unterschiedlichen Streuwinkeln, die jedoch mit dem verwendeten DLS-Gerät nicht durchführbar sind. Interessanterweise sind die gebildeten unbeladenen MM in dem System DPPC+SL WF_{hPC}0.5 mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 16 nm deutlich kleiner als die MM des Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5, was ausführlich in Kapitel 5.4.1 diskutiert wird. Eine Beladung des MM-Systems DPPC+SL WF_{hPC}0.5 mit unterschiedlichen AS führt zu einem leichten

Anstieg in der gefundenen Größe der MM von etwa 16 nm auf 16-22 nm (Abbildung 6.15).

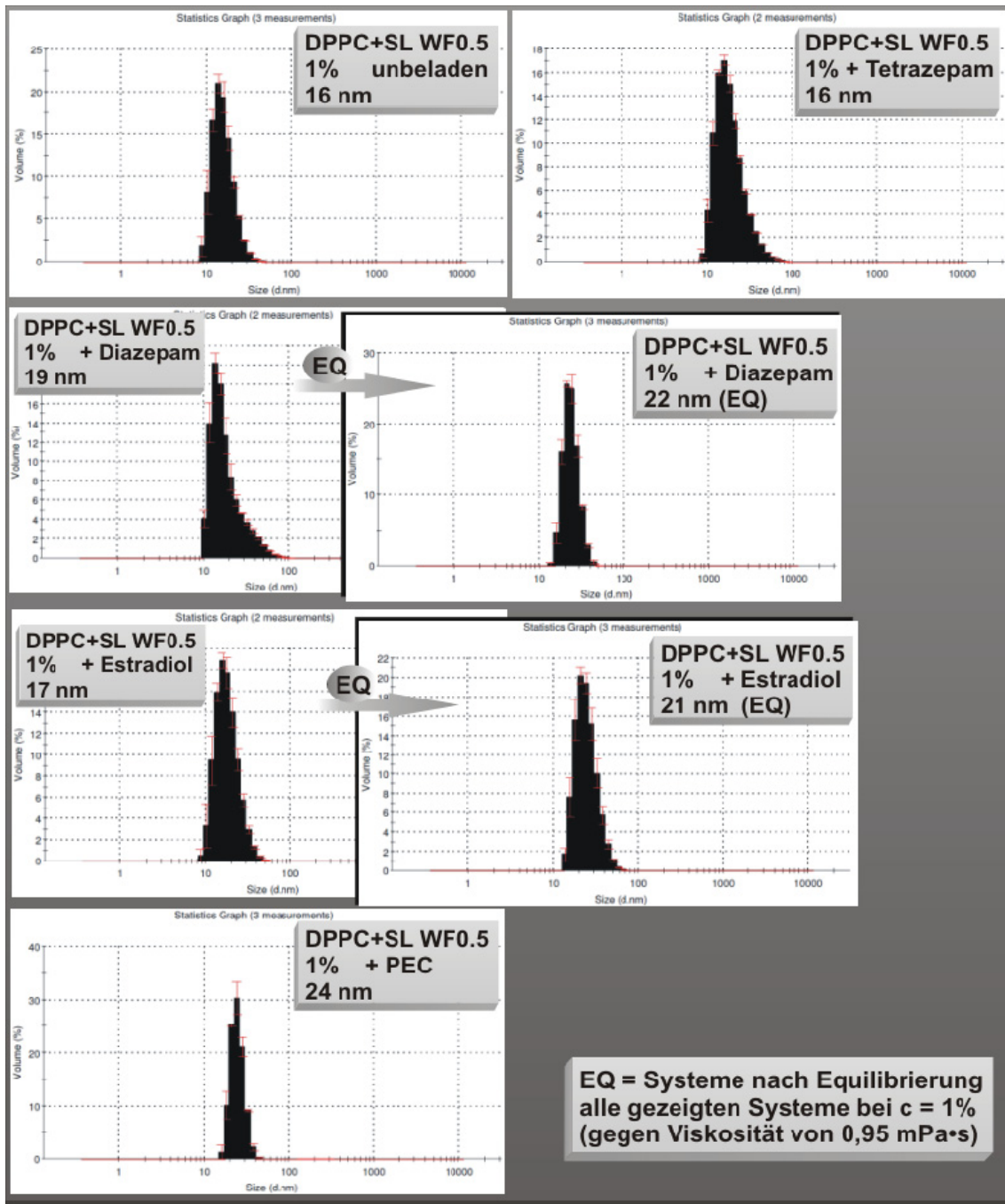


Abbildung 6.15: Mittels DLS gefundene Größen von dem neuartigen MM-System DPPC+SL WF0.5 bei $c = 1\%$ vor und nach der Beladung mit unterschiedlichen schlecht wasserlöslichen Arzneistoffen (EQZ ca. 2 Monate)

Nach der Beladung der Systeme mit Diazepam und Estradiol kam es infolge einer Lagerzeit von etwa 2 Monaten zu einer Equilibrierung der

MM, die einen leichten Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers von 19 auf 22 nm (Diazepam) bzw. von 17 auf 21 nm (Estradiol) zur Folge hatte.

6.8 Zusammenfassung: AS-Solubilisierung

Die verwendeten Sucroseester zeigen als mizellare Systeme ein ausgeprägtes Solubilisierungsvermögen für die untersuchten Benzodiazepine (BDZ). Jedoch bedingt die Inkorporation hydrophober Wirkstoffe wie z.B. Diazepam in das mizellare System eine deutliche Änderung der Morphologie der (mittels DLS-Messungen gefundenen) Mizellen. Die Solubilisierung von Diazepam bzw. Tetrazepam resultiert in einer Verdopplung des gefundenen mizellaren Durchmessers. Dieser deutliche Einfluss der Solubilisierung auf die Größe der Mizellen kann zum einen ein Hinweis darauf sein, dass der Arzneistoff nicht ins Innere der SL-Mizellen aufgenommen wurde, sondern in die Mizellhülle integriert oder aber an die äußere Mizelloberfläche adsorbiert worden ist. Dadurch könnte die Stabilität der Mizellen durch eine Änderung der CMC oder aber die Stabilität des Arzneistoffs durch verstärkte Exposition zum hydrophilen Milieu beeinträchtigt werden. Zum anderen könnte die AS-Solubilisierung eine Umwandlung von kugelförmigen zu stäbchenförmigen Mizellen bedingen. Die mischmizellaren Systeme hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ bzw. DPPC+SL $WF_{hPC}0.5$ ermöglichen eine Solubilisierung verschiedener AS ohne dass es zu einer deutlichen Änderung der mittels DLS-Messungen gefundenen Größe der MM kommt. Diese MM-Systeme weisen zudem eine im Vergleich zu den klassischen Gallensalz/Lecithin-MM erhöhte Solubilisierungskapazität für die untersuchten Benzodiazepine auf. Ferner ist die Solubilisierungskapazität der neu entwickelten MM-Systeme für die untersuchten BDZ auch im Vergleich zu anderen Solubilisierungssystemen wie HP- β -CD oder Polysorbat 80 überlegen. Nach Literatur-Angaben soll Sucroselaurat als Solubilisator zu einer erhöhten Absorption des hydrophoben AS Cyclosporin im in-vitro-Modell führen. Dabei wurde eine Überlegenheit des Sucroselaurats gegenüber anderen Tensiden, wie den

Cholaten, gefunden (Lerk und Sucker, 1993). Die Autoren schlagen SL als Hilfstoff vor, der die orale Bioverfügbarkeit von schlecht löslichen Arzneistoffen erhöhen soll. Ebenso ist bekannt, dass klassische MM durch die Anwesenheit der PL eine Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit erreichen (vgl. Kapitel 2.2.3). In der vorliegenden Arbeit werden nun PL- und SL-Moleküle miteinander zu einem MM-System kombiniert, welches sich als vielversprechendes pharmazeutisches Trägersystem für hydrophobe AS-Moleküle wie Diazepam bewies und möglicherweise auch die Bioverfügbarkeit der solubilisierten Arzneistoffe erhöhen kann.

Die Integration hydrophober Arzneistoff-Moleküle in ein zuvor unbeladenes MM-System könnte theoretisch zur Änderung der Lage der CMC führen. So besteht die Möglichkeit, dass der AS nicht ins Mizellinnere, sondern in die Hülle integriert wird – oder aber in einer anderen Art und Weise den Mizellbildungsprozess beeinflusst. Genauere Details hierzu siehe Kapitel 7.

In Kapitel 7 wird gezeigt welchen Einfluss eine Beladung der neu entwickelten MM-Systeme mit Diazepam auf die Lage der CMC hat.

7 Vorstellung einer neuen Methode zur Bestimmung der CMC von MM

7.1 Einleitung

Die weit verbreiteten Methoden zur CMC-Bestimmung, wie die der Oberflächenspannung (Kapitel 3.9), sind teilweise mit einigen Nachteilen verbunden. Bei dieser Methode wird die Menge an Tensid bestimmt, die zu einer Konstanz der Oberflächenspannung im System führt. Damit wird strenggenommen nicht der Mizellbildungszeitpunkt bzw. die eigentliche Mizellbildung detektiert, sondern es wird die Menge an Tensid bestimmt, die zur Absättigung der Oberfläche benötigt wird. Ein großer Nachteil dieser Methode besteht in der geringen Robustheit. Die verwendeten Gefäße müssen absolut sauber sein und sollten nicht mit tensidhaltigen Waschmitteln gesäubert werden. Nach Reinigung sollte eine erneute mehrfache Spülung der Gefäße mit Aqua bidest. erfolgen, um jegliche Schmutz-, Staubpartikel oder Tensidreste zu entfernen. Die verwendeten Gefäße sollten zudem aus einem Material aufgebaut sein, das eine Adsorption von Tensiden weitgehend unterbindet (etwa Glas). Daneben ist die Methode sehr anfällig gegenüber Erschütterungen und die Messungen sind sehr zeitaufwändig.

Die Messung der Fluoreszenzintensität eines lipophilen Farbstoffes, der die Eigenschaft hat, sich im Inneren der Mizellen oder Mischmizellen aufzuhalten, ermöglicht eine direkte Determination der Mizellbildung (vgl. Kapitel 3.8). Ein möglicher Nachteil dieser Methode kann sich bei der Analyse von mizellaren Systemen ergeben, die bereits einen Wirkstoff eingeschlossen halten. Der hydrophobe Fluoreszenzfarbstoff könnte mit dem hydrophoben AS-Molekül um die „Bindungsstelle“ bzw. die Aufnahme in das hydrophobe Mizellinnere konkurrieren. Abhängig vom Arzneistoff bzw. vom eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff kann es somit zu Abweichungen in den CMC-Werten kommen, z.B. infolge einer geringeren Empfindlichkeit der Methode. Die Kenntnis der genauen Lage der CMC in Arzneistoff-haltigen Systemen ist von größter Bedeutung, da die Stabilität des Gesamt-Solubilisates (AS-beladene MM) für den

therapeutischen Erfolg ausschlaggebend ist und nicht etwa die CMC des unbeladenen Systems. Im Folgenden wird eine neuentwickelte DLS-Methode zur CMC-Bestimmung vorgestellt, die es erlaubt auch die CMC in beladenen MM zu bestimmen und die nicht von der Beschaffenheit des Inneren der Mischmizelle oder einem dritten Farbstoffmolekül abhängig ist. Bei der vorgestellten Methode werden unterschiedliche Verdünnungen eines MM-Systems mittels DLS vermessen, wobei darauf zu achten ist, dass eine der Verdünnungen eine Konzentration aufweist, die unterhalb der CMC des untersuchten MM-Systems liegt.

7.2 CMC-Bestimmungen

In diesem Kapitel werden die zwei etablierten Methoden der Oberflächenspannungsmessung und Fluoreszenzintensitätsmessung zur CMC-Bestimmung mit einer neu vorgestellten Methode (s.u.) verglichen. Die beiden unterschiedlichen MM-Systeme hPC+SL WF_{hPC}0.5 und DPPC+SL WF_{DPPC}0.5 wurden sowohl im unbeladenen als auch im mit Diazepam-beladenen Zustand mittels drei unterschiedlicher Methoden analysiert.

7.2.1 MM-System hPC+SL WF0.5 ± Diazepam

Die CMC im MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 beträgt im unbeladenen Zustand etwa 0,18 mg/ml und nach Beladung mit Diazepam etwa 0,20 mg/ml, wie sowohl durch Oberflächenspannungsmessungen (Abbildung 7.1), als auch durch Messungen der Fluoreszenzintensität (Abbildung 7.2) bestätigt werden konnte. Damit konnte belegt werden, dass die Anwesenheit von Diazepam zu keiner Änderung der CMC führt und die Stabilität des beladenen MM-Systems gegenüber Verdünnungen nicht verändert wurde.

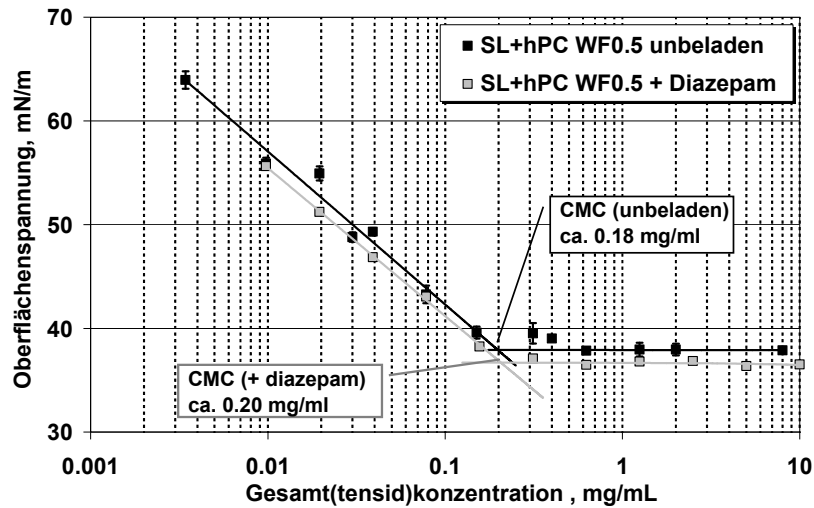


Abbildung 7.1: Ergebnisse der Oberflächenspannungsmessungen zur CMC-Bestimmung im MM-System $hPC+SL WF_{hPC0.5}$; mit / ohne Diazepam

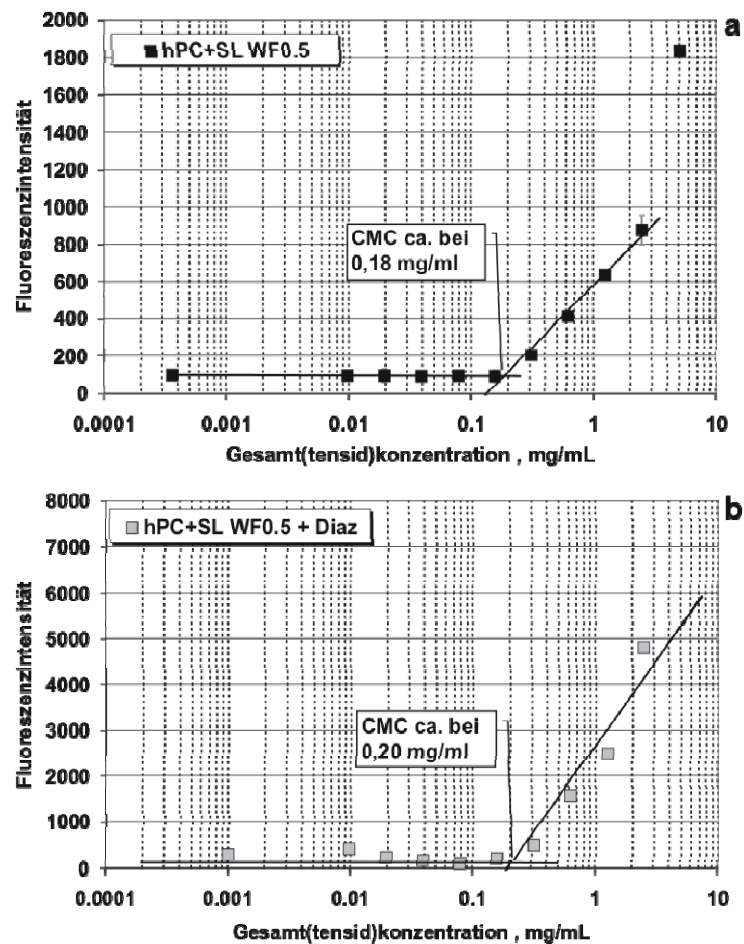


Abbildung 7.2: CMC-Bestimmung durch Messung der Fluoreszenzintensität von DPH im MM-System $hPC+SL WF_{hPC0.5}$; mit / ohne Diazepam (a und b)

Die Abbildung 7.3 zeigt DLS-Messergebnisse, die an unterschiedlich verdünnten Proben des neu entwickelten MM-Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 erhalten wurden.

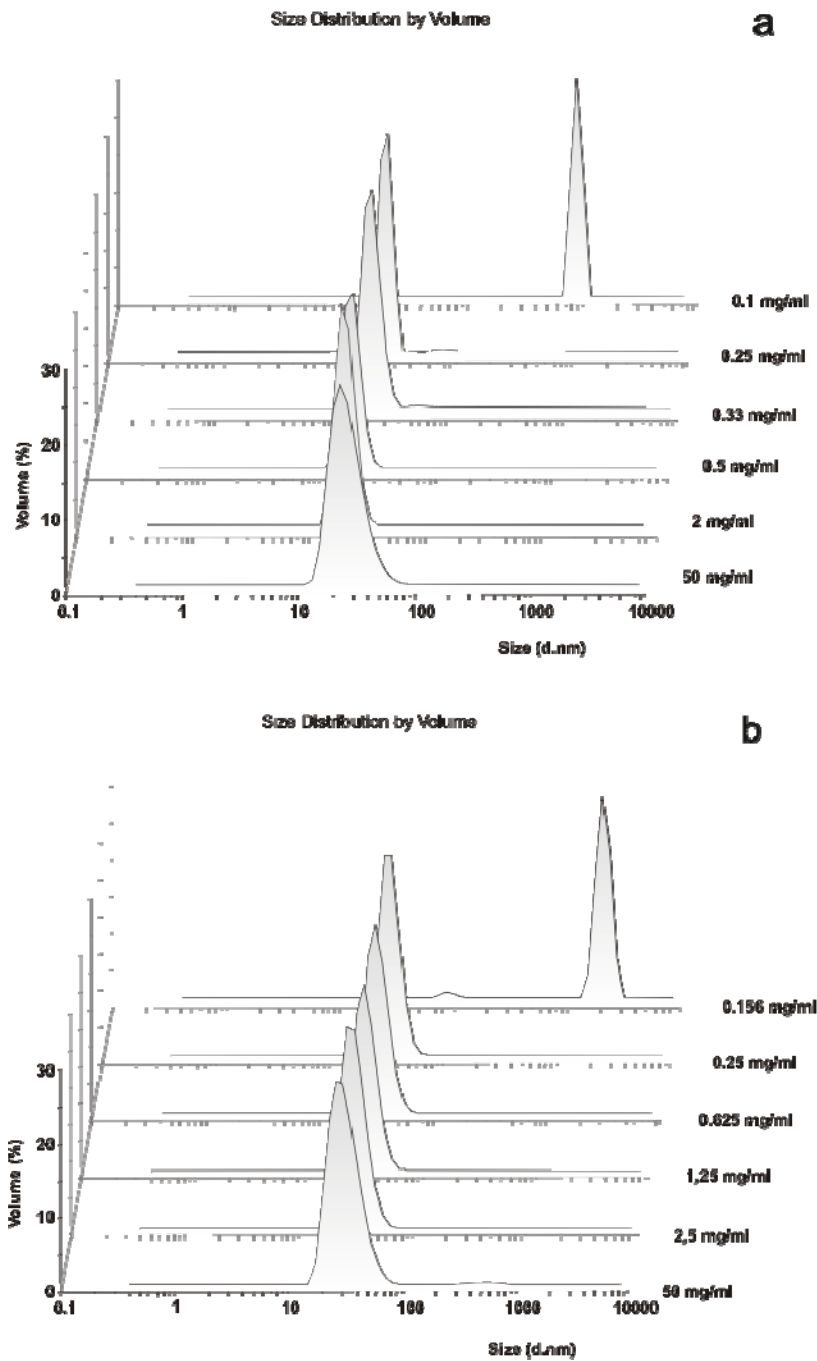


Abbildung 7.3: DLS-Größenmessungen an Verdünnungsreihen des MM-Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 im unbeladenen Zustand (a) und nach Beladung mit Diazepam (b); Stabilität gegenüber Verdünnung

Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Konzentration der am stärksten verdünnten untersuchten Probe unterhalb der zuvor mittels Oberflächenspannungs- und Fluoreszenzintensitätsmessungen erhaltenen CMC lag. Die restlichen untersuchten Proben, deren DLS-Messergebnisse in Abbildung 7.3 dargestellt sind, wiesen jeweils eine Gesamttensidkonzentration auf, die oberhalb der CMC des Systems liegt. Wie die Ergebnisse der DLS-Messungen belegen, blieben die volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der MM im Zuge zunehmender Verdünnung bis zu einer bestimmten Konzentration unverändert. Erst nach Unterschreiten des CMC-Wertes kam es zu einer drastischen Änderung der gefundenen Partikelgröße, was sich in einem Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers von etwa 24 nm auf Werte größer als 1000 nm zeigte (Abbildung 7.3). Es konnten nur dann MM nachgewiesen werden, wenn die Konzentration des MM-Systems oberhalb der CMC lag. Nach Unterschreiten der CMC konnten mit der eingesetzten DLS-Technik keine mischmizellaren Größen nachgewiesen werden, wohl aber Partikel, deren hydrodynamischer Durchmesser deutlich oberhalb der Größe von MM liegt. Die Erklärung für dieses Phänomen liegt im Aufbau der vorliegenden MM begründet. Neben dem wasserlöslichen SL bestehen die MM aus hPC und damit wasserunlöslichen Phospholipiden. Oberhalb der CMC sind diese unlöslichen PL in Form von MM als wasserlösliches Assoziat in Wasser gelöst bzw. fein kolloidal verteilt. Nach Unterschreiten der CMC geben sowohl die SL-Moleküle als auch die „in Lösung gehaltenen“ hPC-Moleküle ihren Assoziatverbund auf. Die wasserlöslichen SL-Moleküle gehen dabei molekulardispers in Lösung. Zu einem solchen Verhalten sind die hPC-Moleküle auf Grund ihrer Wasserunlöslichkeit nicht befähigt. In Folge des hydrophoben Effektes werden sich die hPC-Moleküle zu größeren Agglomeraten zusammenlagern, um die Berührungsfläche der größeren hydrophoben Acylreste des hPC mit dem Wasser zu verringern, um damit die Gesamtentropie des Wassers weiterhin möglichst hoch zu halten (Tanford, 1978; Tanford, 1979; Chandler, 2005). Der Peak bei etwa 1000 nm, der in MM-Systemen unterhalb der CMC gefunden wurde, muss daher durch die Anwesenheit größerer hPC-Agglomerate begründet werden. Dieser Befund lässt sich

dadurch bestärken, dass die mittels DLS gefundenen Partikelgrößen in System mit $c < CMC$ nicht reproduzierbar waren und im Bereich von 300 – 5000 nm schwankten. Zudem war bei diesen Verdünnungen mit Konzentrationen unterhalb der CMC der erhaltene PDI-Wert deutlich erhöht (vgl. Abbildung 7.5). Damit lassen sich DLS-Messung an verdünnten MM-Lösungen zur schnellen und einfachen Methode einsetzen, um den Bereich der CMC in MM-Systemen zu ermitteln. Nach DLS-Messungen liegt die CMC im MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 zwischen 0,1 und 0,25 mg/ml, da unterhalb dieser Konzentrationen keine MM mehr nachweisbar sind. Diese Werte korrelieren gut mit den Werten der Fluoreszenzintensitätsmessungen und der Oberflächenspannungsmessungen (vgl. u.a. Tabelle 7.1).

7.2.2 MM-System DPPC+SL WF0.5 ± Diazepam

Auch in dem MM-System DPPC+SL WF_{DPPC}0.5 blieb die CMC unbeladener und mit Diazepam beladener MM nahezu unverändert, wodurch eine vorzeitige Arzneistofffreigabe bei Verdünnung nicht zu erwarten ist (da die CMC durch die Anwesenheit des Modellarzneistoffes nicht ansteigt, Tabelle 7.1). Zunehmende Verdünnungen der unbeladenen und beladenen MM wurden in Konzentrationen sowohl oberhalb als auch unterhalb der CMC mittels DLS untersucht und die Ergebnisse der Partikelgrößenanalyse sind in Abbildung 7.4 dargestellt. In Analogie zu den Untersuchungen im MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 (Abbildung 7.3) konnte gefunden werden, dass unbeladene und beladene Verdünnungen des MM-Systems DPPC+SL WF_{DPPC}0.5 bei Unterschreiten der CMC keine Peaks von mizellarer Größe, dafür aber einen Peak deutlich erhöhten Durchmessers (> 1000 nm) zeigten (Abbildung 7.4). Die Ursache für das Auftreten von Teilchen mit deutlich erhöhtem Durchmesser, bei Konzentrationen unterhalb der CMC, lässt sich in Analogie zu dem Größensprung unterhalb der CMC im MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 begründen: Infolge eines Unterschreitens der CMC kam es zur Destabilisierung der MM, so dass wasserunlösliches DPPC in der Folge des hydrophoben Effekts präzipitierte und die so erhaltenen DPPC-Agglomerate geben ein starkes Streusignal das auf wesentlich größere Partikel als MM schließen lässt (vgl. Abbildung 7.4).

Tabelle 7.1: CMC-Werte (mg/ml) von unbeladenen und mit Diazepam beladenen MM-Systemen nach drei unterschiedlichen Bestimmungsmethoden

MM-System	Fluoreszenz-intensität	Oberflächen-spannung	DLS
hPC+SL WF0.5			
unbeladen	0,15	0,18	0,1-0,25
+ Diazepam	0,20	0,20	0,15-0,25
DPPC+SL WF0.5			
unbeladen	0,12	0,14	0,1-0,3
+ Diazepam	/	0,15	0,1-0,25

Für jedes der untersuchten MM-Systeme konnte die CMC durch DLS-Messungen bestätigt werden (Tabelle 7.1).

Erhöhte PDI-Werte (Abbildung 7.5) unterstreichen die Theorie einer Präzipitation unlöslicher PL (DPPC), da die sehr hohen Werte auf eine unwillkürliche, spontante Zusammenballung der PL-Moleküle schließen lassen. Zudem schwankten die mittels DLS gefundenen Partikelgrößen mit Werten von 300-5000 nm sehr stark, sobald die Konzentration in den Systemen unterhalb der CMC lag. Diese DLS-Methode ermöglicht eine Partikelgrößenbestimmung des Konzentrationsbereiches in dem die CMC des untersuchten Systems liegt. Hierbei wird das Verhalten der MM gegenüber Verdünnungen direkt betrachtet, so dass neben der Lage der CMC auch gleichzeitig Informationen über Veränderungen der MM in Größe und evtl. Form erhalten werden. Im Vergleich zu den Oberflächenspannungsmessungen bietet die DLS-Methode mehrere Vorteile, wie Zeitersparnis oder ein geringeres Probenvolumen von nur etwa 1 ml anstatt 30 ml bei Messungen mit dem Tensiometer. Die DLS-Methode ist zudem robuster, da sie weniger störanfällig, wie etwa gegen Erschütterungen, ist. Im Vergleich zu der Fluoreszenzmethode bietet die DLS-Methode den Vorteil, dass es zwischen hydrophobem

Fluoreszenzfarbstoff und dem hydrophoben AS-Molekül zu keiner Konkurrenzsituation um das hydrophobe Mizellinnere kommen kann.

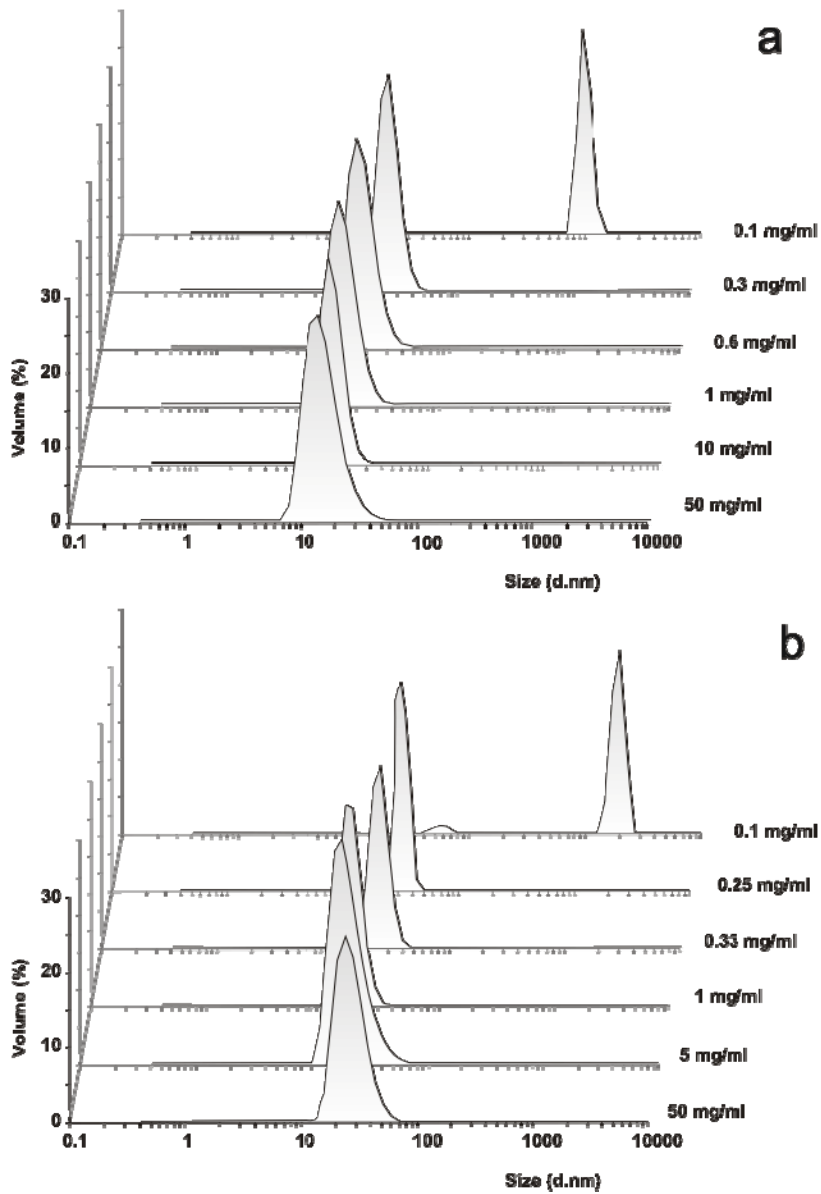


Abbildung 7.4: DLS-Größenmessungen an Verdünnungsreihen des MM-Systems DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ im unbeladenen Zustand (a) und nach Beladung mit Diazepam (b)

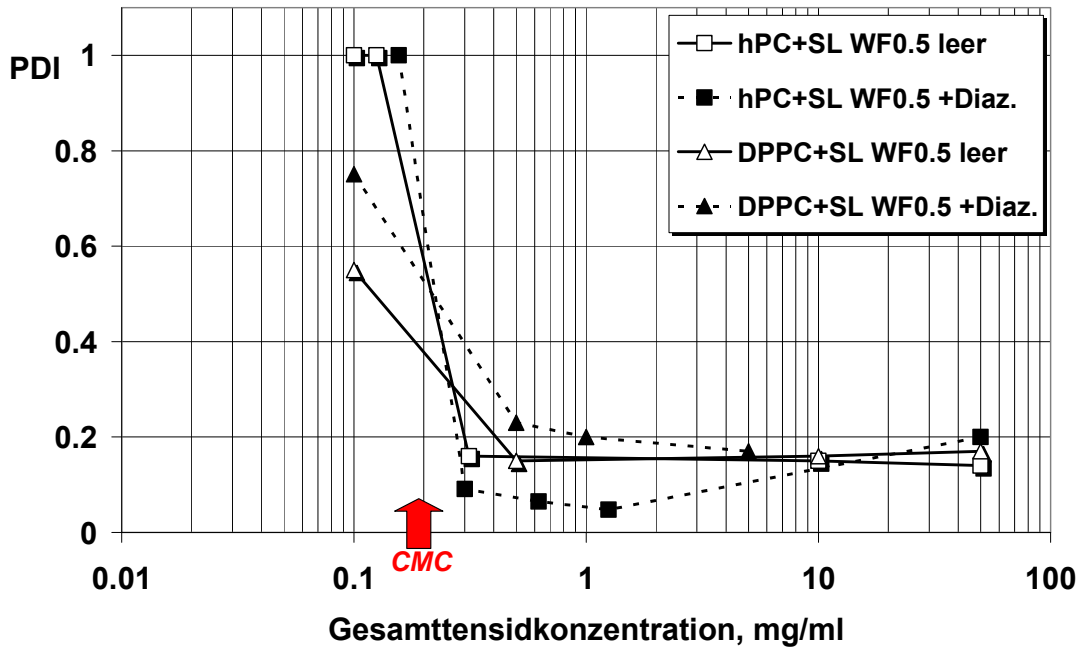


Abbildung 7.5: PDI-Werte der beladenen und unbeladenen MM-Systeme DPPC/hPC+SL WF_{hPC}0.5 bei Konzentrationen oberhalb und unterhalb der CMC

Interessanterweise konnte die DLS-Methode nicht zur Bestimmung der CMC in rein mizellaren „Einkomponenten“-Systemen oder aber zur Detektion der CMC in klassischen MM-Systemen verwendet werden. Bei diesen Systemen ließ sich auch nach Unterschreiten der mittels Oberflächenspannungs- und Fluoreszenzintensitätsmessungen erhaltenen CMC noch ein Peak mit einem hydrodynamischen Durchmesser im mizellaren Größenbereich detektieren. Es kam nicht zu einer Präzipitation. Für rein mizellare Systeme, wie unbeladene SL-Lösungen, erscheint diese Tatsache wenig verwunderlich, da keine wasserunlöslichen Bestandteile vorhanden sind, die nach Unterschreiten der CMC präzipitieren könnten. Nach Unterschreiten der CMC könnte es jedoch weiterhin zur Bildung von Tensid-Dimeren oder -Trimeren kommen, die einer Mizellbildung vorausgehen und ein entsprechendes Lichtstreusignal verursachen. Der Umstand, dass jedoch in klassischen Gallensalz/Lecithin-MM keine Präzipitation von Lecithin (uPC) nachgewiesen werden konnte, ist eher verwunderlich. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich die DLS-Methode zur CMC-Bestimmung nur an MM-Systemen anwenden, die hPC als wasserunlösliches Tensid enthielten.

Klassische MM-Systeme, die uPC anstelle von hPC aufweisen, zeigten keine sprunghafte Änderung der Partikelgröße. Eine mögliche Begründung hierfür könnte sein, dass wasserunlösliche uPC-Moleküle nach Unterschreiten der CMC zwar keine MM mehr mit den Gallensalzen bilden, aber Misch-Assoziate wie Trimere o.ä. weiterhin existent sind. Eventuell verhindern die Gallensalz-Moleküle über eine Dimer- oder Trimerbildung mit uPC Präzipitation der uPC-Moleküle.

8 Ternäre MM-Systeme

8.1 Einleitung

Die bisher betrachteten Mischmizellen stellen binäre Systeme dar, da neben der Phospholipid-Komponente nur ein wasserlösliches Tensid verwendet wurde. Im Folgenden wird gezeigt, wie sich die Anwesenheit einer dritten Komponente auf die MM-Bildung auswirkt. Mit Hilfe dieser Studien sollte herausgefunden werden, ob durch die Verwendung ternärer MM-Systeme eine verbesserte Solubilisierungskapazität erreicht werden kann bzw. ob eine weitere Optimierung der Solubilisierungseffizienz möglich ist. Zu diesem Zweck wurde in ersten Versuchsreihen der Einfluss einer dritten Tensid-Komponente auf die MM-Bildung bzw. die Fähigkeit zur Ausbildung klarer Lösungen mit hPC untersucht.

In dem Kapitel 8.2 werden ternäre MM-Systeme beschrieben, die jeweils einen Masseanteil an hPC von 0.5 ($WF_{hPC}0.5$) aufweisen, da auch die ternären MM-Systeme auf den sehr gut verträglichen PL basieren sollten. In zweiten Teil dieses Abschnitts (Kapitel 8.3) wird gezeigt, wie sich die Kombination von zwei unterschiedlichen PL-Typen auf eine MM-Bildung mit SL auswirkt.

Ein weiterer Grund zur Untersuchung ternärer MM-Systeme besteht darin, das bisher favorisierte MM-System aus DPPC+SL $WF0.5$ hinsichtlich des zu niedrigen Trübungspunktes zu optimieren. Der größte Nachteil dieses MM-Systems liegt in dem zu niedrigen Trübungspunkt (TP), wie in Kapitel 9.6 beschrieben ist. Die Untersuchungen hierzu werden separat in Kapitel 9.6 aufgezeigt und diskutiert.

Die Kernziele ternärer MM-Systeme sind also die Optimierung bzw. Erhöhung der Solubilisierungskapazität, die Forcierung einer MM-Bildung mit Komponenten, die allein mit hPC nicht in Lage sind, klare MM-Lösungen zu generieren und eine Trübungspunkterhöhung (siehe Kapitel 9.6)

8.2 Kombination zweier Tenside mit hPC

8.2.1 Physikochemische Eigenschaften

In einer ersten Versuchsreihe wurden 0.5 Masseanteile an hPC mit variierenden Masseanteilen an SL und SM bzw. M-10D kombiniert. Die unterschiedlichen Kombinationen und die daraus resultierenden System-Zusammensetzungen sind in Tabelle 8.1 aufgeführt. Neben dem hPC bei $WF_{hPC}0.5$ bilden SL und SM bzw. M-10D zusammen 0.5 Masseanteile. Die Systeme wurden nach dem etablierten direkten Dispergierungsverfahren hergestellt und im equilibrierten Zustand analysiert.

Tabelle 8.1: Übersicht über die Zusammensetzung ternärer MM-Systeme aus hPC, SL und SM bzw. M-10D. Aufgelistet sind die Masseanteile (WF) der jeweiligen Komponenten

hPC	SL	SM	hPC	SL	M-10D
0.5	0.0	0.5	0.5	0.0	0.5
	0.1	0.4		0.1	0.4
	0.2	0.3		0.2	0.3
	0.25	0.25		0.25	0.25
	0.3	0.2		0.3	0.2
	0.4	0.1		0.4	0.1
	0.5	0.0		0.5	0.0

Die Abbildung 8.1 zeigt die Ergebnisse der Transmissionsmessungen an 1%igen ternären Systemen aus hPC WF0.5 + SL + M-10D und 5%igen ternären Systemen aus hPC WF0.5 + SL + SM. Wie vorherige Untersuchungen ergaben, ist SM nicht in der Lage, klare Lösungen mit hPC zu bilden, sobald der $WF_{hPC} > 0.1$ (vgl. Kapitel 5.2.2) ist. Eine Kombination mit SL führt zu keinem ternären MM-System, welches die Ausbildung einer klaren Lösung erlaubt (Abbildung 8.1). Andererseits bilden ternäre Systeme aus M-10D und SL mit einem Masseanteil an

hPC $WF_{hPC}0.5$ klare Lösungen, sobald der Masseanteil an SL in diesen Systemen mindestens 0.2 ($WF_{SL}0.2$) beträgt (vgl. Abbildung 8.1). In dem ternären System aus hPC+SL+M-10D wurde durch Kombination von SL mit M-10D ein klares MM-System generiert, was die Kombination von hPC mit M-10D allein nicht ermöglichte.

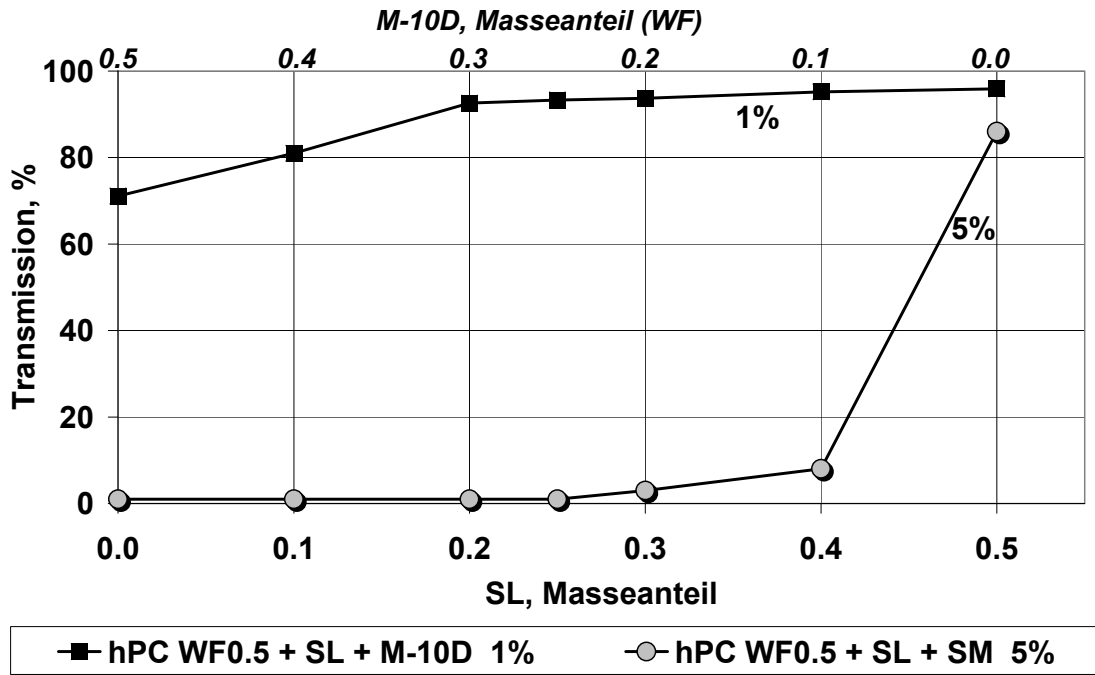


Abbildung 8.1: Transmission ternärer Systeme aus 0.5 Masseanteilen hPC mit SL und M-10D bei $c = 1\%$ sowie mit SL und SM bei $c = 5\%$; in jedem System ergänzen sich SL und M-10D bzw. SM zu 0.5 Masseanteilen

In Abbildung 8.2 sind die beschriebenen und in Tabelle 8.1 aufgeführten ternären Systeme jeweils bei einer Konzentration von 5% in Form photographischer Aufnahmen abgebildet. Wie beschrieben, erkennt man die deutliche Trübung in sämtlichen SM-haltigen Systemen. Dagegen erscheinen die mit 5% hoch konzentrierten ternären Systeme mit M-10D klarer.

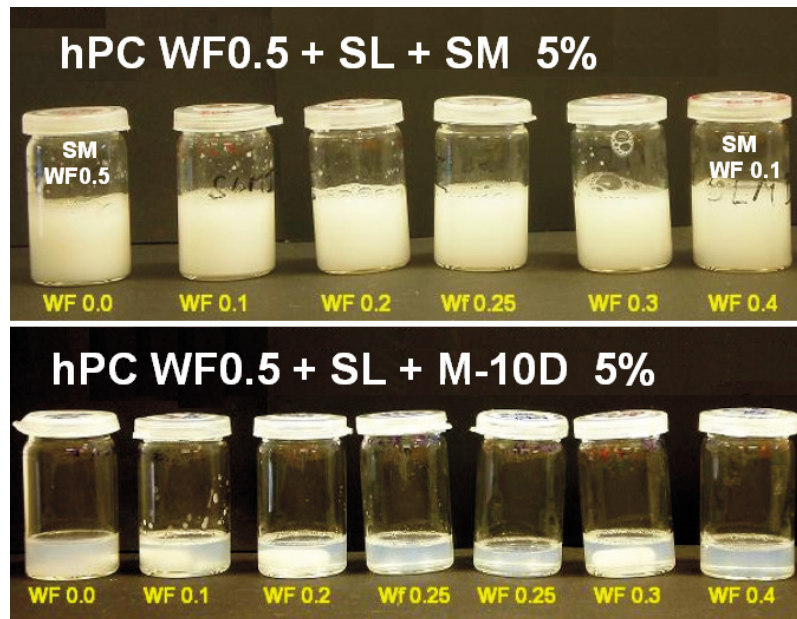


Abbildung 8.2: Visualisierung der Fähigkeit ternärer Systeme, aus SL und SM bzw. SL und M-10D bei $c = 5\%$ klare Lösungen mit 0.5 Masseanteilen hPC ($WF_{hPC0.5}$) zu bilden

Die mittels DLS-Studie ermittelten volumengewichteten hydrodynamischen Durchmesser der MM der binären ($WF_{M-10D}0.0$ und 0.5) und ternären Systeme aus hPC WF0.5 + SL + M-10D sind in der Abbildung 8.3 dargestellt. Mischmizellen aus diesen drei Komponenten haben einen hydrodynamischen Durchmesser von 20-24 nm. Dabei nimmt die Größe der MM mit steigendem Anteil an M-10D, und damit verbunden abnehmenden Anteil an SL, zu. Dieser Erkenntnis liegt die Tatsache zugrunde, dass M-10D mit der Myristinsäure einen längeren hydrophoben Rest trägt als SL mit Laurinsäureresten. Folglich waren größere Radien der MM mit höherem Anteil an M-10D erwartet worden. Die Ergebnisse dieser DLS-Studie korrelieren gut mit den zuvor an binären MM-Systemen aus hPC und SL bzw. M-10D gefundenen Ergebnissen (vgl. Kapitel 5.2.1.2 und Kapitel 5.2.2.2).

