



**CHOLESTEROLBASIERTES, FLÜSSIGKRISTALLINES SYSTEM  
ALS VEHIKEL ZUR TOPISCHEN APPLIKATION**

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

VORGELEGT VON  
**JANINE BERG**

KIEL 2013

Erster Gutachter: Prof. Dr. Hartwig Steckel  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Blaschek

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2013  
Zum Druck genehmigt: 05.04.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl

*„Wir stehen selbst betrübt und sehn betroffen/  
Den Vorhang zu und alle Fragen offen.“*

*Bertolt Brecht*



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

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	EINLEITUNG .....	1
1.2	ZIELSETZUNG .....	2
<b>2</b>	<b>THEORETISCHER TEIL.....</b>	<b>3</b>
2.1	AUFBAU DER EPIDERMIS .....	3
2.1.1	<i>Struktur des Stratum corneum</i> .....	4
2.1.2	<i>Thermodynamische Untersuchungen des Stratum corneum</i> .....	6
2.2	MÖGLICHKEITEN DER VERBESSERTEN WIRKSTOFF-PENETRATION .....	8
2.3	FLÜSSIGKRISTALLINE ZUBEREITUNGEN .....	12
2.4	NIEDERMOLEKULARE ORGANISCHE GELSYSTEME .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>23</b>
3.1	FLÜSSIGKRISTALLINES SYSTEM .....	23
3.1.1	<i>Cholesterol</i> .....	23
3.1.2	<i>Propylenglykol</i> .....	25
3.2	WEITERE HILFSSTOFFE .....	27
3.2.1	<i>Glykole und andere Alkohole</i> .....	27
3.2.2	<i><math>\beta</math>-Sitosterol</i> .....	27
3.2.3	<i>Pemulen<sup>®</sup> TR-1</i> .....	28
3.3	MODELLARZNEISTOFFE .....	28
3.3.1	<i>Testosteron</i> .....	28
3.3.2	<i>Estradiol</i> .....	29
3.3.3	<i>Miconazol</i> .....	30
3.3.4	<i>Prednicarbat</i> .....	30
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>31</b>
4.1	MIKROSKOPIE .....	31
4.1.1	<i>Licht- und Polarisationsmikroskopie</i> .....	31
4.1.2	<i>Elektronenmikroskopie</i> .....	31
4.1.2.1	<i>Gefrierbruchpräparation und Untersuchung im TEM</i> .....	32
4.1.2.2	<i>Kryopräparation und Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop</i> .....	33
4.2	RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE .....	34
4.2.1	<i>SAXD</i> .....	35
4.2.2	<i>WAXD</i> .....	36
4.3	THERMOANALYTISCHE VERFAHREN.....	37

4.3.1	<i>Dynamische Differenzkalorimetrie</i> .....	37
4.3.2	<i>Thermogravimetrische Analyse</i> .....	38
4.4	RHEOLOGIE .....	39
4.4.1	<i>Oszillation</i> .....	39
4.4.1.1	Einführung .....	39
4.4.1.2	Methoden .....	41
4.4.2	<i>Viskosimetrie</i> .....	42
4.5	FREISETZUNGS- UND PERMEATIONSTESTS.....	42
4.5.1	<i>Testdurchführung</i> .....	42
4.5.2	<i>Verwendete Hautmembranen</i> .....	44
4.6	SPEZIELLE METHODEN .....	47
<b>5</b>	<b>PRAKTISCHER TEIL</b> .....	<b>49</b>
5.1	HERSTELLUNGSMETHODEN .....	49
5.1.1	<i>Schwingmühle</i> .....	50
5.1.2	<i>Hochleistungsdispersierer</i> .....	53
5.1.3	<i>Planeten-Mischer</i> .....	54
5.1.4	<i>Hochdruckhomogenisator</i> .....	54
5.1.5	<i>Rührwerkskugelmühle</i> .....	55
5.1.6	<i>Magnetrührplatte</i> .....	59
5.1.7	<i>Zusammenfassung der Herstellungsmethoden</i> .....	66
5.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR REZEPTUROPTIMIERUNG .....	68
5.2.1	<i>Cholesterolgehalt</i> .....	68
5.2.2	<i>Pseudopolymorphe Modifikationen des Cholesterols</i> .....	68
5.2.3	<i>Austausch des Cholesterols</i> .....	72
5.2.4	<i>Einsatz anderer Glykole und Alkohole</i> .....	72
5.2.5	<i>Zusatz von Glykolen und Isopropanol</i> .....	75
5.2.6	<i>Einfluss des Wasseranteils in Propylenglykol</i> .....	77
5.2.6.1	Bestimmung des Wassergehaltes .....	77
5.2.6.2	Trocknung des Propylenglykols .....	77
5.2.6.3	Herstellung der Zubereitungen unterschiedlichen Wassergehaltes .....	78
5.2.7	<i>Optimierung der Propylenglykol-Fixierung</i> .....	79
5.2.8	<i>Zusammenfassung</i> .....	83
5.3	CHARAKTERISIERUNG DES SYSTEMS .....	84
5.3.1	<i>Mikroskopie</i> .....	84
5.3.1.1	Lichtmikroskopie.....	84
5.3.1.2	Elektronenmikroskopie.....	88
5.3.1.3	Lichtmikroskopie nach Anfärbung .....	90
5.3.2	<i>Röntgendiffraktometrie</i> .....	91
5.3.2.1	SAXD .....	91

5.3.2.2	WAXD .....	95
5.3.3	<i>Rheologische Untersuchung</i> .....	97
5.3.3.1	Viskosimetrie .....	97
5.3.3.2	Oszillationsmessungen .....	100
5.3.4	<i>Thermoanalytische Untersuchung</i> .....	104
5.3.5	<i>Zusammenfassung</i> .....	106
5.4	EIGNUNG ALS VEHIKELSYSTEM ZUR TOPISCHEN APPLIKATION .....	108
5.4.1	<i>Wirkstofflöslichkeit und Herstellung wirkstoffhaltiger Proben</i> .....	108
5.4.2	<i>Einfluss auf die Wirkstoffpermeation</i> .....	111
5.4.2.1	Voruntersuchungen .....	111
5.4.2.1.1	Auswahl eines geeigneten Akzeptormediums .....	111
5.4.2.1.2	Probenaufarbeitung .....	113
5.4.2.1.3	Gleichförmigkeit des Gehaltes .....	114
5.4.2.2	Freisetzungsuntersuchungen .....	115
5.4.2.3	Permeationsuntersuchungen .....	120
5.4.3	<i>Einfluss auf das thermodynamische Verhalten des Stratum corneum</i> .....	125
5.4.4	<i>Zusammenfassung</i> .....	128
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>139</b>
8.1	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE .....	139
8.2	VERWENDETE SUBSTANZEN .....	142
8.3	HPLC-METHODEN .....	145
8.3.1	<i>Estradiol-Hemihydrat</i> .....	145
8.3.2	<i>Miconazol</i> .....	146
8.3.3	<i>Prednicarbat</i> .....	146
8.3.4	<i>Testosteron</i> .....	147
8.3.5	<i>Cholesterol</i> .....	147
8.4	BESTIMMUNG DER SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEIT VON CHOLESTEROL .....	148
8.5	ZUSAMMENSETZUNG SÖRENSEN-PHOSPHATPUFFER .....	148
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>149</b>



# 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

## 1.1 Einleitung

Die Haut ist mit einer Fläche von ca. 1,7 m<sup>2</sup> das größte Organ des Menschen und bietet sich zur Applikation von Arzneistoffen an. Je nach Wirkort wird dabei zwischen dermalen und transdermalen Therapie unterschieden (Trommer et al., 2006). Bei der dermalen Therapie wird eine Wirkung im direkten Applikationsbereich (Epidermis oder Dermis) angestrebt. Folglich wird sie vorwiegend zur Behandlung von Hautkrankheiten genutzt. Die transdermale Therapie hingegen bietet eine gute Alternative zur oralen Applikation mit dem Ziel der Aufnahme in den Blutkreislauf und einer entsprechenden systemischen Wirkung (Horstmann et al., 2010). Durch Umgehung des first-pass-Effektes kann dabei eine reduzierte Metabolisierung in der Leber erreicht werden. Wenn auch unterschiedliche Arzneiformen für diese Applikationsform zur Verfügung stehen, haben sich die Transdermalen Therapeutischen Systeme (Transdermale Pflaster) aufgrund der Möglichkeit der exakten Steuerung der Wirkstoffdosierung durchgesetzt (Gröning et al., 2005). Zudem erreichen sie plateauähnliche Plasmaspiegelverläufe, deren Dauer teilweise bis zu sieben Tage aufrechterhalten werden kann. Folglich ergeben sich geringere Nebenwirkungen und Applikationsfrequenzen. Gegenüber der parenteralen Gabe von Arzneistoffen erlauben sie außerdem eine schmerzfreie und bequeme Anwendung (Prausnitz et al., 2008, Subedi et al., 2010). Voraussetzung sowohl für die dermale als auch transdermale Wirkung ist die Passage des Stratum corneum. Da dieses jedoch aufgrund einer besonderen Organisation der interzellulären Lipide eine effektive Barriere gegenüber exogenen Substanzen darstellt, ist die Überwindung des Stratum corneum nicht ohne weiteres möglich (Neubert et al., 1996). Dies gilt besonders für Arzneistoffe mit einer Molekülgröße > 500 Da und einem Verteilungskoeffizienten außerhalb des Bereiches von 10 bis 1000 (Daniels, 2004). Da jedoch eine Vielzahl der vorhandenen Arzneistoffe, insbesondere neuere Arzneistoffe, diese physikochemischen Eigenschaften aufweisen (Faller et al., 2011), kommt der Entwicklung penetrationsfördernder Methoden eine große Bedeutung zu. Die Aufnahme in oder durch die Haut kann dabei sowohl durch das Vehikelsystem als auch durch den Hautzustand reguliert werden. Aufgrund einer gegenseitigen Beeinflussung sollten beide Faktoren nicht isoliert betrachtet werden. Während der Hautzustand durch Einsatz chemischer Enhancer oder physikalischer Methoden verändert werden kann,

bieten innovative Formulierungskonzepte sowohl eine gesteigerte Wirkstofflöslichkeit als auch eine verbesserte Penetration (Neubert et al., 1996).

### **1.2 Zielsetzung**

Im Rahmen von Arbeiten mit einer Rührwerkskugelmühle wurde beobachtet, dass Cholesterol und Propylenglykol unter bestimmten Bedingungen eine halbfeste Formulierung bilden. Da in der Literatur von einem entsprechenden Verhalten dieser beiden Komponenten bisher nicht berichtet wird, ist es das Ziel dieser Arbeit, die Struktur dieser Zubereitung zu untersuchen. Zugleich sollen eine geeignete Herstellungsmethode etabliert und notwendige Bedingungen für die Ausbildung dieser Formulierung erfasst werden. Eine anschließende Untersuchung der Solubilisatoneigenschaften sowie der Wirkstoffpermeation und der Wechselwirkung mit Stratum corneum-Lipiden soll die Eignung dieser Formulierung als ein innovatives Vehikelsystem zur topischen Applikation prüfen.

## 2 THEORETISCHER TEIL

### 2.1 Aufbau der Epidermis

Die wichtigste Aufgabe der menschlichen Haut ist es, ein für biologische Prozesse notwendiges konstantes, inneres Milieu trotz ständiger Veränderungen äußerer Umwelteinflüsse aufrechtzuerhalten. Diese Barrierefunktion wird im Wesentlichen durch die äußerste Hautschicht, die Epidermis, gewährleistet. In dieser 0,1 mm bis 1,5 mm dicken Schicht (Faller et al., 2004) findet eine permanente Zellwanderung durch vier verschiedene Ebenen nach außen hin statt. Die untere, einzellige Basalschicht, das Stratum basale, ist für den ständigen Zelnachschub verantwortlich. In der darauf folgenden Stachelzellschicht (Stratum spinosum) beginnen sich die Keratinozyten zu differenzieren und nehmen ein stacheliges Aussehen an. In dieser Zellschicht treten erstmals sogenannte Lamellengranula (auch Odland-Bodies genannt) auf (Elias et al., 1998). Sie enthalten parallele Lipidlamellen, welche später den Interzellularraum des Stratum corneum füllen (Landmann, 1991). Das sich anschließende Stratum granulosum enthält Keratohyalin granula, welche eine körnchenartige Struktur aufweisen und mit dem Verhornungsprozess in Zusammenhang stehen. Die abschließende Schicht der Epidermis ist das Stratum corneum (siehe Abbildung 2.1). Es ist aus toten Hornzellen (Corneozyten), die weder Kern noch Organellen besitzen, sowie interzellulären Lipiden aufgebaut (Lüllmann-Rauch, 2006).

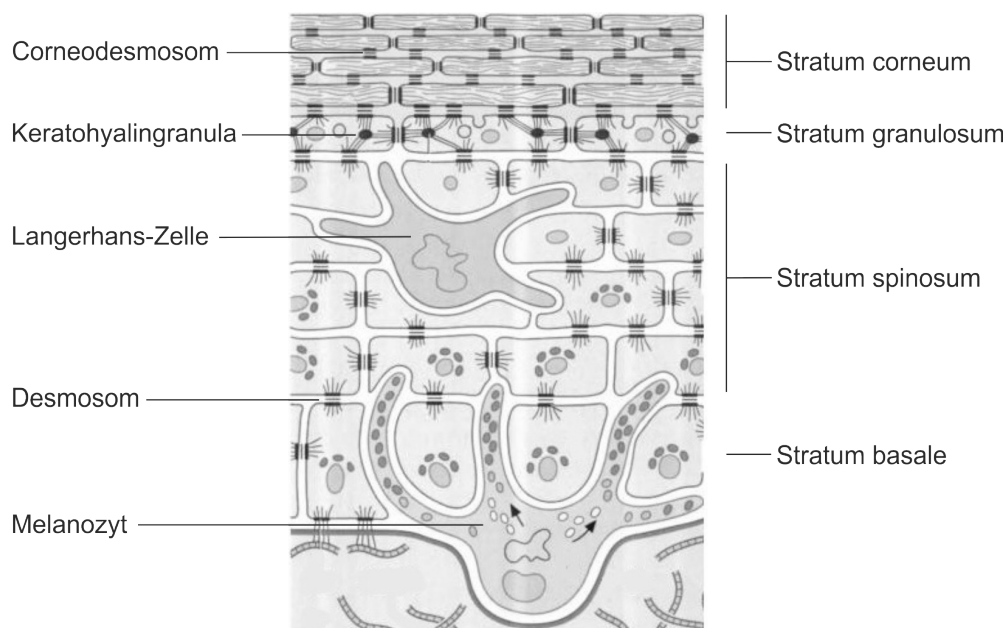


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Epidermisaufbaus, modifiziert nach Lüllmann-Rauch (2006)



### 2.1.1 Struktur des Stratum corneum

Bereits 1975 wurde die heterogene Protein-Lipid-Struktur des Stratum corneum erkannt (Michaels et al., 1975). Um sich diese besser vorstellen zu können, wird das Stratum corneum oft mit einem „Backstein-Mörtel-Modell“ verglichen (Elias, 1983). Dabei stellen die mit Keratin gefüllten Hornzellen die Backsteine dar, welche von einer kohärenten, lamellaren Lipidschicht, dem Mörtel, umgeben sind. Doch dieses Modell erklärt nicht die große Widerstandsfähigkeit dieser Schicht gegenüber mechanischem Stress und innerem Gewebedruck. Zudem kann es weder etwas über den Zusammenhalt der einzelnen Schichten noch etwas über den Stoffaustausch aussagen (Neubert et al., 2007). Daher beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen seit mehr als 30 Jahren mit der Aufklärung dieser sehr komplexen Struktur. Durch hochauflösende Elektronenmikroskopie konnten hakenähnliche Strukturen der Corneozyten (siehe Abbildung 2.2) erkannt werden, die einen wesentlichen Beitrag zur mechanischen Stabilität leisten (Pfeiffer et al., 2000).

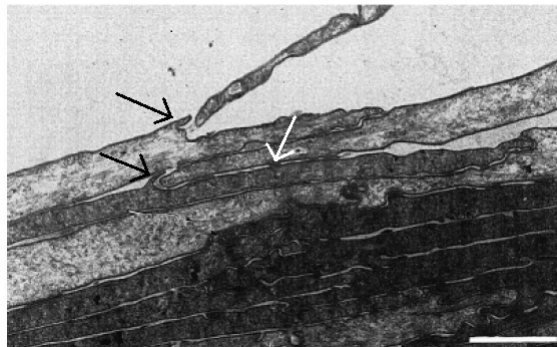


Abbildung 2.2: Transelectronenmikroskopisches Bild nach Kryopräparation des Stratum corneum; schwarze Pfeile kennzeichnen hakenähnliche Strukturen, weißer Pfeil zeigt auf ein Corneodesmosom, Messbalken 2 µm, (Pfeiffer et al., 2000)

Zudem existieren punktförmige, molekulare Verbindungsstellen zwischen den Zellen, die als Corneodesmosomen bezeichnet werden. Diese Haftkontakte bestehen bereits in den lebenden Schichten der Epidermis (hier noch als Desmosomen bezeichnet) (Corcuff et al., 2001) und werden während der Differenzierung mit weiteren Proteinen ergänzt und stabilisiert. Während die beiden genannten Strukturen hauptsächlich die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut erklären, ist die Barrierefunktion auf die folgenden Prinzipien zurückzuführen. Neben den im oberen Stratum granulosum auftretenden Barrierekontakten (Tight junctions) zwischen den Zellen, spielt die Organisation der interzellulären Lipide des Stratum corneum eine wesentliche Rolle (Lüllmann-Rauch, 2006, Neubert et al., 2007). Wie bereits oben beschrieben, stammen

diese Lipide aus den Lipidgranula. Kurz vor der terminalen Differenzierung verschmelzen diese mit der Zellmembran und geben den Inhalt in den Interzellularraum ab, in dem sie sich dann zu parallelen Schichten transformieren (Landmann, 1991). Ob die Bildung des Interzellularraumes tatsächlich durch solch einen exozytotischen Prozess erfolgt oder eher nach dem von Norlén beschriebenen „membrane folding model“ (Norlén, 2001a) abläuft, ist noch nicht abschließend geklärt. Die interzellulären Lipide setzen sich im Wesentlichen aus drei Hauptfraktionen zusammen: Ceramide (40 - 50%), Cholesterol (20 - 33%) und dessen Derivate (Cholesterolester 0 – 20% und Cholesterolsulfat 0 - 7%) sowie freie Fettsäuren (7 - 13%), wobei hauptsächlich gesättigte, langkettige Fettsäuren vorhanden sind (Norlén et al., 2007). Dieses Lipidgemisch liegt geordnet in übereinander gelagerten Schichten vor, in denen sich polare wässrige Bereiche, welche durch die Kopfgruppen der Fettsäuren gebildet werden, mit lipophilen Bereichen der Alkylketten der Fettsäuren abwechseln. Die äußere Schicht der Lipide ist kovalent an die verzweigte Protein-Envelope gebunden, welche die Corneozyten wie eine Hülle umgibt (Norlén et al., 2007).

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung der komplexen Lipidorganisation vorgenommen und viele Strukturmodelle postuliert. So seien z. B. das „Domain-mosaic Model“ (Forslind, 1994), das „Sandwich Model“ (Bouwstra et al., 2001), das „Single-gel-phase Model“ (Norlén, 2003) sowie das „Asymmetric bilayer Model“ (McIntosh, 2003) genannt. Generell gibt es bei diesen Modellvorstellungen verschiedene Ansichten bezüglich der periodisch auftretenden Strukturen, ob diese als „Bilayer“ oder „triple bands“ vorliegen (Swartzendruber et al., 1989) und ob diese wiederum von gleicher oder unterschiedlicher Dicke sind (Hill et al., 2003). Der vorliegende Aggregatzustand der Lipide wird ebenfalls gegensätzlich beschrieben. So liegen diese nach Forslind sowohl kristallin als auch flüssigkristallin nebeneinander vor (Forslind et al., 1997), während Bouwstra zusätzlich den flüssigen Zustand annimmt (Bouwstra et al., 2001). Die Lipidmatrix wird von den meisten Modellen als Zweiphasensystem dargestellt, in dem diskontinuierliche Bereiche von kontinuierlichen getrennt werden (Bouwstra et al., 2002a). Jedoch postulierte Norlén 2001, dass der Interzellularraum aus einem einzigen, kohärenten Gel besteht und keine Separation in kristallin/flüssigkristallin bzw. hexagonal/orthorhombisch vorliegt (Norlén, 2001b). Zugleich wird diskutiert, ob das Cholesterol homogen oder asymmetrisch in den Schichten vorliegt (McIntosh, 2003), ob die Alkylketten gegenüberliegender Fettsäuren ineinandergreifen oder nicht (Schroeter et al., 2009b) und ob die Ceramide in einer

## 2.1 Aufbau der Epidermis

gestreckten Konformation vorliegen oder beide Alkylketten des Moleküls in eine Richtung zeigen (Schroeter et al., 2009a). Dabei basieren einige Aussagen lediglich auf in vitro-Versuchen, die mit Membranmodellen entsprechender Lipidzusammensetzung durchgeführt wurden. Es wurde jedoch auch eine Korrelation zwischen in vitro- und in vivo-Tests bestätigt (Bouwstra et al., 2002b). Die erst seit wenigen Jahren etablierte Technik CEMOVIS (Cryo-electron-microscopy of vitreous section) erlaubt eine Visualisierung der Lipidorganisation mit einer Auflösung von 2 nm in 2D und 5 nm in 3D und ermöglicht eine fortschreitende Strukturaufklärung (Norlén, 2003). Nach neuestem Erkenntnisstand sind die Lipide in gestapelten Bilayern organisiert, wobei die Ceramide in gestreckter Konformation vorliegen. Dabei ordnet sich das Cholesterol neben dem Sphingosinteil des Ceramids an, während eine freie Fettsäure neben dem Fettsäureteil des Ceramids auftritt (siehe Abbildung 2.3). Daraus ergeben sich Bilayer mit einer Periodizität von 11 nm, welche sich aus einer 6,5 nm breiten und einer 4,5 nm schmalen Schicht aufbauen. Im Interzellularraum zwischen zwei Corneozyten wurden unterschiedliche Anzahlen, max. 12, dieser Bilayer detektiert (Iwai et al., 2012).

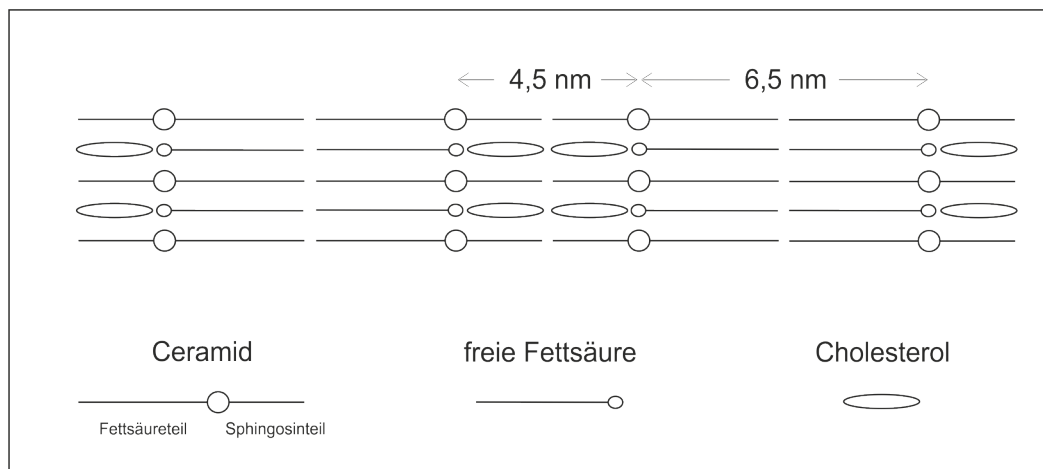


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der interzellulären Lipidorganisation des Stratum corneum nach Iwai et al. (2012)

### 2.1.2 Thermodynamische Untersuchungen des Stratum corneum

Veränderungen in der Mikrostruktur der Lipidmatrix des Stratum corneum können mit Hilfe röntgendiffraktometrischer und thermoanalytischer Messungen detektiert werden. In Abbildung 2.4 ist ein typisches Beispiel für das thermische Verhalten von isoliertem Stratum corneum dargestellt. Im Temperaturbereich zwischen 0 °C und 120 °C treten vier charakteristische endotherme Phasenübergänge auf. Der erste Peak bei 35 °C bis 40 °C ist sehr klein und kann nicht in allen Proben beobachtet werden (Golden et al.,

1986). Er ist entsprechend röntgenanalytischer Untersuchungen auf einen Übergang der orthorhombischen zur hexagonalen Packung der Lipide zurückzuführen. Der folgende Peak zwischen 60 und 75 °C wird durch ein Schmelzen der lamellaren Strukturen verursacht (Bouwstra et al., 1992). Bei ca. 85 °C findet ein Übergang vom Gel- in den flüssigen Zustand der Lipide statt, der jedoch durch Proteine beeinflusst wird (Bouwstra et al., 1991). Das vierte endotherme Ereignis im Bereich zwischen 100 °C und 110 °C kann sowohl in intaktem als auch in entfettetem Stratum corneum, nicht jedoch in isolierten Lipiden detektiert werden und weist somit auf eine Proteindenaturierung hin (Golden et al., 1986, Bouwstra et al., 1991). Der Hydratisierungsgrad des Stratum corneum hat bei diesen Messungen einen signifikanten Einfluss auf die Lage der Phasenübergänge. Während im dehydrierten Stratum corneum der Proteinpeak fehlt (Schaefer et al., 1996), erscheinen die Lipidübergänge  $T_2$  und  $T_3$  mit zunehmendem Wassergehalt bei geringeren Temperaturen (Golden et al., 1986). Bei Verwendung sehr hoher Heizraten (100 °C/min bis 400 °C/min) können mehr als diese vier Phasenübergänge oberhalb der Raumtemperatur analysiert werden. Hervorzuheben ist dabei vor allem der bei 55 °C auftretende Peak, der mit kovalent an Proteine gebundenen Lipiden assoziiert wird (Silva et al., 2006b, Silva et al., 2006a).

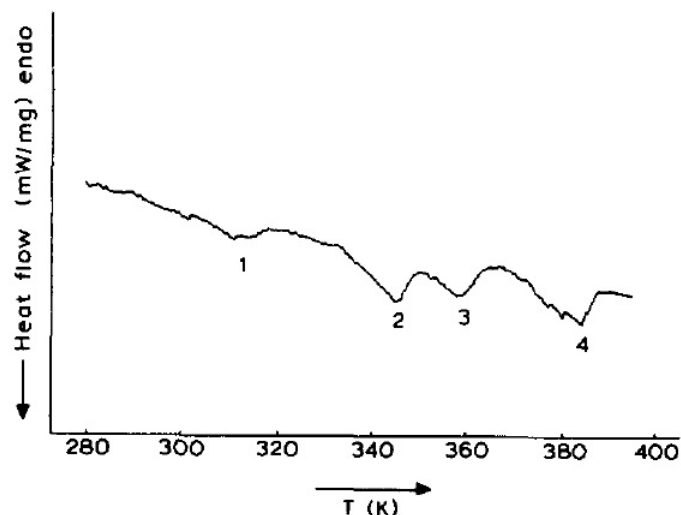


Abbildung 2.4: Beispiel des thermodynamischen Verhaltens von unbehandeltem Stratum corneum (Bouwstra et al., 1991).

### 2.2 Möglichkeiten der verbesserten Wirkstoff-Penetration

Das Stratum corneum stellt also aufgrund seines strukturellen Aufbaus eine effektive Barriere gegenüber exogenen Substanzen dar. Prinzipiell gibt es drei mögliche Penetrationswege durch das Stratum corneum: die Substanzen können die interzelluläre Route wählen, in dem sie um die Corneozyten herum durch die Lipidschicht diffundieren oder über den transzellulären Weg abwechselnd die Corneozyten und die Lipidschicht passieren. Zudem kann auch der Weg über Hautanhangsgebilde gewählt werden (transfollikuläre und transglanduläre Route), wobei dieses eher für große, polare Moleküle von Bedeutung ist (Barry, 1987).

Die therapeutische Effektivität eines topisch applizierten Arzneistoffes hängt hauptsächlich von den folgenden drei Faktoren ab: von den Eigenschaften des Arzneistoffes, vom Hautzustand sowie vom Vehikelsystem. So bestimmen die Löslichkeit, der Verteilungskoeffizient und der Diffusionskoeffizient des Arzneistoffes das Ausmaß der Penetration und welcher der drei Penetrationswege vorwiegend genutzt wird. Die Beschaffenheit der Haut mit dem Gesundheitszustand, der Hautregion, dem Alter sowie einer vorangegangenen Behandlung legt den Zustand der Barriere und somit deren Effektivität fest. Letztendlich spielt auch der Arzneistoffträger – das Vehikel – eine wesentliche Rolle, da es selbst Einfluss auf den Hautzustand nimmt und die Löslichkeit und somit die Freisetzung des Wirkstoffes bestimmt. Dabei kann dieser sowohl gelöst als auch suspendiert in der Grundlage vorliegen (Neubert et al., 1996). Um eine effektive Wirkung topisch verabreichter Arzneimitteln für die dermale und transdermale Anwendung zu erreichen, werden verschiedene Möglichkeiten der Penetrationsverbesserung genutzt. Dabei werden die oben genannten Faktoren beeinflusst:

- Veränderung der Eigenschaften des Wirkstoffes,
- Veränderung des Hautzustandes durch
  - chemische Methoden (Enhancer) oder
  - physikalische Methoden,
- Einsatz besonderer Vehikelsysteme.

Eine Möglichkeit, die Penetration von Wirkstoffmolekülen zu verbessern, besteht in der Bildung von Prodrugs. Meist handelt es sich um Ester-Prodrugs, die in der lebenden Epidermisschicht wieder hydrolysiert werden (Subedi et al., 2010). Eine typische

Substanzklasse stellen die Glucocorticoide dar (z. B. Betamethasonvalerat, Hydrocortisonacetat, Triamcinolonacetonid). Zudem kann die Penetration geladener Moleküle durch Ionenpaarbindung erhöht werden. Je nach Lipophilie des Gegenions kann der Wirkstofftransport dermal oder transdermal gesteuert werden (Neubert et al., 1996).

Der Hautzustand kann auf chemischem Wege durch Einsatz von Enhancern manipuliert werden. Ein häufig eingesetzter Vertreter ist das Dimethylsulfoxid (DMSO). Es besitzt ausgezeichnete Solvations-eigenschaften und verdrängt Wasser von polaren Kopfgruppen der Bilayerstrukturen im Stratum corneum, sodass lösungsmittelgefüllte Räume mit verbesserter Löslichkeit für Wirkstoffe geschaffen werden. Ab Konzentrationen größer als 60% zerstört es zudem die Ordnung der Barrierelipide (Barry, 1987). Ein weiteres sehr effektives Molekül ist Laurocapram (Azone<sup>®</sup>), welches sich in die Lipidketten der Bilayer einlagert und dadurch deren Fluidität erhöht (Trommer et al., 2006). Mehrwertige Alkohole stellen eine weitere Substanzklasse der Enhancer dar, wobei ihre Wirkung als echte Penetrationenhancer umstritten ist. So werden einerseits Wechselwirkungen von z. B. Propylenglykol mit polaren Kopfgruppen der Bilayerstrukturen erwähnt (Brinkmann et al., 2005), andererseits wird ihre Wirkung im Wesentlichen auf die Cosolventieneigenschaften reduziert (Santos et al., 2012, Bendas et al., 1995) (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.2). Auch Harnstoff wird eine penetrationsverbessernde Wirkung zugesprochen, die hauptsächlich auf die gesteigerte Wasserbindungskapazität und die damit verbundene Änderung des Ordnungszustandes der Stratum corneum-Lipide zurückzuführen ist (Neubert et al., 1996). Als weitere Enhancer seien Terpene (z. B. 1,8-Cineol) sowie Fettsäuren (z. B. Ölsäure) und deren Derivate (z. B. Isopropylmyristat) genannt.

Physikalische Methoden können den Hautzustand in einem größeren Ausmaß verändern und werden daher eher für die transdermale Anwendung genutzt. Die Iontophorese, bei der durch Anlegen eines Gleichstromes eine erhöhte Migration von geladenen Arzneistoffen durch die Haut erreicht wird, findet bereits Anwendung in zugelassenen Fertigarzneimitteln (z. B. Ionsys<sup>®</sup> mit Fentanyl, LidoSite<sup>®</sup> mit Adrenalin und Lidocain, Stevenson et al., 2005). Als Phonophorese wird der Arzneistofftransport durch lebendes Gewebe mit Hilfe von Ultraschall bezeichnet (Neubert et al., 1996). Während sich diese beiden Methoden auf die Applikation kleiner Wirkstoffmoleküle beschränken, soll mit folgenden Verfahren die transdermale Permeation auch von Makromolekülen und Impfstoffen ermöglicht werden. Durch kurze Hochspannungs-

pulse (Elektroporation) oder Erhitzen der Hautoberfläche auf über 100 °C für Milli- bzw. Mikrosekunden („Thermal ablation“) werden temporär Poren in der Haut gebildet, welche die Arzneistoffe passieren können (Tanner et al., 2008, Prausnitz et al., 2008). Zudem kann das Stratum corneum durch Verwendung sogenannter Mikronadeln punktiert werden. Dabei können die Nadeln auch mit dem Arzneistoff gefüllt oder mit diesem überzogen sein (van der Maaden et al., 2012).

Während Hydrogele, Lipogele, Emulsionen und Cremes als „Standardgrundlagen“ für topische Arzneiformen dienen, sollen amphiphile Vehikelsysteme wie z. B. Mikroemulsionen, Liposomen und flüssigkristalline Zubereitungen (Neubert et al., 1996) sowie niedermolekulare, organische Gele (Vintiloiu et al., 2007) penetrationsverbessernde Wirkungen besitzen.

Mikroemulsionen stellen dabei thermodynamisch stabile, optisch isotrope Mischungen aus einer lipophilen Phase, einem Tensid, einem Cotensid und Wasser dar (Ritika et al., 2012). Sie zeichnen sich durch ein hohes Solubilisationsvermögen gegenüber schwerlöslichen Substanzen und folglich durch eine erhöhte thermodynamische Aktivität aus (Neubert, 2011). Die Lipidbilayerstrukturen des Stratum corneum können sowohl durch die enthaltenen Tenside und Cotenside als auch durch einen Hydratisierungseffekt bei ausreichend hohem Wassergehalt verändert werden. Die einfache Herstellung und gute Langzeitstabilität sind weitere Vorteile dieses Trägersystems (Neubert, 2011).

Liposomen sind kugelförmige Vesikel, die aus einer oder mehreren Lipidbilayerschichten aufgebaut sind und eine Größe von wenigen Nanometern bis in den Mikrometer-Bereich einnehmen können. Wesentliche Bestandteile sind häufig Phospholipide und Cholesterol (Neubert et al., 1996). Liposomen können sowohl zur Bildung eines Wirkstoff-Depots in der oberen Hautschicht und somit zur Reduzierung systemischer Nebenwirkungen genutzt werden als auch zur gezielten transdermalen Applikation dienen. Welche dieser Funktionen ausgeübt wird, ist von der Zusammensetzung und vom Aufbau der Liposomen abhängig (El Maghraby et al., 2006). Bis heute ist ungeklärt, ob sie das Stratum corneum als intakte Vesikel penetrieren oder ob ihre Lipide in die Bilayerstrukturen des Stratum corneum inkorporiert werden. Arzneistoffe, die bereits in liposomaler Form topisch appliziert werden, sind z. B. Heparin und Diclofenac-Na (Neubert, 2011).

Weiterhin werden derzeit Nanopartikel als Trägersystem mit gesteigerter Hautpenetration erforscht. Diese können aus natürlichen, halbsynthetischen und

synthetischen Polymeren sowie Lipiden bestehen. Da sie hauptsächlich über die folliculäre Route penetrieren, könnte mit ihnen ein Targeting zu haarfollikelassoziierten Zellpopulationen, wie Immun- und Stammzellen realisiert werden (Knorr et al., 2009). Weitere mögliche Vehikelsysteme zur topischen Applikation sind flüssigkristalline Zubereitungen sowie niedermolekulare, organische Gele.



## 2.3 Flüssigkristalline Zubereitungen

Die Begriffserklärung des „Flüssigkristalles“ (FK) erfordert zunächst die Betrachtung der reinen kristallinen und flüssigen Aggregatzustände. Ein kristalliner Festkörper besitzt eine wohlgeordnete Struktur. Sein Kristallgitter beschreibt die Fernordnung der Position der Gitterbausteine. Besitzen diese Gitterbausteine (Moleküle) eine von der Kugel abweichende Gestalt, werden sie aus Packungsgründen auch eine definierte Orientierung aufweisen. Somit liegen sowohl Positionsfernordnung als auch Orientierungsfernordnung vor, die dem Kristall einige seiner typischen Eigenschaften, wie z. B. die hohe mechanische Festigkeit und die Doppelbrechung, verleihen (Hiltrop, 1999a). Ein klassischer Kristall besitzt zudem auch Positions- und Orientierungsordnung im Nahbereich (Abbildung 2.5 I). Eine isotrope Flüssigkeit hingegen zeigt im Fernbereich keine Ordnung, im Nahbereich kann noch Positions- und eventuell Orientierungsordnung vorliegen (Abbildung 2.5 II). Dadurch ist die Flüssigkeit sehr beweglich und nicht doppelbrechend (Müller-Goymann, 1998b). Die betrachteten Fernordnungen können auch unabhängig voneinander auftreten. Liegt Positionsfernordnung ohne Orientierungsfernordnung vor, spricht man von sogenannten „Plastischen Kristallen“, die für Stoffe zu erwarten sind, deren Molekülgestalt nicht allzu stark von der Kugel abweicht (z. B. Tetrachlorkohlenstoff) (Hiltrop, 1999a).

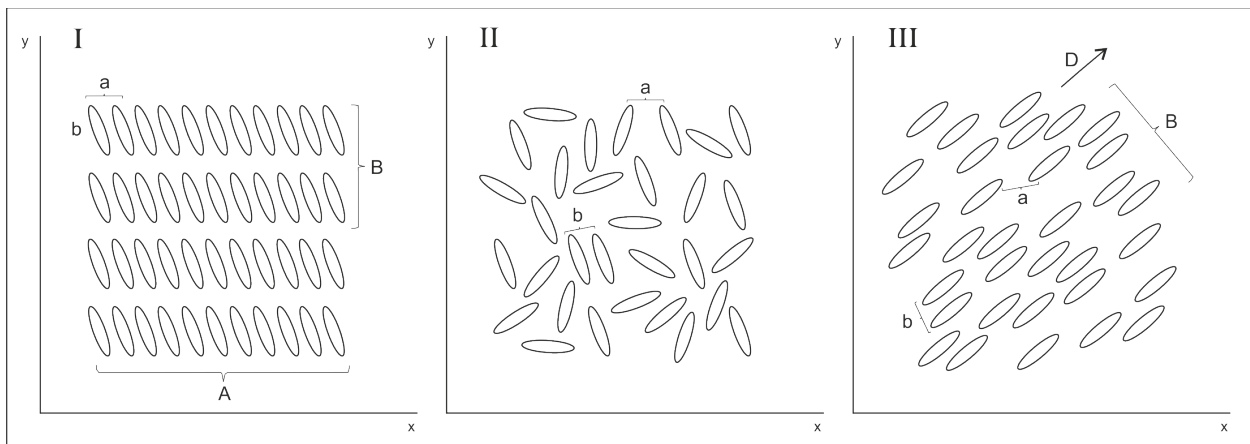
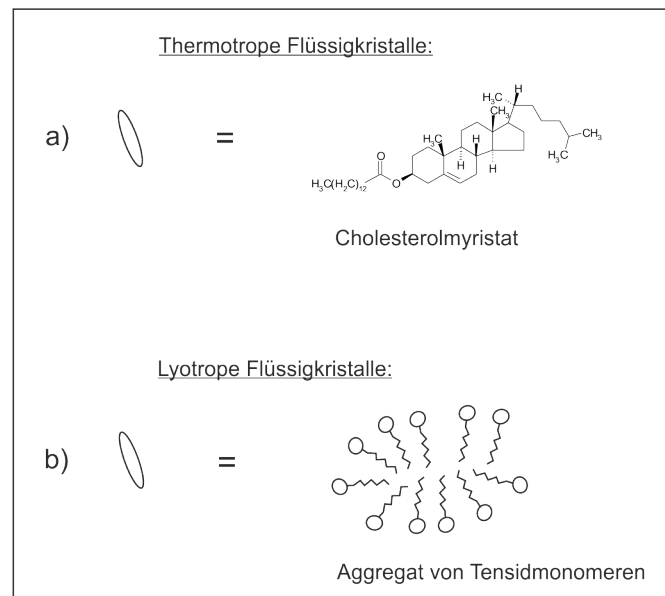


Abbildung 2.5: Zweidimensionale Ordnung im Nah- ( $a,b$ ) und Fernbereich ( $A, B$ ) für Strukturbausteine im I) kristallinen, II) flüssigen und III) flüssigkristallinen Zustand, nach Müller-Goymann (1998b)

Im Falle der vorliegenden Orientierungsfernordnung und der fehlenden bzw. teilweise fehlenden Positionsfernordnung liegt der flüssigkristalline Aggregatzustand vor. Mit der Existenz einer einheitlichen Vorzugsrichtung  $D$  der Strukturbausteine (siehe Abbildung

2.5 III) ist die physikalische Eigenschaft der Doppelbrechung begründet. Die Fluidität dieser Phase beruht hingegen auf dem Fehlen der Positionsfernordnung (Hiltrop, 1999a und Wilisch et al., 1993). Aufgrund des Zwischenzustandes der flüssigkristallinen Phasen werden diese auch als Mesophasen bezeichnet (Müller-Goymann, 1998b). Ausgehend vom kristallinen Zustand können die Flüssigkristalle entweder durch Temperaturerhöhung oder durch Zugabe eines Lösungsmittels entstehen. Man unterscheidet daher zwischen thermotropen und lyotropen Flüssigkristallen (Müller-Goymann, 2004). Im Fall der thermotropen Mesophasen werden die mesogenen Phasenbausteine durch einzelne, recht kleine Moleküle realisiert (siehe Abbildung 2.6), wie z. B. durch Cholesterylmyristat (Bunjes et al., 2005).



**Abbildung 2.6:** a) anisometrische Moleküle als Strukturbausteine thermotroper FK  
 b) anisometrische Molekülaggregate als Strukturbausteine lyotroper FK  
 (eigene Darstellung nach Hiltrop (1999a) und Bunjes et al. (2005))

Voraussetzung für die Mesogenität dieser Moleküle ist die von der Kugel abweichende Gestaltform, die sich sowohl in der Stäbchen- (calamatisch), als auch in der Scheibchenform (discotisch) verwirklichen lässt. Abbildung 2.7 zeigt mögliche Modelle thermotroper Flüssigkristalle. Bei den calamatischen Phasen sind die stäbchenförmigen Moleküle in Richtung ihrer Längsachse parallel zueinander orientiert. Während in nematischen und cholesterischen Phasen ausschließlich Orientierungsfernordnung vorhanden ist, sind in smektischen Mesophasen die parallel orientierten Stäbchen zusätzlich in Schichten angeordnet und zeigen somit auch Positionsfernordnung in mindestens einer Dimension. Bei scheibchenförmigen Molekülen können prinzipiell

## 2.3 Flüssigkristalline Zubereitungen

Mesophasen mit ähnlichen Strukturmerkmalen aufgebaut werden. Jedoch werden anstelle der smektischen Phasen Säulen durch übereinandergeschichtete Scheibchen gebildet, die sich sowohl rechteckig als auch hexagonal ausrichten können (Müller-Goymann, 1998b).

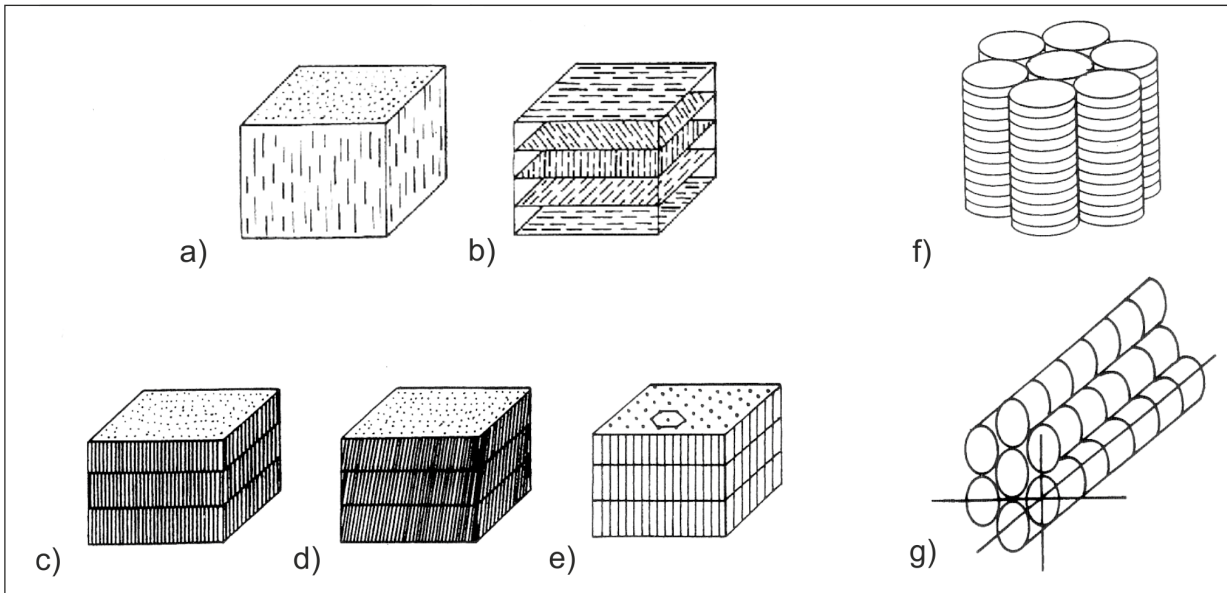


Abbildung 2.7: Modelle thermotroper Flüssigkristalle: calamatische Mesophasen a-e a) nematisch, b) cholesterisch, c-e) smektisch des Typs A, C und B und discotische Mesophasen f und g f) columnar hexagonal senkrecht, g) columnar hexagonal gekippt nach Müller-Goymann (1998b)

Die notwendigen Strukturbausteine zur Ausbildung von Flüssigkristallen sind jedoch nicht auf Einzelmoleküle beschränkt. Unter bestimmten Voraussetzungen kann sich in Lösung eine Anzahl von Molekülen zu Aggregaten assoziieren (siehe Abbildung 2.6), welche auch eine nicht kugelige Form annehmen können und somit ebenfalls als mesogene Phasenbausteine anzusehen sind (Hiltrop, 1999a). In Abhängigkeit von der Mesogenkonzentration, der Lipophilie bzw. Hydrophilie des Lösungsmittels und des Mesogens sind verschiedene Mesophasen möglich (siehe Abbildung 2.8), die jedoch nicht alle auftreten müssen (Müller-Goymann, 2004). Ausgehend von einer monomeren Tensidlösung folgt oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) die Ausbildung von Kugelmizellen. Nimmt die Anzahl dieser kugeligen Aggregate zu, kann deren gegenseitige Abstoßung zur Entstehung einer Positionsfernordnung führen, womit eine kubische Phase vorliegt. Bei weiterer Erhöhung der Tensidkonzentration müssen die Tensidaggregate zunehmend anisometrisch werden, sodass zunächst stäbchenförmige Aggregate (hexagonale Phase) und schließlich die lamellare Phase

von Tensiddoppelschichten ausgebildet werden (Hiltrop, 1999b). Je nach Polarität des solvatisierenden Agens und des Mesogens können die polaren Gruppen der Tensidmoleküle in bestimmten Mesophasen nach außen (hexagonal, kubisch Typ I) oder nach innen (invers hexagonal, kubisch Typ IV) angeordnet sein (Bunjies et al., 2005). Daneben gibt es weitere bikontinuierliche Phasen, die als Übergangphasen zwischen den lamellaren und hexagonalen bzw. invers hexagonalen Zuständen gelten (kubisch Typ II und III) (Müller-Goymann, 1998b).

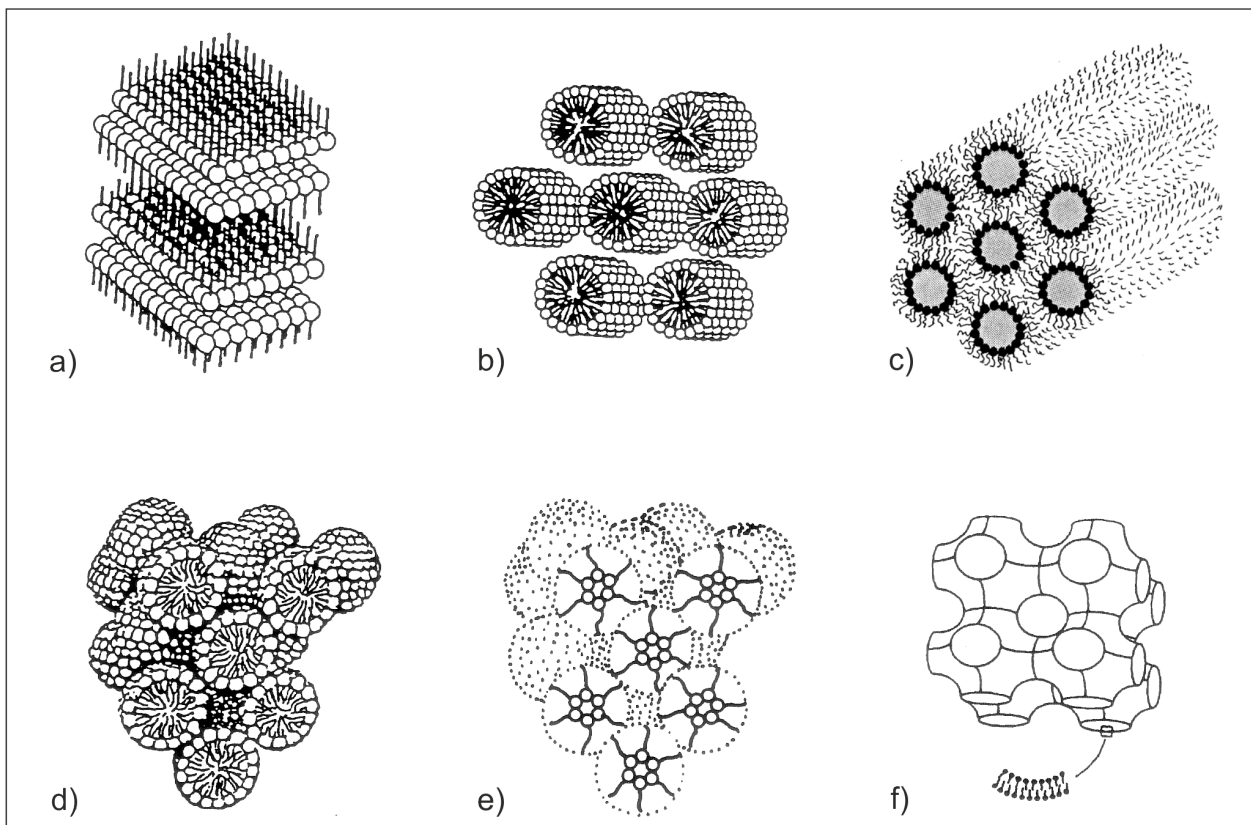


Abbildung 2.8: Modelle lyotroper Flüssigkristalle: a) lamellar, b) hexagonal, c) invers hexagonal, d) kubisch Typ I, e) invers kubisch Typ IV, f) kubisch Typ II; nach Müller-Goymann (1998b) und Seddon et al. (1995)

Eine strikte Trennung zwischen thermotropen und lyotropen Flüssigkristallen ist nicht möglich, da insbesondere lyotrope Flüssigkristalle auch thermisch induzierte Phasenumwandlungen aufweisen (Müller-Goymann, 1998b).

Der Einsatz flüssigkristalliner Systeme in der Pharmazie beruht im Wesentlichen auf ihrer Eigenschaft, verschiedenste Moleküle in hohen Konzentrationen zu lösen (Guo et al., 2010). Zudem sind sie in der Lage, die Hautpermeation positiv zu beeinflussen (Yamada et al., 2011, Costa-Balogh et al., 2008, Wilisch et al., 1993) und eine kontrollierte, verlangsamte Arzneistofffreisetzung zu erzielen (Bunjes et al., 2005). Die Anwendung ist dabei keinesfalls auf topische Arzneiformen beschränkt, auch wenn zahlreiche Beispiele aus diesem Bereich genannt werden können. Flüssigkristalline Tensidgele (z. B. Trauma-Dolgit<sup>®</sup> Gel, Wirkstoff Ibuprofen) stellen reine Flüssigkristalle dar, die sowohl durch ihre kolloidale Struktur als auch durch ihren hohen Tensidgehalt die Hautpermeation verbessern. Aufgrund der hohen Tensidkonzentration und des damit verbundenen hohen irritativen Potentials finden sie nur selten Anwendung in der direkten topischen Applikation. Vielmehr werden sie aufgrund ihrer ausgeprägten Solubilisationsfähigkeit als Reservoir für Transdermale Therapeutische Systeme (in Pflasterform) genutzt (Müller-Goymann, 1999). Zudem lässt sich über die Art der flüssigkristallinen Phase und der damit verbundenen Viskosität die Geschwindigkeit der Arzneistofffreigabe regulieren (Costa-Balogh et al., 2008). Häufiger finden sich flüssigkristalline Strukturen in Mehrphasensystemen. Während Tensidmoleküle in Salben ein flüssigkristallines, strukturgebendes Gerüst ausbilden können (z. B. durch Cetylalkohol oder Stearylalkohol), adsorbieren sie in Cremes an der Phasengrenze und können dort bei genügender Konzentration mehrere, übereinandergelagerte Schichten formen. Dadurch werden die Emulsionstropfen sowohl mechanisch als auch durch die reduzierte Grenzflächenspannung stabilisiert (Müller-Goymann, 1998b). So konnte z. B. eine adsorbierte flüssigkristalline Lamellarphase an der Phasengrenze zwischen dispergierten Öltröpfchen und der kontinuierlichen Hydrogelphase im Voltaren<sup>®</sup> Emulgel beobachtet werden. Der Wirkstoff Diclofenac kann dadurch aus seinem Depot in der lipophilen Phase langsam durch die multilamellare Grenzschicht diffundieren (Müller-Goymann, 1998a). Neben diesen genannten Systemen, gibt es ebenso Arzneiformen, die erst bei Applikation durch Wechselwirkung mit Körperflüssigkeiten oder Entweichen flüchtiger Bestandteile Flüssigkristalle ausbilden. Das zur Parodontitisbehandlung eingesetzte Elyzol<sup>®</sup> Dentalgel enthält suspendiertes Metronidazolbenzoat in einem Oleogel. Die Gerüststruktur des Geles wird durch Glycerolmonooleat gebildet. Es schmilzt bei Körpertemperatur und kann folglich gut auf dem Zahnfleisch spreiten. Durch Wasseraufnahme erfolgt der Übergang in eine invers hexagonale Phase, die eine hohe Viskosität aufweist und daher eine gute Haftung auf der

Schleimhautoberfläche sowie eine langsame Freigabe des Arzneistoffes hervorbringt (Müller-Goymann, 1998a). Da schätzungsweise 5% aller organischen Substanzen thermotrope Flüssigkristalle bilden können, ist es bei der strukturellen Vielfalt pharmazeutischer Wirkstoffe nicht verwunderlich, dass viele Arzneistoffmoleküle selbst die Fähigkeit zum Mesomorphismus besitzen. Sofern der flüssigkristalline Zustand bei Raumtemperatur stabil ist bzw. stabilisiert werden kann, zeigen entsprechende Arzneistoffe häufig verbesserte Löslichkeit, Bioverfügbarkeit sowie Stabilität (Stevenson et al., 2005). Bekannte Beispiele dafür sind Fenopfen, Itraconazol, Methotrexat sowie Dinatriumcromoglicat und Ciclosporin (Stevenson et al., 2005, Bunjes et al., 2005, Müller-Goymann, 1999).

