

Entwicklung und Charakterisierung nonivamidhaltiger Rizinusöl-in-Silikonöl-Emulsionen zur dermalen Anwendung

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Michael Rottke
aus Berlin

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

30.07.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rolf Daniels

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin A. Wahl

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Eberhard Karls Universität Tübingen. Ich danke ihm für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas und die wissenschaftliche Freiheit, die mir bei der Bearbeitung dieses Themas gewährt wurde. Darüber hinaus danke ich ihm für die fachliche Weiterbildung, die er mir durch die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen sowie an der „Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie“ ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens, für seine konstruktiven Anmerkungen und seine stets offene Tür.

Ich danke der Experimentellen Medizin des Universitätsklinikums Tübingen für die freundliche und unkomplizierte Bereitstellung der Schweineohren, ohne die essentielle Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Mein Dank gilt außerdem allen Kollegen und ehemaligen Kollegen für die von Freundschaft und Hilfsbereitschaft geprägte Zusammenarbeit, die nicht nur zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, sondern meine Promotionszeit zu einer besonders schönen hat werden lassen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Freundin für Ihre stets bedingungslose Unterstützung danken. Meiner Freundin danke ich außerdem dafür, dass sie mit mir das „Abenteuer“ Tübingen ohne zu zögern eingegangen ist.

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Tagungsbeiträge veröffentlicht:

Michael Rottke & Rolf Daniels – „Novel Topical Anhydrous Emulsions for Modified Release of Nonivamide“ – 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2012, Istanbul

Michael Rottke & Rolf Daniels – „Novel Topical Anhydrous Emulsions for Modified Permeation of Nonivamide“ – Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting 2012, Würzburg

*„Wer immer tut, was er schon kann,
bleibt immer das, was er schon ist.“*

(Henry Ford)

Besonderer Hinweis:

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Abkürzungsverzeichnis

CPS	Cyclopentasiloxan
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
EMA	European Medicines Agency
et al.	et alii
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balance
HNC	Hydrophile Nonivamid-Creme
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference of Harmonisation
N	Stichprobenumfang
NRF	Neues Rezeptur-Formularium
NVA	Nonivamid
O/O	Öl-in-Öl-Emulsion
O/O-Emulsion	Öl-in-Öl-Emulsion
OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development
PB	Phosphatpuffer pH 7,4
PBE	Ethanolischer Phosphatpuffer 10 %
PBE50	Ethanolischer Phosphatpuffer 50 %
PBP	Macrogol 600-haltiger Phosphatpuffer
PC	Nuclepore track-etched Polycarbonat-Membranfilter 0,03 µm
PDMS	Polydimethylsiloxan
Ph. Eur.	Pharmacopea Europea
PTFE 0,2 µm	Polytetrafluorethylen-Membranfilter 0,2 µm
PTFE 5,0 µm	Polytetrafluorethylen-Membranfilter 5,0 µm
PVV	Phasenvolumenverhältnis
RiO	Rizinusöl
SiO	Silikonöl
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
Φ	Phasenvolumenverhältnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Haut.....	3
2.1.1	Funktion der Haut	3
2.1.2	Aufbau der Haut.....	3
2.1.2.1	Hypodermis.....	4
2.1.2.2	Dermis.....	4
2.1.2.3	Epidermis	4
2.1.3	Arzneistofftransport durch die Haut	8
2.2	In vitro Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen	10
2.2.1	Aufbau und Funktion der Franz-Diffusionszellen	10
2.2.2	Wirkstofffreisetzung aus Dermatika	11
2.2.3	Diffusion durch die Membran bzw. Haut	12
2.2.4	In vitro Freisetzungsuntersuchungen	14
2.2.5	In vitro Permeationsuntersuchungen.....	15
2.2.6	Humanhaut und Humanhautmodelle	16
2.3	Silikone	19
2.3.1	Silikone in Arzneimitteln und Kosmetika.....	19
2.3.2	Struktur und Eigenschaften von Silikonen	20
2.3.3	Verwendete Silikonöle.....	21
2.3.4	Silikontenside.....	22
2.3.4.1	Dimethicon Copolyole	24
2.4	Rizinusöl	25
2.5	Capsaicinoide und der Modellarzneistoff Nonivamid	26
2.6	Pruritus.....	27
2.6.1	Physiologie des Pruritus.....	27

2.6.2	Pathologischer, chronischer Pruritus	29
2.6.3	Therapie des pathologischen, chronischen Pruritus.....	29
2.6.3.1	Capsaicin in der Therapie des pathologischen, chronisches Pruritus	29
3	Materialien und Methoden.....	33
3.1	Materialien	33
3.1.1	Flüssige Lipide.....	33
3.1.2	Silikone	34
3.1.3	Sonstige Chemikalien	35
3.1.4	Membranfilter	36
3.2	Geräte und Software	36
3.2.1	HPLC-UV-Apparatur.....	36
3.2.2	In vitro Freisetzungs- und Permeationsapparatur	37
3.2.3	Licht-/Fluoreszenz-Mikroskop	37
3.2.4	Sonstige Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	38
3.3	Herstellung der Formulierungen	40
3.3.1	Ethanolische Nonivamid-Stammlösung 1,0 % und 10,0 %	40
3.3.2	Basiscreme DAC.....	40
3.3.3	Hydrophile Nonivamid-Creme 0,1 % und 1,0 %	40
3.3.4	Öl-in-Öl-Emulsionen	41
3.3.4.1	Berechnung der Rezepturen.....	41
3.3.4.2	Herstellung von O/O-Emulsionen mittels Ultraschall-Sonotrode	42
3.3.4.3	Herstellung von O/O-Emulsionen mittels Spritze-zu-Spritze-Verfahren	42
3.4	Methoden	43
3.4.1	Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid	43
3.4.1.1	Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in Akzeptormedien.....	43
3.4.1.2	Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in nichtwässrigen Medien.....	43
3.4.2	Untersuchung der Mischbarkeit von Silikonölen mit flüssigen Lipiden	44

3.4.3	Untersuchung der Emulgierfähigkeit verschiedener Silikontenside.....	44
3.4.3.1	Qualitative Untersuchung der Phasenlage und Lagerstabilität von O/O- Emulsionen.....	44
3.4.3.2	Bestimmung von Tröpfchengrößen in O/O-Emulsionen.....	45
3.4.3.3	Quantitative Untersuchung der Lagerstabilität von O/O-Emulsionen.....	46
3.4.4	Bestimmung der Viskosität verschiedener Akzeptormedien.....	46
3.4.4.1	Bestimmung der kinematischen Viskosität verschiedener Akzeptormedien.....	46
3.4.4.2	Bestimmung der Dichte verschiedener Akzeptormedien.....	47
3.4.5	In vitro Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen mit Hilfe von Franz- Diffusionszellen.....	47
3.4.5.1	In vitro Freisetzungsuntersuchungen.....	47
3.4.5.2	In vitro Permeationsuntersuchungen.....	48
3.4.5.3	Akzeptormedien.....	49
3.4.5.4	Hautpräparation.....	49
3.4.6	Prüfung auf Wasserfestigkeit.....	50
4	Ergebnisse und Diskussion.....	51
4.1	Mischbarkeit von Silikonölen mit flüssigen Lipiden.....	51
4.2	Untersuchung der Emulgierfähigkeit verschiedener Silikontenside.....	53
4.2.1	Qualitative Untersuchung der Phasenlage und Lagerstabilität von O/O- Emulsionen.....	53
4.2.2	Quantitative Untersuchung der Lagerstabilität von O/O-Emulsionen.....	54
4.3	Entwicklung eines in vitro Freisetzungssystems.....	57
4.3.1	Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in Akzeptormedien.....	58
4.3.2	Viskosität verschiedener Akzeptormedien.....	59
4.3.3	Einfluss der Membran und des Akzeptormediums auf die gemessene Freisetzungsgeschwindigkeit aus HNC 1,0 % und O/O 1,0 %.....	61
4.3.3.1	Polyester- und Celluloseacetatmembranen.....	62
4.3.3.2	PTFE-Membranen.....	62
4.3.3.3	Polycarbonatmembranen.....	65

4.3.3.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	69
4.4	Beeinflussung der NVA-Freisetzung aus O/O-Emulsionen	71
4.4.1	Einfluss der Emulgatorkonzentration auf die Tröpfchengrößenverteilung in O/O-Emulsionen mit unterschiedlich viskosen kohärenten Phasen.....	73
4.4.2	Einfluss des Nonivamidgehalts auf die Freisetzungsgeschwindigkeit	75
4.4.3	Einfluss des Phasenvolumenverhältnisses auf die Freisetzungsgeschwindigkeit.....	77
4.4.4	Einfluss des Emulgatorgehaltes auf die Freisetzungsgeschwindigkeit.....	79
4.4.5	Einfluss der Viskosität der kohärenten Phase auf die Freisetzungsgeschwindigkeit	81
4.4.6	Zusammenfassung.....	84
4.5	In vitro Permeationsuntersuchungen.....	85
4.5.1	Entwicklung eines in vitro Permeationssystems.....	86
4.5.1.1	Einfluss verschiedener Hautpräparationen auf die NVA-Permeation aus HNC 1,0 %	86
4.5.1.2	Einfluss des Akzeptormediums auf die NVA-Permeation aus O/O 1,0 %	87
4.6	Beeinflussung der NVA-Permeation aus O/O-Emulsionen.....	89
4.6.1	Einfluss des NVA-Gehalts auf die Permeationsgeschwindigkeit.....	90
4.6.2	Einfluss des Phasenvolumenverhältnisses auf die Permeationsgeschwindigkeit	91
4.6.3	Einfluss der Viskosität der kohärenten Phase auf die Permeationsgeschwindigkeit.....	92
4.6.4	Zusammenfassung.....	94
4.7	Vergleich der NVA-Permeation aus O/O 1,0 %, Rizinusöl 1,0 % sowie HNC 0,1 % und 1,0 %	95
4.7.1	Vergleich der Permeationsraten zwischen O/O 1,0 % und HNC 0,1 % sowie 1,0 % bei infiniter Dosierung	95
4.7.2	Vergleich der NVA-Permeation aus O/O 1,0 % und HNC 0,1 % sowie 1,0 % bei finiter Dosierung	97
4.7.3	Vergleich der NVA-Permeation aus O/O 1,0 % und Rizinusöl 1,0 % bei finiter Dosierung	99

4.7.4	Zusammenfassung.....	100
4.8	Wasserfestigkeit von O/O 1,0 % und HNC 1,0 %	101
5	Abschlussdiskussion.....	103
5.1	Die Vorhersage der Emulsionsphasenlage bei Verwendung von Silikontensiden ...	103
5.2	Die Auswertung der Freisetzungsergebnisse und der Freisetzungsmechanismus der O/O-Emulsionen	104
5.3	Die Vergleichbarkeit von Permeationsergebnissen, die mit Haut unterschiedlicher Spenderindividuen ermittelt wurden	108
5.4	Das Dosierungsintervall der Hydrophilen Nonivamid- Creme 0,1 %	109
6	Zusammenfassung der Dissertation	111
7	Literaturverzeichnis	114
8	Anhang	121
8.1	Parameter der Tröpfchengrößenbestimmung mit Hilfe der Software AxioVision Rel. 4.6.3	121
8.2	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Octanol/Wasser für Nonivamid.....	121
8.3	Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von NVA in Rizinusöl und PDMS 20	121
8.4	Freisetzungsraten der Methodenentwicklung (4.3.3).....	123
8.5	Freisetzungsraten der Freisetzungsbbeeinflussung (4.4)	123
8.6	Permeationsraten der Methodenentwicklung (4.5.1)	124
8.7	Permeationsraten der Permeationsbeeinflussung (4.6)	124
8.8	Kalibrierung zur HPLC-UV-Methode	125
8.8.1	Phosphatpuffer pH 7,4 (PB) - Freisetzungsuntersuchungen.....	126
8.8.2	Ethanolischer Phosphatpuffer 10 % (PBE) - Freisetzungsuntersuchungen.....	127
8.8.3	Macrogol 600-haltiger Phosphatpuffer (PBP) - Freisetzungsuntersuchungen	129
8.8.4	Methanol – Bestimmung der Sättigungslöslichkeit	130
8.8.4.1	Macrogol 600-haltiger Phosphatpuffer (PBP) - Permeationsuntersuchungen.....	132
8.8.5	Ethanolischer Phosphatpuffer 50 % (PBE50) – Permeationsuntersuchungen.....	134
8.8.5.1	Permeationsuntersuchungen mit finiter Dosierung.....	134

8.8.5.2 Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosierung..... 136

1 Einleitung und Zielstellung

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und schützt ihn vor Austrocknung und dem Eindringen von Xenobiotika, Parasiten und Mikroorganismen. Diese Aufgabe wird vornehmlich von der äußersten Hautschicht, dem Stratum corneum erfüllt. Diese Hautschicht ist lediglich 20 µm dick, weist aber eine einzigartige Struktur auf, die sie zu einer höchst effektiven Barriere macht (Grams et al. 2005; Hwa et al. 2011). Die Haut verfügt außerdem über spezielle Nervenfasern, die, bei Aktivierung durch äußere Reize, Jucken (Pruritus) hervorrufen. Potentiell schädliche Substanzen und Parasiten werden dann durch das reflektorische Kratzen von der Haut entfernt. (Metz et al. 2010).