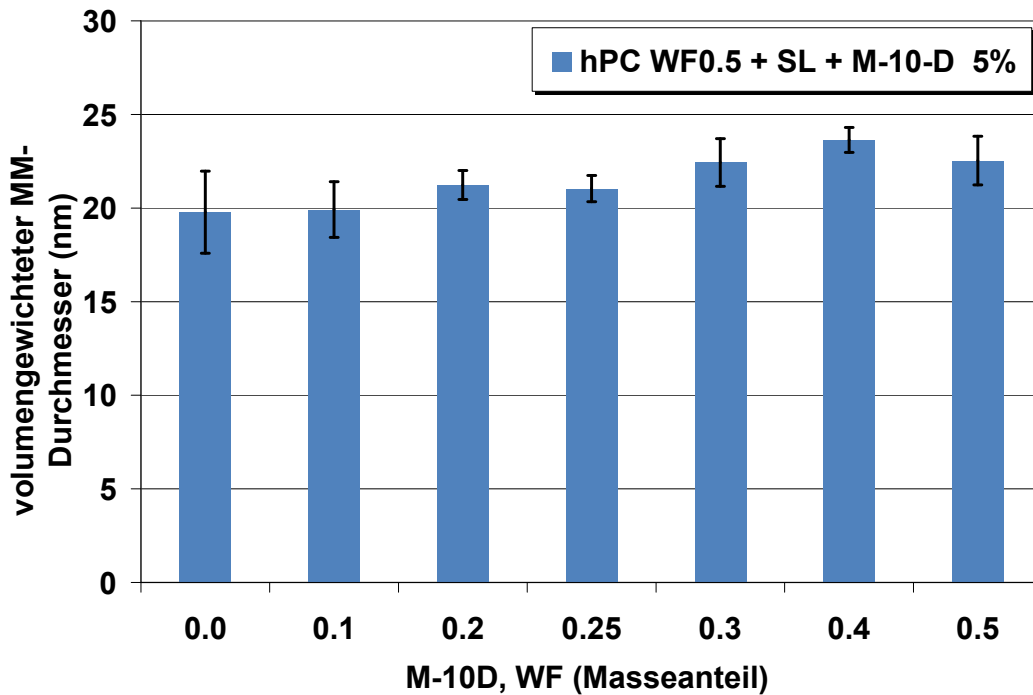


Abbildung 8.3: volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser von ternären MM aus hPC bei WF0.5 mit SL und M-10D bei $c = 5\%$ (DLS-Studie); umgerechnet gegen die Viskosität von 1,24 mPas; $n = 3$

Wie Voruntersuchungen ergaben, bilden nur solche ternären Systeme klare Lösungen mit hohen Anteilen an hPC ($WF_{hPC}0.5$), deren Anteil an SL relativ hoch eingestellt ist. Im Folgenden wurden verschiedene Tenside wie Polyglycerollaurat (L-7D), M-10D, Polysorbat 20 oder 80 bei einem Masseanteil von 10% mit hPC und SL zu ternären Systemen kombiniert. Die Abbildung 8.4 zeigt die Transmission solcher ternären Systeme, die neben hPC und SL entweder 0.1 Masseanteile an Polysorbat 20 oder 80 enthalten. Die Lösungen dieser Systeme erschienen in geringen Konzentrationen sehr klar und waren auch bei erhöhter Konzentration von 5% noch recht klar (vgl. Abbildung 8.4 und Abbildung 8.5). Die Abbildung 8.5 zeigt ferner die visuelle Darstellung des ternären MM-Systems hPC WF0.5 + SL + M-10D WF0.1 bei einer Konzentration von 5%.

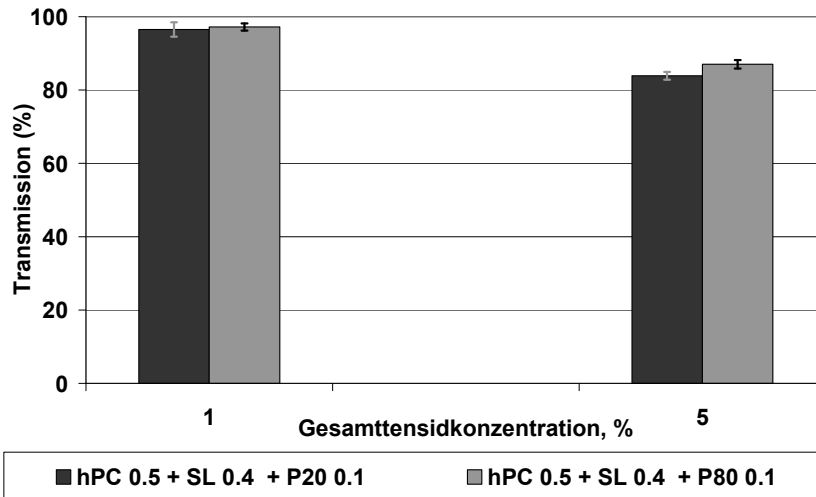


Abbildung 8.4: Transmission ausgewählter ternärer Systeme aus 0.5 Masseanteilen hPC mit SL bei $WF_{SL}0.4$ und Polysorbat 20 (P20) bzw. Polysorbat 80 (P80) bei $c = 1\%$ und 5% dargestellt als Balkendiagramm

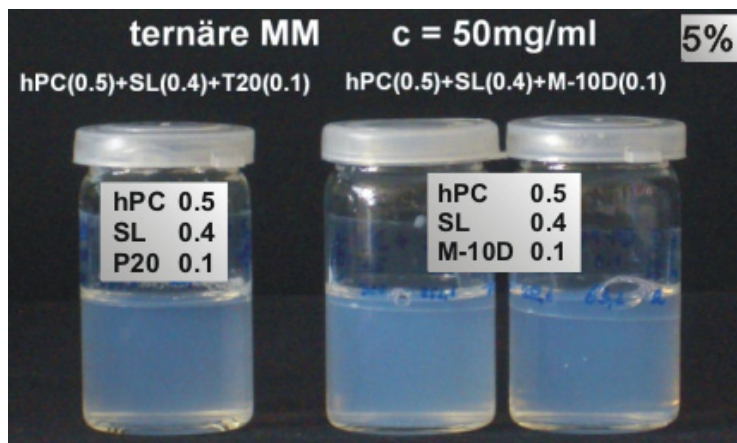


Abbildung 8.5: Visualisierung herausragender ternärer Systeme aus 0.5 Masseanteilen hPC mit SL bei $WF_{SL}0.4$ und Polysorbat 20 (P20, links) bzw. M-10D (rechts) bei erhöhter Gesamttensidkonzentration von 5%

Die DLS-Analyse des ternären Systems hPC WF0.5 + SL WF0.4 + Polysorbat 80 WF0.1 zeigt Mischmizellen, die im unbeladenen Zustand einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 19 nm und nach Beladung mit Diazepam einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 25 nm aufweisen (Abbildung 8.6).

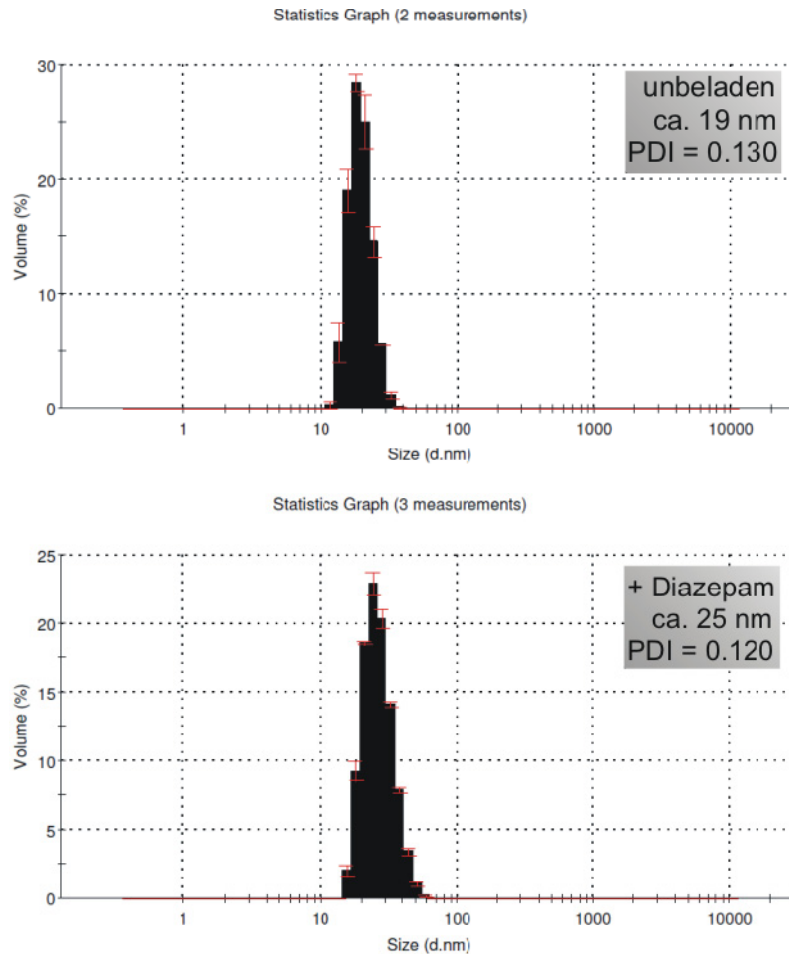


Abbildung 8.6: Dichteverteilungskurven der Partikelgrößenanalyse im ternären MM-System hPC WF0.5 + SL WF0.4 + Polysorbat 80 WF0.1 im unbeladenen und mit Diazepam beladenen Zustand; $c = 1\%$, $n = 3$

Wie die Tabelle 8.2 zeigt, liegt die CMC des zuletzt beschriebenen Polysorbat 80-haltigen MM-Systems im unbeladenen Zustand bei etwa 0,05 mg/ml (nach Messung der Fluoreszenzintensität von DPH) und nach Diazepam-Beladung bei 0,16 - 0,3 mg/ml. Zu beachten ist, dass die Ergebnisse aus einer Dreifachbestimmung resultieren, die jedoch nur an einer einzelnen Charge durchgeführt wurde. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Anwesenheit von Diazepam zu einem Anstieg der CMC führte. Dies könnte durch eine Wechselwirkung von Diazepam mit den ternären MM bzw. mit Polysorbat 80 im MM-System bedingt sein.

Tabelle 8.2: CMC-Werte ausgewählter ternärer MM-Systeme im unbeladenen und mit Diazepam beladenen Zustand. Ergebnisse nach Oberflächenspannungs- bzw. Fluoreszenzmessungen; je n=3 (eine Charge; n.u. = nicht untersucht)

Masseanteil an Tensid, WF			AS	CMC in mg/ml	
hPC	SL	3. Komponente	Diaz.	Oberfl.	Fluoresz.
0.5	0.4	P80 0.1	-	n.u.	0,05
0.5	0.4	P80 0.1	+	0,3	0,16
0.5	0.4	M-10D 0.1	-	0,23	n.u.

In Anbetracht der Tatsache, dass MM-Systeme aus hPC+SL WF_{hPC}0.5 nach Beladung mit Diazepam keinen Anstieg der CMC zeigen, kann gefolgert werden, dass eine Wechselwirkung von Polysorbat 80 mit Diazepam zu dem CMC-Sprung geführt hat. Nach Einbringen von Diazepam in das System wurde dieses eventuell an der Oberfläche der MM bzw. an den PEG-Gruppen des Polysorbat 80 adsorbiert. So zeigte die DLS-Analyse dieses Systems vor und nach Diazepam-Beladung einen Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers von 19 auf 25 nm. Eine mizellare Solubilisierung von Arzneistoffen kann über die Aufnahme ins Mizellinnere, über den Einbau in die Mizellhülle oder über die Adsorption an die Mizelloberfläche realisiert werden (Torchilin, 2007). Das ternäre MM-System hPC WF0.5 + SL + M-10D WF0.1 zeigt eine CMC von etwa 0,23 mg/ml nach Oberflächenspannungsmessungen (Tabelle 8.2).

8.2.2 Solubilisierung von hydrophoben Arzneistoffen

In den ternären MM-Systemen aus hPC WF0.5 + SL + M-10D steigt die Solubilisierungskapazität für Diazepam mit abnehmendem Anteil an M-10D, und damit verbunden steigendem Anteil an SL (Abbildung 8.7). Dieser Trend war erwartet worden, da in vorherigen Untersuchungen

gezeigt werden konnte, dass M-10 deutlich weniger Diazepam zu solubilisieren vermag als SL (vgl. Kapitel 6.3). Ternäre MM-Systeme mit höherem SL-Anteil solubilisieren mehr Diazepam als ternäre MM-Systeme mit höherem Anteil an M-10D.

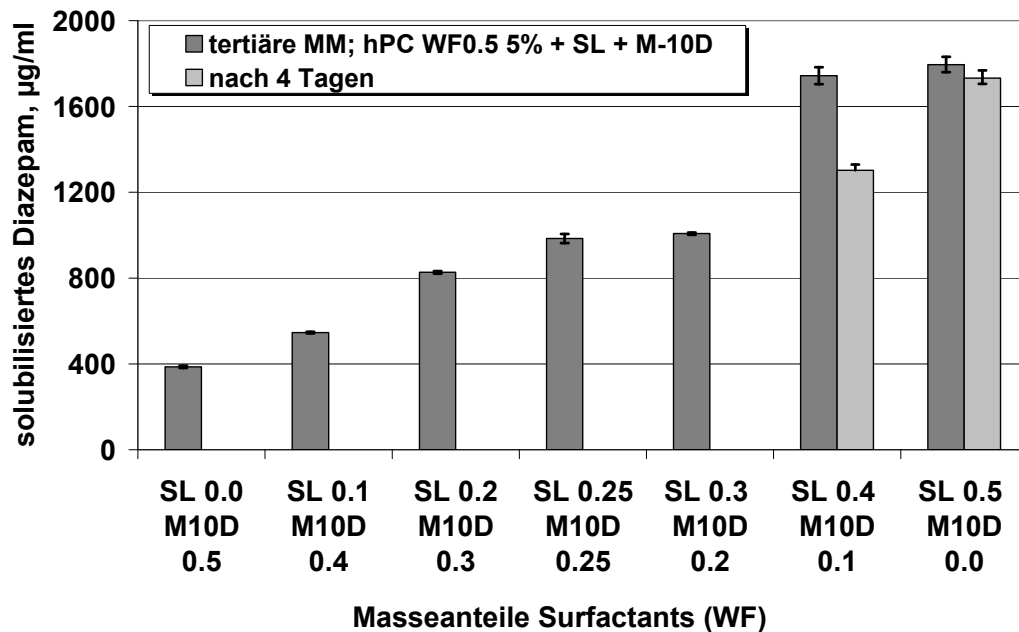


Abbildung 8.7: Solubilisierungskapazitäten ternärer MM aus hPC bei WF0.5 mit SL und M-10D bei $c = 5\%$ für Diazepam

Im Vergleich zu dem MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 zeigt nur das ternäre MM-System mit 0.1 Masseanteil an M-10D eine ähnlich hohe Solubilisierungskapazität für Diazepam, die jedoch nach einigen Tagen Lagerzeit nicht mehr wiedergefunden werden konnte (Abbildung 8.7), so dass dieses ternäre MM-System eine zu geringe Stabilität aufzuweisen scheint.

Wie bereits beschrieben, konnten nur solche ternären Systeme, die neben 0.5 Masseanteilen hPC noch 0.4 Masseanteile SL aufweisen, klare Lösungen mit einer dritten Komponente ausbilden. Als dritte Komponente wurden in entsprechenden ternären Systemen 0.1 Masseanteile an Decaglycerollaurat (L-7D), -myristat (M-10D), Polysorbat 20 und 80 bzw. Cholsäure-Na (CS) eingesetzt. Die Solubilisierungskapazitäten dieser ternären Systeme wurden bei einer

Gesamtkonzentration von 5% bestimmt und mit denen vom MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 verglichen (Abbildung 8.8).

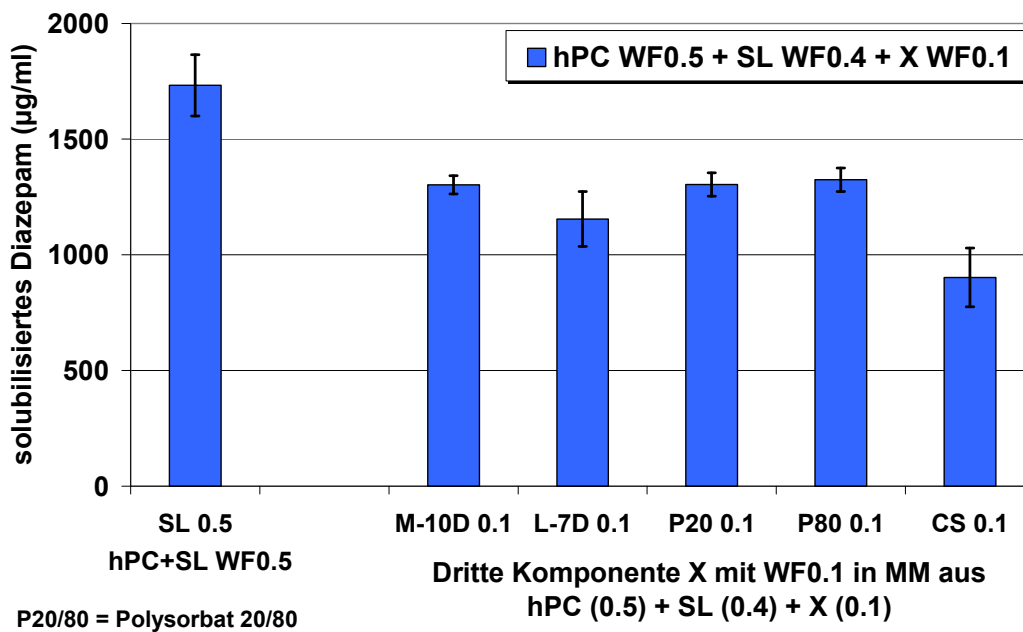


Abbildung 8.8: Solubilisierungskapazitäten ternärer MM aus hPC WF0.5 und SL WF0.4 sowie unterschiedlichen Tensiden bei einem WF0.1; P20/80 = Polysorbat 20/80, c = 5%

Durch keines der entsprechenden ternären Systeme konnte eine Optimierung der Solubilisierungskapazität für Diazepam gegenüber dem MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 erreicht werden. Abschließend kann festgehalten werden, dass keines der eingesetzten Tenside als dritte Komponente neben hPC und SL die Fähigkeit zur Bildung klarer Lösungen oder aber die Solubilisierungskapazität für Diazepam verbessern konnte.

8.3 Kombination zweier Phospholipide mit SL

Während zuvor durch Einbringen eines weiteren wasserlöslichen Tensids eine Optimierung durch ein ternäres System erreicht werden sollte, wird in diesem Abschnitt der Einfluss einer zweiten PL-Komponente auf die MM-Bildung und die Solubilisierungskapazität so erhaltener ternärer MM-Systeme diskutiert.

Wie in Kapitel 9.6 gezeigt wird, bedingt die Gegenwart von DPPC statt hPC neben 0.5 Masseanteilen SL im MM-System einerseits einen niedrigen Trübungspunkt, andererseits lassen sich durch DPPC auch bei höheren Konzentrationen und höheren Anteilen (an DPPC) sehr klare MM-Lösungen ohne Abnahme der Transmission erhalten. Im Folgenden wird gezeigt, wie sich die Kombination von hPC und DPPC zu ternären MM-System mit SL auf die Eigenschaften dieser Systeme auswirkt. Ternäre MM-Systeme aus hPC und DPPC je mit einem WF0.25 und SL bei einem WF0.5 erscheinen als klare Lösungen (Abbildung 8.9 links), die MM mit einem hydrodynamischem Durchmesser von etwa 16 nm aufweisen (Abbildung 8.9 rechts). Auch nach der Beladung dieser ternären MM mit dem hydrophoben Modellarzneistoff Diazepam schwellen die MM nur in geringem Ausmaß auf etwa 18 nm an, was auf stabile Solubilisat-Bildung schließen lässt. Auch die Untersuchungen zur Solubilisierungskapazität dieses ternären MM-Systems zeigen keinen Nachteil gegenüber dem MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5, wie die Abbildung 8.10 am Beispiel 1%iger MM-Systeme zeigt.

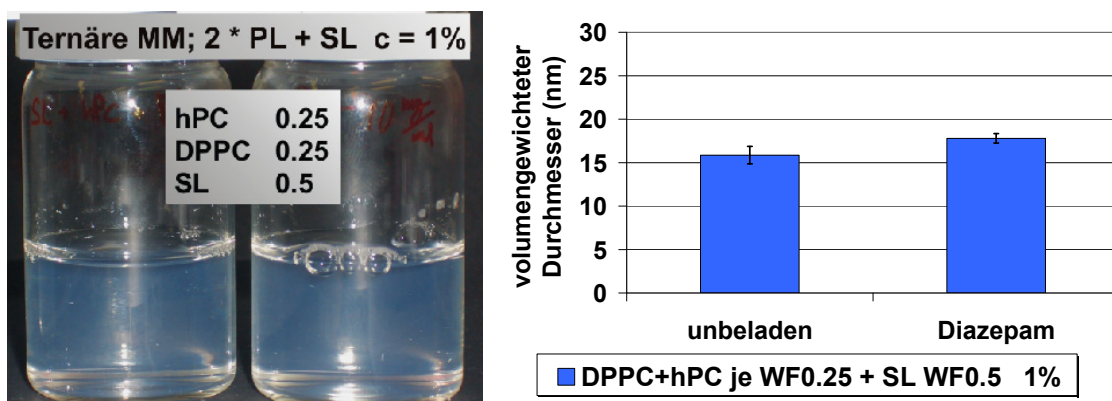


Abbildung 8.9: Visualisierung des ternären MM-System hPC+DPPC 0.25 + SL 0.5 (links) und DLS-Messergebnisse der gefundenen MM-Größen (rechts)

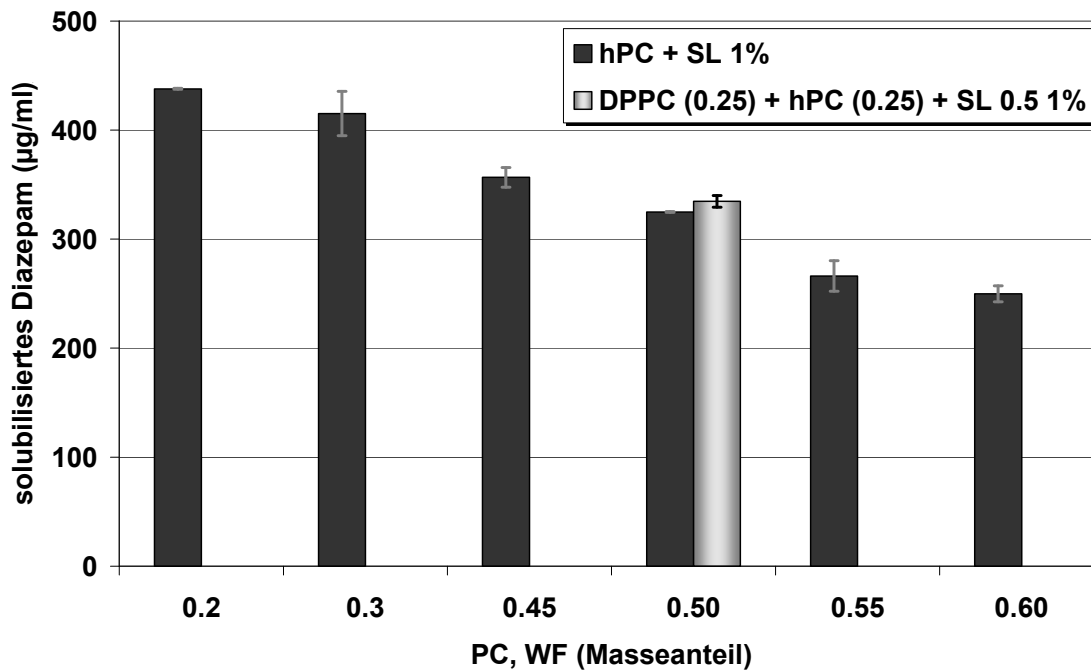


Abbildung 8.10: Diazepam Solubilisierung in 1%igen MM-Systemen; graue Balken steht für das ternäre MM-System hPC+DPPC 0.25 + SL 0.5

Die Solubilisierungskapazität für Diazepam konnte durch die Gegenwart von 0.25 Masseanteilen an DPPC (grauer Balken, Abbildung 8.10) in den niedrig konzentrierten MM-Systemen nicht erhöht werden (im Vergleich zu binären Systemen aus hPC und SL).

Als weitere ternäre Komponente auf PL-Basis wurde das PEGylierte PL DSPE-PEG in unterschiedlichen Anteilen mit hPC zu ternären MM mit SL kombiniert. In jedem untersuchten ternären System kam es hierbei zur Ausbildung klarer Lösungen (gezeigt in Kapitel 9.6), in denen MM mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 14-18 nm nachgewiesen werden konnten (Abbildung 8.11).

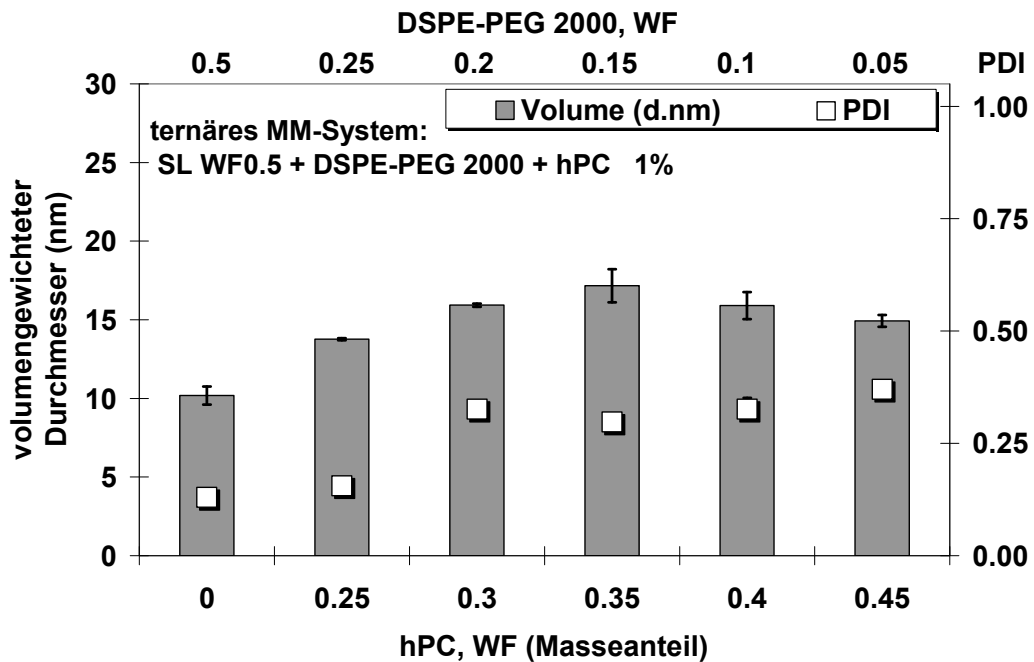


Abbildung 8.11: volumengewichtete hydrodynamische Durchmesser von ternären SL-haltigen MM mit hPC und DSPE-PEG; der Masseanteil an SL in den MM ist mit 0.5 (WF0.5) in jedem System konstant; $c = 1\%$, $n = 3$

Die Abbildung 8.12 zeigt die Resultate einer DLS-Studie an drei unterschiedlichen MM-Systemen, die neben SL aus DSPE-PEG und ggf. hPC aufgebaut sind und sowohl im unbeladenen als auch im Diazepam-beladenen Zustand analysiert wurden. Interessanterweise zeigen die ternären MM, die sowohl DSPE-PEG und hPC enthalten, einen Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers nach Diazepam-Beladung von etwa 14 auf 19 nm bzw. von 15 auf 18 nm. Im Vergleich zu den ternären MM-Systemen aus DPPC/hPC+SL WF_{PC}0.5 erscheint dieser Größenzuwachs recht hoch, wogegen die in der Literatur beschriebenen sterisch stabilisierten MM nach AS-Beladung aus PEGylierten PL und nicht PEGylierten PL zwar keinen deutlichen, wohl aber einen notierbaren Anstieg der MM-Größe aufzeigen (Gao et al., 2002).

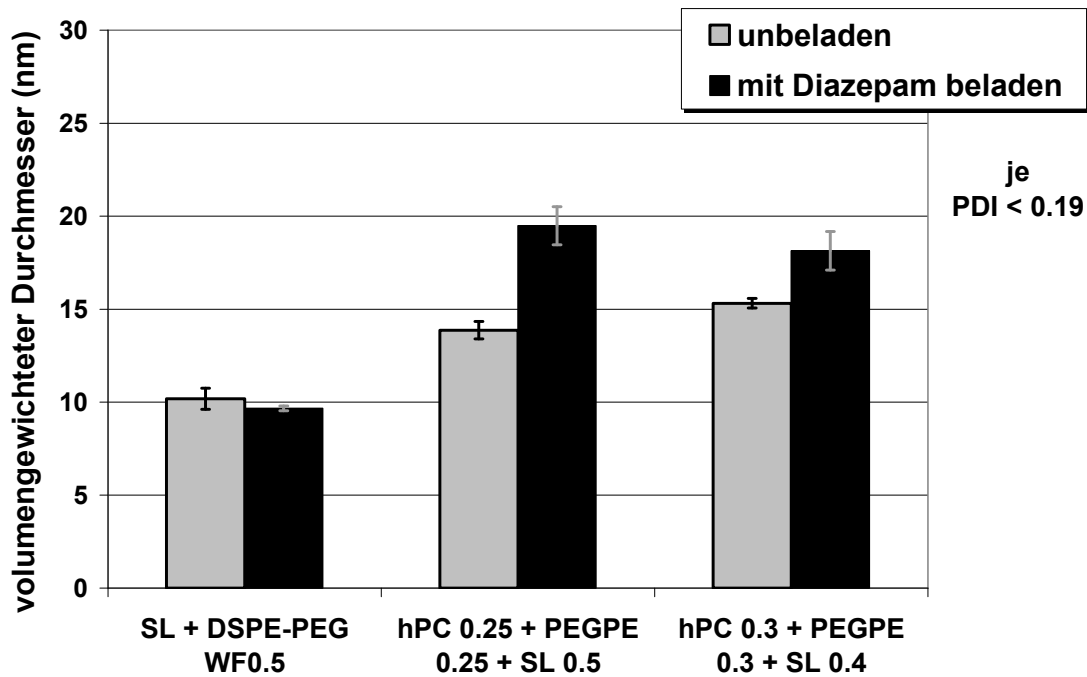


Abbildung 8.12: hydrodynamische Durchmesser von ternären SL-haltigen MM mit hPC und DSPE-PEG; unbeladene und mit Diazepam beladene MM; $c = 1\%$ (DLS-Studie)

Die Abbildung 8.13 vergleicht die Solubilisierungskapazitäten der favorisierten binären MM-Systeme mit ausgewählten ternären MM-Systemen. Dabei sind die erhaltenen Solubilisierungskapazitäten für ternäre MM-Systeme, die neben hPC und SL entweder DSPE-PEG oder C₁₂-PL als dritte Komponente enthalten, aufgeführt. In Voruntersuchungen (siehe auch Kapitel 5.4) wurde gefunden, dass die kurzkettigen PL des Gemisches C₁₂-PL in der Lage sind, relativ klare Lösungen mit SL auszubilden. Es wurde nun untersucht, inwieweit diese PL sich als dritte Komponente eignen, um die Solubilisierungskapazität für Diazepam zu steigern. Auch die Solubilisierungskapazitäten binärer MM-Systeme ohne hPC, aber mit 0.5 Masseanteilen an DSPE-PEG oder C₁₂-PL neben SL, sind dargestellt. Die aufgezeigten Ergebnisse dieser Solubilisierungsstudie zeigen, dass kein ternäres System, welches neben hPC und SL ein weiteres PL aufwies, in der Lage war, die Solubilisierungskapazität für Diazepam im Vergleich zu dem MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 zu verbessern.

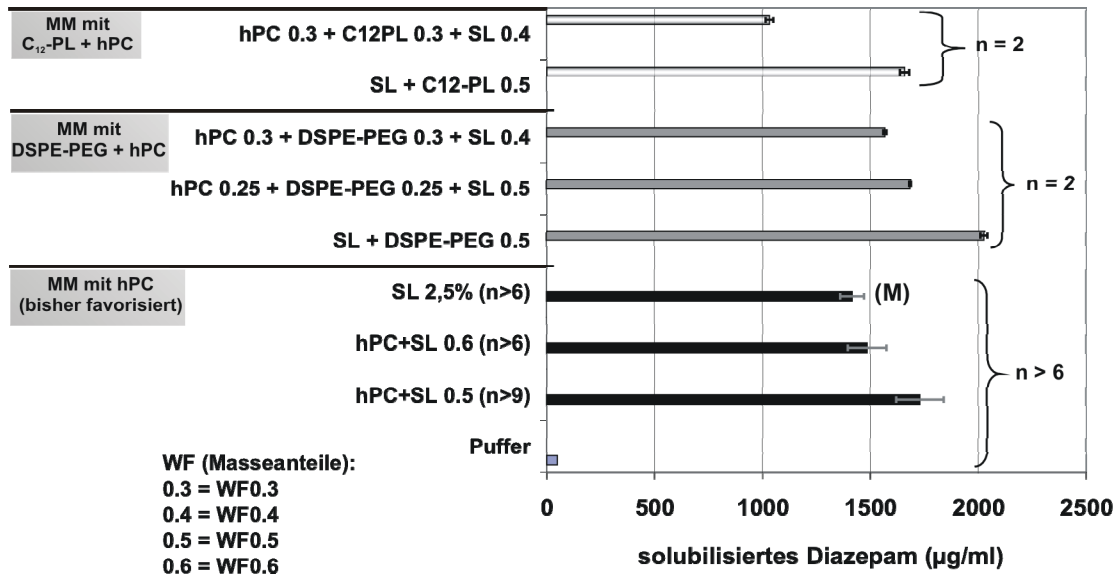


Abbildung 8.13: Diazepam-Solubilisierung in 5%igen SL-haltigen MM-Systemen; Vergleich bisher favorisierter MM-Systeme mit binären und ternären MM-System auf Basis von PEGylierten-PL bzw. C₁₂-PL

Der Einsatz von DSPE-PEG neben hPC hatte keinen negativen Einfluss auf die Solubilisierungskapazität entsprechender MM-Systeme für Diazepam (im Vergleich zu Systemen ohne DSPE-PEG). Sobald das in dem favorisierten MM-System verwendete Phospholipid hPC gänzlich durch DSPE-PEG ausgetauscht wurde, wodurch ein neues binäres MM-System SL+DSPE-PEG WF0.5 vorlag, erhöhte sich die Solubilisierungskapazität für Diazepam auf über 2 mg/ml (vgl. Abbildung 8.13). In keinem bisher untersuchten MM-System konnte eine so hohe Solubilisierungskapazität (> 2 mg/ml) erreicht werden. Das eingesetzte DSPE-PEG stellt jedoch das einzige verwendete PL dar, welches eine gute Wasserlöslichkeit besitzt. Zudem ist es selbst in der Lage, Mizellen auszubilden und im Zuge einer MM-Bildung mit SL müssen die DSPE-PEG Moleküle nicht erst (wie bei dem wasserunlöslichem hPC) von dem SL in Form von MM solubilisiert werden. Folglich ist eine erhöhte Solubilisierungskapazität kein überraschendes Ergebnis.

9 Stabilität von MM-Systemen

9.1 Langzeitstabilität

9.1.1 Einleitung

In diesem Kapitel soll der Einfluss der Lagerzeit auf die Stabilität unterschiedlicher MM-Systeme dargestellt werden. Dabei sind sowohl unbeladene als auch mit dem Modellarzneistoff Diazepam beladene MM-Systeme untersucht worden. Sämtliche hier beschriebenen Systeme lagen als wässrige Systeme (in nicht lyophilisierter Form) vor. Im Laufe der Lagerungszeit kann es folglich zu einer physikalischen Instabilität im Sinne einer Präzipitation der wasserunlöslichen Phospholipide kommen. Hier wäre es möglich, dass die Tensidmoleküle die PL-Moleküle nicht mehr in Form von MM solubilisiert halten können und es zum Ausfallen der PL-Moleküle aus dem MM-Assoziat und damit zur Ausflockung kommt. Dies könnte zudem durch eine chemische Instabilität begünstigt werden. Mit steigender Lagerzeit kann es auch zur Hydrolyse der Esterbindungen im PL- oder im Tensid-Molekül kommen. Die Hydrolyse von PL wie Phosphatidylcholin im Wässrigen folgt einer Pseudo-1.Ordnung-Kinetik (Grit et al., 1989; Grit und Crommelin, 1993; Werling et al., 2008). Die Hydrolyse von Phosphatidylcholin ist dabei basen- oder säurekatalysiert, wobei die pH-neutralen Systeme die geringste Hydrolyse aufweisen (Grit und Crommelin, 1993). In einem ersten Schritt der Hydrolyse kommt es infolge der Abspaltung einer der beiden Fettsäuren zur Bildung von Lysophosphatidylcholin (Grit und Crommelin, 1993; Werling et al., 2008). Das Lysophosphatidylcholin kann weiterem hydrolytischem Abbau unterliegen, so dass es zur Bildung von α -Glycerinphosphat kommt. Die Studie zur Untersuchung der Langzeitstabilität beinhaltet die MM-Systeme hPC bzw. DPPC + SL WF_{PC}0.5. Die eingesetzten gesättigten PC-Typen folgen der zuvor beschriebenen hydrolytischen Zersetzung. Das eingesetzte Sucroselaurat (SL) kann ebenso hydrolytisch zersetzt werden. Dabei kann es über die Hydrolyse der Esterbindungen zur Abspaltung der Laurinsäure von der Saccharose kommen. Die Abbildung 9.1 illustriert die möglichen

Zersetzungsreaktionen und Zersetzungsprodukte der untersuchten MM-Systeme in einer schematischen Darstellung.

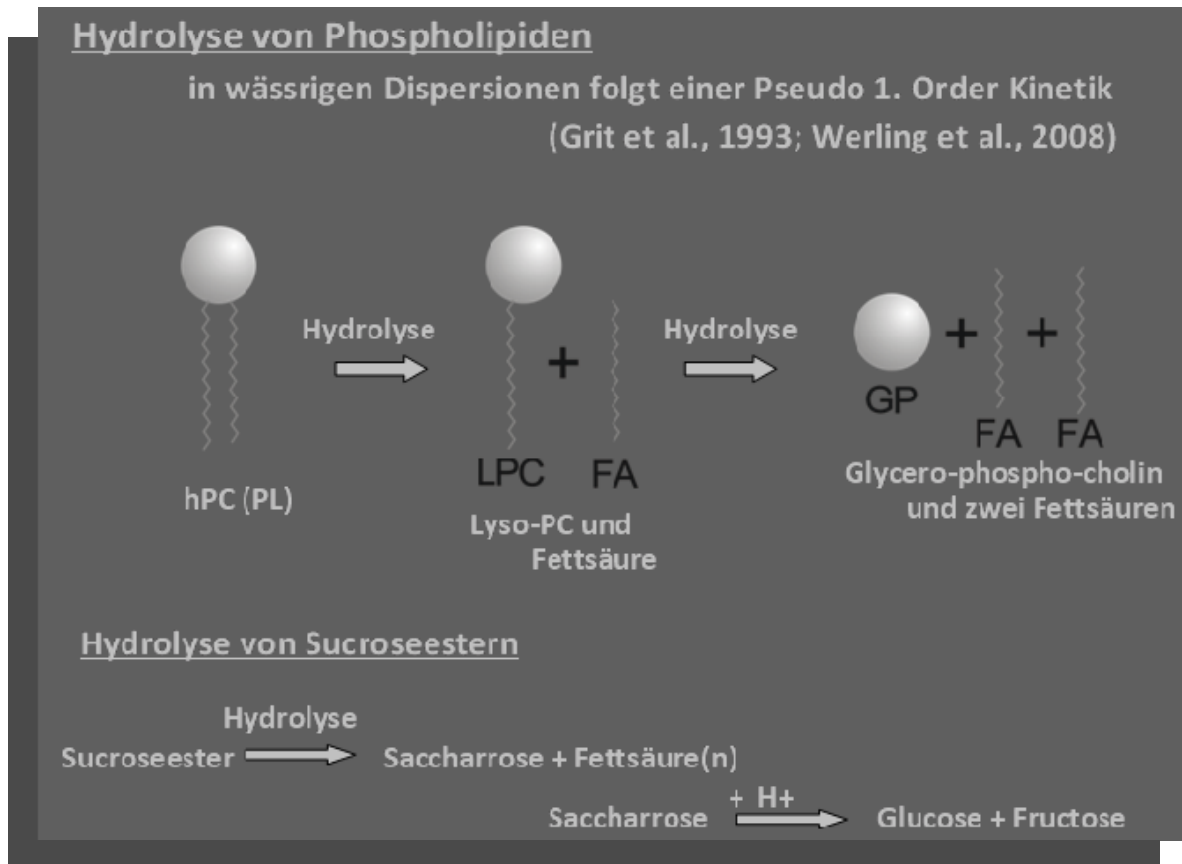


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung der hydrolytischen Zersetzung der Komponenten favorisierter MM-Systeme aus einem gesättigten PL und SL

9.1.2 Einfluss der Lagerzeit auf die Klarheit von MM-Lösungen und die Größe der Mischmizellen

Die Abbildung 9.2 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der MM-Systeme, die zur Evaluierung der Langzeitstabilität nach dem in Kapitel 3.5 beschriebenen Verfahren hergestellt und untersucht worden sind. Es kamen zwei unterschiedliche Herstellerchargen des Sucroselaurats zum Einsatz. Zu unterscheiden sind hier Surfhope D-1216 mit der Bezeichnung 6Y139 als SL Charge 1 (in SA1) sowie die Charge Surfhope D-1216 „7609911A“, die als SL Charge 2 (in SA2 und SB2) bezeichnet wird. Die Systeme aus hPC bzw. DPPC + SL WF_{PC}0.5 wurden in 1 und 5%iger Konzentration untersucht, wobei jeweils eine

Charge bei 5°C (Abkürzung „k“) im Kühlschrank und eine bei RT (20-25°C, Abkürzung „n“) gelagert worden sind.

SA1 = hPC + SL WF0.5	SL Charge 1		
SA2 = hPC + SL WF0.5	SL Charge 2		
SB2 =DPPC + SL WF0.5	SL Charge 2		
n = RT (25°C)	k = kalt = 5°C	1 = 1%	5 = 5%
12 unterschiedliche Stabilitätsproben			
SA1 n 1	SA2 n 1	SB2 n 1	
SA1 n 5	SA2 n 5	SB2 n 5	
SA1 k 1	SA2 k 1	SB2 k 1	
SA1 k 5	SA2 k 5	SB2 k 5	

Abbildung 9.2: Übersicht über die Zusammensetzung der Stabilitätsproben und Untersuchungsbedingungen zur Evaluierung der Langzeitstabilität

Mit zunehmender Lagerungszeit kam es in den MM-Systemen aus SL+hPC WF_{hPC}0.5 zu einer leichten Abnahme der Lichttransmission, sofern die Gesamttensidkonzentration bei 5% lag. Diese Transmissionsabnahme zeigte sich bei Lagerung bei RT deutlicher als bei kühler Lagerung, wo die Abnahme der Transmission nur etwa bei 3-4% lag (vgl. Abbildung 9.3). In geringer konzentrierten MM-Systemen führte eine Lagerungszeit von 150 Tagen nur zu einer geringer Abnahme der Transmission (vgl. Abbildung 9.3 und Abbildung 9.5 rechts). Eine Kühlung der MM-Systeme während der Lagerung bedingt sowohl in niedrig als auch in höher konzentrierten Proben eine geringere Abnahme der Transmission.