## 2.4 Niedermolekulare organische Gelsysteme

Ein weiteres neuartiges Vehikelsystem mit verbesserten Permeationseigenschaften stellt das niedermolekulare organische Gelsystem dar, welches im folgenden Abschnitt näher erläutert werden soll.

Ein Gel ist definiert als ein bikontinuierliches System, das aus gelierten Flüssigkeiten und geeigneten Quellmitteln besteht (Voigt et al., 2000). Je nach Art der flüssigen Komponente kann dabei zwischen Hydro- und Organogelen unterschieden werden (siehe Abbildung 2.9). Die üblichen, bekannten Gelbildner organischer Lösungsmittel sind polymere Moleküle, die sowohl natürlichen, halbsynthetischen als auch synthetischen Ursprungs sein können. Die Ausbildung der Gelgerüststruktur kann durch chemische oder physikalische Wechselwirkungen erfolgen und resultiert entweder in einer Quervernetzung oder nur in einer Verwicklung von Polymerketten (Vintiloiu et al., 2007). Ist die Molekülgröße des Gelbildners kleiner als 2000 Da, so gehört er zu den niedermolekularen Gelbildnern (LMOG - low molecular organic gelator) (Weiss et al., 2006). Die Moleküle dieser Gelbildner assoziieren sich derart, dass sie lange, fibrilläre Aggregate bilden und somit ein verzweigtes, dreidimensionales Netzwerk aufbauen, in dem die flüssige Komponente durch Oberflächenspannung und Kapillarkräfte immobilisiert ist (Sangeetha et al., 2005).

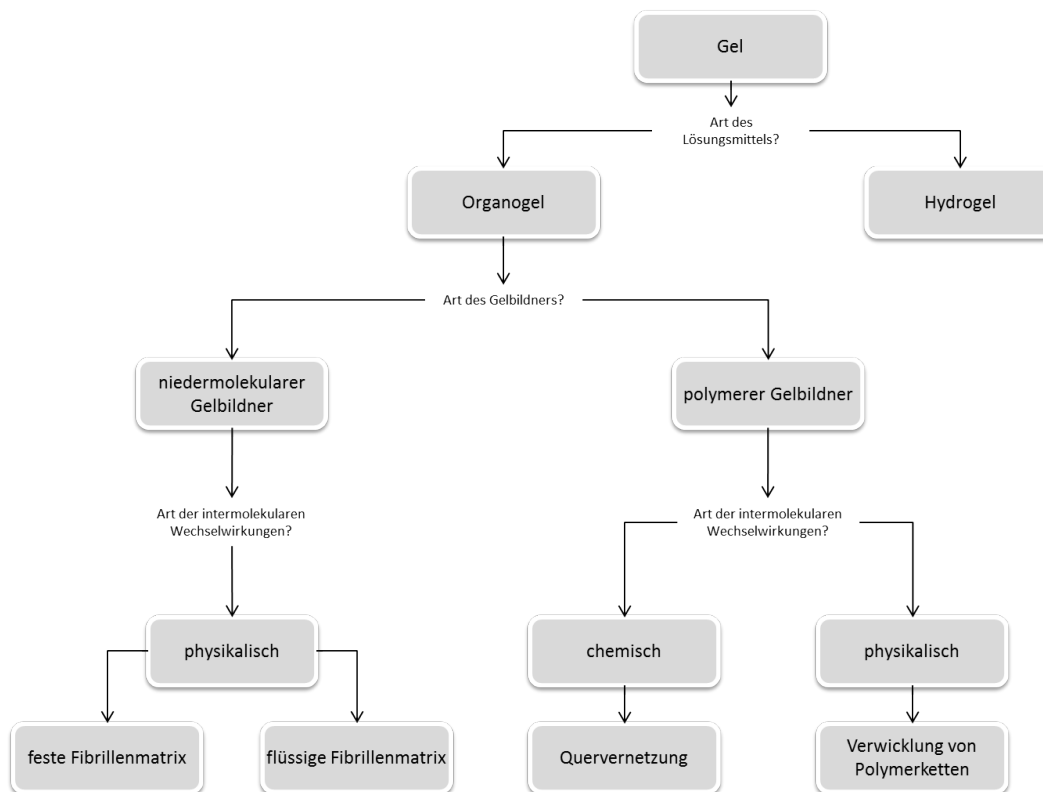


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Gelklassifizierung (nach Vintiloiu et al., 2007)

Die Herstellung solcher supramolekularer Gele erfolgt üblicherweise durch Erwärmen und Lösen des Gelbildners in einer organischen Flüssigkeit und anschließender Abkühlung unterhalb einer bestimmten Gelierungstemperatur (Terech et al., 1997). Der Prozess kann jedoch auch mechanisch oder durch Bestrahlung beeinflusst werden (Weiss et al., 2006). In Abhängigkeit der kinetischen Eigenschaften der Molekülaggregate wird zwischen Gelen mit einem festen, starken Netzwerk und einem flüssigen, schwachen Netzwerk unterschieden. In Abbildung 2.10 soll dieser Unterschied verdeutlicht werden. Die fibrillären Strukturen in den starken Netzwerken sind sehr robust und von permanenter Morphologie. Ihre Verbindungspunkte stellen relativ große kristalline Bereiche dar. Abweichend davon unterliegen die Aggregate der schwachen Gele einem dynamischen Austausch einzelner Gelbildnermoleküle, d. h. sie sind charakterisiert durch ständigen Zerfall und Wiedervereinigung der fädenartigen Strukturen. Ihre Verbindungsstellen sind einfache Kettenverwicklungen (Vintiloiu et al., 2007).

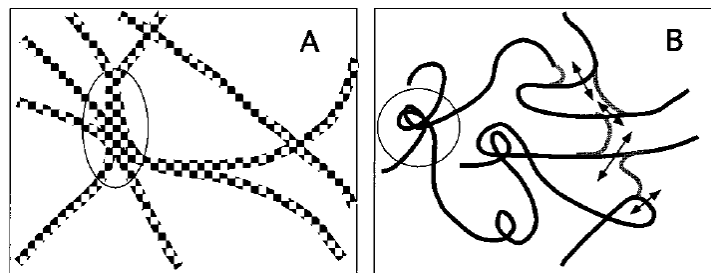
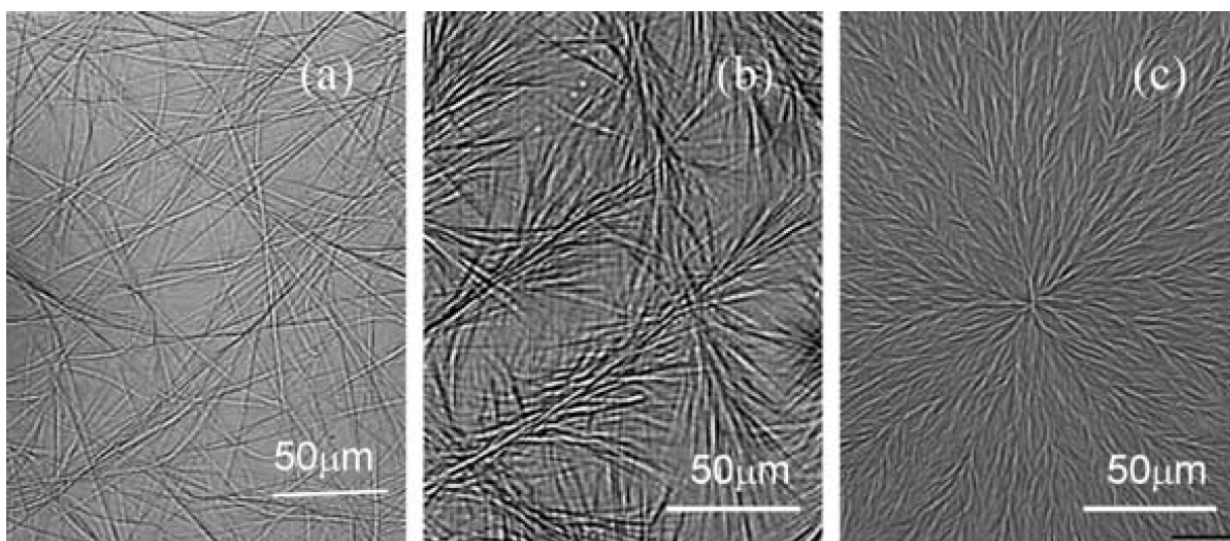


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Verbindungsstellen in festen fibrillären Netzwerken (A) und in flüssigen fibrillären Netzwerken (B) (Terech et al., 1997)

Nach George et al. (2006) erfolgt das Zusammenlagern der Moleküle innerhalb eines Aggregates durch schwache, nicht kovalente Bindungen (Dispersionskräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Kräfte und  $\pi$  -  $\pi$  - Wechselwirkungen). Nach welchem Mechanismus die Fibrillenbildung tatsächlich abläuft, ist zur Zeit noch ungeklärt. Es scheint jedoch der normale Kristallisationsprozess des Gelatormoleküls gestört zu sein. Während eine normale Kristallisation zu zwei- oder dreidimensionalen Objekten führt, zeigen die fibrillären Strukturen ein enorm verstärktes Wachstum in der einen Achse und abgeschwächtes Wachstum in der anderen Achse (George et al., 2006). Es resultieren Strukturen mit einem großen Länge-zu-Dicke-Verhältnis (aspect ratio) mit einer Dicke von wenigen Nanometern und einer Länge bis zu mehreren Millimetern (Vintiloiu et al., 2007). Die Aggregate können dabei die Form von Fäden,



Bändern oder Röhren annehmen und aufgrund ihrer extremen Länge zudem gebeugt sein (Weiss et al., 2006). Ab einer bestimmten Gelbildnerkonzentration liegen diese Strukturen nicht mehr separat vor. Sie überlappen und behindern sich gegenseitig in ihrer Bewegung und bilden dadurch verzweigte Netzwerke (Terech et al., 1997). Laut Liu (2005) können die fibrillären Aggregate in einigen Fällen auch Verzweigungen aufweisen, deren Winkel von der Konzentration des Gelbildners abhängig sind (siehe Abbildung 2.11).



*Abbildung 2.11: Mikroskopische Abbildungen fibrillärer Netzwerke von Laurylglutaminsäure-dibutylamid in Propylenglykol mit steigender Gelbildnerkonzentration, a) unverzweigte Fibrillen, b) Fibrillen mit kleinem Verzweigungswinkel und c) Fibrillen mit großem Verzweigungswinkel (Liu, 2005)*

Die Bildung von Molekülassoziaten erfordert ein subtiles Gleichgewicht zwischen bestimmten Parametern, die einerseits die Löslichkeit des Gelbildners gewährleisten und andererseits das axiale Wachstum auslösen. Der Zusammenhang zwischen der molekularen Struktur des LMOG und der Fähigkeit entsprechende stäbchenartige Strukturen zu bilden, ist bislang noch nicht geklärt. Viele Faktoren, wie z. B. sterische Effekte, Steifheit und Polarität eines Moleküls beeinflussen dessen Aggregationstendenz (Vintiloiu et al., 2007). Zudem spielt die Art des Lösungsmittels und dessen Polarität eine wesentliche Rolle (Terech et al., 1997). Die bisher entdeckten niedermolekularen Gelbildnermoleküle stellen u. a. Derivate aus den Gruppen der Fettsäuren, Aminosäuren, Steroide, organischen Metallverbindungen sowie der Amid- und Harnstoffverbindungen dar (Vintiloiu et al., 2007). In einer Untergruppe der Steroide, den Cholesterol-Derivaten, konnte gezeigt werden, dass das

Cholesterolemolekül selbst die Aggregation durch van der Waals-Kräfte induziert, während die zugeführten Substituenten die Fibrillen durch Wasserstoffbrückenbindung und  $\pi$  -  $\pi$  - Wechselwirkungen stabilisieren. Zudem ist die Hydroxylgruppe in Position C3 für den Gelierungsprozess essentiell, da sie an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt ist (Vintiloiu et al., 2007).

Die Charakterisierung entsprechender Systeme erfolgt u. a. mit Methoden, die bereits für die Untersuchung flüssigkristalliner Phasen genannt wurden. So kann das fibrilläre Netzwerk mittels verschiedener mikroskopischer Methoden, wie der Licht-, Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie sichtbar gemacht werden (Dastidar, 2008). Rheologische Messungen ermöglichen eine Unterscheidung zwischen starken und schwachen Gelen, da die schwach ausgebildeten Netzwerke nicht die Anforderungen eines „echten“ Geles erfüllen. Zudem kann mit Hilfe thermodynamischer Messungen der Gelpunkt bestimmt werden. Die Röntgendiffraktometrie und Photonenkorrelationsspektroskopie ermöglichen weitere Strukturuntersuchungen (Terech et al., 1997).

Neben zahlreichen technischen Anwendungsmöglichkeiten niedermolekularer Gele wird derzeit ihre Eignung als Vehikelsysteme für die Arzneistoff-Freisetzung erforscht. Der mögliche Einsatz entsprechender Organogele in topischen Arzneiformen wird mit folgenden Vorteilen begründet:

- die enthaltenen Komponenten sind häufig Penetrationenhancer,
- die Systeme lassen sich einfach herstellen,
- die flüssigen Komponenten besitzen gutes Lösevermögen für Arzneistoffe,
- die Formulierung zeigt gute Solubilisierungseigenschaften.

Meist ist eine entsprechende Anwendung jedoch aufgrund fehlender Informationen zur Toxizität und Biokompatibilität des Gelbildners nicht möglich (Vintiloiu et al., 2007). Dies ist nicht der Fall bei Verwendung von Lecithin als LMOG. Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit und der Fähigkeit, verschiedenste Arzneistoffe zu solubilisieren sowie die Hautpermeabilität zu verbessern, wird den durch Lecithin gelierten Gelen großes Interesse als „new drug delivery systems“ entgegengebracht. Daher gehören sie zu den am besten untersuchten Organogelen (Vintiloiu et al., 2007). Sie repräsentieren den Typ der „schwachen“ Gele mit nur leicht ausgebildeten Strukturen. Der Mechanismus der Gelbildung ist schematisch in Abbildung 2.12 dargestellt. Ausgehend von einer invers mizellaren Lösung von Lecithin in einem organischen Lösungsmittel wird durch

## 2.4 Niedermolekulare organische Gelsysteme

Zugabe bestimmter Mengen eines polaren Lösungsmittels (meist Wasser) das uniaxiale Wachstum der Mizellen induziert, sodass lange flexible, röhrenartige Aggregate entstehen. Ab einer bestimmten Länge überlappen und verwickeln sich diese und bilden ein dreidimensionales Netzwerk aus. Es wird vermutet, dass durch die geringe Größe der mizellaren Einheiten eine direkte Interaktion mit den Hautlipiden stattfinden kann und somit eine verbesserte Permeation von Arzneistoffen durch die Haut erreicht wird (Kumar et al., 2005).

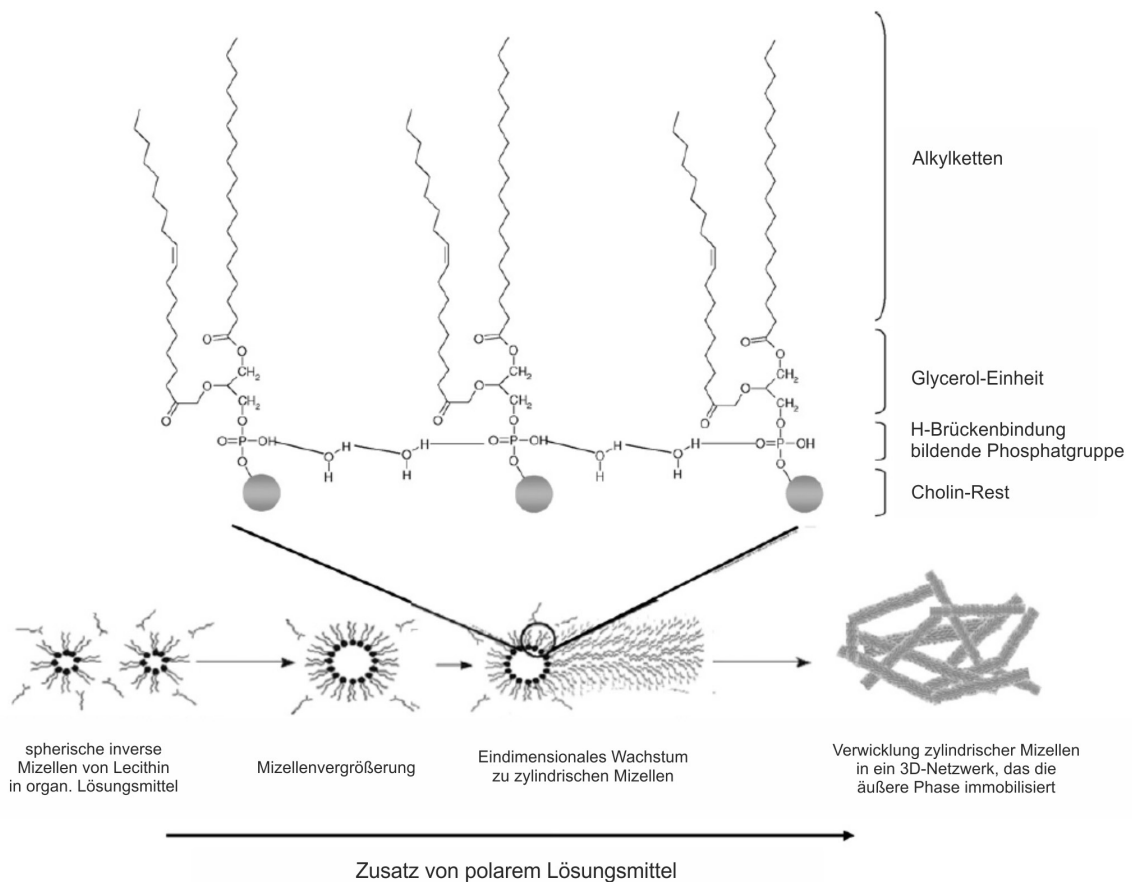


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes aus zylindrischen inversen Mizellen von Lecithin in einem organischen Lösungsmittel (Vintiloiu et al., 2007)

## 3 MATERIAL

### 3.1 Flüssigkristallines System

Das in dieser Arbeit untersuchte flüssigkristalline System besteht primär aus Cholesterol und Propylenglykol. Um das System zu stabilisieren und dessen Verhalten in anderen Vehikeln zu untersuchen, wurden weitere Hilfsstoffe eingesetzt. Die Eignung anderer Glykole bzw. Alkohole als flüssige Komponente und der Ersatz des Cholesterols durch  $\beta$ -Sitosterol wurde ebenfalls erprobt.

#### 3.1.1 Cholesterol

Cholesterol ist das Hauptsteroid der Wirbeltiere und Menschen und Bestandteil der Zellmembranen aller Gewebe. Es ist die biogenetische Vorstufe für Steroidhormone, Gallensäuren und Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>). Es wird im tierischen Organismus sowohl de novo synthetisiert als auch mit der Nahrung aufgenommen. Cholesterol wird primär durch Lösemittelextraktion aus dem Gehirn und Rückenmark von Rindern oder aus Wollfett gewonnen. Je nach Herkunft kann es daher mit zahlreichen Begleitsteroiden verunreinigt sein (Kommentar zur Ph. Eur., 2012).

Laut Monographie des Europäischen Arzneibuchs 7.0 enthält Cholesterol mindestens 95% Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol und maximal 5% verwandte Steroide. (Ph. Eur., 2011)

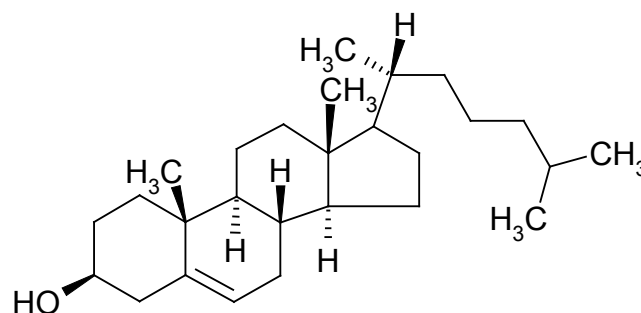


Abbildung 3.1: Strukturformel Cholesterol (Ph. Eur., 2011)

Cholesterol wird aufgrund seiner emulgierenden Eigenschaften als W/O-Emulgator in Konzentrationen von 0,3 bis 5% in verschiedenen pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen eingesetzt. Da Cholesterol gut verträglich ist (Liebert, 1986), kann es auch für innerlich anzuwendende Arzneiformen und Augensalben verwendet werden. Zudem ist es in der Lage, Liposomenmembranen zu stabilisieren und ist daher auch in liposomalen Zubereitungen sowohl zur parenteralen als auch zur topischen Anwendung

### 3.1 Flüssigkristallines System

---

enthalten (Fiedler, 2010). Cholesterol ist ein weißes bis fast weißes, kristallines Pulver, das praktisch unlöslich in Wasser und wenig löslich in Aceton und Ethanol 96% ist (Kommentar zur Ph. Eur., 2012).

Bisher werden in der Literatur drei pseudopolymorphe Formen des Cholesterols beschrieben. Das Cholesterolanhydrat (ChA) weist eine typische nadelförmige Kristallstruktur auf (Abbildung 3.2) und besitzt einen enantiotropen Phasenübergang nahe der Körpertemperatur bei ca. 37 °C bis 39 °C (Loomis et al., 1979, Spier et al., 1965), welcher wahrscheinlich auf einen Konfigurationswechsel der Seitenkette zurückzuführen ist (Hsu et al., 1983, Bhujle et al., 1983). Das ChA kristallisiert aus wasserfreien, übersättigten Lösungen z. B. aus Acetonitril, Aceton und Methanol. Bei Anwesenheit von  $\geq 5\%$  Wasser kristallisiert Cholesterol aus Ethanol oder Acetonitril als Monohydrat, welches einen typischen plättchenartigen Kristallhabitus aufweist (Garti et al., 1981). In einem geschlossenen System und Anwesenheit von Wasser erfolgt bei ca. 86 °C die Dehydratisierung zu ChA, welches anschließend bei ca. 120 °C in eine flüssigkristalline Phase über geht, die bis zum Schmelzpunkt von ca. 150 °C stabil ist (Loomis et al., 1979). Craven beschreibt die Kristallstruktur des Cholesterolmonohydrates mit einem tunnelartigen Einbau des Wassers im Kristallgitter und begründet damit die Instabilität des Monohydrates bei Raumbedingungen (Craven, 1976). Zusätzlich wird das Cholesterolhemiethanolat beschrieben, das durch Fällung aus wasserfreiem Ethanol erhalten werden kann (Garti et al., 1981).

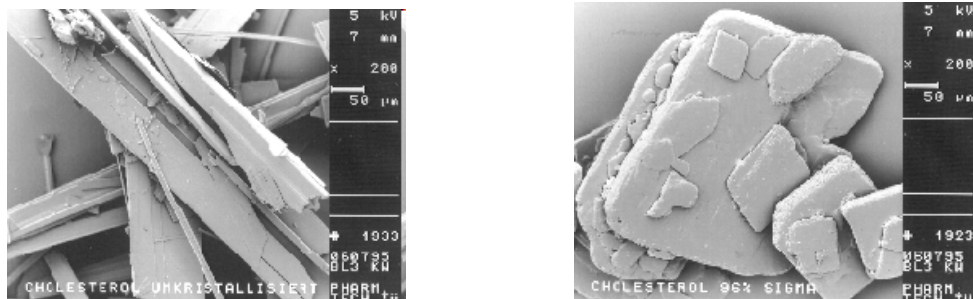


Abbildung 3.2: *Habitus von Cholesterol-Anhydrat (links) und Cholesterol-Monohydrat (rechts) (Fiedler, 2010)*

### 3.1.2 Propylenglykol

Propylenglykol ist eine farblose, klare und hygroskopische Flüssigkeit mit einer Viskosität von 56,0 mPa\*s bei 20 °C (Fiedler, 2010). Es besitzt einen Schmelzpunkt bei -60 °C und einen Siedepunkt bei 188 °C (Kommentar zur Ph. Eur., 2012). In den Monographien des Ph. Eur. und der USP ist das Racemat (RS)-Propan-1,2-diol beschrieben. Während die Ph. Eur. keine Gehaltsangabe macht, legt die USP diese mit 99,5% fest (USP, 2012; Ph. Eur., 2011). Aufgrund seiner multifunktionellen Eigenschaft wird Propylenglykol in zahlreichen pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen, aber auch in Lebensmitteln und Haushaltsprodukten, eingesetzt. So dient es beispielsweise in oralen Lösungen und Injektionspräparaten vorwiegend als Lösemittel bzw. Cosolvens. In überzogenen Arzneiformen wird es als Weichmacher der polymeren Filmüberzüge genutzt. In Zubereitungen zur topischen Anwendung dient es u. a. als Feuchthaltemittel und ab Konzentrationen von 15% bis 20% (bezogen auf die Wasserphase) wirkt es konservierend. In geringeren Konzentrationen vermag Propylenglykol die Wirkung konventioneller Konservierungsmittel zu verbessern (Kommentar zur Ph. Eur., 2012). Dass die in dieser Arbeit verwendeten hohen Einsatzkonzentrationen von Propylenglykol von praktischer Relevanz sind, zeigt die Inactive-Ingredients-Liste<sup>1</sup> der FDA, welche eine topische Gelformulierung mit einem Propylenglykol-Gehalt von 98,09% aufführt.

Entgegen älteren Berichten scheint Propylenglykol nur ein sehr geringes Sensibilisierungspotential zu besitzen (Lessmann et al., 2005), was vermutlich auf Qualitätsverbesserung und Eliminierung von Verunreinigungen zurückzuführen ist (Lautenschläger, 2005). Ob es eine eigene penetrationsfördernde Potenz oder nur als Cosolvens synergistische Wirkung zeigt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Häufig agiert Propylenglykol nur als Lösungsmittel und überführt den Wirkstoff in eine gesättigte Lösung, woraus eine gesteigerte Freisetzung und somit eine gesteigerte Absorption resultiert. Wird der Propylenglykol-Anteil weiter erhöht, steigt die Wirkstofflöslichkeit auf Kosten der Hautpermeation (Ziegenmeyer, 1992). Barry untersuchte die Interaktion von Propylenglykol mit der Humanhaut mittels thermodynamischer Messungen und Penetrationstests und schlussfolgert, dass es als Penetrationenhancer agieren kann. Als Mechanismus nennt er Solvatationseffekte des Propylenglykols auf Keratine, wodurch Bindungsmöglichkeiten für entsprechende

---

<sup>1</sup> Die Inactive-Ingredients-Liste der FDA gibt Informationen über Hilfsstoffe, die in durch die FDA zugelassenen Produkten enthalten sind.

### 3.1 Flüssigkristallines System

---

Wirkstoffe im Gewebe reduziert werden. Einen Effekt auf die Lipidstruktur des Stratum corneum konnte er jedoch nicht feststellen (Barry, 1987). Bendas et al. belegen eine penetrationsfördernde Wirkung des Propylenglykols für Hydrocortison durch konvektiven Transport. Darunter ist die Bewegung der Arzneistoffmoleküle mit dem Lösungsmittelfluss in das Akzeptormedium zu verstehen (Bendas et al., 1995).

## 3.2 Weitere Hilfsstoffe

### 3.2.1 Glykole und andere Alkohole

Als flüssige Komponente des halbfesten Systems wurden neben Propylenglykol Ethandiol, 1,2-Butandiol, 1,2-Pentandiol sowie 1,2-Hexandiol und 1,7-Heptandiol verwendet. Die Glycole der Kettenlänge C<sub>4</sub> bis C<sub>6</sub> werden häufig in halbfesten pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen als Feuchthaltemittel und antimikrobiell wirksame Stoffe eingesetzt (Lautenschläger, 2005). Das Ethandiol kommt eher im technischen Bereich als Kühl- und Heizflüssigkeit sowie als Frostschutzmittel zum Einsatz (Fiedler, 2010). Heptandiol findet in pharmazeutischen Produkten keine Anwendung. Neben diesen Glykolen wurden auch Glycerol 85% und Isopropanol verwendet.

### 3.2.2 $\beta$ -Sitosterol

$\beta$ -Sitosterol ist ein im Pflanzenbereich weit verbreitetes Phytosterin, dessen chemische Struktur starke Ähnlichkeit mit der von Cholesterol besitzt, da es lediglich eine zusätzliche Ethylgruppe in der Seitenkette aufweist (Abbildung 3.3). Es kann z. B. aus Soja-, Baumwollsamensamen- oder Weizenkeimöl gewonnen werden und ist in der Lage, die Cholesterolsorption an der Darmmukosa kompetitiv zu hemmen und somit leicht bis mittelstark erhöhte Cholesterols- bzw. LDL-Cholesterolswerte zu normalisieren (Blaschek et al., 2012). Aus diesem Grund wird es einigen Margarinesorten zugesetzt. Zudem ist es in halbfesten Formulierungen als W/O-Emulgator enthalten (Fiedler, 2010). In dieser Arbeit wurde eine Qualität eingesetzt, die nur einen Gehalt von 70% aufweist. Die Substanz ist dabei hauptsächlich mit dem strukturähnlichen Campesterol verunreinigt.

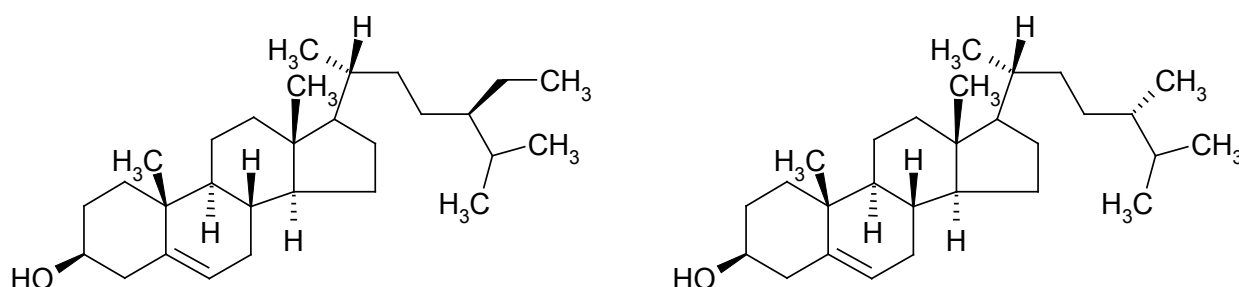


Abbildung 3.3: Strukturformel  $\beta$ -Sitosterol (links) und Campesterol (rechts)



#### 3.2.3 Pemulen® TR-1

Zur verbesserten Fixierung der flüssigen Komponente wurde Pemulen® TR-1 eingesetzt. Es ist ein Crosspolymer aus C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>-Alkylacrylaten und einem oder mehreren Monomeren der Acrylsäure, der Methacrylsäure oder deren Ester. Diese chemische Struktur ermöglicht dem Polymer bereits in niedrigen Konzentrationen (0,1% - 0,3%) nicht nur als Gelbildner sondern auch als O/W-Emulgator zu fungieren. Während der lipophile Anteil an die O/W-Grenzfläche adsorbiert, quillt der hydrophile Anteil in der Wasserphase und bildet ein Gelgerüst um jedes einzelne Öltröpfchen aus (Technical Data Sheet Pemulen®, 2002). Die Gelbildung erfolgt nach Neutralisierung, die im Rahmen dieser Arbeit primär durch Zugabe von Ethylendiamintetrapropanol (EDTP) erfolgte.

### 3.3 Modellarzneistoffe

In dieser Arbeit wurden Modellarzneistoffe mit einem  $\log P_{o/w} > 3$  verwendet, da vorwiegend die Beeinflussung des interzellulären Penetrationsweges, welcher primär für lipophile Arzneistoffe relevant ist, untersucht werden sollte. Dazu wurden zwei systemisch wirkende sowie zwei dermal wirkende Substanzen aus unterschiedlichen Indikationsgebieten ausgewählt.

#### 3.3.1 Testosteron

Testosteron ist ein endogenes Androgen und für das normale Wachstum und die Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane sowie für die Aufrechterhaltung der sekundären Geschlechtsmerkmale verantwortlich. Die reguläre Produktion bzw. Freisetzung des Testosterons beträgt 7 mg/Tag und unterliegt einem circadianen Rhythmus. In den Zielorganen wird es in das noch stärker wirksame 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron umgewandelt (Fachinformations Service, 2012d). Indikationsgebiet einer Testosteron-Substitutionstherapie ist primär der männliche Hypogonadismus, mit dem Ziel, den Blutspiegel wieder auf ein normales physiologisches Niveau einzustellen. Aufgrund eines ausgeprägten first-pass-Effektes ist Testosteron nach oraler Applikation nahezu unwirksam. Das freie Testosteron wird daher vorwiegend mit Hilfe von topisch anzuwendenden Gelen appliziert (Kommentar zur Ph. Eur., 2012). Diese enthalten den Arzneistoff in Konzentrationen von 1% bis 2,5% und sind meist in Einzeldosisbeuteln bzw. -tuben zu 25 mg oder 50 mg Dosierungen abgepackt. Auch Transdermale

Therapeutische Systeme (TTS) mit Freisetzungsraten von 1,2 bis 2,4 mg/24 h sind erhältlich. Zudem stehen auch verschiedene Testosteronester zur Verfügung, welche als ölige Lösungen intramuskulär als Depotformulierung appliziert werden können (Rote Liste, 2012).

Testosteron besitzt einen  $\log P_{o/w}$ -Wert von 3,32 (PhysProp Database, 2012) und wird von der OECD als Referenzsubstanz für die Beurteilung der Vertrauenswürdigkeit eines Testsystems zur Untersuchung der Hautpenetration empfohlen (OECD, 2004b).

### 3.3.2 Estradiol

Estradiol ist neben Estron und Estriol das wichtigste und am stärksten wirksame estrogene Hormon. Estrogene regulieren zahlreiche physiologische Prozesse, wie die Entwicklung der weiblichen Sexualorgane und die Ausprägung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale. Sie bewirken zusammen mit Progesteron die zyklischen Veränderungen der Genitalorgane. Zudem fördern sie die Resorption und den Einbau von Calcium-Ionen in die Knochen und erhöhen somit die Knochendichte (Kommentar zur Ph. Eur., 2012). Neben diesen typischen Hormonwirkungen besitzt Estradiol auch charakteristische Wirkungen am Hautorgan. Es wirkt ab Konzentrationen von 0,01% lokal oder systemisch kapillargefäßerweiternd und fördert die allgemeine Durchblutung. Zudem stimuliert es die Proliferation von Epithelien im Genitalbereich und Harntrakt und steigert die Kollagensynthese der Haut (Fachinformations Service, 2012c). Primäre Anwendung findet Estradiol bei der Substitutionstherapie im weiblichen Klimakterium zur Reduktion subjektiver Wechseljahrsbeschwerden und Osteoporose-Prophylaxe. Dabei wird das Estradiol meist oral in Form von Filmtabletten angewendet. Da oral appliziertes Estradiol jedoch einem hohen first-pass-Effekt von über 80% unterliegt und somit hohe Dosierungen notwendig sind, bietet die transdermale Applikation mit TTS und topisch anzuwendenden Gelen eine gute Alternative. Die symptomatischen Behandlungen atrophischer Vaginitis mit O/W-Cremes sowie mäßig ausgeprägter Entzündungen der Kopfhaut mit alkoholischen Lösungen sind weitere Anwendungsgebiete (Rote Liste, 2012). In den meisten Arzneiformen wird das Hemihydrat des Estradiols eingesetzt, da es im Vergleich zur wasserfreien Substanz stabiler und nicht hygroskopisch ist. Der  $\log P_{o/w}$ -Wert von Estradiol beträgt 4,01 (PhysProp Database, 2012).

#### 3.3.3 Miconazol

Miconazol ist ein Imidazolderivat und gehört zur Gruppe der Azol-Antimykotika. Es ist ein potenter Inhibitor der Biosynthese von Ergosterol, einem essentiellen Bestandteil von Hefen und anderen Pilzen. Miconazol wird lokal zur Therapie von Pilzinfektionen der Haut und Schleimhaut, wie z. B. vaginale Candidose und Mundsoor eingesetzt (Kommentar zur Ph. Eur., 2012). Es ist jedoch auch gegen bestimmte grampositive Bazillen und Kokken wirksam und eignet sich daher auch zur Behandlung von sekundär infizierten Mykosen (Fachinformations Service, 2012a). Appliziert wird es hauptsächlich in Form von Cremes, Salben und Gelen in 2%iger Konzentration. Da die Base des Miconazols praktisch unlöslich in Wasser ist, wird in Cremes und Salben meist das besser wasserlösliche Nitratsalz verwendet (Rote Liste, 2012). Miconazol ist mit einem  $\log P_{o/w}$ -Wert von 6,25 ein sehr lipophiles Molekül (PhysProp Database, 2012).

#### 3.3.4 Prednicarbat

Das Glucocorticoid Prednicarbat ist ein Ester des Prednisolons mit ausgeprägten antiphlogistischen, antiallergischen, antiexsudativen und antiproliferativen Wirkungen. Nach topischer Applikation wird es in der Haut zu dem 8,3fach stärker wirksamen Prednisolon-17-ethylcarbonat metabolisiert, welches langsam zu Prednisolon zerfällt (Kommentar zur Ph. Eur., 2012). Eine systemische Wirkung nach perkutaner Verabreichung konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Der sehr geringe Einfluss von Prednicarbat auf die Kollagensynthese und auf das Wachstum menschlicher Hautfibroblasten spiegelt die geringe atrophogene Potenz des Wirkstoffes wider (Fachinformations Service, 2012b). Es wird topisch in Form von 0,25%igen Cremes, Salben, Lotionen oder Lösungen bei entzündlichen Hauterkrankungen, wie Ekzemen, Psoriasis, entzündlichen Lichtdermatosen u. a. eingesetzt. Der  $\log P_{o/w}$ -Wert von Prednicarbat beträgt 3,82 (PhysProp Database, 2012).

Alle weiteren eingesetzten Hilfs- und Wirkstoffe sind im Anhang unter den verwendeten Substanzen aufgelistet.

## **4 METHODEN**

### **4.1 Mikroskopie**

#### **4.1.1 Licht- und Polarisationsmikroskopie**

Die Zubereitungen wurden 24 h nach Herstellung und zu späteren Zeitpunkten mit einem digitalen Mikroskop (Keyence VHX-500K, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) untersucht. Dabei wurde auf Homogenität der Zubereitung, Flüssigkeitsaustritt, Ausprägung des fibrillären Systems sowie auf Vorkommen von Cholesterol- oder Wirkstoffkristallen geachtet.

Zur Betrachtung der Proben im polarisierten Dunkelfeld wurden unterhalb und oberhalb der Probe Polarisationsfolien (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) angebracht, die in Kreuzstellung zueinander stehen. Die erzeugten Schwingungsebenen des polarisierten Lichts stehen somit senkrecht zueinander. Besitzt die Probe doppelbrechende Eigenschaften, wird die Schwingungsebene des eingestrahnten Lichts verändert, sodass ein Anteil dieses Lichts die zweite Folie passieren kann. Für jede flüssigkristalline Phase ergeben sich typische Schwarz-Weiß-Muster, die als Texturen bezeichnet werden (Müller-Goymann, 1998b).

Um morphologische Veränderungen des flüssigkristallinen Systems beim Erwärmen oder Abkühlen visuell zu detektieren, wurden ausgewählte Zubereitungen mit Hilfe eines Mikroskop-Heiztisches (Mettler FP 52, Mettler Waagen GmbH, Gießen) mit 10 °C/min bis maximal 160 °C aufgeheizt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Abkühlrate konnte dabei nicht gesteuert werden.

#### **4.1.2 Elektronenmikroskopie**

Die Mikrostruktur von Flüssigkristallen und fibrillären Netzwerken niedermolekularer Gele kann mit Elektronenmikroskopen visualisiert werden. Problematisch ist dabei das Hochvakuum im Elektronenmikroskop, welches meist die Struktur von Proben beschädigt, die Wasser oder andere flüchtige Substanzen enthalten. Deshalb müssen entsprechende Zubereitungen mit speziellen Methoden präpariert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Präparationstechniken und Elektronenmikroskope genutzt:

### 4.1.2.1 Gefrierbruchpräparation und Untersuchung im TEM

Im Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Braunschweig wurden die Proben durch Gefrierbruch präpariert und anschließend im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht. Dazu wurde ein Tropfen Probe mittels Glaskapillare auf ein Goldplättchen gegeben und mit einem zweiten Goldplättchen bedeckt. Durch Überführung der Probenhalter in schmelzenden Stickstoff wurde die Probe schockgefroren. Dies ermöglicht den Erhalt der bei Raumtemperatur vorliegenden Probenstruktur. Die gefrorene Probe wurde in eine Gefrierbruchanlage BAF 400 (Balzers GmbH, Wiesbaden) überführt, in der bei  $-100\text{ °C}$  und einem Vakuum von  $5 \cdot 10^{-6}$  bar das obere Plättchen vom unteren getrennt und somit die Probe gebrochen wurde.

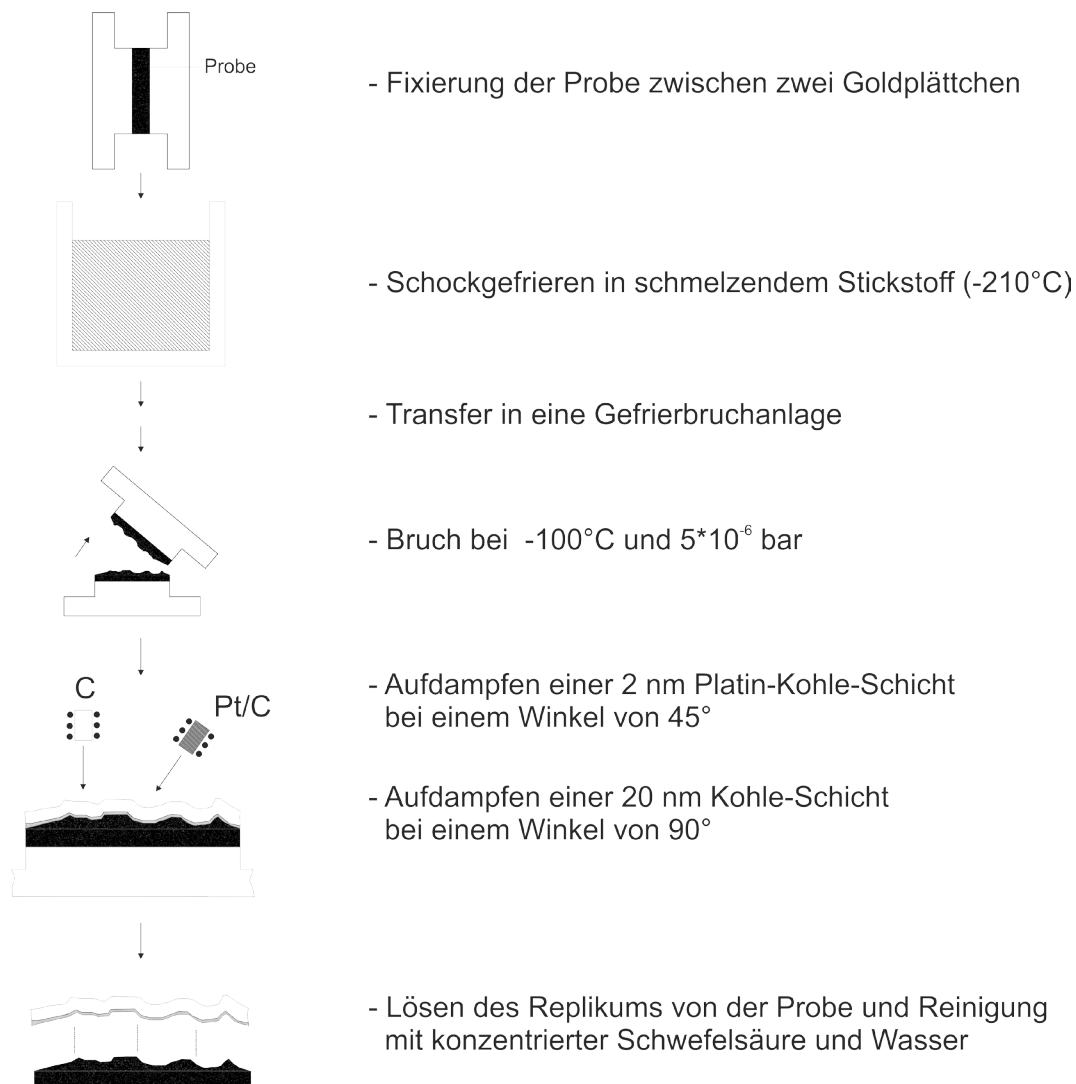


Abbildung 4.1: Gefrierbruchpräparation zur Erzeugung von Probenreplica für die Transmissionselektronenmikroskopie (in Anlehnung an Müller-Goymann, 1999)

Das so entstandene Probenrelief wurde dann mit einer 2 nm dünnen Platin-Kohle-Schicht unter einem Winkel von 45° bedampft. Zur mechanischen Stabilisierung des erhaltenen Abdrucks (Replikum) wurde dieses mit reiner Kohle unter einem 90°-Winkel mit einer Schichtdicke von 20 nm bedampft (schematische Darstellung siehe Abbildung 4.1). Diese Replika wurden mit konzentrierter Schwefelsäure und Wasser von Probenresten gereinigt, auf kleine Kupfernetze aufgebracht und in einem Transmissionselektronenmikroskop LEO EM 922 (LEO, Oberkochen) mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV betrachtet.

Durch die Schrägbedampfung mit Platin werden der Platinquelle zugewandte Erhebungen mit einer dickeren Schicht belegt. Dadurch werden verschiedene Schichtdicken erhalten, die den Elektronenstrahl unterschiedlich stark absorbieren, sodass abgestufte Helligkeitseffekte resultieren (Müller-Goymann, 1998b).

#### **4.1.2.2 Kryopräparation und Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop**

Die Vermessung einer Probe mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) wurde im Demonstrationslabor der Carl Zeiss AG in Oberkochen durchgeführt. Zunächst wurde die Probe mittels Kryopräparation fixiert. Dazu wurde sie in schmelzendem Stickstoff schockgefroren. Die oberste Schicht wurde inklusive anhaftender Eiskristalle mit einem gekühlten Mikrotom weggeschnitten. Anschließend wurde die Probe über ein Cryo-Transfer-System in das REM Auriga 60 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) überführt. Um die empfindliche Probe während der Messung nicht zu beschädigen, wurde mit einer niedrigen Beschleunigungsspannung von 2,0 kV gearbeitet. Zudem reduziert sich mit kleiner werdender Spannung die Eindringtiefe des Elektronenstrahls in die Probe, wodurch eine bessere, detailliertere Darstellung der Oberfläche erhalten wird (Wagener, 2012).

## 4.2 Röntgendiffraktometrie

Die Methode der Röntgendiffraktometrie nutzt die Beugung von Röntgenstrahlen an Strukturen eines Probenmaterials und dient zur Charakterisierung und Feinstrukturuntersuchung von Substanzen bzw. Zubereitungen. Die Röntgenstrahlen werden dabei in einer Röntgenröhre generiert, in welcher an der Kathode austretende Elektronen durch eine angelegte Hochspannung beschleunigt werden und auf die Anode prallen. Neben der dabei freigesetzten Bremsstrahlung werden Elektronen aus den K-Schalen der Anodenatome herausgeschlagen, welche durch Elektronen aus der L-Schale ersetzt werden. Bei diesem Übergang wird die für das Anodenmaterial charakteristische Röntgenstrahlung emittiert.

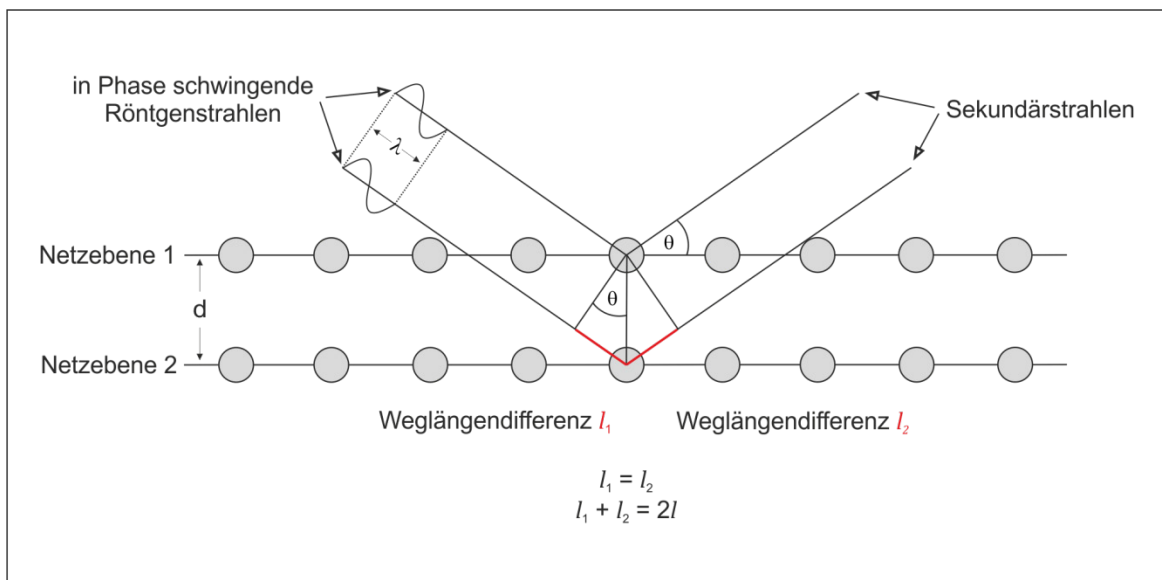


Abbildung 4.2: Modell zur Reflexionsbedingung nach Bragg (in Anlehnung an Schwabe, 2009a)

Ebene, parallele Schichten aus Atomen oder Molekülen in einem Kristall oder Flüssigkristall werden als Netzebenen bezeichnet und stellen ein Beugungsgitter für Röntgenstrahlen dar. Durch einen auftreffenden Röntgenstrahl wird das Atom zu Schwingungen angeregt und emittiert Strahlung gleicher Wellenlänge (Sekundärstrahlung). Je nach Entstehungsort und Geometrie des Beugungsgitters legen die Sekundärstrahlen unterschiedlich lange Wege zurück (Gangunterschied), sodass parallele Strahlen sich durch Phasenverschiebung gegenseitig in ihrer Intensität verstärken oder abschwächen können (siehe Abbildung 4.2). Die Bedingungen, unter denen sich Sekundärstrahlen maximal verstärken, werden durch das Braggsche Gesetz (Gleichung 4.1) beschrieben:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (\text{Gleichung 4.1})$$

$$2 \cdot l = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (\text{Gleichung 4.2})$$

Demnach schwingen parallele Strahlen nur in Phase, wenn ihr Weglängenunterschied  $l$  einem ganzzahligen Vielfachen der Röntgenwellenlänge  $\lambda$  entspricht (Schwabe, 2009a). Aus der Braggschen Gleichung geht ebenso hervor, dass der Netzebenenabstand umgekehrt proportional zum Reflexionswinkel  $\theta$  ist. Daher wird die Röntgenkleinwinkeltechnik (SAXD = Small Angle X-Ray Diffraction) zur Untersuchung großer Netzebenenabstände im Bereich der Fernordnung und die Röntgenweitwinkeltechnik (WAXD = Wide Angle X-Ray Diffraction) für kleine  $d$ -Werte im Bereich der Nahordnung genutzt. Zur genauen Erfassung der Netzebenenabstände in Flüssigkristallen wird daher SAXD verwendet. Diese Methode bietet zudem die Möglichkeit, die Art der flüssigkristallinen Phase zu bestimmen, da die Abfolge der Interferenzen für verschiedene Flüssigkristalle charakteristisch ist:

Lamellar	1	:	1/2	:	1/3	:	1/4
Hexagonal	1	:	$1/\sqrt{3}$	:	$1/\sqrt{4}$	:	$1/\sqrt{7}$
Kubisch	1	:	$1/\sqrt{2}$	:	$1/\sqrt{3}$	:	$1/\sqrt{4}$
Kubisch	1	:	$1/\sqrt{4}$	:	$1/\sqrt{5}$	:	$1/\sqrt{6}$

Mit WAXD-Messungen kann jedoch zumindest der Verlust der Nahordnung durch fehlende Interferenzen bzw. Veränderung des Interferenzmusters im Weitwinkelbereich gegenüber dem kristallinen Zustand ermittelt werden (Müller-Goymann, 1998b).

#### 4.2.1 SAXD

Die SAXD-Messungen der Proben wurden ebenfalls am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Dazu wurden die Proben zwischen zwei weitestgehend röntgenamorphen Kapton-Folien (Krempel, Vaihingen) in einen würfelförmigen Probenhalter gelegt, welcher in eine Kiessig-Lochblendkamera (Eigenbau des Pharmazeutischen Instituts der Technischen Universität Braunschweig) platziert wurde. Der Generator PW 1710 (Phillips, Kassel)



mit einer Feinfokus-Röntgenröhre PW 2213-25 mit Cu-Anode (Beschleunigungsspannung 40 kV, Anodenstrom 25 mA) erzeugte Cu-K $\alpha$ -Strahlung mit einer Wellenlänge von 0,1542 nm. Die ebenfalls vorhandene Cu-K $\beta$ -Strahlung wurde durch einen Nickel-Filter reduziert. Die Detektion erfolgte mit einem OED 50M Detektor (MBraun, Garching) und die Datenverarbeitung mit der Software ASA (MBraun, Garching). Im Unterschied zum Detektor, der bei der WAXD-Messung genutzt wird, fährt dieser Detektor nicht die verschiedenen Winkelpositionen ab, sondern besitzt eine feste Position und besteht aus einer Vielzahl von Kanälen. Durch Vermessen einer Probe mit bekanntem Netzebenenabstand kann mit Hilfe der Bragg'schen Gleichung für jeden der Kanäle ein Reflexionswinkel berechnet werden. Dazu wurde Cholesterol mit einem bekannten Netzebenenabstand von  $d = 3,35$  nm genutzt. Die Messzeit der Proben betrug 10 h, die der Kalibriersubstanz 5000 s.