Pruritus kann jedoch auch pathologisch sein und als eigenständiges oder begleitendes Symptom einer Erkrankung auftreten. Je nach Pathogenese des Pruritus sind verschiedene körpereigene Mediatoren und Rezeptoren am Geschehen beteiligt, wodurch die Therapie sehr schwierig ist (Siepmann et al. 2011). Eine erfolgreiche Behandlung ist jedoch zwingend erforderlich, da chronisches Jucken die Lebensqualität stark beeinträchtigt und das Kratzen zu Hautläsionen verbunden mit massiven Entzündungen führt, die das Jucken verstärken. Capsaicinhaltige Dermatika sind eine vielversprechende Therapieoption, da diese durch den Wirkmechanismus des Capsaicins bei Pruritus verschiedener Genese erfolgreich angewendet werden können. Da die Capsaicinkonzentration individuell auf den Patienten abgestimmt werden muss, finden derzeit ausschließlich niedrigkonzentrierte Magistralrezepturen Anwendung (Ständer et al. 2011). Diese müssen mehrmals am Tag aufgetragen werden, was sich negativ auf die Patientencompliance und damit den Therapieerfolg auswirken kann (Anand et al. 2011). Aus diesem Grund wäre ein verlängertes Applikationsintervall wünschenswert. Die derzeit einzigen am Markt erhältlichen Dermatika mit retardierter Wirkstofffreisetzung sind wirkstoffhaltige Pflaster. Es gibt jedoch für die Pruritusbehandlung keine derartigen zugelassenen Capsaicinpflaster. Zudem sind diese industriell gefertigten Präparate hinsichtlich der Dosierung zu unflexibel und demzufolge für die sehr individuelle Pruritus therapie ungeeignet. Außerdem enthalten Pflaster keine hautpflegenden Komponenten, die die gereizte Haut der Prurituspatienten benötigt. Die verwendeten Klebstoffe können im Gegenteil sogar zu einer zusätzlichen Hautreizung führen.

Das Ziel dieser Dissertation war es daher, eine galenische Alternative zu den bisher verwendeten Magistralrezepturen zu entwickeln, die längere Applikationsintervalle sowie eine auf den Patienten abgestimmte Dosierung ermöglicht. Zu diesem Zweck sollten wasserfreie Öl-in-Öl-Emulsionen hergestellt und der Einfluss der Formulierungsparameter auf die Freiset-

zungs- und Permeationsgeschwindigkeit untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe des verwendeten Franz-Zell-Modells durchgeführt werden. Die Retardierung der Wirkstofffreigabe sollte durch die Verwendung optimal aufeinander abgestimmter Öle erreicht werden. Die verwendeten Öle sollten bezüglich ihrer Löslichkeit für den Arzneistoff so ausgewählt werden, dass der Arzneistoff (nahezu) vollständig in der dispersen Phase gelöst ist. Die disperse Phase bildet damit ein Arzneistoffreservoir, während die Abgabe des Arzneistoffs aus der kohärenten Phase erfolgt. Um der gereizten Haut von Prurituspatienten Rechnung zu tragen, sollte die kohärente Phase von einem Silikonöl gebildet werden, da Silikonöle außergewöhnliche Anwendungseigenschaften zeigen: Sie spreiten sehr gut auf der Haut, fühlen sich nicht fettig an, hinterlassen ein samtiges Hautgefühl und sind physiologisch indifferent, wasserabweisend sowie nicht okklusiv (Floyd 1999). Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass sie ein geringes Lösungsvermögen für die meisten organischen Substanzen zeigen (Grüning et al. 1999).

2 Allgemeiner Teil

2.1 Haut

2.1.1 Funktion der Haut

Die Haut ist mit einer Oberfläche von ca. 2 m² und einem Anteil von 10 % der Körpermasse das größte Organ des Menschen (Grams et al. 2005; Hwa et al. 2011). Sie ist ein hochspezialisiertes Organ, das vielfältige Aufgaben wahrnimmt sowie eine einzigartige Morphologie und chemische Zusammensetzung aufweist.

Ihre Hauptaufgabe ist es, die Abgabe von Wasser und Elektrolyten an die Umwelt zu kontrollieren (Hwa et al. 2011). Ähnlich dieser Funktion schützt die Haut den Organismus vor vielen weiteren Umwelteinflüssen: Sie bildet eine physikalische Barriere gegen Xenobiotika, Mikroorganismen, mechanische Einwirkungen und UV-Strahlung. Die Haut dient aber auch der Wahrnehmung und Kommunikation mit unserer Umwelt, der Temperaturregulierung und der Energiespeicherung (Grams et al. 2005; Norlén 2008; Proksch et al. 2008; Hwa et al. 2011).

2.1.2 Aufbau der Haut

Die Haut besteht aus 3 Schichten, die sich wiederum weiter unterteilen lassen. Von innen nach außen gliedert sich die Haut in Hypodermis, Dermis und Epidermis (Dancik et al. 2008; Hwa et al. 2011). Abbildung 2-1 gibt einen Überblick über den generellen Aufbau der Haut.

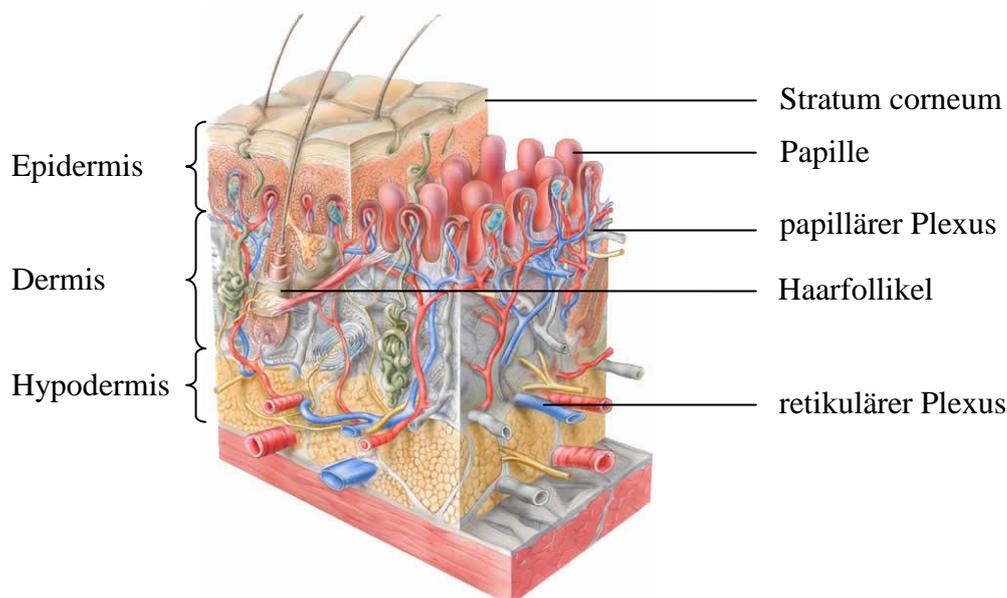


Abbildung 2-1: Aufbau der Haut (Leonhardt 1990).

2.1.2.1 Hypodermis

Die Hypodermis besteht vornehmlich aus Fettgewebe und kann je nach Ernährungszustand einer Person eine sehr unterschiedliche Dimension haben. Diese auch subkutanes Fettgewebe genannte Schicht dient als Energiespeicher, thermische Isolierung, Polsterung und ermöglicht das Verschieben der Haut gegen das darunterliegende Gewebe (Grams et al. 2005; Dancik et al. 2008; Hwa et al. 2011).

2.1.2.2 Dermis

Die Dermis ist eine 1 bis 2 mm dicke Hautschicht und verleiht der Haut Elastizität. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen und elastischen Fasern, die in ein Glucosaminoglykangel eingebettet sind. Darüber hinaus enthält sie Nervenendigungen, Haarfollikel sowie Talg- und Schweißdrüsen. Im Vergleich zur Epidermis ist sie ein zellarmes Gewebe (Dancik et al. 2008; Monteiro-Riviere et al. 2008; Hwa et al. 2011).

In Abbildung 2-1 ist sehr gut erkennbar, dass die Dermis ein stark vaskularisiertes Gewebe ist. Das Blutgefäßsystem dient der Versorgung der Epidermis, die selbst über keinerlei Blutgefäße verfügt und daher nur diffusiv ernährt werden kann. Im unteren Teil der Dermis bilden Arterien und Venen den sogenannten retikulären Plexus, von dem einige Gefäße zur Epidermis hochziehen. Sie bilden dort ein Netz feiner Blutgefäße, den papillären Plexus. Wie zu erkennen ist, bildet die Dermis Ausstülpungen, sogenannte Papillen, die in die Epidermis hineinragen und zu einer Oberflächenvergrößerung führen. Die Arteriolen und Venolen kleiden die Papillen aus und ermöglichen so einen optimalen Stoffaustausch (Dancik et al. 2008).

Parallel zum Blutgefäßsystem verläuft das Lymphgefäßsystem, das Teil der Immunabwehr ist und auch den Abtransport größerer Moleküle ermöglicht (Hwa et al. 2011).

2.1.2.3 Epidermis

Die Epidermis ist ein zellreiches Gewebe, dessen Zellen dicht- und festgepackt vorliegen um eine ausreichende mechanische Festigkeit zu gewährleisten. Um diese zu erreichen, sind die Zellen einer Schicht untereinander über Desmosomen verbunden. Die Verbindung zu Zellen angrenzender Schichten wird über Hemidesmosomen realisiert (Hwa et al. 2011).

Die Epidermis wurde früher fälschlicherweise als indifferente Membran betrachtet. Heute ist jedoch bekannt, dass sie ein sehr stoffwechselaktives Gewebe ist und eine ausgeprägte Protein- sowie Lipidsynthese zeigt. Die Zellen der Epidermis erneuern sich ungefähr alle 28 Tage. Die Zellen werden an der Basalmembran, welche Dermis und Epidermis verbindet, gebildet

und migrieren innerhalb von 14 Tagen zur Oberfläche. Während dieser Zeit durchlaufen sie eine radikale Differenzierung vom Keratinozyten zum kernlosen, verhornten und stark abgeflachten Corneozyten. Die Corneozyten verbleiben in dieser äußersten Schicht weitere 14 Tage bevor sie abgeschilfert werden (Harding 2004; Hwa et al. 2011).

Anhand der unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Keratinozyten, die sich in Schichten zusammenlagern, lässt sich die Epidermis weiter unterteilen, wie in Abbildung 2-2 dargestellt ist.

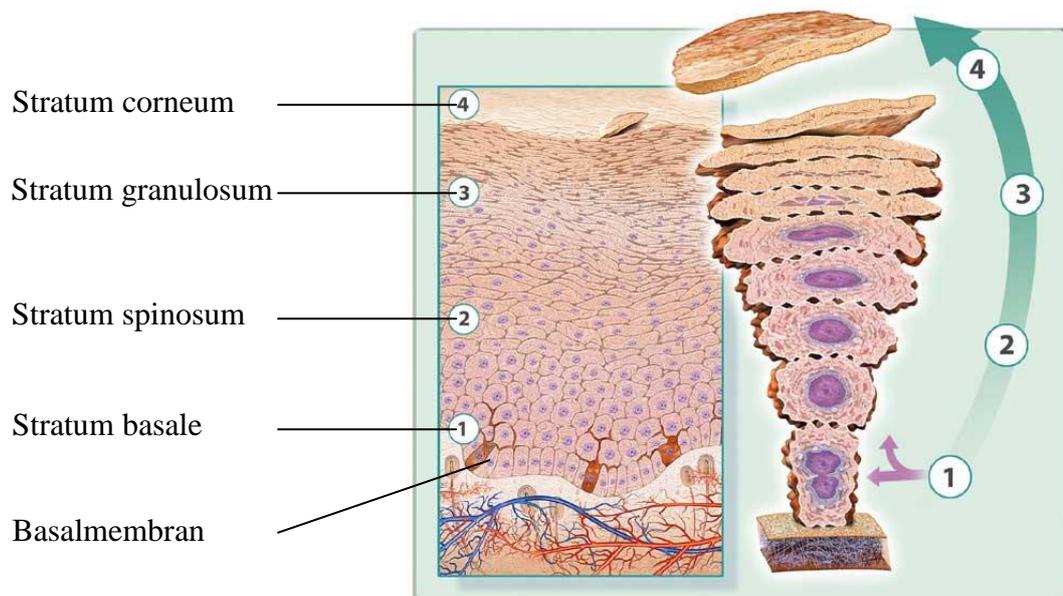


Abbildung 2-2: Lebenszyklus eines Keratinozyten und Struktur der Epidermis (aus Skin Care Form 2003).