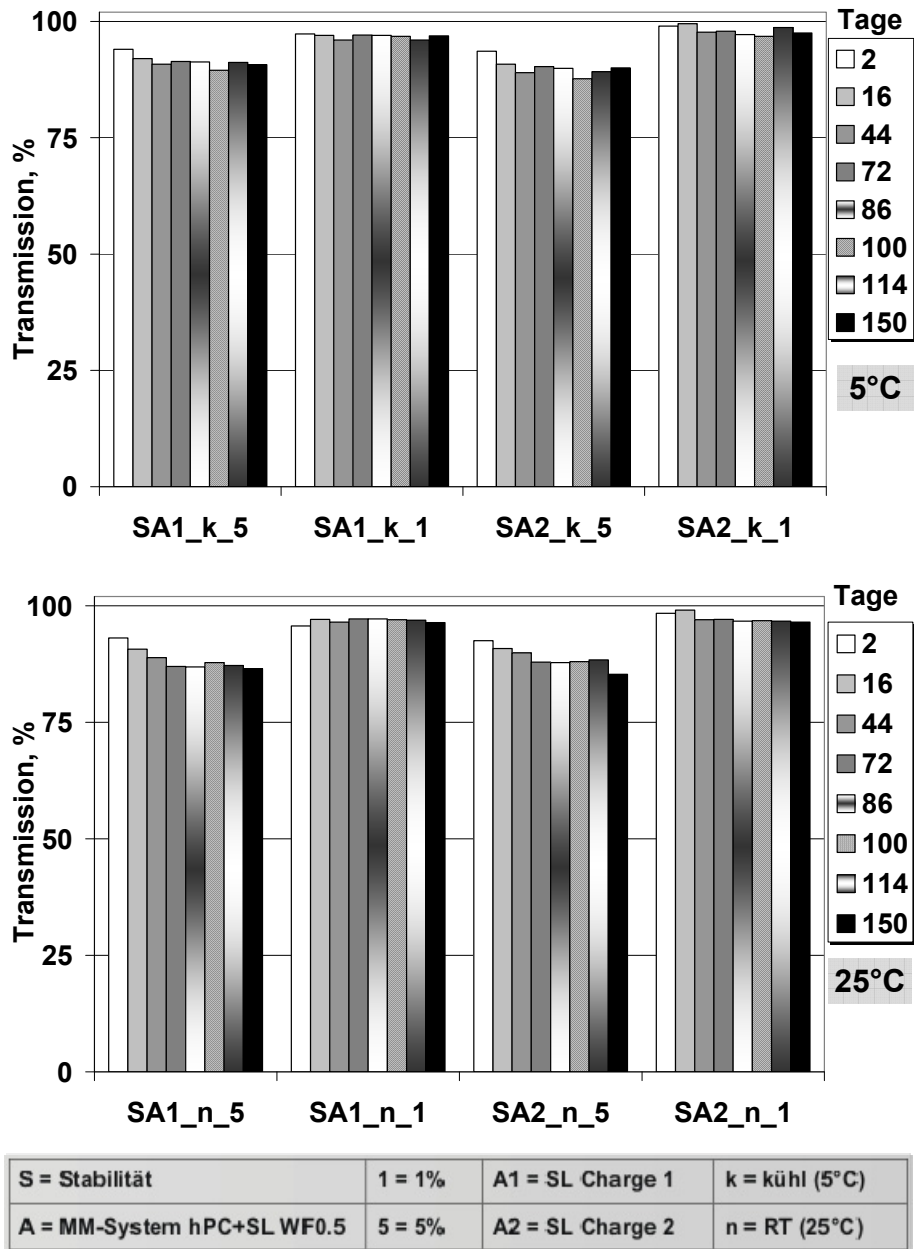


Abbildung 9.3: Transmissionsabnahme der MM-Systeme aus hPC+SL WF_{hPC}0.5 über eine Lagerungszeit von 150 Tagen, c = 1 oder 5%; Lagerung bei 5°C (oben) und Lagerung bei 25°C (unten)

MM-Systeme aus DPPC+SL WF_{hPC}0.5 zeigten prinzipiell dieselben Abhängigkeiten gegenüber den Lagerungsbedingungen und einer Konzentrationsabhängigkeit wie Systeme aus hPC+SL WF_{hPC}0.5. Jedoch zeigten MM-Systeme des Typs DPPC+SL WF_{hPC}0.5 insgesamt eine geringere Transmissionsabnahme über eine Lagerungszeit von 150 Tagen

(Abbildung 9.4). Anzumerken ist weiterhin, dass niedrig konzentrierte Systeme dieses Typs bei Aufbewahrung im Kühlschrank nahezu keine Abnahme der Transmission aufwiesen.

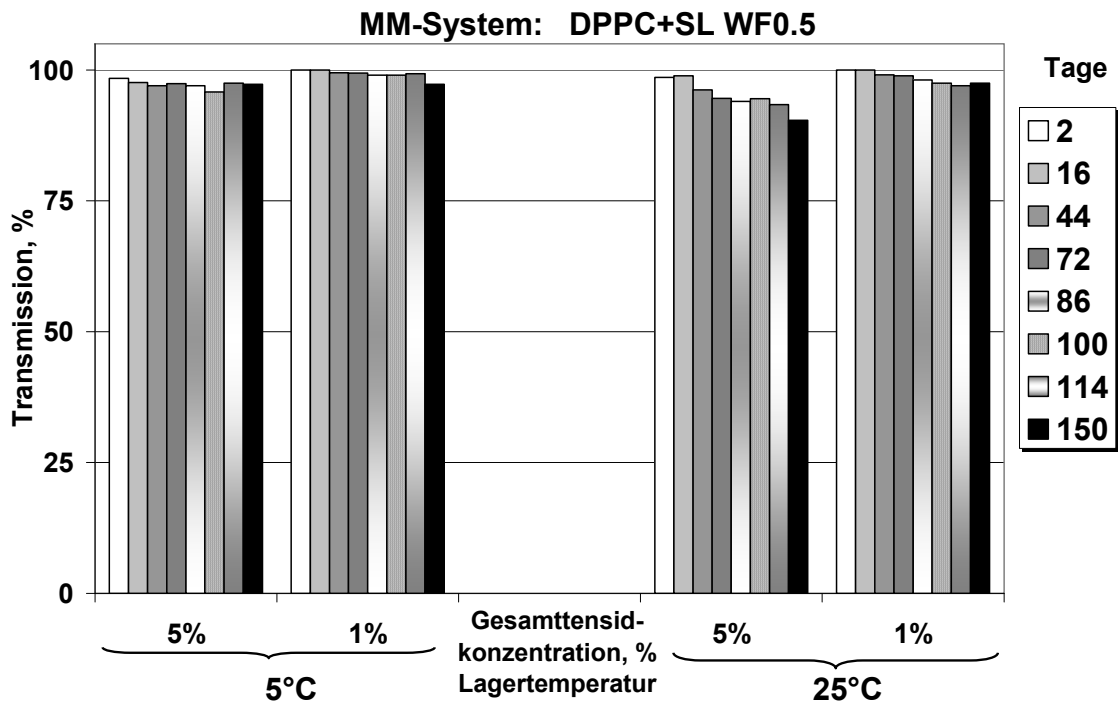


Abbildung 9.4: Transmissionsabnahme der MM-Systeme aus DPPC+SL WF_{DPPC}0.5 über eine Lagerungszeit von 150 Tagen; $c = 1$ oder 5%

Zur Visualisierung sind in Abbildung 9.5 (links) die kühl gelagerten Systeme der Langzeitstabilitätsuntersuchungen nach einer Lagerungszeit von 230 Tagen abgebildet. Daneben sind 1%ige MM-Systeme in den verschließbaren Untersuchungsküvetten zu sehen, die bei RT über 230 Tage aufbewahrt wurden (Abbildung 9.5 rechts). Niedrig konzentrierte MM-Systeme blieben über eine Lagerungszeit von 230 Tagen transparent, und es kam zu keiner Trübung als Folge einer Präzipitation von PC. An dieser Stelle ist anzumerken, dass eine unbedingte aseptische Herstellung und Abfüllung der wässrigen Lösungen einzuhalten ist, da zuvor nicht aseptisch hergestellte Systeme bereits nach ca. vier Wochen eine deutliche Trübung bzw. Verfärbung aufwiesen (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 9.5: Visualisierung der Langzeitstabilität (230 Tage) der untersuchten MM-Systeme (links: Lagerung bei 5°C $c = 1$ und 5%; rechts: Lagerung bei RT, $c = 1\%$, Proben in verschließbaren Küvetten)

Die DLS-Messergebnisse der Größenanalyse der MM-Systeme des Typs hPC+SL WF_{hPC}0.5 sind in Abbildung 9.6 über eine Lagerzeit von 175 Tagen dargestellt. Bei kühler Lagerung kam es in keinem der untersuchten MM-Systeme zu einer signifikanten Veränderung der gefundenen hydrodynamischen MM-Durchmesser. Dies wurde sowohl für 1%ige als auch für 5%ige MM-Systeme gefunden. Die Verwendung unterschiedlicher Herstellerchargen SL führte zu keiner Veränderung der MM-Durchmesser. Diese liegen in den kühl gelagerten 1%igen Systemen etwa bei 22 ± 2 nm und in 5%igen Systemen etwa bei 19 ± 2 nm. Die konzentrationsabhängigen Unterschiede in den gefunden Partikelgrößen sind darin begründet, dass die Proben in Abhängigkeit von ihrer Konzentration bei unterschiedlichen Viskositäten vermessen wurden. Für 1%ige Systeme wurde bei den DLS-Messungen eine Viskosität von 0,95 mPas und für 5%ige Systeme eine Viskosität von 1,24 mPas zugrunde gelegt (vgl. Kapitel 4.1). Die tatsächlichen Viskositäten der Lösungen wurden nicht vermessen, um die aseptisch hergestellten und als geschlossenes System vorliegenden MM-Lösungen nicht zu kontaminieren. Außerdem standen nur begrenzte Volumina dieser Stabilitätsproben zur Verfügung. Jedoch wurden die zugrunde liegenden Viskositäten an MM-Systemen ermittelt, welche dieselbe Zusammensetzung aufwiesen wie die Stabilitätsproben (vgl. Kapitel 4.1). Eine Lagerung der MM-Systeme bei

Raumtemperatur führte bereits nach 44 Tagen Lagerung zu einem Anstieg in der mittels DLS gefundenen Partikelgröße (vgl. Abbildung 9.6). Dies traf sowohl für 1%ige als auch für 5%ige MM-Lösungen zu. Der Anstieg der Partikelgröße betrug etwa 2 nm. Infolge einer längeren Lagerungszeit kam es nach etwa 114 bzw. 175 Tagen Lagerung bei RT zu einem weiteren Anstieg in der gefundenen MM-Größe auf etwa 28 nm in 1%igen MM-Systemen bzw. 24-25 nm in 5%igen MM-Systemen. Die konzentrationsabhängigen Unterschiede in der MM-Größe sind wahrscheinlich auf die nicht-korrekte Viskosität zurückzuführen (vgl. Kapitel 4.1). Zudem kann es in höher konzentrierten MM-Systemen zu stärkeren Wechselwirkungen der MM (als Partikel) untereinander kommen. Diese Wechselwirkungen, die u.a. zu einer stärkeren bzw. häufigeren Abstoßung der MM untereinander bzw. mit LM-Molekülen führen, sind zudem bei höheren Temperaturen stärker ausgeprägt, was die Wahrscheinlichkeit von Umsetzungen in den Systemen erhöht. Die Tatsache, dass es in MM-Systemen, die bei erhöhter Temperatur gelagert wurden, auch zu einem stärkeren Anstieg der MM-Größe über die Lagerungszeit kam, kann auf eine stärkere hydrolytische Zersetzung hindeuten. Infolge einer Hydrolyse, z.B. der PL-Moleküle, kommt es in den MM-Systemen zu einer veränderten Zusammensetzung. So nimmt die Konzentration an nicht-hydrolysierten PL- und SL-Molekülen ab, während die Konzentration an Lysophosphatidylcholin und freien Fettsäuren zunimmt. Die Inkorporation dieser neu entstandenen Moleküle (Abbauprodukte) in die vorhandenen MM könnte zu einem Anschwellen dieser MM führen, was den Partikelgrößenanstieg der MM begründen würde (vgl. Abbildung 9.6). Auch die gefundene Abnahme der Transmission gerade bei höheren Konzentrationen und einer erhöhten Lagertemperatur (Abbildung 9.3) könnte durch das Auftreten neuer Komponenten wie freier Fettsäuren begründet sein. Eine zunehmende Hydrolyse der SL-Moleküle führt zu einer Verminderung der für die Ausbildung von MM unbedingt benötigten (vgl. Packungsparameterkonzept) keilförmigen SL-Moleküle mit „intaktem“ Kopf und Rest.

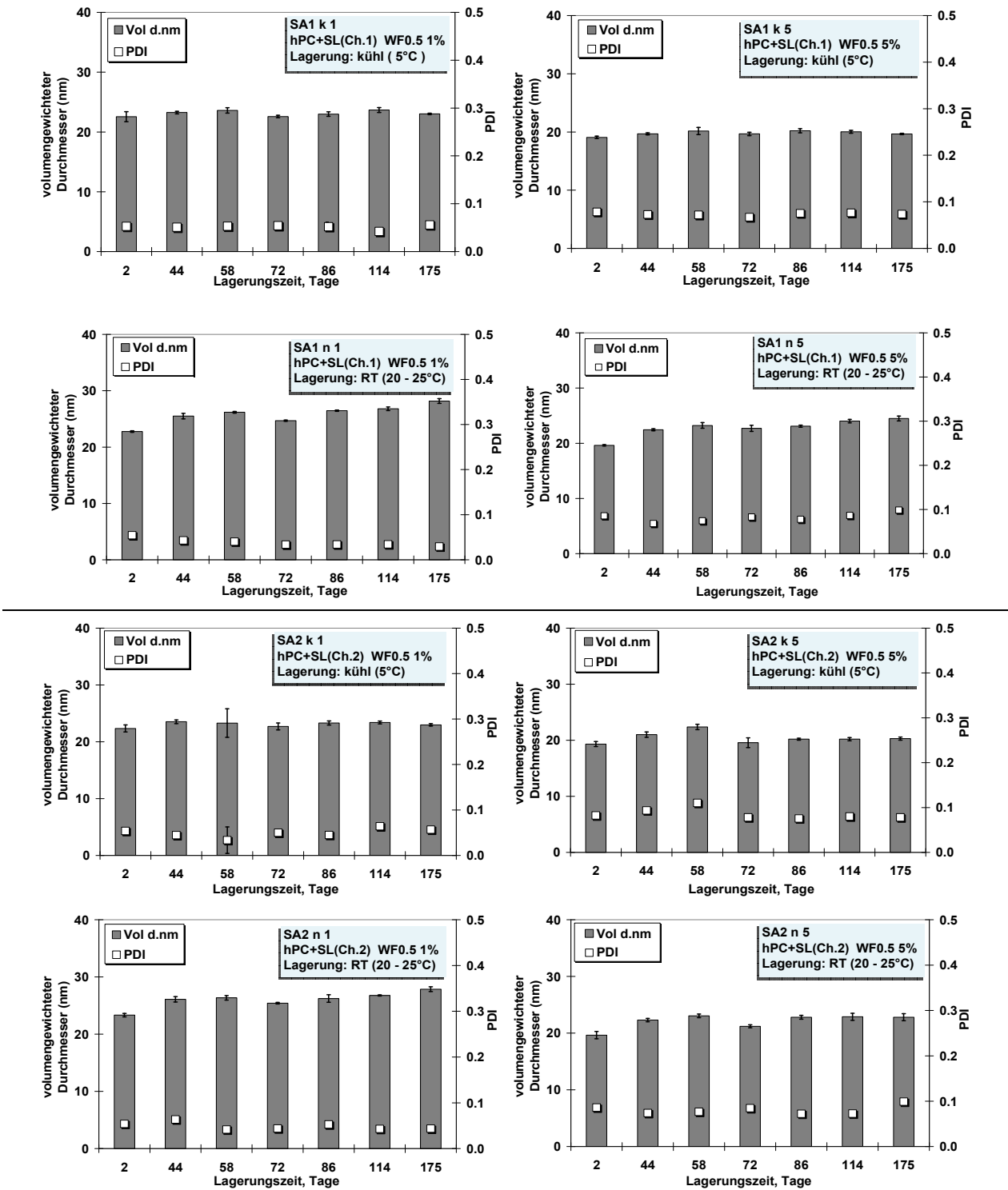


Abbildung 9.6: hydrodynamischer Durchmesser von MM des Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur über eine Lagerungszeit von 175 Tagen; links: 1% und rechts 5%; n = 3 (oben SL Charge 1 (Ch.1) und unten SL Charge 2 (Ch.2))

Somit kann eine Abnahme der SL Konzentration zu einer verringerten Solubilisierung der hPC-Moleküle führen, die dann aus dem wasserlöslichen MM-Assoziat freigesetzt werden und infolge dessen als wasserunlösliche „Lichtstreuer“ die Transmission der Proben herabsetzen (vgl. Abbildung 9.3).

Weiterhin bleibt anzumerken, dass die gefundenen PDI-Werte aller Systeme auch nach einer Lagerungszeit von 175 Tagen mit Werten < 0.1 sehr gut sind und auf monomodal verteilte MM schließen lassen. Diese Ergebnisse stützten die Vermutung, dass es in den untersuchten MM-Systemen zu keiner gravierenden Veränderung oder gar Ausflockung gekommen ist. Höher konzentrierte Proben wiesen etwas höhere PDI-Werte auf, da in höher konzentrierten Proben viel mehr potentielle Lichtstreuer vorhanden sind, die zudem stärker miteinander wechselwirken als Partikel in verdünnten Lösungen.

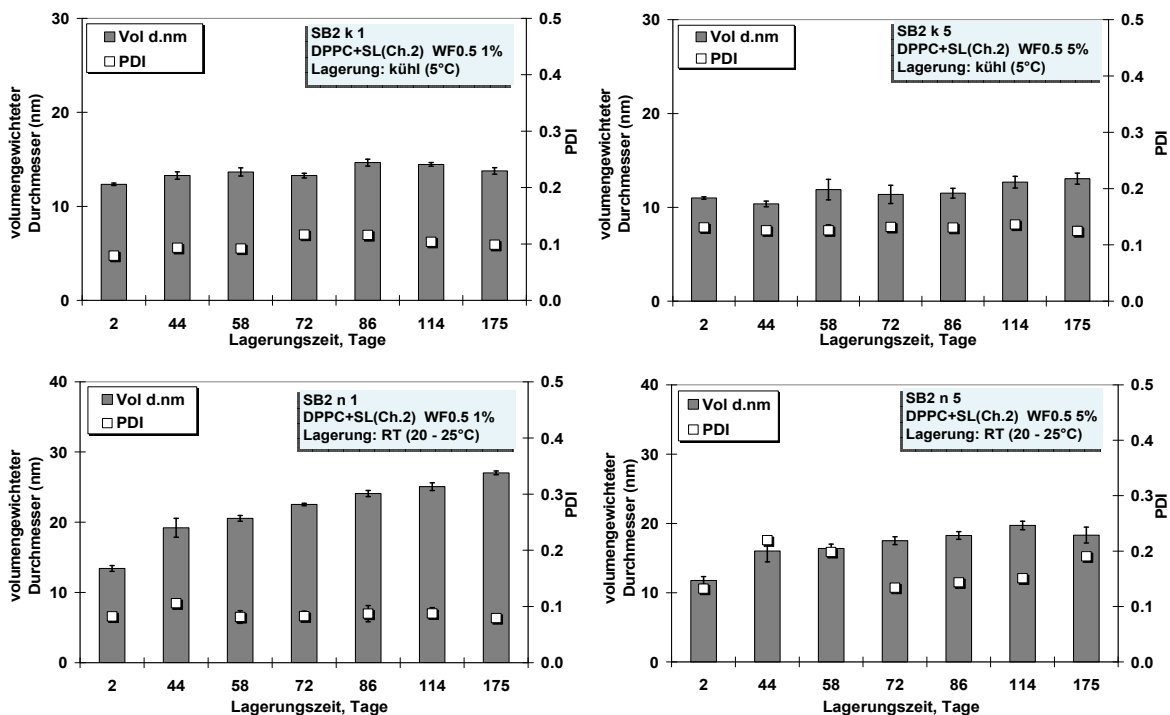


Abbildung 9.7: hydrodynamischer Durchmesser von MM des Systems DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur über eine Lagerungszeit von 175 Tagen (links: 1% und rechts 5%); $n = 3$

Das MM-System DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ zeigte generell einen ähnlichen Trend der Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit über die Lagerzeit

von 175 Tagen (Abbildung 9.7) wie das zuvor beschriebene MM-System des Typs hPC+SL WF_{hPC}0.5. Eine Lagerung bei 5°C führte nur zu geringen, nicht signifikanten Schwankungen in der gefundenen Partikelgröße.

Dagegen hatte eine Lagerung bei RT in dem MM-System DPPC+SL WF_{DPPC}0.5 eine deutliche Veränderung in der gefundenen Größe der MM zur Folge. Nach zwei Tagen Lagerung bei RT waren 1%ige MM noch etwa 13,5 nm klein, um nach einer Lagerzeit von 175 Tagen eine Größe von etwa 27 nm anzunehmen (Abbildung 9.7). Dieses MM-System zeigte mit zunehmender Lagerzeit einen zunehmenden Anstieg in der gefundenen MM-Größe. Die Frage, was zu einem solchen Anstieg führte, ist nach bisherigen Untersuchungen nicht zu beantworten. Eine mögliche Begründung wäre in einer verstärkten hydrolytischen Zersetzung des DPPC zu sehen, was zu einer veränderten MM-Assoziation führen kann. Es ist allerdings verwunderlich, warum gerade 1%ige (vgl. Abbildung 9.7 unten, links), nicht aber 5%ige (vgl. Abbildung 9.7 unten, rechts) MM desselben Systems diese deutliche Veränderung der MM-Größe zeigten. Hier könnte es so sein, dass die niedrige Gesamtkonzentration eine Umwandlung von eher sphärischen zu stäbchenförmigen oder zylindrischen MM begünstigt. Solche Systeme sind in der Literatur für bestimmte Mischsysteme bei spezifischen Konzentrationen beschrieben worden (Acharya und Kunieda, 2006; Kato et al., 2007; Shrestha et al., 2008). Es wäre theoretisch denkbar, dass eine veränderte Zusammensetzung infolge zunehmender Hydrolyse zu einer solchen Umorientierung der Mizellform führte. Allerdings sind zusätzliche Untersuchungen z.B. mittels einer DLS-Analyse bei unterschiedlichen Winkeln nötig, um eine genauere Strukturaufklärung zu ermöglichen.

Weiterhin ist der niedrige Durchmesser der MM-Systeme von nur etwa 12 nm bei kühler Lagerung zu beachten. Die Lagerung der Systeme erfolgte zwar bei 5°C, jedoch wurden die Proben bei 25°C im DLS-Gerät vermessen. Es wurde zudem darauf geachtet, die Proben vor einer Messung einige Stunden bei RT equilibrieren zu lassen. Trotzdem sind diese niedrigen MM-Durchmesser erhalten worden. Eine mögliche Begründung hierfür kann sein, dass die MM des Systems

DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ infolge der (kühlen) Lagerung eine erhöhte Viskosität aufwies, die auf einer Umwandlung im MM-Aufbau beruht und die eine längere Zeit (als einige Stunden) benötigt, um sich bei RT zu „reequilibrieren“.

9.1.3 Einfluss der Lagerzeit auf Solubilisierungskapazität von MM-Systemen für den Modellarzneistoff Diazepam

9.1.3.1 Einleitung und Versuchsplanung

In einer ersten Untersuchungsreihe wurden die Proben zur Langzeitstabilität nicht streng aseptisch hergestellt. Hierbei wurden weder die MM-Lösungen filtriert, noch wurde unter Laminar-Flow in keim- und luftpartikelarmen Räumlichkeiten gearbeitet. Auf eine Filtration der Proben wurde bewusst verzichtet, um jegliche entstandenen Komponenten (Teilchen) nach MM-Herstellung und Diazepam-Beladung mitzuerfassen. Diese erste Versuchsreihe umfasste sowohl unbeladene als auch mit Diazepam-beladene MM-Systeme, die in den Konzentrationen 1% und 5% vorlagen. Allerdings wurde bei dieser Versuchsreihe nach wenigen Wochen eine Verkeimung der Proben festgestellt, und es kam in den mit Diazepam-beladenen Systemen zu einer Gelbfärbung, die auf eine Zersetzung des Diazepams schließen lässt, da diese Verfärbung in unbeladenen Systemen nicht auftrat. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse der ersten Versuchsreihe wurden im Folgenden alle Stabilitätsproben unter aseptischen Bedingungen hergestellt (vgl. Kapitel 3.5) und auch die Beladung mit Diazepam erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Nach Abtrennung des Überschusses an nicht eingeschlossenem Diazepam über eine Zentrifugation (vgl. Kapitel 6.2) wurden die beladenen und equilibrierten MM-Systeme unter Laminar-Flow durch einen 0,45 µm Membranfilter gegeben.

9.1.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Auch mit Diazepam-beladene MM-Systeme des Typs hPC+SL WF_{hPC}0.5 zeigten über eine Lagerzeit von 140 Tagen bei kühler Lagerung keine ausgeprägte Abnahme der Lichttransmission (vgl. Abbildung 9.8). Nachdem sowohl neu entwickelte hPC+SL-Systeme als auch klassische Gallensalz/Lecithin-MM-Systeme über eine Lagerungszeit von 30 Tagen keine Abnahme der Transmission zeigten, nahm die Transmission nach einer längeren Lagerzeit von 140 Tagen in beiden Systemen leicht ab (vgl. Abbildung 9.8).

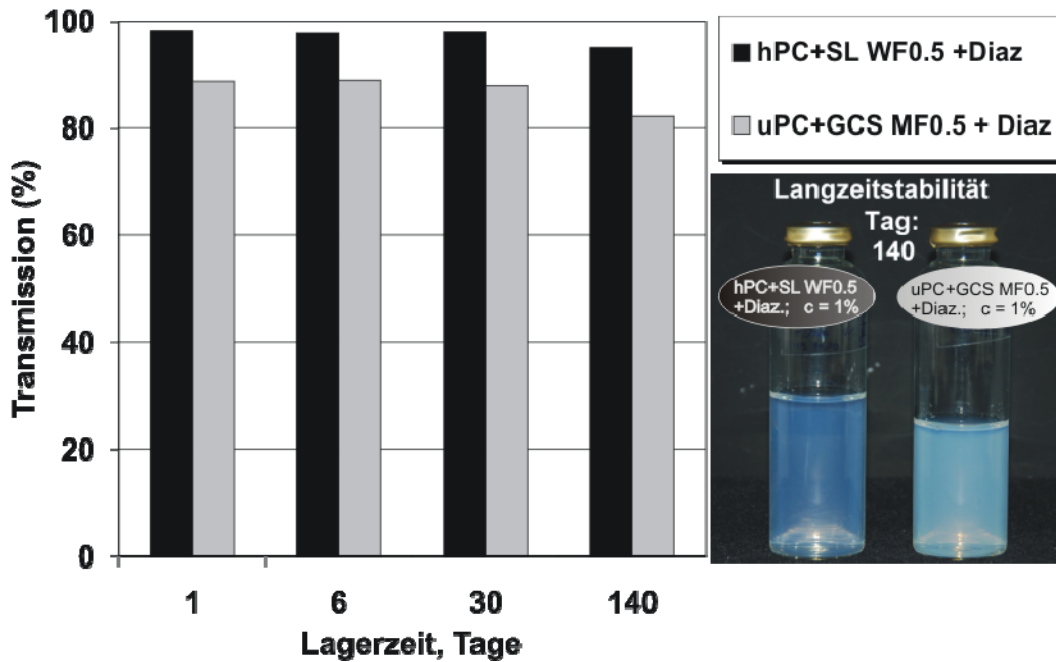


Abbildung 9.8: Einfluss einer Lagerungszeit von 140 Tagen auf die Trübung von mit Diazepam beladenen neu entwickelten MM im Vergleich zu klassischen MM aus uPC und GCS; $c = 1\%$; Lagertemperatur bei 5°C ; $n = 2$

Während neu entwickelte MM-Systeme im beladenen Zustand über einen Lagerungszeitraum von 140 Tagen bei einer Temperatur von 5°C keine Veränderungen der mittels DLS gefundenen hydrodynamischen Durchmesser zeigten, kam es im untersuchten Gallensalz/LecithinMM-System zu einem Anschwellen der gefundenen Partikel von 77 auf 87 nm (Abbildung 9.9). Diese recht hohen Durchmesser der gefundenen Partikel könnten auf eine nicht-sphärische Form der MM dieses Systems schließen lassen (vgl. Kapitel 5.1.1.2). Die neu entwickelten beladenen MM im System hPC+SL WF_{hPC}0.5 zeigten über den gesamten untersuchten Zeitraum von 140 Tagen einen unveränderten hydrodynamischen Durchmesser von etwa 25 nm und waren mit einem PDI < 0.1 monomodal verteilt. Die klassischen MM des Systems uPC+GCS MF_{uPC}0.5 waren bei einem relativ geringem PDI-Wert ebenfalls monomodal verteilt, jedoch ist es nach einer Lagerzeit von 140 Tagen zu einer Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung gekommen, was sich in dem erhöhten PDI-Wert (> 0.1) widerspiegelt (Abbildung 9.9).

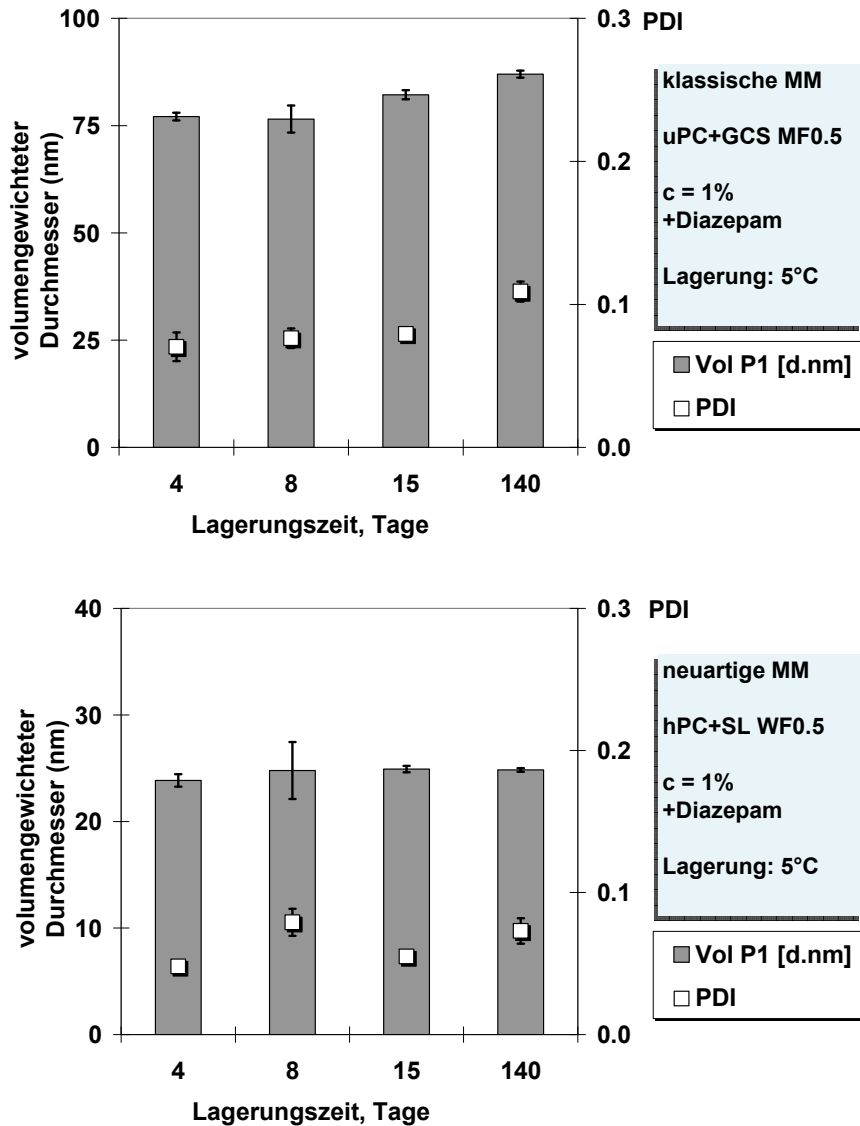


Abbildung 9.9: DLS-Studie: Einfluss einer Lagerungszeit von 140 Tagen auf Größe und PDI von beladenen klassischen MM aus uPC und GCS (oben) und neu entwickelten MM (unten); c = 1%; Lagertemp. bei 5°C; n = 3

Die Solubilisierungskapazitäten kühl gelagerter 1%iger MM-Systeme des Typs hPC+SL WF_{hPC}0.5 und uPC+GCS MF_{uPC}0.5 für den Modellarzneistoff Diazepam sind über die gesamte untersuchte Lagerungszeit von 106 Tagen unverändert geblieben (Abbildung 9.10). Geringe Schwankungen ergaben sich durch die mehrstufige Aufbereitung der beladenen MM-Proben, bevor diese zur HPLC-Analytik bereitstanden. Bei den niedrig konzentrierten beladenen MM-Systemen konnten keine Unterschiede

zwischen den klassischen und den neu entwickelten MM-Systemen gefunden werden.

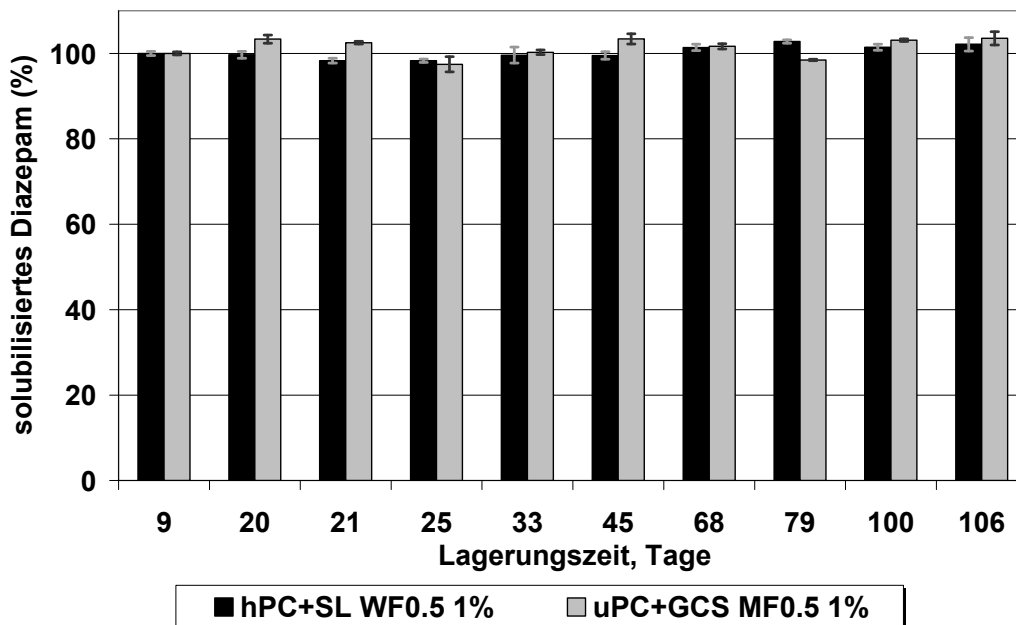


Abbildung 9.10: Einfluss einer Lagerungszeit von 140 Tagen auf die Solubilisierungskapazität von beladenen neu entwickelten MM im Vergleich zu klassischen MM aus uPC und GCS; $c = 1\%$; Lagertemperatur bei 5°C ; $n = 3$

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Solubilisierungskapazität eines mit 5% höher konzentrierten MM-System des Typs hPC+SL WF_{hPC}0.5 hinsichtlich der Lagerzeit und Lagertemperatur analysiert. Aus Abbildung 9.11 ist zu entnehmen, dass es in dem aseptisch hergestellten System auch bei Lagerung bei 25°C zu keiner markanten, wohl aber zu einer einsetzenden Abnahme der Solubilisierungskapazität für Diazepam gekommen ist. Auch bei den Langzeitstabilitätsproben wurde gefunden, dass höher konzentrierte unbeladene Systeme mit der Zeit eine Abnahme der Transmission zeigten.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine Lagertemperatur von 5°C zu bevorzugen ist, da so eine insgesamt geringere Abnahme der Solubilisierungskapazität erreicht werden konnte (Abbildung 9.11). Zwar ist das Ausmaß der Abnahme der Solubilisierungskapazität des untersuchten MM-Systems nicht besonders groß, dennoch kam es in diesem System bei

der erhöhten Gesamttensidkonzentration von 5% bereits nach wenigen Tagen zu einer Abnahme der Solubilisierungskapazität sofern die Lagerungstemperatur bei 25°C lag. Nach 44 Tagen Lagerung ging die Solubilisierungskapazität auf ca. 95% zurück.

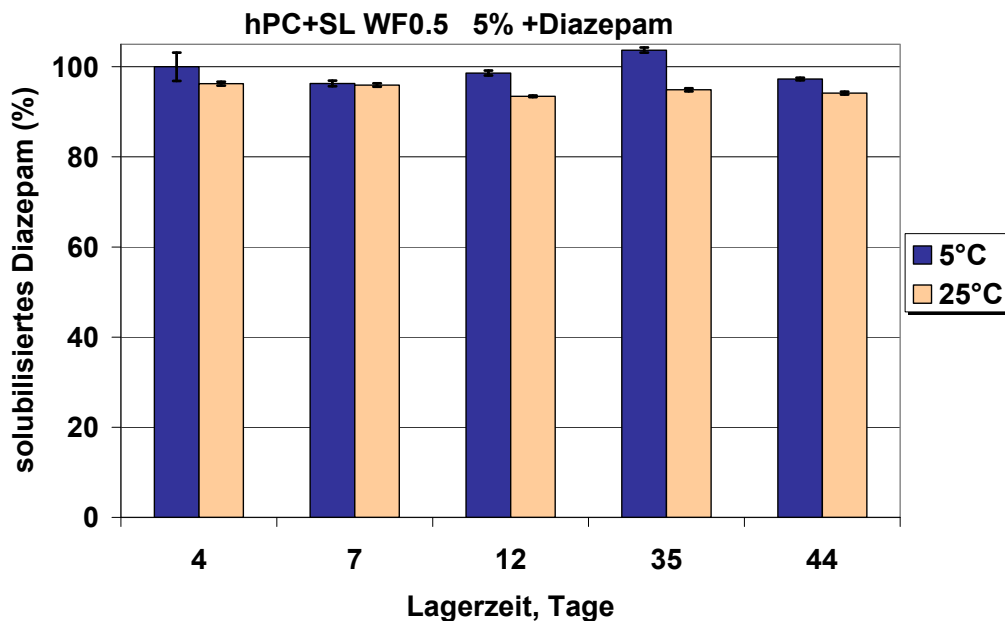


Abbildung 9.11: Einfluss einer Lagerungszeit von 44 Tagen auf die Solubilisierungskapazität von mit Diazepam beladenen neu entwickelten MM bei einer erhöhten Konzentration von 5%; Lagertemperatur bei 5°C; n = 3

9.1.4 Zusammenfassung und Diskussion: Langzeitstabilität

Die Stabilität der hPC-haltigen MM-Systeme zeigt eine Abhängigkeit bezüglich der Lagerungszeit und Lagerungstemperatur. In den wässrigen MM-Systemen wird wahrscheinlich die hydrolytische Zersetzung der Estergruppen des Phosphatidylcholin (und evtl. des Zuckeresters) die chemische Stabilität des Systems bedingen. In der Literatur ist beschrieben, wie auf dieselbe Weise die Stabilität von liposomalen Zubereitungen vor allem durch die hydrolytische Zersetzung des in Wasser dispergierten PC bedingt ist (Grit et al., 1989; Grit und Crommelin, 1992). In Analogie zu den Ergebnissen von Grit bzw. Grit und Crommelin konnte auch in dieser Arbeit eine Temperaturabhängigkeit der Stabilität der hPC-haltigen Systeme gefunden werden. In liposomalen Zubereitungen ist die Stabilität des Phosphatidylcholins gegenüber hydrolytischer Zersetzung

zusätzlich vom pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers abhängig (Grit et al., 1989). Da die Hydrolyse der Estergruppen im PC-Molekül sowohl säure- als auch basenkatalysiert abläuft, bedingt ein neutraler pH-Wert eine optimale Stabilität und je geringer die Ionenstärke des Puffers umso geringer wird das Ausmaß der Hydrolyse ausfallen.

Diesen Erkenntnissen folgend, sind sämtliche MM-Systeme mit einem Phosphatpuffer bei neutralen pH-Wert (pH 7,4) und geringer Ionenstärke (0,067 M) hergestellt worden (vgl. Kapitel 3.4).

Auf Grund der ersten Untersuchungenreihen ist eine ungekühlte Lagerung der mit Diazepam-beladenen MM-Systeme in erhöhten Konzentrationen von 5% kritisch zu sehen. In diesem Fall sollten die MM-Systeme aseptisch hergestellt, beladen und auch aseptisch abgefüllt werden, nachdem die wässrigen Lösungen unter Laminar-Flow filtriert worden sind. Zudem müssen diese Systeme kühl gelagert werden. Höher konzentrierte mischmizellare Lösungen zeigten im mit Diazepam-beladenen Zustand bei einer Lagerungstemperatur von 25°C eine Abnahme der Solubilisierungskapazität. Hierfür können theoretisch mehrere Gründe verantwortlich sein. Die MM wurden bis zur Sättigung mit Diazepam beladen (vgl. 6.2). Eventuell kam es nach der Equilibrierung und anschließenden Lagerung zu einer Umwandlung im mit Diazepam (über)gesättigten MM-System. Infolge einer Übersättigung könnten Diazepam-Moleküle nicht nur im Inneren der MM lokalisiert sein, sondern evtl. auch an der Oberfläche der MM adsorbiert werden. Dadurch wären die Diazepam-Moleküle verstärkt dem umgebenden hydrophilen Medium ausgesetzt, so dass es hier zu einer Zersetzung des Diazepam durch eine Hydrolyse (Han et al., 1977; Moro et al., 1991) kommt. Jedoch sind keine Untersuchungen zu möglichen Zersetzungsprodukten des Diazepam gemacht worden, weshalb diese Theorien eher spekulativ sind.

Bei einer höheren Temperatur und nach längerer Zeit setzt jedoch die Hydrolyse der mischmizellbildenden Substanzen – der PL und des SL – verstärkt ein (Grit et al., 1989; Grit und Crommelin, 1993; Werling et al., 2008), was eine Änderung der Transmission und der Partikelgröße begründet. Somit kann die Verschlechterung der Solubilisierungskapazität der 5%igen MM-Lösungen nach Lagerung bei höherer Temperatur

(ungekühlt, 25°C) durch den Abbau der Transportvehikel (= MM) begründet werden.

9.2 pH-Stabilität

9.2.1 Einleitung

Wie in Kapitel 2.2.3 ausführlich beschrieben, wird mischmizellaren Systemen ein absorptionssteigernder Effekt zugeschrieben, der sich auch nach oraler Gabe im Gastrointestinaltrakt (GIT) zeigen soll. Ein Beispiel eines am Pharmamarkt präsenten Fertigarzneimittels ist Konakion® MM der Hoffmann-La Roche AG, welches ein mischmizellares Trägersystem ausnutzt und zur oralen Applikation zugelassen ist. Das dort angewandte MM-System basiert auf klassischen Gallensalz/Lecithin-MM, die neben ungesättigtem PC das Gallensalz GCS enthalten. In verschiedenen Veröffentlichungen wird über den absorptionssteigernden Effekt der MM im Darm berichtet. Daher müssen die eingesetzten Mischmizellen nach oraler Applikation den gesamten Gastrointestinaltrakt unbeschadet passieren, um in stabiler Form mit eingeschlossenem Arzneistoff die Zielzellen der intestinalen Darmwand zu erreichen. Als Folge muss von einem MM-System eine möglichst hohe Stabilität gefordert werden, damit es nicht nur gegenüber verschiedenen Zusätzen (z.B. Nahrungsbestandteile im Magen-Darm-Trakt) sondern auch gegenüber größeren pH-Schwankungen beständig bleibt. Im Magen herrscht ein pH-Wert von etwa 1,4-3,2 (Mutschler et al., 2001), so dass die MM sowohl im Sauren als auch im Alkalischen (Darm) stabil sein sollten, um den inkorporierten Arzneistoff nicht vorzeitig abzugeben. Wenn die absorptionssteigernde Wirkung aufgrund der MM erfolgt, sollten sie folglich in stabiler Form zum Zielort (Magenwand im Sauren oder aber Darmwand im Alkalischen) gelangen können. Bei den Gallensalz/Lecithin-MM sind neben den als Zwitterion vorliegenden Phosphatidylcholin Gallensäuren anwesend, so dass sich hieraus eine Problematik ergeben kann – da die Gallensäuren eine vom pH-Wert abhängige Löslichkeit zeigen.

9.2.2 Klassische MM-Systeme

Das im Fertigarzneimittel Konakion[®] MM zur Anwendung kommende MM-System besteht neben ungesättigten Phosphatidylcholin aus dem Natriumsalz der Glycocholsäure (GCS).