### 4.2.2 WAXD

Die Röntgenweitwinkeldiffraktometrie wurde sowohl zur Untersuchung der halbfesten Systeme als auch zur Analyse pulverförmiger Substanzen, wie z. B. des Cholesterol-Anhydrates oder -Monohydrates eingesetzt. Dazu wurde ein Diffraktometer Stadi P (Stoe & Cie GmbH, Darmstadt) verwendet. Die genutzte Strahlung war Cu-K $\alpha_1$ -Strahlung, die aus einer Röntgenröhre mit Cu-Anode bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Anodenstrom von 30 mA generiert wurde. Die durchgeführten Messungen sind Transmissionsmessungen, bei denen die Probe zwischen zwei Mylar-Folien in einem rotierenden Probenhalter befestigt wurde. Die gebeugte Röntgenstrahlung wurde über einen ortsempfindlichen Detektor erfasst und mit Hilfe der WinX<sup>POW</sup> Software in ein charakteristisches Röntgendiffraktogramm umgewandelt.

## 4.3 Thermoanalytische Verfahren

### 4.3.1 Dynamische Differenzkalorimetrie

Bei thermoanalytischen Verfahren wird die Probe einem kontrollierten Temperaturprogramm unterworfen, um temperaturbedingte Änderungen von Eigenschaften eines Probenmaterials zu untersuchen. Um energetische (endotherme und exotherme) Veränderungen zu erfassen, wurde die Methode der Dynamischen Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry, DSC) genutzt. Dazu wurde eine Diamond DSC (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) verwendet. Dieses Gerät verfügt über zwei getrennte Öfen mit elektronisch geregelten Heizungen für den Proben- und Referenztiegel, deren Temperaturdifferenz während der gesamten Messung auf  $\Delta T = 0 \text{ °C}$  gehalten wird. So ist bei einem endothermen Vorgang im Proben- und Referenztiegel die Heizleistung für diesen erhöht, bei einem exothermen Vorgang wird sie heruntergeregelt. Über die Veränderung der Heizleistung kann die aufgetretene Enthalpieänderung der Probe erfasst werden. Solche Enthalpieänderungen können u. a. beim Schmelzen, Rekristallisieren oder bei Umwandlungen in andere Kristallmodifikationen auftreten (Schwabe, 2009b). Zudem können Phasenumwandlungen von Flüssigkristallen, bei denen die Art des flüssigkristallinen Zustandes wechselt, erfasst werden, da diese ebenfalls mit einer Änderung des Energiegehaltes des Systems einhergehen (Müller-Goymann, 2004).

Zur Durchführung der Messung wurde die Probe (ca. 5 bis 15 mg) in einen Aluminiumtiegel (DSC Pans 40  $\mu\text{l}$ , Perkin Elmer, Massachusetts, USA) eingewogen und mit einem Aluminiumdeckel kalt verschweißt. Bei Vermessung von Feststoffen wird der Deckel gelocht, um einen Druckausgleich bei eventueller Gasbildung zu gewährleisten (Open-Pan-Methode). Bei Vermessung des halbfesten Systems sowie bei Proben vom humanen Stratum corneum wurde jedoch im geschlossenen System gearbeitet, um die Detektion kleinster Energieänderungen zu ermöglichen. Die Start- und Endtemperatur sowie die Heizrate unterscheiden sich je nach Probenart und werden jeweils bei der Ergebnisdarstellung angegeben. Alle Proben wurden in Inertgasatmosphäre unter Stickstoffbegasung vermessen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software PYRIS (Version 9.0, Perkin Elmer, Massachusetts, USA).

### 4.3.2 Thermogravimetrische Analyse

Zur Unterscheidung zwischen Cholesterol-Monohydrat und -Anhydrat wurde u. a. die thermogravimetrische Analyse verwendet. Mit dieser Methode werden temperaturbedingte Massenänderungen einer Probe erfasst. Dabei steht der Probeniegel auf einer kleinen Waagschale, die mit einer elektronischen Mikrowaage verbunden ist. Zur Durchführung wurde der Simultaneous Thermal Analyzer STA 6000 der Firma Perkin Elmer (Massachusetts, USA) genutzt. Die Substanz (ca. 5 bis 15 mg) wurde ebenfalls in einen Aluminiumtiegel eingewogen und mit gelochtem Deckel verschweißt. Zunächst wurde die Temperatur von 25 °C für 10 min gehalten, anschließend wurde mit einer Heizrate von 15 °C/min bis 160 °C aufgeheizt. Während der gesamten Messung wurde die Probe mit Stickstoff umspült. Die Auswertung des gemessenen Masseverlustes erfolgte mit der Software PYRIS (Version 9.0, Perkin Elmer, Massachusetts).

## 4.4 Rheologie

### 4.4.1 Oszillation

#### 4.4.1.1 Einführung

Mit Hilfe von Oszillationsmessungen werden die viskoelastischen Eigenschaften der halbfesten Proben untersucht. Die zugrunde liegenden Prinzipien dieser Messmethode werden im Folgenden anhand eines Platte/Platte-Modells erläutert. Während die obere, runde Platte zu sinusförmigen Schwingungen (angegeben als Kreisfrequenz  $\omega$ ) angeregt wird, ist die untere Platte unbeweglich. Folglich wird die im Spalt befindliche Probe geschert. Bei einer schubspannungsgeregelten Belastung gilt für die sinusförmige Schubspannungskurve:

$$\tau(t) = \tau_A \cdot \sin \omega \cdot t \quad (\text{Gleichung 4.3})$$

und für die resultierende Deformationskurve:

$$\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad (\text{Gleichung 4.4})$$

$\tau_A$	Schubspannungsamplitude
$\gamma_A$	Deformationsamplitude
$\omega$	Kreisfrequenz
$\delta$	Phasenverschiebungswinkel

Für idealelastische Substanzen gilt nach dem Hook'schen Gesetz:

$$\tau(t) = G^* \cdot \gamma(t) \quad (\text{Gleichung 4.5})$$

mit dem komplexen Schubmodul  $G^*$ , welcher den Widerstand gegen die Verformung repräsentiert. Bleibt die Probenstruktur während der Messung intakt (d. h. wird im linearviskoelastischen Bereich gemessen, siehe unten), ist  $G^*$  konstant. Somit verläuft die Deformationsfunktion in Phase mit der auferlegten Schubspannungsfunktion, sodass der Phasenverschiebungswinkel zwischen den beiden Kurven hier den Betrag  $\delta = 0^\circ$  hat.

Für idealviskose Stoffe gilt nach dem Newtonschen Gesetz:

$$\tau(t) = \eta^* \cdot \dot{\gamma}(t) \quad \text{(Gleichung 4.6)}$$

mit der Scherratenfunktion  $\dot{\gamma}(t)$  und der komplexen Viskosität  $\eta^*$ , welche den Fließwiderstand der Messsubstanz repräsentiert. Im linearviskoelastischen Bereich ist  $\eta^*$  konstant, sodass die resultierende Deformationskurve mit einem Phasenverschiebungswinkel von  $\delta = 90^\circ$  verzögert verläuft.

Viskoelastische Stoffe weisen sowohl viskose als auch elastische Eigenschaften auf, sodass  $\delta$  zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  liegt (siehe folgende Abbildung 4.3).

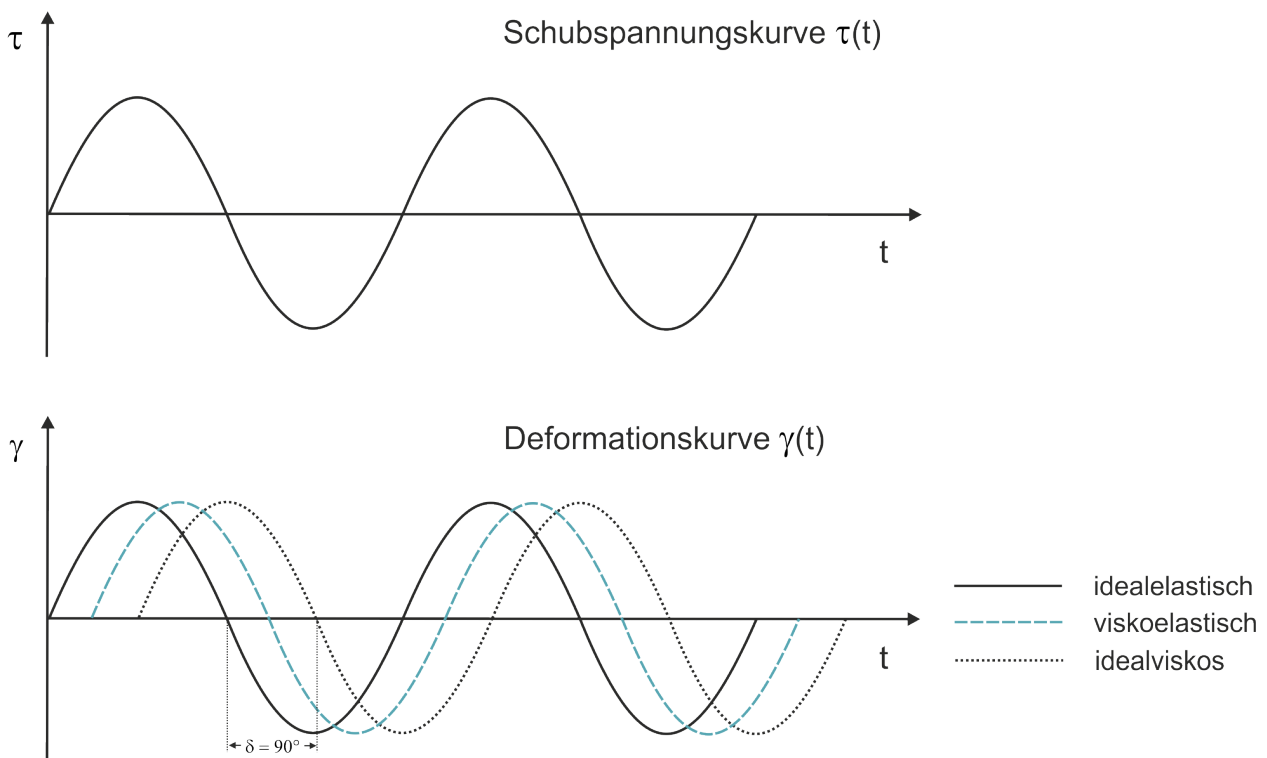


Abbildung 4.3: Schubspannungsfunktion und Deformationsfunktionen von idealelastischen, idealviskosen und viskoelastischen Stoffen (in Anlehnung an Bohlin Instruments, 1999)

Neben dem Phasenverschiebungswinkel und der komplexen Viskosität werden das Speichermodul und das Verlustmodul als Parameter zur Auswertung der Oszillationsmessung genutzt. Das Speichermodul  $G'$  repräsentiert das elastische Verhalten der Messprobe und beschreibt die in der Probe gespeicherte Deformationsenergie, die nach Beendigung der Belastung wieder vollständig zur Rückverformung der Probe zur Verfügung steht. Das Verlustmodul  $G''$  repräsentiert das

viskose Verhalten der Messprobe und beschreibt die verlorene Deformationsenergie, die zur Veränderung der Probenstruktur aufgebraucht und/oder an die Umwelt abgegeben wird. Die Summe des Speicher- und Verlustmoduls wird durch das komplexe Schubmodul  $G^*$  dargestellt.

Vorgabe- und Messparameter sind nur im linearviskoelastischen Bereich proportional zueinander. Messungen außerhalb diesen Bereichs liegen nicht mehr im Geltungsbereich der Gesetze von Hooke und Newton und die Messergebnisse sind nur mit komplizierten Berechnungsformeln auswertbar (Mezger, 2006).

Rheologische Messungen können zur Strukturaufklärung flüssigkristalliner Systeme beitragen, da die verschiedenen Mesophasen charakteristische Fließeigenschaften aufweisen. Je nach Ausprägung des Ordnungsgrades kann sowohl ideal viskoses als auch strukturviskoses Verhalten vorliegen. Kubische und hexagonale Mesophasen sind weniger fließfähig. Ihr viskoelastischer Charakter kann mit Hilfe von Oszillationsmessungen ermittelt werden (Müller-Goymann, 1998b). Zudem kann mit dieser Messmethode die Art des vorliegenden Netzwerkes in niedermolekularen Organogelen bestimmt werden (Terech et al., 1997).

#### **4.4.1.2 Methoden**

Die Oszillationsmessungen wurden mit einem Rotationsviskosimeter vom Typ CVO 120 (Bohlin Instruments, Malvern, Worcestershire, Großbritannien) mit einer Platte/Platte-Messeinrichtung (Plattendurchmesser 40 mm) durchgeführt. Um bei einer unbekanntem Messprobe die Grenze des linearviskoelastischen Bereichs und den Schubspannungswert zu detektieren, bei dem die geringsten Messschwankungen auftreten, wurde zunächst ein Amplitudensweep gefahren. Dazu wurde bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz die Schubspannung stufenweise (logarithmisch) von 0,5 bis 50 Pa erhöht. War dieser Bereich noch nicht aussagekräftig, wurde er entsprechend angepasst. Während eines Amplitudensweeps wurden 60 Messpunkte in 120 s erfasst. Die eigentliche Messung erfolgte anschließend bei der ermittelten, konstanten Schubspannung und konstanter Frequenz von 1 Hz mit 20 Messpunkten in einer Messzeit von 60 s. Die Temperatur wurde stets auf 25 °C gehalten. Die Spaltbreite zwischen den beiden Platten betrug je nach Probenart zwischen 300 und 1000  $\mu\text{m}$ . Damit sich die Probenstruktur nach Herunterfahren der oberen Platte wieder reorganisieren konnte, wurde eine Erholungszeit von 2 bis 5 min eingehalten. Bei ausreichend großer Probenmenge wurden jeweils drei Messungen durchgeführt ( $n = 3$ ).

## 4.5 Freisetzungs- und Permeationstests

---

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Bohlin-Software, Version 6.50.5.8 (Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien).

### 4.4.2 Viskosimetrie

Um Viskositätskurven der halbfesten Proben zu ermitteln, wurde das zuvor genannte Rheometer mit gleicher Messeinrichtung im Viskositätsmodus genutzt. Dazu wurde eine logarithmische Scherrampe von 0,5 bis  $50 \text{ s}^{-1}$  (Auf- und Ab-Rampe) mit insgesamt 40 Messpunkten in einer Zeit von 240 s gefahren. Zudem wurde die Spaltbreite auf  $1000 \mu\text{m}$  eingestellt und die Messung nach einer Erholungszeit von 5 min gestartet.

## 4.5 Freisetzungs- und Permeationstests

Die Wirksamkeit halbfester Formulierungen hängt u. a. davon ab, wie gut es gelingt, den Wirkstoff in ausreichender Konzentration an den Wirkort zu transportieren. Dabei spielen Freisetzung des Wirkstoffes aus der Formulierung und Penetration des Wirkstoffes in die Haut bzw. Permeation durch die Haut eine wesentliche Rolle. Um diese beiden Prozesse zu testen, existieren eine Reihe von Methoden und Modelle, die nicht immer eine vergleichende Betrachtung erlauben. Daher wurden in den letzten Jahren Richtlinien für entsprechende in vivo- und in vitro-Untersuchungen von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) publiziert. Diese dienen auch als Grundlage für entsprechende Richtlinien anderer Organisationen, wie beispielsweise der Weltgesundheitsorganisation (WHO) oder des wissenschaftlichen Beratungsgremiums der Europäischen Kommission zu kosmetischen und Nicht-Lebensmittel-Produkten (SCCNFP).

Im Folgenden werden Aspekte zunächst zur Durchführung der Permeations- und Freisetzungstests und anschließend zur Hautmembranauswahl und deren Präparationstechniken unter Berücksichtigung entsprechender Richtlinien erläutert.

### 4.5.1 Testdurchführung

Die Permeationsuntersuchungen wurden mit einem V9 Franz-Diffusions-Zellen-System (PermeGear, Hellertown, USA), welches die gleichzeitige Nutzung von neun Franz-Zellen ermöglicht, durchgeführt. Der Aufbau einer Franz-Zelle ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

Das Akzeptorkompartiment hat ein Volumen von 8 ml und die Diffusionsfläche zwischen Donor- und Akzeptorkammer beträgt 1,00 cm<sup>2</sup>. Als Membranen wurden humane Epidermis, humanes Stratum corneum sowie Mausvollhaut verwendet (siehe Abschnitt 4.5.2). Zur mechanischen Stabilisierung des Stratum corneum wurde dieses auf einen Celluloseacetat-Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Sartorius, Göttingen) gelegt.

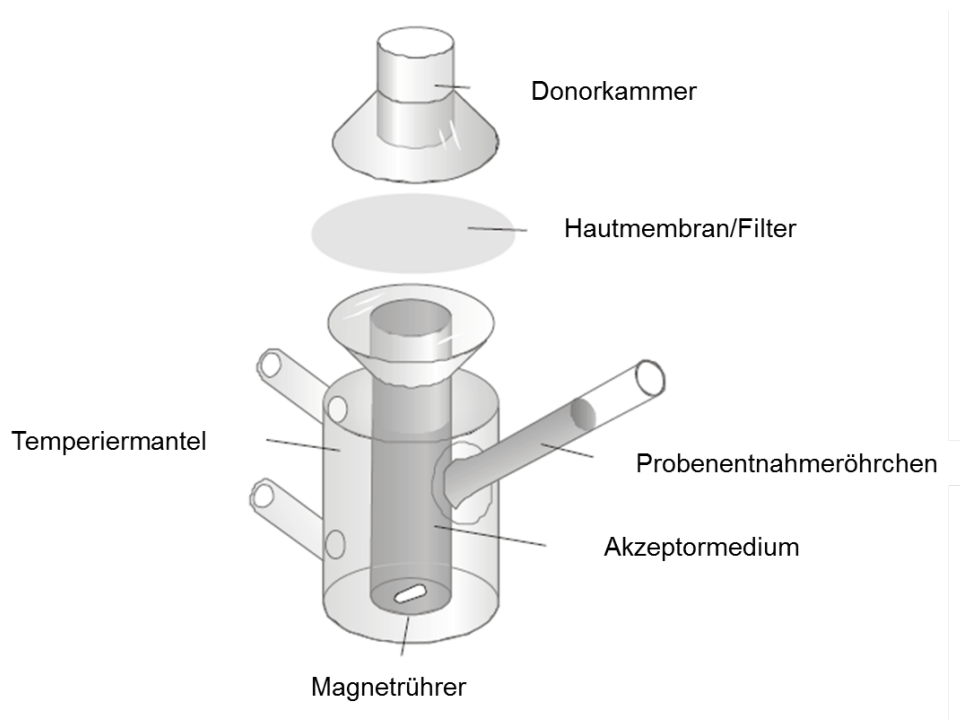


Abbildung 4.4: Aufbau einer Franz-Diffusionszelle

Die Temperatur des Akzeptormediums wurde während des gesamten Tests durch ein Temperierbad (Lauda Thermostat, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen) konstant auf  $32 \pm 1$  °C gehalten. Um zu verhindern, dass eine zu geringe Löslichkeit der Testsubstanz im Akzeptormedium als Penetrationsbarriere agiert, müssen Sink-Bedingungen eingehalten werden. Das heißt, die Konzentration der Testsubstanz darf am Ende des Tests höchstens 10% der Sättigungslöslichkeit betragen. Um dieses auch bei schlecht wasserlöslichen Substanzen zu gewährleisten, empfiehlt die OECD den Zusatz von max. 50% organischem Lösemittel (z. B. Ethanol), 6% Polyethylenglykol-20-oleylether (Brij 98) oder 5% BSA (Bovine Serum Albumin) (OECD, 2010). Nach Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten in den unterschiedlichen Medien (siehe Abschnitt 5.4.1) und unter Berücksichtigung der physiologischen Relevanz wurde ein Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4 (siehe Anlage) mit einem Zusatz von 5% BSA als Akzeptormedium für alle Versuche eingesetzt.



Bei der aufzutragenden Menge der Testformulierung unterscheiden OECD und WHO zwischen „finite dose“- und „infinite dose“-Bedingungen. Demnach soll bei „finite dose“-Bedingung der normale Gebrauch imitiert werden. Die maximale Auftragung der Testformulierung beträgt dabei 10 mg/cm<sup>2</sup>. Eine Masse von mehr als 10 mg/cm<sup>2</sup> wird appliziert, wenn Steady-state-Bedingungen erreicht werden sollen, um z. B. Permeabilitätskonstanten oder Absorptionsraten berechnen zu können (Kielhorn et al., 2005). Da die gleichmäßige Verteilung solch geringer Mengen nicht einfach zu handhaben war, ohne dabei die Membran zu verletzen, wurden neben den „finite“-Dosierungen (applizierte Masse 10 mg) auch „infinite“-Dosierungen (40 mg) angewendet. Nach welcher Methode die Auftragung erfolgte, wird jeweils bei der Ergebnisdarstellung mit angegeben. Die Probenentnahme von jeweils 0,6 ml erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten nach 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 12; 24 und 30 Stunden mit einer 1 ml Spritze. Um eine bessere Durchmischung des Akzeptormediums zu erhalten, wurde vor jedem Probenzug die Spritze dreimal mit dem Akzeptormedium gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mit Hilfe der HPLC-Analytik (Methode siehe Anhang). Zuvor wurde durch Zugabe gleicher Volumenteile Acetonitril zur Probe das BSA ausgefällt und mittels Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG, Hamburg) für 10 min bei 7000 rpm abgetrennt. Der klare Überstand wurde zur Gehaltbestimmung in die HPLC-Anlage injiziert.

Die Freisetzungsuntersuchungen wurden entsprechend den Permeationstests durchgeführt. Als Membran wurde nur der Celluloseacetat-Filter mit gleicher Porengröße verwendet. Die letzte Probe wurde nach 24 h entnommen und die applizierte Masse der Testformulierung betrug 10 mg.

### 4.5.2 Verwendete Hautmembranen

Für die Testung der kutanen Resorption kann prinzipiell Haut von allen Säugern verwendet werden. Da die in vitro-Untersuchungen jedoch meist zur Vorhersage der in vivo-Resorption in Humanhaut dienen, wird diese auch als Testmembran von der OECD favorisiert. Da humanes Hautmaterial jedoch nicht immer zur Verfügung steht und die Beschaffung oft mit großem Aufwand verbunden ist, kann alternativ auch Schweinehaut genutzt werden. Diese ist in Morphologie und Permeabilität der Humanhaut am ähnlichsten (OECD, 2004a). Beim Einsatz von Humanhaut wird meist Brust- oder Bauchhaut verwendet. Dabei kommen grundsätzlich vier Membrantypen in Frage: die Vollhaut, welche nicht dicker als 1 mm sein sollte; 200 µm bis 400 µm dicke

dermatomisierte Haut; Epidermis oder das isolierte Stratum corneum (OECD, 2010, letzteres wird in Richtlinien nicht erwähnt). Diese Membranen unterscheiden sich in ihrer Dicke und somit hauptsächlich in ihrer Diffusionsstrecke. Die Verwendung von Vollhaut ist für Permeationsuntersuchungen von lipophilen Substanzen nicht geeignet, da ein Großteil des Wirkstoffes in der Dermis verbleibt und nicht in das Akzeptormedium gelangt (Netzlaff et al., 2007). Zudem kommt es beim Präparieren entsprechender Hautschichten häufig zu Verletzungen der Haut. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit bei Verwendung von Humanhaut nur Epidermis und das isolierte Stratum corneum verwendet.

Die Hautproben stammen aus der Brust- und Bauchregion von Personen weiblichen Geschlechts (41 und 34 Jahre) und wurden von der Plastischen Chirurgie der Ostseeklinik Kiel sowie der Esthesis Praxis in Kiel zur Verfügung gestellt. Die frisch gelieferten Hautproben wurden zunächst vom subkutanen Fettgewebe befreit und anschließend bei -25 °C tiefgefroren. Die Gewinnung der Epidermis erfolgte mit Hilfe der Hitzeseparierung. Dazu wurde die aufgetaute Haut in ca. 2 x 2 cm große Stücke geschnitten, welche dann einzeln zwischen zwei Aluminiumplatten leicht fixiert und für 90 Sekunden in 60 °C warmes Wasser gehalten wurden. Anschließend konnte mit zwei Pinzetten die Epidermis von der Dermis abgezogen werden (siehe Abbildung 4.5). Diese wurde dann entweder für einen Penetrationstest sofort zwischen Donor- und Akzeptorkammer der Franz-Zelle platziert oder zur Isolierung des Stratum corneum weiter präpariert. Die Isolierung des Stratum corneum erfolgte mit Hilfe der Trypsinierung nach der Methode von Kligman und Christophers (Kligman et al., 1963). Dazu wurde die Epidermis auf einen mit Trypsinlösung (0,03%) getränkten Papierfilter gelegt, zwischen zwei Glaspetrischalen dicht verschlossen und bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde etwas Sörensen-Puffer zugegeben und das Stratum corneum vom Filter abgelöst bis es oben schwamm (siehe Abbildung 4.5). Nach Ausstanzen mit einem Rundstanzeisen (Ø 25 mm) wurde die Hautmembran auf einen Rundfilter (s.o.) aufgenommen, um sie anschließend zum Waschen in Trypsin-Inhibitorlösung 0,04% und Pufferlösung überführen zu können. Zur Verwendung für einen Penetrationsversuch wurde das Stratum corneum zusammen mit dem Filter auf die Akzeptorkammer gelegt. Für die Vermessung mit der DSC wurde es auf eine Teflonlochplatte platziert und im Exsikkator getrocknet.

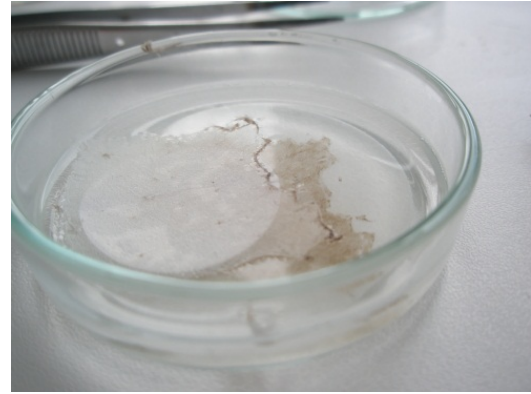
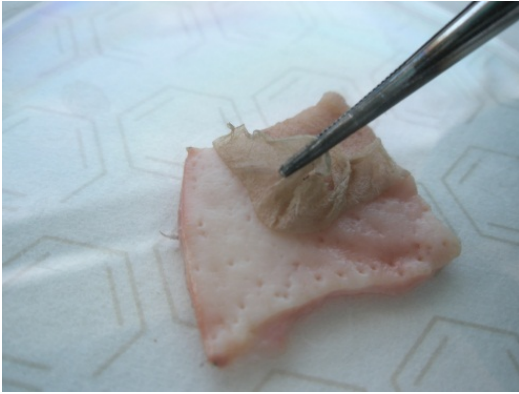


Abbildung 4.5: links: Abziehen der Epidermis von Dermis, rechts: aufschwimmendes Stratum corneum nach Ablösen vom trypsingetränkten Papierfilter

Auch wenn die Viabilität der Haut zerstört wird, bleiben die eigentlichen Permeationseigenschaften der Haut nach Entnahme aus dem Körper und entsprechenden Präparationen erhalten, da die wesentliche Diffusionsbarriere ohnehin durch eine nicht lebende Schicht dargestellt wird (OECD, 2004b). Zudem wurde nachgewiesen, dass eine zweiminütige Inkubation der Haut bei 60 °C warmen Wasser sowie die einjährige Lagerung bei -25 °C keine signifikanten Veränderungen der Permeabilität hervorrufen (Pitman et al., 1982, Harrison et al., 1984). Daher ist die Hitzeseparierung zur Gewinnung der Epidermis eine von der OECD empfohlene Methode. Dies gilt zwar nicht für die Trypsinierung, jedoch wurde von Kligman und Christophers postuliert, dass selbst eine 1%ige Trypsinlösung die Hornschicht nicht zerstört und der natürliche Zustand erhalten bleibt (Kligman et al., 1963). Bei Verwendung nicht lebender Hautschichten schreibt die OECD die Testung der Integrität der Membranen vor und nach Testdurchführung vor. Diese sollen entweder mit Hilfe von Messungen des Transepidermalen Wasserverlustes, durch Widerstandsmessungen oder Permeationsuntersuchungen mit Tritiumoxid erfolgen (OECD, 2004a). Zur Überprüfung der Unversehrtheit der verwendeten Membranen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Transepitheliale Elektrische Widerstand (TEER) mit einem EVOM (World Precision Instrument, Sarasota) mit einem Messbereich bis 20 k $\Omega$  bestimmt. Dazu wurde die Akzeptor- und Donorkammer mit der BSA-Pufferlösung gefüllt. Eine Elektrode des TEER-Gerätes wurde ca. 5 mm über der zu testenden Membran, die andere in die Probenzugsöffnung der Akzeptorkammer gehalten und dann ein Messwert aufgenommen. Die verwendeten Elektroden wurden im Institut selbst angefertigt. Laut Fokul et al. zeigen unversehrte Membranen des Stratum

corneum einen TEER > 20 k $\Omega$  (Fokuhl et al., 2007). Lag der Messwert vor Testbeginn unterhalb von 20 k $\Omega$ , wurde die Membran nach Möglichkeit ausgetauscht.

Aufgrund geringer Absorptionsraten durch die humanen Membranen wurde ebenfalls Maushaut verwendet. Diese besitzt ein sehr dünnes Stratum corneum und zeigt daher in einigen Studien eine 30- bis 40fach gesteigerte Permeabilität im Vergleich zu Humanhaut (El-Kattan et al., 2000). Verwendet wurde Vollhaut von neun Wochen alten, weiblichen Nacktmäusen des Typs Athymic nude. Die Haut wurde fertig präpariert von der Firma Harlan Laboratories B.V. (NM Horst, Niederlande) erworben. Die 2,5 x 2,5 cm großen Hautstücke waren auf dünne Styroporplatten gespannt und wurden auf Trockeneis geliefert. Unmittelbar vor Testbeginn wurden sie mit einem Rundstanzeisen ( $\varnothing$  23 mm) ausgestanzt und auf die Akzeptorkammer der Franz-Zelle gelegt.

## 4.6 Spezielle Methoden

Die in der Tabelle 4.1 gelisteten Methoden bestimmter Versuche werden detailliert in den genannten Kapiteln beschrieben.

*Tabelle 4.1: Übersicht spezieller Methoden*

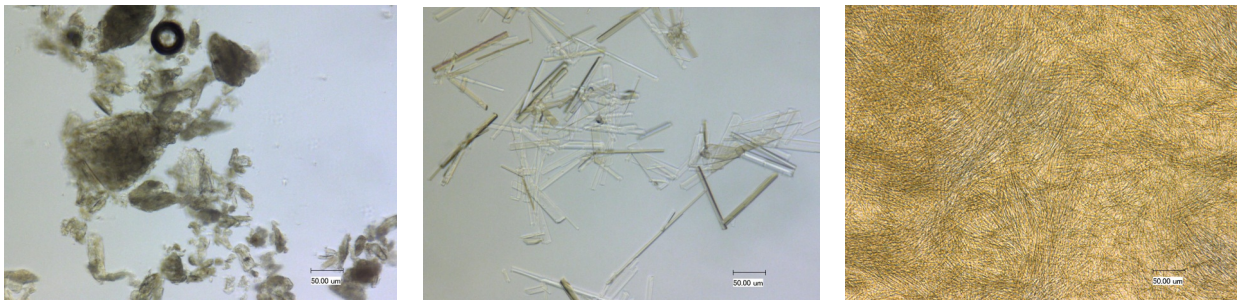
<b>Methode</b>	<b>Kapitel</b>
Herstellungsmethoden des halbfesten Systems	5.1
Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Cholesterol in Propylenglykol	5.1.6
Bestimmung des Wassergehaltes von Propylenglykol	5.2.6.1
Trocknung von Propylenglykol	5.2.6.2
Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Wirkstoffen in Propylenglykol	5.4.1
DSC-Messung von humanem Stratum corneum	5.4.3



## 5 PRAKTISCHER TEIL

### 5.1 Herstellungsmethoden

Zur Untersuchung der Herstellungstechnik des halbfesten, flüssigkristallinen Systems wurde – sofern nicht anders angegeben – mit einer Konzentration von 5% Cholesterol in Propylenglykol gearbeitet. Dazu wurde das Cholesterol anteilig mit Propylenglykol in einer Fantaschale angerieben. Wird diese Suspension nicht weiter behandelt, sondern in ein Weithalsglas abgefüllt und stehen gelassen, verfestigt sich das System derart, dass durch Umdrehen des Gefäßes kein Fließen mehr stattfindet. Durch vorsichtiges Umrühren mit einem Glasstab oder durch Schütteln des Gefäßes tritt das Propylenglykol wieder aus und es liegt eine inhomogene, gelierte Suspension vor. Mikroskopisch ist ein Umkristallisieren in große, nadelförmige Partikel (bis ca. 200  $\mu\text{m}$ ) zu beobachten (siehe linkes Bild der Abbildung 5.1). Diese Nadeln zeigen im polarisierten Dunkelfeld starke Doppelbrechung und haben somit kristallinen Charakter.



**Abbildung 5.1:** *Lichtmikroskopische Aufnahmen von Cholesterol-Formulierungen*  
*links: direkt nach Anreiben in der Fantaschale*  
*mitte: nach mehreren Tagen Standzeit ohne Behandlung*  
*rechts: nach entsprechender „Aktivierung“ mit fibrillärer Struktur*

Um die Cholesterol-Suspension in ein flüssigkristallines, halbfestes System zu überführen, das ein homogenes, cremeartiges Erscheinungsbild und mikroskopisch ein Netzwerk aus fibrillären Strukturen (rechtes Bild der Abbildung 5.1) aufweist, ist eine gewisse „Aktivierung“ notwendig. In diesem Kapitel wird die Verwendung verschiedener Geräte und Methoden zu diesem Zweck beschrieben.

### 5.1.1 Schwingmühle

Zunächst wurde die Aktivierung des Systems mit Hilfe einer Labor-Schwingmühle MM 2000 (Retsch GmbH & Co.KG, Haan) erprobt. Diese enthält zwei Mahlbecher, welche in horizontaler Lage Schwingungen ausüben. Die im Mahlbecher enthaltenen Mahlkugeln schlagen aufgrund ihrer Trägheit mit hoher Energie auf das an den abgerundeten Stirnflächen befindliche Probengut auf. Dadurch wird das Produkt zerkleinert und durch die Becher- und Kugelbewegung gleichzeitig durchmischt. In dieser Arbeit wurden Mahlbecher und Mahlkugeln aus verschiedenen Materialien eingesetzt. Dabei wurden zunächst ein Mahlbecher aus Achat mit einem Kammervolumen von 5 ml sowie vier Achat-Mahlkugeln mit einem Durchmesser von 7 mm verwendet. Der untere Teil des Mahlbechers wurde mit den Mahlperlen bestückt und dann mit der angeriebenen Cholesterol-Suspension vollständig aufgefüllt. Die Schwingungsintensität der Mahlbecher konnte mit Einstellung der Amplitude in Zehnerschritten von 10 bis 100 variiert werden, wobei die maximale Amplitude von 100 einer Schwingungsintensität von  $1800 \text{ min}^{-1}$  entspricht. Bereits bei einer Amplitude von 30 und einer Schwingungsdauer von 30 min konnte die Suspension in ein halbfestes System überführt werden, welches mikroskopisch ein dichtes Netzwerk aus fibrillenartigen Strukturen aufweist (siehe Abbildung 5.2). Die Erhöhung der Schwingungsdauer bis auf 90 min hatte keinen Einfluss auf die makro- und mikroskopische Beschaffenheit. Eine weitere Verlängerung der Prozesszeit auf 180 min führte entsprechend makroskopischer Beurteilung zu einer geringfügigen Verringerung der Viskosität. Durch die Erhöhung der Amplitude auf 60, konnte die Schwingungsdauer auf 20 min reduziert werden. Eine weitere Reduzierung der Herstellungszeit auf 15 min bedarf der Verwendung der höchsten Amplitude. Da die gewonnene Produktmenge mit diesem Verfahren weniger als 2 g betrug, wurde in einem weiteren Versuch ein Zirkoniumdioxid-Mahlbecher mit einem Kammervolumen von 10 ml und drei Mahlkugeln aus gleichem Material verwendet. Die Schwingungsdauer von 30 min reichte bei einer Amplitude von 30 nicht aus, um das Produkt zu gelieren, sondern musste auf 60 min erhöht werden. Das dabei ausgebildete Produkt weist bei mikroskopischer Betrachtung sehr viele Partikel auf (siehe Abbildung 5.2), die wahrscheinlich auf Abrieb der Zirkonoxidmaterialien zurückzuführen sind. Bei Verwendung des größeren Mahlbechers mit einem Kammervolumen von 25 ml wurden Mahlperlen aus yttriumstabilisiertem Zirkonoxid (SiLibeads Typ ZY; 0,4 mm bis 0,6 mm; Sigmund Lindner GmbH, Warmensteinach) eingesetzt. Durch den Zusatz von Yttrium erhalten die Mahlperlen

eine besonders gute Abriebfestigkeit. Das bei einer Amplitude von 60 und einer Schwingungsdauer von 20 min ausgebildete halb feste Produkt zeigte auch einen deutlich geringeren Abrieb.

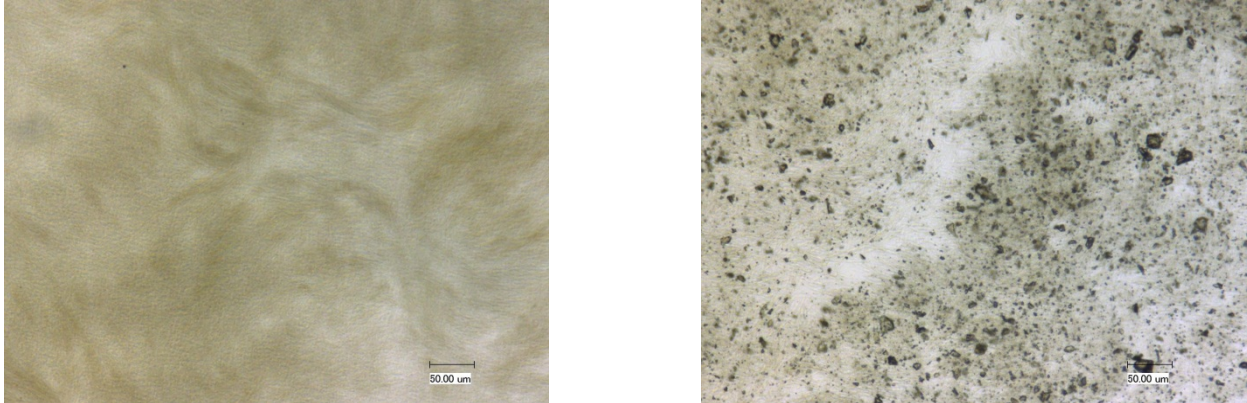


Abbildung 5.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit der Schwingmühle produzierten Proben:  
links: Achatmahlbecher und -kugeln, Amplitude 30, Zeit 30 min  
rechts:  $ZrO_2$ -Mahlbecher und -kugeln, Amplitude 30, Zeit 60 min

Nur im linear polarisierten Licht konnten geringe Anteile von kleinen Partikeln ( $< 1 \mu\text{m}$ ) detektiert werden. Um den Abrieb jedoch ganz zu unterbinden, wurde der Einsatz von Mahlperlen aus Polystyrol (0,61 mm bis 0,99 mm; Norstone Inc. Bridgeport, USA) getestet. Diese besitzen aufgrund ihrer viel geringeren Schüttdichte während des Mahlprozesses eine geringere kinetische Energie. Die Ausbildung des halb festen Produktes konnte auch mit diesen Mahlperlen bei gleicher Parametereinstellung erreicht werden (siehe Tabelle 5.1). Zudem ist dieses Produkt frei von Abriebpartikeln. Die Abtrennung der kleinen Mahlperlen vom halb festen Produkt erfolgte durch leichtes Abpressen durch eine 100 ml Spritze, in welche ein Sieb mit einer Maschenweite von  $300 \mu\text{m}$  eingelegt war. Kurze Zeit nach dem Abfiltrieren der Mahlperlen trat jedoch Propylenglykol aus dem System aus, sodass dieses Verfahren nicht zur Herstellung größerer Produktmengen geeignet zu sein scheint.



## 5.1 Herstellungsmethoden

Tabelle 5.1: Übersicht der Herstellungsversuche mit der Schwingmühle

Mahlbecher	Mahlperlen	Amplitude	Zeit	Produktbeurteilung
Achat 5 ml	4 Achatperlen (Ø 4 mm)	30	30	homogenes, halbfestes Produkt
			60	
			90	
		60	180	homogenes, halbfestes Produkt, etwas geringere Viskosität
			20	homogenes, halbfestes Produkt
Zirkonoxid 10 ml	3 Zirkonoxidperlen (Ø 12 mm)	30	90	homogene, flüssige Suspension
			15	
			100	homogenes, halbfestes Produkt
Zirkonoxid 10 ml	3 Zirkonoxidperlen (Ø 12 mm)	30	30	homogene, flüssige Suspension
			60	homogenes, halbfestes Produkt mit Abrieb
Zirkonoxid 25 ml	25 g SiLibead- Mahlperlen (Ø 0,4-0,6 mm)	60	20	halbfestes Produkt, Flüssigkeitsaustritt, leichter Abrieb
	6 g Polystyrol- mahlperlen (Ø 0,61-0,99 mm)			

### 5.1.2 Hochleistungsdispergierer

Der Hochleistungsdispergierer Ultra-Turrax® T25 digital mit dem Dispergierwerkzeug S25N-25G (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) ist eine Zahnkranzdispergiermaschine, welche nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeitet. Dabei dreht sich ein gezählter Rotor mit sehr hoher Geschwindigkeit im ebenso gezählten Stator. Dadurch wird das Produkt axial in den Dispergierkopf gesaugt und anschließend radial durch die Schlitze der Rotor-Stator Anordnung gepresst (siehe Abbildung 5.3). Durch die großen Beschleunigungskräfte wird das Produkt von sehr starken Scher- und Schubkräften beansprucht. Die zwischen dem Rotor und Stator auftretenden turbulenten Strömungsverhältnisse sorgen zudem für eine optimale Durchmischung der Suspension.

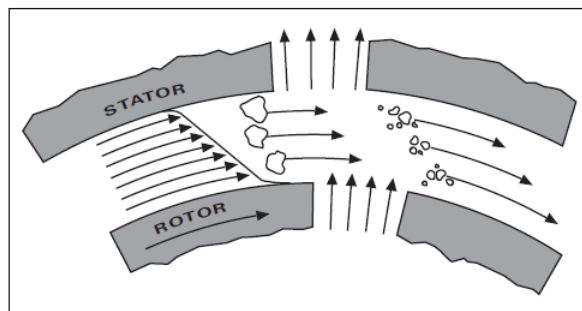


Abbildung 5.3: Dispergierprinzip eines Ultra-Turrax® (IKA-Werke, 2007)

Um zu testen, ob diese starken Dispergierkräfte zur Ausbildung des fibrillären Systems geeignet sind, wurden 50 g einer frisch hergestellten 5%igen Cholesterol-Suspension in ein 100 ml Becherglas überführt und zunächst für 10 min bei geringster Geschwindigkeit (3200 U/min) dispergiert. Nach dieser Zeit konnte noch keine Veränderung der Viskosität beobachtet werden, sodass das Produkt für weitere 10 min behandelt wurde. Auch danach trat keine Verdickung des Systems ein. Die Verwendung einer höheren Umdrehungsgeschwindigkeit (17200 U/min) führte bereits nach 1,5 min zu einem starken Temperaturanstieg auf 51 °C, während das Produkt weiterhin flüssig blieb. Wie in Abschnitt 5.1.6 noch näher beschrieben wird, wirkt sich ein Temperaturanstieg über 45 °C negativ auf die Bildung der flüssigkristallinen Phase aus. Somit ist der Hochleistungsdispergierer generell nicht zur Herstellung des halbfesten Cholesterol-Systems geeignet.

### 5.1.3 Planeten-Mischer

Als Planeten-Mischer wurde ein Thinky Mixer Typ ARE-250 (Thinky Corporation, Tokio, Japan) verwendet. Dieser dient zum Mischen, Dispergieren und Entgasen verschiedenster Proben. Durch Überlagerung zweier Bewegungen des Mischbehälters – einer Zentrifugal- und einer Rotationsbewegung – resultiert ein hocheffizienter Mischvorgang. Da die Technik ohne Rührer auskommt, erfolgt keine Zerstörung des Probenmaterials. 100 g einer frisch hergestellten Cholesteroll-Suspension wurden in einen 200 ml Mischbehälter aus Hochdruckpolyethylen gefüllt und mit maximaler Rotationsgeschwindigkeit (800 U/min) und maximaler Zentrifugalbewegung (2000 U/min) behandelt. Die höchste einstellbare Prozesszeit betrug 30 min. Nach dieser Zeit und auch nach mehrmaligem Durchlaufen dieses Prozesses konnte keine Verdickung des Systems beobachtet werden. Somit ist auch diese Prozesstechnik nicht zur Ausbildung des flüssigkristallinen Systems geeignet.

### 5.1.4 Hochdruckhomogenisator

Der Hochdruckhomogenisator Gaulin Micron Lab 40 (APV Gaulin GmbH, Lübeck) besteht aus einer Hochdruckkolbenpumpe mit nachgeschaltetem Entspannungsventil. Dieses setzt sich aus einem Ventilsitz (fest) und einem Ventil (einstellbar) zusammen. Zwischen diesen beiden Bauteilen befindet sich der Anprallring, welcher zur Einstellung eines definierten Ventilspaltes dient (siehe Abbildung 5.4). Bei Auslösen eines Arbeitshubs wird der vorgewählte Homogenisierdruck (100 bar bis 1600 bar) eingestellt. Dabei wird das Produkt durch den Ventilspalt gepresst. Häufig erreicht der dabei aufgebaute statische Druck den Dampfdruck der kontinuierlichen Phase, sodass in dieser Zone Dampfblasen entstehen. Da im weiteren Verlauf die Strömungsquerschnittsfläche wieder ansteigt, implodieren diese Dampfblasen und setzen energiereiche Stoßwellen frei, die zur Zerkleinerung bzw. Homogenisierung des Produktes führen. Dieses Prinzip der Kavitation ist jedoch nicht der einzige Zerkleinerungsmechanismus des Hochdruckhomogenisierens. Ebenso beteiligt sind das laminare und das turbulente Scherfeld im Ventilspalt. Der überwiegende Teil der aufgewendeten Energie dissipiert nutzlos und erhöht die Temperatur des Produktes (Jahnke, 2008).

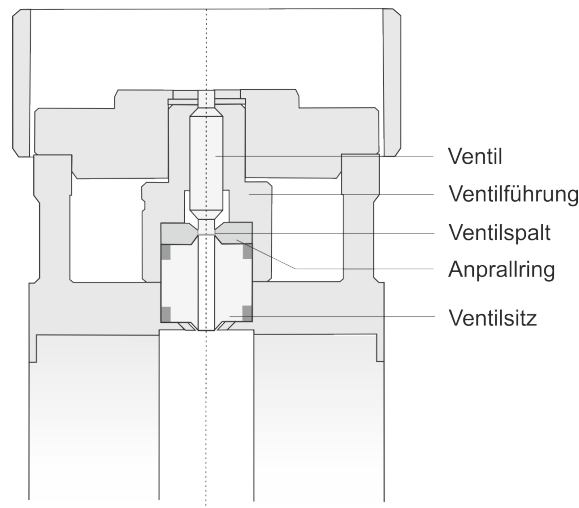


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung eines Hochdruckhomogenisators

Zur Aktivierung des Cholesterol-Systems wurden 40 ml einer frisch hergestellten Suspension in das Probengefäß eingefüllt. Das angeschlossene Wasserbad wurde zur Kühlung auf 15 °C und der Homogenisierdruck auf 1000 bar eingestellt. Nach jedem Arbeitshub wurde das Produkt zusammen mit dem Probengefäß auf Eis gestellt, um die Produkttemperatur wieder zu reduzieren. Nach sieben durchgeführten Arbeitshüben wurde eine sehr homogene Suspension erhalten, die jedoch flüssig war und keine Verdickung des Systems aufwies. Da die maximale Produkttemperatur nur 39 °C betrug, kann das Misslingen dieser Prozesstechnik nicht mit der Temperaturbelastung begründet werden.

### 5.1.5 Rührwerkskugelmühle

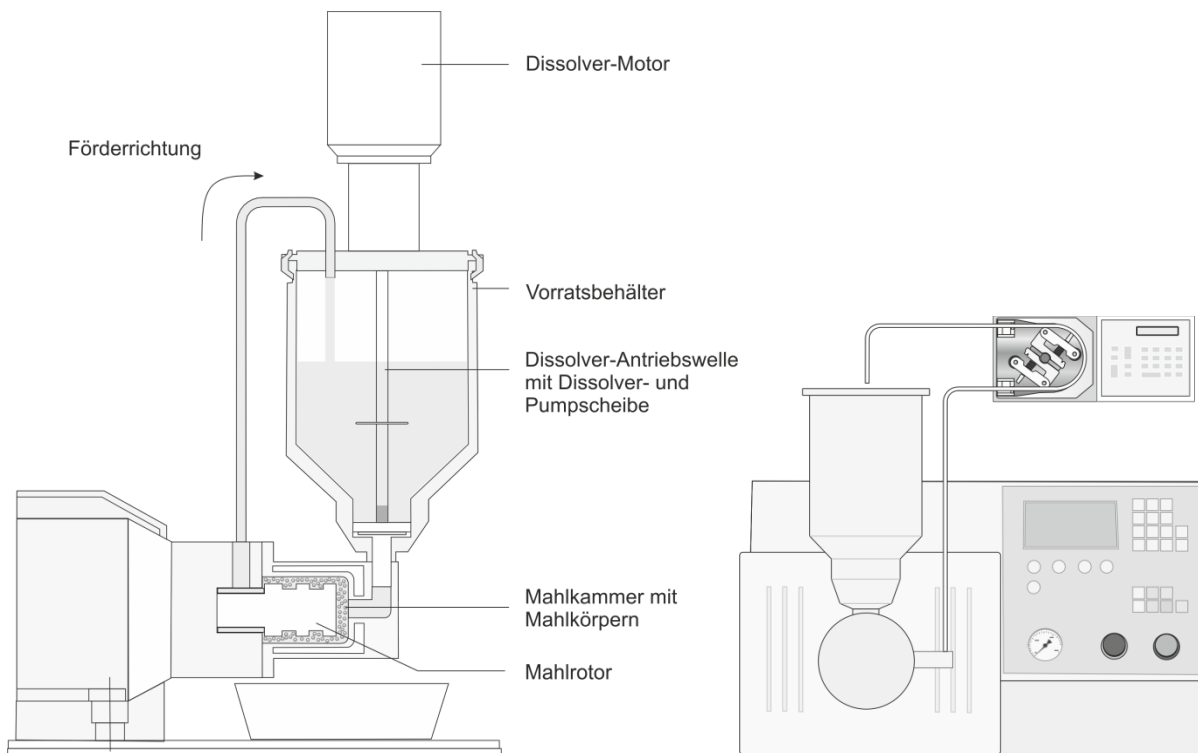
Die verwendete Perlmühle DISPERMAT SL 5 der Firma VMA Getzmann (VMA Getzmann, Reichshof) ist eine Rührwerkskugelmühle mit horizontaler Mahlkammer, welche ein Volumen von 50 ml besitzt und von einem Kühlmantel umgeben ist. Die Mahlkammer ist mit losen Mahlkugeln gefüllt, die von einem Rotor bewegt werden. Auf der Mahlkammer ist ein Vorratsgefäß mit einem Volumen von ca. 1000 ml aufgesetzt. Die Förderung der Suspension kann einerseits mit einer Pump- und Rührereinheit (Dissolver) erfolgen, welche sich auf dem Vorratsgefäß befindet. Das Produkt wird dabei ständig in Bewegung gehalten und nach unten in die Mahlkammer gedrückt. Andererseits kann eine Schlauchpumpe zur Produktförderung genutzt werden.

Die Trennung zwischen Suspension und Mahlkörpern wird durch einen dynamischen Reibspalt ermöglicht. Dieser befindet sich zwischen dem Rotor und der Rückwand der

## 5.1 Herstellungsmethoden

---

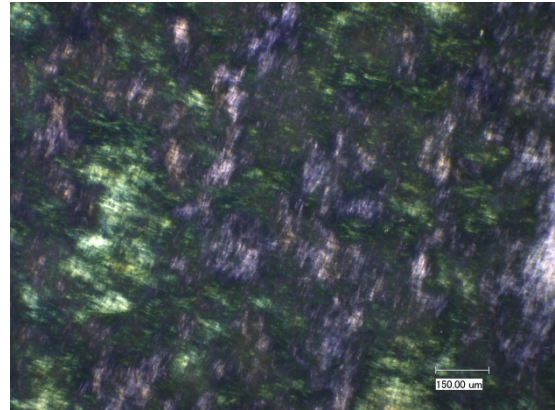
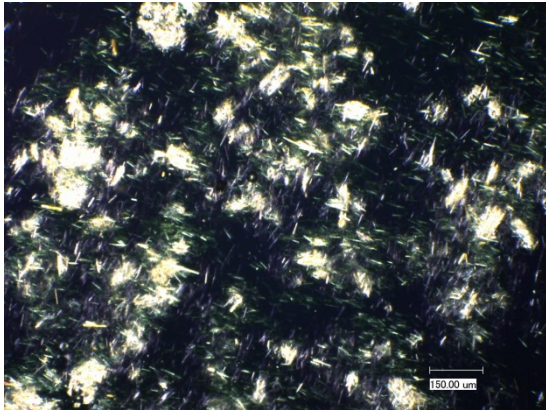
Mahlkammer und kann auf eine definierte Breite eingestellt werden. Beim Zirkulationsbetrieb wird die Zubereitung aus dem Produktauslassstutzen wieder in den Vorratsbehälter gefördert. Andererseits kann auch im Passageverfahren gearbeitet werden, wobei die Suspension in einem Gefäß aufgefangen und für eine weitere Passage wieder in den Vorratsbehälter gefüllt wird.