Das Stratum basale ist für die Regeneration der Epidermis verantwortlich, indem an seiner Basalmembran stetig neue Keratinozyten gebildet werden (Roberts et al. 2008). Diese speziellen Zellen zeichnen sich durch ihren hohen Keratin- und Keratohyalinanteil aus, der ihnen eine hohe Festigkeit verleiht. Die Basalmembran verankert zudem die Epidermis in der Dermis (Hwa et al. 2011).

Die Keratinozyten, die das Stratum spinosum erreichen, sind bereits etwas abgeflacht und weisen im histologischen Präparat charakteristische „Stacheln“ (lateinisch spina) auf (Hwa et al. 2011).

Die Zellen des Stratum granulosum weisen viele kleine Granula auf, deren Inhalt beim Übergang ins Stratum corneum exozytotisch in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Sie bilden damit die extrazelluläre Lipidmatrix. Zu diesem Zeitpunkt verlieren die Zellen ihren

Zellkern sowie ihre Zellorganellen und bilden flache, stark verhornte Zellen, die Corneozyten (Roberts et al. 2008; Hwa et al. 2011).

Das Stratum corneum ist durch seinen äußerst kompakten und festen Aufbau eine sehr effektive Barriere zur Umwelt. Elias beschrieb die Morphologie erstmals 1983 mit seinem „Bricks and Mortar“-Modell (Elias 1983). Ein von Harding (Harding 2004) weiter entwickeltes Modell zeigt Abbildung 2-3.

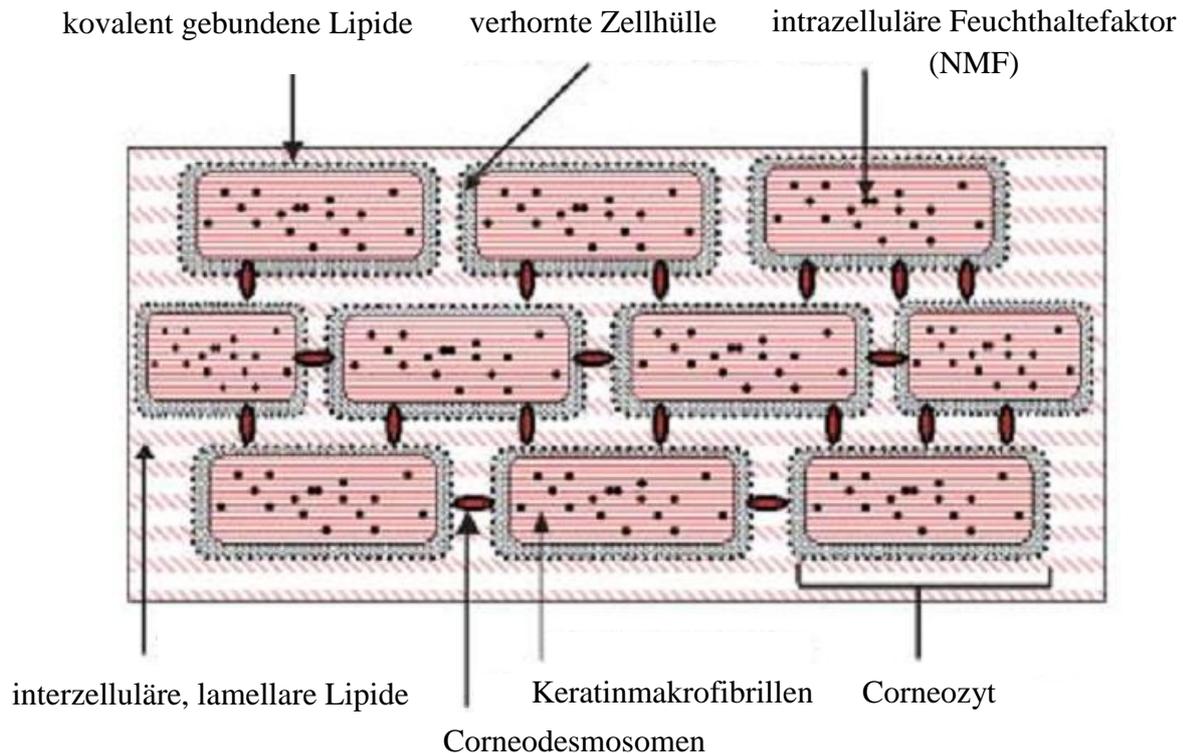


Abbildung 2-3: "Bricks and Mortar" Modell nach Harding.

Abbildung 2-3 illustriert, dass die Corneozyten wie Steine in einer Mauer angeordnet sind. Sie sind mit Keratinfilamenten gefüllt und daher sehr stabil. Zusätzlich werden sie durch eine verhornte Zellhülle („cornified cell envelope“) stabilisiert. Dabei handelt es sich um sehr stark quervernetzte Proteine, die die Zytoplasmamembran ersetzen. An diese Hülle ist zusätzlich eine Lipidhülle kovalent gebunden, die als Gerüst für eine extrazelluläre Lipidmatrix fungiert (Hwa et al. 2011). Der mechanische Zusammenhalt der Corneozyten wird hauptsächlich durch hakenähnliche Strukturen der Corneozyten sowie Corneodesmosomen gewährleistet: Corneodesmosomen bilden sich im Laufe der Keratinozytendifferenzierung und verbinden die Keratinozyten durch Transmembranproteine wie Nieten; auf jeder Seite eines Corneozyten finden sich bis zu 600 Corneodesmosomen (Wepf et al. 2007; Hwa et al. 2011). Zusätzlich bilden die Corneozyten hakenähnliche Strukturen, die den größten Anteil an der mechani-

schen Stabilität der Corneozyten haben (Wepf et al. 2007). Zwischen dieses Mauerwerk aus Corneozyten ist eine Lipidmatrix eingelagert, die hauptsächlich aus äquimolaren Anteilen von Ceramiden, freien Fettsäuren und Cholesterol besteht. Diese Matrixlipide lagern sich wie Biomembranen zu Doppelschichten zusammen, weisen aber keinerlei Phospholipide auf (Hwa et al. 2011). Die Lipidmatrix enthält nur sehr wenig Wasser und ist die hauptsächlich Diffusionsbarriere für Xenobiotika und Wasser (Wepf et al. 2007; Roberts et al. 2008). Langkettige Ceramide scheinen essentiell für diese Barrierefunktion zu sein, da die C36-Seitenkette der entsprechenden Fettsäureester bis in die nächste Lipiddoppelschicht hineinragt und so zur Integrität der Lipidmatrix beiträgt. Tight junctions, die sich ebenfalls zwischen den Corneozyten befinden, sind für eine geordnete Bildung der Lipidmatrix von Bedeutung (Wepf et al. 2007).

Dieser kompakte Aufbau gewährleistet eine einzigartige Stabilität und Barriere gegen eindringende Fremdstoffe oder -körper, ist aber nicht über die gesamte Dicke des ca. 20 µm dicken Stratum corneums gegeben. Um eine Abschilferung („Desquamation“) der obersten Zellschichten zu ermöglichen, muss diese feste Struktur aufgelockert werden. In der Folge weist das sogenannte Stratum disjunctum Störungen der Morphologie, wie z. B. Lücken in der extrazellulären Lipidmatrix, auf. Das darunterliegende Stratum compactum stellt damit die effektivste Barriere dar (Monteiro-Riviere et al. 2008; Hwa et al. 2011).

2.1.3 Arzneistofftransport durch die Haut

Soll ein Arzneistoff in der Haut wirken oder gar systemisch verfügbar werden, muss er zunächst das Stratum corneum, die äußerste Barriere der Haut durchqueren. Dafür stehen verschiedene Wege zur Verfügung, die in Abbildung 2-4 dargestellt sind.

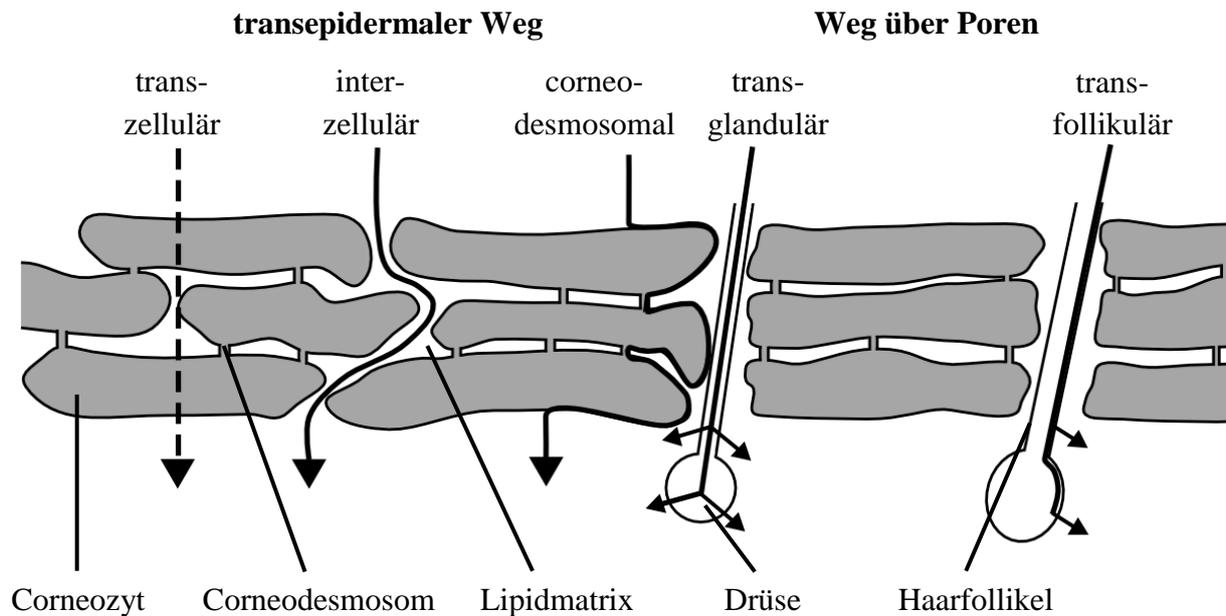


Abbildung 2-4: Arzneistoffwege durch das Stratum corneum.

Betrachtet man die Haut als vollkommen geschlossen, d. h. ohne Hautanhangsgebilde, ergeben sich 3 Routen für Arzneistoffe: Die transzelluläre Route, die den direkten Weg darstellt, die interzelluläre Route, die durch die Lipidmatrix führt sowie die corneodesmosomale Route, die über die Corneodesmosomen von Corneozyt zu Corneozyt führt (Hadgraft 2001; Trommer et al. 2006; Wepf et al. 2007; Hwa et al. 2011).

Der transzelluläre Weg ist praktisch bedeutungslos, da der stete Wechsel zwischen Lipidmatrix und hydrophilen Corneozyten ein großes Hindernis darstellt. Allerdings ist denkbar, dass Arzneistoffe die verhornten Zellhüllen und die Corneodesmosomen, welche die Corneozyten verbinden, als Weg verwenden (Wepf et al. 2007). Die meisten Moleküle gelangen auf dem interzellulären Weg durch das Stratum corneum, obwohl die Lipidmatrix lediglich 1 % des Stratum corneums ausmacht. Dieser Weg verläuft durch die „Bricks and Mortar“-Struktur sehr gewunden und ist dadurch deutlich verlängert. Das Stratum corneum stellt damit ein großes Hindernis für die Penetration von Arzneistoffen dar (Hadgraft 2001; Trommer et al. 2006; Nitsche et al. 2008; Hwa et al. 2011).

Wie in 2.1.2 geschildert, finden sich in der Haut Drüsen und Haarfollikel. Diese durchstoßen die Hautoberfläche und bilden dadurch alternative Routen zum transepidermalen Weg. Die Bedeutung dieser Routen ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Man weiß jedoch, dass der transfollikuläre Weg wichtiger als der transglanduläre Weg ist. Da Haarfollikel nur ungefähr 0,1 % der Hautoberfläche ausmachen, wird allgemein angenommen, dass der transepidermale Weg der dominierende ist (Grams et al. 2005; Hwa et al. 2011). Jedoch haben Berechnungen zu Permeationsuntersuchungen gezeigt, dass der transfollikuläre Weg zu Beginn der Permeation einen wesentlichen Teil zur permeierten Menge beiträgt. Im Steady-State, d. h. der Gleichgewichtsphase der Permeation, ist dieser Anteil jedoch nur noch unbedeutend (Grams et al. 2005). Es gibt aber Hinweise darauf, dass große, polare Moleküle, wie z. B. Proteine, bevorzugt über den transfollikulären Weg permeieren (Kasting et al. 2005; Lauer 2005; Dancik et al. 2008).