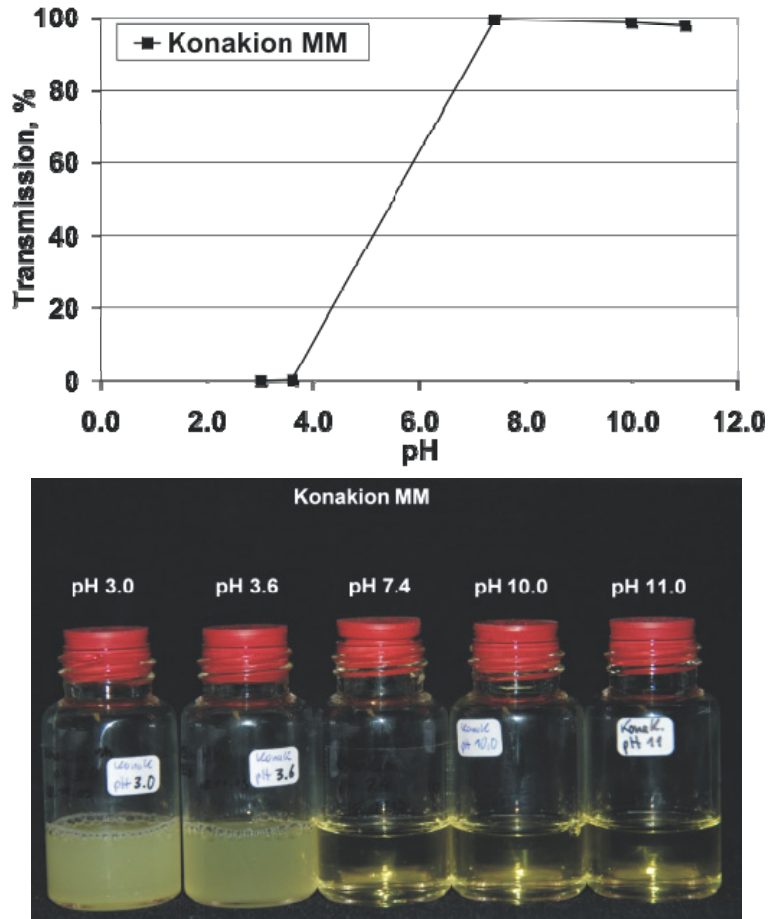


Abbildung 9.12: Ergebnisse der Transmissionsmessungen an klassischen MM des Handelspräparates Konakion[®] MM bei unterschiedlichen pH-Werten (oben) und Visualisierung der pH-eingestellten MM-Systeme

Die Glycocholsäure weist einen pK_s -Wert von 3,8 auf. Wie die Transmissionsuntersuchungen an verdünnten Konakion[®] MM-Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten von pH 3-11 belegen, kommt es mit Unterschreitung des zum pK_s -Wert analogen pH-Wertes zu einer sofortigen deutlichen Trübung der entsprechenden Konakion-Lösungen (Abbildung 9.12 unten), was sich in dem steilen Abfall der Transmissionskurve (Abbildung 9.12 oben) widerspiegelt. Die Trübung entsteht durch Ausflockung der GCS-Moleküle, die ab einem pH-Wert von 3,8 einsetzt, da

die GCS-Moleküle protoniert werden und als ungeladene Säuren selbst nicht mehr im Sauren löslich sind. Die Auswertung der DLS-Messungen an Konakion[®] MM-Lösungen mit unterschiedlich eingestellten pH-Werten bestätigen die Erkenntnisse aus den Transmissionsmessungen (Abbildung 9.13).

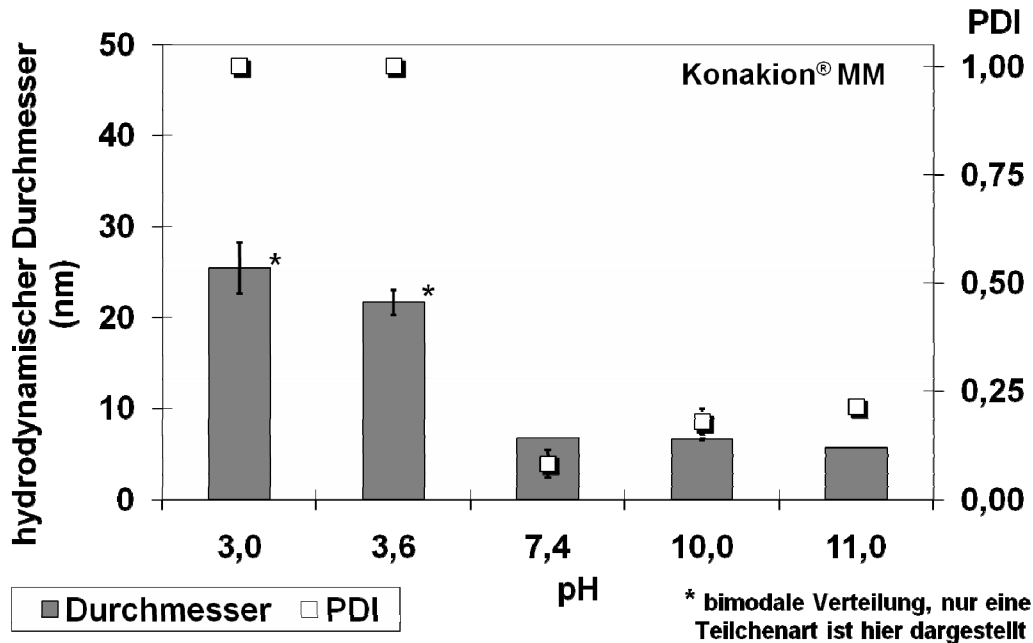


Abbildung 9.13: Ergebnisse einer DLS-Studie an klassischen MM des Handelspräparates Konakion[®] MM bei unterschiedlichen pH-Werten; ^{*} bimodale Verteilung; nur die kleinste gefundene Spezies ist gezeigt; n = 3

Mit einer Unterschreitung des pH-Wertes von 3,6 kam es zu einer deutlichen Veränderung der Partikelgröße und die erhaltenen PDI-Werte der sauren Konakion[®] MM-Lösungen nahmen maximale Werte von 1,0 an, was belegt, dass kein stabiles monomodal verteiltes MM-System mehr vorlag. Im pH-Bereich von 7,4-11,0 konnten jedoch MM mit einem unveränderten mittleren hydrodynamischen Durchmesser von etwa 7 nm nachgewiesen werden.

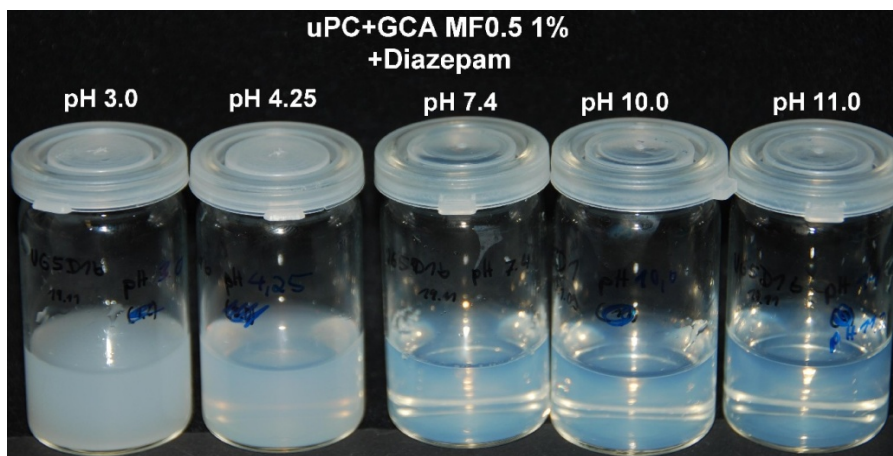
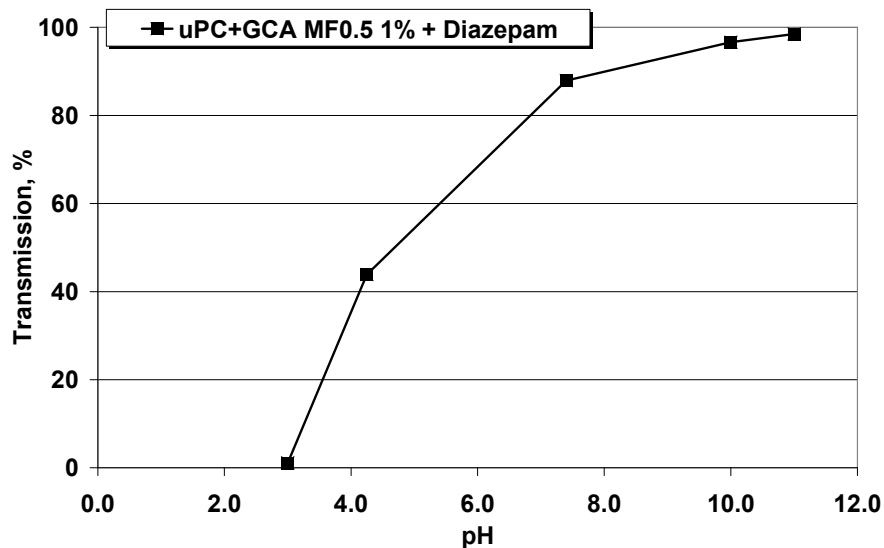


Abbildung 9.14: Ergebnisse der Transmissionsmessungen (oben) am klassischen MM-System $uPC+GCS MF_{uPC}0.5 + Diazepam$ bei unterschiedlichen pH-Werten und Visualisierung der pH-eingestellten MM-Systeme (unten)

In einer weiteren Versuchsreihe sind klassische Gallensalz/Lecithin-MM des Typs $uPC+GCS MF_{uPC}0.5$ hergestellt und mit Diazepam beladen worden, um dann gegenüber unterschiedlichen pH-Schwankungen untersucht zu werden. Bei diesem klassischen MM-System handelt es sich im Prinzip um einen Nachbau des im Konakion[®] MM eingesetzten MM-Systems. Jedoch sind die Anteile an uPC bzw. GCS unterschiedlich. In Analogie zu den Konakion[®] MM-Lösungen zeigten auch 1%ige Lösungen des mit Diazepam-beladenen MM-Systems $uPC+GCS MF_{uPC}0.5$ bei sauren pH-Werten einen starken Abfall in der Transmissionskurve (Abbildung 9.14 oben), was mit einer deutlichen Trübung der entsprechenden leicht sauren

bzw. sauren Lösungen einherging (Abbildung 9.14 Bild unten und oben). Die Trübung setzte hier bereits bei pH 4,25 ein. Auch hier kann das Auftreten der Trübung ebenfalls mit einer Präzipitation der GCS-Moleküle begründet werden, was zu einer Zerstörung der klassischen MM führte (Abbildung 9.15).

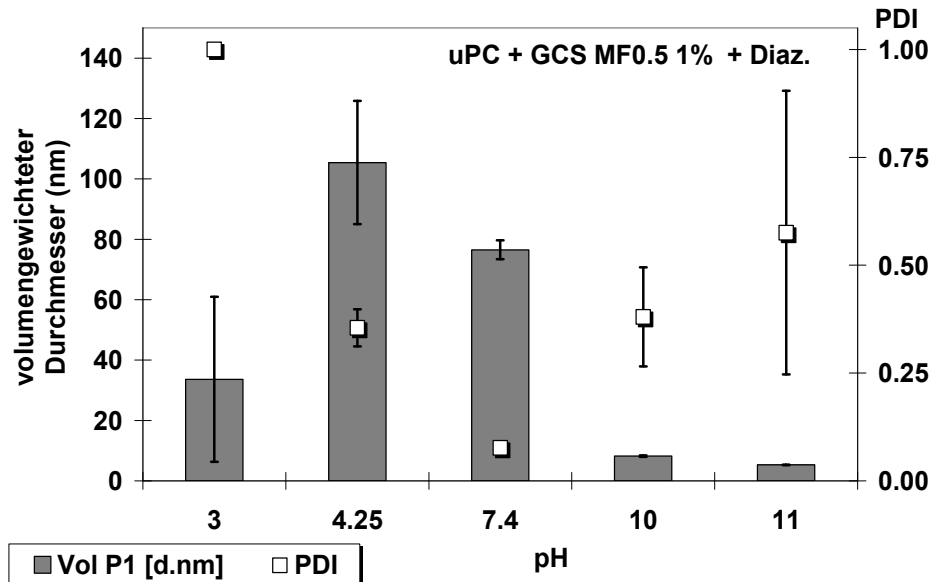


Abbildung 9.15: Ergebnisse einer DLS-Studie am klassischen MM-System $uPC+GCS MF_{uPC}0.5 + Diazepam$ bei unterschiedlichen pH-Werten; $n = 3$

Interessanterweise kam es in dem System mit einem molaren uPC-Anteil von 0.5 auch durch Alkalisieren zu einer Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers. Während die MM bei pH 7,4 noch etwa 77 nm groß waren, was gut mit vorherigen Untersuchungen korreliert, fiel die Größe der MM nach dem Alkalisieren auf etwa 7 nm ab (Abbildung 9.15). Dieses Verhalten könnte durch eine Umwandlung von sphärischen Mizellen bei pH 10 zu stäbchenförmigen Mizellen bei pH 7,4 begründet werden, jedoch bedarf dies einer genaueren Untersuchung (vgl. hierzu Kapitel 5.1.1.2).

Festzuhalten ist, dass klassische Gallensalz/Lecithin-MM nicht nur empfindlich gegenüber Konzentrationsänderungen (vgl. Kapitel 5.1.1.2) sondern auch gegenüber pH-Änderungen sind. Dabei kommt es auch im

alkalischen Bereich bei pH 10, bei dem die MM-Lösungen noch optisch klar erscheinen, zu einer Umwandlung im strukturellen Aufbau der MM.

9.2.3 pH-Einfluss auf das MM-System hPC und SL

Das MM-System hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ zeigte sich gegenüber Schwankungen der pH-Werte von 1,2-11,0 stabil, und es kam zu keiner deutlichen Abnahme der Transmission, wie Messungen an 1%igen Diazepam-haltigen Systemen ergeben haben (Abbildung 9.16).

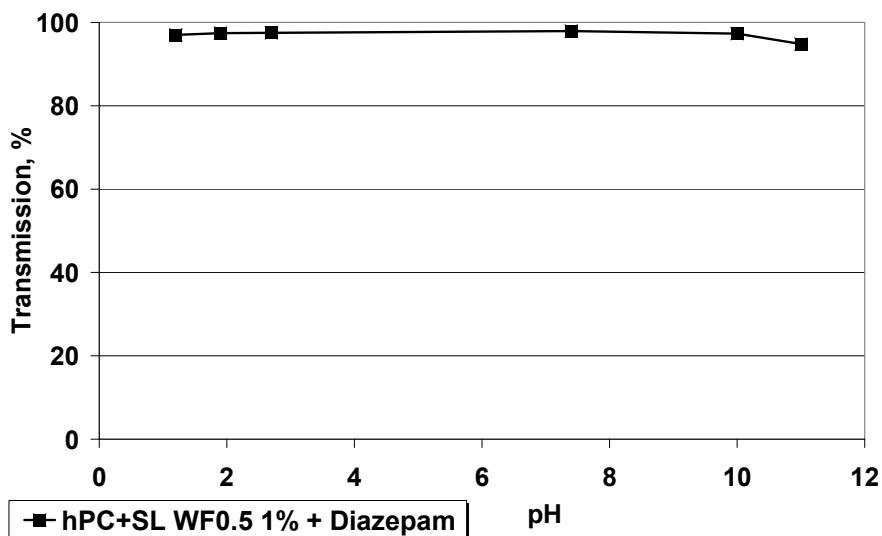


Abbildung 9.16: Ergebnisse der Transmissionsmessungen am neu entwickelten MM-System hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ bei unterschiedlichen pH-Werten

Damit kann festgehalten werden, dass die neu entwickelten MM auch im Sauren stabil sind. Die Abbildung 9.17 zeigt MM-Systeme des Typs hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ im unbeladenen Zustand bei unterschiedlichen pH-Werten von pH 1,2 bis pH 11,1. Vier Stunden nach pH-Einstellung zeigte sich keine Trübung der unterschiedlich eingestellten (pH-Wert) MM-Systeme (Abbildung 9.17 oben) und

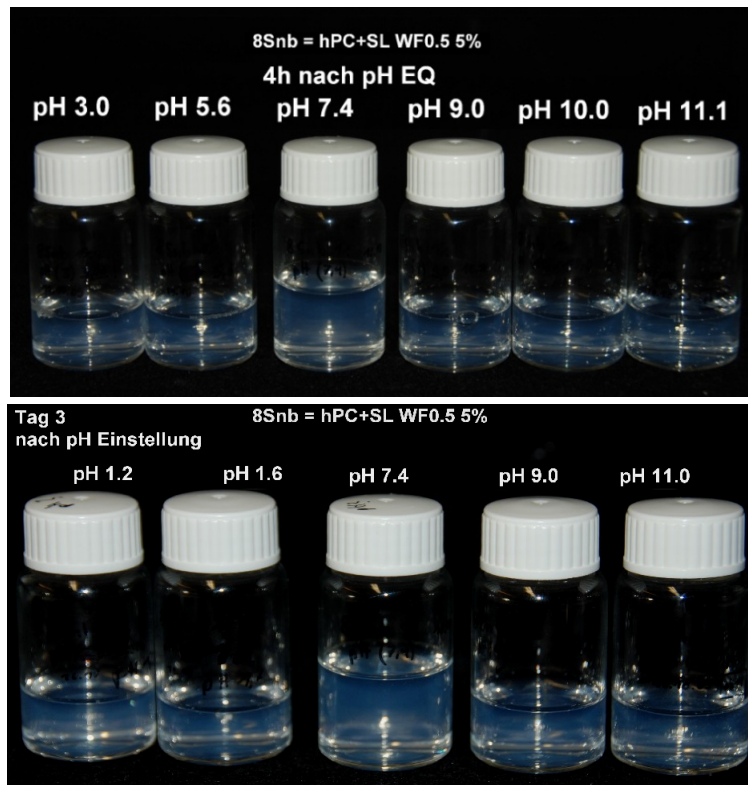


Abbildung 9.17: Visualisierung der pH-eingestellten MM-Systeme des MM-Typs $hPC+SL WF_{hPC}0.5$ vier Stunden nach pH-Einstellung (Bild oben) und drei Tage nach pH-Einstellung (Bild unten)

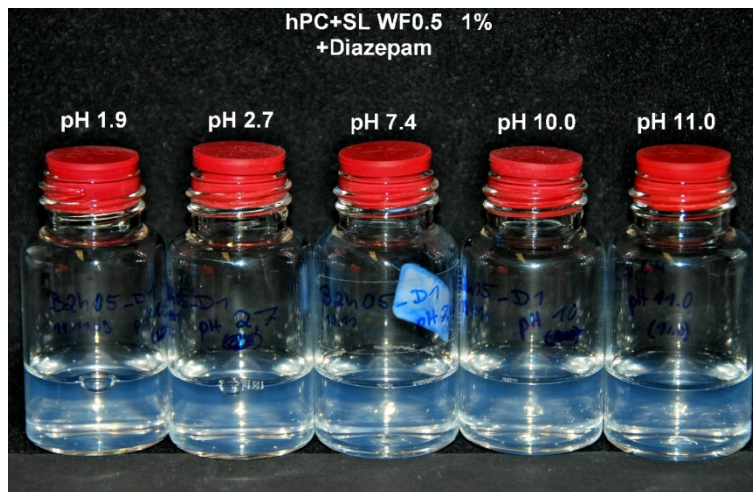


Abbildung 9.18: Visualisierung der mit Diazepam beladenen MM-Systeme des Typs $hPC+SL WF_{hPC}0.5$ bei unterschiedlichen pH-Werten

auch drei Tage nach pH-Einstellung kam es zu keiner Trübung der MM-Lösungen (Abbildung 9.17 unten), unabhängig vom eingestellten pH-Wert.

Während die Abbildung 9.17 unbeladene MM-Lösungen zeigt, sind in Abbildung 9.18 mit Diazepam-beladene MM-Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten desselben MM-Systems bei einer Gesamttensidkonzentration von 1% gezeigt. Auch die beladenen MM-Systeme erscheinen bei jedem untersuchten pH-Wert optisch klar.

Die hydrodynamischen Durchmesser der MM des Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 waren im unbeladenen Zustand, bei einer Gesamttensidkonzentration von 1%, unabhängig vom eingestellten pH-Wert etwa 24 nm groß, und es konnten keine Fluktuationen in der MM-Größe gefunden werden, wenn der pH-Wert im Bereich pH 1,6-11,0 lag, wie DLS-Messungen belegen (Abbildung 9.19; Bild oben). Lediglich im stark Sauren konnten MM mit einem hydrodynamischen Durchmesser von knapp 30 nm gemessen werden. Der PDI der MM war bei jedem untersuchten pH-Wert kleiner 0.05, was auf eine streng monomodale Verteilung der MM schließen lässt. Dieses leichte Anschwellen der MM bei pH 1,2 wird seine Ursache höchstwahrscheinlich im sauer-katalysierten hydrolytischen Abbau des hPC haben. Mit einer (partiellen) Esterhydrolyse ändert sich durch die Entstehung von Lyso-PC und freien Fettsäuren die Zusammensetzung des MM-Systems. Infolge eines Einbaus der Lyso-PC- oder Fettsäure-Moleküle kann es zu einem Anschwellen der MM kommen. Damit belegen diese Resultate (vgl. u.a. Abbildung 9.19) die Hypothese, dass es im Zuge der Langzeitstabilität ebenfalls zu einer Hydrolyse der hPC-Moleküle kam, da auch die Langzeitstabilitätsproben desselben MM-Systems nach 175 Tagen in 1%iger Konzentration hydrodynamische Durchmesser von fast 30 nm zeigten (vgl. Abbildung 9.6 MM-System „SA1n1“). Durch den hier eingestellten sehr sauren pH-Wert von 1,2 wird eine beschleunigte Hydrolyse der hPC- (und ggf. SL-) Moleküle simuliert. Dasselbe MM-System zeigte im mit Diazepam beladenen Zustand ein etwas anderes Verhalten. Beladene MM wiesen bei pH 2,7-10 nur geringe Schwankungen des hydrodynamischen Durchmessers auf, der hier im Bereich von 24-28 nm lag (Abbildung 9.19; unten).

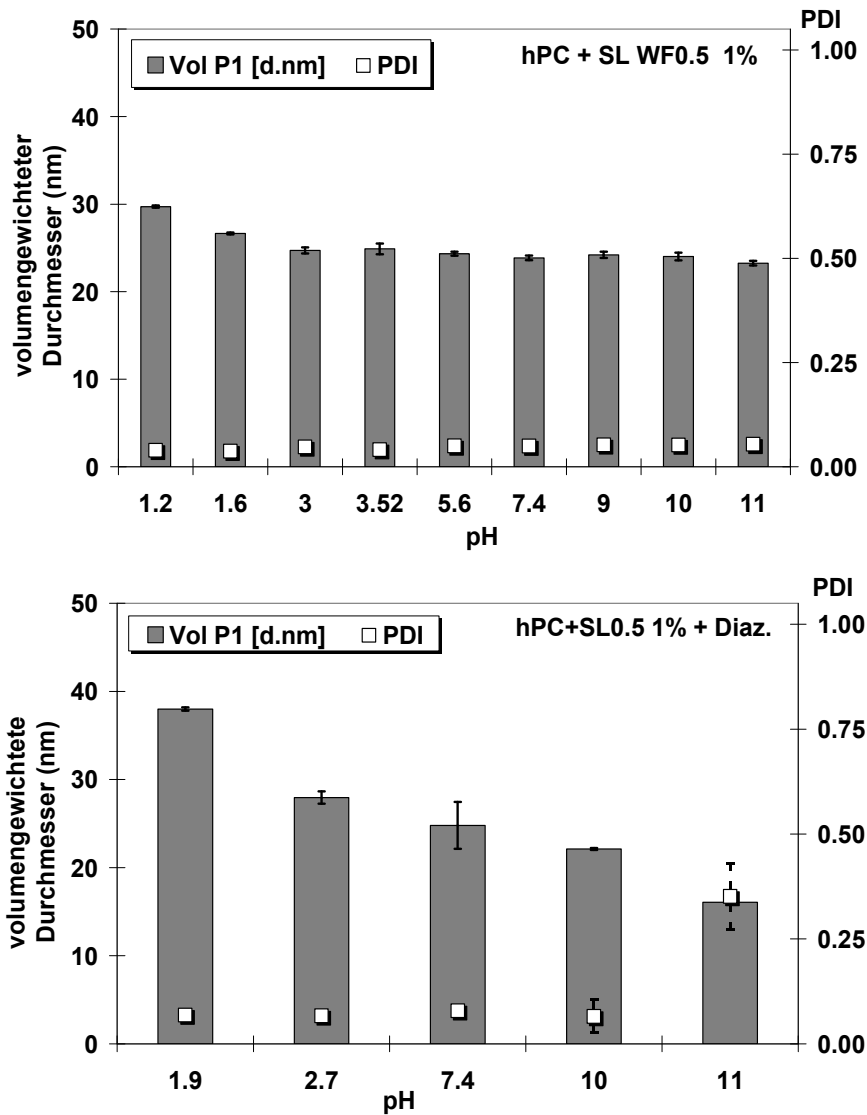


Abbildung 9.19: Ergebnisse einer DLS-Studie am MM-System $hPC+SL$ $WF_{hPC}0.5$ bei unterschiedlichen pH-Werten; Bild oben: unbeladene 1%ige MM $n = 6$; Bild unten: mit Diazepam beladene 1%ige MM; $n = 3$

Im stärker sauren Bereich kam es zu einem Anschwellen der MM auf etwa 38 nm, wobei die PDI-Werte hier immer noch kleiner als 0.05 waren, was auf stabile, streng monomodal verteilte MM schließen lässt (Abbildung 9.19; unten). Im stärker Alkalischen bei pH 11 kam es zu einer Verkleinerung der MM auf etwa 18 nm, wobei diese Größenveränderung mit einer Verschlechterung des gefundenen PDI auf ca. 0.3 einherging. Mit Diazepam-beladene MM-Systeme weisen im Gegensatz zu unbeladenen MM-Systemen eine Veränderung in der Größe der gefundenen MM auf,

sobald sehr niedrige oder aber sehr hohe pH-Werte eingestellt worden sind (vgl. Abbildung 9.19). Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass die Gegenwart von Diazepam für diese Veränderung verantwortlich ist. Diazepam unterliegt bei sauren pH-Werten einer Hydrolyse, die einer Zwei-Schritt-Reaktion folgt. In alkalischer Lösung findet eine Ein-Schritt-Hydrolyse statt, bei der Diazepam zu 2-Methylamino-5-chlorobenzophenon transformiert wird (Han et al., 1977). Sowohl die saure, als auch die alkalische Hydrolyse führt zu einer Ringspaltung des siebengliedrigen cyclischen Lactamrings, so dass Produkte entstehen, die sich strukturell recht deutlich vom Diazepam unterscheiden. Sofern diese Produkte in die vorhandenen MM eingebaut bzw. solubilisiert werden, könnte dies zu einer Veränderung der Größe der Mischmizellen führen. Möglicherweise ist der Größenzuwachs der MM im Säuren bzw. die Verkleinerung der MM im Alkalischen am Auftreten der Abbauprodukte der Hydrolyse des Diazepam begründet, die schließlich in die MM eingebaut werden. Allerdings wurden keine weiteren Analysen zur Detektion der Abbauprodukte vorgenommen. Auf der anderen Seite zeigte die HPLC-Analytik zur Untersuchung der Solubilisierungskapazitäten der MM im Rahmen der Langzeitstabilitätstests keine Hinweise auf einen Abbau des Diazepams (vgl. Abbildung 9.10 und Abbildung 9.11). Zudem sollte das in die MM eingeschlossene Diazepam vor hydrolytischem Abbau weitgehend geschützt werden, sofern die solubilisierten Diazepam-Moleküle im Inneren der MM lokalisiert sind.

Weiterhin ist bekannt, dass die Aufnahme von lipophilen Substanzen wie Diazepam in das Innere von Mischmizellen zu einem strukturellen Umbau der MM-Morphologie führen kann, was stark von den Gegebenheiten des umliegenden Milieus (pH-Wert, Ionenstärke, Ladung) abhängig ist (Torchilin, 2007). Das lipophile Innere der MM ist durch die Fettsäurereste der hPC- bzw. SL-Moleküle geprägt. Bei Aufnahme eines lipophilen Stoffes kommt es zu einem Platzwechsel von Lösungsmittel-Molekülen und AS-Molekülen, wodurch die lipophilen Ketten auseinanderweichen können (Nagarajan und Ganesh, 1989; Torchilin, 2007), was zu einer Umwandlung in der MM-Anordnung führen kann. Sofern diese Umwandlung von der Ionenstärke bzw. dem pH-Wert des umgebenden Milieus beeinflusst wird, kann dies zu den beobachteten Effekten einer veränderten MM-Größe

führen. (Anm.: Die Solubilisierung von lipophilen Substanzen in das Innere von sphärischen Blockcopolymer-Mizellen kann jedoch auch zu einer Umwandlung in stäbchenförmige Mizellen führen (Crothers et al., 2005).)

In dem MM-System DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ kam es im pH-Bereich von 7,4-10 zu keinen starken Schwankungen der MM-Größe, die hier zwischen 16 und 21 nm lag (Abbildung 9.20). Im stärker Alkalischen konnte jedoch ein deutlicher Größenzuwachs der MM beobachtet werden (Abbildung 9.20).

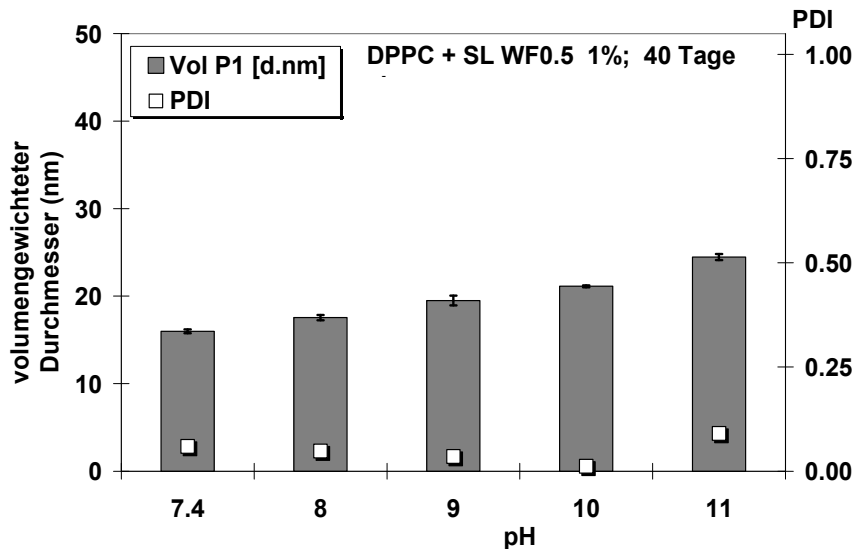


Abbildung 9.20: Ergebnisse einer DLS-Studie am 40 Tage alten MM-System DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ bei unterschiedlichen pH-Werten; $n = 3$

Mit steigendem pH-Wert ging insgesamt ein Anstieg in der gefundenen Partikelgröße einher. Die MM dieses Typs mit DPPC statt hPC scheinen generell einen etwas anderen Aufbau bzw. eine etwas andere Form aufzuweisen als die zuvor beschriebenen MM-Systeme mit hPC, was u.a. an den mit ca. 16 nm kleineren MM zu sehen ist. Vielleicht bedingt die Anwesenheit von DPPC in diesen MM-Typen ein anderes Packungsverhalten als es in MM mit hPC vorhanden ist. Die höhere Lipophilie der längeren Fettsäurereste des hPC sorgt eventuell dafür, dass MM mit hPC durch stärkere Van-der-Waals-Kräfte effektiver gepackt sind und dadurch gegen Einflüsse des umgebenen Milieus resistenter erscheinen. Damit könnte erklärt werden, dass MM mit DPPC aufgrund der weniger starken Van-der-Waals-Kräfte einen weniger starken (durch ihre

geringere Lipophile geprägten) Zusammenhalt zeigen und gegenüber pH-Schwankungen empfindlicher reagieren. Mit steigendem pH-Wert (zunehmender Ionenstärke) zeigt sich ein verändertes Hydratisierungsverhalten der MM, was in einem leichten Anstieg der MM-Größe resultierte (Abbildung 9.20). Zu beachten ist hierbei, dass die im System vorhandenen zwitterionischen DPPC-Moleküle mit steigendem pH-Wert zunehmend mit OH⁻-Ionen abgesättigt werden, was zu einer veränderten Hydratisierung bzw. Orientierung der DPPC-Moleküle in den MM führen kann.

Jedoch sind die Messungen an Proben gemacht worden, die bereits 40 Tage alt waren, so dass die Schwankungen in der MM-Größe auch durch das Auftreten hydrolytischer Zersetzungsprodukte zu erklären sind, die mit steigendem pH-Wert verstärkt anfallen und die in die MM eingebaut werden können (s.o.).

9.2.4 Zusammenfassung

Untersuchungen zum Wirkstofftransport und der Permeation von lipophilen Arzneistoffen aus mizellaren bzw. mischmizellaren Arzneistoffformulierungen weisen darauf hin, dass die Mizellen oder MM im GIT intakt sein müssen, da aller Voraussicht nach der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Absorption eine Kollision der MM mit der (intestinalen) Lipidmembran ist (Karth et al., 1985a; Karth et al., 1985b; Wiedmann et al., 2001a; Wiedmann et al., 2001b). Demnach sollte von einem MM-System gefordert werden, dass es im GIT stabil bleibt.

Die Untersuchungen an Systemen aus klassischen Gallensalz/Lecithin-MM haben ergeben, dass diese MM bei sauren pH-Werten nicht stabil sind. Hierbei darf der pH-Wert der Lösung den pK_s-Wert des verwendeten Gallensalzes nicht unterschreiten. Weiterhin kommt es in den klassischen MM-Systemen, in Abhängigkeit von pH-Wert, aller Wahrscheinlichkeit nach zu Umwandlungen der Morphologie der MM. Mittels DLS-Messungen konnte im MM-System uPC+GCS MF_{uPC}0.5 u.a. eine Umwandlung von 77 nm großen MM zu 7 nm kleinen MM beobachtet werden, wenn der pH-Wert von 7,4 auf 10 angehoben wird. Dieser Größenunterschied kann theoretisch auf eine Umwandlung von stäbchenförmigen MM zu kleinen sphärischen MM begründet sein. Auch wenn die genaue Ursache für diese

Umwandlung im System nicht geklärt wurde, bleibt festzuhalten, dass klassische Gallensalz/Lecithin-MM infolge pH-Änderungen soweit destabilisiert werden können, dass sie gänzlich zerstört oder aber stark deformiert werden. Eine unbeschadete Magenpassage bei pH-Werten < 3 überstehen die klassischen MM nicht. Im Gegensatz dazu sind die neu entwickelten MM, die neben PC keine ionischen Gallensäuren sondern nicht-ionisches Sucroselaurat verwenden, über weite pH-Bereiche von pH 1,6-11 hinreichend stabil. Die Stabilität der MM ist nicht nur über eine kurze Zeit nach pH-Einstellung gegeben, sondern zeigt sich über einen sehr langen Zeitraum von mehreren Tagen. Dabei kann es im stark Sauren oder stark Alkalischen zu leichten Schwankungen in der Mischmizellgröße kommen, jedoch bleiben die Systeme optisch klar und zeigen eine monomodale Partikelgrößenverteilung mit PDI-Werten, die in den meisten Fällen $< 0,1$ sind. Im physiologischen pH-Bereich sind die neu entwickelten MM-Systeme streng monomodal verteilt (PDI $< 0,1$).

9.3 Stabilität gegenüber verschiedenen Additiva

9.3.1 Einleitung und Versuchsplanung

In diesem Kapitel wird dargestellt, welchen Einfluss die Zugabe unterschiedlicher Substanzen auf die Stabilität des MM-Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 hat. Die bisherigen Untersuchungen wurden an MM-Systemen durchgeführt, die neben den zum Aufbau der MM benötigten (potentiell mizellbildenden) Substanzen nur die Pufferbestandteile enthielten. Nach oraler oder parenteraler Applikation der MM-Systeme liegen die MM jedoch nicht mehr in einem isolierten System (in-vitro), sondern neben den unterschiedlichen Bestandteilen des Magen-Darm-Trakts bzw. des Blutes vor. Die folgenden Untersuchungen sollen in-vitro erste Eindrücke auf den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Stabilität des MM-Systems aufzeigen. Mizellare Systeme können sich durch die Gegenwart von Strukturbrechern oder Strukturbildnern (vgl. Kapitel 2.3.4) hinsichtlich ihrer Eigenschaften oder Morphologie verändern (Kumar et al., 2004; Maiti et al., 2009; Abezgauz et al., 2010; Patel et al., 2010). Nicht nur Tenside lassen sich durch die Gegenwart von verschiedenen Substanzen in ihrem Organisationsverhalten beeinflussen, sondern auch Phospholipide. So wird das Phasenverhalten von Phospholipiden durch Substanzen wie z.B. Harnstoff beeinflusst (Feng et al., 2002). Insofern sollte mit dieser Studie untersucht werden, welche Veränderungen bei Zugabe unterschiedlicher Substanzen auf das Organisationsverhalten der mizellbildenden Substanzen zu MM und auf die Solubilisierungseigenschaften der MM für hydrophobe Substanzen zu beobachten sind. Wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, können bestimmte Substanzen die Löslichkeit anderer Stoffe (z.B. AS) in Wasser in geringem Ausmaß verbessern. Jedoch können solche Additiva oft auch eine Mizellbildung (oder die Löslichkeit der PL) beeinflussen. MM-Systeme wie im Vitamin-Präparat Cernevit[®] werden u.a. zur parenteralen Ernährung eingesetzt. Bei der aseptischen Herstellung von Zubereitungen zur parenteralen Ernährung sind die MM-Systeme oft nur ein Bestandteil einer Vielstoffmischung. In diesen Zubereitungen sind neben den MM-Systemen Substanzen wie Glucose oder NaCl vorhanden, sodass von einem MM-System zu fordern ist, dass es mit den verschiedensten Substanzen

kompatibel ist und dass eine Kombination zu keiner Inkompatibilität führt. Zubereitungen auf MM-Basis können u.a. oral oder parenteral appliziert werden. Hierbei darf es im Körper zu keiner Inkompatibilität der MM mit Bestandteilen der Körperflüssigkeiten, wie Blutbestandteilen oder Magensaft kommen, die zu einer Zerstörung der MM führt.

In den folgenden Untersuchungen wurden in einem ersten Schritt MM-Systeme nach dem direkten Dispergierungsverfahren hergestellt und gegebenenfalls mit Diazepam beladen. Nach Equilibrierung dieser MM-Systeme erfolgte die Zugabe der unterschiedlichen Additiva in einer entsprechenden Konzentration. Die folgenden Ausführungen zeigen die Ergebnisse von Transmissionsmessungen, visuellen Beobachtungen, DLS-Messungen und HPLC-Solubilisierungsstudien.

9.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Interessanterweise ist das MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 gegenüber der Zugabe von Alkoholen wie Ethanol 96% (V/V) oder Benzylalkohol nur wenig stabil (Abbildung 9.21). Bereits bei relativ geringen Mengen dieser Alkohole kam es zu einer deutlichen Trübung, die als Folge einer Präzipitation des hPC in den MM-Systemen einsetzte. Aus der Literatur ist bekannt, dass u.a. die Solubilisierungseigenschaften der klassischen Gallensalz/Lecithin-MM durch die Zugabe geringer Mengen derartiger Alkohole verbessert werden können (Hammad, 1998). Die klassischen MM verwenden jedoch ungesättigte Phospholipide, die im Gegensatz zu den hydrierten Phospholipiden in Ethanol löslich sind. Wie Voruntersuchungen ergaben, ist das verwendete hPC nur in warmen Ethanol (Temperatur > 50°C) löslich und bei RT kommt es zu einer Präzipitation. Die Zugabe von Hexylenglykol oder PEG 400 wurde von dem untersuchten MM-System auch nur in geringeren Konzentrationen vertragen, ohne dass es zu einer Trübung kam (vgl. Abbildung 9.21 oben).

Überraschenderweise zeigte das MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 gegenüber nahezu allen anderen untersuchten Salzen, Säuren, Laugen, Strukturbrechern und -bildnern eine gute bzw. sehr gute Verträglichkeit, da es nach Zugabe dieser Substanzen zu keiner Trübung oder Präzipitation gekommen ist (vgl. Abbildung 9.21).

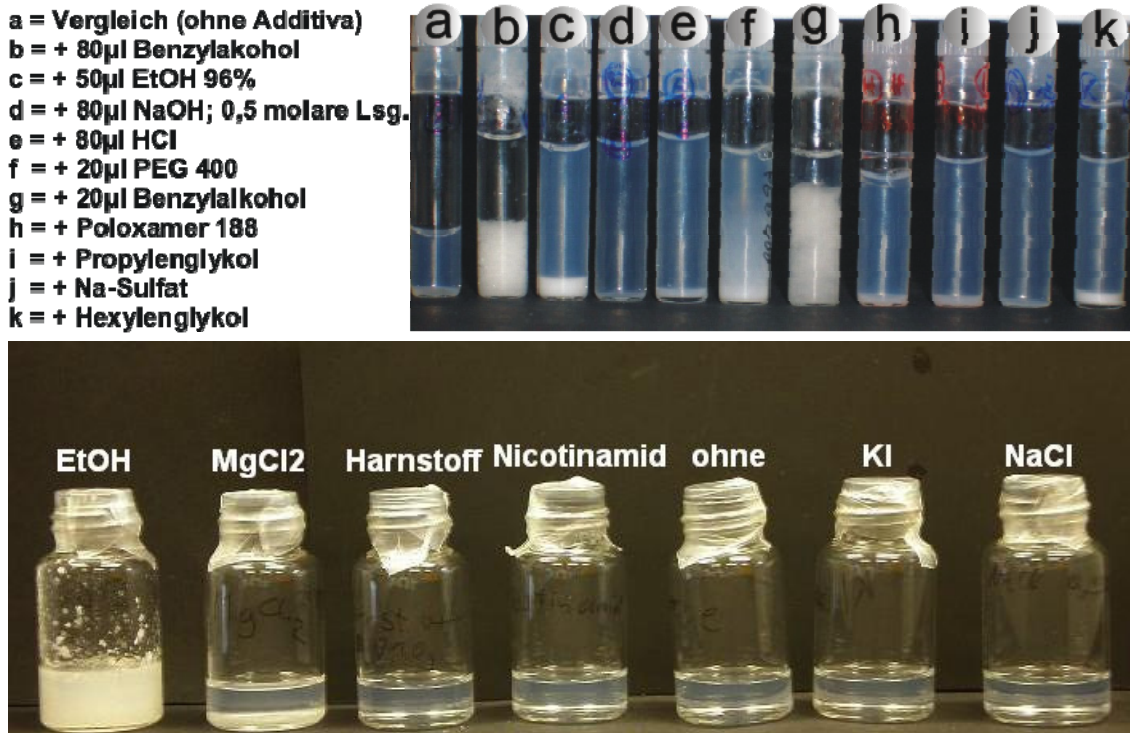


Abbildung 9.21: Visualisierung der Fähigkeit des MM-Systems $hPC+SL WF_{hPC}0.5$ nach Zugabe unterschiedlicher Additiva (b-k, links) weiterhin klare Lösungen aufrecht zuerhalten (Kompatibilitätsstudie)

Die Abbildung 9.22 zeigt die Resultate der Transmissionsmessungen an 1%igen MM-Systemen nach Zugabe verschiedener Substanzen. Hierbei ist der Einfluss dieser Substanzen auf die Fähigkeit unbeladener und mit Diazepam-beladener MM-Systeme zur Ausbildung von isotropen, klaren Lösungen über einen Zeitraum von 16 Tagen Lagerung bei RT dargestellt. In unbeladenen MM-Systemen kam es nur nach Zugabe von 0,5% des Blockcopolymers Poloxamer 188 zu einer Abnahme der Transmission nach 16 Tagen. Diese Inkompatibilität der MM vom Typ $hPC+SL WF_{hPC}0.5$ gegenüber einer Zugabe von 0,5% Poloxamer war im mit Diazepam-beladenen Zustand noch stärker ausgeprägt (vgl. Abbildung 9.22 unten).