**Abbildung 5.5:** Schematische Darstellung der Rührwerkskugelmühle im Zirkulationsbetrieb, links mit Dissolver, rechts mit Schlauchpumpe

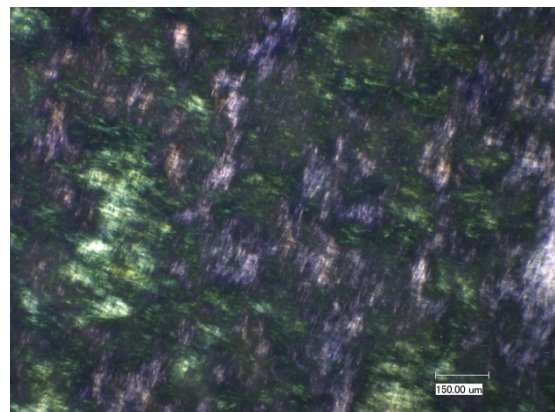
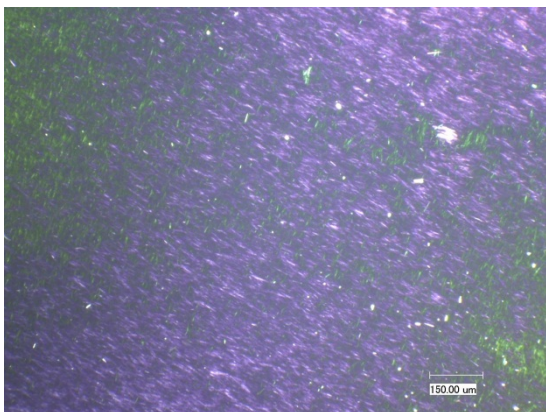
Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung des fibrillären Systems mit der Rührwerkskugelmühle prinzipiell möglich ist. Die Güte des Produktes bezüglich der Ausprägung des fibrillären Netzwerkes, der Viskosität und des Vorhandenseins von kristallinen Strukturen hängt dabei von einer Vielzahl von Prozessparametern ab. So spielt beispielsweise das Material und die Größe der verwendeten Mahlperlen ebenso eine wesentliche Rolle, wie der Füllgrad der Kammer mit den Mahlperlen. Für die durchgeführten Herstellungsversuche wurden stets Mahlperlen aus yttriumstabilisiertem Zirkonoxid verwendet, welche sich durch extrem hohe Verschleißbeständigkeit auszeichnen. Dabei kamen SiLibeads Typ ZY (Sigmund Lindner GmbH, Warmensteinach) aus zwei Größenbereichen zum Einsatz: 0,4 mm bis 0,6 mm und 1,8 mm bis 2,0 mm. Der Füllgrad der Mahlkammer mit Mahlkörpern wurde zwischen 40% und 80% variiert. Je kleiner die Mahlperlen und je mehr Mahlperlen genutzt

werden, umso größer ist der Energieeintrag und umso stärker bildet sich das flüssigkristalline System aus, welches sich durch eine hohe Viskosität und ein dichtes fibrilläres Netzwerk auszeichnet. Abbildung 5.6 zeigt beispielhaft den Einfluss des Füllgrades auf das mikroskopische Bild im linear polarisierten Licht. Während bei einem Füllgrad von 40% viele, kleine kristalline Nadeln zu sehen sind, ist bei einem Füllgrad von 80% ein dichtes fibrilläres Netzwerk mit typischen Schraffurmustern vorhanden.



*Abbildung 5.6: Lichtmikroskopische Aufnahmen im polarisierten Dunkelfeld von Zubereitungen, die mit unterschiedlichem Füllgrad der Mahlkammer hergestellt wurden links: 40%, rechts 80% Füllgrad*

Die Bewegung des Rotors kann leistungs- oder drehzahlgesteuert erfolgen. In den durchgeführten Versuchen wurde immer die Leistung vorgegeben, welche zwischen 35 W und 80 W variiert wurde. Abbildung 5.7 zeigt die mikroskopischen Bilder im polarisierten Dunkelfeld zweier Zubereitungen, deren Herstellungsweise sich in der eingetragenen Leistung des Mahlrotors unterscheiden. Die Zubereitung des linken Bildes wurde mit einer Leistung von 35 W, die des rechten Bildes mit 80 W hergestellt.



*Abbildung 5.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen im polarisierten Dunkelfeld von Zubereitungen, die mit unterschiedlichem Leistungseintrag des Mahlrotors hergestellt wurden links: 35 W, rechts 80 W Leistungseintrag*

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit höherem Energieeintrag ein dichteres fibrilläres Netzwerk ausgebildet wird, in dem keine kristallinen Strukturen mehr zu erkennen sind. Einen weiteren wichtigen Prozessparameter stellt die Anzahl der Passagen bzw. beim Zirkulationsbetrieb die Mahldauer dar. Welche Zeit eine Passage dabei in Anspruch nimmt, ist wiederum abhängig vom verwendeten Fördersystem: Dissolver oder Schlauchpumpe. Es lässt sich nicht allgemein beurteilen, welches System besser zur Produktförderung geeignet ist, da dieses stark von der Viskosität der Zubereitung abhängig ist. Hierin liegt ebenso die Problematik der Herstellung mit der Rührwerkskugelmühle. Wurden die Prozessparameter so eingestellt, dass ein hoher Energieeintrag und somit eine schnelle Ausbildung des flüssigkristallinen Systems erfolgte, so stieg die Viskosität der Zubereitung sehr schnell an und die Produktförderung wurde verlangsamt bzw. war nicht mehr möglich. Somit unterscheiden sich die Passagezeiten erheblich voneinander, je nachdem welche anderen Prozessparameter gewählt wurden. Bei Festlegung der Mahldauer, unterschieden sich die Anzahl der Passagen je nach Viskosität des Produktes. Somit ist es sehr schwierig, vergleichende Aussagen bezüglich des Einflusses einzelner Prozessparameter zu treffen. Da die Förderung des Produktes unter anderem durch den Reibspalt von 0,1 mm limitiert war, erfolgte ein Austausch eines bestimmten Abstandshalters, wodurch der Reibspalt auf 0,5 mm vergrößert wurde. In diesem Fall war nur noch der Gebrauch der größeren Mahlperlen möglich. Produkte, die mit diesem größeren Reibspalt von den Mahlkörpern abgetrennt wurden, weisen alle erheblich viele, große Kristalle auf (siehe Abbildung 5.8). Diese wurden wahrscheinlich zuvor durch den kleineren Reibspalt in der Mahlkammer zurückgehalten. War das System stark verfestigt und ließ sich nicht mehr pumpen bzw. fördern, war eine Trennung von Mahlperlen und Produkt auch außerhalb der Rührwerkskugelmühle nicht möglich. Daher ist auch dieses Gerät nicht zur Herstellung größerer Ansätze des flüssigkristallinen Systems geeignet.



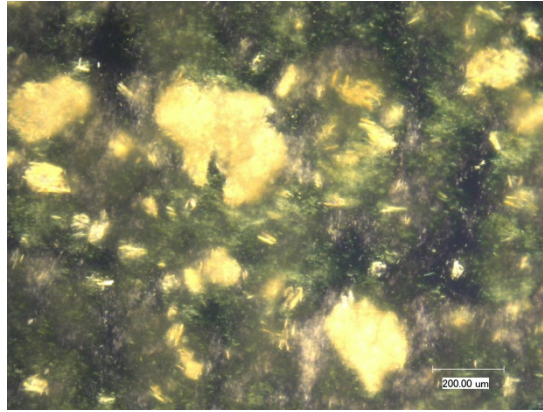


Abbildung 5.8: Lichtmikroskopische Aufnahme im polarisierten Dunkelfeld einer Zubereitung, die durch einen Reibspalt von 0,5 mm von den Mahlkörpern abgetrennt wurde

### 5.1.6 Magnetrührplatte

Zur Herstellung des flüssigkristallinen Systems wurden 20 g einer frisch angeriebenen 5%igen Suspension in ein 100 ml Becherglas überführt und bei verschiedenen Temperaturen auf einer Magnet- und Heizplatte IKAMAG<sup>®</sup> RET (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) für 30 min gerührt. Tabelle 5.2 und Abbildung 5.9 zeigen den Einfluss der Temperatur auf die Ausbildung des halbfesten, flüssigkristallinen Systems. Während bei einer Temperaturbehandlung von 30 °C am Herstellungstag noch keine fibrillären, fadenartigen Strukturen sondern viele, kristalline Nadeln vorhanden sind, zeigen die bei 37,5 °C, 40 °C und 42,5 °C hergestellten Systeme im polarisierten Dunkelfeld bereits typische Texturen eines flüssigkristallinen Systems. Noch deutlicher wird der Temperatureinfluss bei Mikroskopie der Proben fünf Tage nach Herstellung. Die bei 37,5 °C und 40 °C hergestellten Proben weisen zwar ein fibrilläres Netzwerk auf, jedoch sind Rekristallisate in Form von großen Nadeln vorhanden. Die bei 42,5 °C gerührte Probe zeigt im Gegensatz dazu keinerlei kristalline Partikel, sondern ein sehr dicht ausgeprägtes, fibrilläres Netzwerk. Eine weitere Temperaturerhöhung auf 45 °C führt zum vollständigen Umkristallisieren des Cholesterols in große Nadeln.



## 5.1 Herstellungsmethoden

Tabelle 5.2: Übersicht der Herstellungsversuche mit einer Magnetrührplatte bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur	Beurteilung der mikroskopischen Erscheinung	
	am Herstellungstag	5 Tage nach Herstellung
30 °C	viele Ausgangspartikel > 50 µm, keine fibrill. Struktur, große Nadeln	nur kristalline Nadeln bis 100 µm, kein fibrill. System
35 °C	viele Ausgangspartikel > 50 µm, keine fibrill. Struktur, große Nadeln	nur kristalline Nadeln bis 100 µm, kein fibrill. System
37,5 °C	fibrilläre Struktur erkennbar mit vielen Ausgangspartikeln	fibrilläre Struktur vorhanden mit vielen Rekristallisaten (Nadeln und Plättchen)
40 °C	dünne Fäden sichtbar, die typische Strukturen im pol. Licht zeigen, weniger Ausgangspartikel	fibrilläres Netzwerk sehr dicht ausgeprägt, teilweise einzelne sehr große Nadeln > 200 µm
42,5 °C	dünne Fäden sichtbar, die typische Strukturen im pol. Licht zeigen, weniger Ausgangspartikel	sehr feines, fibrilläres Netzwerk ohne Kristalle
45 °C	dünne Fäden sichtbar, die typische Strukturen im pol. Licht zeigen, weniger Ausgangspartikel	keine fibrillären Strukturen, Cholesterol vollständig in Nadeln > 200 µm umkristallisiert

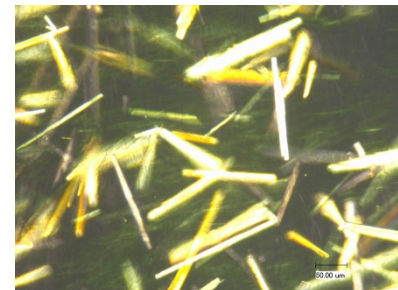
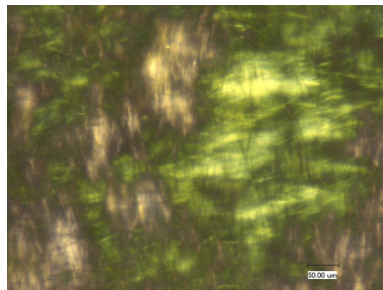
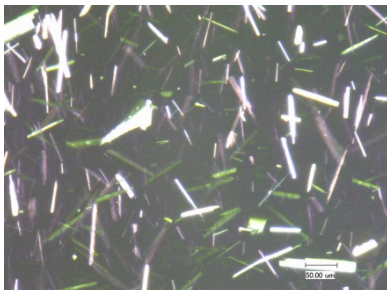


Abbildung 5.9: Lichtmikroskopische Aufnahmen im polarisierten Dunkelfeld von Zubereitungen, die auf der Magnetrührplatte bei 35 °C, 42,5 °C und 45 °C (von links nach rechts) hergestellt wurden; Aufnahmen wurden fünf Tage nach Herstellung angefertigt

Um die Bildung des flüssigkristallinen Systems mikroskopisch zu beobachten, wurden zu verschiedenen Zeiten des Herstellungsprozesses geringe Probenmengen entnommen und sofort mikroskopiert. Die dabei aufgenommenen Bilder sind im Folgenden dargestellt.

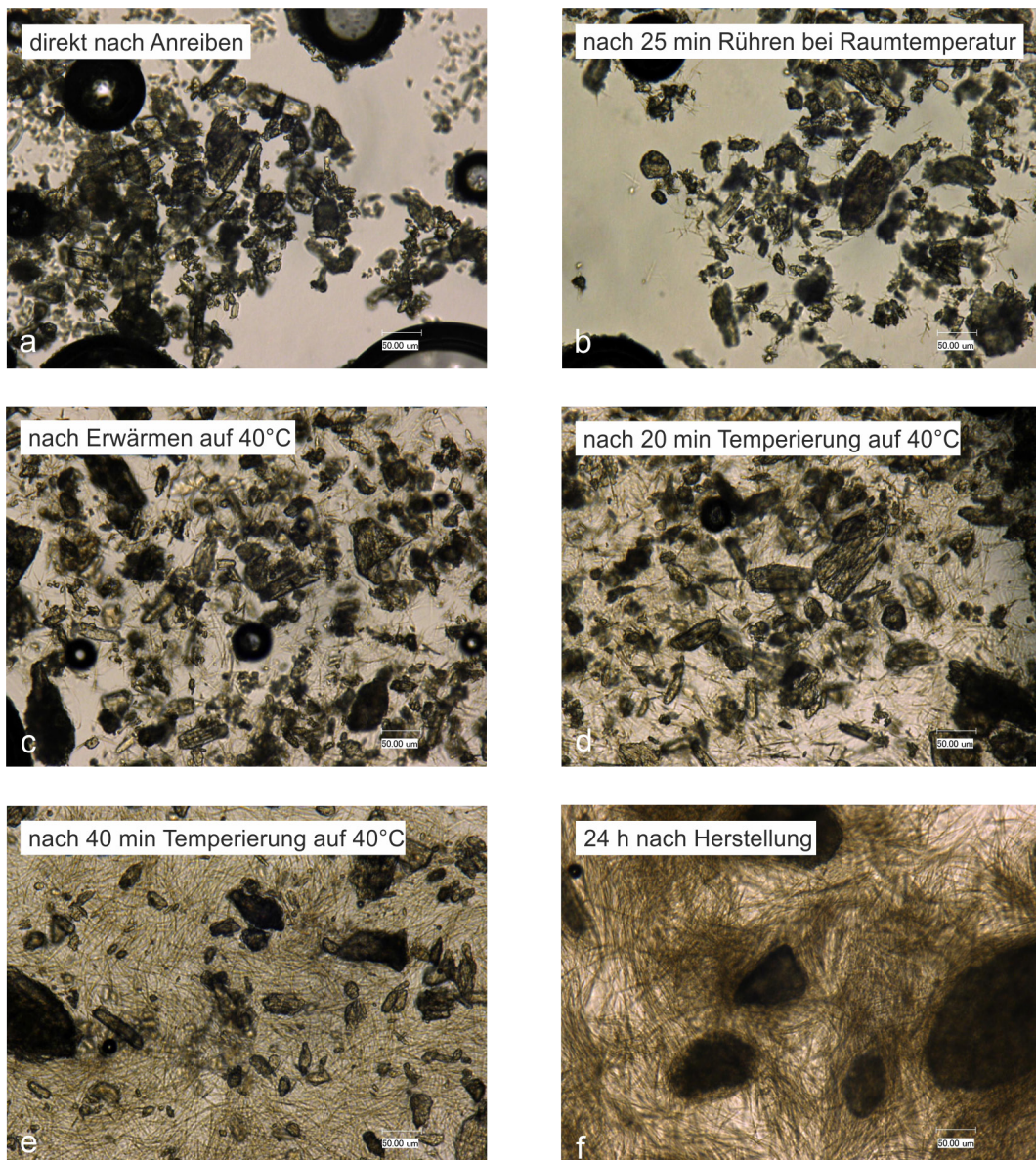


Abbildung 5.10: Verlauf der Fibrillenbildung einer auf der Magnetrührplatte bei 40 °C hergestellten Zubereitung

Das erste Bild zeigt die Ausgangspartikel des Cholesterols, sofort nach dem Anreiben mit Propylenglykol. Nach ca. 25 min Rühren auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur sind bereits winzige fädenartige Strukturen zwischen den großen Cholesterolpartikel zu sehen. Die Temperaturerhöhung auf 40 °C erfolgte innerhalb von 20 min. Nach 20 min Rühren bei konstanten 40 °C sind die fädenartigen Strukturen

bereits stärker ausgeprägt. Nachdem das System 40 min bei dieser Temperatur gerührt wurde, ist eine starke Zunahme der fibrillären, geschwungenen Strukturen zu verzeichnen, wobei die Anzahl der kristallinen Ausgangspartikel deutlich geringer wird. Nach 24 h des Herstellungsprozesses sind nur noch einzelne Cholesterol-Partikel  $> 50 \mu\text{m}$  vorhanden. Das fibrilläre System hat sich weiter ausgebildet, die Fäden scheinen länger geworden zu sein.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Herstellung des halbfesten, flüssigkristallinen Systems durch einfaches Rühren auf einer Magnetheizplatte bei ca.  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  möglich ist. Problematisch bei dieser Herstellungsmethode ist die geringe Reproduzierbarkeit des Temperaturverlaufs, da es sehr schwierig ist, mit der Magnetheizplatte eine geringe Temperatur von  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  über einen längeren Zeitraum konstant zu halten. Bereits eine geringe Temperaturabweichung über  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  führt wieder zur Verflüssigung der Formulierung, wobei sich hauptsächlich große, kristalline Nadeln ausbilden. Zudem kann das Endprodukt noch einige große Cholesterol-Partikel enthalten. Dieses ist auch durch Senkung der Cholesterol-Konzentration auf 3% nicht zu verhindern.

Aus dem mikroskopischen Bild b der Abbildung 5.10 kann geschlossen werden, dass die initiale Bildung der fadenförmigen Strukturen auch bei Raumtemperatur erfolgt. Um die Problematik der konstanten Temperierung zu umgehen, wurden daher weitere Untersuchungen vorgenommen, den Rührvorgang nur bei Raumtemperatur durchzuführen und anschließend das Produkt bei erhöhter Temperatur im Trockenschrank zu lagern. Tabelle 5.3 fasst die durchgeführten Versuche zusammen. Die frisch angeriebenen Suspensionen im Konzentrationsbereich von 2,5% bis 10% wurden in ein Weithalsglas oder in eine Schraubdeckelflasche gefüllt und für die entsprechende Zeit (5 h bis 72 h) auf einer Magnetrührplatte gerührt. Anschließend wurden die Proben in einem Trockenschrank bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Ansatzgröße der Zubereitungen variierte von 100 g bis 500 g.

*Tabelle 5.3: Übersicht der Herstellungsversuche mit Rührvorgang bei Raumtemperatur und anschließender Lagerung bei 50 °C*

<b>Konz.</b>	<b>Rührdauer</b>	<b>Dauer 50 °C</b>	<b>Beurteilung des mikroskopischen Bildes</b>
2,5%	5 h	7 d	nur kristalline Nadeln, kein fibrilläres Netzwerk
		-	überwiegend dünne, kristalline Nadeln
	17 h	7 d	Netzwerk mit langen, geschwungenen Fibrillen
		14 d	Netzwerk mit langen, geschwungenen Fibrillen
		21 d	Netzwerk mit langen, geschwungenen Fibrillen
	48 h	-	feine, lange Fibrillen mit vereinzelt Kristallen
		3 d	dichtes fibrill. Netzwerk mit großen Kristallen
		5 d	sehr feines Netzwerk, ohne Kristalle
	72 h	-	dichtes Netzwerk mit kurzen Fibrillen
		4 d	fibrillen sind länger, mehr geschwungen
3%	24 h	7 d	sehr dichtes, feines fibrilläres Netzwerk
		35 d	sehr dichtes, feines fibrilläres Netzwerk
5%	24 h	3 d	sehr dichtes, feines fibrilläres Netzwerk
		28 d	sehr dichtes, feines fibrilläres Netzwerk
7,5%	24 h	3 d	sehr dichtes Netzwerk, Kristalle vorhanden
		13 d	sehr dichtes Netzwerk, ohne Kristalle
10%	48 h	10 d	sehr dichtes, feines fibrilläres Netzwerk
		28 d	sehr dichtes, feines fibrilläres Netzwerk

Mit einer Rührdauer von 5 h konnte kein fibrilläres System gebildet werden, da die während des Rührvorganges gebildeten fadenartigen Strukturen wieder in große Nadeln auskristallisierten. Bei einer Rührdauer von 17 h bis 72 h war die Überführung der Cholesterol-Suspensionen in halb feste, flüssigkristalline Zubereitungen erfolgreich. Bei Konzentrationen > 3% war ein Rühren nicht länger als 48 h möglich, da sich das System innerhalb dieser Zeit bereits stark verdickte und der Magnetrührer nicht mehr bewegt wurde. Durch eine lange Rührzeit von 72 h bei geringen Cholesterol-Konzentrationen war das fibrilläre System am Ende der Herstellungsphase zwar sehr gut ausgebildet, jedoch war es noch fließfähig. Im Ruhezustand erfolgte innerhalb von

## 5.1 Herstellungsmethoden

---

24 h die Verfestigung. Systeme mit einem Cholesterolgehalt über 10% ließen sich nach dieser Methode nicht produzieren, da sie zu schnell verdicken und nicht lange genug gerührt werden konnten. Am Ende des Rührvorganges enthielten die meisten Produkte bereits ein gut ausgebildetes fibrilläres Netzwerk, in dem allerdings noch zahlreiche Rekrystalle enthalten waren. Um diese zu entfernen, wurden die Zubereitungen im Trockenschrank bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen (30 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C) gelagert. Bei allen Bedingungen außer 50 °C blieben die Rekrystalle vorhanden. Nach mindestens fünf Tagen Lagerung bei 50 °C konnten in keinem Produkt Cholesterolkristalle mikroskopisch nachgewiesen werden. Die Lagerung unter diesen Bedingungen kann dabei bis zu fünf Wochen andauern, ohne dass sich die makroskopische und mikroskopische Beschaffenheit der Zubereitungen verändern. Eine anschließende Lagerung bei Raumtemperatur änderte die Beschaffenheit der Produkte ebenfalls nicht.

Um zu beurteilen, ob dieses Phänomen mit einer gesteigerten Löslichkeit von Cholesterol in Propylenglykol begründet werden kann, wurde die Sättigungskonzentration von Cholesterol in Propylenglykol bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (Methode siehe Anhang). Die Abbildung 5.11 zeigt die Ergebnisse dieser Konzentrationsbestimmung.

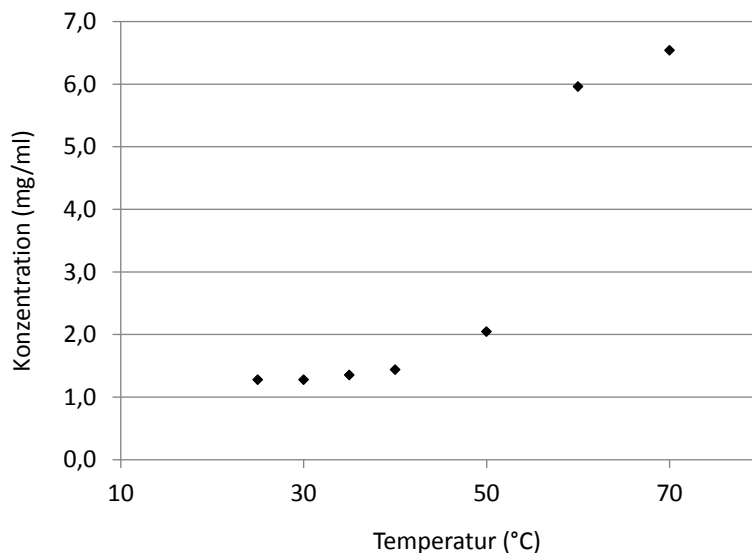
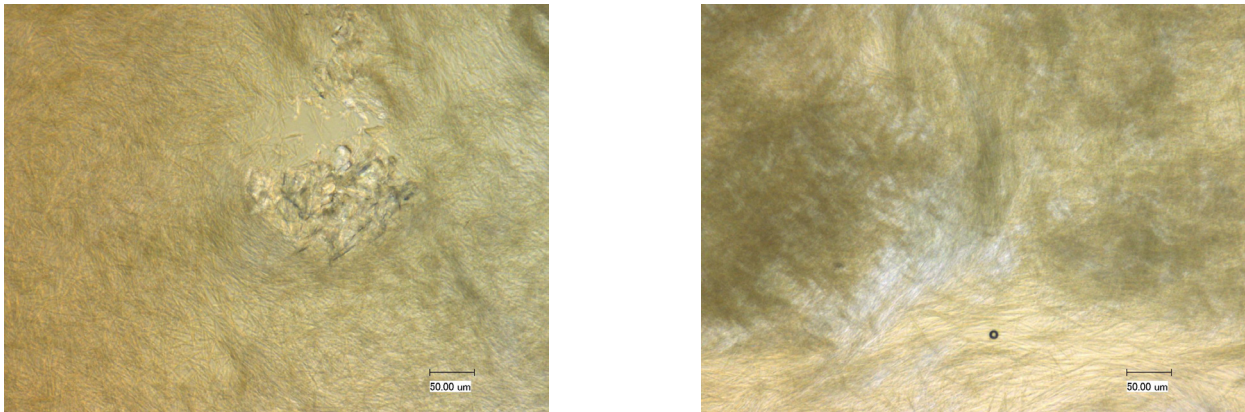


Abbildung 5.11: Sättigungskonzentration von Cholesterol in Propylenglykol in Abhängigkeit von der Temperatur

Tatsächlich zeigt Cholesterol einen leichten Anstieg der Löslichkeit im Propylenglykol bei 50 °C gegenüber niedrigeren Temperaturen, sodass die Rückbildung der



Cholesterolkristalle in der Formulierung durch die mehrtägige Lagerung bei 50 °C damit begründet werden kann. Abbildung 5.12 zeigt mikroskopische Bilder einer 5%igen Zubereitung nach 48stündigem Rühren vor und nach anschließender siebentägiger Lagerung bei 50 °C. Während das fibrilläre Netzwerk durch diese Temperierung nicht beeinflusst wurde, lösten sich die Cholesterolkristalle auf.



*Abbildung 5.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer 5%igen Zubereitung nach 48 h Rühren auf einer Magnetrührplatte. Links vor, rechts nach anschließender Lagerung bei 50 °C*

Besonders wichtig bei dieser Herstellungsmethode war die Art und Weise des Rührens des Magnetrührers. Die Größe des Magnetrührers wurde stets der Größe des Gefäßes, in dem die Herstellung erfolgte, angepasst. Dabei durfte sich der Magnetrührer nur so stark bewegen, dass nicht die gesamte Masse der Zubereitung durchmischte wurde. An der „Grenze“ zwischen unterer bewegter Masse und oberer weniger bewegter Masse bildeten sich nach ca. 20 h Prozesszeit schimmernde Bereiche (siehe Abbildung 5.13), die einen ersten Hinweis auf den flüssigkristallinen Charakter der Formulierung geben. Abbildung 5.14 zeigt das mikroskopische Bild einer aus diesem Bereich entnommenen Probe. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fibrillen sehr lang, stark geschwungen und sehr dicht nebeneinander in Bündeln gepackt sind.



Abbildung 5.13: 3%ige Zubereitung im Herstellungsgefäß nach 17stündigem Rühren mit „schimmernden Bereichen“ in Grenzschicht zwischen bewegter und unbewegter Masse sowie am Gefäßboden

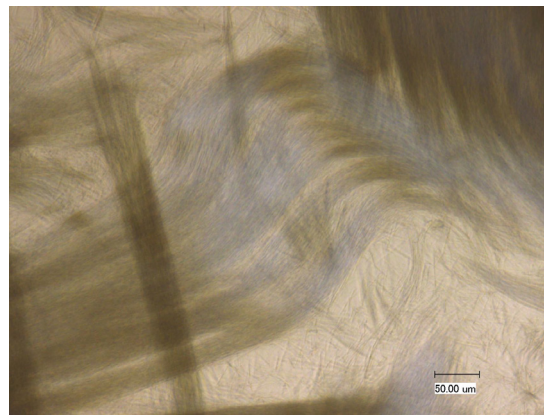


Abbildung 5.14: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Probe aus „schimmerndem Bereich“ einer 3%igen Zubereitung nach 17stündigem Rühren

### 5.1.7 Zusammenfassung der Herstellungsmethoden

Die Überführung der Cholesterol-Suspension in eine halbfeste, flüssigkristalline Zubereitung ließ sich mit Hilfe der Schwingmühle, der Rührwerkskugelmühle sowie durch einfaches Rühren auf der Magnetrührplatte bei Raumtemperatur oder bei ca. 40 °C realisieren. Nicht erfolgreich waren hingegen die Herstellungen mit dem Ultra-Turrax<sup>®</sup>, u. a. aufgrund einer zu hohen Temperaturbelastung, mit dem Planetenmischer, da hier nur sehr kurze Prozesszeiten gewählt werden konnten, und mit dem Hochdruckhomogenisator. Bei Nutzung der Schwingmühle war die Ansatzgröße auf ca. 2 g begrenzt, da bei Einsatz der größeren Mahlbecher aus Zirkonoxid Abrieb das Produkt verunreinigte. Mit der Rührwerkskugelmühle konnte keine reproduzierbare Herstellung gewährleistet werden, da das Produkt bei entsprechender Parametereinstellung schnell verdickte und dann nicht oder nur sehr langsam gefördert

werden konnte. Folglich resultierten unterschiedliche Prozesszeiten. Zudem konnten die Mahlkörper nicht mehr vom Produkt getrennt werden. Die Herstellung des fibrillären Systems ließ sich bis zu einer Ansatzgröße von 500 g durch Rühren auf einer Magnetrührplatte realisieren. Dabei wurde die längere Prozesszeit von ca. 24 h bei Raumtemperatur der kürzeren Herstellung von ca. 1 h bei 40 °C vorgezogen, da die Temperierung mit einer Heizplatte wenig reproduzierbar war.

Für die Schlussfolgerung, welche Bedingungen für die „Aktivierung“ des Systems notwendig sind, muss die Art und Geschwindigkeit der mechanischen Beanspruchung und der resultierende Energieeintrag betrachtet werden. Bei den Prozessen in der Schwing- und Rührwerkskugelmühle, dem Hochdruckhomogenisator und dem Ultra-Turrax<sup>®</sup> liegt eine Beanspruchung zwischen zwei Festkörperoberflächen vor. Es resultiert ein Formzwang, der je nach Gerät unterschiedlich stark ausgeprägt ist. In der Schwing- und Rührwerkskugelmühle herrschen je nach Beanspruchungsgeschwindigkeit Druck- und/oder Schlagbeanspruchung. Während im Ultra-Turrax<sup>®</sup> sehr hohe Scherkräfte realisiert werden, ist im Hochdruckhomogenisator neben der Scherung im Ventilsplatt auch die Kavitation verantwortlich für die Zerkleinerung und Homogenisierung des Produktes. Beim Rühren des Produktes in einem Becherglas mit einem Magnetrührer liegen nur sehr schwache Scherkräfte vor, die jedoch – bei Raumtemperatur – ca. 24 h andauern müssen, um die Formulierung in ein halbfestes System zu überführen. Trotzdem kann geschlussfolgert werden, dass ein sehr hoher Energieeintrag für die mechanische Aktivierung des Systems nicht notwendig ist. Nach 20stündigem Rühren im Becherglas bildeten sich zwischen bewegter und weniger bewegter Schicht, sowie am Gefäßboden und am Rührfisch schimmernde Bereiche aus, die besonders kräftige Fibrillenstrukturen aufweisen. Dieses Phänomen lässt vermuten, dass durch das Aneinanderreiben der Cholesterolpartikel die Bildung der flüssigkristallinen Strukturen induziert wird. Diese Partikel-Partikel-Reibung ist ebenso in den Mahlkammern der Schwing- und Rührwerkskugelmühle gegeben, während sie beim Hochdruckhomogenisieren und Dispergieren mit einem Ultra-Turrax<sup>®</sup> weniger auftritt. Zusätzlich kann die Aktivierung des Systems durch thermische Behandlung beschleunigt werden, da die Prozesszeit von 24 h bei Raumtemperatur auf 1 h bei 40 °C reduziert werden konnte. Dabei muss strikt auf eine konstante Temperierung geachtet werden, da bereits ab 45 °C große, nadelförmige Kristalle entstehen. Ist die fibrilläre Struktur jedoch ausgebildet, können anschließend durch eine Lagerung bei 50 °C noch vorhandene Cholesterolkristalle beseitigt werden.



### 5.2 Untersuchungen zur Rezepturoptimierung

#### 5.2.1 Cholesterolgehalt

Die Bildung des halbfesten, flüssigkristallinen Systems konnte in einem Cholesterolkonzentrationsbereich von 3% bis 10% realisiert werden. Ab einem Gehalt von 20% ließ sich das fibrilläre System nicht mehr produzieren, da ein Rühren bereits nach 5 h durch die pastenartige Konsistenz der Zubereitung nicht mehr möglich war. Mikroskopisch konnten zu diesem Zeitpunkt einige wenige fadenartige Strukturen detektiert werden. Überwiegend waren jedoch kristalline Ausgangspartikel des Cholesterols enthalten, die auch durch Lagerung bei 50 °C nicht beseitigt werden konnten. Bei einer Cholesterolkonzentration von 1% bildeten sich die fibrillären Strukturen zwar sehr gut aus, jedoch war das System makroskopisch sehr inhomogen, da das Propylenglykol durch den geringen Cholesterolanteil nicht ausreichend fixiert werden kann. Daher konnte bereits bei kleinsten Scherungen (z. B. Entnahme mit einem Spatel) eine Abscheidung des Propylenglykols beobachtet werden. Der Einfluss der Cholesterolkonzentration auf das mikroskopische Bild, die rheologischen und thermodynamischen Eigenschaften werden im Abschnitt 5.3 dargestellt.

#### 5.2.2 Pseudopolymorphe Modifikationen des Cholesterols

Wie bereits im Abschnitt 3.1.1 beschrieben, werden in der Literatur drei pseudopolymorphe Formen des Cholesterols genannt. Es kann als Anhydrat und Monohydrat vorliegen oder nach Fällung aus wasserfreiem Ethanol auch das Hemiethanolat bilden. Daher sollte untersucht werden, ob die Art der Pseudomodifikation einen Einfluss auf die Ausbildung der fibrillären Formulierung besitzt. Dazu wurde zunächst die Modifikation des kommerziell verfügbaren Cholesterols der Firma Sigma-Aldrich mittels differentieller Thermoanalyse (DSC) und Thermogravimetrie (TG) bestimmt. Abbildung 5.15 zeigt die Ergebnisse der DSC. Im ersten Aufheisschritt zeigte das Cholesterol einen kleinen endothermen Peak mit einem Onset von 45,3 °C sowie einen Schmelzpeak mit einer Onset-Temperatur bei 149,3 °C. Bei der zweiten Aufheizkurve trat das endotherme Ereignis bereits bei 39 °C auf und entspricht eher einem Phasenübergang. Dieses thermodynamische Verhalten ist vergleichbar mit Literaturangaben zum Cholesterolanhydrat, welches einen enantiotropen Phasenübergang nahe der Körpertemperatur bei 37 °C bis 39 °C aufweist und einen Schmelzpunkt bei ca. 150 °C besitzt (Loomis et al., 1979).

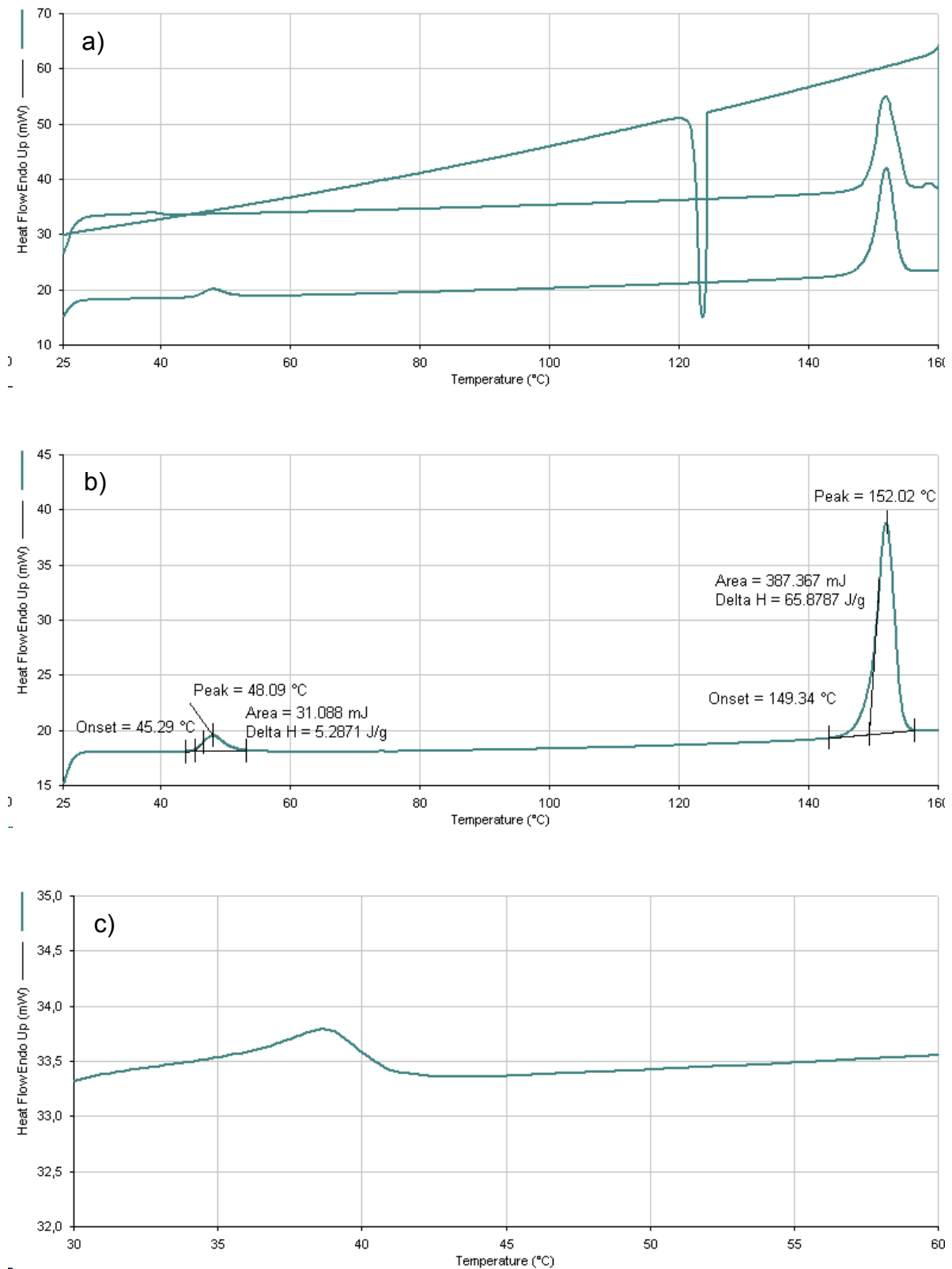


Abbildung 5.15: DSC-Kurven von unbehandeltem Cholesterol

Messparameter: 1. Schritt: 10 min 25 °C halten, 2. Schritt: aufheizen bis

180 °C mit 10 °C/min, 3. Schritt: abkühlen auf 25 °C mit 10 °C/min, 4. Schritt:

aufheizen bis 180 °C mit 10 °C/min

a: Übersicht der gesamten Messung mit 1. und 2. Aufheiz- sowie Abkühlkurve

b: 1. Aufheizkurve

c: Ausschnitt der 2. Aufheizkurve

## 5.2 Untersuchungen zur Rezepturoptimierung

Das TG-Ergebnis bestätigt ebenfalls, dass es sich bei dem Cholesterol um das Anhydrat handelt, da kein Gewichtsverlust während der Messung detektiert wurde (Ergebnis nicht dargestellt). Daraufhin sollte das Cholesterol-Monohydrat produziert werden. Dazu wurde das Ausgangsmaterial zunächst zweimal in Methanol umkristallisiert und anschließend in 95% (V/V) Ethanol bei ca. 50 °C gelöst. Nachdem der Ansatz langsam unter Rühren auf 28 °C abgekühlt wurde, wurde er auf eine Metallplatte ausgegossen und im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet. Das dabei entstandene Cholesterol-Hemiethanolat zeigte in der TG-Messung einen Gewichtsverlust bei 110 °C (Ergebnis nicht dargestellt), welcher durch die Ethanol-Verdampfung verursacht wird (Kaloustian et al., 2003). Um dieses Hemiethanolat in das Monohydrat zu überführen, wurde das Produkt in heißes Aqua bidest. gegeben und für 48 h bei 28 °C geschüttelt.

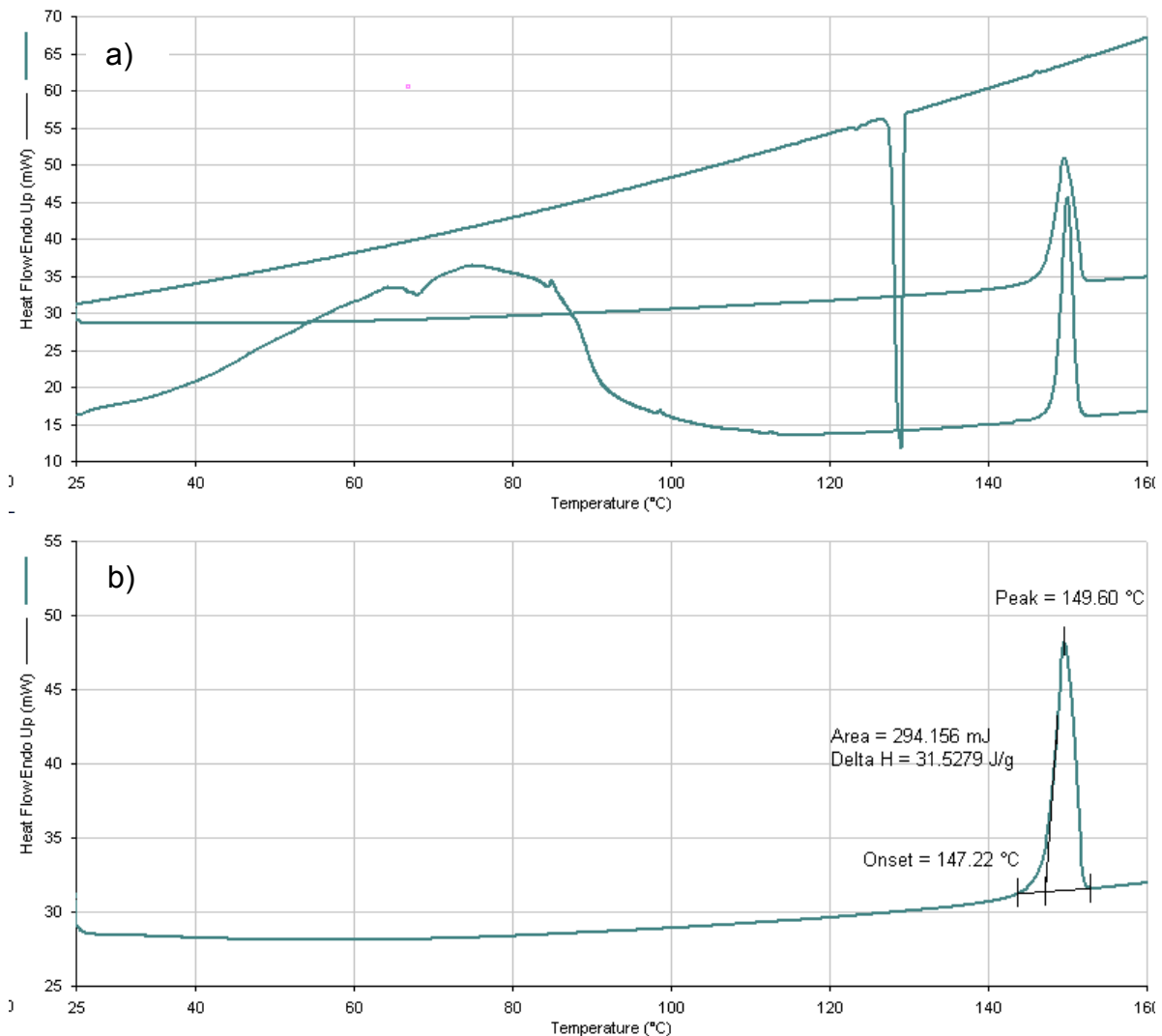


Abbildung 5.16: DSC-Kurven des produzierten Cholesterol-Monohydrates

Messparameter siehe Abbildung 5.15

a) Übersicht der gesamten Messung mit 1. und 2. Aufheiz- sowie Abkühlkurve  
b) 2. Aufheizkurve

Nach dem Abnutschen wurde das Cholesterol sofort in ein dicht verschlossenes Gefäß gefüllt. Aufgrund der großen Instabilität des Monohydrates wurde auf einen Trocknungsprozess verzichtet. Die DSC- und TG-Messungen erfolgten drei Tage nach Lagerung. Abbildung 5.16 zeigt die DSC-Ergebnisse des Endproduktes. Es ist ein breiter, endothermer Peak von 25 °C bis 100 °C vorhanden, welcher der Abgabe des Hydratwassers und eventuell anhaftenden Solvatwassers entspricht (Wada et al., 1992). Die zweite Aufheizkurve enthält kein endothermes Ereignis unterhalb des Schmelzpunktes, sodass das Vorliegen des Anhydrates ausgeschlossen werden kann. Bei der TG-Messung wurde ebenfalls eine Gewichtsabnahme zwischen 30 °C und 70 °C bestätigt (siehe Abbildung 5.17).

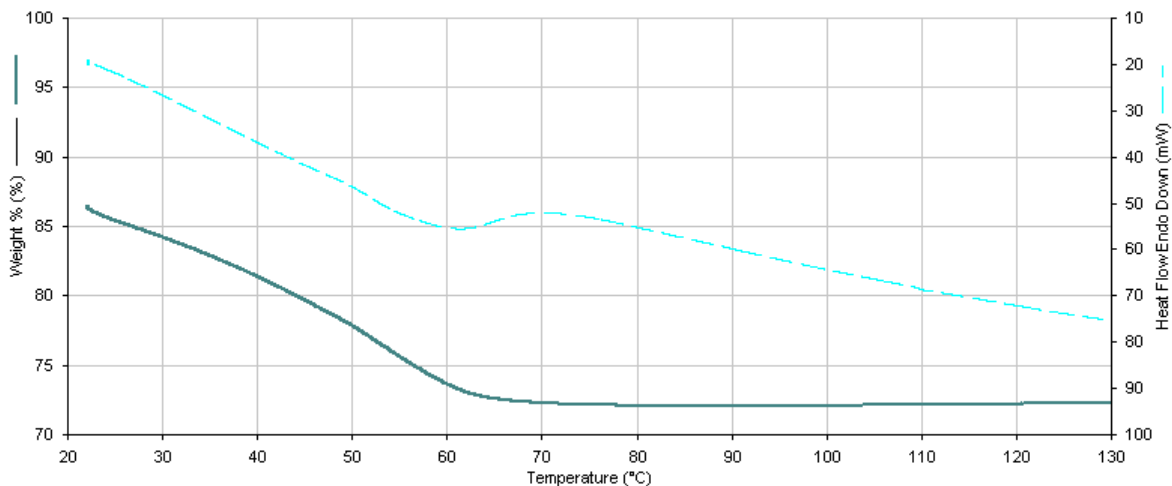


Abbildung 5.17: TG-Kurven des produzierten Cholesterol-Monohydrates  
 Messeinstellungen: zunächst 10 min bei 25 °C halten, dann mit 10 °C/min auf 180 °C heizen

Diese Massenabnahme kann jedoch stöchiometrisch nicht einem Monohydrat zugeordnet werden. Somit konnte zwar ein Hydrat, jedoch kein reines Monohydrat produziert werden. Da das Monohydrat unter normalen Raumbedingungen sehr instabil ist und sein Hydratwasser abgibt (Craven, 1976), wurde auf weitere Optimierungsversuche zur Bildung des Monohydrates verzichtet. Die Ausbildung des fibrillären Systems konnte mit dem gewonnenen Cholesterol-Hydrat in der Schwingmühle bei einer Amplitudenstärke von 30 und einer Prozesszeit von 40 min realisiert werden. Dabei waren keine Unterschiede hinsichtlich der makroskopischen und mikroskopischen Beschaffenheit gegenüber einem Produkt aus Cholesterol-Anhydrat zu verzeichnen. Daher scheint die pseudopolymorphe Form des Cholesterols keinen Einfluss auf die Ausbildung der fibrillären Struktur zu haben. Zudem ist die Relevanz des Monohydrates für die Produktion aufgrund der großen Instabilität nicht gegeben.

### 5.2.3 Austausch des Cholesterols

Um herauszufinden, ob geringe Änderungen der Molekülstruktur der fibrillenbildenden Substanz Auswirkungen auf den flüssigkristallinen Zustand haben, wurde Cholesterol durch das chemisch sehr ähnliche  $\beta$ -Sitosterol ausgetauscht. Dieses unterscheidet sich lediglich durch eine zusätzliche Ethylgruppe in der Seitenkette (Strukturformel siehe Abbildung 3.3). Das  $\beta$ -Sitosterol wurde dazu in 5%iger Konzentration mit Propylenglykol angerieben und für 48 h in einem Becherglas bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Prozesszeit konnten keine Verdickung des Systems und mikroskopisch keine fibrillenartigen Strukturen festgestellt werden.

### 5.2.4 Einsatz anderer Glykole und Alkohole

Um Informationen über die chemischen Strukturvoraussetzungen der flüssigen Komponente zur Ausbildung des halbfesten Systems mit Cholesterol zu erhalten, wurde das Propylenglykol durch verschiedene, flüssige Diole sowie Isopropanol und Glycerol ausgetauscht. Die Herstellung der Zubereitungen erfolgte sowohl mit der Schwingmühle mit Achatmahlbecher und -kugeln als auch durch Rühren bei 40 °C auf einer Magnetheizplatte. Die Cholesterolkonzentration betrug jeweils 5%. In Tabelle 5.4 sind die makroskopischen und mikroskopischen Beurteilungen der entstandenen Produkte zusammengefasst. Keine der eingesetzten Flüssigkeiten vermochte die Cholesterol-Suspension in eine halbfeste Zubereitung zu überführen. Es waren in keinem Produkt fibrilläre Strukturen nachweisbar.

Tabelle 5.4: Übersicht der Herstellungsversuche mit verschiedenen flüssigen Komponenten

flüssige Komponente	Herstellung mit	
	Schwingmühle	Magnetrührer
Ethandiol	flüssige Suspension keine fibrillären Strukturen	flüssige Suspension keine fibrillären Strukturen
1,2-Butandiol	flüssige Suspension keine fibrillären Strukturen	flüssige Suspension keine fibrillären Strukturen
1,2-Pentandiol	Cholesterol überwiegend in Lösung, keine fibrillären Strukturen	Lösung, keine fibrillären Strukturen
1,2-Hexandiol	Lösung, keine fibrillären Strukturen	Lösung, keine fibrillären Strukturen
1,2-Heptandiol	---*	flüssige Suspension keine fibrillären Strukturen
Glycerol 85%	---*	flüssige Suspension keine fibrillären Strukturen
Isopropanol	---*	Lösung, keine fibrillären Strukturen

\* Herstellung mit der Schwingmühle wurde nicht durchgeführt

Da sich das Cholesterol in 5%iger Konzentration in Pentandiol, Hexandiol und Isopropanol löste, wurde in diesen Lösemitteln eine höhere Konzentration von 7,5% eingesetzt. Dabei bildete das Cholesterol mit Pentandiol und Hexandiol flüssige Suspensionen, die ebenfalls keine fibrillären Strukturen enthielten. Der Ansatz von 7,5% Cholesterol in Isopropanol enthielt zwei nebeneinander existierende Phasen. Während der Großteil des Ansatzes gelöst war, entstand am Gefäßboden ein trübes, opaleszierendes Gel. Dieses enthielt sehr lange ( $> 500 \mu\text{m}$ ) und stark geschwungene Fibrillen, die ein sehr dichtes Netzwerk darstellten. Eine weitere Konzentrationserhöhung des Cholesterols auf 10% führte zu einer halbfesten Zubereitung mit sehr hoher Konsistenz. Das mikroskopische Bild zeigt in diesem Fall keine einzelnen Fibrillen, sondern weist im linear polarisierten Licht eine leichte, für flüssigkristalline Zubereitungen typische, Schraffur auf (siehe Abbildung 5.18).

## 5.2 Untersuchungen zur Rezepturoptimierung

Tabelle 5.5: Makroskopische und mikroskopische Beurteilung von Isopropanol-Zubereitungen unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen

Konzentration	Makroskopie	Mikroskopie
5%	klare Lösung	isotrope Zubereitung
7,5%	klare Lösung und trübes, opaleszierendes Gel	sehr lange (> 500 µm) und geschwungene Fibrillen, die ein dichtes Netzwerk ausbilden
10%	schnittfeste, weiße Zubereitung	im polarisierten Licht: typische schwarz-weiß Schraffur

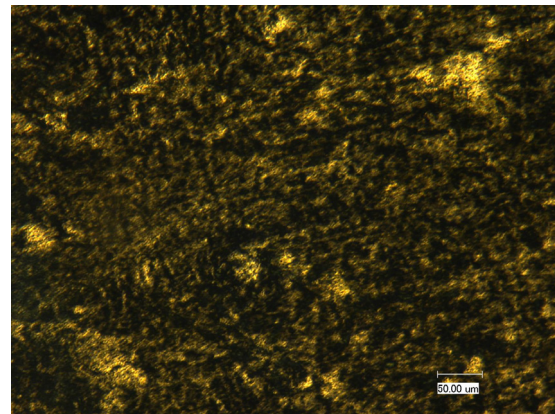
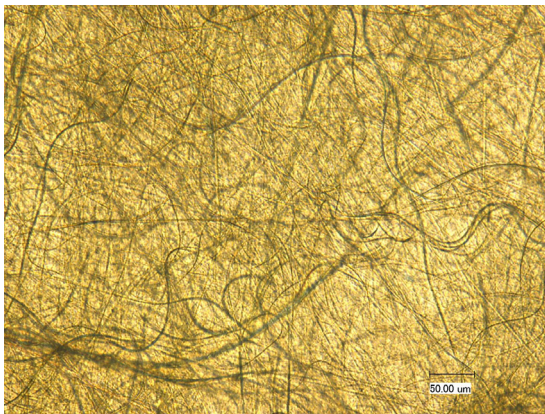


Abbildung 5.18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Isopropanol-Zubereitungen  
links: 7,5% Cholesterol  
rechts: 10% Cholesterol (im polarisierten Dunkelfeld betrachtet)

Dass Cholesterol mit Isopropanol flüssigkristalline Gele bildet, beobachteten W. Acree et. al bereits 1977, als sie Löslichkeitsbestimmungen von Cholesterol durchführten. Dabei stellten sie fest, dass je nach Cholesterol-Konzentration und Lagertemperatur neben transparenten Gelen auch flüssige oder kristalline Phasen sowie halbfeste, „weiße Massen“ auftreten können. Das transparente Gel erschien im Polarisationsmikroskop hauptsächlich isotrop und zeigt nur kleine Bereiche mit optischer Aktivität. Weitere Angaben zu Untersuchungen dieser Systeme oder zur Erklärung dieses Verhaltens wurden jedoch nicht genannt (Acree et al., 1977). Weiss und Térech beurteilen diese Beobachtungen als ein frühzeitig entdecktes Beispiel niedermolekulare Gele (Weiss et al., 2006).

Die Bildung fibrillärer Strukturen konnte somit von allen getesteten Lösemitteln nur in Propylenglykol und Isopropanol beobachtet werden.