Die kernhaltige Epidermis weist eine deutlich weniger kompakte Struktur auf, bietet durch die sehr dichten Verbindungen zwischen den Zellen allerdings praktisch keine interzellulären Wege (Hwa et al. 2011). Der dadurch erzwungene transzelluläre Weg behindert die Diffusion von Substanzen, die Hauptbarriere stellt dennoch das Stratum corneum dar (Reddy et al. 2005). Die Dermis schließlich ist sehr zellarm und die Maschenweite der Kollagennetze ist so groß, dass keine Größenselektion von Molekülen stattfindet. Diese sehr wasserhaltige Hautschicht stellt deshalb ausschließlich für sehr lipophile Substanzen eine Barriere dar. Eine ausgeprägte Barrierefunktion ist an dieser Stelle allerdings auch nicht mehr essentiell, da die Moleküle in der Regel bei Erreichen des papillären Plexus ins Blut übergehen und über Leber und Niere aus dem Körper entfernt werden (Hwa et al. 2011).

2.2 In vitro Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen

Um den Arzneistofftransport in der Haut bzw. durch die Haut zu untersuchen, stellen in vivo Versuche am Menschen das Mittel der Wahl dar. Ethische Bedenken, hohe Kosten sowie eine aufwändige Analytik verhindern jedoch derartige Routineuntersuchungen.

Es gibt daher Surrogatuntersuchungen, die sich in ihrer Durchführung als auch ihren Zielen unterscheiden. Sowohl in vitro Freisetzungs- als auch in vitro Permeations- bzw. Penetrationsuntersuchungen haben ihren Platz in Forschung, Entwicklung sowie Qualitätskontrolle.

2.2.1 Aufbau und Funktion der Franz-Diffusionszellen

Das Grundprinzip der in vitro Freisetzungs- bzw. Permeationsuntersuchungen besteht darin, die pro Zeiteinheit in ein Akzeptormedium abgegebene Arzneistoffmenge zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit Franz-Diffusionszellen verwendet, da sie die am weitestverbreiteten Systeme für diese Art von Untersuchung darstellen und ihr Einsatz auch von staatlichen Behörden wie der „Food and Drug Administration“ (FDA) gebilligt wird (Corbo 1995; Food and Drug Administration 1997).

Der klassische Aufbau einer Franz-Diffusionszelle ist in Abbildung 2-5 dargestellt.

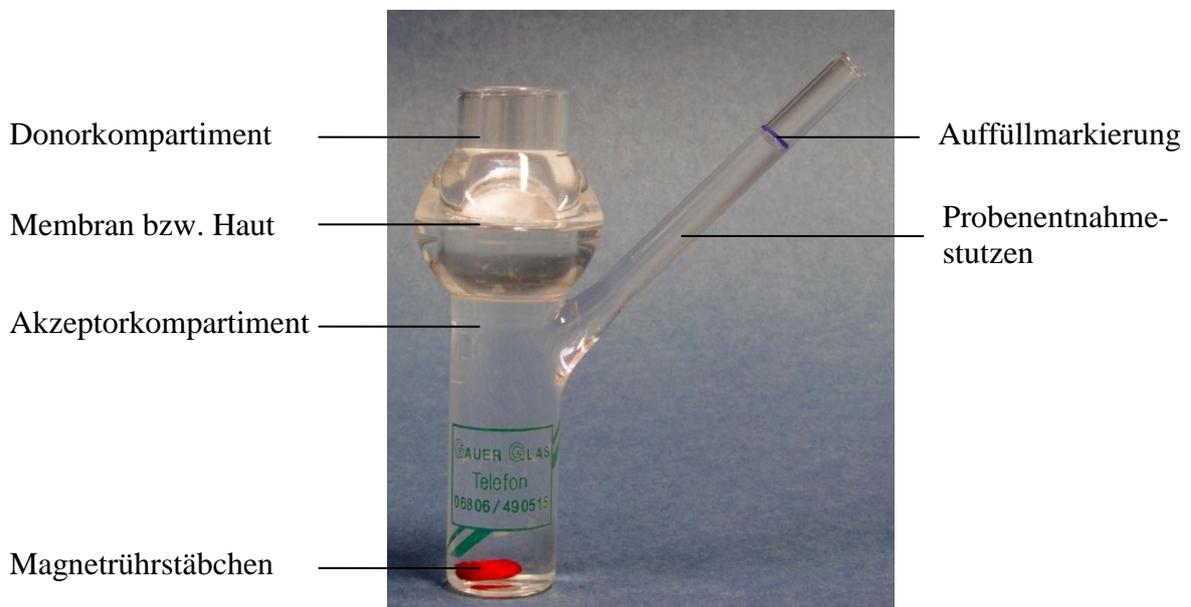


Abbildung 2-5: Franz-Diffusionszelle.

Eine Franz-Diffusionszelle besteht aus 2 Kompartimenten: Dem oberen Donorkompartiment, welches die zu untersuchende Zubereitung aufnimmt und dem unteren Akzeptorkompartiment, welches das Akzeptormedium enthält. Beide Kompartimente werden durch eine Membran bzw. Haut getrennt. Auf die Membran bzw. Haut wird die wirkstoffhaltige Formulierung aufgetragen. Der Arzneistoff diffundiert durch die Membran bzw. Haut in das Akzeptormedium, in welchem dann die Arzneistoffmenge bestimmt wird. Dazu werden zu festgelegten Entnahmezeiten Proben gezogen und analysiert. Das entnommene Volumen wird durch neues Akzeptormedium ersetzt. Franz-Diffusionszellen werden so temperiert, dass die Membran die humane Hautoberflächentemperatur von 32 °C annimmt.

In vitro Wirkstofffreisetzungs- und Permeationsuntersuchungen unterscheiden sich in der Art der verwendeten Membran, die entweder aus einem Polymer oder Haut besteht. Bei beiden Methoden finden Arzneistofffreisetzung und Diffusion durch eine Membran statt.

2.2.2 Wirkstofffreisetzung aus Dermatika

Die Freisetzung von Arzneistoffen aus Dermatika lässt sich in vielen Fällen durch eine Wurzel-Zeit-Kinetik beschreiben, die erstmals von Takeru Higuchi 1961 postuliert wurde (Higuchi 1961). Dieses Quadratwurzelgesetz wurde ursprünglich für Suspensionssalben aufgestellt, gilt jedoch unter bestimmten Voraussetzungen auch für Lösungssysteme (Shah 2005). Das Quadratwurzelgesetz nach Higuchi (Gleichung 2-1) besagt, dass eine Auftragung der freigesetzten Menge gegen die Wurzel der Zeit eine Gerade ergibt, deren Steigung der Freisetzungsgeschwindigkeit des Systems entspricht.

$$Q = \sqrt{2ADC_s t}$$

Gleichung 2-1

- Q = freigesetzte Arzneistoffmenge/Fläche
- A = Arzneistoffkonzentration
- D = Diffusionskoeffizient in der kontinuierlichen Phase
- C_s = Löslichkeit in der externen Phase
- t = Zeit

Die Proportionalität zwischen freigesetzter Arzneistoffmenge und der Wurzel der Zeit ist in Gleichung 2-1 gut zu erkennen. Sie gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, dass während der Versuchsdauer maximal 30 % der Arzneistoffmenge abgegeben werden (Thakker et al. 2003; Shah 2005).

Auch die Freisetzung aus Emulsionen lässt sich durch die Higuchi-Gleichung beschreiben; so wie bei einer Suspension die Arzneistoffkonzentration im Vehikel durch die Sättigungslöslichkeit des Arzneistoffs im Vehikel vorgegeben ist, so geben bei Emulsionen der Verteilungskoeffizient und das Volumenverhältnis von kontinuierlicher zu disperser Phase die Arzneistoffkonzentration in der kontinuierlichen Phase vor.

2.2.3 Diffusion durch die Membran bzw. Haut

Sowohl bei in vitro Wirkstofffreisetzungsuntersuchungen als auch bei in vitro Permeationsuntersuchungen muss der Arzneistoff eine Membran durchwandern, um in das Akzeptormedium zu gelangen. Dies geschieht in beiden Fällen durch passive Diffusion, da es bisher kaum Hinweise für einen aktiven Transport durch die Haut gibt. Der Transportvorgang lässt sich daher mit Hilfe des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes beschreiben, das in Gleichung 2-2 wiedergegeben ist (Hadgraft 2001; Azzi et al. 2005; Levin et al. 2005).

$$J = \frac{D \cdot VK}{h} \cdot C_{app} \quad \text{Gleichung 2-2}$$

J = Flux/Fläche
D = Diffusionskoeffizient
VK = Verteilungskoeffizient Haut/Vehikel
C_{app} = applizierte Konzentration
h = Dicke der Haut

Der in Gleichung 2-2 dargestellte Zusammenhang stellt für Haut jedoch eine starke Vereinfachung dar, da die Haut als homogene Membran betrachtet und die sehr unterschiedlichen Diffusionseigenschaften der Hautschichten nicht berücksichtigt werden. Dennoch ist der Ansatz geeignet, den Einfluss der Parameter zu beschreiben: Die pro Zeiteinheit diffundierende Menge verhält sich proportional zur aufgetragenen Arzneistoffkonzentration und zum Verteilungskoeffizienten Haut/Vehikel. Das bedeutet, dass bei gleicher Arzneistoffkonzentration Formulierungen mit einer höheren Affinität zum Arzneistoff, geringere Freisetzungsraten aufweisen (Higuchi 1962; Hadgraft 2001; Azzi et al. 2005).

Erweitert man das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz um die Besonderheiten poröser Membranen, die Zatz und Segers in ihrer Veröffentlichung ausführlich diskutieren, so erhält man Gleichung 2-3 (Zatz et al. 1998).

$$J = \frac{D \cdot VK \cdot \varepsilon}{\tau \cdot h} \cdot C_{\text{app}}$$

Gleichung 2-3

- J = Flux/Fläche
 D = Diffusionskoeffizient im Akzeptormedium
 VK = Verteilungskoeffizient Akzeptormedium/Vehikel
 ε = Membranporosität
 τ = Membrantortuosität
 h = Membrandicke

Gleichung 2-3 berücksichtigt zusätzlich die Porosität und Tortuosität von Membranen, d. h. deren Porenanteil und die Gewundenheit der Poren. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 2-6 den Längsschnitt einer porösen Membran.

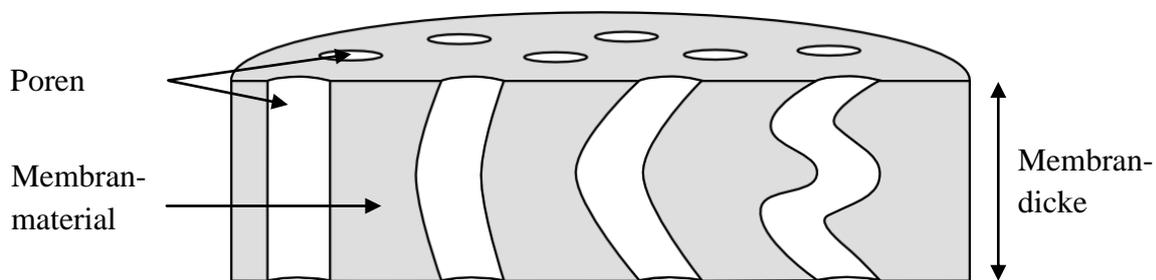


Abbildung 2-6: Längsschnitt einer porösen Filtermembran, mit Poren unterschiedlicher Tortuosität.