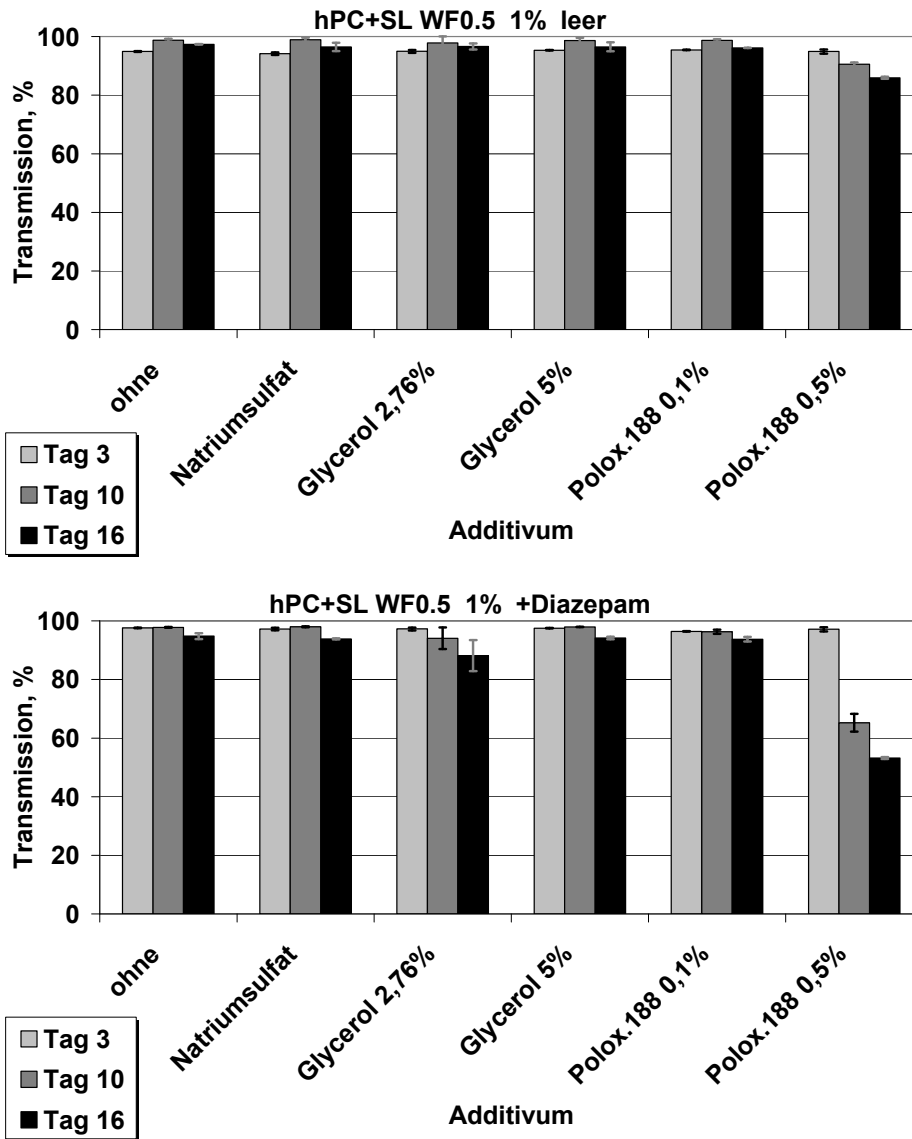


Abbildung 9.22: Transmission in Lösungen des unbeladenen (oben) und mit Diazepam-beladenen (unten) MM-Systems $hPC+SL WF_{hPC}0.5$ nach Zugabe unterschiedlicher Additiva klare Lösungen auszubilden; $n = 2$

Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass das verwendete hPC mit Poloxamer 188 keine klaren MM-Lösungen auszubilden vermag (vgl. 5.1.3), da das Blockcopolymer den Anforderungen des modifizierten Packungsparameterkonzepts nicht entspricht (vgl. Kapitel 5.5). Jedoch zeigten die Untersuchungen an den MM-Lösungen, dass eine Zugabe von 0,1% des Blockcopolymeres über den Zeitraum von 16 Tagen zu keiner Inkompatibilität des Systems geführt hat – weder im unbeladenen noch im mit Diazepam-beladenen Zustand. Dasselbe gilt für Natriumsulfat und

Glycerol. Über einen Zeitraum von drei Wochen kam es in den unbeladenen und Diazepam-beladenen MM-Systemen nach Zugabe der beschriebenen Additiva zu keiner deutlichen Veränderung der mittels DLS-Technik gefundenen hydrodynamischen Durchmesser (Abbildung 9.23). Die MM der unbeladenen Systeme sind zwischen 21 und 25 nm groß. Unabhängig von dem gewählten Additivum kam es nach 14 bzw. 21 Tagen bei Lagerung bei RT zu einem geringem Anstieg in der MM-Größe. Dieses leichte Anschwellen der MM-Größe ist auch bei den Langzeitstabilitätsuntersuchungen für dieses MM-System gefunden worden, sofern die Lagerung bei RT (und nicht gekühlt vorgenommen wurde). Die etwas höheren hydrodynamischen Durchmesser der Glycerol-haltigen Lösungen könnten auf die nicht-korrigierte höhere Viskosität dieser Lösungen zurückzuführen sein oder aber auf ein anderes Hydratationsverhalten der MM in einem Glycerol-haltigem Puffer. In Systemen mit 0,5% Poloxamer 188 kam es dagegen zur Ausbildung bimodaler Systeme, von denen in Abbildung 9.23 nur die Teilchen (Komponente oder Spezies) mit dem geringeren hydrodynamischen Durchmesser dargestellt sind. Das grenzflächenaktive Blockcopolymer wird auf Grund seiner tensidartigen Eigenschaften mit den MM des Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 wechselwirken, wodurch es zu einem Umbau der mizellaren Strukturen kommen kann. Dieses Verhalten erklärt auch ein Ausflocken (Trübung) entsprechender Systeme, wie es in Abbildung 9.22 (unten) dargestellt ist. Die beladenen MM zeigten denselben Trend gegenüber den Additiva wie die unbeladenen MM. Die hydrodynamischen Durchmesser der mit Diazepam-beladenen MM lagen etwa zwischen 25 und 30 nm, was gut mit den vorherigen Untersuchungen an beladenen MM-Systemen (ohne Additiva) des Typs hPC+SL WF_{hPC}0.5 korreliert.

Die PDI-Werte der MM-Systeme nach Zugabe der Additiva und Lagerung über 21 Tagen weisen zudem darauf hin, dass es zu keiner Änderung der Partikelgrößenverteilung gekommen ist (vgl. Tabelle 9.1). Interessanterweise kam es in den meisten MM-Systemen nach Zugabe der Additiva mit längerer Lagerzeit zu einer weiteren Equilibrierung der Systeme, die in einer Verkleinerung der Partikelgrößenverteilung resultierte, da die PDI-Werte mit der Zeit kleiner wurden.

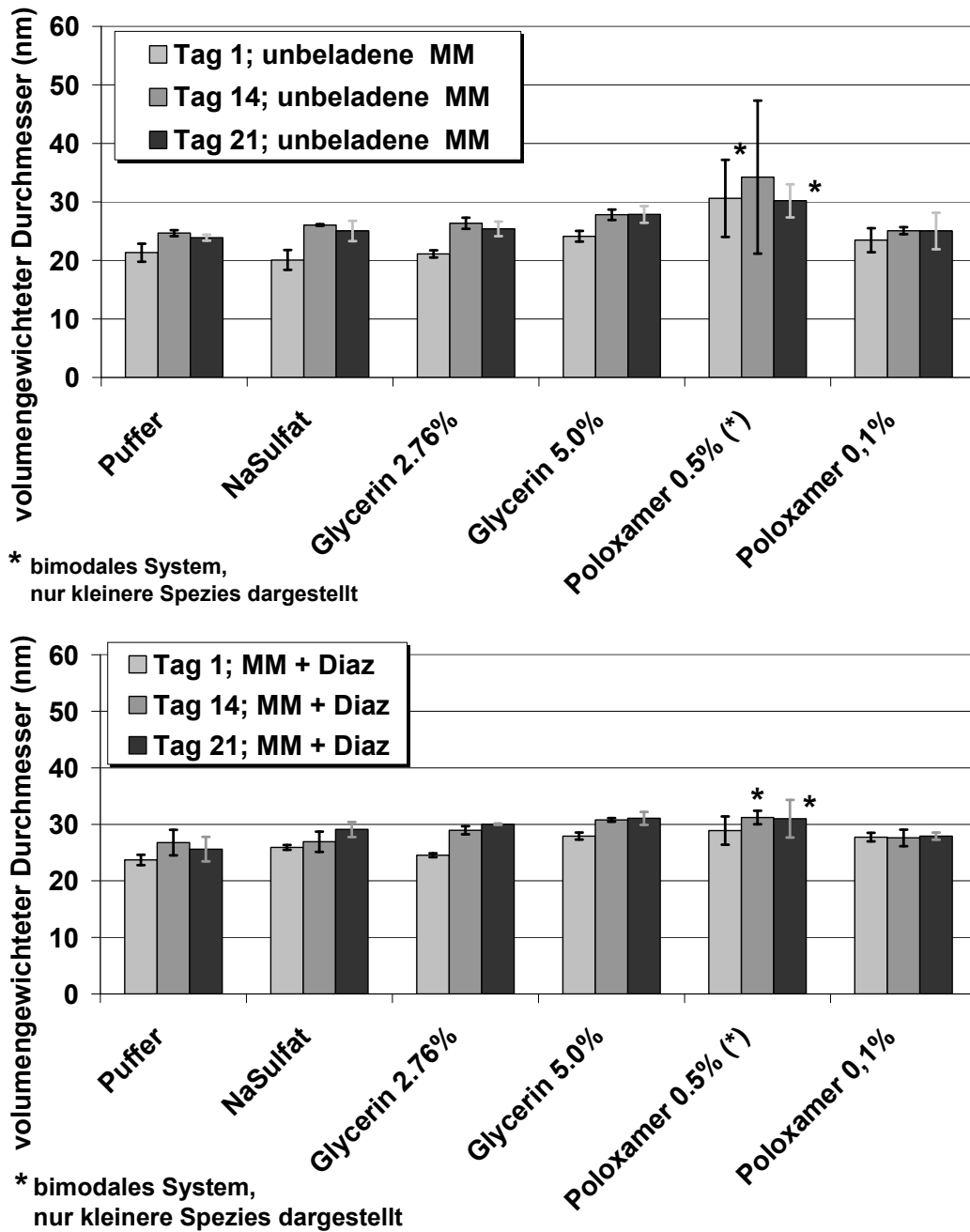


Abbildung 9.23: 21-tägige DLS-Studie: Hydrodynamische Durchmesser der MM des unbeladenen (oben) und mit Diazepam-beladenen (unten) MM-Systems hPC+SL $WF_{hPC0.5}$ nach Zugabe unterschiedlicher Additiva; $n = 6$

Tabelle 9.1: PDI-Werte einer DLS-Studie an MM-Systemen des Typs $hPC+SL$ $WF_{hPC}0.5$ nach Zugabe unterschiedlicher Additiva

unbeladene MM	Tag 1	Tag 14	Tag 21
Puffer	0.23	0.17	0.14
Na-Sulfat	0.34	0.14	0.13
Glycerin 2,76%	0.24	0.17	0.12
Glycerin 5,0%	0.18	0.16	0.11
Poloxamer 0.5%	0.24	0.24	0.23
Poloxamer 0,1%	0.25	0.19	0.20
MM + Diazepam			
Puffer	0.19	0.10	0.21
Na-Sulfat	0.20	0.17	0.09
Glycerin 2,76%	0.20	0.16	0.09
Glycerin 5,0%	0.15	0.18	0.10
Poloxamer 0.5%	0.16	0.15	0.20
Poloxamer 0,1%	0.15	0.12	0.08

In einer weiteren Studie zur Untersuchung der Stabilität der MM-Systeme gegenüber unterschiedlichen Additiva sind den unbeladenen 1%igen MM-Systemen aufsteigende Konzentrationen an NaCl, Glucose und Mannitol zugesetzt worden. Während sich geringe Konzentrationen an Additivum in einer leichten Verkleinerung des MM-Durchmessers äußerten, führte die Zugabe von 10% (das 10-fache an hPC und SL zusammen) der Additiva zu einem Anwachsen der MM von etwa 20 auf 25 nm (Abbildung 9.24). Bei einer Konzentration von 2% an Additivum kam es dagegen kaum zu einer Veränderung des gefundenen MM-Durchmessers. Insgesamt variiert die Größe der MM im System $hPC+SL$ $WF_{hPC}0.5$ in Abhängigkeit von der Art und Konzentration (0,5-10%) des Additivum von 16 nm bis etwa 25 nm, wobei die Größe der MM ohne Additivum bei etwa 20 ± 2 nm lag.

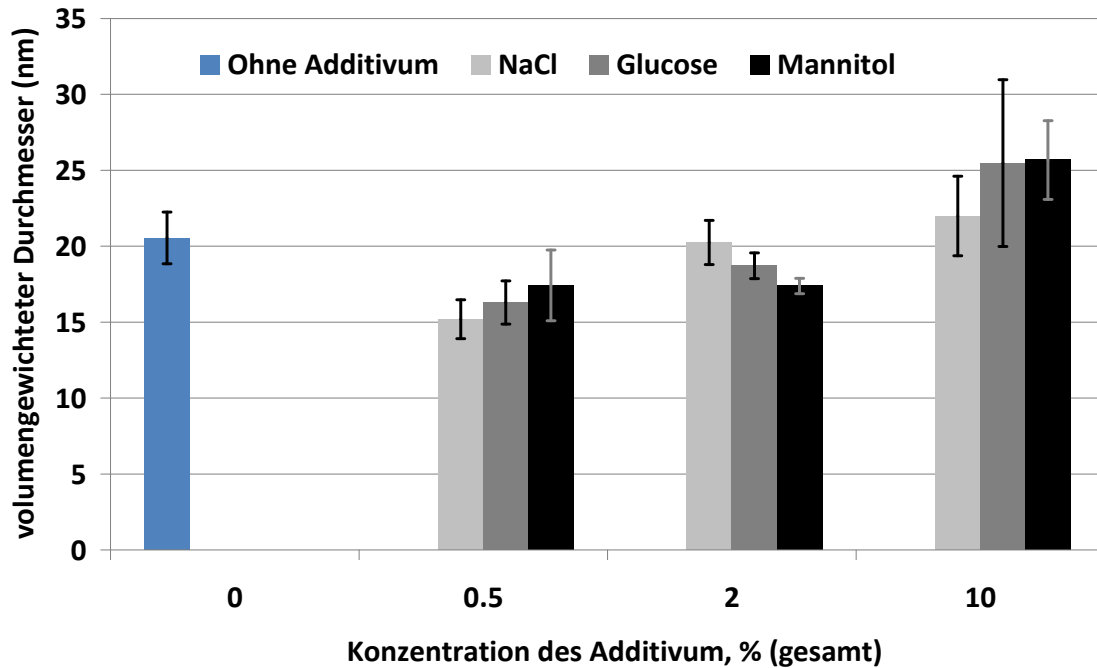


Abbildung 9.24: DLS-Studie: Hydrodynamische Durchmesser der MM des unbeladenen 1%igen MM-Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 nach Zugabe unterschiedlicher Mengen verschiedener Additiva; n = 3

Neben dem Einfluss der Additiva auf die Wasserstruktur (vgl. Kapitel 2.3.4) beeinflussen diese auch die Hydratation der MM und damit den hydrodynamischen MM-Durchmesser, was Schwankungen von geringerem Ausmaß erklären kann. Zusätze wie Harnstoff oder Salze können in einem mizellaren System auch eine Umwandlung von sphärischen in stäbchenförmige Mizellen bewirken (Alargova et al., 2003; Kumar et al., 2004; Acharya und Kunieda, 2006). Allerdings würde es in solchen Fällen vermutlich zu einer deutlicheren Veränderung der Durchmesser als nur von 20 zu 25 nm kommen. Zu beachten ist ferner, dass jeder DLS-Messung dieselbe Viskosität (0,95 mPas (vgl. Abschnitt 4.1)) zugrunde gelegt wurde und der Einfluss von 10% Additivum hierbei nicht berücksichtigt worden ist. Somit könnten die Schwankungen der gefundenen hydrodynamischen Durchmesser hierdurch beeinflusst worden sein, da die Viskosität einen deutlichen Einfluss auf das Messergebnis hat, wie in Abschnitt 4.1 dargestellt wurde.

In der Abbildung 9.25 sind die Dichteverteilungskurven der erhaltenen Partikelgrößenanalysen an MM-Lösungen des Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 vor und nach Zugabe unterschiedlicher Additiva gezeigt. Die Zugabe keines der aufgezeigten Additiva führte zu einer Umwandlung der monomodal verteilten MM in bimodale Systeme. Die gezeigten Dichteverteilungskurven wurden an unfiltrierten Systemen vorgenommen. Weder Strukturbrecher wie Harnstoff oder Kaliumiodid (KI) noch Strukturbildner wie NaCl oder Kaliumchlorid (KCl) führten zu einer Destabilisierung der MM. Wie Abbildung 9.25 verdeutlicht, wurden selbst 10%ige Zusätze von NaCl, Mannitol oder Glucose von dem MM-System toleriert, und es kam zu keiner Umorientierung oder partiellen Präzipitation. Damit bestätigen sowohl die DLS-Messungen als auch die Transmissionsmessungen, dass es nach Zugabe der nicht-alkoholischen Additiva zu keiner manifesten Inkompatibilität gekommen ist. Die Tabelle 9.2 veranschaulicht, welche der getesteten Additiva zu einer manifesten Inkompatibilität, im Sinne einer Präzipitation, Trübung oder Verbreiterung bzw. Änderung der Partikelgrößenverteilung führen bzw. welche Zusätze für das MM-System als kompatibel zu bewerten sind.

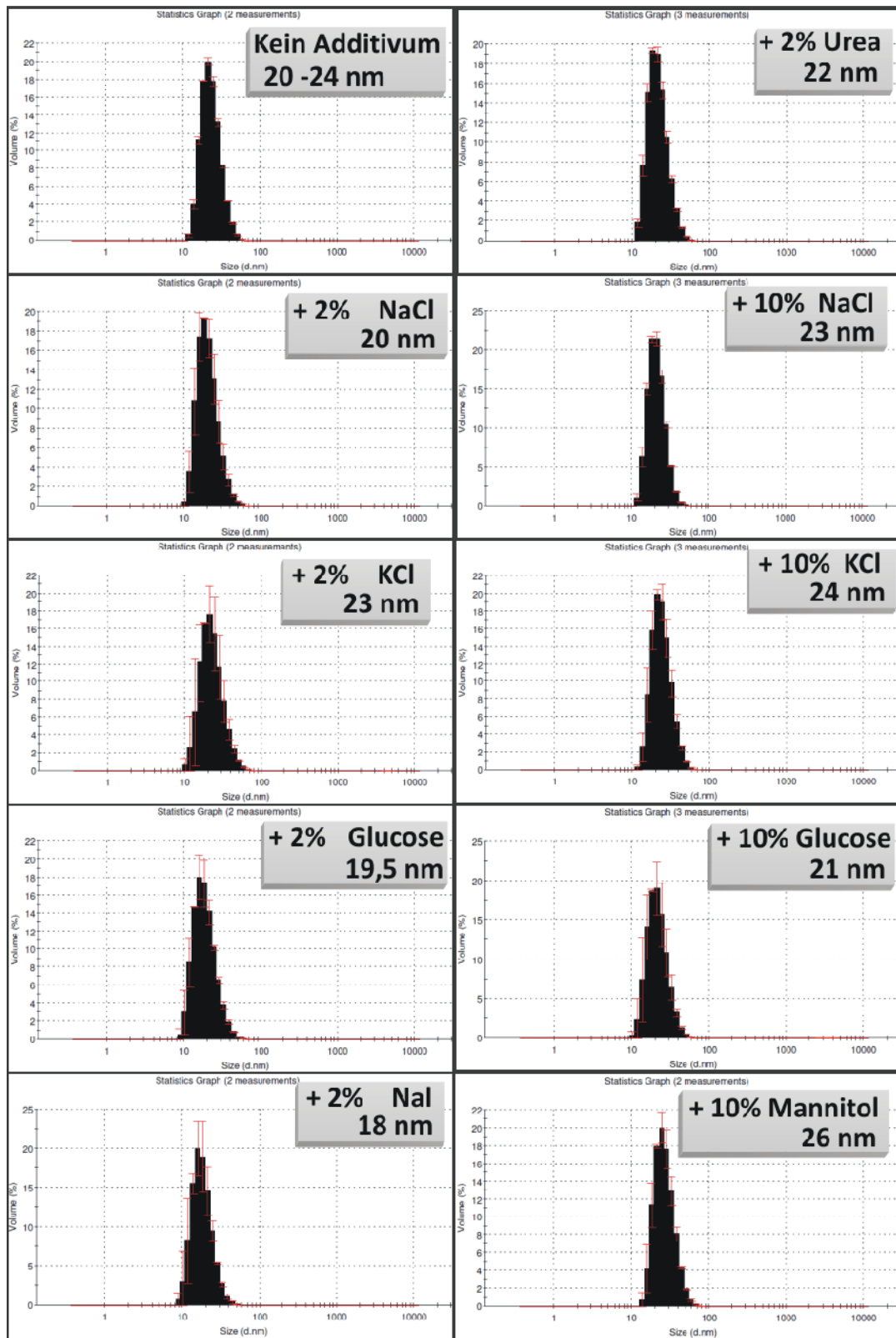


Abbildung 9.25: DLS-Studie: Einfluss verschiedener Additiva auf die MM-Größe im System hPC+SL WF_{hPC}0.5; n = 3

Tabelle 9.2: Übersicht über die Kompatibilität des MM-Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 gegenüber der Zugabe unterschiedlicher Additiva (Kompatibilität meint die beständige Fähigkeit klare Lösungen auszubilden)

Additivum	Kompatibilität
EtOH 96%	nein (Trübung)
Benzylalkohol	nein (Trübung)
Propylenglykol	ja
Hexylenglykol	ja (ggf. leichte Trübung)
HCL	ja
NaOH	ja (pH < 12); pH > 12 (Gel)
Harnstoff	ja
Nicotinamid	ja
Glucose	ja
Saccharose	ja
Mannitol	ja
MgCl ₂	konzentrationsabhängig
KI (Kaliumiodid)	ja
NaCl	ja
Na-Sulfat	ja
PEG 400	konzentrationsabhängig
Poloxamer 188	konzentrationsabhängig 0,1% werden noch toleriert

Die Diazepam-Solubilisierungskapazitäten des 1%igen MM-Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 vor und nach Zugabe unterschiedlicher Additiva sind in Abbildung 9.26 über eine Lagerzeit von 14 Tagen dargestellt. Keines der untersuchten Zusätze erreichte eine Erhöhung der

Solubilisierungskapazität. Die Zugabe von Poloxamer 188 in 0,1%iger oder 0,5%iger Konzentration führte zu einer Abnahme der Solubilisierungskapazität, da die MM durch das Blockcopolymer destabilisiert wurden (vgl. Abbildung 9.22 und Abbildung 9.23).

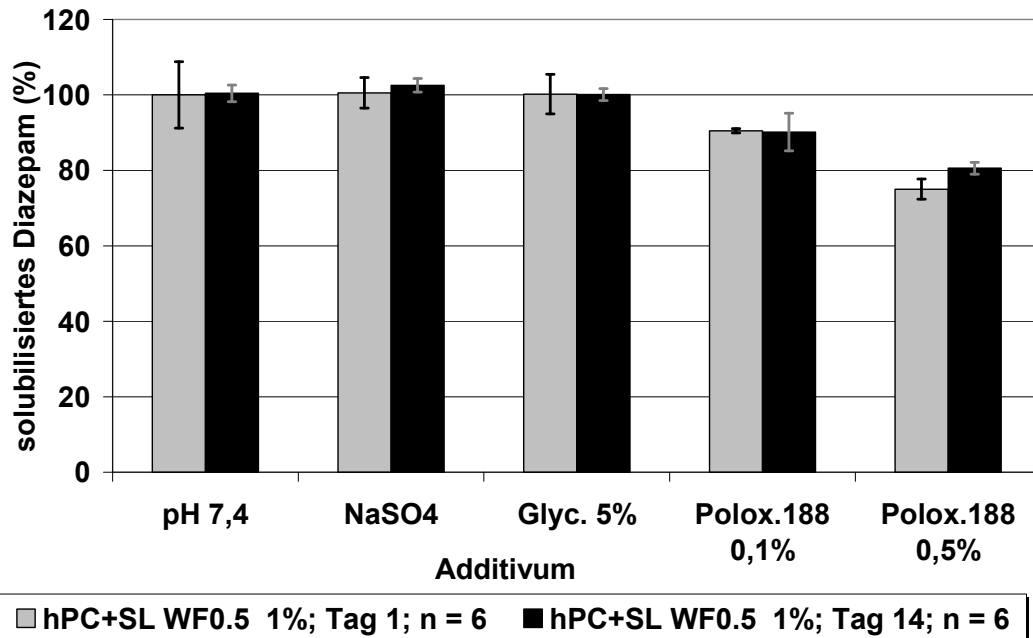


Abbildung 9.26: Einfluss verschiedener Additiva auf die Solubilisierungskapazität des 1%igen MM-Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 für Diazepam über einen Zeitraum von 14 Tage und Lagerung bei RT; n = 6

Der Strukturbrecher Natriumsulfat und eine 5%ige Zugabe von Glycerol nahmen keinen Einfluss auf die Solubilisierungskapazität der MM-Systeme für Diazepam (Abbildung 9.26). Damit führte eine Zugabe des Cosolvens Glycerol nicht zu einer Steigerung der Solubilisierungskapazität, was zu erwarten gewesen wäre, da die Polarität des Wassers durch das Glycerol herabgesetzt wird. Allerdings kann es sein, dass die Konzentration an Glycerol mit 5% noch zu gering war, um einen messbaren Effekt feststellen zu können.

9.3.3 Zusammenfassung

Das MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 zeigte keine manifesten Inkompatibilitäten gegenüber sämtlichen eingesetzten Salzen, Zuckern, Zuckeralkoholen, Strukturbrechern wie Harnstoff oder Nicotinamid, sowie

gegenüber Säuren oder Basen und Glycerol. Nach Zugabe dieser Substanzen kam es weder zur Trübung des Systems infolge einer Präzipitation des wasser-unlöslichen hPC, noch kam es zu einer Verbreiterung oder Veränderung der Partikelgrößenverteilung wie die Transmissions- bzw. DLS-Messungen ergeben haben. Die Untersuchungen zur Stabilität des neu entwickelten MM-Systems lassen den Schluss zu, dass dieses System mit den untersuchten und zuletzt beschriebenen Substanzen kompatibel ist. Die MM des Typs hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ sollten nicht mit grenzflächenaktiven Blockcopolymeren kombiniert werden. Das eingesetzte Poloxamer 188 wird nur in geringeren Konzentrationen von etwa 0,1% toleriert. Bereits bei höheren Konzentrationen von 0,5% kommt es zu einer manifesten Inkompatibilität, die nach einigen Tagen in einer Trübung des Systems resultiert. Generell sollte der Einsatz zusätzlicher grenzflächenaktiver Substanzen kritisch gesehen werden, da hier die Möglichkeit einer Wechselwirkung mit den mischmizellbildenden Amphiphilen besteht, die das vorhandene MM-System verändern könnte. Die Untersuchungen an ternären MM-Systemen haben jedoch gezeigt, dass MM-Systeme aus hPC und SL Zusätze von grenzflächenaktiven Substanzen wie Polysorbaten in gewissen Konzentrationen gut vertragen. Zu beachten ist, dass Zusätze von Alkoholen wie Benzylalkohol oder Ethanol bereits in relativ geringen Konzentrationen zu einer manifesten Inkompatibilität führen, die sich in Form einer Präzipitation des hPC, und damit einer Trübung des Systems äußert. Der Einfluss unterschiedlicher Additiva auf den Trübungspunkt in mischmizellaren Systemen wird in Kapitel 9.7 separat diskutiert.

9.4 Lyophilisation von MM-Systemen

9.4.1 Einleitung und Versuchsplanung

Wie in Abschnitt 3.12 beschrieben, stellt die Gefriertrocknung eine sehr effektive Methode dar, um die Stabilität einer wässrigen Formulierung durch Entfernung des Wassers zu erhöhen. Neben einer Erhöhung der chemischen Stabilität (vgl. Abschnitt 3.12) durch Protektion der Estergruppen-enthaltenden, Mischmizell-bildenden Substanzen bedingt der Wasserentzug einen Schutz vor einer mikrobiellen Kontamination bzw. einer Reduktion des Keimwachstums. Die Aufbewahrung der MM-Systeme als Lyophilisate bringt neben einer Lagerungsoptimierung den Vorteil einer Dosierungsoptimierung mit sich. So kann eine Konzentrationseinstellung nahezu beliebig erfolgen.

Diese Studie verfolgt zudem einen weiteren Aspekt. Zwar sind bisher nur wenige MM-Systeme als oral zu applizierende Arzneimittel am Pharmamarkt präsent, dennoch belegen mehrere Studien den Vorteil einer oralen Applikation von MM, da sie die Bioverfügbarkeit erhöhen können (vgl. Kapitel 2.2.3). Insofern kann eine erfolgreiche Lyophilisation eines AS-haltigen MM-Systems der erste Schritt einer Formulierungsentwicklung sein. So besteht die Möglichkeit die MM-haltigen Lyophilisate z.B. als Schmelztablette einzusetzen. Ein besonderer Vorteil des untersuchten MM-Systems ist die Verwendung von Zuckerestern, die einen guten Geschmack haben. Sucroseester werden bereits seit langer Zeit zur Herstellung von Eiscreme eingesetzt (Buck et al., 1986). Das am weltweiten Pharmamarkt präsente Vitamin K₁-haltige Konaktion[®] MM auf Gallensalz/Lecithin-Basis soll bei Kleinkindern mit Vitamin K₁-Mangel als oral zu applizierendes Arzneimittel Verwendung finden. Jedoch scheint hier der völlig bittere Geschmack der Gallensalze nicht beachtet zu werden. Allerdings existiert bisher keine alternative MM-Formulierung. In der Literatur ist beschrieben, wie sich AS-haltige mizellare Systeme (Polymermizellen) erfolgreich lyophilisieren lassen (Huh et al., 2005; Miyata et al., 2005), jedoch weisen die dort verwendeten mizellbildenden Substanzen selbst eine sehr gute Wasserlöslichkeit auf, so dass eine erneute Mizellbildung nach Rekonstitution in Wasser zu erwarten ist. Im Rahmen dieser Arbeit sind MM-Systeme entwickelt worden, die neben gut

wasserlöslichem SL das wasserunlösliche hPC enthalten. Damit ergibt sich eine zusätzliche Herausforderung, die darin besteht eine Gefriertrocknung in der Weise zu ermöglichen, dass eine anschließende Rekonstitution in Wasser erneut zu einer erfolgreichen Reorganisation der SL- und hPC-Moleküle zu MM führt.

Im Folgenden soll gezeigt werden, inwieweit das neu entwickelte MM-System hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ im unbeladenen und im mit Diazepam-beladenen Zustand einer Gefriertrocknung zugänglich ist. Ziel ist es, eine Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist, MM-Systeme zu lyophilisieren und anschließend in Wasser zu rekonstituieren, ohne dass es zu einer Trübung, Veränderung der Partikelgrößenverteilung oder aber einem Verlust an inkorporierten Diazepam kommt. Zu einigen der eingesetzten 5%igen MM-Lösungen wurden Zusätze zur Stabilisierung des Lyophilisats wie Mannitol oder Saccharose gegeben. Nach der Gefriertrocknung (Methode siehe Abschnitt 3.12) erfolgte die Rekonstitution der MM in Aqua bidest. und die equilibrierten Proben sind mittels DLS- und HPLC-Analytik untersucht worden.

9.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildung 9.27 zeigt unbeladene (links) und mit Diazepam-beladene (rechts) 5%ige MM-Systeme mit und ohne Zusatz von unterschiedlichen Mengen an Mannitol. Die Abbildung illustriert die nach erfolgreicher Lyophilisierung erhaltenen Gefriertrocknungskuchen in den entsprechenden Glasvials (Bild oben). Der untere Teil der Abbildung 9.27 zeigt dieselben Proben nach Rekonstitution in Wasser, wonach erneut 5%ige MM-Lösungen erhalten wurden, die klar erscheinen. Zu erkennen ist, dass die Gefriertrocknung ohne einen Volumenverlust erfolgte (kein Absacken oder Zusammenbrechen der Kuchen). Dies wurde für jede MM-Lösung mit oder ohne Zusatz gefunden.

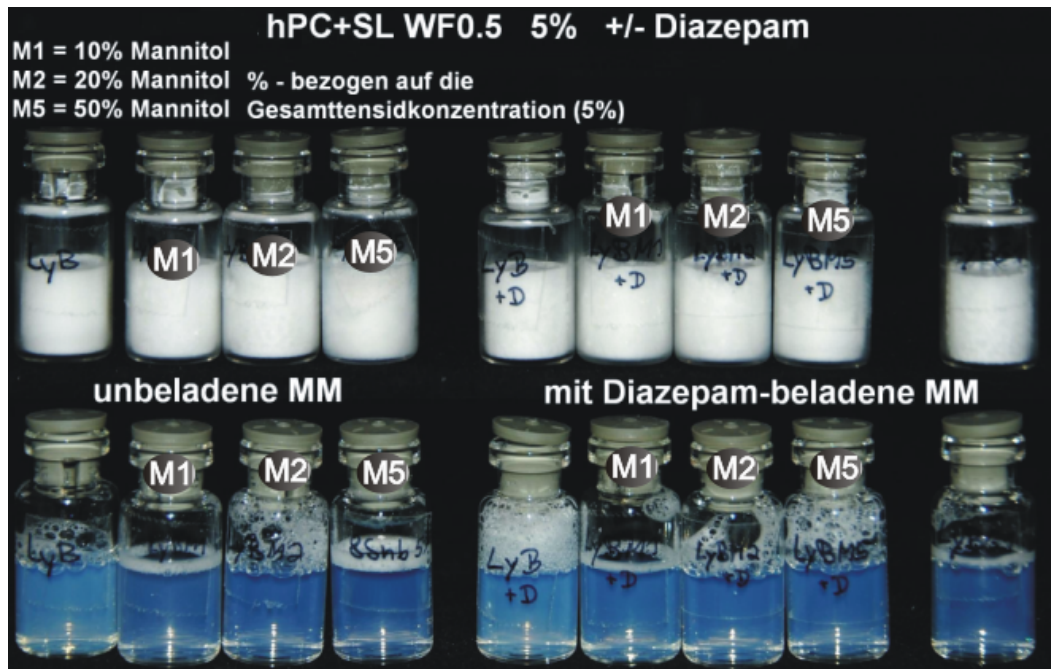


Abbildung 9.27: Visualisierung der 5%igen unbeladenen (links) und mit Diazepam-beladenen (rechts) MM-Systeme nach der Lyophilisation (oben) und nach der Rekonstituierung in Aqua bidest.; Zusatz (%) bezogen auf den hPC/SL-Anteil

Die jeweils ganz links gezeigten Proben enthalten das MM-System im unbeladenen oder beladenen Zustand ohne ein Stabilisierungsagens. Wie zu erkennen ist, erscheinen diese Systeme nicht so klar wie die Proben desselben MM-Systems mit Zusätzen wie Mannitol. Ein Zusatz von 5 mg/ml Mannitol reichte jedoch aus, damit sich die Proben wieder zu einer klaren Lösung redispergieren ließen. Jedoch erfolgte die Ausbildung einer klaren Lösung nicht nach direktem Kontakt mit Wasser, sondern erst nach einer Zeit von mehreren Minuten bis einigen Stunden. Die Verwendung eines Ultraschallbads verkürzte die Equilibrierungszeit enorm. Nach Zugabe des Wassers reichte ein kurzes Eintauchen von zwei bis fünf Sekunden ins Ultraschallbad, um die MM-Lösungen optisch klar werden zu lassen. Die Abbildung 9.28 zeigt die Dichteverteilungskurven der DLS-Partikelgrößenanalyse des untersuchten MM-Systems vor (Bild oben links) und nach der Gefriertrocknung und anschließender Rekonstitution in Wasser. Die unbeladenen MM wiesen vor Durchführung der Gefriertrocknung einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 24 nm auf. Nach der Gefriertrocknung und anschließender Rekonstitution in

Wasser kam es zu keiner Änderung der Partikelgrößenverteilung. Die unbeladenen MM zeigten auch mit Mannitolzusatz einen hydrodynamischen Durchmesser von 24 bzw. 21 nm.

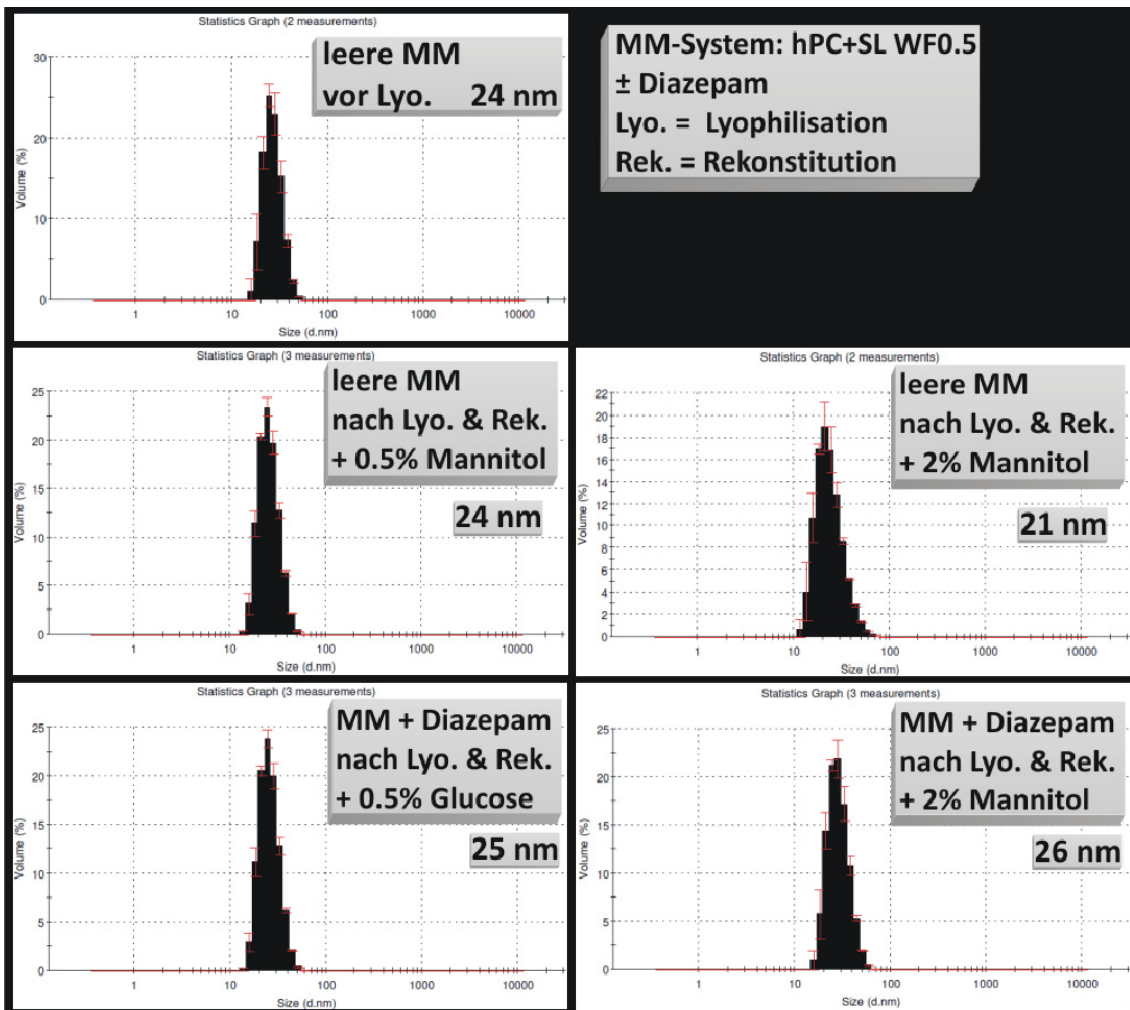


Abbildung 9.28: DLS-Studie: Hydrodynamische Durchmesser der 5%igen unbeladenen und mit Diazepam-beladenen MM vor der Lyophilisation und nach Lyophilisation und Rekonstitution in Aqua bidest.; $n = 3$

In MM-Systemen mit Diazepam sowie einem Zusatz von Glucose bzw. Mannitol lagen die mittleren hydrodynamischen Durchmesser der MM nach Rekonstitution in Wasser bei 25 bzw. 26 nm (Abbildung 9.28). Diese Ergebnisse korrelieren zudem sehr gut mit den Untersuchungen an anderen Chargen desselben MM-Systems, sowohl im unbeladenen als auch im mit Diazepam-beladenen Zustand (vgl. Abbildung 6.14). Die DLS-Analyse an den equilibrierten und zuvor rekonstituierten MM-Lösungen

bestätigen eine erfolgreiche Gefriertrocknung mit erfolgreicher Wiederherstellung des MM-Systems sowohl im beladenen als auch im unbeladenen Zustand. Die HPLC-Analytik an 5%igen Proben des MM-Systems vor und nach der Gefriertrocknung mit anschließender Rekonstitution in Wasser zeigen, dass die Solubilisierungskapazitäten des MM-Systems für Diazepam nach der Gefriertrocknung wiedergefunden wurden (Abbildung 9.29).

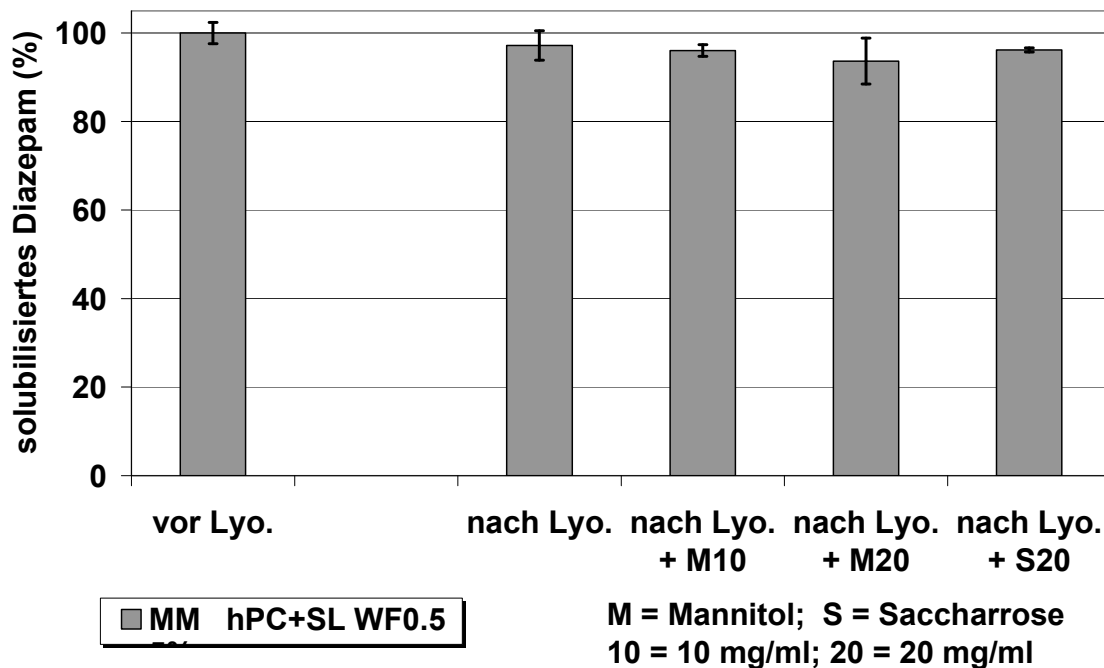


Abbildung 9.29: Solubilisierungskapazitäten 5%iger MM für Diazepam vor der Lyophilisation und nach Lyophilisation und Rekonstitution in Aqua bidest.; ohne und mit unterschiedl. Additiva wie Mannitol oder Saccharose ($n = 6$)

Nach der Lyophilisation kam es höchstens zu einer geringen Abnahme der Solubilisierungskapazität der MM-Systeme für Diazepam. Hierbei hatte die Anwesenheit der Lyoprotektoren Mannitol oder Saccharose keinen wesentlichen Einfluss auf die wiedergefundene Solubilisierungskapazität.

9.5 Lokalisation von Arzneistoffmolekülen in ausgewählten MM-Systemen

9.5.1 Einleitung und Versuchsplanung

Wie bereits beschrieben ergeben sich in mizellaren Systemen mehrere Möglichkeiten zur Solubilisierung eines Arzneistoffes. In Abhängigkeit von den physiko-chemischen Eigenschaften des zu solubilisierenden Stoffes aber auch der mizellbildenden Substanzen, sowie verschiedenen Einflussfaktoren des umgebenden Mediums (pH, Ionenstärke, etc.) kann ein zu solubilisierender Stoff ins Innere der Mizellen, in die Mizelhülle oder aber an die Mizelloberfläche gebunden vorliegen (Torchilin, 2007). Daraus wiederum können sich Auswirkungen auf die Stabilität des solubilisierten Arzneistoffes ergeben. Sofern der Arzneistoff in Wasser einer Hydrolyse unterliegt, kann eine Adsorption der AS-Moleküle an die äußere Mizelloberfläche über eine verstärkte Exposition zum wässrigen Medium zu einem gesteigerten hydrolytischen Abbau führen. In einem solchen Fall würde ein Einschluss der AS-Moleküle ins lipophile Mizellinnere eine Protektion vor einer Hydrolyse bedingen. Generell ist eine Einkapselung des zu solubilisierenden AS in das Innere der Mizellen bzw. MM zu bevorzugen (v.a. bei i.v.-Applikation), da hier eine Abschirmung vor beispielsweise Blutbestandteilen wie Plasmaproteinen oder Oponinen gegeben ist, die eine Entfernung des AS aus der Blutbahn bedingen können.