### 5.2.5 Zusatz von Glykolen und Isopropanol

In einem weiteren Versuch sollte getestet werden, ob die Ausbildung des halbfesten Systems durch Zumischen anderer Lösungsmittel zu dem Propylenglykol beeinflusst wird und ob dadurch eventuell die Rekristallisation von Cholesterol bzw. das Vorliegen von kristallinen Ausgangspartikeln reduziert werden kann. Dafür wurde Propylenglykol jeweils mit Butandiol, Pentandiol und Isopropanol in einem Verhältnis von 9:1 und 7:3 gemischt. Mit dieser Mischung wurde das Cholesterol (Konzentration 5%) angerieben und für ca. 40 min bei 40 °C im Becherglas gerührt. Tabelle 5.6 zeigt eine Übersicht der makroskopischen und mikroskopischen Charakterisierungen der entstandenen Produkte. Zubereitungen, in denen der flüssigen Komponente 10% Butandiol oder Pentandiol beigemischt wurde, zeigten makroskopisch keine Veränderungen. Mikroskopisch konnten jedoch deutlich längere, stark geschwungene Fibrillen festgestellt werden, die neben einer Vielzahl von kristallinen Partikeln vorlagen.

Wurde der Butandiol-Anteil auf 30% erhöht, konnten nur noch vereinzelt Fibrillenstrukturen detektiert werden. Bei einem Pentandiolzusatz von 30% waren gar keine fibrillären Strukturen mehr enthalten. Alle Formulierungen, denen Isopropanol zugesetzt wurde, wiesen keine kristallinen Partikel mehr auf. Während die Fibrillenstruktur bei einem 10%igen Isopropanol-Anteil noch identisch zu reinen Propylenglykol-Systemen war, wurden die Fibrillen bei 30% deutlich kürzer und waren dichter gepackt. Bei 50% Isopropanolzusatz waren die Fibrillen sehr dünn und konnten bei 500facher Vergrößerung im Mikroskop nur schwach am Rand der Zubereitung detektiert werden. Makroskopisch lag bei dieser Zusammensetzung ein weißlich-opaleszierendes Gel vor.



## 5.2 Untersuchungen zur Rezepturoptimierung

---

Tabelle 5.6: Einfluss von Lösemittelzusätzen auf makroskopische und mikroskopische Eigenschaften des flüssigkristallinen Systems

Mischungsverhältnis	Makroskopie	Mikroskopie
<i>Propylenglykol : Butandiol</i>		
9:1	halbfeste, weiße Zubereitung	viele Partikel, sehr lange, stark geschwungene Fibrillen
7:3	halbfeste, weiße Zubereitung	nur noch ganz vereinzelt lange Fibrillen vorhanden
<i>Propylenglykol : Pentandiol</i>		
9:1	halbfeste, weiße Zubereitung	viele Partikel, sehr lange, stark geschwungene Fibrillen
7:3	halbfeste, weiße Zubereitung	nur Partikel, keine Fibrillen
<i>Propylenglykol : Isopropanol</i>		
9:1	halbfeste, weiße Zubereitung	gewohntes Fibrillensystem, ohne Partikel
7:3	halbfeste, weiße Zub., klumpig	Fibrillen sind kürzer und dichter gepackt, keine Partikel
5:5	weißlich- opakes Gel	Fibrillen sind deutlich feiner, nur noch sehr schwach am Rand der Zubereitung sichtbar, keine Partikel

---

Aus den beschriebenen Versuchen kann zusammengefasst werden, dass Propylenglykol und Isopropanol, in denen die Fibrillenbildung stattfindet, nicht rein vorliegen müssen, sondern mit anderen Lösemitteln, welche selbst nicht zur Fibrillenbildung befähigt sind (z. B. Butandiol, Pentandiol), gemischt werden können. Je nach Art und Konzentration der Lösemittel können die Dimensionen (Dicke und Länge) der haarähnlichen Strukturen beeinflusst werden.

### 5.2.6 Einfluss des Wasseranteils in Propylenglykol

Um den Einfluss des Wasseranteils in Propylenglykol auf die Ausbildung des flüssigkristallinen Systems zu überprüfen, wurde die Herstellung von Zubereitungen mit Propylenglykol unterschiedlichen Wassergehaltes durchgeführt.

#### 5.2.6.1 Bestimmung des Wassergehaltes

Die Quantifizierung des Wassergehaltes erfolgte volumetrisch mit einem Karl-Fischer-Titrator V20 (Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz). Die Gesamtgleichung der dabei ablaufenden Reaktion lautet:



Dabei stellt RN die Base Imidazol dar. Die Reaktion läuft solange ab, bis das gesamte Wasser verbraucht ist und damit freies Jod neben Jodid vorliegt. Die Endpunkterfassung erfolgt bei dem verwendeten Titrator bivoltametrisch. Das heißt, sinkt das Potential unter einen bestimmten, festgelegten Wert, ist der Endpunkt der Titration erreicht. Als Titriermittel wurde Hydranal<sup>®</sup> 1-comp 5 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet. Dieses wird als Einkomponentenreagenz bezeichnet, da es neben Jod auch Schwefeldioxid und Imidazol enthält. Für die Umsetzung von 5 mg H<sub>2</sub>O wird 1 ml dieses Titrationsmittel benötigt. Das Reaktionsgefäß enthält als Lösemittel Methanol, welchem lediglich Reaktionsbeschleuniger zugesetzt sind, um die Endpunkterfassung zu optimieren. Die Titereinstellung erfolgte wöchentlich mit einem Wasserstandard (Hydranal-Water Standard 10.0, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Die Probenmenge variierte je nach Wassergehalt zwischen 0,5 g und 2 g.

#### 5.2.6.2 Trocknung des Propylenglykols

Zur Trocknung des Propylenglykols wurde ein Molekularsieb mit einem Porendurchmesser von 3 Å verwendet (UOP Molekularsieb, Obermeier Spezialchemikalien, Bad Berleburg). Nur Moleküle, die einen kleineren Durchmesser haben, können an diesem Material adsorbieren. Um den Wassergehalt des Propylenglykols effektiv zu senken, wurde eine dynamische Trocknungsmethode gewählt. Dazu wurden drei Chromatographiesäulen (Ø 20 mm, Länge 400 mm) mit je 70 g des Molekularsiebes gefüllt und 800 g Propylenglykol nacheinander über jede Säule gegeben. Die Auffanggefäße enthielten ebenfalls 50 g des Molekularsiebes. Mit

Hilfe dieser Trocknungsmethode konnte der Wassergehalt des Propylenglykols von anfänglich 2,06 mg/g (SD 0,09 mg/g) auf 0,08 mg/g (SD 0,01 mg/g) gesenkt werden. Durch Mischen des getrockneten und des Ausgangs-Propylenglykols wurde eine Konzentrationsreihe mit steigendem Wassergehalt hergestellt. Für die Einstellung eines Wassergehaltes über 2 mg/g wurden dem Ausgangsprodukt entsprechende Wassermengen hinzugesetzt. Der tatsächliche Wassergehalt wurde anschließend jeweils mit dem KF-Titrator bestimmt (siehe Tabelle 5.7).

### 5.2.6.3 Herstellung der Zubereitungen unterschiedlichen Wassergehaltes

Die Herstellung der Zubereitungen mit den unterschiedlichen Propylenglykol-Typen wurde mit einer Ansatzgröße von 100 g auf einer Magnetrührplatte bei 40 °C durchgeführt. Dazu wurde das Cholesterol mit dem Propylenglykol in einer Fantaschale schrittweise angerieben und anschließend in ein 400 ml Becherglas überführt. Die Temperaturerhöhung auf 40 °C erfolgte unter Rühren innerhalb von 20 min. Dann wurde diese Temperatur für 45 min möglichst konstant bei ständigem Rühren von 150 U/min gehalten. Abschließend wurde die Zubereitung in eine 100 ml Braunglasflasche abgefüllt. Nach einwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte die mikroskopische und makroskopische Beurteilung der Formulierungen.

Aufgrund der Hygroskopizität des Propylenglykols wurden alle Arbeiten, bei denen Propylenglykol mit einem Wassergehalt < 2 mg/g verwendet wurde, in einer Glove-Box durchgeführt. In dieser wurde mit  $P_2O_5$  und Blaugel sowie durch  $N_2$ -Begasung die relative Luftfeuchtigkeit auf ca. 5% bei Raumtemperatur eingestellt. Tabelle 5.7 zeigt die makroskopischen und mikroskopischen Beurteilungen der hergestellten Formulierungen. Der Wasseranteil von 0,2% des kommerziell verfügbaren Propylenglykols scheint für die Ausbildung der fibrillären Strukturen nicht notwendig zu sein, da die Zubereitung mit dem geringsten Wassergehalt makroskopisch und mikroskopisch keinen Unterschied zu den herkömmlichen Formulierungen aufweist. Alle Ansätze, in denen Propylenglykol mit einem Wassergehalt von 0,08 bis 25,4 mg/g eingesetzt wurde, sind vom äußeren Erscheinungsbild vergleichbare, weiße, halbfeste und homogene Zubereitungen. Die fibrillären Strukturen sind in allen genannten Formulierungen vorhanden und bilden ein verzweigtes, dichtes Netzwerk aus. Den Formulierungen ist ebenso das Vorhandensein kristalliner Ausgangspartikel gemein. Ab einem Wassergehalt von 30 mg/g fand die Ausbildung des flüssigkristallinen Systems nicht mehr statt. Es waren überwiegend kristalline Cholesterolpartikel vorhanden, die

teilweise in große Nadeln umkristallisiert waren. Wasser scheint somit für die Ausbildung der flüssigkristallinen Strukturen nicht notwendig zu sein, sondern stört ab einem gewissen Anteil die Bildung der Fibrillen. Dies gibt einen Hinweis auf vorliegende Wasserstoffbrückenbindungen, die zur Ausbildung der Fibrillen notwendig sind (George et al., 2006).

*Tabelle 5.7: Einfluss des Wassergehalts des eingesetzten Propylenglykols auf die Beschaffenheit der Cholesterol-Zubereitungen*

<b>Wassergehalt in mg/g (SD)<sup>2</sup></b>	<b>Makroskopische und mikroskopische Beurteilung</b>
0,08 (0,01)	
0,27 (0,01)	
0,72 (0,09)	halbfeste, weiße, homogene Zubereitungen,
2,06 (0,09)	fibrilläre Strukturen sind in allen Zubereitungen vorhanden
5,32	und bilden ein dichtes Netzwerk,
15,9	jede Zubereitung enthält kristalline Ausgangspartikel
25,4	
30,0	Zubereitungen sind fließfähig; keine fibrillären Strukturen,
50,7	viele kristalline Ausgangspartikel, teilweise große Nadeln

### 5.2.7 Optimierung der Propylenglykol-Fixierung

Da das flüssigkristalline System nach einiger Lagerzeit und auch nach geringer Scherung (z. B. durch Verreiben in einer Fantaschale) einen Flüssigkeitsaustritt auf der Oberfläche zeigte, der unabhängig von der Cholesterolkonzentration auftrat, konnte die Zubereitung in dieser Zusammensetzung nicht als reine Grundlage genutzt werden. Zudem konnten keine rheologischen Messungen zur Charakterisierung des Systems durchgeführt werden, da bei der Einstellung des Messspaltes sehr viel Flüssigkeit aus der Zubereitung austrat. Da die Immobilisierung der flüssigen Komponente im fibrillären Netzwerk wahrscheinlich lediglich durch Kapillarkräfte und Oberflächenspannung erfolgt, ist verständlich, dass durch leichte Scherung und folgende Ausrichtung der Fibrillen Anteile des Propylenglykols wieder frei gesetzt werden. Um die Fixierung des

<sup>2</sup> Bei einem Wassergehalt bis 2 mg/g wurden 5fach-Bestimmungen, bei höherem Wassergehalt Doppelbestimmungen durchgeführt.

## 5.2 Untersuchungen zur Rezepturoptimierung

---

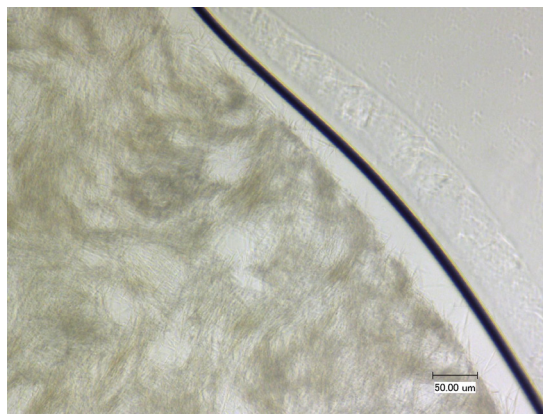
Propylenglykols zu verbessern und eine homogene Zubereitung zu erhalten, wurde zunächst die Einarbeitung einer 5%igen flüssigkristallinen Cholesterol-Formulierung in andere Vehikelsysteme erprobt. Das Verhältnis des eingearbeiteten Vehikelsystems zu flüssigkristalliner Probe betrug dabei 1:1. Die getesteten Systeme sind in Tabelle 5.8 dargestellt. Bei der Verarbeitung mit Vaseline lösten sich die fibrillären Strukturen sofort auf, wodurch das Propylenglykol freigesetzt wurde. Makroskopisch lagen somit zwei separate Phasen nebeneinander vor.

*Tabelle 5.8: Beurteilung der Einarbeitung eines 5%igen Cholesterol-Systems in verschiedene Vehikelsysteme im Verhältnis 1:1*

<b>Vehikelsysteme</b>	<b>Beurteilung</b>
Vaseline	Auflösung der Fibrillen, Vorliegen zweier separater Phasen
O/W-Creme Ung. emulsif. aquos., DAB	homogene Zubereitung ohne Fibrillen
Hydrogel 1% Carbopol <sup>®</sup> 981	zunächst homogene Zubereitung ohne Flüssigkeitsaustritt, nach 11 Tagen Lagerung Rekristallisation von Cholesterol
PEG-Salbe Macrogolsalbe, DAC	homogene Zubereitung ohne Veränderung der Fibrillen, jedoch mikroskopisch leichter Flüssigkeitsaustritt

Die Kombination mit der O/W-Creme lieferte zwar eine homogene Zubereitung, jedoch waren mikroskopisch ebenfalls keine Fibrillen mehr vorhanden. Bei der Verarbeitung mit PEG-Salbe konnte selbst nach vier Wochen Lagerung keine Veränderung der flüssigkristallinen Strukturen beobachtet werden. Makroskopisch war die Zubereitung homogen, mikroskopisch trat am Rand der Formulierung jedoch immer noch etwas Flüssigkeit aus. Die Einarbeitung in das Hydrogel war prinzipiell möglich, da die fibrillären Strukturen zunächst erhalten wurden und ein Flüssigkeitsaustritt makroskopisch nicht mehr beobachtet wurde. Auch mikroskopisch zeigte die Zubereitung einen stabilen Rand, sodass das Propylenglykol in diesem System besser fixiert wurde. Nach bereits 11 d Lagerung konnte jedoch eine Veränderung des Systems beobachtet werden. Es kam zum Auskristallisieren von Cholesterol in Form großer Nadeln sowie zu einem Rückgang der fibrillären Strukturen. Aus Erfahrung konnte dieses Verhalten auf den Wasseranteil im System zurückgeführt werden. Daher wurde anschließend untersucht, ob bestimmte Gelbildner in der Lage sind, reines Propylenglykol ohne Wasserzusatz zu gelieren. Die dazu eingesetzten Gelbildner sowie

ihre Geliereigenschaften sind in Tabelle 5.9 aufgeführt. Demnach sind lediglich Pemulen® TR-1, Kollidon® 90 und Aerosil® 200 in der Lage, reines Propylenglykol in ein Gel zu überführen. Bei einer Einsatzkonzentration von 5% sind die Gele mit den Gelbildnern Kollidon® 90 und Aerosil® 200 jedoch nur schwach geliert. Zudem weisen die Gele eine leichte Trübung auf. Abbildung 5.19 zeigt das mikroskopische Bild eines 10%igen Cholesterol-Systems, in welches 5% Aerosil® 200 eingearbeitet wurde. Es ist deutlich zu sehen, dass der Rand der Zubereitung nicht stabil ist, sondern eine Phasenseparation auftritt. Zudem ist die Formulierung nicht homogen.



*Abbildung 5.19: Lichtmikroskopische Aufnahme eines 10%igen Cholesterol-Systems, in welches 5% Aerosil® 200 eingearbeitet wurde.*

Beim Pemulen® TR-1 hingegen reichte eine Konzentration von 1% aus, um aus Propylenglykol ein festes, klares Gel auszubilden. Die Gelierung findet hierbei nach Neutralisation statt. Zunächst erfolgte diese durch Zugabe von 0,2 N Natriumhydroxidlösung. Da jedoch nach Einarbeitung verschiedener, auch nicht ionischer Wirkstoffe wieder eine leichte Verflüssigung des Geles beobachtet wurde, kam anschließend Ethylendiamintetrapropanol (EDTP) als Neutralisationsmittel zum Einsatz. Durch dieses Neutralisationsmittel werden Gele ausgebildet, die bekanntermaßen weniger empfindlich gegenüber ionischen und pH-Wert beeinflussenden Zusätzen sind.

Abbildung 5.20 zeigt mikroskopische Bilder einer 5%igen flüssigkristallinen Zubereitung mit und ohne Zusatz von Pemulen® TR-1. Durch den Gelbildner wird die Formulierung sehr homogen und zeigt keinen Flüssigkeitsaustritt am Rand.

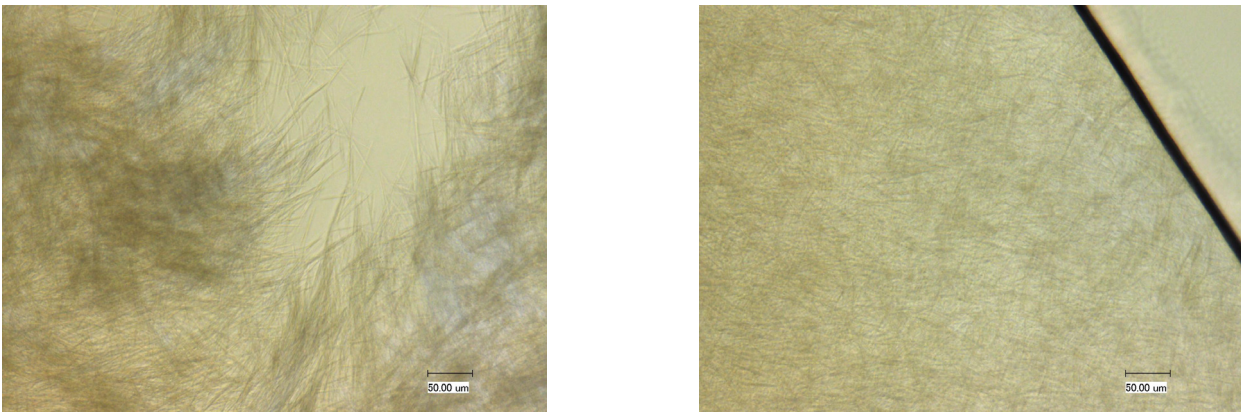


Abbildung 5.20: Mikroskopische Bilder einer 5%igen flüssigkristallinen Cholesterolfomulierung; links ohne, rechts mit 1% Pemulen® TR-1 nach Neutralisation mit EDTP

Durch den Zusatz von 1% Pemulen® TR-1 und anschließende Neutralisation mit 1% EDTP kann das Propylenglykol in den flüssigkristallinen Cholesterolsystemen fixiert werden, sodass homogene Zubereitungen vorliegen, bei denen auch nach mehreren Monaten Lagerzeit bei Raumtemperatur keine Phasenseparation auftritt. Die Zubereitung kann in dieser Zusammensetzung als Grundlage bzw. Wirkstoffreservoir genutzt werden und ist nun auch mit rheologischen Messeinrichtungen charakterisierbar.

Tabelle 5.9: Gelbildungsvermögen unterschiedlicher Gelbildner mit Propylenglykol

Gelbildner	Beurteilung der Gelierung von Propylenglykol
Natrosol® HHX 250 Hydroxyethylcellulose	mind. 20% Wasser zur Gelierung notwendig
Metolose® 60 SH 50 Hypromellose	mind. 20% Wasser zur Gelierung notwendig
Carbopol® 981 Polyacrylsäure	mind. 5% Wasser zur Gelierung notwendig, Neutralisation
Pemulen® TR-1 Alkylierte Polyacrylsäure	geliert ohne Wasser, Neutralisation notwendig
Kollidon® 90 Polyvinylpyrrolidon	geliert ohne Wasser, nur schwach, Produkt ist trübe
Aerosil® 200 Hochdisperses Siliciumdioxid	geliert ohne Wasser, nur schwach, Produkt ist trübe
Keltrol® Xanthangummi	keine Gelierung ohne Wasser

### 5.2.8 Zusammenfassung

Um essentielle Bedingungen zur Bildung der fibrillären Strukturen zu erfassen, wurden sowohl Veränderungen der festen als auch der flüssigen Komponente vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass die Cholesterolkonzentration sowie der Austausch des Anhydrates durch das Monohydrat keinen Einfluss auf die Ausbildung der fibrillären Strukturen besitzen. Ist zusätzlich eine Ethylgruppe in der Seitenkette des Cholesterols vorhanden, konnte keine Überführung in ein halbfestes System erreicht werden. Für die flüssige Komponente ergaben sich ebenso strenge Anforderungen an die Molekülstruktur, da bereits bei Verwendung eines Lösungsmittels mit einer zusätzlichen Methylgruppe keine Ausbildung der Strukturen mehr stattfand. Ähnliche Strukturen konnten lediglich im Isopropanol, jedoch erst ab einer Cholesterolkonzentration von 7,5% realisiert werden. Da die Entstehung der halbfesten Formulierung ab einem Wasseranteil von ca. 3% gestört ist, werden Wasserstoffbrückenbindungen am Aufbau der Strukturen beteiligt sein. Damit das Propylenglykol in der Zubereitung stärker immobilisiert ist und das Produkt folglich homogener und unempfindlicher gegenüber Scherung wird, wurde der Formulierung ein polymerer Gelbildner (Pemulen<sup>®</sup> TR-1) zugefügt.



## 5.3 Charakterisierung des Systems

### 5.3.1 Mikroskopie

#### 5.3.1.1 Lichtmikroskopie

Eine einfache und aussagekräftige Methode zur Beurteilung der flüssigkristallinen Proben ist die lichtmikroskopische Untersuchung. Abbildung 5.21 zeigt die fibrillären Strukturen einer Probe mit einem Cholesterolgehalt von 5%, die durch 48stündiges Rühren bei Raumtemperatur und anschließende Lagerung bei 50 °C hergestellt wurde.

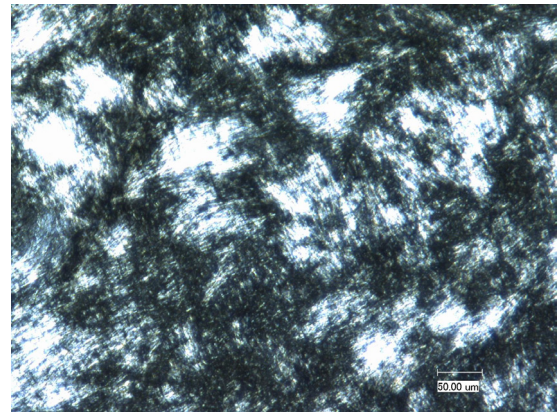
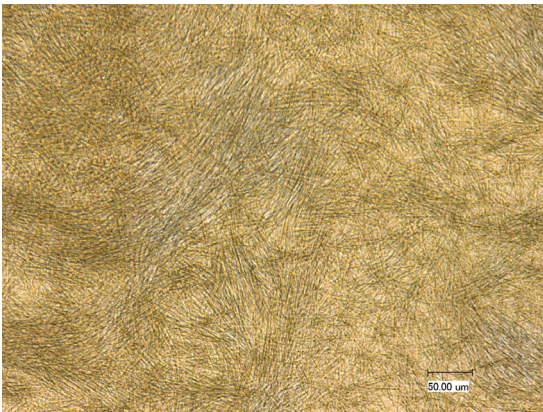


Abbildung 5.21: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer flüssigkristallinen Probe mit 5% Cholesterol in Propylenglykol, rechts im polarisierten Dunkelfeld

Die Fibrillen weisen keine bestimmte Orientierung auf und bilden ein dicht gepacktes Netzwerk. Im polarisierten Dunkelfeld ist eine typische, flächenhafte Schwarz-Weiß-Schraffur zu erkennen, welche mit Texturen hexagonaler Mesophasen vergleichbar ist (Müller-Goymann, 1998b). Im Gegensatz dazu enthält eine 1%ige Probe kein zusammenhängendes Netzwerk mehr, sondern sehr lange (> 500 µm) und stark geschwungene Filamente.

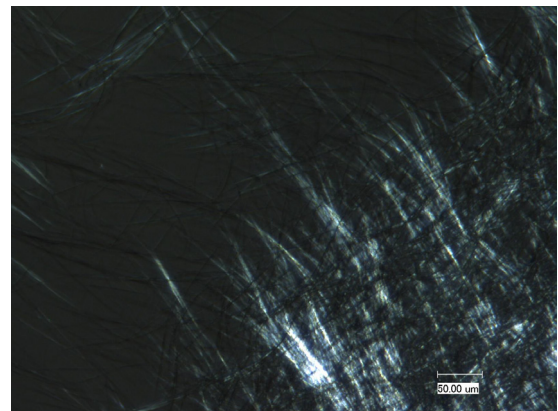
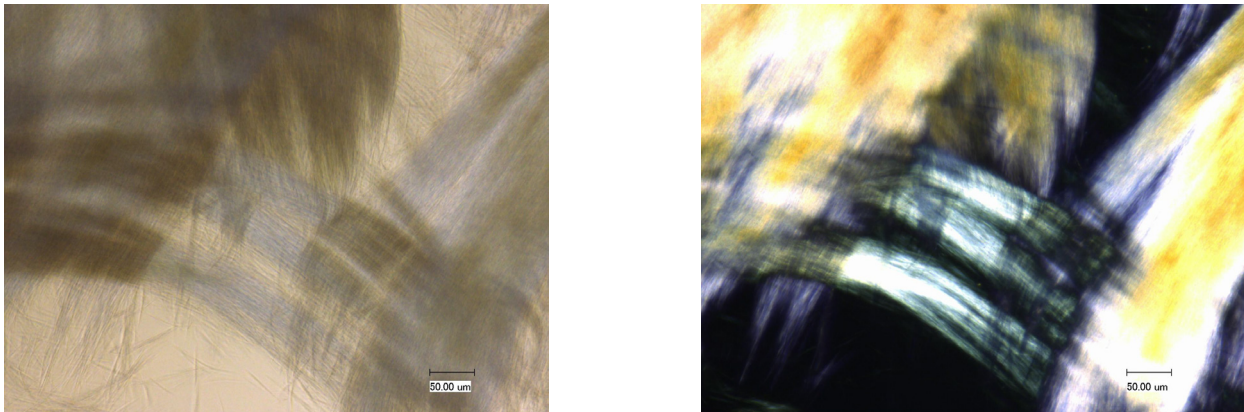


Abbildung 5.22: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer flüssigkristallinen Probe mit 1% Cholesterol in Propylenglykol, rechts im polarisierten Dunkelfeld

Einzelne Fibrillen zeigen im polarisierten Dunkelfeld noch keine Doppelbrechung. Erst durch Aneinanderlagerung mehrerer fadenförmiger Strukturen wird die Probe optisch aktiv (Abbildung 5.22).

In Abschnitt 5.1.6 wurde bereits beschrieben, dass sich bei der Probenherstellung durch mehrstündiges Rühren am Magnetrührfisch und an der Gefäßwand sogenannte „schimmernde Bereiche“ ausbilden, die besonders ausgeprägte Strukturen enthalten. Abbildung 5.23 zeigt ein Beispiel dieser Proben. Die Fibrillen sind sehr dicht und parallel gepackt und scheinen in übereinander verschobenen Schichten bzw. Bündeln angeordnet zu sein. Die Farbgebung der Aufnahme im polarisierten Dunkelfeld deutet auf eine intensive Doppelbrechung dieser Probe hin.



*Abbildung 5.23: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines „schimmernden Probenbereichs“, der sich während des Herstellvorganges am Magnetrührfisch gebildet hat, rechts im polarisierten Dunkelfeld*

Diese Strukturen sind visuell vergleichbar mit fadenförmigen Aggregaten in niedermolekularen organischen Gelen (siehe Abbildung 2.11). Zudem wurden von Konikoff et. al und Chung et. al ähnliche fibrilläre Aggregate des Cholesterols beobachtet. Sie konnten mit verschiedenen mikroskopischen Verfahren den Kristallisationsprozess von Cholesterol aus künstlicher und natürlicher (humaner) Gallenflüssigkeit verfolgen und beschreiben diesen als Abfolge verschiedener metastabiler Zwischenzustände. Dabei bilden sich ausgehend von mizellaren Cholesterollösungen filamentartige Strukturen aus, die bündelartig angeordnet sein können. Diese gehen dann über den Zwischenzustand helikaler und nadelförmiger Strukturen in die typische Plättchenform des Cholesterolmonohydrates über. Diese Kristallisationsabfolge wurde bei 37 °C beobachtet und wird mit der Bildung von Gallensteinen in Verbindung gebracht (Konikoff et al., 1992; Chung et al., 1993).



### 5.3 Charakterisierung des Systems

---

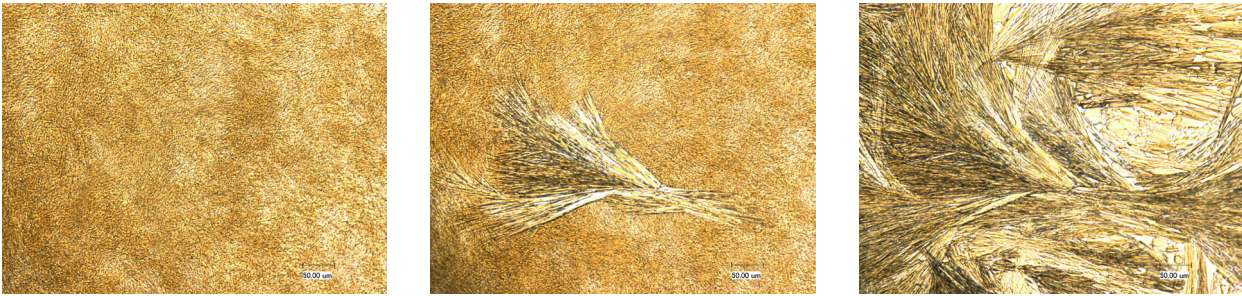


Abbildung 5.24: Lichtmikroskopische Untersuchung einer 10%igen Probe während eines Heizvorganges, links: bei Raumtemperatur, Mitte: bei 94 °C, rechts: bei 98 °C

Abbildung 5.24 zeigt das Verhalten einer 10%igen Zubereitung beim Aufheizen mit einem Mikroskop-Heiztisch. In einem Temperaturbereich von 90 °C bis 100 °C konnte eine Umwandlung in eine andere flüssigkristalline Phase beobachtet werden, welche bei ca. 110 °C in eine isotrope Flüssigkeit überging. Dieser Zustand änderte sich bis zum Erreichen der maximalen Temperatur von 140 °C nicht. Beim anschließenden Abkühlen wurden mehrere Übergänge in verschiedene flüssigkristalline Zustände detektiert. Abbildung 5.25 zeigt z. B. einen Phasenübergang von einer möglichen lamellaren Struktur, die durch Malteser-Kreuze gekennzeichnet ist, in eine weitere flüssigkristalline Phase, die bis hin zur Raumtemperatur stabil ist.

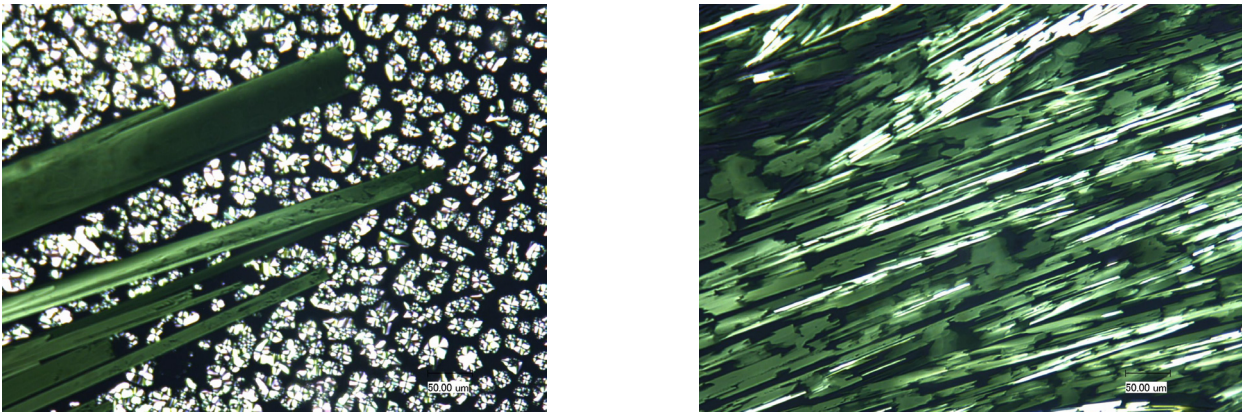
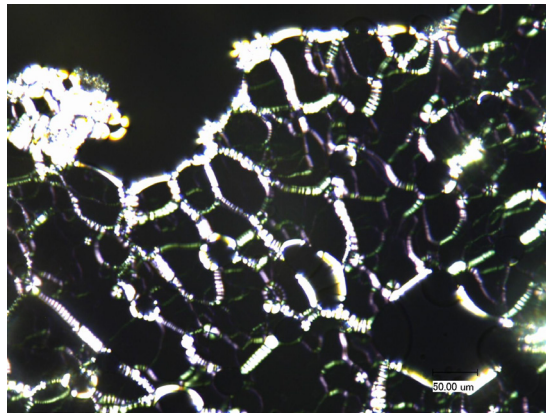


Abbildung 5.25: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer 10%igen Probe während eines Abkühlvorganges von 140 °C auf Raumtemperatur im polarisierten Dunkelfeld

Eine zusätzliche Phase konnte bei einer drei Jahre alten, 5%igen Probe, die mit der Schwingmühle produziert wurde, beobachtet werden. Diese zeigte während des Aufheizvorganges zusätzlich bei 115 °C einen Übergang in eine ölige Streifentextur, die ebenfalls kennzeichnend für lamellare Mesophasen ist (Abbildung 5.26). Da auch bei lyotropen Flüssigkristallen durch Temperaturvariation eine Phasentransformation

zwischen verschiedenen Mesophasen ausgelöst werden kann, beweisen die beobachteten temperaturabhängigen Umwandlungen in verschiedene Texturen, dass es sich bei den vorliegenden fibrillären Strukturen um einen flüssigkristallinen Zustand handelt (Müller-Goymann, 2004).



*Abbildung 5.26: Lichtmikroskopische Aufnahme einer 5%igen Probe aus der Schwingmühle bei 115 °C im polarisierten Dunkelfeld*

### 5.3.1.2 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Probenreplikums nach Gefrierbruch einer 5%igen Probe zeigt sehr lange „Röhrenbündel“ mit strikter Parallelität (Abbildung 5.27). Der Pfeil kennzeichnet deutlich übereinander geordnete Strukturen, welche einen Hinweis auf das Vorliegen einer hexagonalen Phase geben (Müller-Goymann, 2010). Die Stäbchen haben einen Durchmesser bzw. eine Dicke von ca. 150 nm.

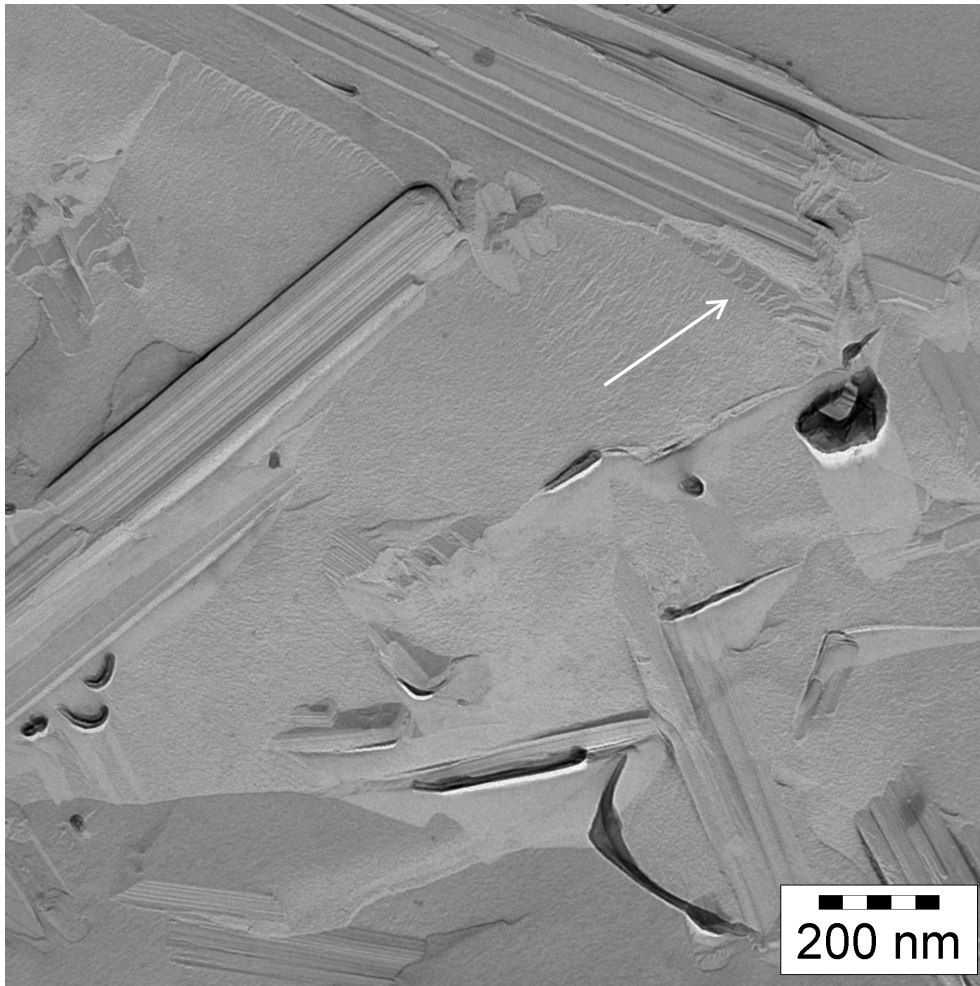


Abbildung 5.27: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer 5%igen Probe aus der Schwingmühle nach Gefrierbruch; Pfeil deutet auf viele übereinander geordnete Schichten hin

Die in Abbildung 5.28 dargestellten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen einer direkten Probe (Cholesterolgehalt 3%) bestätigen diese Strukturen. Die Probe ist durchzogen von langen, starren Gebilden, die deutlich schichtenartig übereinander gelagert sind (Pfeil). Die Breite der Fibrillen beträgt hier ungefähr 400 nm.



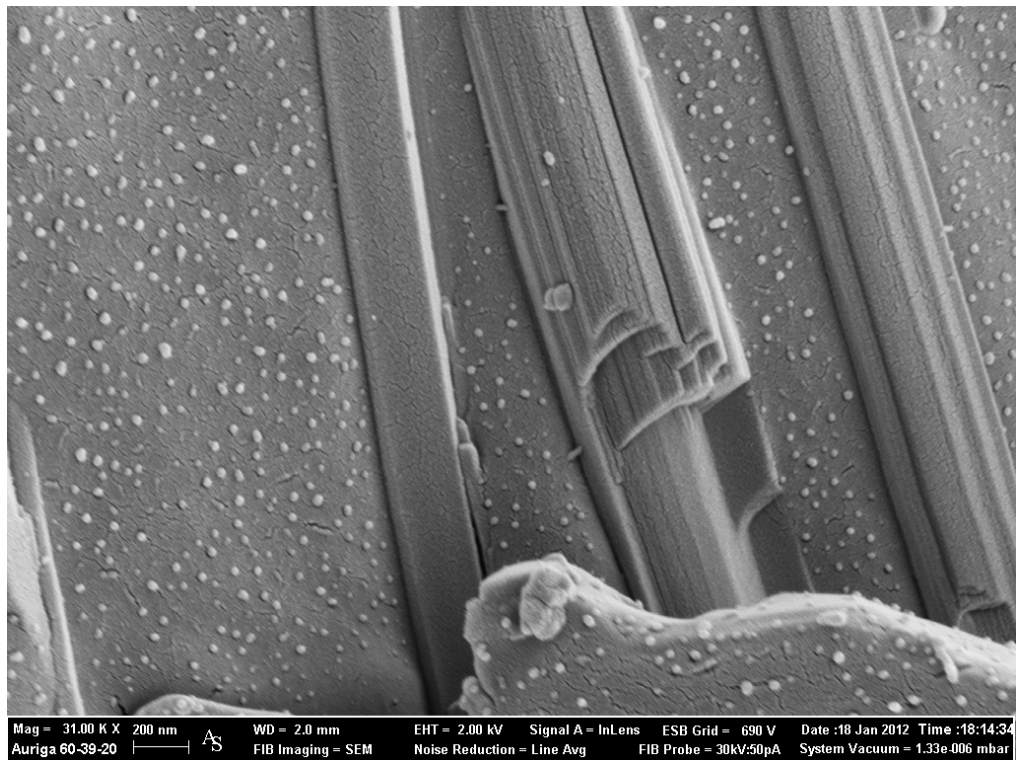
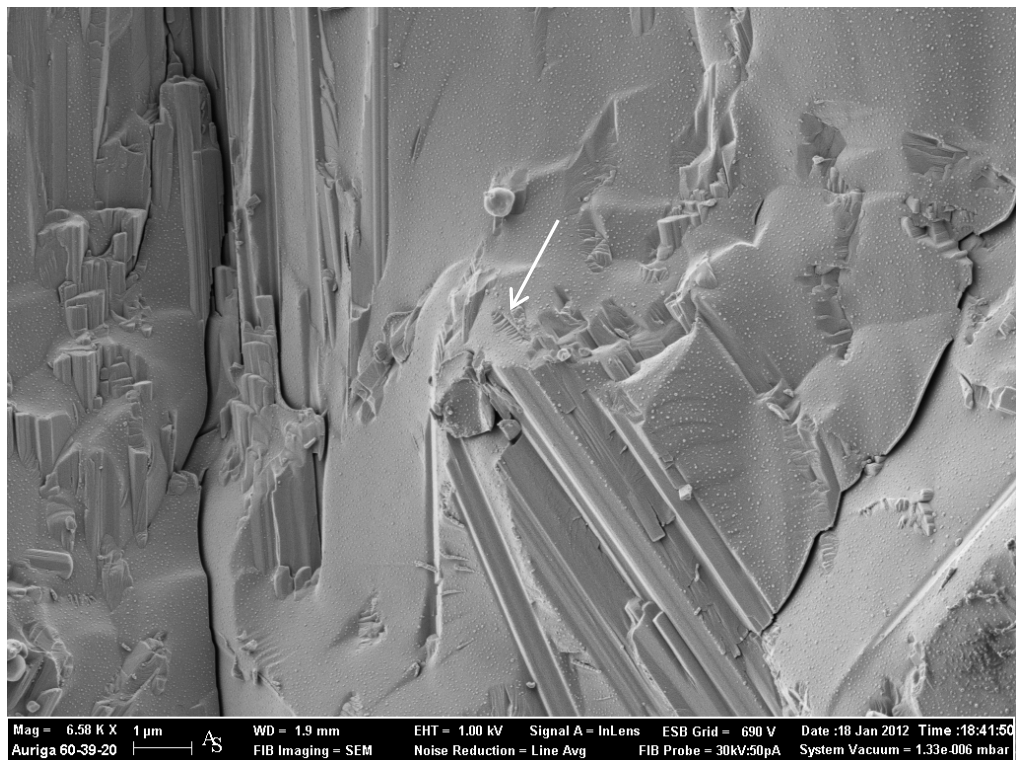
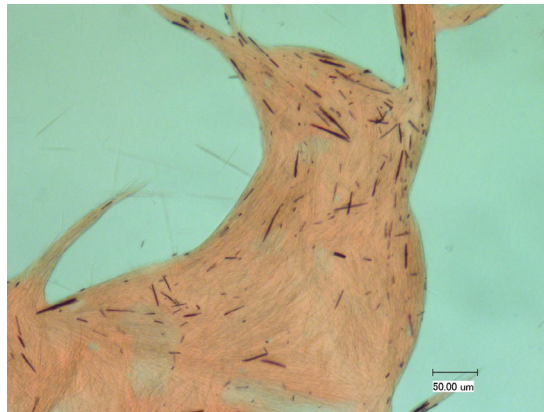


Abbildung 5.28: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 3%igen Probe nach Kryopräparation; Pfeil deutet auf viele übereinander geordnete Schichten hin

### 5.3.1.3 Lichtmikroskopie nach Anfärbung

Um herauszufinden, ob die fibrillären Strukturen durch eine normale hexagonale oder invers hexagonale Phase aufgebaut sind, wurde eine 10%ige Probe zunächst mit Mittelkettigen Triglyceriden versetzt und anschließend mit Methyleneblau und Sudanrot angefärbt. In Abbildung 5.29 ist deutlich zu erkennen, dass die Fibrillen sich im lipophilen Bereich, der durch das Sudan III rot gefärbt ist, ansammeln, während das blau gefärbte Propylenglykol als separate Phase vorliegt. Die zusätzlich auftretenden dunklen Nadeln sind ungelöste Sudanrot-Partikel. Dieses Verhalten demonstriert erwartungsgemäß die Lipophilie der fibrillären Strukturen und beweist dementsprechend das Vorliegen von invers hexagonalen Aggregaten.

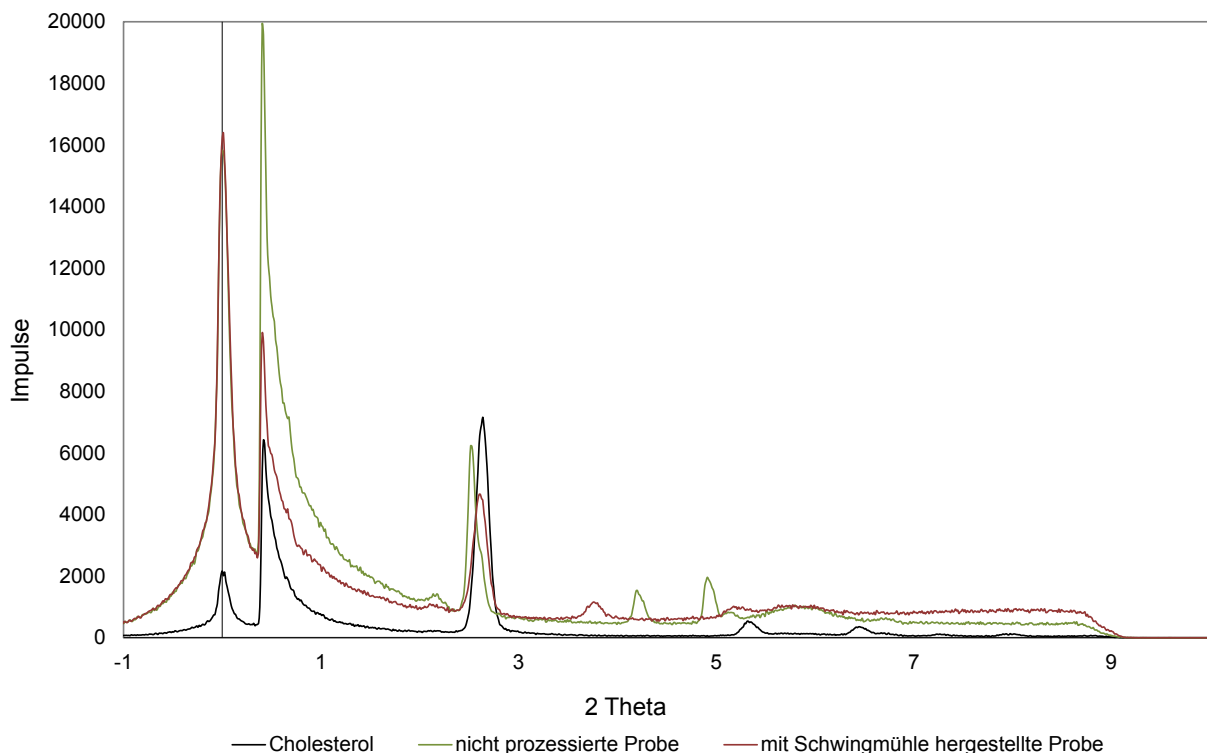


*Abbildung 5.29: Lichtmikroskopische Untersuchung einer 10%igen Probe, welche nach Zusatz von Mittelkettigen Triglyceriden mit Sudan III und Methyleneblau angefärbt wurde*

## 5.3.2 Röntgendiffraktometrie

### 5.3.2.1 SAXD

Zur röntgenographischen Untersuchung der halbfesten Proben wurden 5%ige Zubereitungen unterschiedlicher Herstellungsprozesse sowie kristallines Cholesterol mit einem Röntgenkleinwinkeldiffraktometer vermessen. Das Cholesterol diente zudem als Kalibriersubstanz. Die in den folgenden Abbildungen als „nicht prozessiert“ bezeichnete Probe wurde durch einfaches Anreiben von Cholesterol mit Propylenglykol in einer Fantaschale erhalten. Zudem wurde ein Produkt vermessen, das mit der Schwingmühle bei einer Amplitude von 90 und einer Prozesszeit von 30 min hergestellt wurde. Die mit dem Magnetrührer hergestellte Probe stammt aus sogenannten „schimmernden Bereichen“, die sich während des 24stündigen Rührvorganges bei Raumtemperatur am Rührfisch ausgebildet haben und mikroskopisch ein besonders intensiv ausgeprägtes Fibrillennetzwerk aufweisen. Die Peakintensitäten von Cholesterol und den Proben sind aufgrund unterschiedlicher Messzeiten nicht direkt vergleichbar.



**Abbildung 5.30:** Vergleich der Röntgenkleinwinkeldiffraktogramme von Cholesterol, einer nicht prozessierten Probe sowie einer mit der Schwingmühle hergestellten Probe, Cholesterolgehalt jeweils 5%



### 5.3 Charakterisierung des Systems

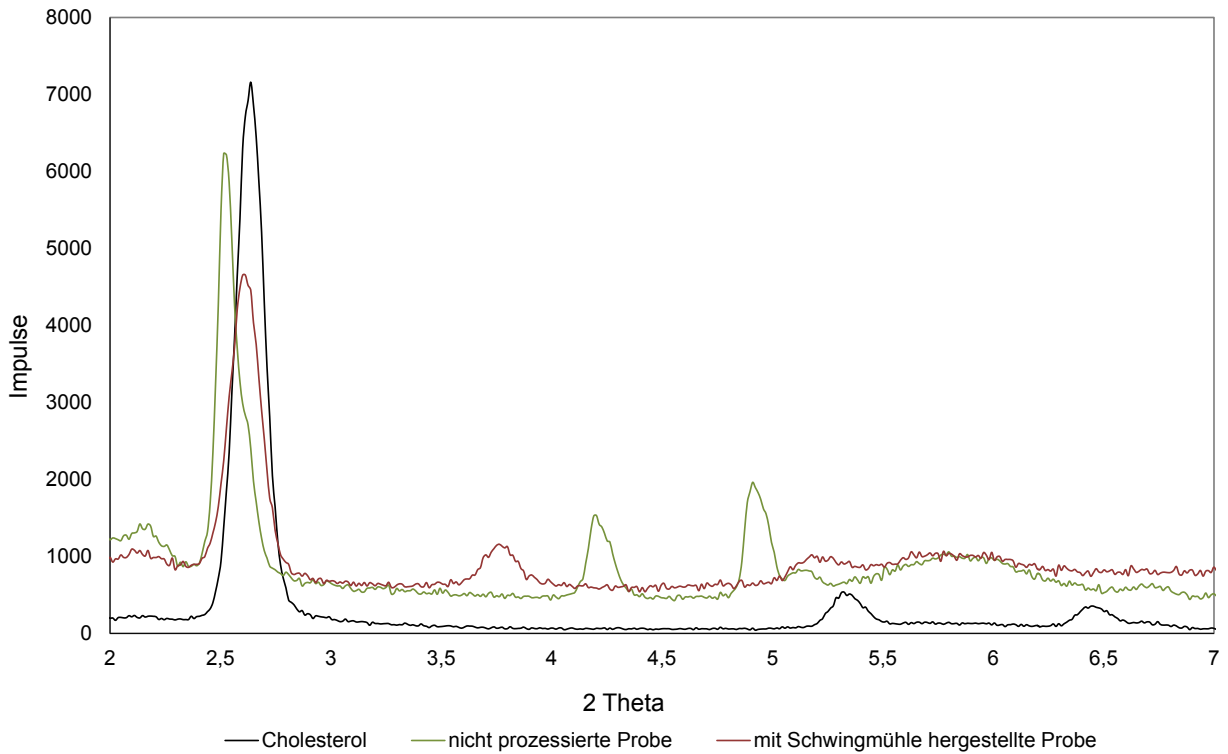


Abbildung 5.31: Ausschnitt der Röntgenkleinwinkeldiffraktogramme von Cholesterol, einer nicht prozessierten Probe sowie einer mit der Schwingmühle hergestellte Probe, Cholesterolgehalt jeweils 5%

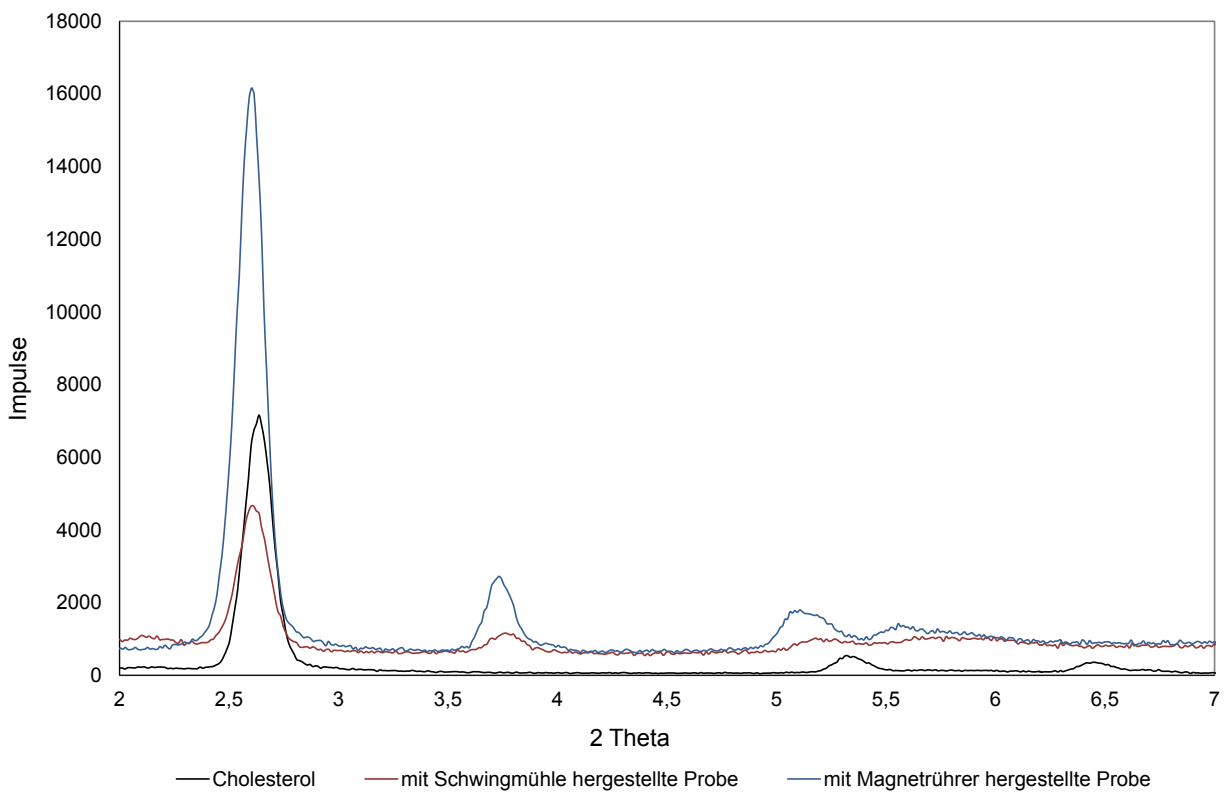


Abbildung 5.32: Ausschnitt der Röntgenkleinwinkeldiffraktogramme von Cholesterol, einer mit der Schwingmühle produzierten sowie einer mit dem Magnetrührer hergestellten Probe, Cholesterolgehalt jeweils 5%

Die ersten beiden Peaks in Abbildung 5.30 werden durch den gefilterten Primärstrahl bzw. den ungefilterten Primärstrahl hervorgerufen. Der zur Kalibrierung genutzte Peak des kristallinen Cholesterols liegt bei 2,6 2Theta. Da alle Proben einen deutlichen Reflex in diesem Winkelbereich aufweisen, ist stets kristallines Cholesterol in den Proben enthalten. Abbildung 5.31 zeigt, dass die halbfesten Zubereitungen zusätzliche Reflexe zum kristallinen Cholesterol hervorrufen. Diese unterscheiden sich je nach Herstellungsprozess. Während die nicht prozessierte Probe zwei zusätzliche Peaks bei ca. 4,2 und 4,9 2Theta besitzt, wird bei der Zubereitung aus der Schwingmühle ein Reflex bei 3,75 2Theta erhalten. Dieser ist ebenso in der Probe mit dem stark ausgebildeten fibrillären Netzwerk (Magnetrührfisch) vorhanden, wobei hier der Reflex lediglich etwas intensiver ausgeprägt ist (Abbildung 5.32).