Poröse Membranen nehmen das Akzeptormedium in ihre Poren auf, so dass die Verteilung des Arzneistoffs direkt in das Akzeptormedium erfolgt (Zatz 1995). Dies kann in umso größerem Ausmaß erfolgen, je poröser die Membran ist, da so die Grenzfläche zwischen Vehikel und Akzeptormedium vergrößert wird. Wie bei Haut, spielt auch bei Membranen der Verteilungskoeffizient eine Rolle. Allerdings ist dieser hier nicht vorgegeben, sondern wird durch die Wahl des Akzeptormediums beeinflusst. Der Arzneistoff sollte daher eine hohe Affinität zum Akzeptormedium aufweisen. Die Zeit, die der Arzneistoff nach dem Verteilungsvorgang benötigt um die Membran zu durchwandern, hängt von der Diffusionsgeschwindigkeit in der Membran und dem Diffusionsweg ab. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird durch das Akzeptormedium bestimmt, da dessen Viskosität indirekt proportional zum Diffusionskoeffizienten ist (Einstein 1905). Der Diffusionsweg hängt von der Membrandicke und der Porentortuosität ab; verlaufen die Poren geradlinig, ist der Weg kürzer als wenn sie stark gewunden verlaufen. Für einen schnellen Membrantransport sind daher sehr poröse, dünne Membranen, deren Poren möglichst geradlinig verlaufen sowie ein Akzeptormedium, das eine hohe Affinität für den Arzneistoff und eine geringe Viskosität zeigt, nötig. Nuclepore-Membranen, die auch im Rahmen der Promotion verwendet wurden, erfüllen diese Anforderungen.

2.2.4 In vitro Freisetzungsuntersuchungen

In vitro Freisetzungsuntersuchungen haben das Ziel, die intrinsische, d. h. die wahre Freisetzungsgeschwindigkeit zu messen (Zatz 1995). Sie ermöglichen dadurch, den Einfluss von beabsichtigt und unbeabsichtigt geänderten Herstellungsparametern zu bestimmen (Shah 2005).

In vitro Freisetzungsuntersuchungen werden genutzt, um die gleichbleibende Qualität einer dermalen Formulierung zu überprüfen, da Variationen der Prozessparameter, der Lieferanten, des Herstellungsortes oder der Herstellungsgeräte zu verändertem Freisetzungsverhalten und damit auch zu Veränderungen der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit führen können. Damit wird der gleiche Ansatz verfolgt, der bereits vor Jahren zur Etablierung von Dissolutionstests für feste Arzneiformen geführt hat (Shah 2005). Die Einzelheiten für die Validierung der Chargenkonformität nach kleineren oder größeren Änderungen im Produktionsprozess sind in der „SUPAC SS“, einer speziellen Guideline der US-amerikanischen „Food and Drug Administration“ beschrieben (Food and Drug Administration 1997).

Daneben sind in vitro Freisetzungsuntersuchungen wertvolle Werkzeuge der Formulierungsentwicklung und des Scale-up-Prozesses, da mit ihnen der Einfluss gezielter Veränderungen in der Herstellung auf das Freisetzungsverhalten untersucht werden können (Shah 2005).

Um auch kleine Veränderungen im Freisetzungsverhalten detektieren zu können, muss sichergestellt sein, dass diese Unterschiede nicht durch den membranären Arzneistofftransport überlagert werden. Das bedeutet, dass die Membrandiffusion so schnell erfolgen muss, dass die Freisetzung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird (Corbo 1995; Zatz 1995; Zatz et al. 1998). Dazu werden geeignete Membranen und Akzeptormedien ausgewählt. Da es nicht das Ziel ist, physiologische Bedingungen zu imitieren, werden für sehr lipophile Arzneistoffe oft ethanolische, methanolische oder macrogolhaltige Medien verwendet, die eine ausreichende Arzneistofflöslichkeit gewährleisten. Weiterhin ist für die Messung unverfälschter Freisetzungsraten die physikalische Integrität der Arzneiform zu gewährleisten, da entsprechende Veränderungen während der Freisetzung, die Freisetzungseigenschaften beeinflussen können. Zu diesem Zweck werden die Donorkompartimente verschlossen, was die Evaporation flüchtiger Bestandteile unterbindet (Flynn et al. 1999).

Um einen statistischen Vergleich zur Beurteilung der Freisetzungsveränderung durchführen zu können, ist es erforderlich reproduzierbare Parameter zu bestimmen. Durch infinite Dosierung, d. h. durch Dosierungen, die eine praktisch konstante Arzneistoffkonzentration über den

Versuchszeitraum gewährleisten, können gemäß der Higuchi-Gleichung gleichbleibende Freisetzungsraten im sogenannten Steady-State erreicht werden, die unabhängig von der aufgetragenen Menge sind (Higuchi 1961). Dies ermöglicht die Bestimmung der Geradensteigung, die die Freisetzungsgeschwindigkeit repräsentiert (Food and Drug Administration 1997).

Als Folge des Versuchsdesigns von *in vitro* Freisetzungsuntersuchungen, ist die Diffusion durch die Membran viel schneller als die Freisetzung, die dadurch geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Kinetik mit der der Arzneistoff im Akzeptormedium erscheint, gehorcht daher ebenfalls dem Quadratwurzelgesetz nach Higuchi (Flynn et al. 1999).

2.2.5 In vitro Permeationsuntersuchungen

Je nachdem wie weit ein Arzneistoff in die Haut vordringt, unterscheidet man Penetration, Permeation und Resorption. Penetration bezeichnet das Eindringen einer Substanz in eine bestimmte Hautschicht, wohingegen Permeation die Wanderung des Arzneistoffs von einer Hautschicht in eine strukturell andere Hautschicht beschreibt. Die Resorption erfolgt, wenn der Arzneistoff die Epidermis durchwandert hat und im vaskulären Plexus der Dermis in das Blut aufgenommen wird (Hwa et al. 2011).

In vitro Permeationsuntersuchungen dienen dazu, das Ausmaß und die Geschwindigkeit zu bestimmen, mit der eine Substanz die Haut durchwandert. Diese Informationen sind in der Risikobewertung von Substanzen sowie bei der Entwicklung neuer dermaler Zubereitungen sehr wertvoll (Levin et al. 2005; Hadgraft et al. 2008; Schäfer-Korting et al. 2008).

Permeationsuntersuchungen haben im Vergleich zu Freisetzungsuntersuchungen den Vorteil, dass sie näher an den Anwendungsbedingungen der Praxis sind; sie verwenden Haut, die, im Gegensatz zu den Membranen der Freisetzungsuntersuchungen, eine wirksame Barriere gegen das Eindringen von Xenobiotika darstellt. Im Allgemeinen stellt dadurch die Diffusion durch die Haut den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Hadgraft et al. 2008).

Je nach Durchführung der Permeationsuntersuchungen kann man sich unterschiedlich stark den realen Anwendungsbedingungen annähern und unterscheidet dabei 2 grundsätzliche Versuchsansätze:

Bei *infiniter* Dosierung ersetzt man lediglich die Membranen der Freisetzungsuntersuchungen gegen Haut. Das heißt, dass die aufgetragene Formulierungsmenge weiterhin so gewählt ist, dass die Arzneistoffkonzentration während der Versuchsdauer praktisch konstant bleibt. So

hat man bereits ein deutlich realistischeres Ergebnis und erhält dennoch Parameter, die statistisch verglichen werden können. Die Kinetik mit der die permeierte Arzneistoffmenge ins Akzeptormedium gelangt, lässt sich durch das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz beschreiben, sofern die Diffusion durch die Haut den geschwindigkeitsbestimmende Schritt darstellt (OECD 2004; Hadgraft et al. 2008). Nachteilig ist jedoch, dass Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosierung zu einer Überbewertung der Permeationsraten führen können, da die aufgetragenen großen Formulierungsmengen okklusiv wirken und damit zur Quellung des Stratum corneums führen, die dessen Barrierefunktion beeinträchtigt (Zhai et al. 2005; Trommer et al. 2006; Wepf et al. 2007; Hwa et al. 2011)

Bei Versuchen mit finiter Dosierung wird eine anwendungsorientierte Dosierung ≤ 10 mg Formulierung pro cm^2 Haut gewählt (OECD 2004). Zusätzlich wird auf das Verschließen der Donorkompartimente verzichtet. Mit diesem Ansatz können realistischere Daten gewonnen werden, da Phänomene, die bei der Anwendung von Dermatika auftreten, berücksichtigt werden. Dazu gehört, dass sich die Arzneistoffkonzentration durch die Abgabe von Arzneistoff merklich über die Versuchszeit ändert und dass sich die Formulierungen nach Applikation durch Evaporation flüchtiger Komponenten wie Wasser, Ethanol oder Propylenglykol verändern kann (Flynn et al. 1999; OECD 2004). Ein Nachteil der finiten Dosierung ist jedoch, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schlechter ist und die Permeation oft keiner linearen Kinetik gehorcht und deshalb keine statistisch zu vergleichenden Parameter ermittelt werden können.

2.2.6 Humanhaut und Humanhautmodelle

In vitro Permeationsuntersuchungen können mit verschiedenen Häuten durchgeführt werden, dazu gehören Humanhaut, Tierhaut und rekonstruierte Epidermis (Netzlaff et al. 2005).

Frisch exzidierte Humanhaut stellt naturgemäß den Goldstandard dar, ihr Einsatz ist allerdings auf Grund logistischer Probleme häufig limitiert. Auch die Verwendung kryokonserverter Humanhaut ist auf Grund von Verfügbarkeits- und Ethikproblemen häufig nicht realisierbar (Schreiber 2006). Deshalb kommen oft alternative Hautmodelle zur Anwendung.

Die Häute verschiedener Tierspezies können für in vitro Permeationsuntersuchungen herangezogen werden. Die größten Unterschiede zwischen den Spezies betreffen die Behaarung, das Schweißdrüsenvorkommen, die Dicke und die Struktur der Haut sowie der Hautschichten (Monteiro-Riviere et al. 2008). Meist werden Nagetier- und Schweinehaut verwendet. Nagetiere sind etablierte Modelle für die Toxizitätsprüfung von Substanzen, für Permeationsunter-

suchungen jedoch wenig geeignet, da sie eine deutlich geringer ausgeprägte Hautbarriere und dadurch unvorhersehbar höhere Permeationsraten als Humanhaut zeigen (Schäfer-Korting et al. 2008). Schweinehaut zeigt hingegen hinsichtlich Morphologie und chemischer Zusammensetzung die größten Übereinstimmungen mit Humanhaut aller Tierhäute. Da auch die Permeationseigenschaften vergleichbar sind, ist Schweinehaut mittlerweile ein etablierter Ersatz für Humanhaut (Monteiro-Riviere et al. 2008).

Bei der Auswahl der Haut ist zusätzlich das Hautareal zu beachten, da die Permeabilität stark von diesem abhängt. So gilt für den Menschen z. B. folgende Permeabilitätsrangordnung: Skrotum > Stirn > Achselregion > Kopfhaut > Rücken > Extremitäten (Wester et al. 2005). Diese Unterschiede sind durch viele Faktoren bedingt, wie Dicke und Lipidzusammensetzung des Stratum corneums, Dichte der Hautanhangsgebilde und Durchblutung der Haut (Hwa et al. 2011). Permeationsergebnisse müssen daher immer unter Berücksichtigung des verwendeten Hautareals interpretiert werden. Für das Schwein gilt Haut vom hinteren Teil der Ohrmuschel als bestes Hautmodell (Hadgraft et al. 2008).

Human- und Tierhaut können als Vollhaut, Spalthaut, hitzeseparierte Epidermis und trypsinsepariertes Stratum corneum verwendet werden (Schäfer-Korting et al. 2008). Im Rahmen der Dissertation wurden Vollhaut und Spalthaut genutzt. Vollhaut besteht aus der Epidermis und Dermis. Sie sollte nur in begründeten Fällen verwendet werden, da sie Substanzen künstlich zurückhält (Bronaugh et al. 2005). Zudem werden in vivo Arzneistoffe im papillären Plexus absorbiert und durchwandern deshalb die Dermis nicht vollständig (Hwa et al. 2011). Es ist daher nicht sinnvoll, diese Hautschicht in der Untersuchung zu berücksichtigen. Spalthaut umfasst die vollständige Epidermis und einen Teil der Dermis. Um Spalthaut zu gewinnen, werden Hautschichten definierter Dicke mit Hilfe eines Dermatoms von Haut herunter präpariert. Die Spalthaut sollte nicht zu dünn geschnitten werden, da die Behaarung sonst zu Löchern im Präparat führen kann (Monteiro-Riviere et al. 2008).

Eine weitere Alternative zu Humanhaut stellt rekonstruierte Epidermis dar. Unter den kommerziell erhältlichen Hautmodellen sind EpiDerm[®], Episkin[®] und SkinEthic[®] die bestuntersuchten. Die in vitro kultivierten 3D-Matrices zeigen insgesamt gute Übereinstimmungen mit Humanhaut. Jedoch zeigen sie auch Abweichungen in der Proteinexpression und Lipidzusammensetzung, die für eine Störung der Barriereigenschaften sprechen (Schäfer-Korting et al. 2008). Untersuchungen haben gezeigt, dass das Permeationsausmaß vieler Substanzen deutlich höher als bei Verwendung von Human- oder Schweinehaut ist (Vuia 2007). Versuche mit dem Ziel, Vehikeffekte auf die Permeation zu untersuchen, haben zudem gezeigt, dass

die Ergebnisse mit rekonstruierter Epidermis nicht immer auf Humanhaut übertragbar sind. Dies liegt auch daran, dass diese Modelle z. B. empfindlich auf Ethanol reagieren (Netzlaff et al. 2005; Schäfer-Korting et al. 2008). Dies schränkt auch die Wahl geeigneter Akzeptormedien für sehr lipophile Substanzen ein, die oft Ethanol oder Methanol enthalten (OECD 2004). Vor diesem Hintergrund erscheint die Verwendung von rekonstruierter Epidermis unvorteilhaft zu sein.