Die folgenden Untersuchungen wurden in Anlehnung an bereits etablierte und in der Literatur beschriebene Methoden (Gupta et al., 2000; Wei et al., 2009) durchgeführt und verfolgen das Ziel, die Lokalisierung des Diazepam in einem neu-entwickelten MM-System aufzuklären. Sämtliche Proben wurden wie in Abschnitt 3.10 beschrieben hergestellt und anschließend nach den beschriebenen Methoden analysiert. Weiterhin wurde Diazepam (als Zielstruktur) in derselben Konzentration wie es in den MM solubilisiert ist, ebenfalls in einer Probe in deuteriertem Chloroform gelöst und ein entsprechendes $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen.

9.5.2 Ergebnisse und Diskussion

Vor der Durchführung eines $^1\text{H-NMR}$ Experiments sollte geklärt werden, ob sich die zuvor lyophilisierten MM-Systeme nach der Gefriertrocknung in deuteriertem Wasser (D_2O) rekonstituieren lassen.

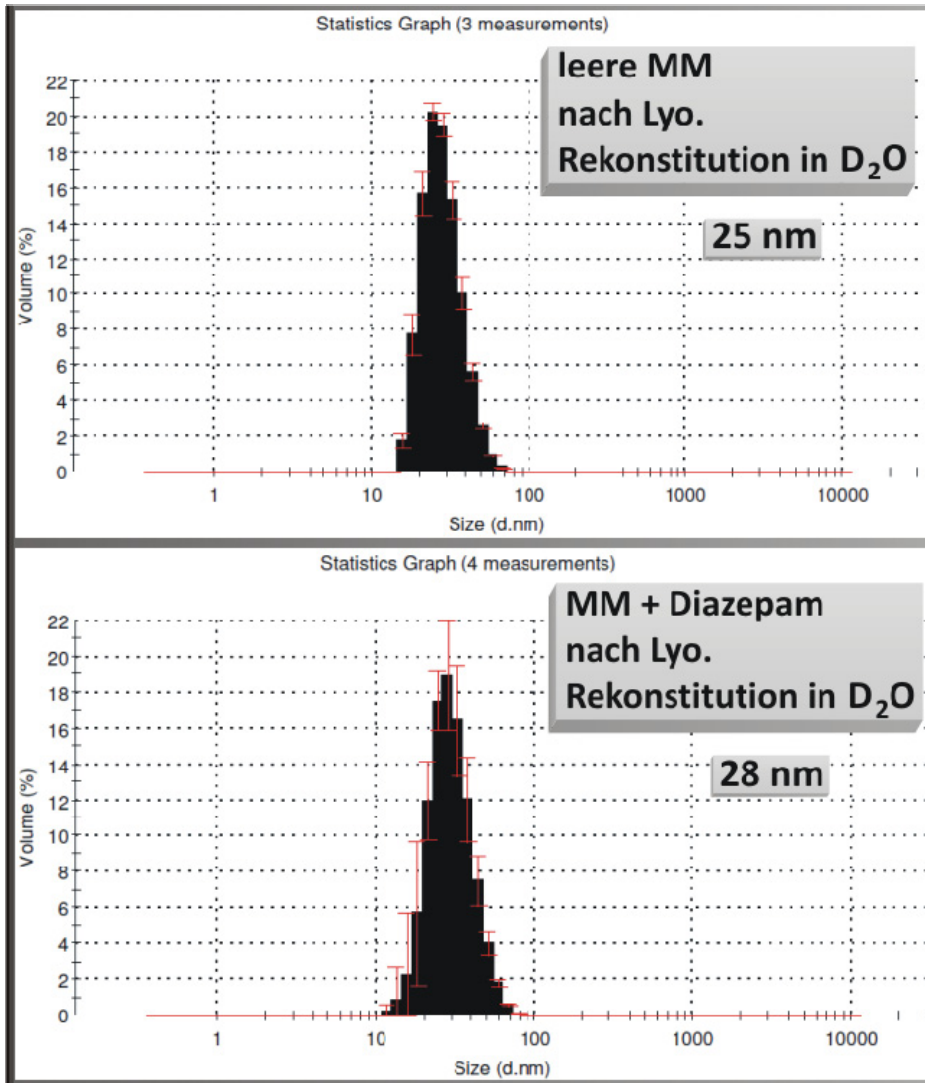


Abbildung 9.30: Dichteverteilungskurven der volumengewichteten Partikelgrößenanalyse in unbeladenen und mit Diazepam-beladenen MM des Typs $\text{hPC+SL WF}_{\text{hPC}0.5}$ nach Lyophilisierung und Rekonstitution in D_2O ($n = 3$)

Die Abbildung 9.30 zeigt die Ergebnisse der DLS-Messungen an unbeladenen (Bild: oben) und mit Diazepam-beladenen (Bild: unten) Mischmizellen nach Rekonstitution in deuteriertem Wasser. Die Ergebnisse dieser DLS-Studie belegen, dass sich das MM-System $\text{hPC+SL WF}_{\text{hPC}0.5}$ auch (nach Lyophilisation) in deuteriertem Wasser erfolgreich

redispergieren lässt, ohne eine Veränderung der Partikelgrößenverteilung zu zeigen. Lediglich die mittleren hydrodynamischen Durchmesser der unbeladenen MM scheinen in D₂O etwa 1-2 nm größer zu sein als in H₂O. Nachdem die Herstellung bzw. Rekonstitution der MM in deuteriertem Wasser erfolgreich war, wurde die ¹H-NMR-Analyse an unterschiedlichen Proben durchgeführt.

Zunächst wurde Diazepam bei einer Konzentration von 750 µg/ml in deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gelöst, um dann von dieser Lösung ein ¹H-NMR Spektrum aufnehmen zu können (Abbildung 9.31). Voruntersuchungen der Solubilisierungskapazitäten der hier verwendeten Charge an MM ergaben, dass die Löslichkeit von Diazepam in den verwendeten MM bei etwa 1700 µg/ml lag. Die Abbildung 9.31 zeigt die drei bzw. vier charakteristischen Banden des Diazepams. Bei etwa 7,5 ppm sind die Banden des aromatischen Bereiches als deutliche Signale der Wasserstoffatome der Aromaten zu erkennen. Diese Signale sind mit einem geschlossenen Kreis besser kenntlich gemacht. Als weiteres charakteristisches Signal ist ein Peak bei etwa 3,35 ppm zuerkennen, bei dem es sich um die Wasserstoffatome der N-Methylgruppe am Stickstoff handelt. Dieses Singulett ist von einem gestrichelten Rechteck in Abbildung 9.31 umrandet. Das Diazepam-Molekül weist weiterhin eine freie CH₂-Gruppe am siebengliedrigen, zentralen Ringsystem auf, deren Wasserstoffatome als zwei Dupletts im ¹H-NMR Spektrum von Diazepam zu erkennen sind und etwa bei 3,75 und 4,9 ppm liegen. Die geschlossenen, grünen Rechtecke weisen auf die entsprechenden Banden (Abbildung 9.31).

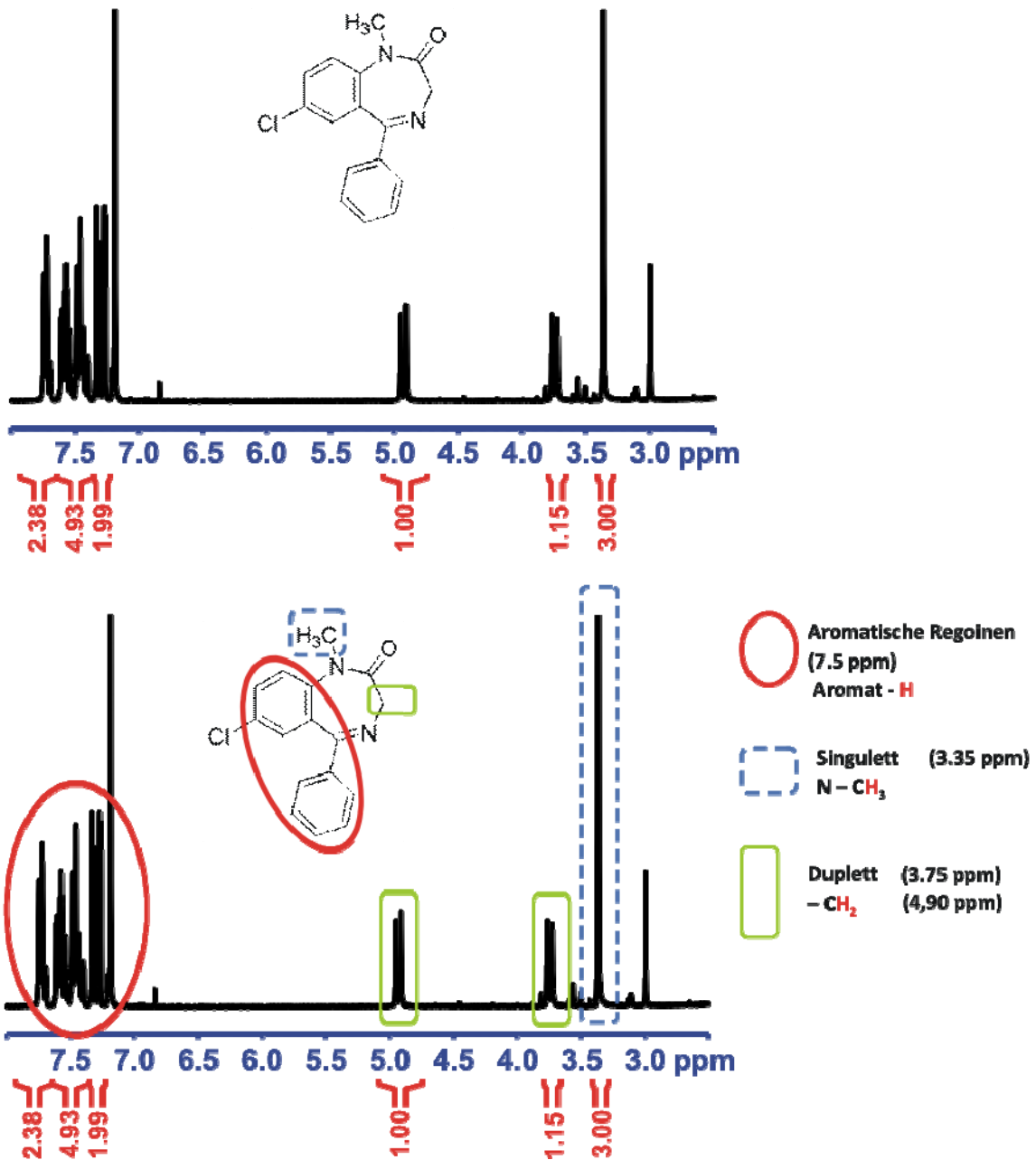


Abbildung 9.31: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Diazepam in deuteriertem Chloroform; mit Markierung der charakteristischen Banden (Bild unten)

Nachdem die Zielstrukturen des Diazepams als charakteristische Banden im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum spezifiziert wurden und bekannt waren, sind die unterschiedlichen MM-Systeme analysiert worden.

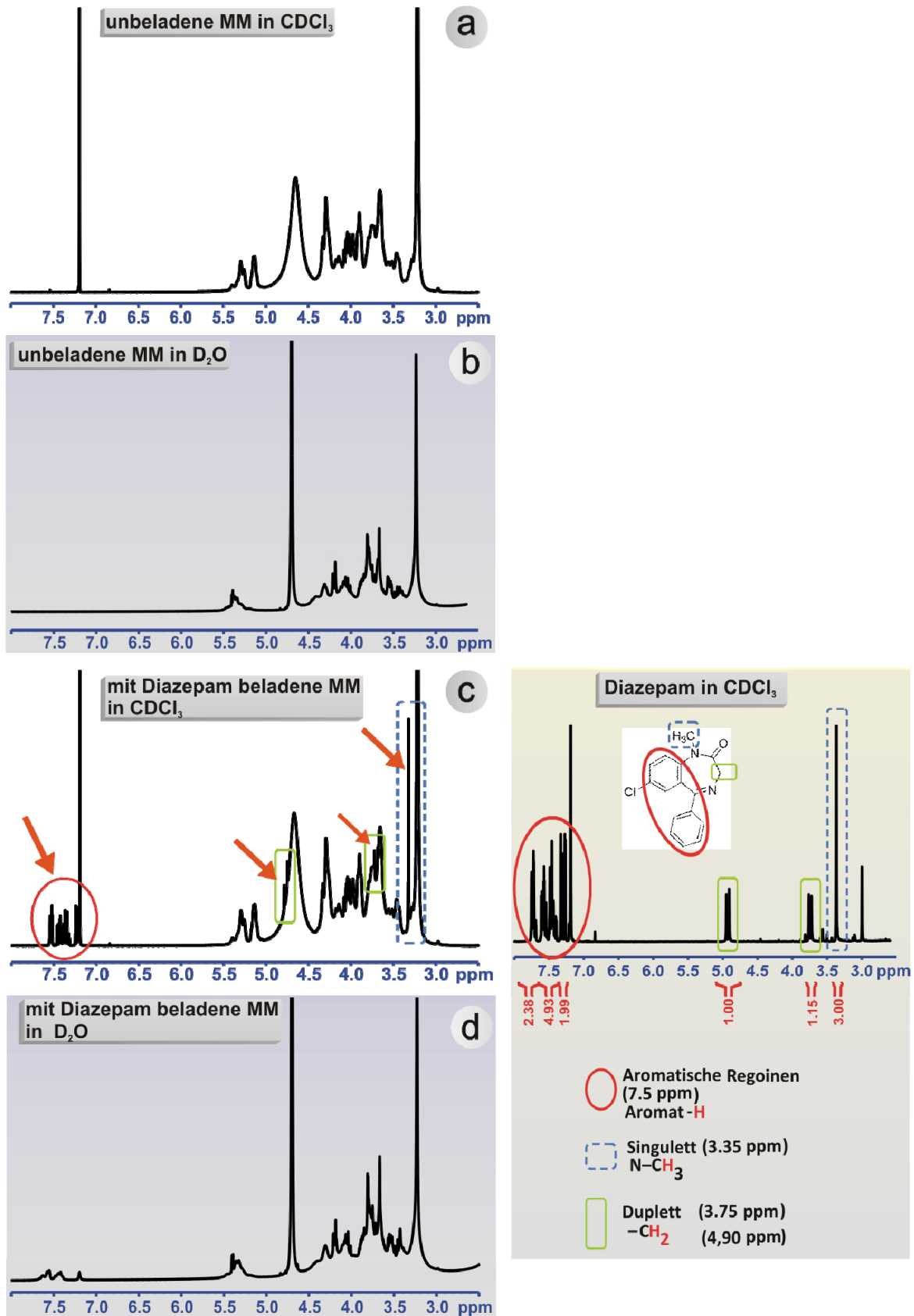


Abbildung 9.32: $^1\text{H-NMR}$ Spektren unbeladener und mit Diazepam-beladener MM (c_{Diaz} ca. 1,7 mg/ml) in D_2O (Bild b & d) bzw. CDCl_3 (Bild a & c)

Die Abbildung 9.32 zeigt $^1\text{H-NMR}$ Spektren von unbeladenen MM-Systemen in CDCl_3 (a) bzw. in D_2O (b) ohne Diazepam und mit Diazepam-beladene MM-Systeme in CDCl_3 (c) bzw. in D_2O (d). Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des beladenen MM-System in CDCl_3 (Abbildung 9.32 c) veranschaulicht sämtliche Signale aller Bestandteile des Systems, die in CDCl_3 gelöst vorlagen. Das MM-System wurde beim Lösen in CDCl_3 zerstört, wodurch sämtliches solubilisiertes Diazepam –in CDCl_3 gelöst und nicht mehr in den MM solubilisiert–für die $^1\text{H-NMR}$ -Analytik detektierbar wurde. Die Banden des Diazepam sind hier entsprechend gekennzeichnet und alle charakteristischen Signale sind zusätzlich durch Pfeile markiert. Jedes der charakteristischen Diazepam-Signale ließ sich wiederfinden, wobei die Wasserstoffatome im aromatischen Bereich und die Wasserstoffatome der N-Methylgruppe die stärksten Signale lieferten. Die Signale der Wasserstoffatome der CH_2 -Gruppe sind als relativ schwache und phasenverschobene Signale nur schwierig zu erkennen (Abbildung 9.32 c). Jedoch wiesen die Kopplungskonstanten daraufhin, dass es sich hierbei um die beiden Dupletts der CH_2 -Gruppe, die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein AB-System bildet, handeln müsste (Kopplungskonstanten sind nicht dargestellt). In der Abbildung 9.32 d ist das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum desselben beladenen MM-Systems in D_2O (anstatt in CDCl_3) gezeigt. Auch in diesem System befindet sich dieselbe Konzentration an Diazepam in einer gelösten (solubilisierten) Form. Wie die Abbildung zeigt, sind weder die schwachen Signale der CH_2 -Gruppe des Diazepams als Dupletts zuerkennen, noch ist das Signal der Wasserstoffatome der N-Methylgruppe bei etwa 3,35 ppm wiederzufinden, welches zuvor (vgl. Abbildung 9.31 und Abbildung 9.32 c) die größte Signalintensität zeigte. Allerdings ist ein „Artefakt“ der Signale der Wasserstoffatome des aromatischen Bereiches bei etwa 7,5 ppm zu erkennen. In diesem Bereich müssten jedoch acht Peaks zu finden sein, da acht Wasserstoffatome im aromatischen Bereich des Diazepams vorhanden sind. Stattdessen lassen sich als „Artefakt“ nur drei Peaks erkennen. Die Tatsache, dass bei etwa 7,5 ppm ein Signal gefunden wurde, könnte in einem nicht vollständigem Einschluss des Diazepams im Inneren der Mischmizellen begründet sein. Auf der anderen Seite konnte der deutliche Peak der Wasserstoffatome der

N-Methylgruppe bei etwa 3,35 ppm nicht wiedergefunden werden, was auf eine Aufnahme des Diazepam ins Innere der MM schließen lässt. Zudem besteht ferner die Möglichkeit, dass ein Teil des Diazepam in die Hülle der MM eingebaut wurde bzw. dass eventuell die N-Methylgruppe ins Innere der MM ragt und somit nach Außen hin abgeschirmt vorliegt. Allerdings sind das eher spekulative Annahmen.

Möglicherweise kam es in dem untersuchten MM-System zu einer partiellen Adsorption von Diazepam an die Oberfläche der MM, da die MM bis zur vollständigen Sättigung mit Diazepam beladen wurden. (Durch die Beladungsmethode bedingt, wird nur überschüssiges Diazepam, das nicht im Innern der MM solubilisiert wurde, mittels Ultrazentrifugation abgetrennt.) Somit besteht die Möglichkeit, dass infolge einer Übersättigung (durch Temperaturabfall, Verwendung von D₂O anstatt H₂O) nach der Probenaufbereitung ein Teil des Diazepam ausgefallen ist und an die MM-Oberfläche adsorbiert wurde. Eine weitere Untersuchungsreihe sollte hierüber Aufschluss geben. Das hierbei verwendete MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5 wurde nicht bis zur Sättigung mit Diazepam beladen. Das zuvor verwendete mit Diazepam-beladene 5%ige MM-System wurde in einem weiteren Schritt mit dem unbeladenen 5%igen MM-System verdünnt (ca. 2+1) und über 24 Stunden zur Equilibrierung stehen gelassen bevor das ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen wurde. Die Abbildung 9.33 zeigt das ¹H-NMR Spektrum dieses MM-Systems mit einer Diazepamkonzentration, die unterhalb der Sättigungskonzentration liegt – somit können Übersättigungsphänomene ausgeschlossen werden. Die Peaks bzw. das „Artefakt“ bei 7,5 ppm sind stark minimiert und kaum zu erkennen. Eine Vergrößerung dieses ppm-Bereichs zeigt, dass die Signale (der H-Atome des aromatischen Bereichs) mit sehr schwacher Intensität weiterhin vorhanden sind. Jedoch ist auch in diesem Diazepam-haltigen MM-System kein weiteres der für Wasserstoffatome im Diazepam charakteristischen Signale (wie das der Wasserstoffatome der N-Methylgruppe) zu erkennen.

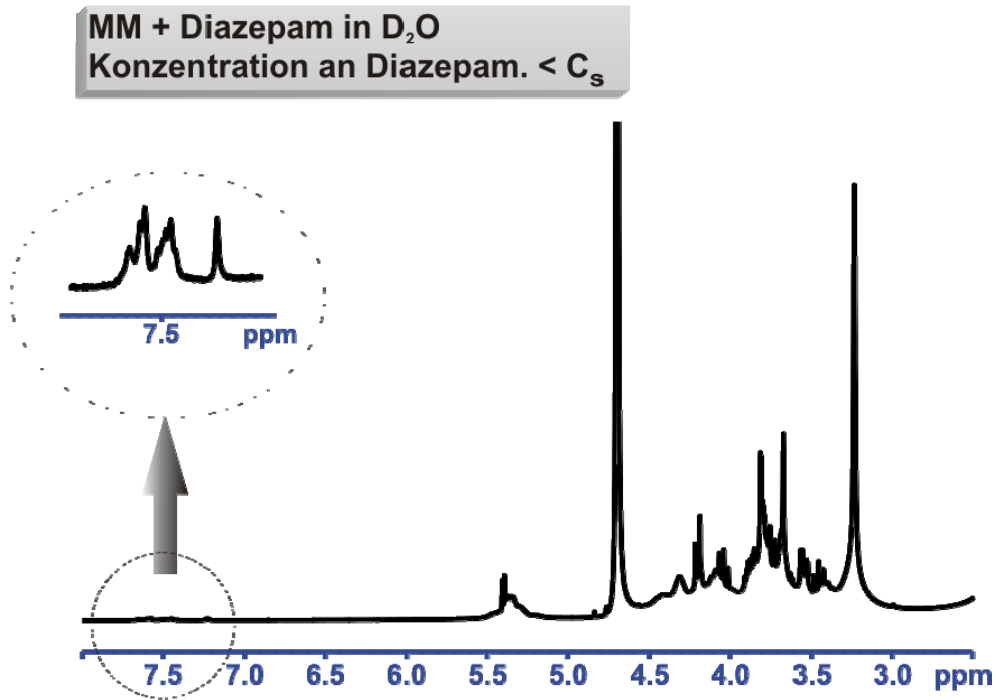


Abbildung 9.33: ¹H-NMR Spektrum von mit Diazepam-beladenen MM in D₂O wobei die Konzentration an Diazepam geringer ist als die Sättigungskonzentration des Diazepam In dem MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.5

Es lässt sich festhalten, dass keines der vier charakteristischen Signale der Wasserstoffatome im Diazepam-Molekül eindeutig wiedergefunden werden konnten, wenn mit Diazepam-beladene mischmizellare Systeme (in D₂O) untersucht worden sind. Die Kontrolle am selben MM-System, jedoch nach Auflösen in deuteriertem Chloroform, ließ jedes der Diazepam Signale im ¹H-NMR Spektrum deutlich sichtbar werden. Damit kann gefolgert werden, dass sich die Diazepam-Moleküle mit hoher Wahrscheinlichkeit im hydrophoben Inneren der MM aufhalten.

9.6 Trübungspunkt-Optimierung

9.6.1 Einleitung und Versuchsplanung

Der größte Nachteil der neu entwickelten MM-Systeme aus hPC bzw. DPPC und SL besteht in den relativ niedrigen Trübungspunkten der entsprechenden mischmizellaren Lösungen. Für MM des Typs DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ liegt der Trübungspunkt (TP) etwa bei nur 29°C und in dem System aus hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ liegt der Trübungspunkt bei etwa 38,2°C.

Interessanterweise zeigen reine SL-Lösungen einen TP > 100°C und durch die Kombination mit hPC (50:50) sinkt dieser auf Temperaturen unterhalb 40°C ab. Dies ist ein Hinweis auf die deutlich erhöhte Lipophilie in diesen Mischsystemen, die ein Indiz für das erhöhte Solubilisierungsvermögen der MM für hydrophobe AS gegenüber von SL-Lösungen ist (Goto et al., 1980). In den folgenden Untersuchungen wird gezeigt, wie sich die Zugabe unterschiedlicher Substanzen auf die Lage des Trübungspunktes in den verschiedenen neu entwickelten MM-Systemen auswirkt. Weiterhin wurde versucht die Lage des Trübungspunktes durch Verwendung ternärer MM-Systeme zu erhöhen. Hierbei sind vor allem unterschiedliche Phospholipide eingesetzt worden.

9.6.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildung 9.34 zeigt den Einfluss unterschiedlicher Additiva auf den Trübungspunkt in den MM-Systemen hPC+SL $WF_{hPC}0.4$ (a) und hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ (b). Der Trübungspunkt des 1%igen MM-Systems hPC+SL $WF_{hPC}0.4$ mit 60%-Masseanteil an SL lag bei etwa 40°C, während der des 1%igen MM-Systems hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ mit 50%-Masseanteil an SL bei etwa 38°C lag. Die in Abbildung 9.34 dargestellten Ergebnisse belegen, dass keiner der eingesetzten Strukturbrecher in Lage war, den TP der MM-Systeme in entscheidendem Ausmaß zu erhöhen. Interessanterweise ergab sich auch in hohen Konzentrationen von 10% Zusatz an Strukturbrechern keine wesentliche Erhöhung der Trübungstemperatur. Es wurde weiterhin gefunden, dass selbst der Strukturbildner Natriumchlorid in höheren Konzentrationen keine Depression des TP bedingt. In dem MM-System hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ scheint

die Zugabe von 10% NaCl sogar in einer leichten Erhöhung des Trübungspunktes zu resultieren (Abbildung 9.34). Dies ist von einem Strukturbildner eigentlich nicht zu erwarten, da die Hydratation der Na⁺- und Cl⁻-Ionen freie Valenzen der Wassermoleküle, die nicht in Cluster assoziiert vorliegen (vgl. 2.3.4), benötigen. Diese zuvor freien Wassermoleküle, mit potentiellen H-Brückenbindngstellen, stehen in der Folge nicht mehr zur Solvatisierung der hydrophilen Tensid-Moleküle der MM zur Verfügung. Strukturbildner treten danach mit den Tensid-Molekülen in Konkurrenz um freie Wasser-Moleküle, die zur Solvatisation benötigt werden. Nach dieser Theorie sollte NaCl, als effektiver Strukturbildner, in der eingesetzten hohen Konzentration von 10%, eine Desolvatation der Tensid- und PL-Moleküle der MM bewirken, was bei einer geringeren Temperatur bereits zu einem Ausfallen der MM-Bestandteile und damit zu einem niedrigeren TP führen sollte. Wider Erwarten leitet NaCl jedoch keine Erniedrigung des TP in den untersuchten MM-Systemen ein, was jedoch auch an anderen Systemen beobachtet wurde, wo es sogar zu einem Anstieg des TP durch NaCl-Zusatz kam (Lu et al., 2004). Im Gegensatz zu dem Einfluss von NaCl auf den TP in MM-Systemen, wurde in einer Studie an reinen Tensidlösungen gefunden, dass NaCl die TP verschiedener Tenside deutlich herabsetzt (vgl. Kapitel 5.3.1). Von den eingesetzten Strukturbrechern ermöglichte lediglich Harnstoff einen leichten Anstieg des Trübungspunktes. Jedoch scheint auch dieser Einfluss erst bei Konzentrationen von 10% signifikant zu sein (vgl. Abbildung 9.34). Strukturbrecher wie Harnstoff bedingen durch ihre Hydratation ein Aufbrechen der Wasser-Cluster, so dass vermehrt freie Wassermoleküle freigesetzt werden, die in der Folge die hydrophilen Bestandteile der MM zusätzlich solvatisieren können. Auf diese Weise bewirken Strukturbrecher wie Harnstoff eine Stabilisierung der Hydrathülle um die Kopfgruppen der SL- und hPC-Moleküle, die während der Dehydratisierung infolge Temperaturerhöhung verstärkt abgebaut wird, was schließlich zur Trübung der Lösung führt. Insgesamt lässt sich festhalten, dass keines der untersuchten Additiva geeignet ist, den Trübungspunkt der MM in adäquater Art und Weise zu erhöhen (vgl. Abbildung 9.34).

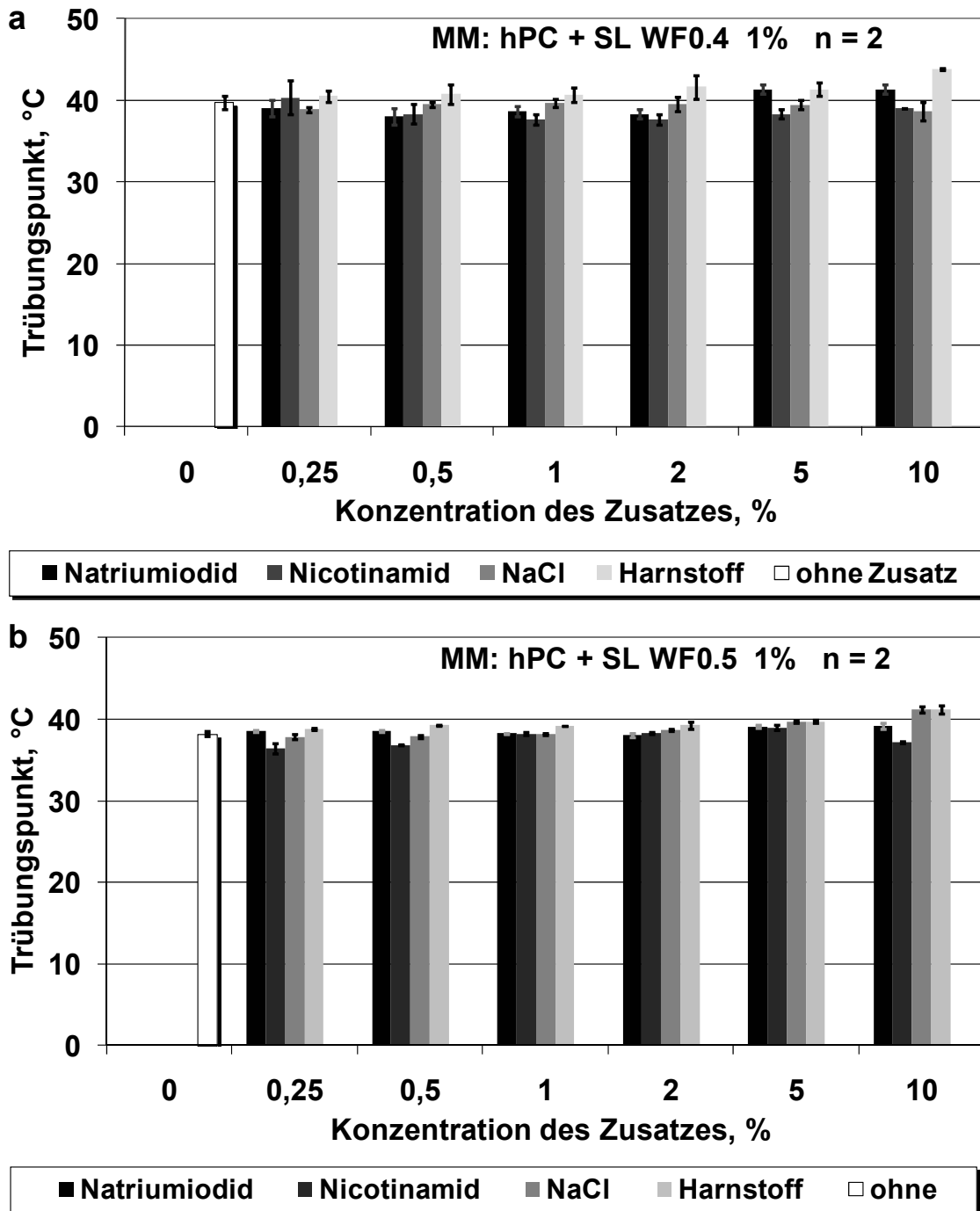


Abbildung 9.34: Trübungspunkte im 1%igen MM-System hPC+SL WF_{hPC}0.4 (a) bzw. hPC+SL WF_{hPC}0.5 (b) vor und nach Zugabe unterschiedlicher Strukturbrecher und NaCl; n = 2

Durch Verwendung von relativ geringem Masseanteil an DSPE-PEG (PEG-PE) konnte erreicht werden, dass der Trübungspunkt in dem System aus hPC und SL bei WF_{SL}0.5 deutlich ansteigt (Abbildung 9.35). Bei einem

Masseanteil von 0.05 bzw. 0.1 steigt der TP auf Werte oberhalb von 40°C, wobei die hierbei auftretende Trübung eher als ein bläulicher Schimmer anstelle einer Phasenseparation bzw. einer Ausflockung zu bewerten ist. Bei einem Masseanteil an DSPE-PEG von 0.15 steigt der TP bereits auf Werte oberhalb von 100°C (vgl. Abbildung 9.35).

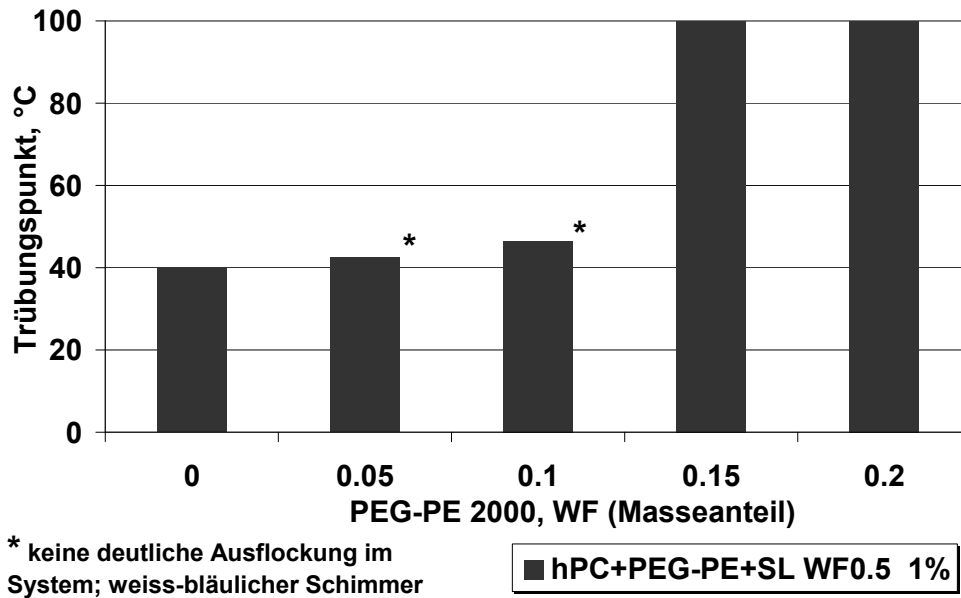


Abbildung 9.35: Trübungspunkte in 1%igen MM-Systemen aus hPC, PEG-PE sowie mit konstantem Masseanteil an SL (WF0.5); $n = 2$

Durch den Einsatz gut verträglicher (Zalipsky et al., 1994; Torchilin et al., 2003; Sawant et al., 2008), aber recht teurer, PEGylierter PL kann der TP im System aus hPC und SL $WF_{SL}0.5$ also deutlich erhöht werden. In dem System aus DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ lag der TP bei etwa 29°C (Abbildung 9.36 Balken ganz links). In einer weiteren Studie wurde untersucht, wie sich die Kombination von hPC und DPPC zu 0.5 Masseanteilen neben SL bei einem $WF_{SL}0.5$ auf die Lage des Trübungspunktes auswirkt. Die Abbildung 9.36 zeigt die Ergebnisse der Trübungspunkt-Bestimmungen in den ternären MM-Systemen. Die hellgrauen Balken der Abbildung 9.36 stellen ternäre MM-Systeme aus hPC+DPPC+SL $WF_{SL}0.5$ dar. Mit steigendem Anteil an hPC, und damit sinkendem Anteil an DPPC, konnte der Trübungspunkt gesteigert werden. Interessanterweise bedingt das stärker

hydrophobe hPC einen TP-Anstieg, wobei dies eher für das kürzerkettige DPPC erwartet worden wäre.

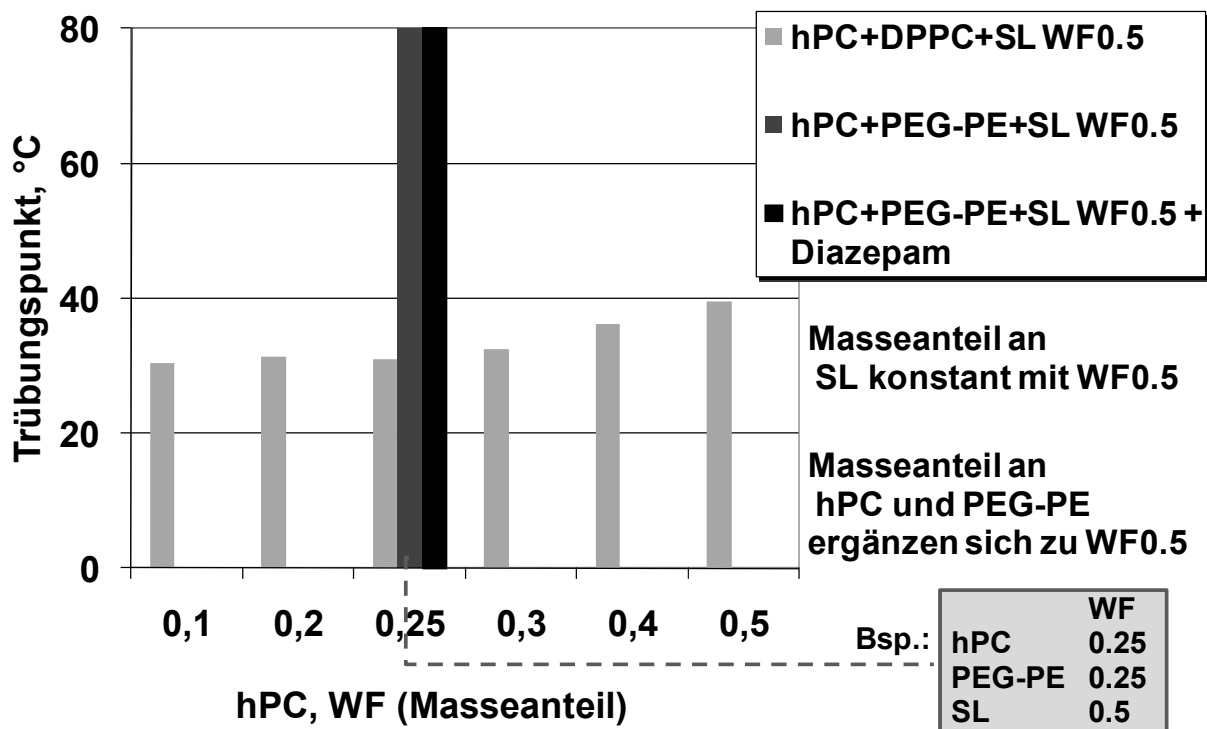


Abbildung 9.36: Trübungspunkte in 1%igen ternären MM-Systemen mit konstantem Masseanteil an SL (WF0.5) sowie hPC und DPPC bzw. 0.25 Masseanteilen an PEG-PE (hierbei sind auch beladene MM gezeigt); $n = 2$

Denn die kürzeren hydrophoben Fettsäurereste (C_{16}) des DPPC sollten theoretisch bei höheren Temperaturen in Lösung gehalten werden können als die längerkettigen (stärker hydrophoben) Reste des hPC (C_{16} und C_{18}). Jedoch scheinen sich die beiden PC-Typen in unterschiedlicher Weise in den MM mit SL zu packen, so dass die hPC-Moleküle auf Grund ihrer Einbettung in den MM einen höheren TP erzeugen als DPPC-Moleküle. Die zuvor vorgestellten DLS-Partikelgrößenanalysen bestätigen einen relativ großen Unterschied in der Größe zwischen MM des Typs hPC+SL $WF_{hPC}0.5$ und denen vom Typ DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$. Dieser Größenunterschied von etwa 4 nm ist nicht allein durch das Vorhandensein der Stearinsäure im hPC-Molekül zu erklären. Somit können die TP-Werte einen Hinweis auf ein unterschiedliches Packungsverhalten der MM-Typen geben. Der Einfluss einer Zugabe PEGylierter PL wird im Folgenden

detailliert beschrieben. Die Abbildung 9.36 verdeutlicht jedoch bereits an dieser Stelle, dass die Zugabe von 0.25 Masseanteilen an PEG-PE sowohl in unbeladenen als auch in mit Diazepam-beladenen MM-Systemen eine drastische Erhöhung des TP bewirkte.

Tabelle 9.3: Zusammensetzung der untersuchten MM-Systeme aus DPPC, PEG-PE und SL (Masseanteile als WF) sowie die einzelnen Bezeichnungen

Kürzel	DPPC	PEG-PE	SL
TP 0	WF 0.5	WF 0.0	WF 0.5
TP 0.5	WF 0.45	WF 0.05	WF 0.5
TP 1	WF 0.4	WF 0.1	WF 0.5
TP 2	WF 0.3	WF 0.2	WF 0.5
TP 2.5	WF 0.25	WF 0.25	WF 0.5

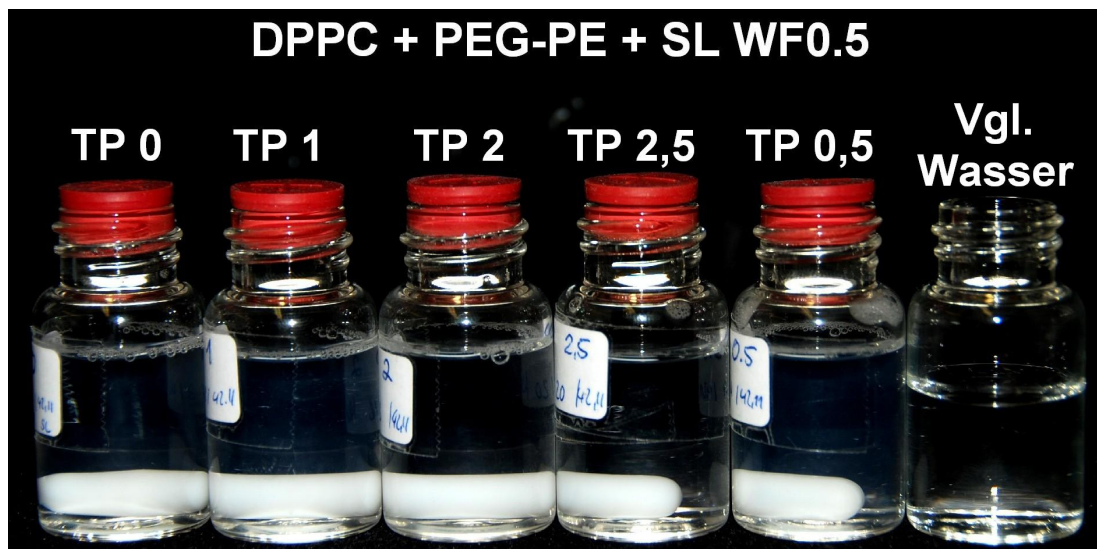


Abbildung 9.37: Visualisierung ternärer MM-Systeme aus DPPC, PEG-PE und SL bei einer Gesamttensidkonzentration von 1%; als Vergleich: Wasser

Zur Untersuchung des Einflusses von PEG-PE (DSPE-PEG 2000) auf die Lage des TP im System aus DPPC und SL wurden unterschiedliche Kombinationen zu binären (DPPC+SL $WF_{DPPC}0.5$ als „TP 0“) und ternären („TP 0.5“ bis „TP 2.5“) Systemen kombiniert, deren genaue

Zusammensetzung in Tabelle 9.3 dargestellt ist. Die Abbildung 9.43 zeigt die unterschiedlichen 1%igen klaren, isotropen Lösungen zur Visualisierung. Jede der unterschiedlichen Kombinationen resultierte in der Ausbildung einer klaren Lösung. In der Abbildung 9.38 sind die Ergebnisse der DLS-Messungen an den Systemen dargestellt. Jedes der untersuchten binären oder ternären Systeme zeigte monomodal verteilte Mischmizellen mit PDI-Werten ≤ 0.2 und einem hydrodynamischen Durchmesser ≤ 15 nm. Mit steigendem Anteil an PEG-PE ließ sich der Trend einer Verkleinerung der MM beobachten. Der Trübungspunkt konnte auch in dem System aus DPPC und SL bei einem $WF_{SL}0.5$ durch die Addition von PEG-PE erhöht werden (vgl. Abbildung 9.39). Hierbei steigt der Trübungspunkt, wie in Systemen mit hPC, mit steigendem Anteil an PEG-PE. In dem ternären System „TP 1“ (Zusammensetzung: siehe Tabelle 9.3) mit einem PEG-PE Masseanteil von 0.1 wird ein TP von etwa 37°C erreicht. Sobald der Masseanteil an PEG-PE größer 0.1 gewählt wurde, stieg der Trübungspunkt auf Temperaturen oberhalb 90°C. Eine Zugabe von PEGylierten Phospholipiden vom Typ DSPE-PEG bedingt in den MM-Systemen hPC bzw. DPPC+SL $WF_{PC}0.5$ eine Erhöhung des Trübungspunktes. Hierbei werden nur geringe Zusätze an PEG-PE benötigt. In diesen MM-Systemen führte beispielsweise eine PEG-PE-Konzentration von 1,5 mg/ml zu einer Erhöhung des Trübungspunktes auf über 100°C. Es kann festgehalten werden, dass die Anwesenheit der wasser-unlöslichen Phospholipide hPC bzw. DPPC für die relativ niedrige Lage der Trübungspunkte in entsprechenden binären Systemen verantwortlich ist. Ein Austausch der längerkettigen PC-Typen durch deutlich kürzerkettige Phospholipide führt zu einer deutlichen Erhöhung des TP (vgl. Abbildung 9.40). Das PL-Gemisch C_{12} -PL, welches nach Herstellerangaben mind. 70% Laurinsäure als (veresterte) Fettsäuren enthält, zeigte in Kombination mit SL Trübungspunkte oberhalb von 100°C.