Um eine Zuordnung der vorhandenen Strukturen zu bestimmten Mesophasen vornehmen zu können, wurden Reflexreihenfolgen aus den gemessenen Streuvektoren berechnet (jeweils bezogen auf den in der Tabelle zuerst angegebenen Peak) und mit Literaturwerten verglichen (siehe Tabelle 5.10 bis Tabelle 5.12). Nach Seddon und Templer liegen die Reziproken der Netzebenenabstände von hexagonalen, lamellaren und kubischen Mesophasen in folgenden Verhältnissen vor (Seddon et al., 1995):

lamellar:	1	2	3	4...
hexagonal	1	$\sqrt{3}$	2	$\sqrt{7}$ 3...
kubisch	1	$\sqrt{2}$	$\sqrt{3}$	2 $\sqrt{5}$ ...

Tabelle 5.10: Röntgenreflexe einer nicht prozessierten Probe

2Theta	$h \text{ (nm}^{-1}\text{)}^3$	$d \text{ (nm)}^4$	Intensität	Verhältnis
2,12	1,51	4,16	+	1,00
2,59	1,85	3,40	+++	1,22
4,20	2,99	2,10	++	1,98
4,91	3,50	1,80	++	2,32
5,15	3,66	1,71	+	2,43
5,70	4,06	1,55	+	2,69
6,56	4,67	1,35	+	3,09

<sup>3</sup> h = Streuvektor, zur Berechnung der Reflexreihenfolge genutzt

<sup>4</sup> d = Netzebenenabstand

### 5.3 Charakterisierung des Systems

Tabelle 5.11: Röntgenreflexe einer mit der Schwingmühle produzierten Probe

2Theta	h (nm <sup>-1</sup> )	d (nm)	Intensität	Verhältnis
2,12	1,51	4,16	+	1,00
2,59	1,85	3,40	+++	1,22
3,75	2,67	2,36	++	1,77
5,15	3,66	1,71	+	2,43
5,70	4,06	1,55	+	2,69

Tabelle 5.12: Röntgenreflexe einer mit dem Magnetrührer produzierten Probe

2Theta	h (nm <sup>-1</sup> )	d (nm)	Intensität	Verhältnis
2,59	1,85	3,40	+++	1,00
3,75	2,67	2,36	++	1,44
5,15	3,66	1,71	++	1,98
5,70	4,06	1,55	+	2,20

Den errechneten Reflexverhältnissen zufolge ist keine Zuordnung der vermessenen Proben zu einer bestimmten flüssigkristallinen Phase möglich. Jedoch spricht auch ein einzelner Peak im Kleinwinkelbereich für das Vorhandensein einer Mesophase (Seddon et al., 1995). Ob diese zum kristallinen Cholesterol zusätzlich auftretende Struktur jedoch kristalliner oder flüssigkristalliner Art ist, kann mit dieser Methode alleine nicht beurteilt werden.

### 5.3.2.2 WAXD

Durch Feinjustierung des Primärstrahlfilters konnte mit dem Röntgenweitwinkeldiffraktometer relativ nahe am Kleinwinkelbereich gemessen werden. Die dabei erhaltenen Diffraktogramme von kristallinem Cholesterol und einer halbfesten Probe, die 5% Cholesterol enthält und durch ca. 60minütiges Rühren bei 40 °C hergestellt wurde, sind in Abbildung 5.33 dargestellt. Die Reflexintensitäten von Cholesterol und der halbfesten Probe sind aufgrund unterschiedlicher Messzeiten nicht miteinander vergleichbar. Die halbfeste Probe wurde über einen Zeitraum von 20 h vermessen. Die Diffraktogramme stimmen mit den Resultaten der SAXD-Messungen überein, da die halbfeste Probe ebenso den intensiven Reflex des kristallinen Cholesterols (bei ca. 2,45 2Theta) aufweist und einen zusätzlichen, starken Reflex bei ca. 3,60 2Theta besitzt. Zudem können einige Reflexe des kristallinen Cholesterols im Weitwinkelbereich (z. B. 16,9 2Theta, 17,4 2Theta und 18,1 2Theta) auch in der halbfesten Probe detektiert werden, welche jedoch von einem diffusen Weitwinkelreflex (zwischen 15 und 25 2Theta) überlagert sind. Dieser diffuse Reflex im Weitwinkelbereich entspricht einer Periode von etwa 0,45 nm und beweist damit laut Hiltrop das Vorliegen beweglicher Alkylketten der Tensidmoleküle in Stäbchenaggregaten (Hiltrop, 1999b).

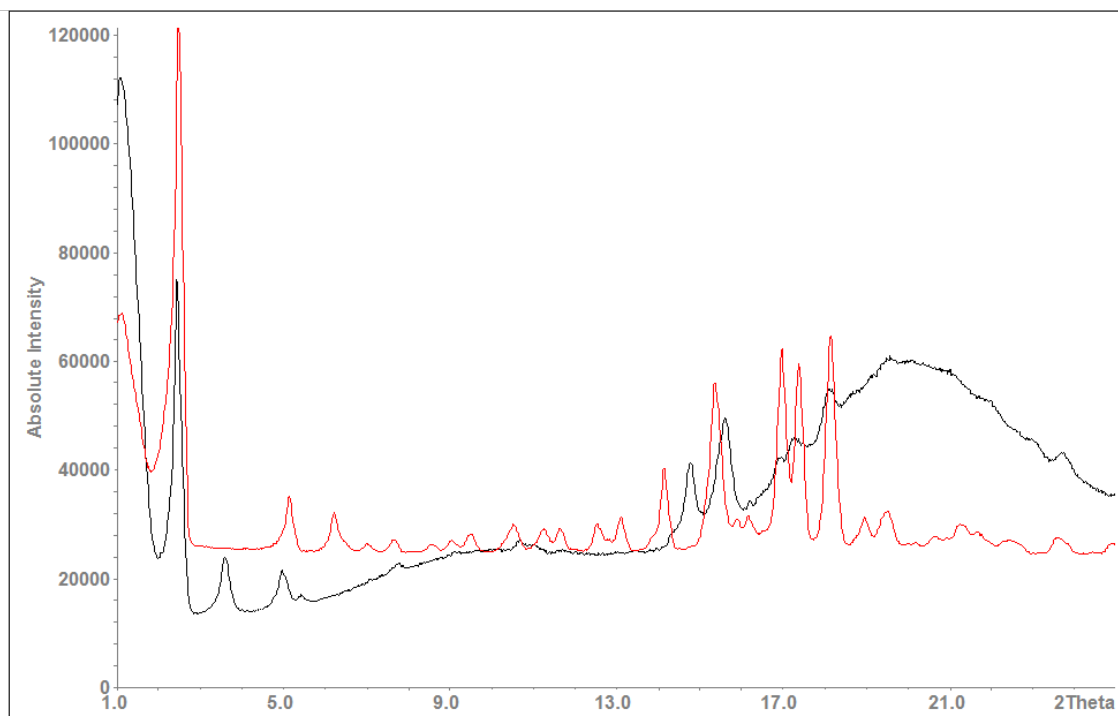


Abbildung 5.33: Vergleich der Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von Cholesterol (rot) und einer 5%igen halbfesten Zubereitung, die mit dem Magnetrührer bei 40 °C hergestellt wurde (schwarz)

### 5.3 Charakterisierung des Systems

Weiterhin wurde untersucht, ob geringe Temperaturveränderungen während des Herstellungsprozesses Einfluss auf die flüssigkristalline Struktur besitzen und ob diese bereits kurz nach der Herstellung vollständig ausgebildet ist oder sich nach entsprechender Lagerzeit noch verändert. Dazu wurden 5%ige Zubereitungen unter 60minütigem Rühren auf einer Magnetrührplatte bei 35 °C bzw. 40 °C hergestellt und sowohl eine Stunde als auch eine Woche nach der Herstellung röntgendiffraktometrisch vermessen. Um tatsächlich die Struktur direkt nach der Herstellung zu untersuchen, wurde die Messzeit auf 2 h verkürzt. Daher sind die Reflexintensitäten in den erhaltenen Röntgendiffraktogrammen deutlich schwächer ausgeprägt. Aus Abbildung 5.34 und Abbildung 5.35 ist ersichtlich, dass die Variation der Herstellungstemperatur zwischen 35 °C und 40 °C keine wesentlichen Veränderungen der fibrillären Strukturen verursacht. Die Peakintensität des kristallinen Cholesterols bei 2,45 2Theta ist bei der 40 °C-Herstellung lediglich leicht erhöht. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Struktur bereits eine Stunde nach Herstellung vorhanden ist und sich nach einer Woche Lagerzeit bei Raumtemperatur nicht verändert hat.

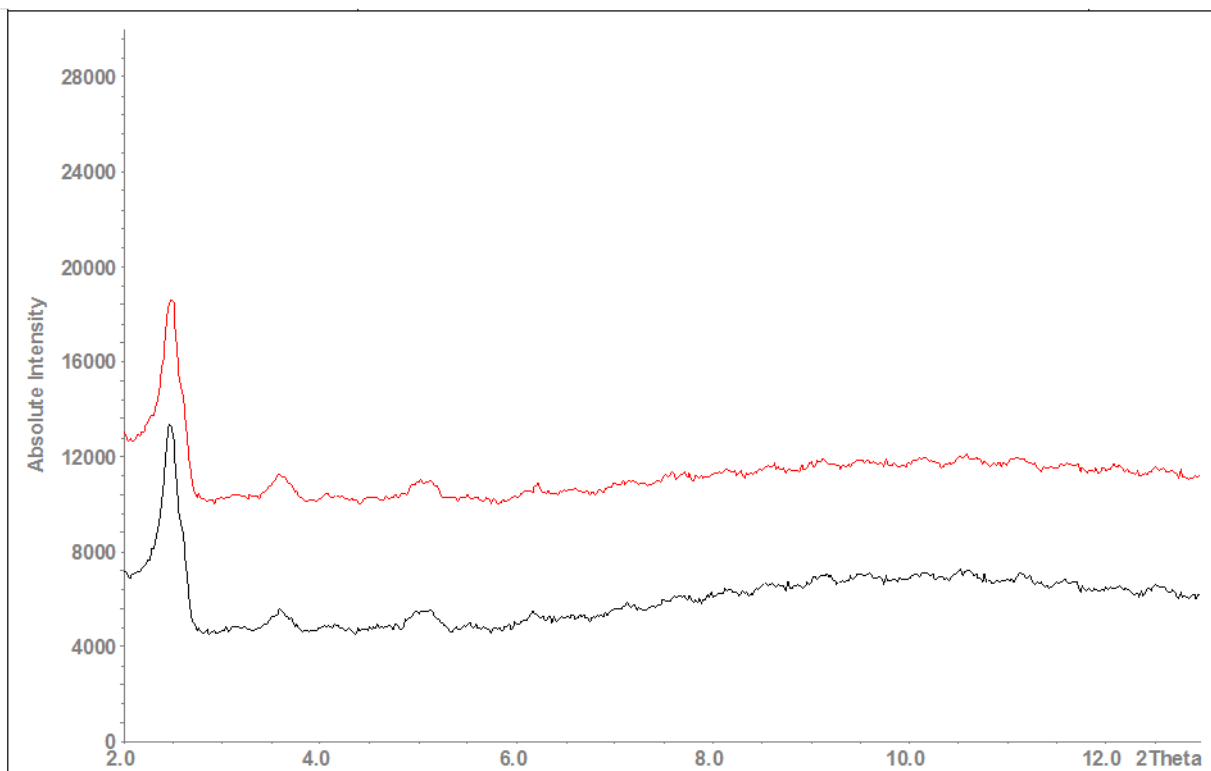


Abbildung 5.34: Vergleich der Röntgenweitwinkeldiffraktogramme einer 5%igen Probe, die mit dem Magnetrührer bei 35 °C hergestellt wurde, nach unterschiedlicher Lagerzeit, rot: 1 h nach Herstellung, schwarz: eine Woche nach Herstellung

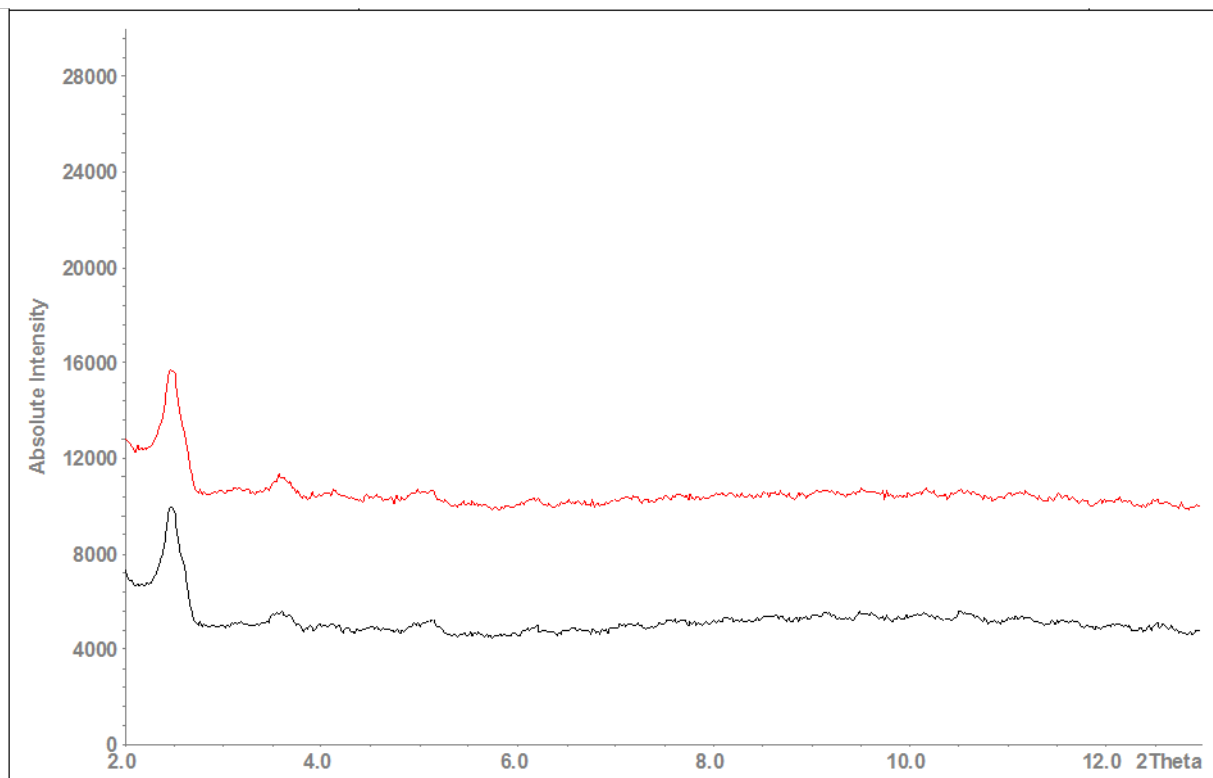


Abbildung 5.35: Vergleich der Röntgenweitwinkeldiffraktogramme einer 5%igen Probe, die mit dem Magnetrührer bei 40 °C hergestellt wurde, nach unterschiedlicher Lagerzeit, rot: 1 h nach Herstellung, schwarz: eine Woche nach Herstellung

### 5.3.3 Rheologische Untersuchung

Im folgenden Abschnitt werden zunächst das Fließverhalten des flüssigkristallinen Systems und der Einfluss der Cholesterolkonzentration auf dieses beschrieben. Um im Messspalt zwischen den Platten homogene Proben zu erhalten, wurden für diesen Versuch Zubereitungen genutzt, in denen das Propylenglykol durch Zusatz von 1% Pemulen® TR-1 stärker fixiert ist. Anschließend werden Einflüsse von zwei variablen Herstellungsparametern auf die rheologischen Eigenschaften des reinen Systems (ohne Zusatz eines Gelbildners) mittels Oszillationsmessungen dargestellt.

#### 5.3.3.1 Viskosimetrie

Um die Auswirkungen der Cholesterolkonzentration auf das Fließverhalten zu untersuchen, wurden Zubereitungen mit 3, 5 und 10% Cholesterol durch 48ständiges Rühren bei Raumtemperatur hergestellt. Nach einwöchiger Lagerung bei 50 °C wurde in alle Zubereitungen 1% Pemulen® TR-1 eingearbeitet. Zur Überprüfung der

Reproduzierbarkeit wurden von jeder Einsatzkonzentration drei Zubereitungen hergestellt, welche wiederum dreifach vermessen wurden. Für die in Abbildung 5.36 und Abbildung 5.37 dargestellten Scherrampenversuche wurde ein Messspalt von 300  $\mu\text{m}$  gewählt. Um die Beeinflussung der Fließeigenschaften durch den Pemulen<sup>®</sup>-Zusatz zu berücksichtigen, wurden alle Daten um die Messwerte eines reinen Propylenglykol-Geles, welches ebenso mit 1% Pemulen<sup>®</sup> TR-1 geliert wurde, korrigiert. Daher werden keine Standardabweichungen mit angegeben. Alle Zubereitungen weisen ein ausgeprägt plastisches Fließverhalten auf. Das bedeutet, sie besitzen eine Fließgrenze (graphisch nicht dargestellt) und zeigen mit steigender Scherrate eine zunehmende Scherverflüssigung. Diese ist unabhängig von der Einsatzkonzentration bei allen Zubereitungen gleich stark ausgeprägt. Während die Viskositäten der 3%- und 5%igen Zubereitungen bei maximaler Scherung relativ dicht beieinander liegen (5,7 Pa\*s und 6,8 Pa\*s), besitzen die 10%igen Formulierungen eine deutlich gesteigerte Viskosität bei 20,4 Pa\*s. In Abbildung 5.37 ist die momentane Viskosität gegen die Messzeit dargestellt. Bei einer Messzeit von 120 s ist die maximale Scherrate von 45 s<sup>-1</sup> erreicht und fällt anschließend wieder ab. Alle Formulierungen weisen bei sinkender Scherrate wieder eine Scherverfestigung auf. Während die 3%- und 5%igen Formulierungen nach Beendigung des Scherprozesses wieder ihre Ausgangsviskosität besitzen, zeigt die 10%ige Zubereitung eine gewisse Hysterese an: die Viskosität beträgt zum letzten Messzeitpunkt 422,3 Pa\*s und liegt damit deutlich unterhalb der Anfangsviskosität von 997,1 Pa\*s. Das Vorliegen der plastischen Fließeigenschaften ist typisch für hexagonale und kubische Mesophasen und ist auf den dreidimensionalen Ordnungsgrad dieser Flüssigkristalle zurückzuführen (Müller-Goymann, 1998b).

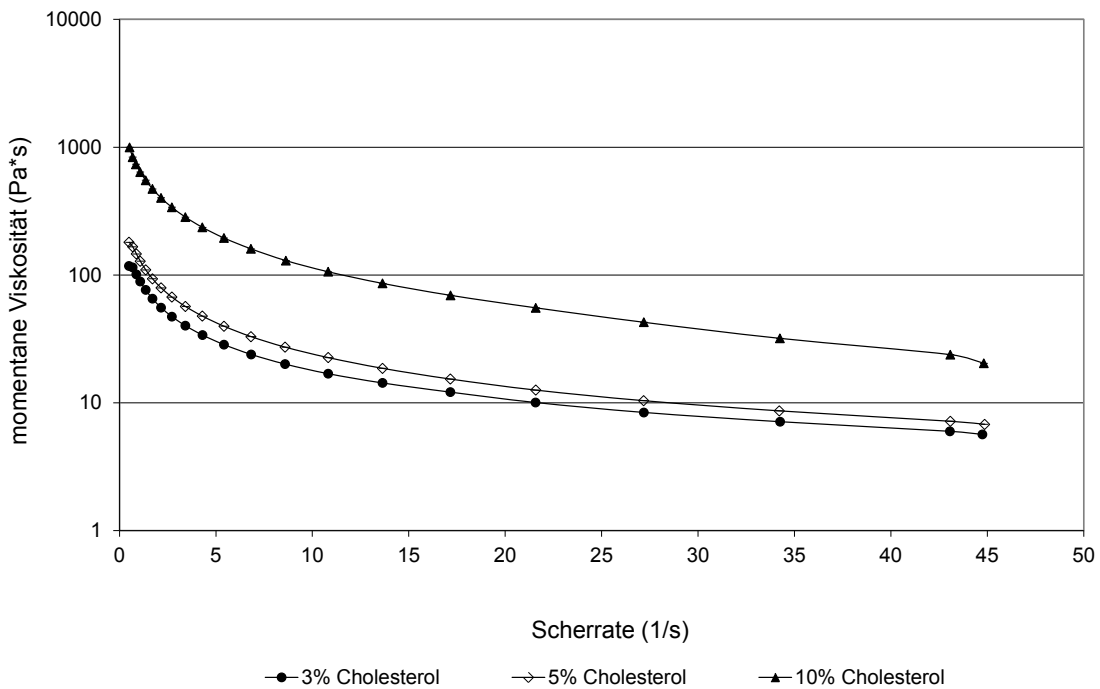


Abbildung 5.36: Momentane Viskosität bei ansteigender Scherrate von Zubereitungen unterschiedlicher Cholesterolkonzentrationen; dargestellt sind Mittelwerte von dreifach hergestellten Zubereitungen

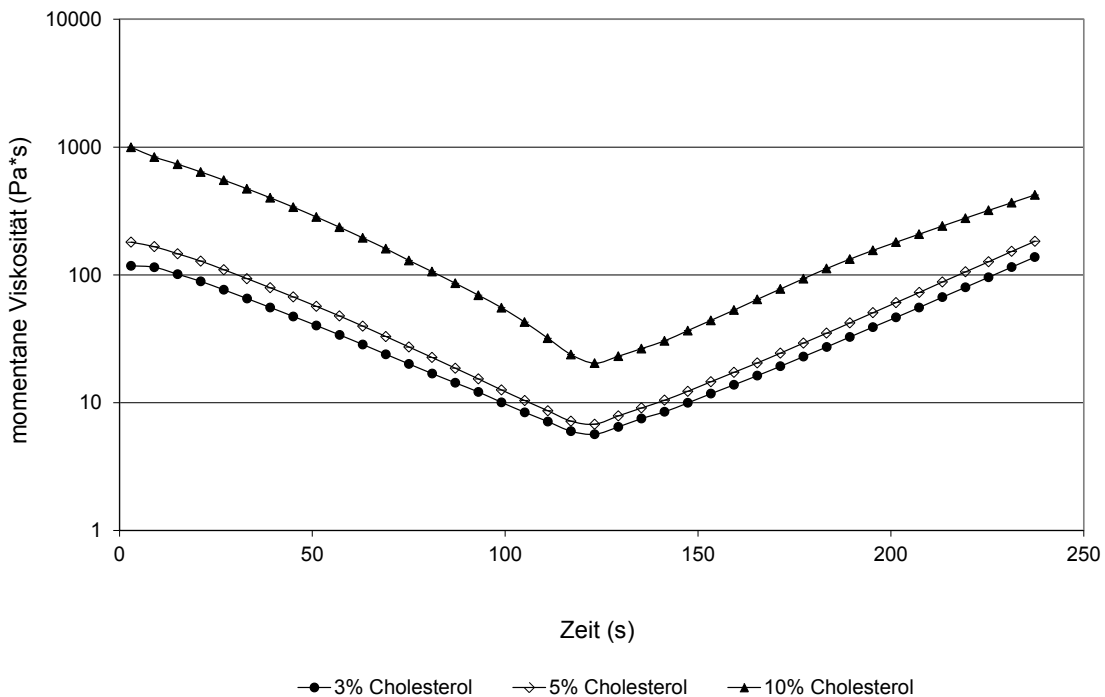


Abbildung 5.37: Momentane Viskosität bei ansteigender und abfallender Scherrate, dargestellt gegen die Messzeit; dargestellt sind Mittelwerte von dreifach hergestellten Zubereitungen



### 5.3.3.2 Oszillationsmessungen

Um eine Strukturveränderung durch mechanische Verformung zu verhindern und somit auch elastische Anteile der Proben zu erfassen, wurden die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Zubereitungen ebenfalls oszillationsrheologisch vermessen. Der Messspalt wurde dazu auf 1000  $\mu\text{m}$  eingestellt. Abbildung 5.38 zeigt den starken Unterschied der 10%igen Zubereitungen gegenüber den Formulierungen geringerer Konzentration bezüglich der komplexen Viskosität. Eine Steigerung der Cholesterolkonzentration von 3% auf 5% führte zum knapp dreifachen Anstieg der Viskosität. Im Unterschied dazu zeigen die 10%igen Formulierungen ca. 30fach erhöhte Werte gegenüber den 5%igen Zubereitungen. Die komplexe Viskosität eines reinen Propylenglykol-Gels beträgt  $13,7 \pm 0,4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ .

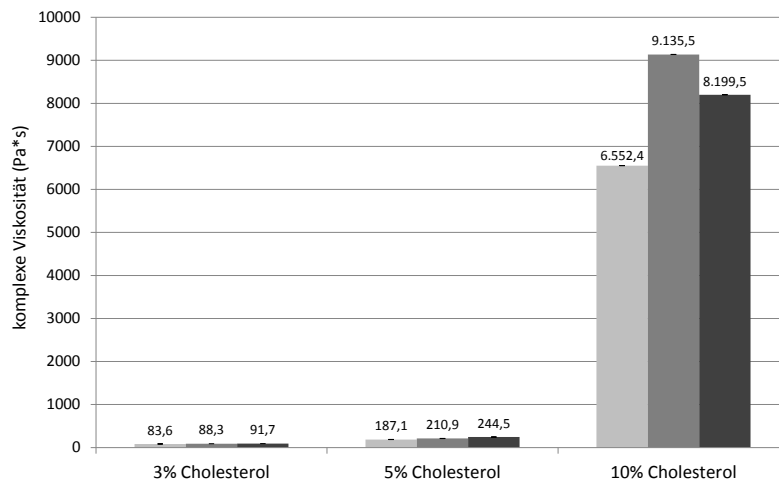


Abbildung 5.38: Komplexe Viskosität von je dreifach hergestellten Zubereitungen unterschiedlicher Cholesterolkonzentration, Fehlerbalken: SD von Dreifachmessungen

Zudem wird der Einfluss der Cholesterolkonzentration auf die Reproduzierbarkeit der Herstellung deutlich. Die Variationskoeffizienten der komplexen Viskosität der je dreifach hergestellten Zubereitungen steigen mit zunehmender Einsatzkonzentration: 3% Cholesterol VK = 4,7%; 5% Cholesterol VK = 13,5%; 10% Cholesterol VK = 16,4%. Da die Zubereitungen mit höheren Konzentrationen bereits während der Herstellung verdickten, konnte eine kontinuierliche und gleichmäßige Bewegung des Magnetrührfisches nicht gewährleistet werden. Dies führt zu einer unterschiedlich intensiven Ausprägung des fibrillären Netzwerkes und begründet die zunehmenden Schwankungen der komplexen Viskosität mit steigender Konzentration.

Der viskoelastische Charakter der Zubereitungen kann mit Hilfe des Phasenverschiebungswinkels beurteilt werden. Aus Abbildung 5.39 ist ersichtlich, dass der Phasenwinkel nur geringen Schwankungen unterliegt und sich unabhängig von der Konzentration im Bereich zwischen  $15^\circ$  und  $21^\circ$  befindet. Da jedoch der Phasenwinkel eines reinen Propylenglykol-Gels  $18,9 \pm 1,0^\circ$  beträgt, kann mit Hilfe dieser Methode nicht beurteilt werden, ob das überwiegend elastische Verhalten der getesteten Zubereitungen auch auf das dreidimensionale Netzwerk der Cholesterol-Aggregate oder nur auf den Gelbildnerzusatz zurückzuführen ist.

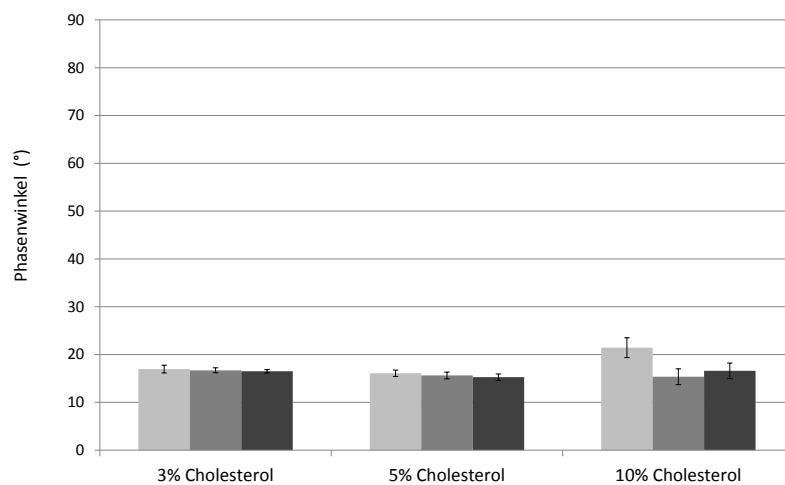


Abbildung 5.39: Phasenwinkel von je dreifach hergestellten Zubereitungen unterschiedlicher Cholesterolkonzentration, Fehlerbalken: SD von Dreifachmessungen

### 5.3 Charakterisierung des Systems

Im Folgenden werden Einflüsse unterschiedlicher Temperaturbedingungen und Rührzeiten auf die rheologischen Eigenschaften von 5%igen Cholesterolzubereitungen dargestellt. Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitenpunkten während und nach der Herstellung Oszillationsmessungen der reinen Zubereitungen, d. h. ohne Zusatz von Pemulen® TR-1, vorgenommen. Aufgrund der zeitlich gebundenen Probenentnahme konnte dabei nur eine Einfachmessung durchgeführt werden. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass es bei zunehmender Festigkeit der Proben bei Einstellung des Messspaltes teilweise zum Austritt des Propylenglykols aus der Formulierung kam und die Messergebnisse dadurch beeinflusst wurden. Eine Einschätzung des Einflusses der untersuchten Parameter auf die Ausbildung des fibrillären Netzwerkes ist jedoch aufgrund intensiver Veränderungen der Messwerte möglich.

Zunächst werden zwei verschiedene Temperaturbedingungen (Raumtemperatur und 38 °C) bei einer Rührdauer von 6 h verglichen. Während sich die komplexe Viskosität der bei Raumtemperatur hergestellten Zubereitung während des Rührvorganges nur leicht erhöhte und eine deutliche Gelierung erst 24 h nach Herstellungsbeginn detektiert werden konnte, stieg die Viskosität bei Herstellung unter erhöhten Temperaturbedingungen bereits nach 45 bis 75 min stark an.

*Tabelle 5.13: Zeitliche Veränderung der komplexen Viskosität bei verschiedenen Temperaturen und Rührzeiten des Herstellungsprozesses; unterstrichene Werte zeigen das Ende des Rührprozesses an; SD sind aus einzelnen Messwerten einer Messung berechnet*

Rührprozess Zeit	Komplexe Viskosität (Pa*s) Mittelwert ± Standardabweichung					
	Raumtemperatur/ 6 h		38 °C/ 6 h		38 °C/ 75 min	
15 min	0,14 ± 0,03		0,14 ± 0,01		0,11 ± 0,00	
30 min	0,14 ± 0,04		0,67 ± 0,13		0,25 ± 0,27	
45 min	0,17 ± 0,02		97,48 ± 7,65		34,63 ± 3,46	
75 min	0,26 ± 0,03		1887,16 ± 224,64		<u>769,02 ± 52,31</u>	
90 min	0,31 ± 0,08		596,02 ± 20,04		1967,50 ± 91,94	
120 min	0,43 ± 0,10		14,91 ± 4,45		6506,80 ± 477,85	
4 h	7,83 ± 0,43		1,16 ± 0,12		10386,10 ± 480,63	
6 h	<u>7,93 ± 1,87</u>		<u>315,76 ± 16,57</u>		17300,00 ± 1241,57	
24 h	1786,45 ± 83,28		1552,15 ± 60,21		24200,00 ± 823,37	
48 h	3061,45 ± 134,68		1157,39 ± 88,92		16938,50 ± 479,33	
7 d	8507,84 ± 396,82		1820,90 ± 168,55		29256,50 ± 884,77	

Die rasche Ausbildung der elastischen Anteile kann am Abfall des Phasenwinkels von 80,9° bei 30 min auf 21,7° bei 45 min erkannt werden. Durch das anhaltende Rühren wurde die Viskosität der Zubereitung jedoch wieder deutlich reduziert und gleichzeitig der Phasenwinkel erhöht. Daher wurde in einem weiteren Versuch bei gleicher Temperaturbehandlung (38 °C) der Rührvorgang nach 75 min beendet. Die Ausbildung des fibrillären Netzwerkes wurde somit nicht behindert, sodass 6 h nach Herstellungsbeginn eine komplexe Viskosität von 17300 Pa\*s und ein Phasenwinkel von 6,4° erreicht werden konnten. Alle Zubereitungen zeigten nach einwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur einen weiteren Anstieg der komplexen Viskosität, wobei die für 75 min bei 38 °C gerührte Formulierung mit Abstand die höchste Viskosität und den kleinsten Phasenwinkel besaß. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Ausbildung des fibrillären Netzwerkes bei Raumtemperatur möglich ist, jedoch durch eine Temperaturbehandlung bei 38 °C deutlich beschleunigt werden kann. Der Rührvorgang sollte nach Eintreten der Gelierung beendet werden, um die Ausbildung des dreidimensionalen Netzwerkes der fibrillären Strukturen nicht zu behindern.

*Tabelle 5.14: Zeitliche Veränderung des Phasenwinkels bei verschiedenen Temperaturen und Rührzeiten des Herstellungsprozesses; unterstrichene Werte zeigen das Ende des Rührprozesses an; SD sind aus einzelnen Messwerten einer Messung berechnet*

Rührprozess Zeit	Phasenwinkel (°) Mittelwert ± Standardabweichung		
	Raumtemperatur/ 6 h	38 °C/ 6 h	38 °C/ 75 min
15 min	73,6 ± 16,3	77,6 ± 3,8	76,4 ± 8,8
30 min	73,1 ± 5,8	80,9 ± 3,5	73,7 ± 8,4
45 min	75,1 ± 3,6	21,7 ± 1,2	34,9 ± 2,5
75 min	75,4 ± 4,0	9,9 ± 8,4	<u>13,3 ± 2,4</u>
90 min	74,4 ± 3,1	14,2 ± 1,2	10,9 ± 2,7
120 min	76,3 ± 8,1	66,2 ± 2,9	6,8 ± 3,1
4 h	78,4 ± 2,3	75,0 ± 1,1	10,2 ± 2,4
6 h	<u>74,2 ± 3,6</u>	<u>14,7 ± 2,7</u>	6,4 ± 2,9
24 h	12,5 ± 2,3	12,1 ± 1,9	8,4 ± 1,5
48 h	11,6 ± 2,2	21,6 ± 3,8	10,5 ± 2,7
7 d	7,7 ± 3,8	20,7 ± 3,1	4,9 ± 1,4

Da in diesem Fall die Zubereitungen ohne Zusatz von Pemulen® TR-1 vermessen wurden, können mit den erhaltenen Werten für den Phasenwinkel Rückschlüsse auf das Verhältnis der elastischen und viskosen Anteile des Cholesterolsystems gemacht werden. Der kleinste gemessene Wert des Phasenwinkels beträgt  $4,9 \pm 1,4^\circ$  und deutet auf das stark dominierende Speichermodul ( $G' = 183110 \text{ Pa}$ ) gegenüber dem Verlustmodul ( $G'' = 15566 \text{ Pa}$ ) hin. Dieses überwiegend elastische Verhalten kann mit der dreidimensionalen Vernetzung der fibrillären Strukturen begründet werden.

#### 5.3.4 Thermoanalytische Untersuchung

Um temperaturbedingte Änderungen des halbfesten Cholesterolsystems zu erfassen und die Einflussnahme der Konzentration auf dieses Verhalten festzustellen, wurden Zubereitungen unterschiedlicher Konzentration (3%, 5% und 10%) mit Hilfe der DSC vermessen. Dabei wurden die Proben einem Aufheizvorgang von  $20^\circ\text{C}$  auf  $160^\circ\text{C}$  mit einer Heizrate von  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  unterzogen. Jede Formulierung wurde dreifach hergestellt und jeweils dreifach vermessen. Abbildung 5.40 zeigt die Veränderungen der endothermen Ereignisse in Abhängigkeit von der Konzentration. Zur deutlicheren Darstellung wurde jeweils die erste Ableitung des Wärmeflusses gegen die Temperatur aufgetragen. Reproduzierbare, endotherme Ereignisse finden unabhängig von der Konzentration bei ca.  $90^\circ\text{C}$  sowie  $110^\circ\text{C}$  statt. Somit können die mikroskopisch beobachteten Phasenumwandlungen mit diesen Messungen bestätigt werden. Demnach entspricht das Ereignis bei ca.  $90^\circ\text{C}$  der Umwandlung des fibrillären Systems in eine andere flüssigkristalline Phase, die bei  $110^\circ\text{C}$  in den flüssigen Zustand übergeht. In Tabelle 5.15 sind die berechneten Enthalpieänderungen aufgeführt. Erwartungsgemäß stiegen die Energieänderungen mit zunehmender Cholesterolkonzentration an. Neben den halbfesten Zubereitungen verschiedener Konzentrationen wurde auch eine frisch hergestellte Mischung aus 5% Cholesterol und Propylenglykol, die lediglich in der Fantaschale angerieben wurde und mikroskopisch noch keine fibrillären Strukturen aufwies, vermessen. Da das fibrilläre System noch nicht ausgebildet war, konnte auch die erste Phasenumwandlung bei  $90^\circ\text{C}$  nicht detektiert werden. Der zweite Peak bei  $110^\circ\text{C}$  ist jedoch vorhanden, wenn auch mit geringerer Intensität im Vergleich zur halbfesten Probe. Somit stellt das fibrilläre System eventuell einen Zwischenzustand dar, der durch entsprechende Scher- und Temperaturbehandlung induziert und stabilisiert werden kann. Zudem konnte mit diesen Untersuchungen aufgrund des fehlenden oder gering ausgeprägten Schmelzpeaks des

Cholesterols (148 °C) gezeigt werden, dass kristallines Cholesterol nicht oder nur in geringen Anteilen in den halbfesten Proben vorhanden ist.

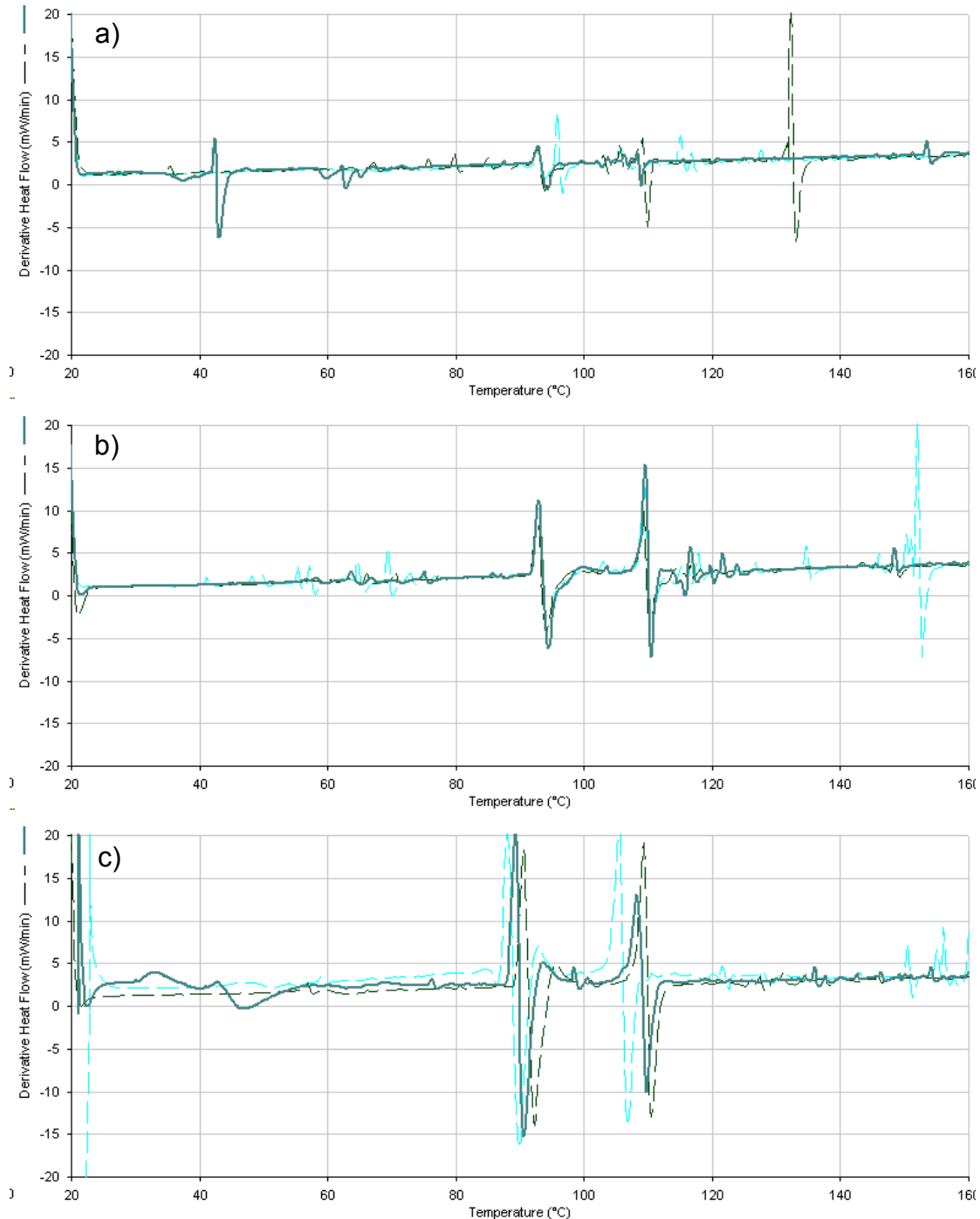


Abbildung 5.40: DSC-Kurven eines Aufheizvorganges von 20 °C auf 160 °C mit 10 °C/min von je 3 vermessenen Proben (1. Ableitung)  
a) einer 3%igen Zubereitung  
b) einer 5%igen Zubereitung  
c) einer 10%igen Zubereitung

## 5.3 Charakterisierung des Systems

Tabelle 5.15: *Abhängigkeit der Enthalpieänderung und Peaklage von der Konzentration; jede Zubereitung wurde dreifach hergestellt und je dreifach vermessen*

Cholesterol-Konzentration	Peak 1		Peak 2	
	Peak ( °C) ± SD	Δ H (J/g) ± SD	Peak ( °C) ± SD	Δ H (J/g) ± SD
3%	87,0 ± 11,1	0,214 ± 0,063	109,1 ± 0,62	0,139 ± 0,145
5%	93,6 ± 0,2	1,209 ± 0,043	110,0 ± 0,2	1,086 ± 0,061
10%	90,1 ± 1,2	3,673 ± 0,160	108,4 ± 2,0	3,027 ± 0,176
5% -Mischung		- <sup>5</sup>	109,8 ± 3,7	0,319 ± 0,041 <sup>6</sup>

### 5.3.5 Zusammenfassung

Werden die erzielten Ergebnisse im Kontext betrachtet, so kann eindeutig geschlussfolgert werden, dass die vorliegenden fibrillären Strukturen von flüssigkristalliner Art und mit hoher Wahrscheinlichkeit invers hexagonal aufgebaut sind. Für den flüssigkristallinen Zustand sprechen die beim Aufheizen der Probe mikroskopisch und thermoanalytisch beobachteten Übergänge in andere flüssigkristalline Phasen. Die Resultate der Röntgenkleinwinkelmessungen zeigen deutlich das Vorliegen einer zusätzlichen Struktur neben dem kristallinen Cholesterol. Die Zuordnung zu einer bestimmten Mesophase erfolgt mit Hilfe der Lichtmikroskopie im polarisierten Dunkelfeld, da die erhaltene Schwarz-Weiß-Schraffur vergleichbar mit Texturen hexagonaler Zustände ist. Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen geben einen Hinweis auf das Vorliegen dieser Art von Flüssigkristall. Der erhaltene diffuse Weitwinkelreflex im Röntgendiffraktogramm zeigt vorhandene Stäbchenaggregate an. Durch das Anfärben mit Methylenblau und Sudanrot konnte letztendlich bewiesen werden, dass die fibrillären Strukturen lipophil und folglich invers hexagonaler Art sind. Rheologische Messungen deuten ebenfalls auf das Vorliegen von Molekülaggregaten mit einem hohen Ordnungsgrad (wie hexagonal oder kubisch) hin. Dennoch muss der Unterschied zu üblichen, reinen hexagonalen Flüssigkristallen beachtet werden. Diese sind typischerweise optisch isotrop oder opaleszierend, nicht jedoch tief weiß gefärbt, wie das vorliegende Cholesterolsystem. Das weiße Erscheinungsbild wird durch die mikroskopisch sichtbaren fibrillären Strukturen erhalten, an denen das Licht gebrochen wird. Diese Strukturen sind vergleichbar mit den in Kapitel 2.4 beschriebenen Netzwerken niedermolekularer, organischer Gele. Da

<sup>5</sup> kein Peak detektierbar

<sup>6</sup> nur in 2 von 3 Messungen war ein Peak vorhanden, von diesen wurden Mittelwerte berechnet

die Bildung der langen fadenförmigen Strukturen in solchen Gelen mit einem fehlgeschlagenen Kristallisationsprozess begründet wird und zugleich ähnliche Cholesterofilamente als Zwischenzustand bei der Auskristallisation von Cholesterolmonohydrat aus Gallenflüssigkeit beschrieben wurden, scheint in der vorliegenden Formulierung ein entsprechender Zwischenzustand durch das gleichzeitige Vorliegen bestimmter Bedingungen (Propylenglykol, Temperatur und Scherung) stabilisiert zu sein.

Da die rheologisch gemessenen elastischen Anteile in der Probe signifikant den viskosen überlegen sind und somit ein wahres Gel vorhanden ist, kann zudem von einem stark ausgebildeten Netzwerk mit permanent vorliegenden Molekülaggagaten ausgegangen werden (Terech et al., 1997).



### **5.4 Eignung als Vehikelsystem zur topischen Applikation**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die entwickelte flüssigkristalline Cholesterolzubereitung als Vehikelsystem für topisch zu applizierende Dermatika eignet. Dazu wurde zunächst das Lösevermögen gegenüber verschiedenen Wirkstoffen getestet. Im Anschluss wurden die Beeinflussung der Wirkstoffpermeation mit Hilfe von Franz-Diffusionszellen sowie die Veränderung der Lipidstruktur des Stratum corneum mittels thermodynamischer Messungen geprüft.

#### **5.4.1 Wirkstofflöslichkeit und Herstellung wirkstoffhaltiger Proben**

Um herauszufinden, ob das flüssigkristalline System schwerlösliche Arzneistoffe in Lösung bringen kann und sich somit als Vehikelsystem für entsprechende Wirkstoffe zur topischen Applikation eignet, wurde zunächst die Löslichkeit von Wirkstoffen verschiedener Anwendungsgebiete in Propylenglykol getestet. Die Wirkstoffe wurden in ihren maximalen Einsatzkonzentrationen<sup>7</sup> mit Propylenglykol für 24 h auf einer Magnetrührplatte gerührt. Die Ergebnisse der anschließenden visuellen Beurteilung sind in Tabelle 5.16 und Tabelle 5.17 aufgeführt. Von den getesteten 19 Wirkstoffen sind sechs im Propylenglykol unlöslich. Daher wurde anschließend erprobt, ob diese Wirkstoffe aufgrund des flüssigkristallinen Charakters in der halbfesten Cholesterolzubereitung solubilisiert und gelöst werden können. Die Arzneistoffeinarbeitung erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Einerseits wurde der Wirkstoff mit dem bereits fertig ausgebildeten fibrillären System anteilig in der Fantaschale angerieben, während bei der zweiten Methode der Wirkstoff vor der Ausbildung der flüssigkristallinen Phase zugesetzt wurde. Dazu wurde Cholesterol mit dem Arzneistoff in der Fantaschale vorgelegt, anteilig mit Propylenglykol angerieben und durch einen entsprechenden Rührvorgang bei 40 °C in ein Gelsystem überführt.

---

<sup>7</sup> entsprechend den Angaben in der Normdosentabelle des NRF (DAC/NRF, 2012) bzw. verwendeter Konzentrationen in zugelassenen Fertigarzneimitteln (Rote Liste, 2012)

*Tabelle 5.16: Löslichkeit von Wirkstoffen in Propylenglykol bei max. üblichen Einsatzkonzentrationen*

<b>Nichtsteroidales Antirheumatikum</b>		<b>Hormon</b>	
Diclofenac-Na	löslich	Estradiol	löslich
Ibuprofen	löslich	Testosteron	löslich
Ketoprofen	löslich	Progesteron	löslich

*Tabelle 5.17: Löslichkeit von Wirkstoffen in Propylenglykol bei max. üblichen Einsatzkonzentrationen*

<b>Antimykotikum/ Antibiotikum</b>		<b>Glucocorticoid</b>	
Clotrimazol	löslich	Triamcinolonacetonid	unlöslich
Ketoconazol	löslich	Betamethasonvalerat	unlöslich
Terbinafin HCl	löslich	Prednisolon	löslich
Terbinafin	unlöslich	Hydrocortisonacetat	unlöslich
Miconazol	löslich	Prednicarbat	löslich
Bifonazol	unlöslich		
Ciclopirox-Olamin	löslich		
Erythromycin	unlöslich		

Bei der zuletzt genannten Methode wurde die Ausbildung des fibrillären Netzwerkes durch keinen Wirkstoff beeinflusst. Auch die nachträgliche Einarbeitung der Wirkstoffe veränderte die Zubereitungen nicht. Die Beurteilung der Wirkstofflöslichkeit in der halbfesten Formulierung erfolgte lediglich mikroskopisch, da DSC- und auch WAXD-Messungen in diesem Fall nicht geeignet waren. Keiner der im Propylenglykol unlöslichen Wirkstoffe lag in diesem halbfesten Cholesterolsystem in gelöster Form vor. Somit eignet sich diese Zubereitung nicht als Vehikelsystem mit verbesserten Solubilisationseigenschaften für schwerlösliche Arzneistoffe.

Da jedoch eine Vielzahl der aufgeführten Wirkstoffe in Propylenglykol löslich ist, können diese in die halbfeste Cholesterolzubereitung eingearbeitet und somit die Beeinflussung der Wirkstoffpenetration untersucht werden.

Nach Auswahl von zwei Wirkstoffen zur transdermalen Applikation (Estradiol und Testosteron) sowie zwei dermal wirksamen Arzneistoffen (Miconazol und Prednicarbat) wurde deren Verträglichkeit mit der flüssigkristallinen Cholesterolzubereitung getestet.

Die Wirkstoffe wurden nach beiden oben beschriebenen Methoden eingearbeitet. Auch bei diesen Arzneistoffen konnte keine Beeinflussung der fibrillären Struktur beobachtet werden. Jedoch ist die nachträgliche Einarbeitung in das bereits ausgebildete Netzwerk vorzuziehen, da bei den auf diese Art hergestellten Zubereitungen mikroskopisch keine Cholesterolkristalle detektiert werden konnten. Wie bereits im Abschnitt 5.2.7 beschrieben wurde, ist der Zusatz von 1% Pemulen<sup>®</sup> TR-1 und eine Neutralisation mit EDTP notwendig, um das Austreten des Propylenglykols durch den manuellen Rührvorgang bei der Wirkstoffearbeitung sowie eine Verflüssigung des Geles durch den Wirkstoff zu verhindern. Auf diese Art hergestellte Zubereitungen sind mikroskopisch und makroskopisch über einen geprüften Zeitraum von 3 Monaten stabil, weisen keine Cholesterolkristalle auf und enthalten den Wirkstoff (Estradiol, Testosteron, Prednicarbat oder Miconazol) in gelöster Form.

## 5.4.2 Einfluss auf die Wirkstoffpermeation

Nach erfolgreicher Einarbeitung verschiedener Wirkstoffe in die entwickelte Formulierung sollte nun die Einflussnahme des flüssigkristallin vorliegenden Cholesterols auf die Wirkstoffpermeation durch verschiedene Hautmembranen mit Franz-Zellen getestet werden. Zunächst musste dafür ein geeignetes Akzeptormedium bestimmt und die Probenaufbereitung optimiert werden. Zudem wurde die Homogenität des Wirkstoffgehaltes in den Zubereitungen ermittelt.