2.3 Silikone

Silikone sind Polymerhybride, die aus organischen und anorganischen Strukturen bestehen und wegen ihrer einzigartigen Eigenschaften heutzutage in vielen Industriezweigen Anwendung finden. Eingesetzt werden sie z. B. in der Lack-, Chemie-, Kosmetik-, Lebensmittel- und der Pharmaindustrie (Somasundaran et al. 2006).

Sie sind dabei von technischer Bedeutung, z. B. als Dichtungs-, Antischaum- oder Oberflächenhydrophobisierungsmittel oder sind Bestandteil entsprechender Produkte, wie Cremes, Haarpflegemittel, Entlausungspräparaten (z. B. Nyda[®] oder Etopril[®]), Antiflatulencia (z. B. Sab simplex[®]), Marmeladen oder Fruchtsäfte.

2.3.1 Silikone in Arzneimitteln und Kosmetika

Silikonverbindungen stellen eine sehr heterogene Stoffklasse dar und verfügen über eine Reihe interessanter Eigenschaften, die sie von konventionellen Hilfsstoffen unterscheiden (Somasundaran et al. 2006). Dies hat dazu geführt, dass ihre Verwendung in Kosmetikprodukten seit den 1970ern stark zugenommen hat und mittlerweile mehrere 10000 t dieser Substanzen jährlich verarbeitet werden. Auf Grund der Vielzahl möglicher Verbindungen existieren unterschiedliche Anwendungsgebiete: Silikone werden u. a. als Emulgatoren, Additive, Hautschutzmittel oder als Ersatz für konventionelle Kohlenwasserstoffverbindungen eingesetzt (Floyd 1999).

Die Toxikologie von Silikonen ist gut dokumentiert: Sie sind untoxisch und bei dermalen Applikation physiologisch indifferent und reizlos. Sie zählen damit zu den sichersten Inhaltsstoffen überhaupt. Gleichzeitig zeichnen sie sich durch spezielle Anwendungseigenschaften aus: Sie hinterlassen ein weiches, samtiges und nicht fettiges Hautgefühl (Floyd 1999; Hoffmann et al. 1999; Somasundaran et al. 2006). Da diese Eigenschaften gerade bei geschädigter Haut geschätzt sind, wäre ihr Einsatz z. B. bei Psoriasis oder Neurodermitis von großem Vorteil.

Silikone werden in der Pharmaindustrie außerdem als Silikonmembranen und -implantate eingesetzt bzw. erforscht, um die Heilung von Brandwunden zu unterstützen oder um Arzneistoffe kontrolliert freizusetzen (Kajihara et al. 2003; Somasundaran et al. 2006; Tandara et al. 2008).

2.3.2 Struktur und Eigenschaften von Silikonen

Silikone sind Organopolysiloxane. Sie besitzen ein Polysiloxangrundgerüst bestehend aus Si–O-Einheiten. Diese Siloxaneinheiten können mit einer Vielzahl unterschiedlicher organischer Substituenten verknüpft werden. Als Substituenten kommen alle funktionellen Gruppen in Betracht, die auch in der klassischen Kohlenwasserstoffchemie Verwendung finden. Im einfachsten Fall sind die Silizium-Atome permethyliert. Dieses sogenannte Polydimethylsiloxan (PDMS) stellt das Grundgerüst der meisten Silikone dar. Je nachdem, ob das Polysiloxangrundgerüst linear oder als Ring vorliegt, können die Silikone in kettenförmige oder cyclische Verbindungen eingeteilt werden. Die allgemeine Strukturformel der Silikone ist in Abbildung 2-7 wiedergegeben.

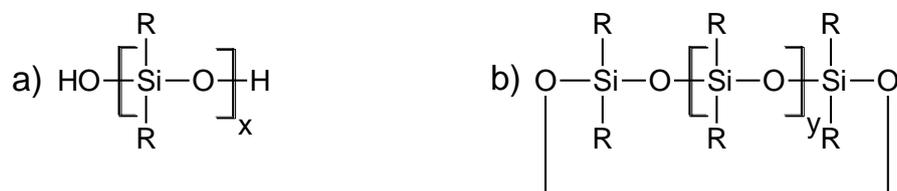


Abbildung 2-7: Allgemeine Strukturformeln kettenförmiger (a) und cyclischer (b) Silikone.

Der Polymerisationsgrad x kettenförmiger Verbindungen kann sehr unterschiedlich sein, resultierend in einer Vielzahl verschiedener Silikone. Cyclische Silikone zeigen hingegen immer einen Polymerisationsgrad y zwischen 2 und 4 (Hill 1999; Hoffmann et al. 1999). Silikone unterscheiden sich also nicht nur darin, ob sie kettenförmig oder cyclisch vorliegen, sondern auch in ihrem Polymerisationsgrad, ihren Substituenten und den Substitutionsmustern (Floyd 1999; Hill 1999; Hoffmann et al. 1999). Bereits durch diese Vielfalt möglicher Verbindungen stellen Silikone eine interessante Hilfsstoffgruppe dar. Darüber hinaus zeichnen sich diese Polymere durch besondere Eigenschaften aus, die auf die Struktur des Polysiloxangrundgerüsts zurückzuführen sind: Si–O-Bindungen sind deutlich länger als C–O- oder C–C-Bindungen und zeigen zudem flachere Bindungswinkel. Dadurch besteht so gut wie keine Rotationshinderung, wodurch das Grundgerüst im Vergleich zu Kohlenwasserstoffen deutlich flexibler ist (Floyd 1999).

Polydimethylsiloxane, die zur Gruppe der Silikonöle gehören, unterscheiden sich grundlegend von kohlenstoffbasierten Ölen. Dies ist neben dem Polysiloxangrundgerüst auf die Methylgruppen zurückzuführen, die inert sowie hydrophob sind und nur geringe intermolekulare Wechselwirkungen aufweisen. Dadurch liegen nur niedrige Kohäsionskräfte vor, sodass PDMS gut spreiten, eine geringe Oberflächenenergie haben und auch bei hohem Molekulargewicht sowie niedrigen Temperaturen keine Fließgrenze zeigen. Die Viskosität der PDMS

hängt von ihrer Kettenlänge ab und liegt zwischen 0,6 und 10^6 mPas (Fiedler 2001). Sie wird daher zur Charakterisierung der PDMS herangezogen und findet sich bei Produkten der Firma Dow Corning auch im Handelsnamen wieder. Eine weitere strukturelle Besonderheit der PDMS führt zur Wasserdampfdurchlässigkeit von PDMS-Filmen: Die Polymere bilden offene Räume, durch die Gasmoleküle passieren können. Daher sind PDMS zwar wasserabweisend, aber nicht okklusiv (Floyd 1999; Hill 1999; Somasundaran et al. 2006). Neben dieser Hydrophobie zeigen PDMS, die aus mindestens 6-8 Permethyloxaneinheiten aufgebaut sind, ein mangelhaftes Lösungsvermögen für Kohlenwasserstoffe (Grüning et al. 1999; Somasundaran et al. 2006).

Cyclische Polydimethylsiloxane zeigen die gleichen positiven Anwendungseigenschaften wie die PDMS, sind aber flüchtig. Die Verdampfungsenthalpie ist jedoch so gering, dass dabei kein ausgeprägter Kühleffekt zu bemerken ist.

2.3.3 Verwendete Silikonöle

Die verwendeten Silikonöle (Abbildung 2-8) wurden von der Firma Dow Corning zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei ausschließlich um PDMS verschiedener Kettenlängen und Cyclopentasiloxan (CPS). Abbildung 2-8 zeigt die Struktur der PDMS und von Cyclopentasiloxan.

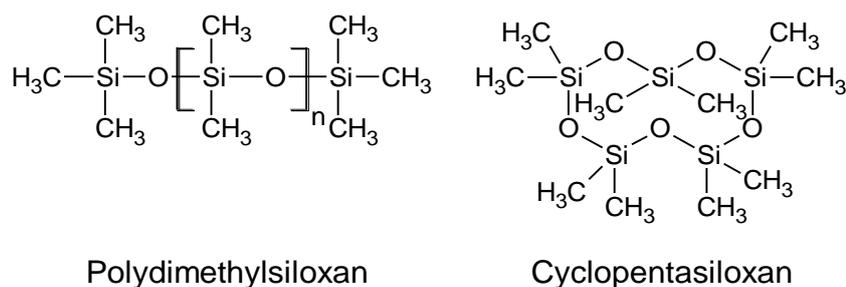


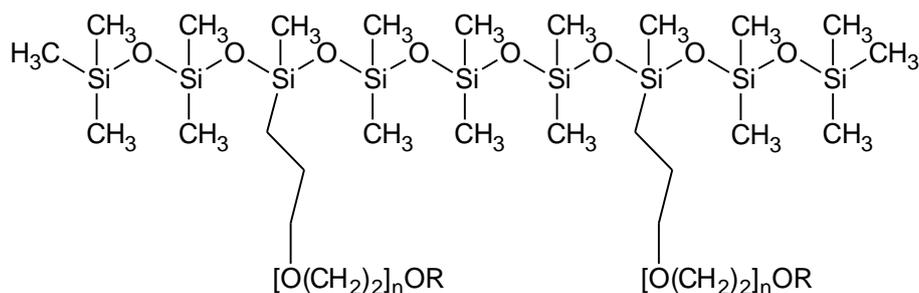
Abbildung 2-8: Struktur von Polydimethylsiloxan und Cyclopentasiloxan

2.3.4 Silikontenside

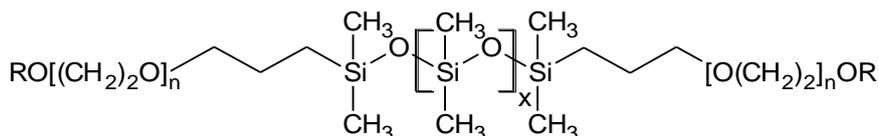
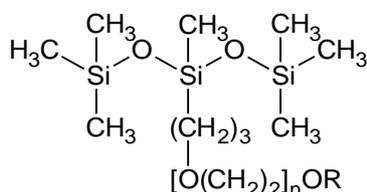
Silikontenside sind meist lineare oligomere oder polymere Silikone, die durch organische Reste modifiziert sind (Grüning et al. 1999; Hill 1999; Somasundaran et al. 2006).

Sie sind bereits seit den 1950ern bekannt und wurden ursprünglich zur Herstellung von Polyurethanbauschäumen verwendet, finden mittlerweile jedoch auch Verwendung in der Lack-, Agrar- und Kosmetikindustrie. Pharmazeutische Produkte, die Silikontenside enthalten, sind aktuell nicht auf dem Markt (Hill 1999; Somasundaran et al. 2006).

Silikontenside sind in der Regel Derivate von PDMS: Durch die Einführung hydro- oder lipophiler Gruppen wie z. B. Polyoxyalkylenen, Zuckern, Sulfatgruppen, Alkylgruppen und Halogenen werden diese amphiphil. Theoretisch ist eine Vielzahl unterschiedlicher Silikontenside denkbar, da die PDMS-Kettenlänge, die Substituenten und deren Substitutionsmuster frei wählbar sind. Jedoch lassen sich die meisten Silikontenside auf polyoxyalkylensubstituierte PDMS (INCI-Bezeichnung: Dimethicon Copolyole) zurückführen. Diese lassen sich nach dem Substitutionsmuster weiter unterteilen (Abbildung 2-9). Kommerzielle Bedeutung besitzen jedoch ausschließlich Graft-Copolymere (Hill 1999; Hoffmann et al. 1999; Somasundaran et al. 2006).



Graft-Copolymer (syn. Comb- oder Rake-Copolymer)

ABA-Block-Copolymer (syn. $\alpha\omega$ -Copolymer)

Trisiloxan-Copolymer

Abbildung 2-9: Allgemeine Strukturen von Silikontensiden.