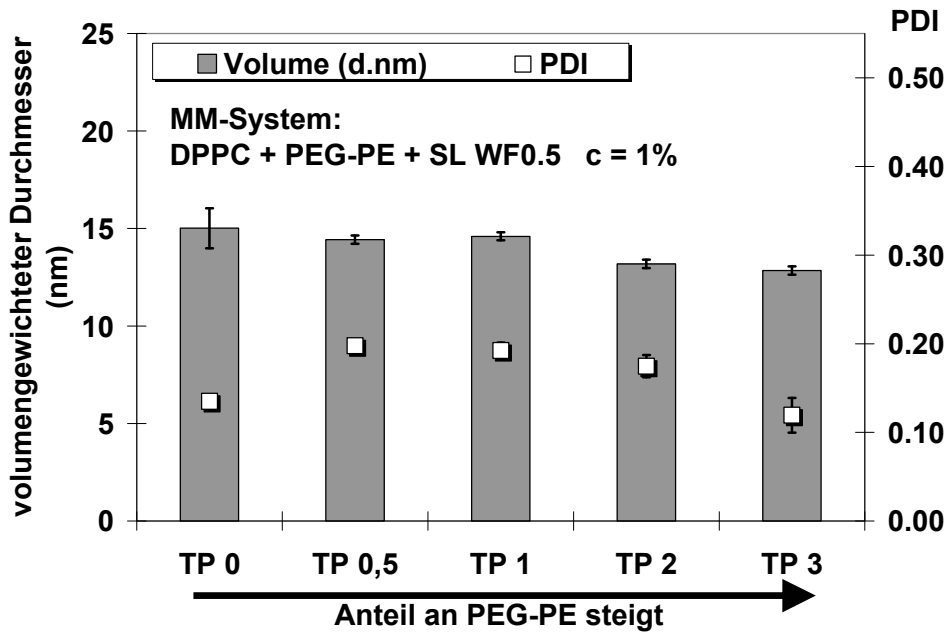


Abbildung 9.38: Hydrodynamische Durchmesser von ternären MM aus DPPC, PEG-PE und SL bei einer Gesamtlipidkonzentration von 1% und konstantem Masseanteil an SL (WF0.5); n = 3

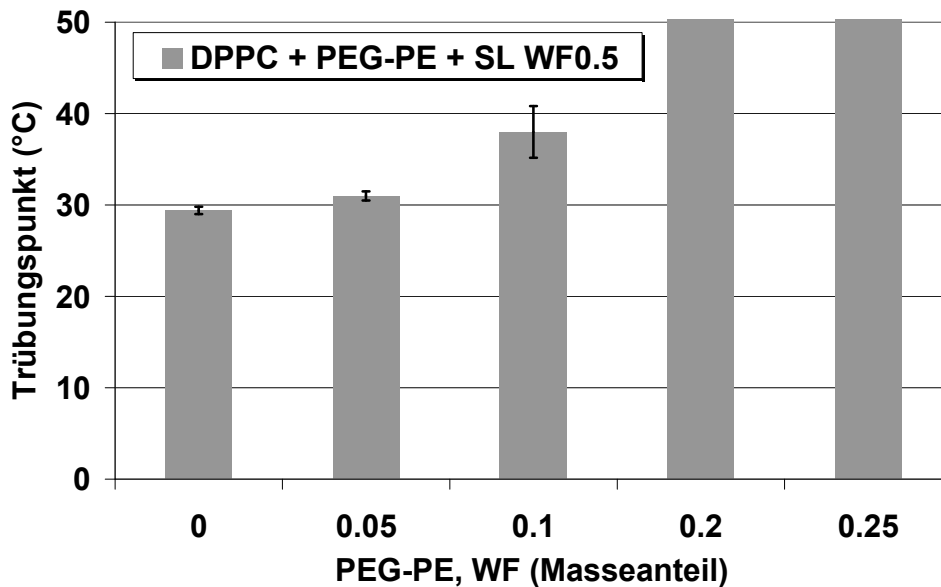


Abbildung 9.39: Trübungspunkte in 1%igen MM-Systemen aus DPPC und PEG-PE sowie mit konstantem Masseanteil an SL (WF0.5); n = 3

Die PL-Moleküle im C₁₂-PL-Gemisch mit kürzeren Fettsäureresten sind weniger hydrophob, so dass diese Moleküle während einer

Temperaturerhöhung weniger stark dehydratisiert werden. Die weniger hydrophoben Laurinsäurereste führen dazu, dass die PL-Moleküle länger „in-Lösung“ bleiben, da die Polaritätsdifferenz zwischen hydrophiler, hydratisierter polarer Kopfgruppe und nicht hydratisierten hydrophoben Fettsäurerest geringer ist als in hPC- oder DPPC-Molekülen.

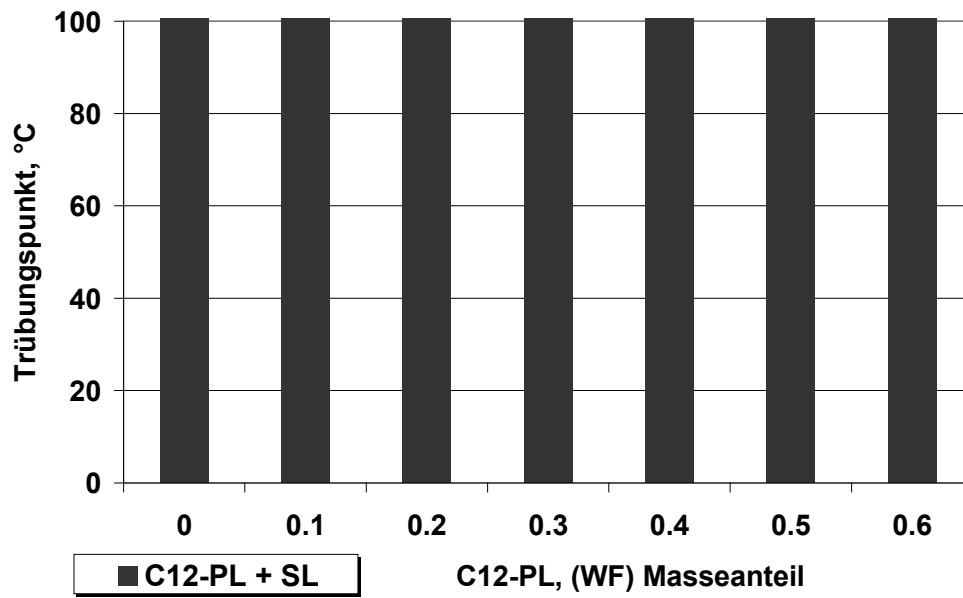


Abbildung 9.40: Trübungspunkte in 1%igen MM-Systemen aus SL und steigenden Masseanteilen an C_{12} -PL; $n = 3$

10 Diskussion: Mischmizellen oder Vesikel?

Eine Kombination von amphiphilen Substanzen in einem wässrigen Milieu muss nicht in einer Assoziation zu Mischmizellen resultieren, sondern kann auch eine Formierung von vesikulären Strukturen zur Folge haben (siehe Kapitel 2.1). Hierbei sind vor allem natürliche Phospholipide aufgrund ihrer zylindrischen Molekülgeometrie zur Vesikelbildung befähigt (vgl. Kapitel 2.1). Jedoch können auch bestimmte mizellbildende Tenside vesikuläre Strukturen ausbilden (Manosroi et al., 2003; Liu und Guo, 2007; Di Marzio et al., 2008).

Die neuentwickelten Mischmizellen des Systems hPC+SL WF_{hPC}0.5 weisen einen hydrodynamischen Durchmesser von 19-25 nm auf. In der Literatur wird an vielen Stellen diskutiert, ob solche gefundenen Partikelgrößen in Systemen mit hohen Anteilen an vesikelbildenden Substanzen (wie PL) aufgrund der für mizellare Assoziate recht großen Dimensionen nicht eher auf Vesikel als auf Mischmizellen schließen lassen. Auch das beschriebene MM-System trägt einen recht hohen Anteil an Phospholipiden. Es ist bekannt, dass die theoretisch kleinst mögliche Größe eines Vesikels aus DPPC-Molekülen 25 nm beträgt und dass diese Vesikel nur durch einen hohen Energieeintrag gebildet werden. Sobald sich ein solches energiereiches System equilibriert, kommt es zu einer Fusion der kleinen Vesikel zu größeren Vesikeln. Die geringe Größe der kleinen Vesikel führt zu Bilayern mit einem hohen Krümmungsradius, was zu einer sehr hohen Membranspannung des Bilayers führt, die durch Fusion abgebaut werden kann (Kaye, 1981; Sharma und Sharma, 1997; Segota und Tezak, 2006). Vesikel aus Phospholipiden mit einem Durchmesser kleiner als 50 nm sind metastabil und werden nach Equilibrierung zu größeren Vesikeln fusionieren (Lerebours et al., 1993). Im Folgenden werden mehrere Gründe aufgeführt, warum es sich bei den neu entwickelten Systemen mit Partikelgrößen < 25 nm um Mischmizellen und nicht um Vesikel handelt.

1.) Die im Rahmen der Langzeitstabilitätsuntersuchungen erfolgten DLS-Untersuchungen helfen indes zur Aufklärung: Da die am MM-

System hPC+SL WF_{hPC}0.5 durchgeführten DLS-Messungen sowohl direkt nach der Herstellung als auch über eine lange Lagerzeit von 175 Tagen, bei unterschiedlichen Temperaturen nahezu dieselben hydrodynamischen Durchmesser (< 30 nm) aufwiesen, ist es sehr wahrscheinlich, dass hier thermodynamisch stabile MM vorlagen. Wie beschrieben, zeigen Vesikel mit entsprechend geringem Durchmesser (< 50 nm) bereits nach kurzer Equilibrierungszeit eine Vesikelfusion, um die hohe Membranspannung abzubauen. Insofern hätte ein deutlicher Anstieg der mittels DLS-Messungen gefundenen Partikelgrößen im Rahmen der Langzeitstabilitätstest beobachtet werden müssen.

2.) Die Generierung von Vesikeln erfordert in der Regel ein Herstellungsverfahren, welches einen hohen Energieeintrag in die Systeme einbringt, um eine Ausbildung von Bilayer-Strukturen zu erzwingen (vgl. Kapitel 2.1.3 und 3.4). Da zur Herstellung der MM-Systeme das direkte Dispergierungsverfahren angewendet worden ist, sollte eine Vesikelbildung eher unwahrscheinlich sein.

3.) Mit der vorgestellten DLS-Methode zur Bestimmung der CMC in den neu entwickelten MM-Systemen kann geklärt werden, ob es sich bei den Teilchen mit einer Größe von etwa 22 nm (hPC+SL WF_{hPC}0.5) bzw. 16 nm (DPPC+SL WF_{DPPC}0.5) tatsächlich um Mischmizellen oder aber um Vesikel handelt. Nach Unterschreiten der CMC konnten in den MM-Systemen DPPC/hPC+SL WF_{PC}0.5 keine Partikel mehr gefunden werden, die aufgrund der Größe auf MM schließen lassen. Nach Unterschreiten der CMC kam es zu einem spontanen Anstieg in der gefundenen Partikelgröße von ca. 22 nm (bzw. 16 nm) auf über 1000 nm. Da nur Mizellen oder MM, nicht aber Vesikel unterhalb ihrer CMC instabil sind und auseinander dissoziieren bzw. zerstört werden, muss es sich bei den vorliegenden Teilchen (in Systemen oberhalb der CMC) um MM und nicht um Vesikel handeln.

4.) Die Solubilisierungskapazität der MM für Diazepam und Tetrazepam ist bei gleicher Konzentration an potentiell mizellbildenden Substanzen größer als die reiner SL-Lösungen. Sollte die Kombination von hPC und SL in einer Vesikelbildung resultieren, so wäre zu erwarten, dass nur eine relativ geringe Menge an hydrophoben AS-Molekülen in ein solches

Bilayer-System mit einem hydrophilen inneren Kern eingeschlossen werden kann. Zudem erfolgte die Beladung mit dem hydrophoben AS erst, nachdem die ca. 20 nm große Teilchen (MM oder Vesikel) bereits gebildet waren.

5.) Eine Bestimmung des Trübungspunktes in den mischmizellaren Systemen ist möglich, wobei die Lösungen sich nach kurzem Abkühlen sofort wieder equilibrieren, um erneut in einer optisch klaren Lösung zu erscheinen.

11 Zusammenfassung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung neuartiger Mischmizellen (MM) beschrieben, die zu hohen Anteilen aus Phospholipiden (PL) bestehen. Seit den 1960er Jahren sind Gallensalz/Lecithin-MM als einziges mischmizellares System am Pharmamarkt bekannt. Seitdem wurde kein alternatives MM-System beschrieben, welches neben hohen Anteilen (50%) an natürlichen PL andere Tenside als die Gallensalze verwendet. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit das Organisationsverhalten der wasserunlöslichen, membranbildenden PL durch eine Kombination mit einem geeigneten Tensid dahingehend beeinflusst werden kann, dass eine MM-Bildung erzwungen wird. Durch systematische Auswahl strukturell unterschiedlicher Tensidklassen ist der Einfluss der Molekülgeometrie der Tenside auf die Fähigkeit untersucht worden, möglichst große Mengen an natürlichem PL in Form einer optisch klaren mischmizellaren Lösung zu solubilisieren. Daneben wurden strukturell unterschiedliche PL auf ihre Eignung zur Bildung von MM untersucht. Aus Literaturrecherchen und dem von Israelachvili et al. (1970) beschreibenden Packungsparameterkonzept (PPC) ist bekannt, dass bestimmte strukturelle Merkmale im Molekülbau eines amphiphilen Stoffes zu einer bevorzugten Mizellbildung führen. Es wurde ein modifiziertes PPC entwickelt, welches die Assoziation von zwei unterschiedlichen amphiphilen Substanzen (PL + Tensid) zu MM theoretisch beschreibt. Dieses transferierte PPC bildet die theoretische Grundlage für die Erklärung einer MM-Bildung und hiernach wurden die unterschiedlichen amphiphilen Moleküle miteinander kombiniert. Nachdem mit den Sucrose- und Polyglycerolestern zwei Tensidklassen gefunden wurden, die vielversprechende strukturelle Voraussetzungen für eine MM-Bildung mit PL aufweisen, wurden diese Substanzen entsprechend untersucht. Neben diesen Tensiden mit den präferierten Strukturmerkmalen sind weitere Tensidklassen mit differenten Strukturmerkmalen ebenso auf ihre Fähigkeit untersucht worden, optisch klare mischmizellare Lösungen mit unterschiedlichen PL zu bilden. Hierbei kamen u.a. Tenside wie das Blockcopolymer Poloxamer 188 zum

Einsatz, welches einen divergenten Molekülbau aufweist, so dass es z.B. nicht in einer konischen Geometrie erscheint. Die neu entwickelten MM-Systeme sollten auf gesättigten PL basieren, da die so generierten wässrigen Systeme stabiler gegenüber oxidativen Veränderungen sind. Transmissionsmessungen an den unterschiedlichen Kombinationen der Tenside und PL ermöglichten eine Trübungsbestimmung in diesen Systemen, wodurch optisch klare Systeme identifiziert werden konnten. Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) konnte die Größe der MM, Mizellen oder sonstiger vorhandener Teilchen als hydrodynamischer Durchmesser bestimmt werden. Das zu entwickelnde MM-System sollte eine streng monomodale Partikelgrößenverteilung aufweisen. Mit dem direkten Dispergierverfahren wurde ein einfaches Herstellungsverfahren etabliert und eingesetzt, das die Herstellung von MM ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel oder den Einsatz von Dispergierhilfsmitteln wie etwa einen Ultra Turrax erlaubt. Klassische Gallensalz/Lecithin-MM werden zumeist unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie Chloroform produziert. Das neue MM-System sollte eine Herstellung im Großmaßstab unter geringem Kosten- und Zeitaufwand erlauben.

Die Anwendung des transferierten PPC zur MM-Bildung aus zwei unterschiedlichen Amphiphilen ließ sich für die untersuchten Tenside und Phospholipide erfolgreich umsetzen. Mit dieser Arbeit konnten wesentliche Erkenntnisse gewonnen werden, die Hinweise über die erforderlichen Strukturmerkmale der verwendeten PL und Tenside geben, damit eine Kombination in einer MM-Bildung resultiert. Auf diese Weise wurden Systeme generiert, die eine MM-Bildung mit hohen Anteilen an gesättigten (natürlichen) PL ermöglichen, was bislang in der Literatur nicht beschrieben worden ist. So ergibt die Kombination aus Sucroselaurat (SL) und natürlichem hydriertem Phosphatidylcholin (hPC) oder Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) im Verhältnis 1:1, auch bei erhöhten Konzentrationen oberhalb 5% eine optisch klare Lösung, die eine streng monomodale Partikelgrößenverteilung aufweist, wobei der mittlere hydrodynamischer Durchmesser der MM bei etwa 20 nm liegt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird beschrieben, wie sich die neu entwickelten MM-Systeme in der Solubilisierung unterschiedlicher, schwer wasserlöslicher Arzneistoffe verhalten. Die Solubilisierungskapazitäten der neu entwickelten MM-Systeme wurden mit denen bekannter klassischer Gallensalz/Lecithin-MM sowie anderen Systemen verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die neu entwickelten MM-Systeme aus hPC bzw. DPPC und SL bei einem Masseanteil an PC von 50-60%, eine deutlich höhere Solubilisierungskapazität für Diazepam und Tetrazepam aufweisen als klassische MM oder auch gleichkonzentrierte Polysorbate 80- oder Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin-Lösungen. Durch Entwicklung ternärer MM-Systeme wurde versucht die Solubilisierungskapazität sowie bestimmte physikochemische Eigenschaften (wie z.B. Lage der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC), Transmission der Lösungen) der MM zu verbessern. Mit dem Einsatz geringer Mengen an PEGylierten Phospholipiden konnte eine deutliche Steigerung des Trübungspunktes erreicht werden. In diesen ternären MM-Systemen kam es dabei zu keiner Abnahme der Solubilisierungskapazität für Diazepam. Binäre Systeme aus SL und PEGylierten Phospholipiden (50:50) ermöglichen eine weitere Steigerung der Solubilisierungskapazität für Diazepam.

Weiterhin wurde eine neue Methode zur Bestimmung der CMC entwickelt, die eine entsprechende Untersuchung von MM-Systemen ermöglicht und hierbei mehrere Vorteile gegenüber den klassischen Methoden bietet. Bei dieser Methode werden Verdünnungen der PC-haltigen MM-Systeme mittels DLS-Technik untersucht. Die jeweils eingesetzten wasserunlöslichen PC-Moleküle werden nur oberhalb der CMC in Form von MM in Lösung gehalten. Sobald die Verdünnungen entsprechend niedrig konzentriert sind ($c < \text{CMC}$), zeigt eine Präzipitation der wasserunlöslichen PC-Moleküle die CMC an, was durch steigende PDI-Werte und steigende Partikelgrößen angezeigt wird. Diese Methode ermöglicht eine schnelle CMC-Bestimmung, die wenig störanfällig ist, eine direkte Mizellbildung nachweist und keine dritten Indikatormoleküle (wie DPH bei Fluoreszenzmessungen) benötigt.

Ferner ist die Stabilität favorisierter neuer MM-Systeme gegenüber einer Lagerungszeit von mehr als 200 Tagen, dem Zusatz unterschiedlicher Additiva sowie unterschiedlichen pH-Werten untersucht worden. Die Stabilität der neu entwickelten MM-Systeme ist im pH-Bereich von 1-11 gegeben, was eine orale Applikation der MM ermöglicht, ohne dass diese im Gastrointestinaltrakt zerstört werden. Die neu entwickelten MM-Systeme blieben unter in-vitro Bedingungen im Bereich von pH 1-11 über weit mehr als 24 Stunden stabil. Klassische Gallensalz-Lecithin-MM werden in Folge einer Präzipitation der sauren Gallensalze zerstört, sobald der pH-Wert des umgebenden Milieus den pK_s -Wert des verwendeten Gallensalzes unterschreitet.

Weiterhin zeigten sich die neu entwickelten MM-Systeme als sehr stabil gegenüber niedrig und hoch konzentrierten Zusätzen der eingesetzten Salze, Zucker, Zuckeralkohole, Glycerol, Strukturbrecher wie Harnstoff oder Nicotinamid. Dagegen reagieren die Systeme empfindlich gegenüber Alkohol-Zusatz.

Eine sehr effektive Methode zur Erhöhung der Stabilität einer wässrigen Zubereitung stellt die Gefriertrocknung dar. Die neu entwickelten MM-Systeme ließen sich sehr gut gefriertrocknen, wobei eine Rekonstitution der Lyophilisate in Wasser problemlos war, was aus entsprechenden Lichtstreuungsmessungen abgeleitet werden konnte. Ebenso konnte der Anteil an solubilisiertem Diazepam wiedergefunden werden. Der Einschluss hydrophober Arzneistoffe in mizellare oder mischmizellare Systeme kann die Stabilität des Arzneistoffes erhöhen, sofern sich die AS-Moleküle im Inneren der Mizellen, geschützt vor der wässrigen Phase, befinden und nicht an die Oberfläche der Mizellen adsorbiert vorliegen. Strukturaufklärungen wurden an unbeladenen und mit Arzneistoff-beladenen MM vorgenommen, um die Lokalisierung des hydrophoben Arzneistoffes in den neu entwickelten MM-Systemen zu bestimmen. Die mittels der eingesetzten $^1\text{H-NMR}$ -Analytik erhaltenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass der hydrophobe Modellarzneistoff Diazepam aller Wahrscheinlichkeit nach in das Innere der MM aufgenommen wurde.

12 Abstract

Nowadays almost half of newly developed active pharmaceutical ingredients are rejected in early phase development and will never find a way to a patient because of their poor water solubility leading to bioavailability problems. Considering such arising solubility problems the development of application vehicles like mixed micelles (MM) is a challenging research topic in pharmaceutical technology.

Since all known classical MM systems being introduced to the market are composed of unsaturated phosphatidylcholine and bile salts, it was the aim of this study to develop alternatively composed MM which also comprise high ratios of phosphatidylcholine (PC) but further a surfactant type that is distinct from the bile salts. A combination of a bile acid and a PC does only result in a MM-formation if the applied PC-types are of unsaturated origin - otherwise no MM but vesicles or PC-agglomerates will occur, regardless which type of bile salt is used. Further, a drawback of the classical MM is given by a micelle – vesicle transformation which also takes place by changing the ratio of bile salt/lecithin or the total concentration.

The theoretical approach behind this work is the transfer of the packing-parameter-concept, which describes the molecular association of one amphiphilic species, to the organisation behaviour of two different amphiphilic species (water-insoluble phospholipid +surfactant leading to MM). Therefore the influence of the surfactant molecular geometry on the ability to form MM with phospholipids was investigated. The successful combination of a suitable water-soluble surfactant and high ratios of a suitable, natural, water-insoluble phospholipid results in an isotropically clear aqueous solution offering a strictly unimodal particle size distribution with MM showing a hydrodynamic diameter of about < 30 nm. Transmission and dynamic light scattering (DLS) measurements revealed that specific molecular properties of both the surfactant- and the phospholipid-type determine the ability of those amphiphilic species to form MM. After testing a large number of different surfactants and

different phospholipids, a toolbox with specific molecular conditions of both tested species, the surfactant and the PL, could successfully be configured. To provide an example, the surfactant needs to geometrically appear in a conical shape and a strictly defined breakup within its molecular geometry is required. Here, the polar head should feature a high hydrophilicity which is defined as far as possible by hydroxyl-units instead of e.g. polyoxyethylenglycol (as in in the case of polysorbate). This large hydrophilic head needs to be explicitly separated from an absolutely hydrophobic ending (offering non hydrophilic element at all). Laurylic acid esters of polyglycerol or sucrose, both offering an optimal large hydrophilic head region, which forces the hydrophobic acyl chains into a v-formation, led to the most beneficial results regarding a formation with PL to a clear mixed micellar solution. It could be found that the length of the fatty acids within the applied phosphatidylcholine-type is a limiting factor for the formation of MM. It should be C₁₆ or C₁₈. Since the description of classical lecithin/phospholipids MM in the 1960s, the present work has established a way to allow an alternatively formation of MM with the benefit of using more stable hydrogenated PC-types and by using a class of aliphatic surfactants that do not belong to the bile acids. With Sucrose laurate (SL) for the first time a surfactant was found that solubilizes up to 60% of natural PC into an optically clear solution. SL forms isotropically clear solutions with hydrogenated phosphatidylcholine (hPC) or dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) exhibiting a unimodal particle distribution with particle sizes of approximately 20 nm, indicating mixed micelles, and an excellent PDI-value of 0.1, even at higher ratios of hPC (60% DPPC) and over a broad range of total surfactant concentrations. In comparison to the commonly used lecithin/bile salt MM where unsaturated PC (lecithin) is required for a MM formation, the introduced novel MM are formed with saturated PC-types which are more stable against oxidative degradation. Contrary to the classical MM, no micelle-to-vesicle-transformation occurred by changing the concentration or the ratio in the favourite developed MM system. The applied direct dispersion method is a simple production method for the introduced MM-systems owing the benefit of avoiding organic solvents.

The present work compares the solubilization capacities of newly developed MM to those of classical lecithin/bile salt MM and different other solubilizing systems. The MM system with SL and hPC (50:50) was found to be superior in drug solubilization of all investigated drugs compared to the classical lecithin/bile salt MM. Further, a polysorbate 80 solution, also at 5%, was inferior with regard to solubilizing the hydrophobic drugs diazepam and tetrazepam. The MM sizes of the favorite developed MM, before and after drug incorporation, were analysed by DLS to evaluate the influence of the drug incorporation. Here, the particle sizes remained constant, indicating a stable formation of the solubilizate.

Further the critical micelle concentration (CMC) of MM before and after drug incorporation was analysed by three different determination techniques. In this work a new robust method is introduced that enables the CMC Determination - unlike the classical surface tension measurement technique - by the direct detection of MM with hPC. Constant CMC-values could be obtained regardless if diazepam was encapsulated within the MM or unloaded MM were analysed. Long-term stability tests considered the novel MM system to be stable at least over the investigated storage period of 200 days at cool storage conditions.

A lyophilization of the empty and diazepam loaded MM could successfully be carried out leading again to stable MM with constant sizes and constant encapsulated drug amounts after reconstitution in double distilled water.

MM systems are described to enhance the bioavailability after oral administration. Accordingly, the stability of the MM system against pH-shifts has been evaluated and compared to that of classical bile salt/lecithin MM. Unlike the classical MM which disintegrate at pH-values underneath the pK_a of the applied bile acid by precipitation, the introduced novel MM remain stable from pH 1-11 without any fluctuation in hydrodynamic diameter. A $^1\text{H-NMR}$ study suggests the solubilized hydrophobic drug molecules (diazepam) to be incorporated into the inner mixed micellar core and not being adsorbed on the outer shell.

The new developed MM system with 50 or 60% of well tolerated natural hydrogenated PC and SL seems to be a promising drug delivery system to enhance the bioavailability of orally or parenterally administrated hydrophobic drugs – not at least since it is known that PL in classical MM and SL alone in micellar solutions increase the bioavailability of different hydrophobic drugs.

13 Anhang

13.1 Abkürzungsverzeichnis und Begriffsklärung

AS	Arzneistoff
°C	Grad Celsius
BDZ	Benzodiazepine
bidest.	zweifach destilliert
c	Konzentration (%)
C ₁₂ -PL	Phospholipide mit vorwiegend Laurinsäure als Fettsäurerest (ca. 70%)
CS	Cholsäure-Natrium
dD	direkte Dispergierung
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLPC	Dilaurylphosphatidylcholin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPH	Diphenylhaxatrien
DSPE-PEG	siehe PEG-PE
DSC	differential scanning calorimetry
PEG-PE	PEG 2000-Phosphatidylethanolamin
EQZ	Equilibrierungszeit
GCS	Glycocholsäure-Natrium
GIT	Gastrointestinaltrakt
HP-β-CD	β-Cyclodextrin
hPC	hydriertes Phosphatidylcholin
HPLC	high performance liquid chromatography
L-7D	Decaglycerollaurat
LM	Lösungsmittel
m/m	Masse pro Masse

m/V	Masse pro Volumen
M-10D	Decaglycerolmyristat
MF	Mol Anteil (molare Fraktion)
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mPa·s	Millipascal · Sekunde
MPL	Milch-Phospholipide
n	Anzahl der Versuche
n.a.	nicht anwendbar
n.u.	nicht untersucht
nm	nanometer (10^{-9} Meter)
P20	Polysorbat 20
P80	Polysorbat 80
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	potentia hydrogenii
PL	Phospholipid
PP	Packungsparameter
PPC	Packungsparameterkonzept
SL	Sucroselaurat
SM	Sucrosemyristat
SP	Sucrosepalmitat
SWA-10D	Decaglycerolstearat
TP	Trübungspunkt
uPC	ungesättigtes Phosphatidylcholin
WF	Masseanteil (engl. weight fraction)
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer (10^{-6} Meter)

Begriffsklärung:

Der verwendete Begriff „klare Lösung“ steht für eine optisch isotrope, kolloidale Lösung und meint damit keine, im eigentlichen pharmazeutisch-technologischen Sinne, echte (molekulardisperse) Lösung.

Als Verhältnis von Phospholipid zu Tensid in einem System wird der Masseanteil des Phospholipids mit der Abkürzung WF_{PC} aus dem Englischen (WF = weight fraction) verwendet.

13.2 Weitere verwendete Substanzen

Aqua bidest.	Hauseigene Anlage	Finn-Aqua	75-E-4,
	FinnAqua, Finnland		
Methanol (HPLC grade)	Mallinckrodt Baker B.V.,	Niederlande	
Acetonitril	Mallinckrodt Baker B.V.,	Niederlande	
Natriummonohydrogenphosphat	Merck KGaA,	Darmstadt	
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA,	Darmstadt	

13.3 HPLC-Methoden

Zur Quantifizierung des solubilisierten Arzneistoffgehalts (Solubilisierungskapazität) in den Tensid-haltigen Systemen wurde eine Waters-HPLC-Anlage (Waters Corp. Milford, MA, USA) eingesetzt. Die Anlage besteht aus einer Hochpräzisionspumpe (Waters 600E Multisolvent Delivery System), einen Autosampler (Waters Inline Degasser AF und eine Waters 717 plus Autosampler) und einem Waters UV detector (Waters 996 Photodioden Array Detektor). Zur Analyse der erhaltenen Chromatogramme wurde die Software Waters Empower 1154 verwendet. Die Konzentrationen der Proben wurde über Kalibriergeraden mit externen Standarts bestimmt. Die eingesetzten Fließmittel waren aus Lösungsmitteln in HPLC-Qualität und doppelt destilliertem Wasser zusammengesetzt. Bevor eine HPLC-Analytik durchgeführt wurde, sind die Fließmittel in einem Ultraschallbad entgast worden.

13.3.1 Diazepam

Die verwendete HPLC-Analytik entspricht der bereits beschriebenen Methode (Hammad, 1998; Hammad und Müller 1998). Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde ein weiterer externer Standard mit bekannten Gehalt an Diazepam (Diazepam in Diazepam-ratiopharm[®] 10mg/2ml Injektionslösung) mit untersucht.

Stationäre Phase	Merck Kartuschensystem
Säule	RP-18 NovaPak (3,9 x 150) 4 µm
Vorsäule	Phenomenex Security Guard
Mobile Phase	70% Methanol (HPLC-grade) 30% Aqua bidest.
Flussrate:	1,0 ml/min
Retentionszeit:	3,5 min
Wellenlänge:	254 nm
Kalibrierbereich:	1-10 mg/ml

13.3.2 Tetrazepam

Die verwendete HPLC-Analytik entspricht der bereits beschriebenen Methode (Hammad, 1998; Hammad und Müller 1998).

Stationäre Phase	Merck Kartuschensystem
Säule	RP-18 NovaPak (3,9 x 150) 4 µm
Vorsäule	Phenomenex Security Guard
Mobile Phase	60% Acetonitril (HPLC-Grade) 40% 0,01 M KH ₃ PO ₄ -Lsg. pH 4,2 (pH-Einstellung mit H ₃ PO ₄)
Flussrate:	1,4 ml/min
Retentionszeit:	3,5 min
Wellenlänge:	254 nm
Kalibrierbereich:	1-10 mg/ml

13.3.3 Estradiol

Die verwendete HPLC-Analytik entspricht der bereits beschriebenen Methode (Hammad, 1998).

Stationäre Phase	Merck Kartuschensystem
Säule	RP-18 NovaPak (3,9 x 150) 4 µm
Vorsäule	Phenomenex Security Guard
Mobile Phase	70% Methanol (HPLC-Grade) 30% Aqua bidest.
Flussrate:	1,4 ml/min
Retentionszeit:	4 min
Wellenlänge:	280 nm
Kalibrierbereich:	1-10 mg/ml

13.4 Colorimetrische Bestimmung von Erythromycin

Innerhalb einer Versuchsreihe wurde die Solubilisierungskapazität ausgewählter MM-Systeme für Erythromycin bestimmt. Zur Quantifizierung der solubilisierten Menge an Erythromycin diene hierbei keine HPLC-Methode, wie bei allen anderen untersuchten Arzneistoffen, sondern eine colorimetrische Methode. Die angewandte Methode entspricht einer abgewandelten Methode von Ford et al. (1953) bzw. Petersen (Petersen, 2009).

Die untersuchten MM-Systeme wurden in einem Phosphatpuffer pH 8,5 (3,5 g Kaliummonohydrogenphosphat und 4,5 g Natriumchlorid in 500 ml Aqua bidest.; Einstellung des pH-Wertes mit konzentrierter Phosphorsäure) hergestellt. Ein Überschuss an Erythromycin wurde zu 5 ml des jeweiligen MM-Systems gegeben und die so beladenen Proben wurden bei 25°C im temperierten Schüttelbad (Wasserbad) für 48 Stunden bewegt. Daraufhin wurden 1,5 ml der Proben entnommen und nach Abzentrifugieren des Überschusses an Erythromycin bei 12000 U/min für 15 min wurde aus dem Überstand eine Probe entnommen und zur Quantifizierung aufbereitet. Zur Quantifizierung wurden gleiche

Volumina verdünnter Schwefelsäure und Probelösung (verdünnt mit Phosphatpuffer) in einer Polystyrol-Küvette zusammengegeben und homogenisiert. Anschließend erfolgte die Vermessung photometrisch an einem UV/VIS-Spektrometer (Uvikon 930, Kontron Instruments, München, Deutschland) nach etwa einer Stunde bei 485 nm. Um die zeitliche Veränderung der Farbintensität zu kompensieren, wurde jeweils eine Kalibrierung im Bereich von 25 bis 85 µg/ml zeitgleich angesetzt und vermessen.

14 Literaturverzeichnis

- Abezgauz, L., Kuperkar, K., Hassan, P.A., Ramon, O., Bahadur, P., und Danino, D., 2010. Effect of Hofmeister anions on micellization and micellar growth of the surfactant cetylpyridinium chloride. *Journal of Colloid and Interface Science*. 342, 83-92.
- Acharya, D.P. und Kunieda, H., 2006. Wormlike micelles in mixed surfactant solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 123, 401-413.
- Agharkar, S., Lindenbaum, S. und Higuchi, T., 1976. Enhancement of solubility of drug salts by hydrophilic counterions: Properties of organic salts of an antimalarial drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 65, 747-749.
- Ahyayauch, H., Larijani, B., Alonso, A., und Goñi, F.M., 2006. Detergent solubilization of phosphatidylcholine bilayers in the fluid state: Influence of the acyl chain structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1758, 190-196.
- Akers, M.J., 2002. Excipient-drug interactions in parenteral formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 91, 2283-2300.
- Alani, A.W.G., Bae, Y., Rao, D.A., und Kwon, G.S., 2010. Polymeric micelles for the pH-dependent controlled, continuous low dose release of paclitaxel. *Biomaterials*. 31, 1765-1772.
- Alargova, R.G., Petkov, J.T. und Petsev, D.N., 2003. Micellization and interfacial properties of alkyloxyethylene sulfate surfactants in the presence of multivalent counterions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 261, 1-11.
- Albers, E. und Müller, B.W., 1995. Cyclodextrin derivatives in pharmaceuticals. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 12, 311-337.
- Alkan-Onyuksel, H., Ramakrishnan, S., Chai, H.-B., und Pezzuto, J.M., 1994. A Mixed Micellar Formulation Suitable for the Parenteral Administration of Taxol. *Pharmaceutical Research*. 11, 206-212.
- Amedee-Manesme, O., Grüter, J. und Hanck, A., 1991. Verwendung von Mischmicellen (zur Herstellung peroraler Applikationsformen von Vitamin K1). . Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0471309. .
- Amidon, G.L., H., L., P., S.V., und R., C.J., 1995. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 12, 413-420.

- Andelman, D., Kozlov, M.M. und Helfrich, W., 1994. Phase transitions between vesicles and micelles driven by competing curvatures. *Europhysics Letters*. 25 231-236.
- Andrieux, K., Forte, L., Lesieur, S., Paternostre, M., Ollivon, M., und Grabielle-Madelmont, C., 2009. Solubilisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by sodium taurocholate: A model to study the stability of liposomes in the gastrointestinal tract and their mechanism of interaction with a model bile salt. *European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 71, 346-355.
- Ashok, B., Arleth, L., Hjelm, R.P., Rubinstein, I., und Önyüksel, H., 2004. In vitro characterization of PEGylated phospholipid micelles for improved drug solubilization: Effects of PEG chain length and PC incorporation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 93, 2476-2487
- Bangham, A.D., 1968. Membrane models with phospholipids. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 18, 29-36, IN23-IN24, 37-42, IN25-IN26, 43-70, IN27-IN28, 71-95.
- Bansal, T., Akhtar, N., Jaggi, M., Khar, R.K., und Talegaonkar, S., 2009. Novel formulation approaches for optimising delivery of anticancer drugs based on P-glycoprotein modulation. *Drug Discovery Today*. 14, 1067-1074.
- Bauer, K.H., Frömming, K.H. und Führer, C., 2002. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. 7. Auflage.
- Becerra, N., Toro, C., Zanocco, A.L., Lemp, E., und Günther, G., 2008. Characterization of micelles formed by sucrose 6-O-monoesters. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 327, 134-139.
- Belsito, S., Bartucci, R. und Sportelli, L., 2001. Lipid chain length effect on the phase behaviour of PCs/PEG:2000-PEs mixtures. A spin label electron spin resonance and spectrophotometric study. *Biophysical Chemistry*. 93, 11-22.
- Bisrat, M., Anderberg, E.K., Barnett, M.I., und Nyström, C., 1992. Physicochemical aspects of drug release. XV. Investigation of diffusional transport in dissolution of suspended, sparingly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 80, 191-201.
- Bisrat, M. und Nyström, C., 1988. Physicochemical aspects of drug release. VIII. The relation between particle size and surface specific dissolution rate in agitated suspensions. *International Journal of Pharmaceutics*. 47, 223-231.
- Blume, G. und Cevc, G., 1990. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 1029, 91-97.

- Böhm, B., 1999. Herstellung und Charakterisierung von Nanosuspensionen als neue Arzneiform für Arzneistoffe mit geringer Bioverfügbarkeit. PhD thesis. Freie Universität Berlin.
- Booker, L.B., LaMorte, W.W., Ahrendt, S.A., Lillemoe, K.D., und Pitt, H.A., 1992. Distribution of phosphatidylcholine molecular species between mixed micelles and phospholipid-cholesterol vesicles in human gallbladder bile: dependence on acyl chain length and unsaturation. *Journal of Lipid Research* 1485 - 1492.
- Brauns, U. und Müller, B.W., 1984. Pharmaceutical Composition of Water Insoluble or Instable Compounds and Process for Preparing Thereof. EP Application No. 84115965.0.
- Brewster, M.E., Kerry, S.E., Thorsteinn, L., Robert, P., Hartmut, D., Gotelind, M., und Nicholas, B. Improved delivery through biological membranes XXXI: Solubilization and stabilization of an estradiol chemical delivery system by modified beta-cyclodextrins, Vol. 77, 1988, pp. 981-985.
- Brewster, M.E. und Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59, 645-666.
- Bromberg, L., 2008. Polymeric micelles in oral chemotherapy. *Journal of Controlled Release*. 128, 99-112.
- Buck, J.S., Walker, C.E. und Pierce, M.M., 1986. Evaluation of Sucrose Esters in Ice Cream. *Journal of Food Science*. 51, 489-493.
- Buszello, K. und Mueller, B.W., 1996. The influence of alkali fatty acids on the properties and the stability of parenteral O/W emulsions modified with solutol HS15. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4, S140-S140.
- Byrne, P. und Chapman, D., 1964. Liquid Crystalline Nature of Phospholipids. *Nature*. 202, 987-988.
- Carey, M.C. und Small, D.M., 1970. The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *The American Journal of Medicine*. 49, 590-608.
- Carstens, M.G., de Jong, P.H.J.L.F., van Nostrum, C.F., Kemmink, J., Verrijck, R., de Leede, L.G.J., Crommelin, D.J.A., und Hennink, W.E., 2008. The effect of core composition in biodegradable oligomeric micelles as taxane formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 68, 596-606.
- Cesur, H., Rubinstein, I., Pai, A., und Önyüksel, H., 2009. Self-associated indisulam in phospholipid-based nanomicelles: a potential nanomedicine for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 5, 178-183.

- Chandler, D., 2005. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*. 437, 640-647.
- Chattopadhyay, A. und London, E., 1984. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Analytical Biochemistry*. 139, 408-412.
- Chiappetta, D.A. und Sosnik, A., 2007. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 66, 303-317.
- Chu, K.A. und Yalkowsky, S.H., 2009. An interesting relationship between drug absorption and melting point. *International Journal of Pharmaceutics*. 373, 24-40.
- Cohen, D.E. und Carey, M.C., 1991. Acyl chain unsaturation modulates distribution of lecithin molecular species between mixed micelles and vesicles in model bile. Implications for particle structure and metastable cholesterol solubilities. *Journal of Lipid Research*. 32, 1291 - 1302.
- Collins, K.D., 1997. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysical Journal*. 72, 65-76.
- Corkery, R.W., 2002. The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 26, 3-20.
- Craig, D.Q.M., Royall, P.G., Kett, V.L., und Hopton, M.L., 1999. The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 179, 179-207.
- Crosasso, P., Ceruti, M., Brusa, P., Arpicco, S., Dosio, F., und Cattel, L., 2000. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *Journal of Controlled Release*. 63, 19-30.
- Crothers, M., Zhou, Z., Ricardo, N.M.P.S., Yang, Z., Taboada, P., Chaibundit, C., Attwood, D., und Booth, C., 2005. Solubilisation in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. *International Journal of Pharmaceutics*. 293, 91-100.
- Cunha-Filho, M.S.S., Martínez-Pacheco, R. und Landín, M., 2008. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral [beta]-lapachone by solvent change precipitation of microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 69, 871-877.