### 5.4.2.1 Voruntersuchungen

#### 5.4.2.1.1 Auswahl eines geeigneten Akzeptormediums

Wie bereits auf Seite 42 erwähnt wurde, empfiehlt die OECD den Zusatz von 50% organischem Lösungsmittel, 6% Brij<sup>®</sup> 98 oder 5% BSA zum Akzeptormedium, um Sinkbedingungen zu gewährleisten und somit eine limitierte Penetration aufgrund zu geringer Löslichkeit der Testsubstanz zu verhindern. Die dafür mindestens erforderlichen Sättigungskonzentrationen wurden basierend auf einem Volumen des Akzeptormediums von 10 ml sowohl für finite dose-Bedingungen (Auftrag von 10 mg Zubereitung) als auch für infinite dose-Bedingungen (100 mg Zubereitung) berechnet (Tabelle 5.18). Demnach muss zum Beispiel die Sättigungskonzentration von Testosteron bei Verwendung einer 2%igen Zubereitung und einer Auftragsmenge von 10 mg/cm<sup>2</sup> mindestens 200 µg/ml betragen, um entsprechende Konzentrationsbedingungen zu gewährleisten.

*Tabelle 5.18: Theoretisch berechnete notwendige Sättigungskonzentrationen verschiedener Wirkstoffe zur Gewährleistung von Sinkbedingungen im Akzeptormedium*

Einsatzkonzentration des Wirkstoffes		notwendige Sättigungskonz. für sink-Bedingungen in µg/ml	
		finite dose (10 mg/cm <sup>2</sup> )	infinite dose (100 mg/cm <sup>2</sup> )
Estradiol	0,1%	10,0	100,0
Testosteron	2,0%	200,0	2000,0
Prednicarbat	0,25%	25,0	250,0
Miconazol	2,0%	200,0	2000,0

Zur Auswahl eines geeigneten Lösemittels wurden die Sättigungskonzentrationen der vier Wirkstoffe in den genannten Medien bestimmt. Dazu wurde der Wirkstoff im Überschuss zum Lösemittel gegeben, für 24 h auf einer Schüttelapparatur bewegt und

## 5.4 Eignung als Vehikelsystem zur topischen Applikation

durch einen Chromafil® RC-45/15 MS Filter filtriert. Tabelle 5.19 zeigt die Ergebnisse der gemessenen Löslichkeiten (Einfachbestimmung). Während für Estradiol mindestens 20% Ethanol notwendig sind, sind die Sättigungslöslichkeiten bei den anderen Wirkstoffen in Phosphatpuffer mit 5% BSA-Zusatz ausreichend, um die gewünschten Konzentrationsbedingungen zu erfüllen. Für die folgenden Versuche wurde Testosteron als Modellarzneistoff ausgewählt, da es die höchste Löslichkeit in einem physiologisch relevanten Medium besitzt.

Tabelle 5.19: Analytisch ermittelte Sättigungslöslichkeiten verschiedener Wirkstoffe in möglichen Akzeptormedien (Einfachbestimmung)

Akzeptormedium	ermittelte Sättigungskonzentration in µg/ml			
	Estradiol	Testosteron	Prednicarbat	Miconazol
PBS-Puffer <sup>8</sup>	1,0	18,9	21,1	0,0
PBS + 5% BSA	- <sup>9</sup>	279,6	176,4	254,4
PBS + 5% Brij 98	-	713,4	1936,2	3345,5
EtOH 10%	4,3	73,7	49,8	0,0
EtOH 20%	21,4	211,5	198,9	4,2
EtOH 30%	149,0	1494,5	1471,9	n. b. <sup>10</sup>
EtOH 40%	810,5	4352,3	4676,1	n. b.
EtOH 50%	2108,3	4564,6	4591,9	n. b.

Da die Permeations- und Freisetzungstests in den Franz-Zellen bei 32 °C durchgeführt werden, wurde die Sättigungslöslichkeit von Testosteron in 5%igem BSA-Puffer bei dieser Temperatur erneut bestimmt. Demnach beträgt die  $c_s = 430,6 \mu\text{g/ml}$  (SD = 5,9 µg/ml, berechnet aus Dreifachbestimmung) und zeigt eine um ca. 55% gesteigerte Löslichkeit gegenüber Raumtemperaturbedingungen. Dies verdeutlicht zugleich, dass eine korrekte und konstante Temperierung der Franz-Zellen für aussagekräftige Ergebnisse dringend erforderlich ist. Die ermittelte Sättigungskonzentration bei dieser Temperatur ist mit Literaturwerten vergleichbar ( $345 \pm 10 \mu\text{g/ml}$  (Baert et al., 2010) und  $463,8 \mu\text{g/ml}$  (Baert et al., 2009)).

<sup>8</sup> Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4; Zusammensetzung siehe Anhang

<sup>9</sup> nicht auswertbar aufgrund von Peaküberlagerung

<sup>10</sup> n. b. = nicht bestimmt

#### 5.4.2.1.2 Probenaufarbeitung

Testosteron weist eine ausgeprägte Proteinbindung auf. Im Blut sind 98% des Testosterons an SHBG (sex hormone binding globuline) und Albumin gebunden (Kommentar zur Ph. Eur., 2012). Die Bindung an das humane Albumin ist hauptsächlich auf Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Kräfte sowie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zurückzuführen (Aljhani et al., 2012). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des BSA zum humanen Albumin ist daher auch im Akzeptormedium ein Teil des Testosterons an BSA gebunden und wird bei der HPLC-Analytik nicht vollständig erfasst. Um BSA aus den Proben zu entfernen, wurden diese stets mit gleichen Volumenteilen Acetonitril versetzt, manuell geschüttelt und das somit gefällte BSA anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 7000 rpm abgetrennt. Der klare Überstand wurde in die Vials überführt. Um sicherzustellen, dass diese Präparationsmethode eine bessere Wiederfindung erzielt, wurden Testosteronkonzentrationen vor und nach entsprechender Präparation gemessen. Dabei wurden drei verschiedene, für die Permeationsversuche relevante, Konzentrationsbereiche überprüft (Dreifachbestimmung). Abbildung 5.41 bestätigt die fehlerhafte Quantifizierung des Testosterongehaltes in den BSA enthaltenden Proben. Zugleich ist ersichtlich, dass sowohl die Wiederfindung als auch die gebundene Menge Testosteron pro BSA-Menge je nach Konzentrationsbereich variabel sind und sich somit eine Korrekturrechnung verbietet. Da das Ausfällen des BSA die Wiederfindung verbessern konnte, wurden alle Proben der Freisetzungs- und Permeationstests entsprechend aufgearbeitet.

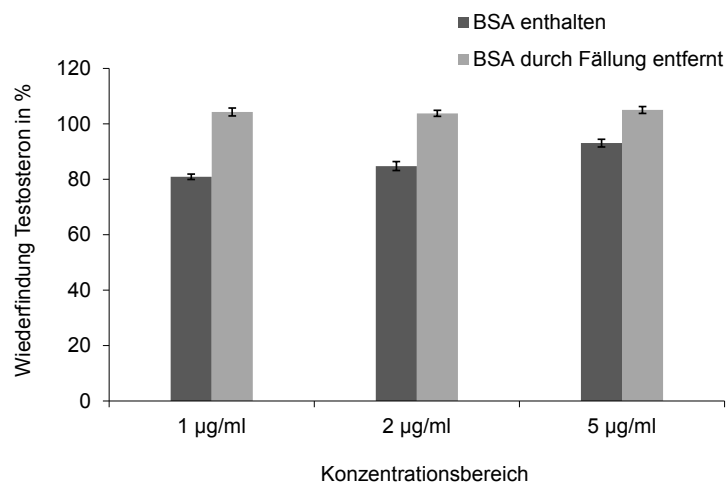


Abbildung 5.41: Wiederfindung des Testosterongehaltes mittels HPLC-Analytik vor und nach Ausfällung von BSA; Fehlerbalken: SD von einer Dreifachbestimmung.

## 5.4 Eignung als Vehikelsystem zur topischen Applikation

---

### 5.4.2.1.3 Gleichförmigkeit des Gehaltes

Um die Güte des Herstellungsprozesses der wirkstoffhaltigen Proben (anteiliges Anreiben des Wirkstoffes mit der Zubereitung in einer Fantaschale) bezüglich der homogenen Wirkstoffverteilung zu überprüfen, wurde die Wirkstoffkonzentration von zehn zufällig entnommenen Proben à 10 mg bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.20 dargestellt. Da ein Mittelwert von 98,8% und eine relative Standardabweichung von 1,9% für die durchzuführenden Permeationsversuche akzeptabel sind, wird davon ausgegangen, dass das verwendete Herstellungsverfahren bezüglich der Wirkstoffverteilung geeignet ist. Daher wird im weiteren Verlauf bei neu hergestellten Proben auf eine erneute Bestimmung des Gehaltes verzichtet.

*Tabelle 5.20: Homogenität des Wirkstoffgehaltes einer flüssigkristallinen Formulierung mit 10% Cholesterol, 1% Pemulen<sup>®</sup> TR-1 und 2% Testosteron. Die Probenmenge von jeweils 10 mg entspricht der zu applizierenden Masse bei Permeations- und Freisetzungsversuchen.*

<b>Probe</b>	<b>Gehalt in Prozent vom Sollgehalt</b>
1	102,6
2	99,0
3	100,7
4	99,2
5	97,1
6	98,9
7	96,3
8	97,3
9	99,5
10	97,8
Mittelwert	98,8
SD	1,9
rSD (%)	1,9

---

### 5.4.2.2 Freisetzungsuntersuchungen

Für die aufgeführten Freisetzungs- und Permeationstests wurden die folgenden Formulierungen verwendet. Die untersuchte flüssigkristalline Probe enthielt stets 10% Cholesterol und 1% Pemulen® TR-1 und wurde jeweils mit einem reinen Propylenglykol-Gel, welches auf die gleiche Weise geliert wurde, verglichen. Die eingesetzte Testosteronkonzentration betrug 1% bzw. 2%. Als Vergleichspräparat diente das Fertigarzneimittel Testogel® mit 10 mg Testosteron pro g Zubereitung. Weitere Inhaltsstoffe dieser Formulierung sind Carbomer 980, Ethanol 96%, Isopropylmyristat sowie gereinigtes Wasser.

Eine wesentliche Problematik der Franz-Zellentests stellte die Auftragung der geringen Probenmengen der halbfesten Formulierungen dar. Zur Gewährleistung von finite-dose Bedingungen betrug die Masse 10 mg. Diese musste gleichmäßig über die Diffusionsfläche von  $1,0 \text{ cm}^2$  verteilt werden, ohne die verwendete Membran zu beschädigen. Gleichzeitig musste die aufgetragene Menge quantifiziert werden.

Zunächst erfolgte die Aufgabe der Testformulierungen auf die bereits in der Franz-Zelle eingespannte Membran, da zuvor deren Integrität geprüft wurde und sie durch anschließende Entnahme wieder leicht beschädigt werden kann. Bei der ersten Freisetzungsuntersuchung wurde dazu ein Spritzensystem genutzt, welches in Abbildung 5.42 dargestellt ist.

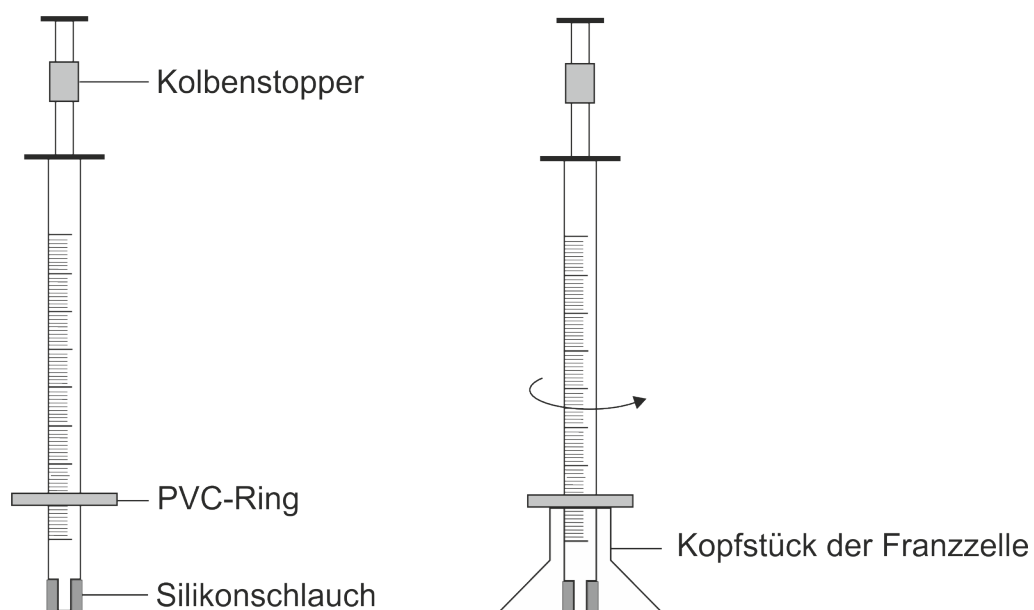
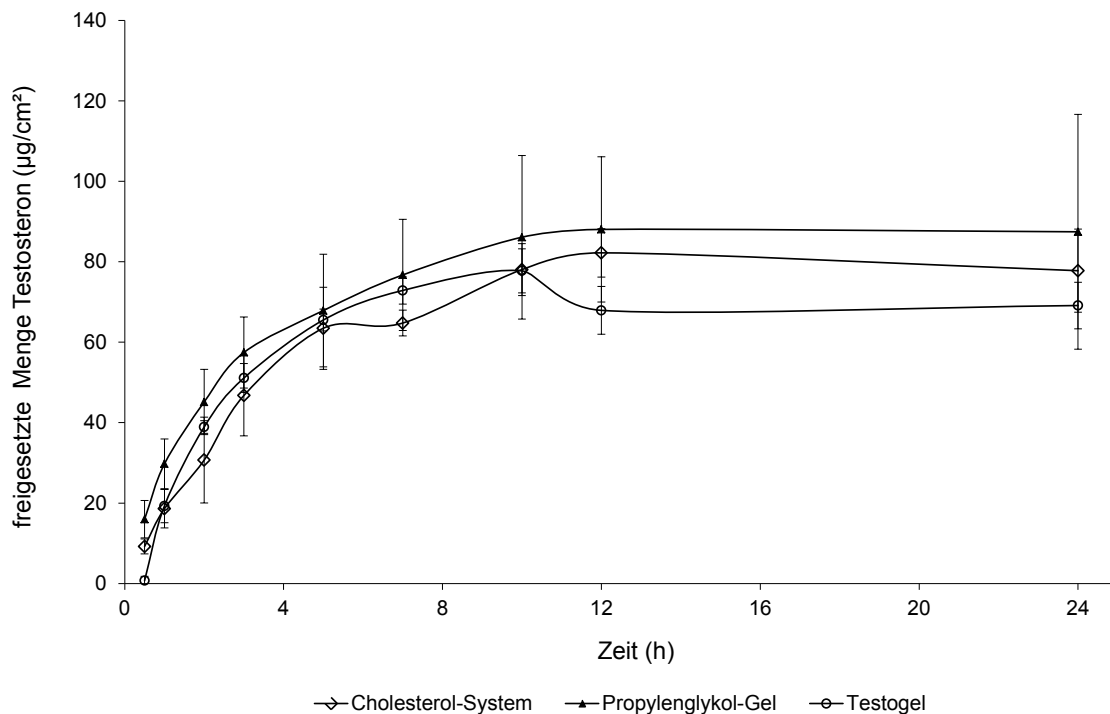


Abbildung 5.42: Aufbau einer adaptierten 1 ml Spritze zum Auftrag und zur Verteilung einer geringen Probenmenge auf der Testmembran



## 5.4 Eignung als Vehikelsystem zur topischen Applikation

Der PVC-Ring um den Zylinder wurde in eine Position gebracht, in welcher die Spitze der Spritze beim Aufsetzen des Ringes auf das Kopfstück der Franz-Zellen ca. 1 mm Abstand zur Membran besaß. Um die Auflagefläche der Spitze zu vergrößern, wurde ein Stück eines Silikonschlauches auf die Spitze gesetzt, sodass nun durch kreisende Bewegung der Spritze die Probe verteilt werden konnte, ohne dabei die Membran zu berühren. Zudem wurde ein Ring um den Kolben derart positioniert, dass beim Betätigen des Kolbens bis zum Anschlag die gewünschte Probenmenge vordosiert werden konnte. Die Quantifizierung dieser erfolgte durch Rückwägung der Spritze auf einer Analysenwaage.



**Abbildung 5.43:** Vergleich der Freisetzung von Testosteron aus einer flüssigkristallinen Formulierung, einem Propylenglykol-Gel und dem Fertigarzneimittel Testogel<sup>®</sup> durch einen Celluloseacetat-Filter. Die Auftragung von 10 mg Formulierung (1% Testosteron) erfolgte mit einer Spritze auf den bereits eingespannten Filter in der Franz-Zelle (Rückwägung auf der Analysenwaage),  $n = 3$ .

Die Ergebnisse einer mit dieser Auftragsmethode durchgeführten Freisetzung von Testosteron aus dem flüssigkristallinen System, dem Propylenglykol-Gel sowie aus dem Vergleichspräparat Testogel<sup>®</sup> durch einen Celluloseacetatfilter sind in den Abbildung 5.43 und Abbildung 5.44 dargestellt. Demnach unterscheiden sich die drei Formulierungen nicht in ihren Freisetzungprofilen. Nach 10 h wurde jeweils die

maximale Menge Testosteron freigesetzt. Auffällig sind besonders große Standardabweichungen sowohl der freigesetzten Menge im Akzeptormedium als auch des Rückstands im Filter und des verbliebenen Wirkstoffes in der Zubereitung. Zudem schwankt die Wiederfindung des applizierten Testosterons zwischen 83% und 123%. Hauptursache dafür ist wahrscheinlich die ungenaue Quantifizierung durch das Rückwiegen der Spritze auf der Analysenwaage. Gleichzeitig war auch die homogene Verteilung der Probe über die gesamte Diffusionsfläche nicht gegeben. Trotzdem wurde diese Auftragsmethode auch für die ersten Permeationsversuche genutzt.

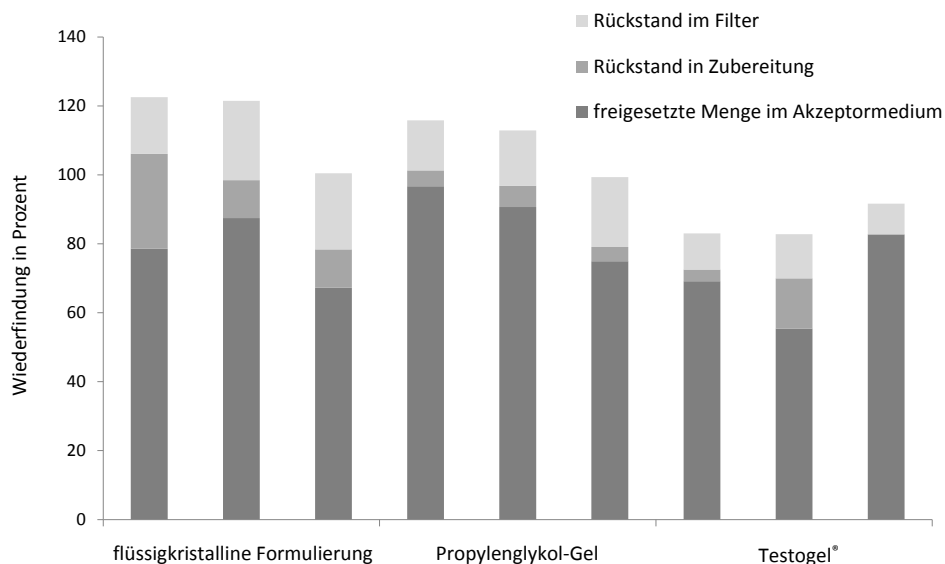


Abbildung 5.44: Wiederfindung der applizierten Testosteronmenge im Akzeptormedium, im Filter und in der Zubereitung der in Abbildung 5.43 beschriebenen Freisetzungsuntersuchung

Um auszuschließen, dass unterschiedliche Freisetzungs- und Permeationsprofile zwischen der entwickelten Formulierung und dem Testogel® auf Differenzen in der Sättigungslöslichkeit des Testosterons in den Vehikelsystemen beruhen, wurde diese nach der in Abschnitt 5.4.2.1.1 beschriebenen Methode bestimmt. Demnach beträgt die Sättigungslöslichkeit von Testosteron im Propylenglykol  $50,4 \pm 3,5$  mg/g und im Vehikelsystem des Testogels®  $48,9 \pm 1,6$  µg/g, sodass die entwickelten Formulierungsgrundlagen bezüglich der Testosteronlöslichkeit mit der Grundlage des Fertigarzneimittels vergleichbar sind.

## 5.4 Eignung als Vehikelsystem zur topischen Applikation

---

Um die Quantifizierung der applizierten Menge zu verbessern, musste die Auftragung der Zubereitung separat, d. h. auf eine noch nicht in der Zelle eingesetzte Membran erfolgen und auf einer empfindlicheren Waage dosiert werden. Um das bei Permeationsversuchen verwendete Stratum corneum dabei nicht zu beschädigen, wurde ein entsprechend ausgestanztes Stück ( $\varnothing$  25 mm) zusammen mit dem Filter in eine Ausparung eines angefertigten PVC-Ringes eingesetzt (Abbildung 5.45). Die zur Fixierung aufgelegte Scheibe enthält eine der Diffusionsfläche entsprechende Bohrung, durch welche die Probe aufgegeben wurde. Somit war eine einfache Handhabung des Hautpräparates möglich, ohne dieses zu verletzen.

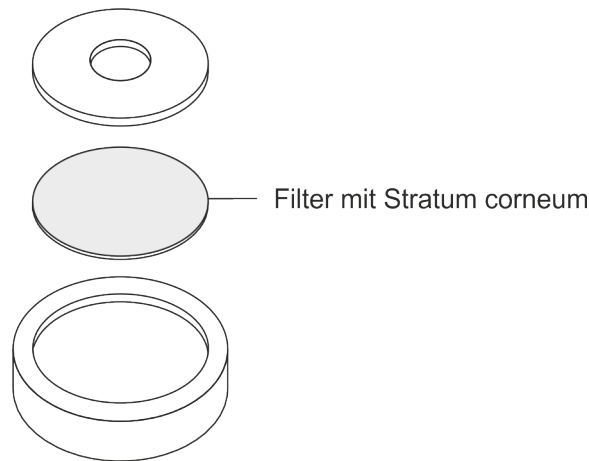


Abbildung 5.45: PVC-Ring zur Fixierung von Filter und Stratum corneum, wodurch ein direkter Probenauftrag auf einer Komparatorwaage ermöglicht wird

Eine nach dieser optimierten Methode durchgeführte Freisetzungsbefreiung liefert die in Abbildung 5.46 und Abbildung 5.47 dargestellten Ergebnisse. Demnach unterscheidet sich die flüssigkristalline Cholesterolzubereitung nicht vom Propylenglykol-Gel. Beide setzten ca. 87% bis 89% des applizierten Wirkstoffes frei. 9% bis 13% des Wirkstoffes waren im Filter nachweisbar und nur ein minimaler Anteil ( $< 0,6\%$ ) verblieb in der Zubereitung. Das Testogel<sup>®</sup> setzt deutlich mehr Wirkstoff frei, jedoch beträgt die Wiederfindung teilweise über 120%. Dies kann mit dem hohen Ethanolgehalt der Formulierung begründet werden, der sich während der Verteilung der Zubereitung verflüchtigt hat und somit die Einwaage verfälschen kann. Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse, dass die Dosierung der Zubereitungen durch Wägung auf einer Komparatorwaage sehr viel präziser ist im Vergleich zum Spritzensystem.

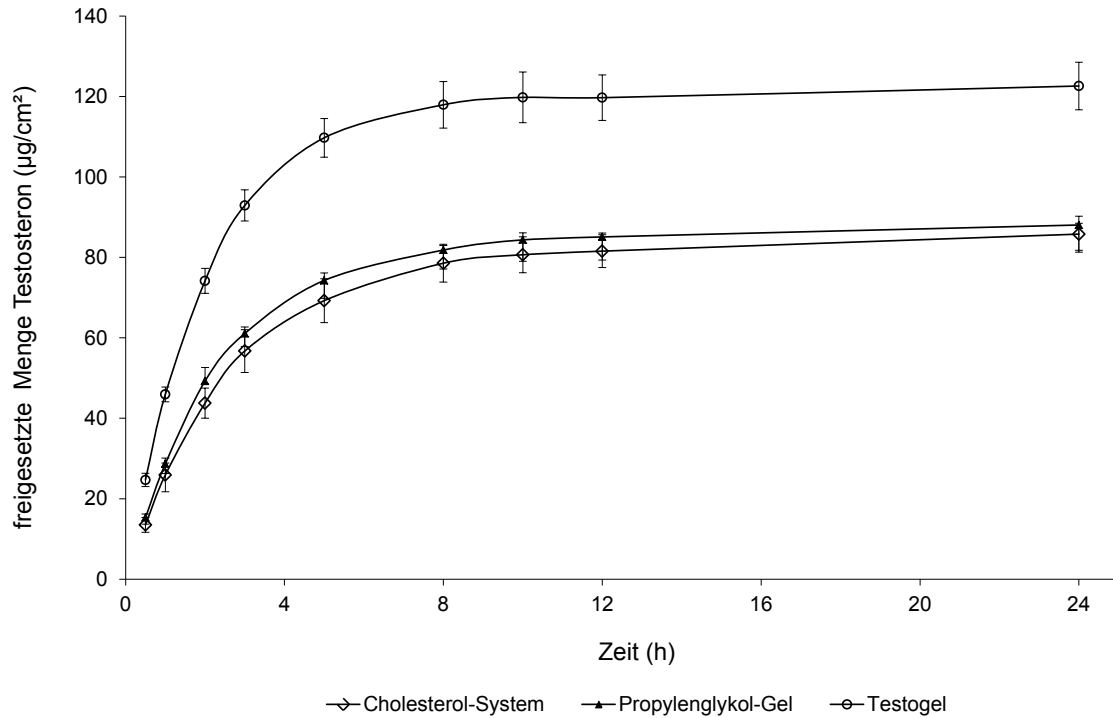


Abbildung 5.46: Vergleich der Freisetzung von Testosteron aus einer flüssigkristallinen Formulierung, einem Propylenglykol-Gel und dem Fertigarzneimittel Testogel<sup>®</sup> durch einen Celluloseacetat-Filter. Die Auftragung von 10 mg Formulierung (1% Testosteron) erfolgte mit einem Spatel auf dem separaten Filter (direkte Wägung auf der Komparatorwaage),  $n = 3$ .

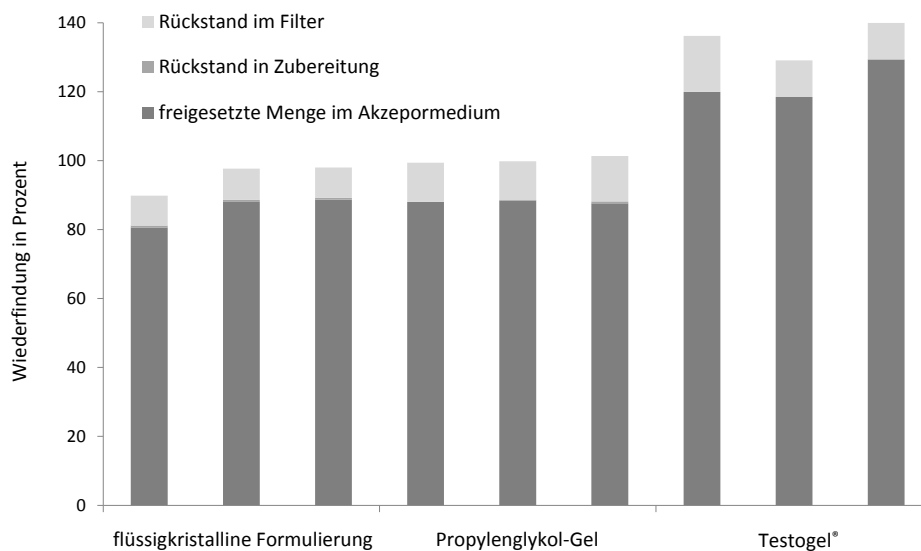


Abbildung 5.47: Wiederfindung der applizierten Testosteronmenge im Akzeptormedium, im Filter und in der Zubereitung der in Abbildung 5.46 beschriebenen Freisetzungsuntersuchung

### 5.4.2.3 Permeationsuntersuchungen

Aus Voruntersuchungen war bereits bekannt, dass Testosteron aus dem flüssigkristallinen System und dem Propylenglykol-Gel im Durchschnitt nur zu ca. 1,5% durch humane Epidermis permeierte. Daher wurde für einen folgenden Permeationstest Stratum corneum als Barriermembran genutzt. Zur mechanischen Stabilisierung wurde das ausgestanzte Stück auf einen Celluloseacetatfilter aufgebracht. Vor Auftragung der Zubereitungen wurde die Integrität mittels Widerstandsmessung geprüft. Aufgrund begrenzter Anzahl wurden auch Hautpräparate mit einem Widerstand  $< 20 \text{ k}\Omega$  genutzt und somit der Einfluss des gemessenen Widerstands auf die permeierte Testosteronmenge untersucht. Abbildung 5.48 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

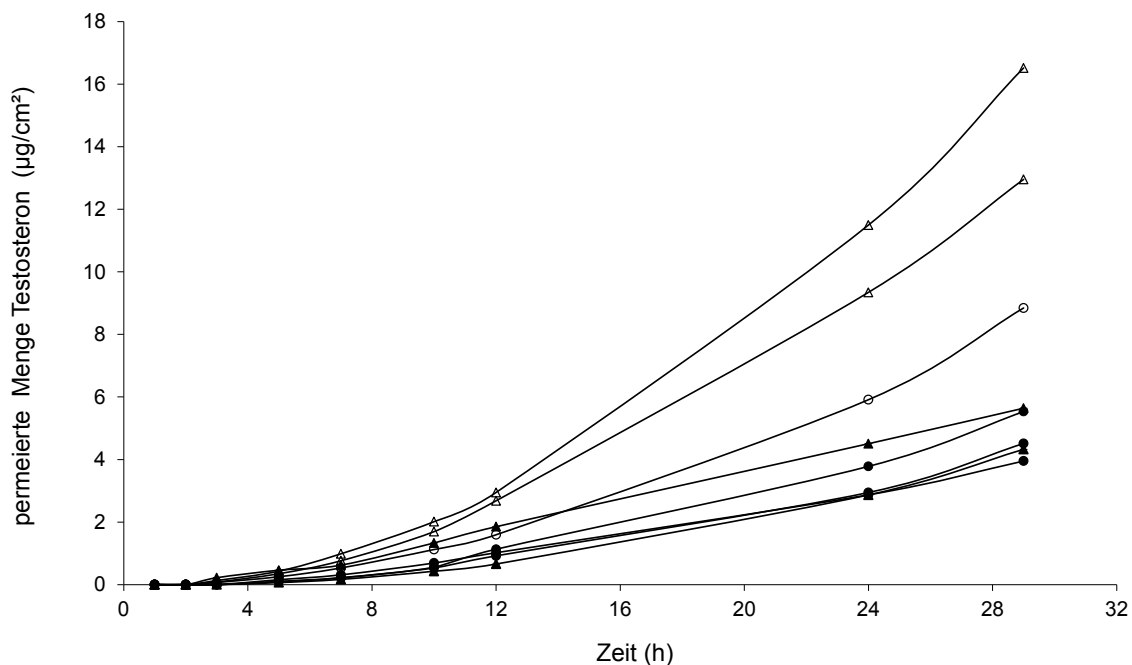


Abbildung 5.48: Einfluss des gemessenen Hautwiderstands auf die permeierte Menge Testosteron durch humanes Stratum corneum aus einem flüssigkristallinen System (Dreiecke) und einem Propylenglykol-Gel (Kreise). Intaktes Stratum corneum mit Widerstand  $> 20 \text{ k}\Omega$  (gefüllte Symbole), beschädigtes Stratum corneum mit Widerstand  $< 20 \text{ k}\Omega$  (offene Symbole). Auftragung von 10 mg Zubereitung (2% Testosteron) mittels Rückwägung auf Analysenwaage

Während die permeierte Testosteronmenge nach 30 h durch die intakten Membranen im Bereich zwischen  $4,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  und  $5,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lag, permeierte durch die beschädigten Membranen bis zu  $16,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Es zeigt sich daher die Messung des TEER als geeignete Methode, um kleinste, visuell nicht zu erkennende Verletzungen der Haut

detektieren zu können und somit eine fälschlich erhöhte Permeation auszuschließen. Ein Unterschied der Permeation aus der flüssigkristallinen Cholesterolfomulierung und dem Propylenglykol-Gel durch unbeschädigtes Stratum corneum ist nicht ersichtlich. Zudem wurde festgestellt, dass die Permeationsrate durch Stratum corneum gegenüber Epidermis keine deutliche Steigerung zeigte, da max. 2,8% des applizierten Testosterons im Falle der intakten Hautpräparate im Akzeptormedium detektiert wurden.

Um die Permeationsrate zu erhöhen und damit eventuell eine bessere Diskriminierung zu erzielen, wurde in einem weiteren Versuch Mausvollhaut als Permeationsbarriere genutzt. Diese besitzt ein sehr dünnes Stratum corneum und zeigt daher eine deutlich gesteigerte Permeabilität gegenüber humanem Material (El-Kattan et al., 2000, Godin et al., 2007). Da hier ebenfalls nur eine begrenzte Anzahl von Hautpräparaten zur Verfügung stand, wurden auch solche mit einem Widerstand  $< 20 \text{ k}\Omega$  verwendet. In diesem Fall konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem gemessenen Widerstand und der permeierten Testosteronmenge festgestellt werden. Die Aussage der Unversehrtheit des Stratum corneum bei Werten  $> 20 \text{ k}\Omega$  bezieht sich jedoch auf humanes Stratum corneum (Fokuhl et al., 2007). Um zusätzlich eine leichtere Aufgabe und Verteilung der Probenmenge zu erreichen, wurden infinite-dose Bedingungen mit  $40 \text{ mg/cm}^2$  simuliert. Abbildung 5.49 zeigt, dass Testosteron aus dem Fertigarzneimittel deutlich schneller permeiert. Der Flux (das ist die permeierte Stoffmenge pro Zeiteinheit und Diffusionsfläche) ist hier bereits zwischen 3 h und 5 h mit  $23,8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  am höchsten. Nach 24 h stellt sich bereits eine Plateauphase ein. Die Cholesterolfomulierung und das Propylenglykol-Gel hingegen zeigen erst am Ende des Tests, also zwischen 24 h und 30 h den maximalen Flux mit durchschnittlich  $5,6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . Von Testogel<sup>®</sup> sind nach 30 h ca.  $116 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$  permeiert, das entspricht ca. 29% der applizierten Testosteronmenge. Die anderen beiden Formulierungen zeigten über den geprüften Zeitraum eine Permeation von 21,3%. Somit konnte mit dieser Methode eine deutlich erhöhte Permeabilität und ein signifikanter Unterschied im Permeationsprofil zwischen dem Fertigarzneimittel und den beiden Testformulierungen festgestellt werden. Das flüssigkristalline Cholesterol scheint jedoch in diesem Fall keinen Einfluss auf die Permeationsbarriere auszuüben, da der Verlauf der permeierten Menge mit dem des Propylenglykol-Gels vergleichbar ist.

## 5.4 Eignung als Vehikelsystem zur topischen Applikation

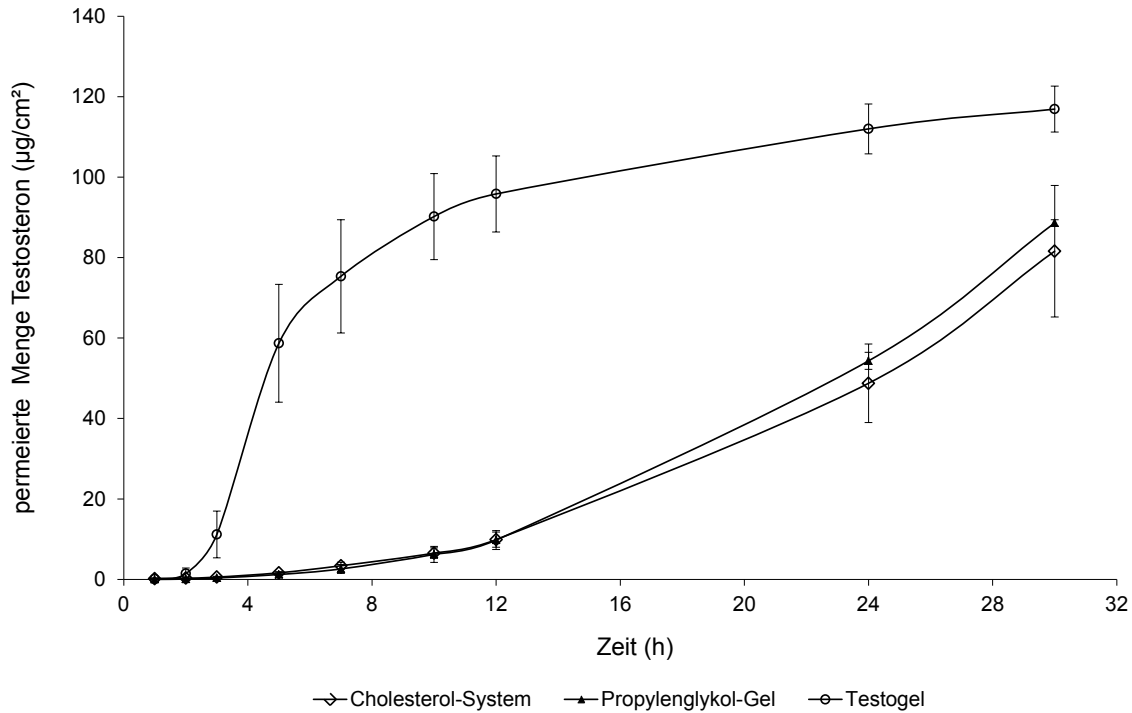


Abbildung 5.49: Vergleich der Permeation von Testosteron durch Mausvollhaut aus einer flüssigkristallinen Formulierung, einem Propylenglykol-Gel und dem Fertigarzneimittel Testogel®. Auftragung von 40 mg Zubereitung (1% Testosteron) mittels Rückwägung auf Analysenwaage, n = 3

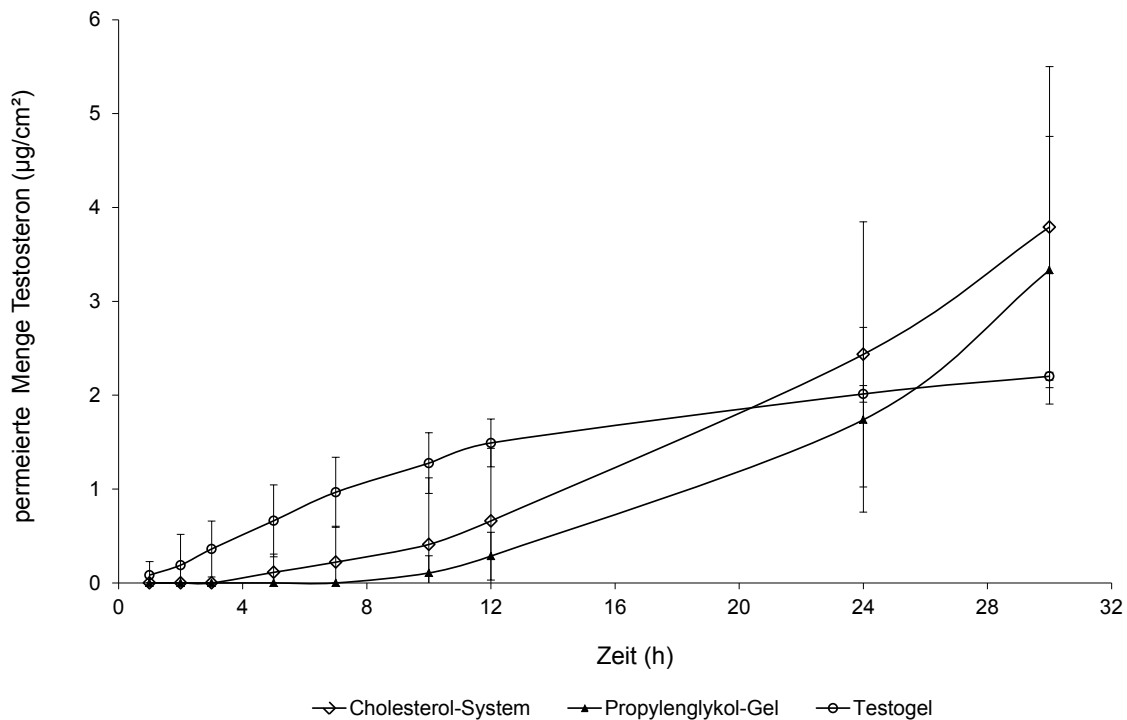


Abbildung 5.50: Vergleich der Permeation von Testosteron durch intaktes Stratum corneum (Widerstand > 20 kΩ) aus einer flüssigkristallinen Formulierung, einem Propylenglykol-Gel und dem Fertigarzneimittel Testogel®. Auftragung von 10 mg Zubereitung (1% Testosteron) mittels direkter Wägung auf Komperatorwaage, n = 3

In einem abschließenden Permeationstest wurde versucht, eine Vielzahl von Parametern zu optimieren, um eine gesteigerte Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu erzielen. Dazu wurde vor allem die Auftragung der Probenmenge auf einer Komparatorwaage durchgeführt, wodurch eine bessere Quantifizierung und auch homogene Verteilung der Zubereitung mit einem Spatel ermöglicht wurde. Zudem wurde die Probenmenge wieder auf 10 mg reduziert, um finite-dose Bedingungen zu gewährleisten. Integritätsmessungen vor und nach dem Test bestätigen die Unversehrtheit aller Hautpräparate. Die in Abbildung 5.50 dargestellten Permeationsverläufe zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Testformulierungen und unterliegen erneut großen Schwankungen. Dies kann u. a. darauf zurückgeführt werden, dass die Permeationsrate des Testosterons durch humanes Stratum corneum sehr gering ist. Es werden im Durchschnitt nach 30 h nur 3,1% des applizierten Testosterons im Akzeptormedium wiedergefunden. Diese geringe Permeationsrate ist mit Literaturwerten vergleichbar und auf die Lipophilie des Moleküls ( $\log P_{o/w}$  3,32) zurückzuführen.

Tabelle 5.21: Übersicht einiger Literaturdaten zur Permeation von Testosteron

Autor	Membran	appliziertes Testosteron	Akzeptormed. Temperatur	Prüfung Integrität	kumulierte Menge im Akzeptormed.
Hathout et. al (2010)	Schwein, Vollhaut 750 $\mu\text{m}$	20 $\text{mg}/\text{cm}^2$	PBS, 37 °C	nein	ca. 36 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n. 30 h (0,32%)
Schreiber et. al (2005)	Schwein, Vollhaut, 1000 $\mu\text{m}$	2,83 $\text{mg}/\text{cm}^2$	PBS + 5% BSA, 32 °C	visuell	ca. 4,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n. 6 h (0,16%)
Schreiber et. al (2005)	Humanhaut, Epidermis u. Vollhaut	2,83 $\text{mg}/\text{cm}^2$	PBS + 5% BSA, 32 °C	visuell	ca. 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n. 8 h (0,53%)
Baert et. al (2010)	Humanhaut, Vollhaut, 400 $\mu\text{m}$	4,69 $\text{mg}/\text{cm}^2$	PBS + 5% BSA, 32 °C	ja	234 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n. 24 h (5%)
Netzloff et. al (2007)	Humanhaut, Epidermis	11,36 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	PBS, 32 °C	nein	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n. 24 h (8,8%)
Buist et. al (2010)	Humanhaut, Epidermis	0,41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,9% NaCl 0,01% Na-Azid 6% Brij 96	ja	0,26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n. 8 h (63%)



## 5.4 Eignung als Vehikelsystem zur topischen Applikation

---

Tabelle 5.21 zeigt einige Beispieldaten zur Permeation von Testosteron durch verschiedene Testmembranen verschiedener Arbeitsgruppen. Schreiber et. al beschreiben z. B. eine Permeationsrate von 0,53% nach 8 h durch humane Vollhaut (Dicke 400  $\mu\text{m}$ ) und stellen keinen Unterschied der Permeationsrate durch Epidermis fest. Bei Auftragung einer sehr geringen Wirkstoffmenge von 11,36  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  auf humane Epidermis konnten Netzlaff et. al nach 24 h 8,8% im Akzeptormedium nachweisen. Bei den aufgeführten Literaturdaten ist zu beachten, dass alle Arbeitsgruppen außer Buist et. al mit infinite dose Bedingungen arbeiten und teilweise mehr als 2  $\text{ml}/\text{cm}^2$  Zubereitung auf die Hautmembranen auftragen.

### 5.4.3 Einfluss auf das thermodynamische Verhalten des Stratum corneum

Um die Auswirkungen des flüssigkristallin vorliegenden Cholesterols auf die Lipidstruktur des Stratum corneum zu ermitteln, wurden thermodynamische Untersuchungen des mit der Zubereitung behandelten Stratum corneum durchgeführt. Dazu wurde das Stratum corneum eines Donors (weiblich, 34 Jahre, Bauchhaut) nach der in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Methode isoliert. Nach dem Waschen in Pufferlösung wurde das Stratum corneum auf eine Teflonlochplatte aufgenommen und für ca. 10 h in einem mit Blaugel gefüllten Exsikkator getrocknet, um anhaftendes Restwasser zu entfernen. Zur Einstellung eines erforderlichen Hydratisierungszustandes wurde die Hautprobe anschließend für 48 h bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% bei Raumtemperatur gelagert (Lusiana et al., 2012). 5 g der zu testenden Formulierung wurden in einer Petrischale verteilt und geschlossen für 30 min bei 37 °C equilibriert. Anschließend wurde das Stratum corneum auf die Zubereitung gelegt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Entfernung der anhaftenden Produktreste erfolgte durch mehrmaliges Auflegen des Hautstückes auf ein Filterpapier sowie mit Hilfe eines Q-Tipps. Dann wurde das Stratum corneum zusammengefaltet und in einen Aluminiumtiegel eingewogen und verschlossen. Die Messung erfolgte von 20 °C bis 120 °C mit einer Heizrate von 5 °C/min. Dabei wurde auf eine strikte Einhaltung der Inkubationszeit sowie auf einen sofortigen Beginn der Messung nach dieser geachtet. Jede Messung wurde dreifach durchgeführt. Abbildung 5.51 zeigt die DSC-Kurven des unbehandelten Stratum corneum im Vergleich zu den mit der flüssigkristallinen Zubereitung (mit 10% Cholesterol und 1% Pemulen® TR-1) und dem Propylenglykol-Gel behandelten Hautproben. Zusätzlich wurde auch die reine Cholesterol-Zubereitung vermessen. Um die Phasenübergänge ersichtlich zu machen, wurde die erste Ableitung des Wärmeflusses in stark vergrößertem Maßstab dargestellt. Es sei darauf hingewiesen, dass die Änderungen des Wärmeflusses teilweise kleiner als 0,2 mW sind und nur knapp vom Grundrauschen unterschieden werden können. Die Phasenübergänge  $T_2$  und  $T_3$  des unbehandelten Stratum corneum wurden bei 73,5 °C und 87,9 °C detektiert und liegen im Bereich der auf Seite 6 angegebenen Literaturwerte. Die zusätzlich auftretenden Peaks der Messung von mit Cholesterol-Zubereitung behandeltem Stratum corneum im Bereich zwischen 85 °C und 90 °C sind auf nicht entfernte Formulierungsreste zurückzuführen. Zur besseren Übersicht sind die Phasenübergänge der vermessenen Hautproben in Abbildung 5.52 grafisch dargestellt.

## 5.4 Eignung als Vehikelsystem zur topischen Applikation

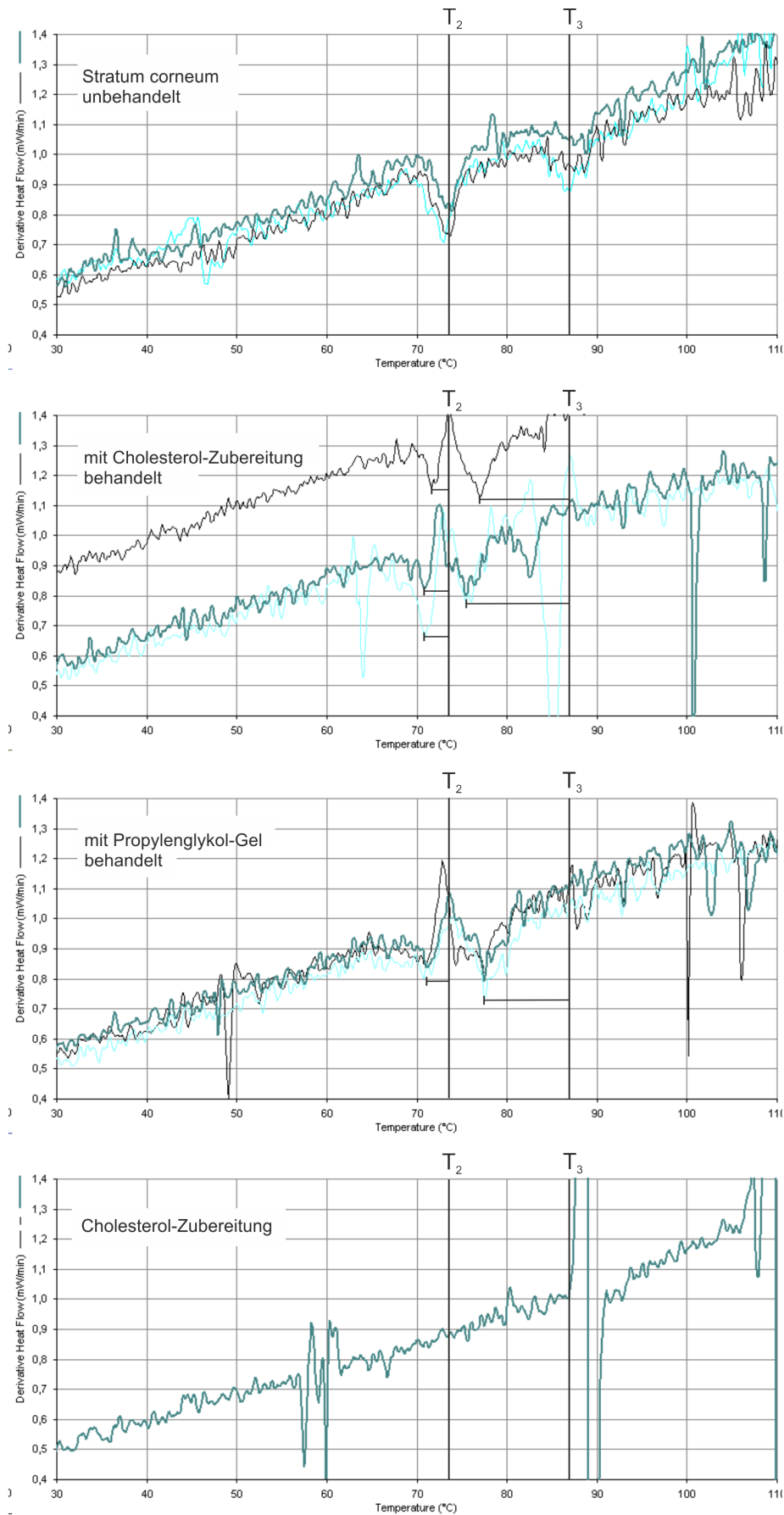


Abbildung 5.51: DSC-Kurven von unbehandeltem, mit Cholesterol-Zubereitung und Propylenglykol-Gel behandeltem Stratum corneum sowie von reiner Cholesterol-Formulierung,  $n = 3$

Während der Phasenübergang  $T_2$  durch beide Zubereitungen nicht signifikant verschoben wird, sinkt  $T_3$  um mehr als  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . Jedoch ist kein Unterschied zwischen den beiden Formulierungen festzustellen, sodass die Phasenverschiebung bei Behandlung mit der flüssigkristallinen Zubereitung lediglich auf den Propylenglykol-Anteil zurückzuführen ist.

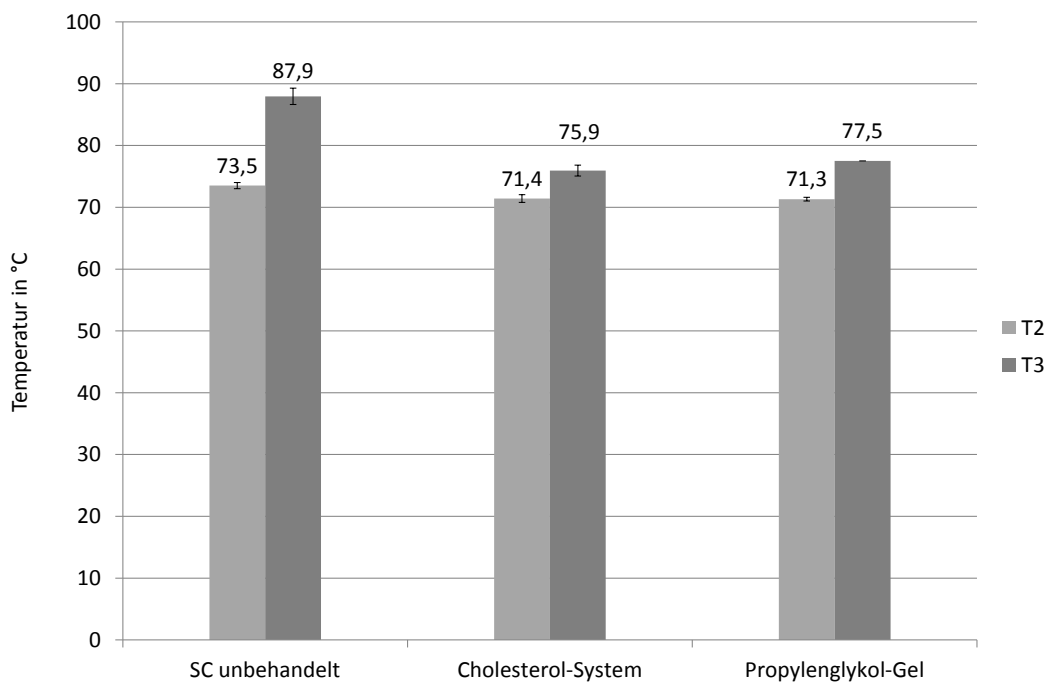


Abbildung 5.52: Beeinflussung des 2. und 3. Phasenüberganges der Stratum corneum-Lipide durch Applikation einer flüssigkristallinen Cholesterol-Zubereitung und eines Propylenglykol-Gels. Fehlerbalken: SD einer Dreifachbestimmung.