Abbildung 2-9 zeigt die Strukturen von Graft-, ABA-Block und Trisiloxan-Copolymeren. Graft-Copolymere zeigen eine kammartige Struktur, dabei bilden die Substituenten die Kammzähne. Sie stellen ökonomisch die bedeutendste Gruppe von Silikon-Copolymeren dar, da das Substitutionsmuster sehr flexibel gestaltet werden kann. Die ABA-Block-Copolymere besitzen zwei, die Trisiloxan-Copolymere sogar nur einen Substituenten, wodurch sie schlechter an den jeweiligen Einsatzzweck angepasst werden können, aber deutlich besser chemisch definiert sind (Hill 1999; Hoffmann et al. 1999; Somasundaran et al. 2006).

Die speziellen Eigenschaften der Silikontenside machen sie zu sehr potenten Emulgatoren. Die hohe Flexibilität der PDMS-Kette erlaubt eine optimale Positionierung der Substituenten in der Grenzfläche und dadurch eine optimale sowie dichte Belegung dieser Grenzfläche. Da CH_3 -Gruppen zudem energieärmer als CH_2 -Gruppen sind, ermöglichen Silikontenside geringere Oberflächenspannungen als konventionelle Kohlenwasserstofftenside (20 mN/m vs. 30 mN/m) (Hill 1999). Graft-Copolymere besitzen zudem mehrere funktionelle Gruppen mit denen sie an die Grenzfläche adhären können, so dass sie sehr fest verankert sind und nur

geringe Desorptionstendenzen zeigen. Die viskoelastischen Eigenschaften der Substanzen sorgen zusätzlich für eine gute Stabilisierung (Hill 1999; Somasundaran et al. 2006).

Je nach Silikontensid können Wasser-in-Öl- bzw. Wasser-in-Silikonöl-Emulsionen, nicht-wässrige Emulsionen, wie z. B. Öl-in-Öl-Emulsionen oder multiple Emulsionen stabilisiert werden. Die Verwendung als Öl-in-Wasser-Emulgator ist hingegen untypisch (Grüning et al. 1999; Suitthimeathegorn et al. 2005).

Ein Nachteil bei der Verwendung von Silikontensiden ist die relativ schlechte Datenlage verglichen mit dem großen Erfahrungsschatz, der für Kohlenwasserstoffenside vorliegt. Es ist beispielsweise noch immer schwierig, bestimmte Eigenschaften der Silikontenside mit der Struktur zu korrelieren. Zudem besteht keine zuverlässige Methode, die erwartete Phasenlage vorherzusagen. Die beste Näherung besteht hier in der Verwendung der Bancroft-Regel, die besagt, dass sich der Emulgator besser in der Außenphase löst. In Folge dessen erfordert die Arbeit mit Silikontensiden noch mehr empirische Untersuchungen als die mit Kohlenwasserstoffensiden (Suitthimeathegorn et al. 2005).

2.3.4.1 Dimethicon Copolyole

Dimethicon Copolyole (Polyoxyalkylensubstituierte PDMS) stellen als sog. Graft-Copolymere die kommerziell bedeutsamsten Silikontenside dar und wurden auch im Rahmen dieser Dissertation verwendet. An das PDMS-Rückgrat sind Polyoxyethylen- und/oder Polyoxypropylensubstituenten angebunden. Diese Substituenten können als Block vorliegen oder statistisch verteilt sein (Hoffmann et al. 1999). Die Hydrophilie bzw. Lipophilie kann durch die Anzahl der Substituenten, die Kettenlänge der Substituenten sowie durch das Verhältnis von Polyoxyethylen- und Polyoxypropyleneinheiten gesteuert werden (Somasundaran et al. 2006). Da die Synthese nicht hochspezifisch verläuft, handelt es sich bei Graft-Copolymeren stets um eine Mischung verschiedener Verbindungen (Hill 1999).

Dimethicon Copolyole sind zudem zur Stabilisierung nichtwässriger Emulsionen befähigt und damit vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung von Öl-in-Öl-Emulsionen (Suitthimeathegorn et al. 2005).

2.4 Rizinusöl

Rizinusöl wird aus den Samen von *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) durch Kaltpressung gewonnen (Teuscher et al. 2004).

Die Triacylglyceride weisen als Fettsäurekomponente hauptsächlich Rizinolsäure, die einen Anteil von 85 % bis 90 % ausmacht, auf. Daneben finden sich Ölsäure und Linolsäure. Rizinolsäure ist eine ungesättigte Hydroxyfettsäure (12-Hydroxy-9,10-cis-octadecensäure; siehe Abbildung 2-10), die polarer als andere Fettsäuren ist. Der hohe Anteil an Rizinolsäure ist daher dafür verantwortlich, dass Rizinusöl leicht löslich in relativ polaren Lösungsmitteln wie Ethanol oder Methanol ist, aber nur wenig löslich in unpolaren Lösungsmitteln wie Petrol-ether. Dieser hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren bedingt jedoch auch die Oxidationsempfindlichkeit des Öls. Diesem werden daher oft fettlösliche Antioxidantien, allen voran α -Tocopherol zugefügt. Die Lagerung sollte zudem im Kühlschrank erfolgen (Voigt et al. 2006).

Rizinusöl stellt ein gutes Lösungsmittel für viele Arzneistoffe dar. Dies ließ sich auch für Nonivamid bestätigen. Rizinusöl zeigt eine gute Haut- und Schleimhautverträglichkeit und eignet sich deshalb auch für die Herstellung von Ophthalmika sowie Injektabilia (Ammon 1997; Voigt et al. 2006).

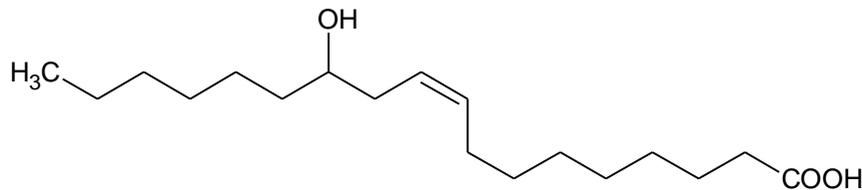


Abbildung 2-10: Chemische Struktur von Rizinolsäure

2.5 Capsaicinoide und der Modellarzneistoff Nonivamid

Capsaicinoide gehören zur Gruppe der Phenylalkylamine, genauer zu den Benzylaminen. Sie sind Amide des Vanillylamins. Sie sind die scharf schmeckenden Bestandteile in den Früchten von *Capsicum frutescens* L. s. l. (Solanaceae) sowie in etwa 200 Kultursorten der Gattung *Capsicum*. Capsaicin ist das Hauptalkaloid des Cayennepfeffers (Teuscher et al. 2004; Chhabra et al. 2012).

Nonivamid (N-Vanillylnonanamid; NVA) wird auch als synthetisches Capsaicin bezeichnet. Abbildung 2-11 zeigt die Strukturen der beiden Substanzen sowie die des Vanillins.

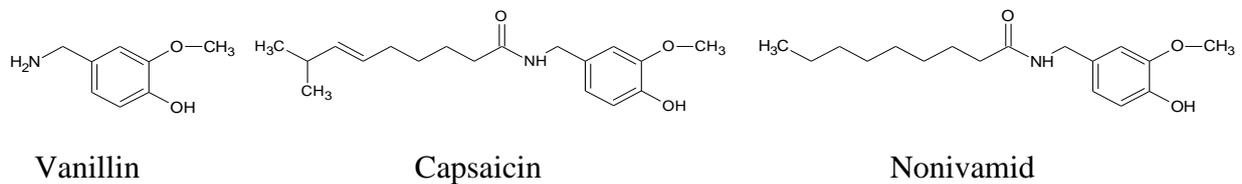


Abbildung 2-11: Strukturformeln von Vanillin, Capsaicin und Nonivamid

Traditionell werden Cayennepfefferextrakte bzw. Capsaicinoide topisch in der Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises angewendet. Sie werden aber auch in der Behandlung von Pruritus eingesetzt (Ständer et al. 2011).

Auf Grund der bekannten Struktur-Wirkungsprinzipien für Capsaicinagonisten und der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Capsaicin und Nonivamid, weisen beide Substanzen vergleichbare pharmakologische Wirkungen auf (Reyes-Escogido et al. 2011). Es bietet sich daher an, Nonivamid als Modellarzneistoff einzusetzen, da dieses in größeren Mengen und hoher Reinheit verfügbar ist.

2.6 Pruritus

2.6.1 Physiologie des Pruritus

Pruritus (lat. prurire = jucken) ist eine unangenehme Sinneswahrnehmung, die das Verlangen zu kratzen hervorruft (Metz et al. 2010).

Jucken stellt einen wichtigen angeborenen Schutzmechanismus dar, der dazu führt, dass durch Kratzen potentiell schädliche Umwelteinflüsse wie Parasiten oder Xenobiotika von der Haut entfernt werden (Metz et al. 2010). Ergänzt wird dieser Abwehrmechanismus durch Schmerz, der ebenfalls zur Meidung potentieller Noxen führt (Patel et al. 2010). Diese beiden komplementären Systeme zeigen viele physiologische Gemeinsamkeiten, so dass die meisten pruritogenen Noxen auch Schmerz auslösen können und andersherum. Die Schmerz- und Pruritusverarbeitung im Rückenmark modulieren sich gegenseitig, wodurch ein der Situation angemessener Schutzreflex ausgelöst wird (Ross 2011). Jucken und Schmerz sind damit eigenständige Sinneswahrnehmungen (Buddenkotte et al. 2010).

Jucken wird über bestimmte Subpopulationen unmyelinisierter, polymodaler C-Fasern registriert (Potenzieri et al. 2012). Diese Pruritozeptoren unterscheiden sich von den bisher bekannten nozizeptiven C-Fasern in der Lokalisation der Nervenendigungen, den verarbeitenden Rückenmarksneuronen und z. T. in den registrierten Stimuli, wie Abbildung 2-12 zeigt (Ikoma 2010; Ross 2011; Ständer et al. 2011).

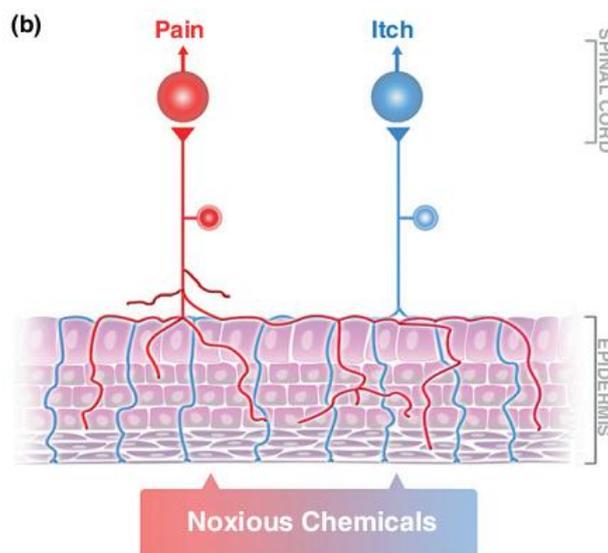


Abbildung 2-12: Unterschiede in der Schmerz- und Pruritusregistrierung sowie -verarbeitung (Ross 2011).

Da sich die Nervenendigungen insbesondere in der Epidermis befinden, wird Pruritus immer an der Hautoberfläche erzeugt (Ikoma 2010). Erst wenn die darunterliegenden Nozizeptoren erregt werden, wird ein Schmerzsignal erzeugt (Ross 2011). Die an der Pruritusregistrierung und -verarbeitung beteiligten C-Fasern werden unterteilt in mechano-sensitive (CMH), mechano-insensitive (CMi) und sonstige C-Fasern. Diese exprimieren viele verschiedene Rezeptoren, die pruritusinduzierend oder –inhibierend wirken können (Ständer et al. 2011).

Die Auslösung von Pruritus ist ein sehr komplexes Geschehen, an dem neben Neuronen weitere Zelltypen beteiligt sind. Die sich anschließende biochemische Kaskade, an der viele verschiedene Mediatoren, wie z. B. Zytokine und Interleukine beteiligt sind, ist Teil der angeborenen Immunabwehr (Buddenkotte et al. 2010; Ständer et al. 2011). Eine zentrale Rolle bei der Erregungsentstehung spielt dabei der TRPV1-Rezeptor (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), der sowohl selbst aktiviert werden kann, als auch in die Signalkaskade anderer Rezeptoren, wie z. B. der des H₁-Rezeptor involviert ist (Ross 2011; Potenzieri et al. 2012). Eine nicht abschließende Übersicht über die beteiligten Zellen und Mediatoren gibt Abbildung 2-13 (nach Ständer et al. 2011).