- Dabholkar, R.D., Sawant, R.M., Mongayt, D.A., Devarajan, P.V., und Torchilin, V.P., 2006. Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine conjugate (PEG-PE)-based mixed micelles: Some properties, loading with paclitaxel, and modulation of P-glycoprotein-mediated efflux. *International Journal of Pharmaceutics*. 315, 148-157.
- Danhier, F., Magotteaux, N., Ucakar, B., Lecouturier, N., Brewster, M., und Pr at, V., 2009. Novel self-assembling PEG-p-(CL-co-TMC) polymeric micelles as safe and effective delivery system for Paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 73, 230-238.
- Date, A.A. und Nagarsenker, M.S., 2008. Parenteral microemulsions: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*. 355, 19-30.
- Davis, S.S., 2002. Parenteral Polymers. *DDT*. 7, 1159-1161.
- del Burgo, P., Aicart, E. und Junquera, E., 2007. Mixed vesicles and mixed micelles of the cationic-cationic surfactant system: Didecyldimethylammonium bromide/dodecylethyldimethylammonium bromide/water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 292, 165-172.
- Di Marzio, L., Marianecchi, C., Cinque, B., Nazzarri, M., Cimini, A.M., Cristiano, L., Cifone, M.G., Alhaique, F., und Carafa, M., 2008. pH-sensitive non-phospholipid vesicle and macrophage-like cells: Binding, uptake and endocytotic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1778, 2749-2756.
- Dintaman, J.M. und Silverman, J., 1999. Inhibition of P-glycoprotein by D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). *Pharmaceutical Research*. 16, 1550-1556.
- Dongowski, G., Fritsch, B., Giessler, J., H rtl, A., Kuhlmann, O., und Neubert, R.H.H., 2005. The influence of bile salts and mixed micelles on the pharmacokinetics of quinine in rabbits. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 60, 147-151.
- Eckert, T., 1983. Solubilisierung von in Wasser schwerl slichen Wirkstoffen. Patent - Offenlegungsschrift DE 3221579.
- Edwards, K., Gustafsson, J., Almgren, M., und Karlsson, G., 1993. Solubilization of Lecithin Vesicles by a Cationic Surfactant: Intermediate Structures in the Vesicle-Micelle Transition Observed by Cryo-Transmission Electron Microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*. 161, 299-309.
- Engelmann, B. und Wiedmann, M.K.H., 2010. Cellular phospholipid uptake: Flexible paths to coregulate the functions of intracellular

- lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1801, 609-616.
- Fachinformation. 1998. Konakion® MM 2 mg - Fachinformation. Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen.
- Fachinformation. 1999. Valium® MM - Fachinformation. Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen.
- Feng, Y., Yu, Z.-W. und Quinn, P.J., 2002. Effect of urea, dimethylurea, and tetramethylurea on the phase behavior of dioleoylphosphatidylethanolamine. *Chemistry and Physics of Lipids*. 114, 149-157.
- Ferro, A. und Steffen, H., 1985. Mischmicell-Lösungen mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern. . Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0280887.
- Ferro, A. und Steffen, H., 1988. Mischmicell-Lösungen mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern. . Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0280887. .
- Fillafer, C., Wirth, M. und Gabor, F., 2007. Stabilizer-induced viscosity alteration biases nanoparticle sizing via dynamic light scattering. *Langmuir*. 23, 8699-8702.
- Floyd, A.G., 1999. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 2, 134-143.
- Ford, J.H., Prescott, G.C., Hinman, J.W., und Caron, E.L., 1953. Colorimetric Determination of Erythromycin. *Analytical Chemistry*. 25, 1195-1197.
- Francis, M.F., Piredda, M. und Winnik, F.M., 2003. Solubilization of poorly water soluble drugs in micelles of hydrophobically modified hydroxypropylcellulose copolymers. *Journal of Controlled Release*. 93, 59-68.
- Funari, S.S., Nuscher, B., Rapp, G., und Beyer, K., 2001. Detergent-phospholipid mixed micelles with a crystalline phospholipid core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 8938-8943.
- Gabizon, A.A., 1995. Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 16, 285-294.
- Gale, M.M. und Saunders, L., 1971. The solubilisation of steroids by lysophosphatidylcholine. Testosterone, estradiol and their 17[alpha]-ethinyl derivations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 248, 466-470.

- Gao, Z., Lukyanov, A.N., Singhal, A., und Torchilin, V.P., 2002. Diacyllipid-Polymer Micelles as Nanocarriers for Poorly Soluble Anticancer Drugs. *Nano Letters*. 2, 979-982.
- Gaspar, R. und Duncan, R., 2009. Polymeric carriers: Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61, 1220-1231.
- Gaudy, J., Sicard, J., Lhoste, F., und Boitier, J., 1987. The effects of cremophor EL in the anaesthetized dog. *Canadian Journal of Anesthesia / Journal canadien d'anesthésie*. 34, 122-129.
- Gebicki, J.M. und Hicks, M., 1973. Ufasomes are Stable Particles surrounded by Unsaturated Fatty Acid Membranes. *Nature*. 243, 232-234.
- Gibaldi, M. und Feldman, S., 1970. Mechanisms of surfactant effects on drug absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 59, 579-589.
- Goni, F., M. , Urbaneja, M.-A., Arrondo, J.L., R. , Alonso, A., Durrani, A., A. , und Chapman, D. The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100, Vol. 160, 1986, pp. 659-665.
- Goto, A., Nihei, M. und Endo, F., 1980. Solubilization of methylparaben in nonionic surfactant micelles in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*. 84, 2268-2272.
- Gottesman, M.M. und Ling, V., 2006. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. *FEBS Letters*. 580, 998-1009.
- Gottesman, M.M. und Pastan, I., 1993. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Annual Review of Biochemistry* 62, 385-427.
- Grindel, J.M., Jaworski, T., Piraner, O., Emanuele, R.M., und Balasubramanian, M., 2002. Distribution, metabolism, and excretion of a novel surface-active agent, purified poloxamer 188, in rats, dogs, and humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 91, 1936-1947.
- Grit, M. und Crommelin, D.J.A., 1992. The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 62, 113-122.
- Grit, M. und Crommelin, D.J.A., 1993. The effect of surface charge on the hydrolysis kinetics of partially hydrogenated egg phosphatidylcholine and egg phosphatidylglycerol in aqueous liposome dispersions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1167, 49-55.

- Grit, M., de Smidt, J.H., Struijke, A., und Crommelin, D.J.A., 1989. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 50, 1-6.
- Gupta, A.K., Madan, S., Majumdar, D.K., und Maitra, A., 2000. Ketorolac entrapped in polymeric micelles: preparation, characterisation and ocular anti-inflammatory studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 209, 1-14.
- Haag, R. und Kratz, F., 2006. Polymere Therapeutika: Konzepte und Anwendungen. *Angewandte Chemie*. 118, 1218-1237.
- Hagler, A.T., Scheraga, H.A. und Nemethy, G., 1972. Structure of liquid water. *Statistical thermodynamic theory*. *The Journal of Physical Chemistry*. 76, 3229-3243.
- Hammad, M.A., 1998. Solubility and stability of drugs in mixed micelles. Ph. D. Thesis.
- Hammad, M.A. und Muller, B.W., 1998. Solubility and stability of clonazepam in mixed micelles. *International Journal of Pharmaceutics*. 169, 55-64.
- Hammad, M.A. und Müller, B.W., 1998a. Factors affecting solubility and stability of indomethacin in mixed micelles. *Pharmazie*. 53, 790-794.
- Hammad, M.A. und Müller, B.W., 1998b. Increasing drug solubility by means of bile salt-phosphatidylcholine-based mixed micelles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 46, 361-367.
- Hammad, M.A. und Müller, B.W., 1998c. Solubility and stability of tetrazepam in mixed micelles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7, 49-55.
- Han, W.W., Yakatan, G.J. und Maness, D.D., 1977. Kinetics and mechanisms of hydrolysis of 1,4-benzodiazepines II: Oxazepam and diazepam. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 66, 573-577.
- Hauser, H., 2000. Short-chain phospholipids as detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1508, 164-181.
- Hintz, R.J. und Johnson, K.C., 1989. The effect of particle size distribution on dissolution rate and oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics*. 51, 9-17.
- Hirakura, Y., Nakamura, M., Wakasawa, T., Ban, K., Yokota, S., und Kitamura, S., 2006. Excipient hydrolysis and ester formation increase pH in a parenteral solution over aging. *International Journal of Pharmaceutics*. 325, 26-38.
- Hjelm, R.P.J., Thiyagarajan, P. und Alkan, H., 1988. A small-angle neutron scattering study of the effects of dilution on particle

- morphology in mixtures of glycocholate and lecithin. *Journal of Applied Crystallography*. 21, 858-863.
- Hodgdon, T.K. und Kaler, E.W., 2007. Hydrotropic solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 12, 121-128.
- Hoffman, N.E., 1970. The relationship between uptake in vitro of oleic acid and micellar solubilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 196, 193-203.
- Hu, Y., Meleson, K. und Israelachvili, J., 2006. Thermodynamic Equilibrium of Domains in a Two-Component Langmuir Monolayer. *Biophysical Journal*. 91, 444-453.
- Huang, C.-h. und Mason, J.T., 1986. Structure and properties of mixed-chain phospholipid assemblies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 864, 423-470.
- Huh, K.M., Lee, S.C., Cho, Y.W., Lee, J., Jeong, J.H., und Park, K., 2005. Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel. *Journal of Controlled Release*. 101, 59-68.
- Hülsmann, S., Backensfeld, T., Keitel, S., und Bodmeier, R., 2000. Melt extrusion - an alternative method for enhancing the dissolution rate of 17[β]-estradiol hemihydrate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 49, 237-242.
- Hunien, B., 2005. Solubilisierung stark lipophiler Arzneistoffe in mischmizellare Systeme und deren Einfluss auf den Resorptionsprozess. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. und Ninham, B.W., 1976. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 72, 1525 - 1568.
- Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. und Ninham, B.W., 1977. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 470, 185-201.
- Jackson, M.L., Schmidt, C.F., Lichtenberg, D., Litman, B.J., und Albert, A.D., 1982. Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside. *Biochemistry*. 21, 4576-4582.
- Jacobs, C., Kayser, O. und Müller, R.H., 2000. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. *International Journal of Pharmaceutics*. 196, 161-164.
- Jain, A.K., 2008. Solubilization of indomethacin using hydrotropes for aqueous injection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 68, 701-714.

- Jeannet, M. und Hässig, A., 1964. The Role of Lysophosphatides and Fatty Acids in Haemolysis. *Vox Sang.* 9, 113-127.
- Jones, M.-C. und Leroux, J.-C., 1999. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 48, 101-111.
- Joshi, M.D. und Müller, R.H., 2009. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 71, 161-172.
- Josip, P.K., 1984. Size of Bile Salt Micelles: Techniques, Problems and Results. *Hepatology.* 4, 85S-97S.
- Jouyban-Gharamaleki, A., Valaee, L., Barzegar-Jalali, M., Clark, B.J., und Acree Jr, W.E., 1999. Comparison of various cosolvency models for calculating solute solubility in water-cosolvent mixtures. *International Journal of Pharmaceutics.* 177, 93-101.
- Jumaa, M. und Müller, B.W., 1998. The stabilization of parenteral fat emulsion using non-ionic ABA copolymer surfactant. *International Journal of Pharmaceutics.* 174, 29-37.
- Jumaa, M. und Müller, B.W., 2002. Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 54, 207-212.
- Kabanov, A.V., Batrakova, E.V. und Alakhov, V.Y., 2002. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release.* 82, 189-212.
- Karth, M.G., Higuchi, W.I. und Fox, J.L., 1985a. Direct membrane method for the study of interface-controlled transport of cholesterol in aqueous media. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 74, 612-617.
- Karth, M.G., Ho, N.F.H. und Higuchi, W.I., 1985b. Quantitative analysis of the interfacial barrier to membrane transport of cholesterol solubilized in a charged micellar system. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 74, 618-620.
- Kato, T., Kawabata, Y., Fujii, M., Kato, T., Hato, M., und Minamikawa, H., 2007. Micelle structures in aqueous solutions of glucose-based surfactants having an isoprenoid-type hydrophobic chain. *Journal of Colloid and Interface Science.* 312, 122-129.
- Kaye, S.B., 1981. Liposomes--Problems and promise as selective drug carriers. *Cancer Treatment Reviews.* 8, 27-50.
- Keck, C.M. und Müller, R.H., 2006. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 62, 3-16.

- Khabriev, R., Popkov, V., Reshetnyak, V., Krasnyuk, I., und Lapshova, A., 2009. Solubility of erythromycin from solid dispersions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 43, 625-631.
- Kim, S., Kim, J.Y., Huh, K.M., Acharya, G., und Park, K., 2008. Hydrotropic polymer micelles containing acrylic acid moieties for oral delivery of paclitaxel. *Journal of Controlled Release*. 132, 222-229.
- Kleinebudde, P., 1987. Untersuchung an pharmazeutisch verwendbaren, flüssigen Mehrkomponentensystemen mit nicht mischbaren Komponentenpaaren. Dissertation CAU Kiel.
- Koo, O.M., Rubinstein, I. und Onyuksel, H., 2005. Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: A novel nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 1, 77-84.
- Koo, O.M.Y., Rubinstein, I. und Onyuksel, H., 2006. Camptothecin in sterically stabilized phospholipid nano-micelles: a novel solvent pH change solubilization method. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 6, 2996-3000.
- Krishnadas, A., Rubinstein, I. und Onyueksel, H., 2003. Sterically Stabilized Phospholipid Mixed Micelles: In Vitro Evaluation as a Novel Carrier for Water-Insoluble Drugs. *Pharmaceutical Research*. 20, 297-302.
- Kumar, S., Parveen, N. und Kabir ud, D., 2004. Effect of Urea Addition on Micellization and the Related Phenomena. *The Journal of Physical Chemistry B*. 108, 9588-9592.
- Kumar, V.V., 1991. Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) Biophysics*. 1, 444-448.
- Kuznesof, P.M., 2006. Guidance on the Labeling of Certain Uses of Lecithin Derived From Soy Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Kwon, G., Naito, M., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., und Kataoka, K., 1997. Block copolymer micelles for drug delivery: loading and release of doxorubicin. *Journal of Controlled Release*. 48, 195-201.
- Kwon, G.S. und Okano, T., 1996. Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 21, 107-116.
- Lappe, G. und Eikermann, H., 1965. Process for the preparation of natural choline phosphoric acid diglyceride ester compounds. Nattermann & Cie GmbH: Patent - Offenlegungsschrift US 3197368.

- Lasch, J., Hoffman, J., Omelyanenko, W.G., Klivanov, A.A., Torchilin, V.P., Binder, H., und Gawrisch, K., 1990. Interaction of Triton X-100 and octyl glucoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations. Spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1022, 171-180.
- Lasic, D.D., 1992. Mixed Micelles in drug delivery. *Nature*. 355, 279-280.
- Lawrence, M.J. und Rees, G.D., 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 45, 89-121.
- Leng, J., Egelhaaf, S.U. und Cates, M.E., 2003. Kinetics of the Micelle-to-Vesicle Transition: Aqueous Lecithin-Bile Salt Mixtures. *Biophysical Journal*. 85, 1624-1646.
- Lerebours, B., Wehrli, E. und Hauser, H., 1993. Thermodynamic stability and osmotic sensitivity of small unilamellar phosphatidylcholine vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1152, 49-60.
- Lerk, P.C. und Sucker, H., 1993. Application of sucrose laurate, a new pharmaceutical excipient, in peroral formulations of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*. 92, 197-202.
- Leuenberger, H., 2002. *Martin - Physikalische Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Stuttgart.
- Li, C.-Y., Zimmerman, C.L. und Wiedmann, T.S., 1996. Solubilization of Retinoids by Bile Salt/ Phospholipid Aggregates. *Pharmaceutical Research*. 13, 907-913.
- Li, P. und Zhao, L., 2007. Developing early formulations: Practice and perspective. *International Journal of Pharmaceutics*. 341, 1-19.
- Lichtenberg, D., 1985. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 821, 470-478.
- Lichtenberg, D., Opatowski, E. und Kozlov, M.M., 2000. Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1508, 1-19.
- Lichtenberg, D., Robson, R.J. und Dennis, E.A., 1983. Solubilization of phospholipids by detergents structural and kinetic aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 737, 285-304.
- Lichtenberg, D.Z., Y., Greenzaid, F; Zamir, S., 1979. Structural and Kinetic Studies on the Solubilization of Lecithin by Sodium Deoxycholatet. *Biochemistry*. 18, 3517-3525.

- Lim, L.-Y. und Go, M.-L., 2000. Caffeine and nicotinamide enhances the aqueous solubility of the antimalarial agent halofantrine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 10, 17-28.
- Lim, W.H. und Lawrence, M.J., 2004a. Aggregation behaviour of mixtures of phosphatidylcholine and polyoxyethylene sorbitan monoesters in aqueous solution. *Physical chemistry chemical physics*. 6, 1381-1387.
- Lim, W.H. und Lawrence, M.J., 2004b. Influence of surfactant and lipid chain length on the solubilisation of phosphatidylcholine vesicles by micelles comprised of polyoxyethylene sorbitan monoesters. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 250, 449-457.
- Lindenstruth, K., 2003. Entwicklung multipler Emulsionen als Träger von Peptidarzneistoffen. Christian-Albrechts-Universität Kiel; Dissertation.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., und Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 46, 3-26.
- List, P.H., Müller, B.W. und Nürnberg, E., 1985. *Arzneiformenlehre*. 4. Auflage.
- Liu, T. und Guo, R., 2007. Structure and transformation of the niosome prepared from PEG 6000/Tween 80/Span 80/H₂O lamellar liquid crystal. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 295, 130-134.
- Löbenberg, R. und Amidon, G.L., 2000. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 50, 3-12.
- Lorenz, W., Schmal, A., Schult, H., Lang, S., Ohmann, C., Weber, D., Kapp, B., Lüben, L., und Doenicke, A., 1982. Histamine release and hypotensive reactions in dogs by solubilizing agents and fatty acids: Analysis of various components in cremophor EI and development of a compound with reduced toxicity. *Inflammation Research*. 12, 64-80.
- Lu, J., Carpenter, K., Li, R.-J., Wang, X.-J., und Ching, C.-B., 2004. Cloud-point temperature and liquid-liquid phase separation of supersaturated lysozyme solution. *Biophysical Chemistry*. 109, 105-112.

- Lukyanov, A.N., Gao, Z. und Torchilin, V.P., 2003. Micelles from polyethylene glycol/phosphatidylethanolamine conjugates for tumor drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 91, 97-102.
- Luzzati, V., Gulik-Krzywicki, T. und Tardieu, A., 1968. Polymorphism of Lecithins. *Nature*. 218, 1031-1034.
- Maeda, H., Matsumoto, T., Konno, T., Iwai, K., und Ueda, M., 1984. Tailor-making of protein drugs by polymer conjugation for tumor targeting: A brief review on smancs. *Journal of Protein Chemistry*. 3, 181-193.
- Maiti, K., Mitra, D., Guha, S., und Moulik, S.P., 2009. Salt effect on self-aggregation of sodium dodecylsulfate (SDS) and tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB): Physicochemical correlation and assessment in the light of Hofmeister (lyotropic) effect. *Journal of Molecular Liquids*. 146, 44-51.
- Malvern-Instruments, T., *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*. DLS -Technical Note MRK656-01. Autoren: Rawle und Nitzsche.
- Malvern Instruments, L., 2008. *Vibro Viskosimeter - Zetasizer Nano Series technical note*.
- Manosroi, A., Wongtrakul, P., Manosroi, J., Sakai, H., Sugawara, F., Yuasa, M., und Abe, M., 2003. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 30, 129-138.
- Marjan, J.M.J. und Allen, T.M., 1996. Long circulating liposomes: Past, present and future. *Biotechnology Advances*. 14, 151-175.
- Marques, E.F., Regev, O., Khan, A., und Lindman, B., 2003. Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects. *Advances in Colloid and Interface Science*. 100-102, 83-104.
- Martin, G.P. und Marriott, C., 1981. Membrane damage by bile salts: the protective function of phospholipids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 33, 754-759.
- Matsuoka, K., Takeuchi, E., Takahashi, M., Kitsugi, S., Honda, C., und Endo, K., 2009. Solubilization of n-alkylbenzene and n-perfluoroalkylbenzene in hydrogenated and fluorinated surfactants micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 333, 641-645.
- Mattila, M.A.K. und Suistomaa, M., 1984. Intravenous premedication with diazepam. *Anaesthesia*. 39, 879-882.
- Mayer, L.D., Hope, M.J. und Cullis, P.R., 1986. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 858, 161-168.

- Mayer, L.D., Tai, L.C.L. und Bally, M.B., 1989. Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. *Cancer Research*. 49, 5922-5930.
- Mazer, N.A., Benedek, G.B. und Carey, M.C., 1980. Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry*. 19, 601-615.
- Menon, S.V.G., Manohar, C. und Lequeux, F., 1996. Vesicle to micelle transitions induced by Coulomb correlations in two dimensions. *Chemical Physics Letters*. 263, 727-732.
- Meyer, L., 1973. Lecithine - Eigenschaften und Anwendungen. Broschüre.
- Michel, H., Göritz, D., Rößling, G., und Tack, J.-W., 1990. Verfahren zur Herstellung wässriger Mischmizelllösungen. Offenlegungsschrift DE 3903753 A1.
- Milkereit, G., Garamus, V.M., Veermans, K., Willumeit, R., und Vill, V., 2005. Structures of micelles formed by synthetic alkyl glycosides with unsaturated alkyl chains. *Journal of Colloid and Interface Science*. 284, 704-713.
- Milkereit, G.E., 2006. Investigation of colloidal, biophysical and liquid crystalline properties of synthetic alkyl glycosides and glycolipids. Dissertation Universität Hamburg; Fachbereich: Chemie.
- Millard, J.W., Alvarez-Núñez, F.A. und Yalkowsky, S.H., 2002. Solubilization by cosolvents: Establishing useful constants for the log-linear model. *International Journal of Pharmaceutics*. 245, 153-166.
- Miyata, K., Kakizawa, Y., Nishiyama, N., Yamasaki, Y., Watanabe, T., Kohara, M., und Kataoka, K., 2005. Freeze-dried formulations for in vivo gene delivery of PEGylated polyplex micelles with disulfide crosslinked cores to the liver. *Journal of Controlled Release*. 109, 15-23.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Dadswell, C.M., Savay, S., Alving, C.R., und Szebeni, J., 2004. Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Flocor(TM))-induced complement activation in human sera: A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1689, 103-113.
- Moro, M.E., Novillo-Fertrelluncal, J., Velazquez, M.M., und Rodriguez, L.J., 1991. Kinetics of the acid hydrolysis of diazepam, bromazepam, and flunitrazepam in aqueous and micellar systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 80, 459-468.

- Mrestani, Y., Behbood, L., Härtl, A., und Neubert, R.H.H., 2010. Microemulsion and mixed micelle for oral administration as new drug formulations for highly hydrophilic drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. In Press, Uncorrected Proof.
- Mu, L., Elbayoumi, T.A. und Torchilin, V.P., 2005. Mixed micelles made of poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine conjugate and d-[alpha]-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate as pharmaceutical nanocarriers for camptothecin. *International Journal of Pharmaceutics*. 306, 142-149.
- Mueller, K., 1981. Structural dimorphism of bile salt/lecithin mixed micelles. A possible regulatory mechanism for cholesterol solubility in bile? X-ray structural analysis. *Biochemistry*. 20, 404-414.
- Müller, A. und Moser, U., 2005. *Arzneibuch-Kommentar. Wissenschaftliche Erläuterungen zum Europäischen Arzneibuch und zum Deutschen Arzneibuch, einschließlich 20. Lieferung 2005*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart / Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag, Eschborn. Monographien: Theophyllin; Theophyllin-Ethylendiamin; Theophyllin-Ethylendiamin-Hydrat; Theophyllin-Monohydrat. In: Bracher, F., et al. (Hrsg.),.
- Müller, B.W., 1998. Mikroemulsionen als neue Wirkstoff-Trägersysteme. In: R.H. Müller and G.E. Hildebrand, Editors. *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, 161–168.
- Muranishi, S., 1985. Modification of Intestinal Absorption of Drugs by Lipoidal Adjuvants. *Pharmaceutical Research*. 2, 108-118.
- Muranishi, S., Muranushi, N. und Sezaki, H., 1979. Improvement of absolute bioavailability of normally poorly absorbed drugs: inducement of the intestinal absorption of streptomycin and gentamycin by lipid-bile salt mixed micelles in rat and rabbit. *International Journal of Pharmaceutics*. 2, 101-111.
- Muranushi, N., Kinugawa, M., Nakajima, Y., Muranishi, S., und Sezaki, H., 1980a. Mechanism for the inducement of the intestinal absorption of poorly absorbed drugs by mixed micelles I. Effects of various lipid--bile salt mixed micelles on the intestinal absorption of streptomycin in rat. *International Journal of Pharmaceutics*. 4, 271-279.
- Muranushi, N., Nakajima, Y., Kinugawa, M., Muranishi, S., und Sezaki, H., 1980b. Mechanism for the inducement of the intestinal absorption of poorly absorbed drugs by mixed micelles II. Effect of the incorporation of various lipids on the permeability of liposomal membranes. *International Journal of Pharmaceutics*. 4, 281-290.

- Murzyn, K., Róg, T. und Pasenkiewicz-Gierula, M., 2005. Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. *Biophysical Journal*. 88, 1091-1103.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Ruth, P., und Schäfer-Korting, M., 2001. Mutschler Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 9. Auflage 2008.
- Nagarajan, R., 1985. Thermodynamics of nonionic polymer--micelle association. *Colloids and Surfaces*. 13, 1-17.
- Nagarajan, R. und Ganesh, K., 1989. Block Copolymer Self-Assembly in Selective Solvents: Theory of Solubilization in Spherical Micelles. *Macromolecules* 22, 4312-4325.
- Nagayasu, A., Uchiyama, K. und Kiwada, H., 1999. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 40, 75-87.
- Naylor, L.J., Bakatselou, V. und Dressman, J.B., 1993. Comparison of the Mechanism of Dissolution of Hydrocortisone in Simple and Mixed Micelle Systems. *Pharmaceutical Research*. 10, 865-870.
- Némethy, G., 1966. Structure of water and of aqueous solutions. *Cryobiology*. 3, 19-26.
- Nemethy, G. und Scheraga, H.A., 1962a. Structure of Water and Hydrophobic Bonding in Proteins. I. A Model for the Thermodynamic Properties of Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 36, 3382-3400.
- Nemethy, G. und Scheraga, H.A., 1962b. Structure of Water and Hydrophobic Bonding in Proteins. II. Model for the Thermodynamic Properties of Aqueous Solutions of Hydrocarbons. *The Journal of Chemical Physics*. 36, 3401-3417.
- Noyes, A.A. und Whitney, W.R., 1897. Über die Auflösungsgeschwindigkeit von festen Stoffen in ihren eigenen Lösungen. *Z. Phys. Chem*. 23, 689-694.
- Ollivon, M., Eidelman, O., Blumenthal, R., und Walter, A., 1988. Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octylglucoside. *Biochemistry*. 27, 1695-1703.
- Ollivon, M., Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C., und Paternostre, M., 2000. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1508, 34-50.
- Ōmura, S., 1984. Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice. Academic Press.

- Panchagnula, R. und Thomas, N.S., 2000. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics*. 201, 131-150.
- Partearroyo, M.A., Urbaneja, M.A. und Goni, F.M., 1992. Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100. *FEBS letters*. 302, 138-140.
- Patel, H., Raval, G., Nazari, M., und Heerklotz, H., 2010. Effects of glycerol and urea on micellization, membrane partitioning and solubilization by a nonionic surfactant. *Biophysical Chemistry*. In Press, Accepted Manuscript.
- Paternostre, M.T., Roux, M. und Rigaud, J.L., 1988. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry*. 27, 2668-2677.
- Perrett, S. und Venkatesh, a.E.G., 2006. Enhancing the Bioavailability of Insoluble Drug Compounds. *Innovations in Pharmaceutical Technology*
- Pittrof, F. und Steffen, H., 1996. Mischmicellen Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift. EP 0730860.
- Pittrof, F. und Supersaxo, A., 1991. Verwendung von pharmazeutischen und kosmetischen Präparaten mit Mischmicellen. Hoffmann - La Roche AG. Patent - Offenlegungsschrift.
- Rajewski, R.A. und Stella, V., J. . 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *in vivo* drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 85, 1142-1169.
- Rasenack, N., 2003. Optimierung physikochemischer Arzneistoffeigenschaften durch Verfahren zur kontrollierten Kristallisation. Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Rasenack, N., Hartenhauer, H. und Müller, B.W., 2003. Microcrystals for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 254, 137-145.
- Rasenack, N. und Müller, B.W., 2002. Dissolution rate enhancement by in situ micronization of poorly water-soluble drugs. *Pharmaceutical Research*. 19, 1894-1900.
- Rasenack, N. und Müller, B.W., 2004. Micron-size drug particles: Common and novel micronization techniques. *Pharmaceutical development and technology*. 9, 1-13.
- Rawle, A. und Nitzsche, R., PCS in 30 minutes. Malvern Instruments.

- Regev, O. und Guillemet, F., 1999. Various Bilayer Organizations in a Single-Tail Nonionic Surfactant: Unilamellar Vesicles, Multilamellar Vesicles, and Flat-Stacked Lamellae. *Langmuir*. 15, 4357-4364.
- Rosoff, M. und Serajuddin, A.T.M., 1980. Solubilization of diazepam in bile salts and in sodium cholate-lecithin-water phases. *International Journal of Pharmaceutics*. 6, 137-146.
- Ruckenstein, E. und Shulgin, I., 2003. Solubility of drugs in aqueous solutions: Part 1. Ideal mixed solvent approximation. *International Journal of Pharmaceutics*. 258, 193-201.
- Saettone, M.F., Giannaccini, B., Delmonte, G., Campigli, V., Tota, G., und La Marca, F., 1988. Solubilization of tropicamide by poloxamers: physicochemical data and activity data in rabbits and humans. *International Journal of Pharmaceutics*. 43, 67-76.
- Saleki-Gerhardt, A., Stoweell, J., G. , Byrn, S., R., und Zografis, G. Hydration and dehydration of crystalline and amorphous forms of raffinose, Vol. 84, 1995, pp. 318-323.
- Saunders, L., 1957. Some properties of mixed sols of lecithin and lysolecithin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 9, 834.
- Sawant, R.R., Sawant, R.M. und Torchilin, V.P., 2008. Mixed PEG-PE/vitamin E tumor-targeted immunomicelles as carriers for poorly soluble anti-cancer drugs: Improved drug solubilization and enhanced in vitro cytotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 70, 51-57.
- Scherließ, H., 2008. Wäßrige Nanosuspensionen zur pulmonalen Applikation. Christian-Albrechts-Universität Kiel; Dissertation.
- Schreier, S., Malheiros, S.V.P. und de Paula, E., 2000. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1508, 210-234.
- Schuberth, O. und Wretling, A., 1961. Intravenous infusion of fat emulsions, phosphatides and emulsifying agents. *Acta Chirurgica Scandinavica*. 278.
- Schurtenberger, P., Bertani, R. und Känzig, W., 1986. Formation of mixed bile salt-lecithin vesicles: A study of the temperature dependence. *Journal of Colloid and Interface Science*. 114, 82-87.
- Schurtenberger, P., Mazer, N., Waldvogel, S., und Känzig, W., 1984. Preparation of monodisperse vesicles with variable size by dilution of mixed micellar solutions of bile salt and phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 775, 111-114.

- Scott Swenson, E. und Curatolo, W.J., 1992. (C) Means to enhance penetration : (2) Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: mechanisms and potential toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 8, 39-92.
- Scriven, L.E., 1976. Equilibrium bicontinuous structure. *Nature*. 263, 123-125.
- Segota, S. und Tezak, D., 2006. Spontaneous formation of vesicles. *Advances in Colloid and Interface Science*. 121, 51-75.
- Sehgal, P., Doe, H. und Sharma, M., 2003. Micellar behavior of short chains phospholipids binary mixture in an aqueous medium: interfacial and fluorescence study. *Colloid & Polymer Science*. 282, 188-192.
- Sekiguchi, K. und Obi, N., 1961. Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I. A Comparison of the Behavior of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man. . *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 9, 866-872.
- Sezgin, Z., Yüksel, N. und Baykara, T., 2006. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 64, 261-268.
- Shah, J.C., Chen, J.R. und Chow, D., 1995. Preformulation study of etoposide: II. Increased solubility and dissolution rate by solid-solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 113, 103-111.
- Shankland, W., 1970. The equilibrium and structure of lecithin-cholesterol mixed micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*. 4, 109-130.
- Sharma, A. und Sharma, U.S., 1997. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 154, 123-140.
- Shrestha, R.G., Shrestha, L.K. und Aramaki, K., 2008. Wormlike micelles in mixed amino acid-based anionic/nonionic surfactant systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 322, 596-604.
- Simões, S.I., Tapadas, J.M., Marques, C.M., Cruz, M.E.M., Martins, M.B.F., und Cevc, G., 2005. Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 26, 307-317.
- Singla, A.K., Garg, A. und Aggarwal, D., 2002. Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 235, 179-192.
- Skinner, L.M. und Sambles, J.R., 1972. The Kelvin equation--a review. *Journal of Aerosol Science*. 3, 199-210.

- Small, D., 1968a. A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 45, 108-119.
- Small, D., M. Size and Structure of Bile Salt Micelles. *Molecular Association in Biological and Related Systems*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D. C., 1968b, pp. 31-52.
- Small, D.M., Bourges, M. und Derivichian, D.G., 1966. Ternary and Quaternary Aqueous Systems Containing Bile Salt, Lecithin, and Cholesterol *Nature*. 211, 816-818
- Small, D.M., Penkett, S.A. und Chapman, D., 1969. Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 176, 178-189.
- Steffen, H. und Schmidt, D., 1978. Injektionslösungen. Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift DE 2730570.
- Stella, V.J. und Nti-Addae, K.W., 2007. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59, 677-694.
- Suzanne, S. und Sol M., G., 1997. Role of phosphatidylethanolamine lipids in the stabilization of protein-lipid contacts. *Biophysical Chemistry*. 67, 269-279.
- Sznitowska, M., 2008. Paclitaxel Solubility in Aqueous Dispersions and Mixed Micellar Solutions of Lecithin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 56, 70 - 74.
- Takeuchi, H., Nagira, S., Yamamoto, H., und Kawashima, Y., 2005. Solid dispersion particles of amorphous indomethacin with fine porous silica particles by using spray-drying method. *International Journal of Pharmaceutics*. 293, 155-164.
- Tanford, C., 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*. 200, 1012-1018.
- Tanford, C., 1979. Interfacial free energy and the hydrophobic effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76, 4175-4176.
- Taniguchi, K., Muranishi, S. und Sezaki, H., 1980. Enhanced intestinal permeability to macromolecules II. Improvement of the large intestinal absorption of heparin by lipid-surfactant mixed micelles in rat. *International Journal of Pharmaceutics*. 4, 219-228.
- Teilmann, K., Schläppi, B., Schüpbach, M., und Kistler, A., 1984. Preclinical safety evaluation of intravenously administered mixed micelles. *Arzneimittel Forschung*. 34, 1517-1523.
- Tengamnuay, P. und Mitra, A.K., 1990. Bile Salt-Fatty Acid Mixed Micelles as Nasal Absorption Promoters of Peptides. I. Effects of

- Ionic Strength, Adjuvant Composition, and Lipid Structure on the Nasal Absorption of [D-Arg²]Kyotorphin. *Pharmaceutical Research*. 7, 127-133.
- Thomson as Lord-Kelvin, W.T., 1871. *Philos. Mag.* 42.
- Torchilin, V., 2007. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research*. 24, 1-16.
- Torchilin, V.P., 2002. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54, 235-252.
- Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N. und Gao, Z. Micelle drug delivery system containing a phospholipid-PEG component, (Northeastern University, USA). Patent, 2004, p. 50 pp.
- Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N., Gao, Z., und Papahadjopoulos-Sternberg, B., 2003. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)*. 100, 6039-6044.
- Traube, J., 1891. *Annale Chemie* 265, 27-55.
- Türk, M. und Lietzow, R., 2004. Stabilized nanoparticles of phytosterol by rapid expansion from supercritical solution into aqueous solution. *AAPS PharmSciTech*. 5, 36-45.
- Uekama, K., Hirayama, F. und Irie, T., 1998. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemical Reviews*. 98, 2045-2076.
- Ueno, M., Tanaka, N. und Horikoshi, I., 1989. Transformation from mixed micelles to vesicles. *Journal of Membrane Science*. 41, 269-279.
- Van Eerdenbrugh, B., Van Speybroeck, M., Mols, R., Houthoofd, K., Martens, J.A., Froyen, L., Van Humbeeck, J., Augustijns, P., und Van den Mooter, G., 2009. Itraconazole/TPGS/Aerosil®200 solid dispersions: Characterization, physical stability and in vivo performance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 38, 270-278.
- van Hasselt, P.M., Janssens, G.E.P.J., Slot, T.K., van der Ham, M., Minderhoud, T.C., Talelli, M., Akkermans, L.M., Rijcken, C.J.F., und van Nostrum, C.F., 2009. The influence of bile acids on the oral bioavailability of vitamin K encapsulated in polymeric micelles. *Journal of Controlled Release*. 133, 161-168.
- van Hoogdalem, E.J., de Boer, A.G. und Breimer, D.D., 1989. Intestinal drug absorption enhancement: An overview. *Pharmacology & Therapeutics*. 44, 407-443.
- Vinson, P.K., Talmon, Y. und Walter, A., 1989. Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-

- transmission electron microscopy. *Biophysical Journal*. 56, 669-681.
- Wacker, M. und Schubert, R., 1998. From mixed micelles to liposomes: Critical steps during detergent removal by membrane dialysis. *International Journal of Pharmaceutics*. 162, 171-175.
- Wagenaar, B.W. und Müller, B.W., 1994. Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres. *Biomaterials*. 15, 49-54.
- Wajda, R. Emulsionsartige wasserlösliche Konzentrate, (Lipoid G.m.b.H., Germany). Patent WO2004/047791 A2, 2004a.
- Wajda, R., 2004b. NanoSolve - a new type of technique for the solubilization of lipophilic actives such as coenzyme Q10 or omega-3 fatty acids. *Innovations in Food Technology*. 24, 32-33.
- Wan, L., S. C. und Lee, P., F. S. . 1974. CMC of polysorbates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 63, 136-137.
- Wei, Z., Hao, J., Yuan, S., Li, Y., Juan, W., Sha, X., und Fang, X., 2009. Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: Formulation, optimization and in vitro characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 376, 176-185.
- Wempe, M.F., Wright, C., Little, J.L., Lightner, J.W., Large, S.E., Caflisch, G.B., Buchanan, C.M., Rice, P.J., Wachter, V.J., Ruble, K.M., und Edgar, K.J., 2009. Inhibiting efflux with novel non-ionic surfactants: Rational design based on vitamin E TPGS. *International Journal of Pharmaceutics*. 370, 93-102.
- Wennerström, H. und Lindman, B., 1979. Micelles. *Physical chemistry of surfactant association*. *Physics Reports*. 52, 1-86.
- Werling, J., Graham, S., Owen, H., Nair, L., Gonyon, T., und Carter, P.W., 2008. Physicochemical stability of phospholipid-dispersed suspensions of crystalline itraconazole. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 69, 1104-1113.
- WHO. 1963. Lecithin. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (see Annex 1, Ref. No. 7).
- WHO. 1973. WHO Food Additives Series No. 5 (Lecithin). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives which met in Geneva, 25 June - 4 July 1973.
- Wiedmann, T.S., Deye, C. und Kallick, D., 2001a. Interaction of Bile Salt and Phospholipids with Bovine Submaxillary Mucin. *Pharmaceutical Research*. 18, 45-53.
- Wiedmann, T.S., Herrington, H., Deye, C., und Kallick, D., 2001b. Distribution and Diffusion of Sodium Taurocholate and Egg Phosphatidylcholine Aggregates in Rat Intestinal Mucin. *Pharmaceutical Research*. 18, 1489-1496.

- Wishart, D.S., 2008. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. . *Nucleic Acids Res* 36.
- Wu, W. und Nancollas, G.H., 1998. A New Understanding of the Relationship Between Solubility and Particle Size. *Journal of Solution Chemistry*. 27, 521-531.
- Yan, F., Zhang, C., Zheng, Y., Mei, L., Tang, L., Song, C., Sun, H., und Huang, L., 2010. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6, 170-178.
- Yonemochi, E., Kitahara, S., Maeda, S., Yamamura, S., Oguchi, T., und Yamamoto, K., 1999. Physicochemical properties of amorphous clarithromycin obtained by grinding and spray drying. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7, 331-338.
- You, J., Hu, F.-Q., Du, Y.-Z., und Yuan, H., 2007. Polymeric Micelles with Glycolipid-like Structure and Multiple Hydrophobic Domains for Mediating Molecular Target Delivery of Paclitaxel. *Biomacromolecules*. 8, 2450-2456.
- Yu, B.G., Okano, T., Kataoka, K., und Kwon, G., 1998. Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *Journal of Controlled Release*. 53, 131-136.
- Yu, L., 2001. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 48, 27-42.
- Zalipsky, S., Brandeis, E., Newman, M.S., und Woodle, M.C., 1994. Long circulating, cationic liposomes containing amino-PEG-phosphatidylethanolamine. *FEBS Letters*. 353, 71-74.
- Zastre, J., Jackson, J. und Burt, H., 2004. Evidence for Modulation of P-glycoprotein-Mediated Efflux by Methoxypolyethylene Glycol-block-Polycaprolactone Amphiphilic Diblock Copolymers. *Pharmaceutical Research*. 21, 1489-1497.

Man sollte alles so einfach wie möglich sehen – aber auch nicht einfacher.

Albert Einstein

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die Überlassung des überaus interessanten Dissertationsthemas danken. Die regelmäßigen Treffen und Diskussionen haben mich stets motiviert und einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Durch die Möglichkeit meine eigenen Ideen einzubringen und die freie selbstständige Gestaltung des Dissertationsthemas war meine Promotionszeit zumeist von großem Enthusiasmus geprägt. An dieser Stelle noch mal ein großer Dank für die Begleitung der Arbeit bis zum Schluss, die Korrektur der Veröffentlichungen und das schnelle Korrekturlesen dieser Dissertation.

Ebenso danke ich Prof. Dr. H. Steckel für die spätere Übernahme der Betreuung und die wissenschaftliche Begleitung meiner Arbeit. Vielen Dank für die hilfreichen Gespräche und das Korrekturlesen der Publikationen, Poster und der Dissertation.

Ein besonderer Dank geht auch an Rüdi, die gute Seele der Pharmazeutischen Technologie in Kiel, der nicht nur durch seine Hilfsbereitschaft und zeichnerischen Begabungen einen bleibenden Eindruck hinterlassen wird.

Thorsten und Steve danke ich für den guten Start, bzw. die schöne gemeinsame Zeit im dritten Stock der Techno, die danach mit Jan und Torben genauso gut weiterging. Ohne euch wäre die Zeit im Institut und auch nach Feierabend mit Sicherheit nicht zu dem geworden, was sie gerade im Nachhinein ist. Dasselbe gilt genauso für Momme.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich auch hier noch mal bei Thorsten und Mareike.

Ansonsten möchte ich den Praktikumsassistenten Claudia, Maren, Alexandra, Janine und Franz, die mit mir zusammen auf Station waren, für die unkomplizierte Art und gute Zusammenarbeit danken. Also Claudia, Maren, Janine, Alexandra und Franz vielen Dank für die gute Zusammenarbeit. Lieben Dank auch an alle technischen Angestellten für die netten Gespräche zwischendurch und die Hilfsbereitschaft z.B. bei der HPLC (danke Regina).

Beim gesamten Arbeitskreis bedanke ich mich für die schöne Zeit, die erlebnisreichen Klassenfahrten, die gemeinsam erlebten Kongresse und vieles mehr.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Elena, die mich immer bei Allem unterstützt hat, die Vorträge nachher besser kannte als ich und die stets dafür gesorgt hat, dass es auch eine Welt außerhalb des Instituts gab, um für den nötigen Ausgleich zu sorgen.

Zu guter Letzt ein großer Dank an meine Eltern und Geschwister, die immer hinter mir standen und jederzeit mit großem Interesse und gutem Zuspruch eine feste Unterstützung darstellten, die zum Erfolg der Promotion wesentlich beigetragen hat.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Familienname: Christopher Harald Rupp
Geburtsdatum: 28.07.1979
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULBILDUNG UND ZIVILDIENTST

1986 – 1990 Grundschule: Brüder-Grimm-Schule, Seelze
1990 – 1992 Orientierungsstufe, Seelze
1992 – 1999 Georg-Büchner-Gymnasium, Seelze
06/1999 Allgemeine Hochschulreife
09/1999-07/2000 Zivildienst in der Lebenshilfe Seelze

HOCHSCHULAUSSCHULUNG

10/2000 – 05/2005 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
09/2003 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
05/2005 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

PRAKTISCHES JAHR

07/2005 – 12/2005 Diplom – Pharmaziestudium an der CAU Kiel
01/2006 – 07/2006 halbjährige Tätigkeit als Pharmaziepraktikant in der Apotheke im Familamarkt in Kiel-Mettenhof
08/2006 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 Approbation zum Apotheker

BERUFSTÄTIGKEIT

seit 10/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Steckel

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vom 12. Mai 2009, dass der Inhalt der vorliegenden Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, von mir selbst erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt wurde. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt und entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis.

Christopher Rupp