Die Verschiebung der Phasenübergänge zu geringeren Temperaturen ist für das Propylenglykol bekannt und wird z. B. mit  $4,1\text{ }^\circ\text{C}$  für  $T_2$  und  $5,5\text{ }^\circ\text{C}$  für  $T_3$  von Brinkmann et. al (Brinkmann et al., 2005) und von Bouwstra et. al mit  $10\text{ }^\circ\text{C}$  für beide Phasenübergänge angegeben (Bouwstra et al., 1991). Während Bouwstra et. al bei ebenfalls durchgeführten SAXD-Messungen keine Veränderung des Röntgendiffraktogrammes durch Propylenglykol analysierten und daher einen Einschluss des Propylenglykols lediglich in die Kopfgruppenregionen der Lipide vermuteten, können Brinkmann et. al dieses nicht bestätigen. Sie erhalten im mit Propylenglykol behandelten Stratum corneum einen zusätzlichen SAXD-Reflex und schlussfolgern daher, dass sich das Propylenglykol nicht nur in hydrophilen Bereichen der Lipid-Bilayer anreichert sondern auch in lateraler Richtung zwischen die Lipidkopfgruppen eingelagert wird (siehe Abbildung 5.53) (Brinkmann et al., 2005).

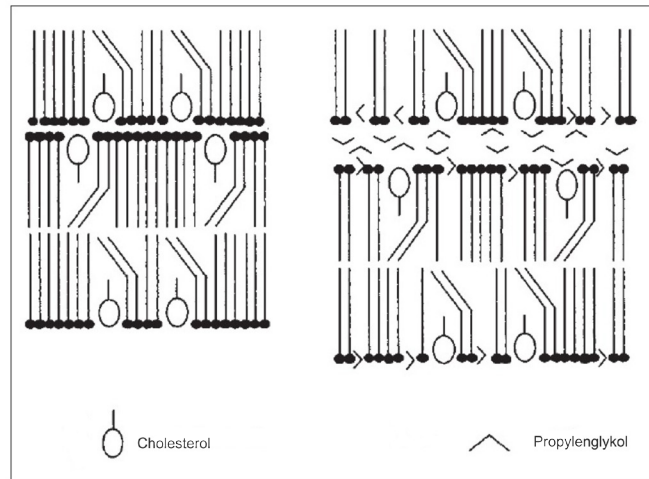


Abbildung 5.53: Schematische Darstellung des Propylenglykol-Einflusses auf die Lipid-Bilayerstruktur des Stratum corneum, links unbehandelt, rechts mit Propylenglykol behandelt, modifiziert nach Brinkmann et al., 2005

Bei dieser Untersuchung wurde das Fertigarzneimittel Testogel<sup>®</sup> nicht als Vergleich herangezogen, da das enthaltende Wasser dieser Formulierung den Hydratisierungsstatus des Stratum corneum verändert und somit eine vergleichende Betrachtung der Zubereitungen nicht möglich wäre.

### 5.4.4 Zusammenfassung

Liegen Wirkstoffe in der entwickelten Formulierung gelöst vor, so basiert dies auf dem hohen Propylenglykolanteil und der Löslichkeit in diesem Hilfsstoff. Eine Verbesserung der Lösungseigenschaften aufgrund des flüssigkristallinen Cholesterols konnte gegenüber im Propylenglykol suspendiert vorliegenden Wirkstoffen nicht gezeigt werden. Da die Einarbeitung molekulardispers vorliegender Arzneistoffe die flüssigkristalline Struktur nicht veränderte, konnten die Auswirkungen der Cholesterolfomulierung auf das Stratum corneum durch Permeationstests mit Franz-Zellen sowie durch thermodynamische Untersuchungen analysiert werden. Die Permeationsversuche wurden entsprechend der Empfehlungen der OECD durchgeführt. Unter diesen Bedingungen zeigte das Fertigarzneimittel Testogel<sup>®</sup> ein vergleichbares Permeationsprofil mit dem Cholesterolsystem und dem Propylenglykol-Gel. Bei Verwendung von Mausvollhaut und unter infinite dose Bedingungen wurde eine deutlich reduzierte Permeation von Testosteron aus den Testformulierungen gegenüber dem Fertigarzneimittel beobachtet. Dies ist vor allem auf den Ethanolgehalt des Testogels<sup>®</sup> und die damit verbundene Beeinträchtigung der Hautbarriere

zurückzuführen. Insgesamt ist bei allen Permeationsuntersuchungen keine gesteigerte Permeation des Testosterons aus dem flüssigkristallinen System gegenüber dem Propylenglykol-Gel festgestellt worden, sodass das Cholesterol in dieser Zubereitung keinen Einfluss auf die Hautbarriere zu haben scheint.

Ob die Verwendung eines anderen Wirkstoffmoleküls, möglichst mit größerer Permeationsrate, zu einer besseren Diskriminierung zwischen der Cholesterolzubereitung und dem Propylenglykol-Gel führt, müsste durch zusätzliche Versuche geklärt werden. Um jedoch die vermutete Beeinflussung der Stratum corneum-Lipide nachzuweisen, sollte der Wirkstoff hauptsächlich den interzellulären Transportweg des Stratum corneum passieren und muss daher eine ausreichende Lipophilie besitzen (Barry, 1987).

Die Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen werden durch thermodynamische Messungen des behandelten Stratum corneum bestätigt. Die Veränderungen der Phasenübergänge des Stratum corneum waren bei Behandlung der Haut mit der Cholesterol-Formulierung und dem Propylenglykol-Gel gleich stark ausgeprägt und somit lediglich auf das Propylenglykol zurückzuführen.

Von den flüssigkristallin vorliegenden Cholesterolaggregaten wurde erwartet, dass sie einerseits eine gesteigerte Solubilisationsfähigkeit gegenüber schwerlöslichen Arzneistoffen besitzen und sich andererseits in die geordneten Strukturen der interzellulären Stratum corneum-Lipide einlagern und somit deren Barrierefunktion beeinflussen können. Die erzielten Ergebnisse widerlegen jedoch diese Vermutungen. Mögliche Ursachen dafür können auf die Stabilität der Cholesterolfibrillen zurückzuführen sein. Handelt es sich tatsächlich um ein niedermolekulares Organogel mit einem stark ausgeprägten Netzwerk, zeigen die Cholesterolaggregate keinen dynamischen Molekülaustausch, sondern sind starre, stabile Gebilde von permanenter Struktur. Dadurch kann weder eine Solubilisation zugesetzter Substanzen, noch eine Interaktion mit den Stratum corneum-Lipiden auf molekularer Ebene erfolgen.

Die Stabilität entsprechender Cholesterolaggregate wurde bereits 1973 durch ungewöhnlich hohe intermolekulare Kräfte zwischen den Monomeren von stäbchenartigen Mizellen im wässrigen Medium beschrieben. Folglich konnte eine Substanz, die gewöhnlich durch viele synthetische Detergentien solubilisiert werden kann, nicht in die Cholesterolmizellen inkorporiert werden (Haberland et al., 1973).



## 6 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wurde der Strukturaufbau einer halbfesten Zubereitung aus Cholesterol und Propylenglykol analysiert und dessen Verwendung als Vehikelsystem zur topischen Applikation geprüft. Diese Formulierung weicht vom Aufbau eines gewöhnlichen, halbfesten Zweiphasensystems (O/W- bzw. W/O-Formulierung) deutlich ab, da sie aus langen, fädenförmigen Cholesterolaggregaten besteht, welche die flüssige Komponente durch Kapillarkräfte immobilisieren.

Um diese fibrilläre Struktur näher zu untersuchen, musste zunächst eine geeignete Herstellungsmethode entwickelt werden. Die Bildung dieses halbfesten Systems konnte durch Prozesse sowohl mit einem sehr hohen als auch mit einem sehr niedrigen Energieeintrag erfolgen. Induziert wurde die Fibrillenbildung vielmehr durch Aneinanderreiben kristalliner Cholesterolpartikel. Diese Bedingungen waren einerseits in der Schwing- und Rührwerkskugelmühle, andererseits auch bei einem einfachen Rührprozess mit einem Magnetrührer gegeben. Da die Ansatzgröße in der Schwingmühle jedoch auf 2 g limitiert war und eine reproduzierbare Herstellung in der Rührwerkskugelmühle aufgrund unregelmäßiger Produktförderung nicht möglich war, konnten beide Geräte nicht zur Herstellung genutzt werden. Der einfache Rührprozess in einem verschlossenen Schraubdeckelgefäß konnte sowohl bei Raumtemperatur mit einer Prozesszeit von 24 h als auch bei ca. 40 °C und einer stark verkürzten Prozesszeit von 60 min realisiert werden. Da die Temperierung jedoch sehr konstant erfolgen musste und eine höhere Temperatur als 45 °C bereits zur Bildung nadelförmiger Kristalle führte, wurde die Variante bei Raumtemperatur bevorzugt. Nach Ausbildung der fibrillären Strukturen konnten restliche Cholesterolkristalle durch mehrtägige Lagerung bei 50 °C beseitigt werden. Auf diese Weise hergestellte Produkte unterlagen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit weder makroskopischen noch mikroskopischen Veränderungen.

Um notwendige Molekülstrukturen zu erfassen, wurden Cholesterol und Propylenglykol jeweils durch chemisch verwandte Substanzen bzw. durch eine pseudopolymorphe Modifikation ausgetauscht und die Polarität der flüssigen Phase durch Wasserentzug und -zugabe variiert. Dabei zeigte sich, dass bei Austausch des Cholesterolanhydrates durch das -monohydrat sowie des Propylenglykols durch Isopropanol eine Fibrillenbildung ebenso möglich war. Alle weiteren getesteten Substanzen, die z. B.



eine weitere Ethylgruppe im Fall des Cholesterols oder eine weitere Methylgruppe im Fall des Propylenglykols aufwiesen, zeigten diese Eigenschaft nicht. Es ergaben sich daher strenge Anforderungen an die Molekülstruktur der festen und flüssigen Komponente. Eine weitere Voraussetzung war das Vorliegen einer bestimmten Polarität, da ab einem Wassergehalt von ca. 3% die Ausbildung der fibrillären Strukturen nicht mehr möglich war. Dies gibt einen Hinweis auf die Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen an der Ausbildung dieser fibrillären Strukturen.

Die mikroskopisch sichtbaren Filamente sind visuell vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Netzwerken niedermolekularer Organogele. Dabei assoziieren Moleküle mit einem geringen Molekulargewicht derart, dass sie ein stark gesteigertes Wachstum in der einen Achse und gehemmtes Wachstum in den anderen Raumachsen aufweisen. Es resultieren sehr lange (Millimeterbereich) und sehr dünne (Nanometerbereich) fibrilläre Strukturen, die sich gegenseitig in ihrer Bewegung behindern und ein dreidimensionales Netzwerk darstellen, welches die flüssige Komponente durch Oberflächenspannung und Kapillarkräfte immobilisiert. Mit Hilfe von Polarisations- und Elektronenmikroskopie, Röntgenkleinwinkel- und -weitwinkelmessungen sowie thermodynamischen und rheologischen Methoden konnte zudem ein flüssigkristalliner, insbesondere ein invers hexagonaler Aufbau dieser Strukturen belegt werden.

Da sowohl flüssigkristalline Systeme als auch niedermolekulare Gele gute Solubilisationseigenschaften sowie eine gesteigerte Wirkstoffpermeation durch die Haut aufweisen können und letzteres besonders von dem flüssigkristallin vorliegenden Cholesterol – einem wichtigen Bestandteil von interzellulären Stratum corneum-Lipiden – erwartet wurde, ist die entwickelte Formulierung hinsichtlich dieser Eigenschaften untersucht worden. Dabei konnte keine Verbesserung der Lösungseigenschaften gegenüber im Propylenglykol suspendiert vorliegenden Arzneistoffen gezeigt werden. Da jedoch eine Vielzahl der getesteten Wirkstoffe im Propylenglykol selbst löslich war und diese das fibrilläre System weder makroskopisch noch mikroskopisch veränderte, konnte die Auswirkung der flüssigkristallinen Zubereitung auf die Wirkstoffpermeation durch die Haut mit Hilfe von Franz-Zellen erprobt werden. Als Modellarzneistoff wurde Testosteron eingesetzt. Um die penetrationsverbessernde Wirkung des Propylenglykols zu berücksichtigen, wurde das Cholesterolsystem mit einem reinen Propylenglykol-Gel verglichen. Bei keiner der

durchgeführten Permeationstests durch humanes Stratum corneum oder Mausvollhaut konnte eine gesteigerte Testosteronpermeation aus der Cholesterolformulierung gegenüber dem Propylenglykol-Gel festgestellt werden.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Wechselwirkung mit der Haut stellten thermodynamische Messungen des mit der Zubereitung behandelten Stratum corneum dar. Da die interzellulären Lipide der obersten Hautschicht eine komplexe Organisation und folglich charakteristische Phasenübergänge aufweisen, kann eine Veränderung der Lipidorganisation mit dieser Methode erfasst werden. Die detektierten Verschiebungen der Phasenübergänge waren jedoch erneut lediglich auf das Propylenglykol zurückzuführen.

Eine mögliche Ursache für die fehlende Solubilisierungseigenschaft und permeationssteigernde Wirkung der untersuchten Formulierung kann mit der Stabilität der Cholesterolaggregate begründet werden. Mit Hilfe rheologischer Ergebnisse war eine Zuordnung zum Typ der „starken“ niedermolekularen Gele möglich. In diesen weisen die Fibrillen eine stabile, permanente Struktur ohne dynamischen Molekülaustausch auf. Zudem wurde in der Literatur beschrieben, dass ungewöhnlich hohe intermolekulare Kräfte zwischen Cholesterolmonomeren einer stäbchenförmigen Mizelle auftreten. Demzufolge können eine Inkorporierung von Arzneistoffmolekülen und auch die molekulare Interaktion mit den hoch geordneten Stratum corneum-Lipiden nicht stattfinden. Die Cholesterolformulierung zeigte daher in den vorgenommenen Untersuchungen keine Vorteile gegenüber anderen Vehikelsystemen zur topischen Applikation.



## 7 ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the structure of a semisolid formulation, consisting of cholesterol and propylene glycol, and to investigate its potential as topical delivery system. The microstructure of this preparation is different to those of standard two-phase-systems (like o/w- or w/o-formulations), because it exhibits long, fibre-like aggregates of cholesterol which immobilize the liquid component by capillary forces.

Initially a suitable production process had to be developed to investigate this filamentous structure. The formation of this semisolid product could be realised by processes both with a high and a low energy input. The building process was induced rather by friction between crystalline cholesterol particles. These conditions were fulfilled either in a swinging and a rotating ball mill or with the help of a very simple stirring process on a magnetic stirrer. Due to a limited batch size by using the swinging mill and poor reproducibility because of an irregular product transport in case of the rotating ball mill, both devices were found not to be suitable for this purpose. The stirring process in a closed bottle was realised either at room temperature with a process time of approx. 24 hours or at approx. 40 °C with a reduced process time of 60 minutes. But temperature had to be kept constant and not higher than 45 °C, otherwise needle-like crystals were produced. Therefore, room temperature was preferred for this process. After the formation of the fibrillar structure it was possible to remove all remained cholesterol crystals by storing the formulation at 50 °C for several days. All preparations produced this way showed no macroscopic and microscopic changes over longterm storage at ambient conditions.

To detect essentially molecular structures forming the gel, cholesterol and propylene glycol were replaced by chemically related substances and by a pseudopolymorphic form of cholesterol, respectively. Additionally the polarity of the liquid phase has been varied by extracting or adding water. It could be shown that the formation of the fibre-like structures was also possible by replacing the anhydrous form of cholesterol by the monohydrate as well as propylene glycol by isopropanol. Other excipients tested, which exhibit an additional ethylgroup in case of cholesterol or an additional methylgroup in case of propylene glycol did not show gel formation. Consequently there were strong requirements to the molecular structure of the solid and liquid component. Another requirement was the existence of a certain polarity, because the formation of the

structures was not possible with a water content up to 3% approx. This indicated the participation of hydrogen bonding to the formation of filamentous structures.

The microscopic filaments are comparable visually with low molecular organic gels, which are described in literature. In this type of gel, molecules with a low molecular weight associate in a way, that they exhibit strong growth in the one axis and limited growth in the other both axes. This results in very long (millimetre range) and very thin (nanometre range) filaments, which overlap each other and form a three-dimensional network in which the liquid component is immobilized by surface tension and capillary forces. Additionally, a liquid crystalline, especially an invers hexagonal structure of these filaments could be investigated with the help of polarising and electron microscopy, small- and wide-angle-x-ray diffraction as well as rheological and thermoanalytical methods.

Liquid crystalline systems as well as low molecular organic gels can offer good stability properties and enhanced drug permeation through the skin. Especially the latter was expected for the liquid crystalline cholesterol, because it is an important component of intercellular lipids of stratum corneum. Therefore the investigated formulation was analysed in terms of these properties. It could be shown that there were no enhanced solubility properties for drugs, which were insoluble in propylene glycol. However, several tested drugs were soluble in propylene glycol themselves and did neither change the fibrillar system macroscopically nor microscopically. Therefore, the impact of the liquid crystalline preparation to drug permeation through the skin could be investigated by Franz cell tests using testosterone as model drug. The cholesterol formulation was compared with a pure propylene glycol gel, in order to consider the enhancing effect of propylene glycol. An increased permeation rate of testosterone by the cholesterol formulation compared to the pure propylene glycol gel could not be detected in any of the permeation tests through human stratum corneum and full mouse skin, respectively.

An additional method to inspect the interaction with the skin was the thermoanalytical measurement of stratum corneum, which was treated by the cholesterol formulation. The complex organization of intercellular lipids of the uppermost layer of the skin leads to characteristic phase transitions. That is why this method can detect some changes in lipid organization. But the measured shifts were caused only by the propylene glycol

again. A possible explanation for the lack of solubility properties and enhanced permeation rates is related to the stability of cholesterol aggregates. With the help of rheological measurement the system could be assigned to the type of low molecular organic gel with a strong fibrillar network. In this case the network has a robust and permanent morphology without a dynamic remodelling of molecules. Additionally literature describes that rodlike cholesterol micelles are stabilized by unusually strong intermolecular attractive forces between the aggregated monomers. Consequently an incorporation of drug molecules and a molecular interaction with the high ordered stratum corneum lipids are not present. In conclusion, the investigated cholesterol preparation did not show any advantage over other drug delivery systems for topical application.



## 8 ANHANG

### 8.1 Verwendete Abkürzungen und Symbole

$\emptyset$	Durchmesser
$\Delta H$	Enthalpieänderung
$\Delta T$	Temperaturänderung
$\delta$	Phasenverschiebungswinkel
$\eta^*$	komplexe Viskosität
$\gamma_A$	Deformationsamplitude
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu\text{g}$	Mikrogramm ( $10^{-6}$ Gramm)
$\mu\text{l}$	Mikroliter ( $10^{-6}$ Liter)
$\mu\text{m}$	Mikrometer ( $10^{-6}$ Meter)
$\omega$	Kreisfrequenz
$\Theta$	Reflexionswinkel
$\tau_A$	Schubspannungsamplitude
bar	Druckeinheit
BSA	bovine serum albumine
$\text{CH}_3\text{OH}$	Methanol
ChA	Cholesterolanhydrat
$\text{cm}^2$	Quadratzentimeter
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
$c_s$	Sättigungslöslichkeit
Cu	Kupfer
d	Netzebenenabstand oder Tag
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DSC	Dynamic Scanning Calorimetry
EDTP	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	lat.: und andere(r)
EtOH	Ethanol
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FK	Flüssigkristall



g	Gramm
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul
G*	komplexes Modul
h	Stunde oder Streuvektor
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
I <sub>2</sub>	Jod
J/g	Joule pro Gramm
K	Kelvin
KF	Karl-Fischer
kΩ	Kilohm (10 <sup>3</sup> Ohm)
kV	Kilovolt (10 <sup>3</sup> Volt)
l	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
LMOG	low molecular organic gelator
log P <sub>o/w</sub>	Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungs- koeffizienten
mA	Milliampere (10 <sup>-6</sup> Ampere)
mg	Milligramm (10 <sup>-6</sup> Gramm)
min	Minute
ml	Milliliter (10 <sup>-6</sup> Liter)
mm	Millimeter (10 <sup>-6</sup> Meter)
mPa*s	Einheit der Viskosität
n	Umfang der Stichprobe
n. b.	nicht bestimmt
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer (10 <sup>-9</sup> Meter)
NRF	Neues Rezeptur Formularium
O/W	Öl-in-Wasser
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development

---

P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	di-Phosphorpentoxid
Pa	Pascal
Pa*s	Einheit der Viskosität
PBS	phosphate buffered solution
PEG	Polyethylenglykol
pH	Potentia Hydrogenii
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RN	symbolisch für eine Base (in diesem Fall Imidazol)
rpm	rounds per minute
rSD	relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SC	Stratum corneum
SAXD	Small Angle X-ray Diffraction
SCCNFP	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products
SD	Standardabweichung
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
t	Zeit
TEER	trans epidermal electrical resistance
TEM	Transelektronenmikroskopie
TG	Thermogravimetrie
TTS	Transdermales Therapeutisches System
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ung. Emulsif. Aquos.	Wasserhaltige Hydrophile Salbe DAB
Upm	Units per minute
USP	United States Pharmacopeia
VK	Variationskoeffizient
W	Watt
W/O	Wasser-in-Öl
WAXD	Wide Angle X-ray Diffraction
WHO	World Health Organisation
ZrO <sub>2</sub>	Zirkoniumdioxid

---

## 8.2 Verwendete Substanzen

### Substanzen

#### Acetonitril

CHROMASOLV gradient grade > 99,9%

#### Albumin

von Rinderserum, > 98%  
Charge 120M1338V

#### Betamethasonvalerat

Charge 06C17-N05

#### Bifonazol

Charge 11D13-N13

#### Brij<sup>®</sup> 98

#### 1,2-Butandiol

>98%

#### Carbopol<sup>®</sup> 981 PNF

#### Cholesterol

95%, Charge 099K1508

95%, Charge 057K0683

> 95%, Charge 1324049

Charge: 06A02-N16

#### Ciclopirox-Olamin

Charge 11C21-N03

#### Clotrimazol

Charge 675

#### Diclofenac-Natrium

#### EDTP

Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-2-propanol >98%

#### Erythromycin

Charge 09174703

### Hersteller

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Fagron GmbH & Co.KG, Barsbüttel

Fagron GmbH & Co.KG, Barsbüttel

Uniqema GmbH & Co.KG, Emmerich

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Lubrizol Advanced Materials Inc.  
Cleveland, USA

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Fluka Chemie AG, Buchs

Fagron GmbH & Co.KG, Barsbüttel

Fagron GmbH & Co.KG, Barsbüttel

Karlo. Helm, Hamburg

unbekannt

Merck KGaA, Darmstadt

Caesar & Loretz GmbH, Hilden

---

<b>Estradiol-Hemihydrat</b> Charge 80200069	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<b>Ethandiol</b>	Walter CMP GmbH, Kiel
<b>Ethanol</b> LiChrosolv, > 99,9%	Merck KGaA, Darmstadt
<b>1,7-Heptandiol</b> > 95% Charge 1261956	Fluka Chemie AG, Buchs
<b>Hydrocortisonacetat</b> Charge 81309	Mainland, Frankfurt
<b>Ibuprofen</b> Charge 1BG470	Knoll AG, BASF-Pharma, Ludwigshafen
<b>Isopropanol</b> > 99,8%	AppliChem GmbH, Darmstadt
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Ketoconazol</b> Charge 83C0376	Janssen Pharmaceutical, Belgien
<b>Ketoprofen</b> Charge 01020212	Kreussler Pharma, Wiesbaden
<b>Methanol</b> HPLC Gradient grade	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
<b>Miconazol</b> Charge 87H0906	Janssen Pharmaceutical, Belgien
<b>Molekularsieb</b> UOP Typ 3A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<b>Myritol® 318 PH</b>	Cognis GmbH, Düsseldorf
<b>Natriumchlorid</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>di-Natriumhydrogenphosphat</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Natriumhydroxid</b>	Merck KGaA, Darmstadt

---

Pemulen® TR-1	Lubrizol Advanced Materials Inc., Cleveland, USA
1,2-Pentandiol Hydrolite-5, Charge 265	Symrise AG, Holzminden
di-Phosphorpentoxid > 98%	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphorsäure konz. 85%	Merck KGaA, Darmstadt
Prednicarbat mikronisiert, Charge M1876M	New Chem, Verona, Italien
Prednisolon Charge 27H0169	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Progesteron Charge 110H0007	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propylenglykol Charge 87-0369 99,5%, Charge SZBA1520	BASF SE, Ludwigshafen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Sitosterol > 70%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Terbinafin Base	selbst hergestellt aus Terbinafin HCL
Terbinafin HCL Charge 905015HA	Qilu Pharmaceutical Co., China
Testosteron > 99%, Charge 339200/1395	Fluka Chemie AG, Buchs
Triamcinolonacetonid Charge 2322825	Mainland, Frankfurt
Triethylamin > 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vaseline	Sasol Germany GmbH, Hamburg

## 8.3 HPLC-Methoden

Die Arzneistoffe wurden mit einer Agilent 1100 HPLC-Anlage (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) quantifiziert. Die Analysen erfolgten isokratisch bei den nachfolgend aufgelisteten Parametern. Die Auswertung der erhaltenen Peakflächen wurde mit der Software Chemstation LC 3D (Rev. A.10.02[1757], Agilent Technologies Inc.) durchgeführt. Die Gehaltsberechnung erfolgte über lineare Regression von Verdünnungsreihen mit externen Standards.

### 8.3.1 Estradiol-Hemihydrat

Stationäre Phase:	<u>Säule:</u> LiChroCART <sup>®</sup> 125-4, gefüllt mit LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 (5 µm)
	<u>Vorsäule:</u> LiChroCART <sup>®</sup> 4-4, gefüllt mit LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 (5 µm)
Mobile Phase:	55% Acetonitril 45% Aqua bidest.
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	25 °C
Detektionswellenlänge:	205 nm
Retentionszeit:	2,8 min

### 8.3.2 Miconazol

Stationäre Phase:	<u>Säule:</u> LiChroCART® 250-4, gefüllt mit LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) <u>Vorsäule:</u> LiChroCART® 4-4, gefüllt mit LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)
Mobile Phase:	90% Methanol 10% TEAP-Puffer (5 g Triethylamin ad 1 l Aqua bidest., mit konz. Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt)
Flussrate:	1,2 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	40 °C
Detektionswellenlänge:	225 nm
Retentionszeit:	4,6 min

### 8.3.3 Prednicarbat

Stationäre Phase:	<u>Säule:</u> LiChroCART® 125-4, gefüllt mit LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) <u>Vorsäule:</u> LiChroCART® 4-4, gefüllt mit LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)
Mobile Phase:	55% Acetonitril 45% Aqua bidest.
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	25 °C
Detektionswellenlänge:	243 nm
Retentionszeit:	5,8 min

### 8.3.4 Testosteron

Stationäre Phase:	<u>Säule:</u> LiChroCART <sup>®</sup> 125-4, gefüllt mit LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 (5 µm) <u>Vorsäule:</u> LiChroCART <sup>®</sup> 4-4, gefüllt mit LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 (5 µm)
Mobile Phase:	39% Acetonitril 61% Aqua bidest.
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl (bei sehr geringen Konzentrationen 100 µl)
Säulentemperatur:	25 °C
Detektionswellenlänge:	254 nm
Retentionszeit:	9,1 min

### 8.3.5 Cholesterol

Stationäre Phase:	<u>Säule:</u> LiChroCART <sup>®</sup> 125-4, gefüllt mit LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-8 (5 µm) <u>Vorsäule:</u> LiChroCART <sup>®</sup> 4-4, gefüllt mit LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-8 (5 µm)
Mobile Phase:	50% Acetonitril 50% Methanol
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	25 °C
Detektionswellenlänge:	210 nm
Retentionszeit:	4,0 min



## 8.4 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Cholesterol

Zur Bestimmung der Sättigungskonzentration von Cholesterol in Propylenglykol bei verschiedenen Temperaturen, wurde eine 2,5%ige Cholesterol-Suspension für ca. 12 h mit einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurden jeweils 10 g in ein Schraubdeckelgefäß überführt und mehrere Tage bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Sofort nach Entnahme aus dem Trockenschrank wurde etwas Propylenglykol abgepresst und filtriert (CHROMAFIL<sup>®</sup> RC-45/15 MS). Der Cholesterolgehalt wurde mit Hilfe der HPLC-Analytik bestimmt. Für jede Temperatur wurde eine Einfachbestimmung durchgeführt.

## 8.5 Zusammensetzung Sörensen-Phosphatpuffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00 g
NaCl	4,19 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,17 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- Acree, W. und Bertrand, G. (1977): *A cholesterol-isopropanol gel*. In: *Nature*. 269, S. 450-450.
- Aljhni, R.; Ibrahim, F. et al. (2012): *Reactive oxygen species and nitric oxide effect on the steroid hormone binding with serum albumin*. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 62, S. 129–134.
- Baert, B.; Annavarapu, S. et al. (2009): *Analytical, biopharmaceutical and regulatory evaluation of topical testosterone preparations*. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, S. 275–281.
- Baert, B.; Boonen, J. et al. (2010): *A new discriminative criterion for the development of Franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals*. In: *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 13, S. 218–230.
- Barry, B. W. (1987): *Mode of action of penetration enhancers in human skin*. In: *Journal of Controlled Release*. 6, S. 85–97.
- Bendas, B.; Schmalfuß, U. et al. (1995): *Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanisms of drug transport from hydrogels*. In: *International Journal of Pharmaceutics*. 116, S. 19–30.
- Bhujle, V. V.; Nair, P. D. et al. (1983): *On the Nature of Physiologically Unique 37 °C Phase Transition of Cholesterol*. In: *Spectroscopy Letters*. 16, S. 855–864.
- Blaschek, W.; Ebel, S. et al. (2012): *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*. Hg. v. Blaschek, W.; Ebel, S. et al. Online verfügbar unter <http://www.drugbase.de/de/datenbanken/hagers-enzyklopaedie.html>
- Bohlin Instruments (Hg.) (1999): *Benutzerhandbuch für Bohlin Rheometer*. 1. Aufl.
- Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S. et al. (1992): *Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle x-ray diffraction study*. In: *International Journal of Pharmaceutics*. 84, S. 205–16.
- Bouwstra, J. A.; Pilgram, G. S. K. et al. (2002a): *Does the single gel phase exist in stratum corneum?* In: *Journal of Investigative Dermatology*. 118, S. 897–901.
- Bouwstra, J.; Gooris, G. et al. (2002b): *The Lipid Organization of the Skin Barrier: Liquid and Crystalline Domains Coexist in Lamellar Phases*. In: *Journal of Biological Physics*. 28, S. 211–223.
- Bouwstra, J.; Pilgram, G. et al. (2001): *New Aspects of the Skin Barrier Organization*. In: *Skin Pharmacology and Physiology*. 14, S. 52–62.
- Bouwstra, J.; Vries, M. et al. (1991): *Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier*. In: *Journal of Controlled Release*, S. 209–220.

- Brinkmann, I. und Müller-Goymann, C. C. (2005): *An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum*. In: *Pharmazie*. 60, S. 215–220.
- Buist, H. E.; van Burgsteden, J. A. et al. (2010): *New in vitro dermal absorption database and the prediction of dermal absorption under finite conditions for risk assessment purposes*. In: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 57, S. 200–209.
- Bunjes, H. und Rades, T. (2005): *Thermotropic liquid crystalline drugs*. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 57, S. 807–816.
- Chung, D. S.; Benedek, G. B. et al. (1993): *Elastic free energy of anisotropic helical ribbons as metastable intermediates in the crystallization of cholesterol*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90, S. 11341–11345.
- Corcuff, P.; Fiat, F. et al. (2001): *Ultrastructure of the Human Stratum corneum*. In: *Skin Pharmacology and Physiology*. 14, S. 4–9.
- Costa-Balogh, F. O.; Sparr, E. et al. (2008): *Drug release and skin permeation from lipid liquid crystalline phases*. In: *Progress in Colloid and Polymer Science*. 135, S. 119–129.
- Craven, B. M. (1976): *Crystal structure of cholesterol monohydrate*. In: *Nature*. 260, S. 728–729.
- DAC/NRF: *Tabellen für die Rezeptur*. 6. Aufl.: Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH.
- Daniels, R. (2004): Strategien zur Verbesserung der Hautpenetration. In: Skin Care Forum. Hg. v. BASF Personal Care and Nutrition GmbH, Online verfügbar unter <http://www.skin-care-forum.basf.com/artikel/home/strategien-zur-verbesserung-der-hautpenetration/2004/08/12?id=5b9a9164-6148-4d66-bd84-6df76bd6d111&mode=Detail>
- Dastidar, P. (2008): *Supramolecular gelling agents: can they be designed?* In: *Chemical Society Reviews*. 37, S. 2699–2715.
- El Maghraby, G. M. M.; Williams, A. C. et al. (2006): *Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin?* In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 58, S. 415–429.
- Elias, P. M. (1983): *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 80, S. 44–9.
- Elias, P. M.; Cullander, C. et al. (1998): *The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell*. In: *J Investig Dermatol Symp Proc (The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings)*. 3, S. 87–100.

- El-Kattan, A.; Asbill, C. S. et al. (2000): *Transdermal testing: practical aspects and methods*. In: *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 3, S. 426–430.
- Fachinformations Service (2012a): *Fachinformation Doktor® 2% Crème*, Online verfügbar unter [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)
- Fachinformations Service (2012b): *Fachinformation Dermatop®*, Online verfügbar unter [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)
- Fachinformations Service (2012c): *Fachinformation Linoladiol® H N*, Online verfügbar unter [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)
- Fachinformations Service (2012d): *Fachinformation Testim® 50 mg Gel*, Online verfügbar unter [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)
- Faller, A. und Schünke, M. (2004): *Der Körper des Menschen. Einführung in Bau und Funktion*. 14. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Faller, B.; Ottaviani, G. et al. (2011): Evolution of the physicochemical properties of marketed drugs: can history foretell the future? In: *Drug Discovery Today*. 16, S. 976–984.
- FDA (2012): *Inactive-Ingredients-Database*, Online verfügbar unter <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/>
- Fiedler (2010): *Encyclopedia of Excipients*, Editio Cantor Verlag, Online verfügbar unter <http://www.ecv.de/ecv/catalog/fiedler.php>
- Fokuhl, J. und Müller-Goymann, C. C. (2007): *Untersuchung der Unversehrtheit von humanem exzidiertem Stratum corneum mittels TEER-Messungen*. Posterbeitrag DPhG-Jahrestagung. Erlangen.
- Forslind, B. (1994): *A domain mosaic model of the skin barrier*. In: *Acta dermatovenereologica*. 74, S. 1–6.
- Forslind, B.; Engstroem, S. et al. (1997): *A novel approach to the understanding of human skin barrier function*. In: *Journal of Dermatological Science*. 14, S. 115–125.
- Garti, N.; Karpuj, L. et al. (1981): *Correlation between crystal habit and the composition of solvated and nonsolvated cholesterol crystals*. In: *Journal of Lipid Research*. 22, S. 785–791.
- George, M. und Weiss, R. G. (2006): *Molecular organogels. Soft matter comprised of low-molecular-mass organic gelators and organic liquids*. In: *Accounts of Chemical Research*. 39, S. 489–497.
- Godin, B. und Touitou, E. (2007): *Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models*. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59, S. 1152–1161.
- Golden, G. M.; Guzek, D. B. et al. (1986): *Lipid Thermotropic Transitions in Human Stratum Corneum*. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 86, S. 255–259.

- Gröning, R. und Müller, R. S. (2005): Transdermalpflaster. In: Deutsche Apotheker Zeitung. 145, S. 4295–4301.
- Guo, C.; Wang, J. et al. (2010): *Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery*. In: *Drug Discovery Today*. 15, S. 1032–1040.
- Haberland, M. E. und Reynolds, J. A. (1973): *Self-association of cholesterol in aqueous solution*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70, S. 2313–2316.
- Harrison, S. M.; Barry, B. W. et al. (1984): *Effects of freezing on human skin permeability*. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 36, S. 261–262.
- Hathout, R. M.; Woodman, T. J. et al. (2010): *Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone*. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 40, S. 188–196.
- Hill, J. R. und Wertz, P. W. (2003): *Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum*. In: *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*. 1616, S. 121–126.
- Hiltrop, K. (1999a): *Grundlagen und Historie*. In: Stegemeyer, H. (Hg.): *Lyotrope Flüssigkristalle. Grundlagen, Entwicklung, Anwendung*. Darmstadt: Steinkopff Verlag GmbH, S. 1–24.
- Hiltrop, K. (1999b): *Lyotrope Flüssigkristallphasen mizellarer Tensidlösungen*. In: Stegemeyer, H. (Hg.): *Lyotrope Flüssigkristalle. Grundlagen, Entwicklung, Anwendung*. Darmstadt: Steinkopff Verlag GmbH, S. 25–57.
- Horstmann, M. und Wiedersberg, S. (2010): Transdermale therapeutische Systeme. In: Mäder, K. und Weidenauer, U. (Hg.): *Innovative Arzneiformen. Ein Lehrbuch für Studium und Praxis*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, S. 301–321.
- Hsu, L. Y. und Nordman, C. E. (1983): *Phase transition and crystal structure of the 37 °C form of cholesterol*. In: *Science*. 220, S. 604–6.
- IKA-Werke (2007): *Bedienungsanleitung Ultra-Turrax® T25 digital*.
- Iwai, I.; Han, H. M. et al. (2012): *The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety*. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 132, S. 2215–2225.
- Jahnke, S. (2008): *Theorie der Hochdruckhomogenisation*. Hg. v. GEA Niro Soavi Deutschland.
- Kaloustian, J.; Pauli, A. M. et al. (2003): *Thermal Analysis of Anhydrous and Hydrated Cholesterol*. In: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 71, S. 341–351.
- Kielhorn, J.; Melching-Kollmuß, S. et al. (2005): *Dermal Absorption*. International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria. Hg. v. WHO.

- Kligman, A. und Christophers, E. (1963): *Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum*. In: *Archives of Dermatology*. 88, S. 702–705.
- Knorr, F.; Lademann, J. et al. (2009): *Follicular transport route - Research progress and future perspectives*. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 71, S. 173–180.
- Kommentar zur Ph. Eur. (2012): *Monographien. Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 7.0. amtliche deutsche Übersetzung*.
- Konikoff, F. M.; Chung, D. S. et al. (1992): *Filamentous, helical, and tubular microstructures during cholesterol crystallization from bile: evidence that cholesterol does not nucleate classic monohydrate plates*. In: *Journal of Clinical Investigation*. 90, S. 1155–1160.
- Kumar, R. und Katare, O. P. (2005): *Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review*. In: *AAPS PharmSciTech*. 6, S. E298-310.
- Landmann, L. (1991): *The permeability barrier of the skin*. In: *Pharmazie in unserer Zeit*. 20, S. 155–63.
- Lautenschläger, H. (2005): *Konservierungsstoffe*. In: *Kosmetische Praxis*, S. 6–8.
- Lazo, N. D.; Meine, J. G. et al. (1995): *Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as  $\beta$ -sheets: a solid-state nuclear magnetic resonance study*. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 105, S. 296–300.
- Lessmann, H.; Schnuch, A. et al. (2005): *Skin-sensitizing and irritant properties of propylene glycol*. In: *Contact Dermatitis*. 53, S. 247–259.
- Liebert, M. A. (1986): *Final Report on the Safety Assessment of Cholesterol*. In: *Journal of the American College of Toxicology*. 5, S. 491–515.
- Liu, X. Y. (2005): *Gelation with small molecules: from formation mechanism to nanostructure architecture*. In: *Topics in Current Chemistry*. 256, S. 1–37.
- Loomis, C. R.; Shipley, G. G. et al. (1979): *The phase behavior of hydrated cholesterol*. In: *Journal of Lipid Research*. 20, S. 525–535.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006): *Haut und Hautanhangsgebilde*. In: Lüllmann-Rauch, R. (Hg.): *Taschenlehrbuch Histologie*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 519–537.
- Lusiana und Müller-Goymann, C. C. (2012): *Physicochemical characterization of topical formulations containing NSAIDs (with emphasis on ibuprofen): thermal gravimetric analysis and differential scanning calorimetry*. Posterbeitrag 16. GD-Jahrestagung. Berlin.
- McIntosh, T. J. (2003): *Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: Diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol*. In: *Biophysical Journal*. 85, S. 1675–1681.

- Mezger, T. (2006): *Das Rheologie-Handbuch. Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*. 2. Aufl. Hannover: Vincentz Network GmbH & Co. KG.
- Michaels, A. S.; Chandrasekaran, S. K. et al. (1975): *Drug permeation through human skin. Theory and in vitro experimental measurement*. In: *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 21, S. 985–96.
- Müller-Goymann, C. C. (1998a): *Arzneimittel mit Flüssigkristallen*. In: Bauer, K. H., Hildebrand, G. E. und Müller, R. H. (Hg.): *Pharmazeutische Technologie: moderne Arzneiformen*. 2. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, S. 121–132.
- Müller-Goymann, C. C. (1998b): *Flüssigkristalline Systeme in der Pharmazeutischen Technologie*. In: *PZ PRISMA*, S. 129–140.
- Müller-Goymann, C. C. (1999): *Anwendung lyotroper Flüssigkristalle in Pharmazie und Medizin*. In: Stegemeyer, H. (Hg.): *Lyotrope Flüssigkristalle. Grundlagen, Entwicklung, Anwendung*. Darmstadt: Steinkopff Verlag GmbH, S. 141–167.
- Müller-Goymann, C. C. (2004): *Physicochemical characterisation of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration*. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58, S. 343–356.
- Müller-Goymann, C. C. (2010): Persönliche Kommunikation. Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Braunschweig.
- Netzlaff, F.; Kaca, M. et al. (2007): *Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations*. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 66, S. 127–134.
- Neubert, R. H. H. (2011): *Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery*. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 77, S. 1–2.
- Neubert, R. H. H. und Wepf, R. (2007): *Struktur und Morphologie einer Barriere*. In: *Pharmazeutische Zeitung*. 152, S. 1506–1513.
- Neubert, R.; Schmalfluss, U. et al. (1996): *Percutaneous penetration and modulation of active substances*. In: *Pharmazeutische Zeitung*. 141, S. 1483–1493.
- Norlén, L. (2001a): *Skin barrier formation: the membrane folding model*. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 117, S. 823–829.
- Norlén, L. (2001b): *Skin barrier structure and function: the single gel phase model*. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 117, S. 830–836.
- Norlén, L. (2003): *Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function*. In: *Skin Pharmacology and Physiology*. 16, S. 203–11.

- Norlén, L.; Gil, I. P. et al. (2007): *Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir-Blodgett films*. In: *Journal of Structural Biology*. 158, S. 386–400.
- OECD (2004a): *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies No. 28*.
- OECD (2004b): *Guideline for the Testing of Chemicals No. 428. Skin Absorption: in vitro method*.
- OECD (2010): *Guidance Notes on Dermal Absorption*.
- Pfeiffer, S.; Vielhaber, G. et al. (2000): *High-pressure freezing provides new information on human epidermis: simultaneous protein antigen and lamellar lipid structure preservation. Study on human epidermis by cryoimmobilization*. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 114, S. 1030–1038.
- Ph. Eur. (2011): *Monographien. Europäisches Arzneibuch 7.0. amtliche deutsche Ausgabe*.
- PhysProp Database (2012). Hg. v. SRC Inc., Online verfügbar unter <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>
- Pitman, I. H. und Rostas, S. J. (1982): *A comparison of frozen and reconstituted cattle and human skin as barriers to drug penetration*. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 71, S. 427–430.
- Prausnitz, M. R. und Langer, R. (2008): *Transdermal drug delivery*. In: *Nature Biotechnology*. 26, S. 1261–1268.
- Ritika; Harikumar, S. L. et al. (2012): *Microemulsion system in role of expedient vehicle for dermal application*. In: *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2, S. 23–28.
- Rote Liste (2012): *Wirkstoffe*, Online verfügbar unter [www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de)
- Rybach, J. und Rybach, S. (2012): *Pharmazie und Physik. Ohne Grundlagen geht es nicht*. In: *Deutsche Apotheker Zeitung*.
- Sangeetha, N. M. und Maitra, U. (2005): *Supramolecular gels: functions and uses*. In: *Chem Soc Rev*. 34, S. 821–836.
- Santos, P.; Watkinson, A. C. et al. (2012): *Influence of penetration enhancer on drug permeation from volatile formulations*. In: *International Journal of Pharmaceutics*. 439, S. 260–268.
- Schaefer, H. und Redelmeier, T. E. (Hg.) (1996): *Skin barrier. Principles of percutaneous absorption*. Basel: Karger AG.
- Schreiber, S.; Mahmoud, A. et al. (2005): *Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies*. In: *Toxicology in Vitro*. 19, S. 813–822.



- Schroeter, A.; Kessner, D. et al. (2009a): *Basic nanostructure of stratum corneum lipid matrices based on ceramides [EOS] and [AP]: a neutron diffraction study*. In: *Biophysical Journal*. 97, S. 1104–1114.
- Schroeter, A.; Kiselev, M. A. et al. (2009b): *Evidence of free fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes based on ceramide [AP] by deuterium labelling*. In: *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*. 1788, S. 2194–2203.
- Schwabe, L. (2009a): *Röntgendiffraktometrie in: Moderne Pharmazeutische Technologie*. Internet-Lehrbuch. Hg. v. Keck, C. M. und Müller, R. H., Online verfügbar unter <http://www.pharmazie-lehrbuch.de/Moderne%20Pharmazeutische%20Technologie.pdf>
- Schwabe, L. (2009b): *Thermoanalyse in: Moderne Pharmazeutische Technologie*. Internet-Lehrbuch. Hg. v. Keck, C. M. und Müller, R. H., Online verfügbar unter <http://www.pharmazie-lehrbuch.de/Moderne%20Pharmazeutische%20Technologie.pdf>
- Seddon, J. M. und Templer, R. H. (1995): *Polymorphism of Lipid-Water Systems*. In: Lipowsky, R. und Sackmann, E. (Hg.): *Handbook of Biological Physics*. 1. Aufl.: Elsevier Science B.V.
- Silva, C. L.; Nunes, S. C. C. et al. (2006a): *Study of human stratum corneum and extracted lipids by thermomicroscopy and DSC*. In: *Chemistry and Physics of Lipids*. 140, S. 36–47.
- Silva, C. L.; Nunes, S. C. C. et al. (2006b): *Thermal behaviour of human stratum corneum. A differential scanning calorimetry study at high scanning rates*. In: *Skin Pharmacology and Physiology*. 19, S. 132–139.
- Spier, H. L. und van Senden, K. G. (1965): *Phase transition of cholesterol*. In: *Steroids*, S. 871–873.
- Stevenson, C. L.; Bennett, D. B. et al. (2005): *Pharmaceutical liquid crystals: The relevance of partially ordered systems*. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 94, S. 1861–1880.
- Subedi, R. K.; Oh, S. Y. et al. (2010): *Recent advances in transdermal drug delivery*. In: *Archives of Pharmacal Research*. 33, S. 339–351.
- Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W. et al. (1989): *Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum*. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 92, S. 251–7.
- Tanner, T. und Marks, R. (2008): *Delivering drugs by the transdermal route: review and comment*. In: *Skin Research and Technology*. 14, S. 249–60.
- Technical Data Sheet Pemulen® (2002): *Introducing Pemulen® Polymeric Emulsifiers*. Hg. v. Lubrizol Advanced Materials.
- Terech, P. und Weiss, R. G. (1997): *Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels*. In: *Chemical Reviews*. 97, S. 3133–3160.

- Trommer, H. und Neubert, R. H. H. (2006): *Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review.* In: *Skin Pharmacology and Physiology*. 19, S. 106–121.
- USP (Hg.) (2012): *Monographs. United States Pharmacopoeia 35.*
- van der Maaden, K.; Jiskoot, W. et al. (2012): *Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery.* In: *Journal of Controlled Release*. 161, S. 645–655.
- Vintiloiu, A. und Leroux, J. C. (2007): *Organogels and their use in drug delivery-a review.* In: *Journal of Controlled Release*. 125, S. 179–192.
- Voigt, R. und Fahr, A. (2000): *Pharmazeutische Technologie. Für Studium und Beruf.* 9. Aufl. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- Wada, Y.; Igimi, H. et al. (1992): *Another crystalline form of cholesterol monohydrate and its connection with gallstones.* In: *Thermochimica Acta*. 210, S. 233–241.
- Wagener, M. (2012): Persönliche Kommunikation. Carl Zeiss NTS GmbH.
- Weiss, R. G. und Terech, P. (2006): *Molecular gels. Materials with self-assembled fibrillar networks.* Dordrecht: Springer-Verlag GmbH.
- Wilisch, I. L. und Müller-Goymann, C. C. (1993): *Correlation of colloidal microstructure, drug release and permeation through excised human skin.* In: *International Journal of Pharmaceutics*. 96, S. 79–84.
- Yamada, K.; Yamashita, J. et al. (2011): *Preparation and evaluation of liquid-crystal formulations with skin-permeation-enhancing abilities for entrapped drugs.* In: *Journal of Oleo Science*. 60, S. 31–40.
- Ziegenmeyer, J. (1992): *Biopharmazeutische Aspekte bei der Anwendung von Dermatika.* In: Niedner, R. und Ziegenmeyer, J. (Hg.): *Dermatika. Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, S. 243–307.

## **DANKSAGUNG**

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hartwig Steckel für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Überlassung des interessanten Themas. Er gab mir die Möglichkeit, mein Promotionsthema frei zu gestalten und unterstützte mich durch stetige Gesprächsbereitschaft sowie durch rasche und unkomplizierte Beschaffung von Materialien und Geräten. Zudem ermöglichte er mir, über das Promotionsthema hinaus, die Welt der halbfesten Arzneiformen zu entdecken und somit meinen wissenschaftlichen Werdegang zu prägen. Dafür danke ich ihm herzlich.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Blaschek für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Bei Frau Prof. Dr. Christel Müller-Goymann vom Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Braunschweig und ihren Mitarbeiterinnen bedanke ich mich für die Anfertigung der TEM-Bilder und Durchführung von Röntgenkleinwinkelmessungen sowie für die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse. Herrn Dr. Martin Wagener der Firma Carl Zeiss NTS GmbH danke ich für die Aufnahme der Cryo-REM-Bilder.

Für die Bereitstellung von humanen Hautproben danke ich Herrn Dr. Dr. Christian Preißner der Helios Klinik Kiel (ehemals Ostseeklinik Kiel) sowie Herrn Dr. Andreas Häring der Praxis esthesis in Kiel.

Meiner langjährigen Büronachbarin Maren danke ich für die investierte Zeit und Mühe zur Korrekturlesung dieser Arbeit und die stetige Hilfsbereitschaft zur Klärung vielfältiger Fragestellungen. Ein riesengroßes Dankeschön geht an Ann-Kathrin, die mir besonders während meiner letzten Zeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Besonders für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit und die vielen konstruktiven Gespräche danke ich ihr. An dieser Stelle möchte ich auch Kirsten vielmals für das schnelle Korrekturlesen sowie für die schöne Zeit der gemeinsamen Praktikumsbetreuung danken. Ein großes Dankeschön geht an Thea, die mir mit großem Engagement als „Hiwine“ und auch als Wahlpflichtfachstudentin zu wesentlichen Ergebnissen verholfen hat. Zudem danke ich Katha für ihr stets offenes Ohr, vor allem an Tagen, die weniger von Erfolg geprägt waren.

Die wohl größte praktische und auch seelische Unterstützung habe ich von den „TA´s“ erhalten: Ich danke Hanna für ihre Hilfe bei allen HPLC-Arbeiten und der mit großer Freude über tausendfach durchgeführten Aufarbeitung von Cremeproben. Ebenso danke ich Maren für ihre Unterstützung bei der Bonnie-Handhabung und den vielen, immer mit viel Spaß verbundenen, Franzzellen-Tests. Ein großes Dankeschön geht an Regina für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei ganz vielen Dingen, vor allem für die Konservierungsbelastungstests und die tatkräftige Unterstützung im Salbenlabor. Anna danke ich ebenfalls sehr für alle Arbeiten im Salbenlabor, vor allem für die zahlreichen großen und kleinen Becomix-Ansätze, die in Zusammenarbeit so viel Freude bereitet haben. Euch allen, und auch Simone, danke ich für die überlebensnotwendige Nervennahrung und die netten Teerunden!

Ein weiteres riesengroßes Dankeschön geht an Rüdi: sowohl für seine vielfältige praktische Hilfe (wie DSC, Röntgendiffraktometrie, Mikroskopie, Fotografie, Grafikbearbeitung usw.) als auch für die zahlreichen, teils philosophischen Gespräche, die zum Totlachen witzigen Momente und für die stetige Zuversicht in meine Fähigkeiten danke ich ihm herzlich.

Zudem danke ich Dirk für zahlreiche Reparaturen und die Anfertigung von Sonderwünschen sowie die Zuordnung zur Kategorie der Schrauber.

Für die stets schnelle Hilfe bei allen „elektrischen“ Herausforderungen und die netten Angeltipps danke ich Kalle vielmals.

Weiterhin danke ich Franz für die freundliche gemeinsame Praktikumsbetreuung und die Hilfe bei allen mikrobiologischen Fragestellungen.

Detlef, Arne und Volkmar danke ich für ihre schnelle Hilfe bei allen PC-Problemen.

Zudem danke ich allen Kollegen des „alten“ und „neuen“ Arbeitskreises für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ebenso zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Bei allen Praktikumsassistenten bedanke ich mich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Betreuung von Studenten.

Bei Holger möchte ich mich für die Grundsteinlegung dieser Arbeit bedanken: nicht nur, weil er das Cholesterolsystem entdeckt hat, sondern auch weil er als mein Assistent im

3. und 7. Semester mein Interesse für die Pharmazeutische Technologie enorm verstärkt hat.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Freundin Betti für die vielen schönen und erholsamen Stunden, die mir immer eine willkommene Abwechslung vom Forschungsalltag waren.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich während meiner gesamten Ausbildung in allen Lebenslagen begleitet und mich stets mit Zuversicht unterstützt hat. Ein ganz großes Dankeschön möchte ich Frank aussprechen, der mich mit sehr viel Geduld auch in anstrengenden Zeiten ertragen und mich immer mit viel Zuspruch und Zuversicht gestärkt hat.

# **LEBENS LAUF**

## **PERSÖNLICHE DATEN**

Name	Janine Berg
Geburtsdatum	29.01.1984
Geburtsort	Hagenow
Staatsangehörigkeit	deutsch

## **SCHULBILDUNG**

1990 – 2000	Verbundene Haupt- und Realschule mit Grundschule Lübstorf/Alt Meteln Qualifizierter Realschulabschluss
2000 – 2003	Fachgymnasium an der Beruflichen Schule Malchin Allgemeine Hochschulreife

## **STUDIUM**

10/2003 – 11/2007	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel
08/2005	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2007	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

## **PRAKTISCHE AUSBILDUNG**

01/2008 – 06/2008	Kastanien-Apotheke, Kiel
07/2008 – 12/2008	Anfertigung einer Diplom-Arbeit in der Abteilung der Pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie des Pharmazeutischen Instituts der CAU zu Kiel
02/2009	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Approbation zur Apothekerin
02/2009	Diplom-Pharmazeutin

## **PROMOTION**

Seit 04/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. H. Steckel
--------------	--

## Erklärung

Hiermit bestätige ich gemäß § 8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät und der Technischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vom 31. August 2012, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und wurde bisher bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

---

Janine Berg