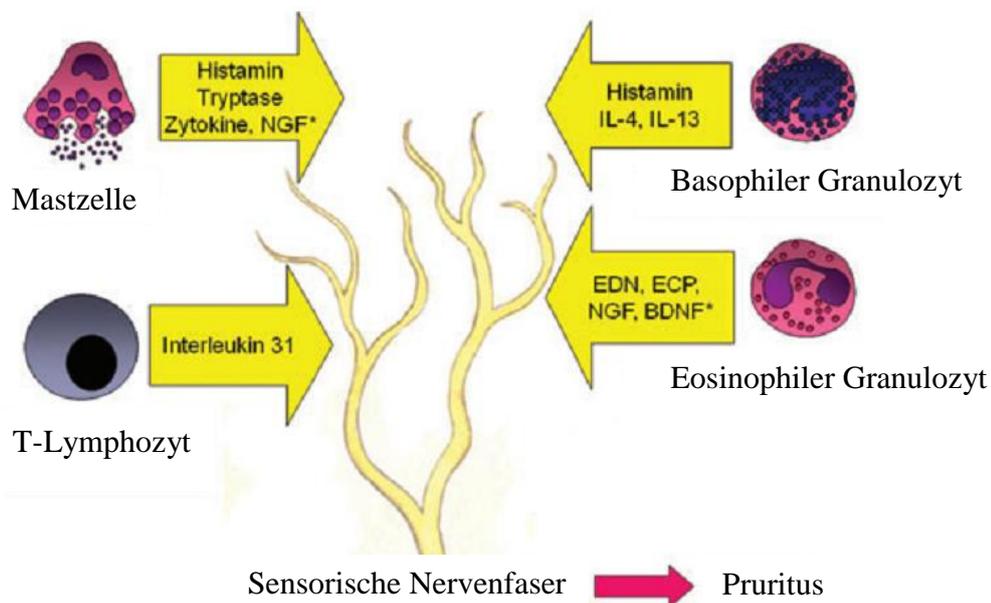


Abbildung 2-13: An der kutanen Induktion von Pruritus beteiligte Zellen und Mediatoren. BDNF = brain-derived neurotrophic factor. ECP = eosinophil cationic protein. EDN = eosinophil derived neurotoxin. NGF = nerve growth factor.

2.6.2 Pathologischer, chronischer Pruritus

Der Terminus „chronischer Pruritus“ bezeichnet eine langanhaltende Juckempfindung, die länger als 6 Wochen besteht. Trotz einer relativ hohen Prävalenz von ca. 13,9 %, stellt chronisches Jucken ein noch immer schwer zu behandelndes Symptom dar (Siepmann et al. 2011). Jucken ist oft Begleitsymptom einer systemischen, psychischen oder dermatologischen Grunderkrankung. Auch eine Vielzahl von Arzneimitteln kann pruritogen wirken. Dieser hohen ätiologischen Diversität muss bei der Diagnostik und der Therapie Rechnung getragen werden, so dass keine allgemeingültigen Therapieschemata verfügbar sind. Erschwerend kommt hinzu, dass häufig kein synchroner Verlauf von Grunderkrankung und Pruritus besteht. Das krankhafte Jucken kann der Grunderkrankung vorausgehen oder trotz erfolgreicher Therapie der Grunderkrankung fortbestehen (Ständer et al. 2011).

2.6.3 Therapie des pathologischen, chronischen Pruritus

Die Behandlung chronischen Juckens besteht in der Therapie der Grunderkrankung sowie einer begleitenden symptomatischen Therapie des Juckens (Siepmann et al. 2011).

Für die symptomatische Therapie stehen verschiedene lokale und systemische Arzneistoffe zur Verfügung. Systemisch werden z. B. hochdosierte H₁-Antihistaminika, Antidepressiva, Selektive-Serotonin-Reuptake-Inhibitoren, Mastzellstabilisatoren, Antikonvulsiva und Opioidagonisten bzw. -antagonisten verwendet. Topisch kommen insbesondere Lokalanästhetika, Glucocorticoide, Calcineurininhibitoren, Cannabinoidagonisten sowie Capsaicin zur Anwendung (Ständer et al. 2011).

2.6.3.1 Capsaicin in der Therapie des pathologischen, chronisches Pruritus

Der Einsatz von capsaicinhaltigen Präparaten bei Schmerz hat seinen Ursprung in der Volksmedizin. Als topische Therapieoption bei Schmerz und Jucken wurde es erstmals 1850 erwähnt (Anand et al. 2011). Die heute verwendeten dermalen Zubereitungen zur Behandlung von Pruritus enthalten 0,025 % bis 0,1 % (m/m) Capsaicin. Die verwendete Konzentration wird individuell festgelegt und richtet sich nach der Pathogenese des Pruritus. Zudem sollte die Therapie einschleichend begonnen werden, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wie Brennen und Kribbeln möglichst gering zu halten. Aus diesem Grund sind magistrale Rezepturen zu bevorzugen und kommerzielle Präparate zur Behandlung des Pruritus derzeit nicht am Markt erhältlich (Ständer et al. 2011). Die Creme- bzw. Salbengrundlagen der Rezepturen werden außerdem auf den Hautzustand des Patienten abgestimmt, so dass verschiedene Grundlagen wie z. B. Unguentum leniens, Unguentum cordes und Basiscreme DAC in Be-

tracht kommen (Reimann et al. 2000; ABDA 2011). Die Basiscreme DAC ist die Grundlage der NRF-Rezeptur „Hydrophile Capsaicinoid-Creme 0,025 % / 0,05 % / 0,1 % (NRF 11.125.)“, die in Deutschland als Antipruriginosum verschrieben wird (ABDA 2011). Der Nachteil der konventionellen capsaicinhaltigen Dermatika ist die mehrfache tägliche Applikation (zwischen 2 und 5 mal pro Tag), die zu einer gesenkten Therapietreue des Patienten führen kann (Anand et al. 2011; Ständer et al. 2011). Das im Jahr 2010 von der EMA (European Medicines Agency) für die Behandlung von neuropathischen Schmerzen zugelassene Hochdosis-Capsaicin-Pflaster Qutenza, stellt einen neuen Therapieansatz dar: Es enthält 8 % Capsaicin und erzielt durch eine einmalige 60-minütige Anwendung bis zu 12 Wochen Schmerzfreiheit (Anand et al. 2011). Es ist jedoch für die Behandlung des pathologischen Pruritus nicht zugelassen.

Der Wirkmechanismus von Capsaicin und entsprechender Analoga wie Nonivamid ist noch umstritten. Während der traditionellen Ansicht nach die Depletion von Substanz P aus den Nervenendigungen für die Wirkung verantwortlich ist, argumentieren Anand und Bley (Anand et al. 2011), dass die Substanz P-Verarmung lediglich eine Begleiterscheinung der Defunktionalisierung der C-Fasern sei. Diese sei jedoch nicht wirkungsbestimmend, da Substanz P nicht die zentrale Rolle bei Entzündungen spiele, die man ihr früher zugeordnet habe (Gooding et al. 2010; Misery 2010; Anand et al. 2011). Einigkeit herrscht jedoch darüber, dass Capsaicin hochspezifisch und hochaffin an den TRPV1-Rezeptor bindet und diesen aktiviert (Anand et al. 2011). In der Folge werden verschiedene Entzündungsmediatoren ausgeschüttet, die zu Jucken, Brennen und Schmerz führen. Bei wiederholter Applikation oder bei Applikation sehr hoher Capsaicindosen kommt es jedoch zu einer Desensibilisierung bzw. Defunktionalisierung der C-Fasern (Anand et al. 2011). Das Auslösen von Schmerz und Jucken ist nicht mehr möglich (Ständer et al. 2011). Auf Grund dieses Wirkmechanismus ist Capsaicin bei Pruritus verschiedener Genese wirksam (Ständer et al. 2011).

Abbildung 2-14 zeigt den Wirkmechanismus von Capsaicin wie er von Anand und Bley (Anand et al. 2011) vorgestellt wurde.

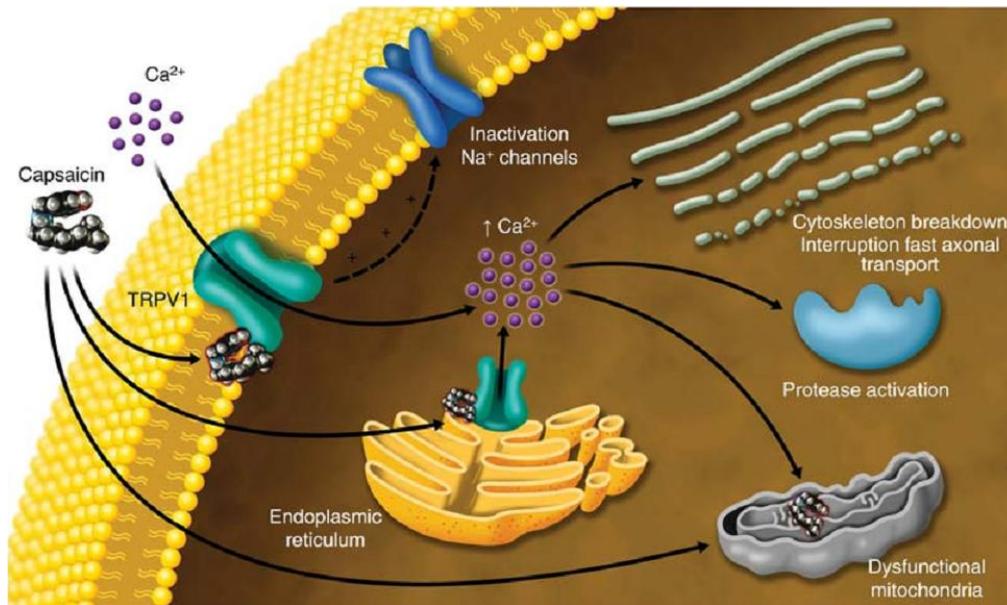


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Capsaicin.

TRPV1-Rezeptoren werden durch pH-Werte $< 5,9$, Temperaturen $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ und endogene Liganden, wie Anandamide aktiviert. Die Folge ist ein transienter Natrium- und Calciumioneneinstrom in die Zelle, der eine Membrandepolarisation sowie eine Signalkaskade in Gang setzt. Die Aktivierung durch Capsaicin oder andere chemisch stabile Agonisten führt zu einer persistierenden Öffnung des TRPV1-Ionenkanals. Da der Kanal für Calciumionen deutlich permeabler als für Natriumionen ist, reichern sich vor allem Calciumionen in der Zelle an. Capsaicin bindet außerdem an TRPV1-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums, welches daraufhin seinerseits Calciumionen freisetzt. Die sehr hohe Calciumionenkonzentration führt zur Aktivierung calciumabhängiger Enzyme wie Proteasen und zur Depolymerisation von Zytoskelettkomponenten wie den Mikrotubuli. Zusätzlich konkurriert Capsaicin TRPV1-unabhängig mit Ubichinon und blockiert so die mitochondriale Atmungskette. Die hohe Ionenkonzentration führt außerdem zu einem Wassereinstrom, durch den die C-Faser anschwillt. In der Summe dieser Ereignisse stellt das Axon in den betroffenen Bereichen seine Funktion ein. Membranpotential und Membranintegrität können nicht aufrecht erhalten werden, so dass die gespeicherten Mediatoren freigesetzt werden und keine weiteren Aktionspotentiale entstehen können. Da außerdem die Mikrotubuli zerstört sind, kann kein axonaler Transport von Mediatoren vom Zellkörper zu den Nervenendigungen stattfinden. Dies führt schließlich zu einer Depletion aller Mediatoren, einschließlich Substanz P (Bernstein 1991; Anand et al. 2011). Ständer und Luger argumentieren hingegen, dass die erhöhte Calciumionenkonzentration nach chronischer Stimulation des TRPV1 zu einer physiologischen Defunktionalisierung des Ionenkanals führt, die eine Schädigung der Nervenfasern verhindern soll. Sie

führen die Wirkung des Capsaicins u. a. auf diese Defunktionalisierung zurück, da dadurch keine Erregung der Nervenfasern mehr möglich ist (Ständer et al. 2010). Misery (Misery 2010) warnt hingegen sogar vor einer unter Umständen nichtreversiblen Degeneration von Nervenendigungen durch chronische Applikation von Capsaicin. Vergleicht man die verschiedenen Publikationen so scheint zumindest die Depletion verschiedener Neurotransmitter und die Hemmung des axonalen Transports dieser Transmitter ein gesicherter Wirkmechanismus zu sein.

Durch die direkte Wirkung an den sensorischen Nervenfasern ist Capsaicin auch in der Therapie des nicht-Histamin-induzierten Pruritus wirksam (Ständer et al. 2011).

Da die aus C-Fasern freigesetzten Mediatoren Substanz P und Neurokinin eine wichtige Funktion in der Wundheilung übernehmen, indem sie das Wachstum von Fibroblasten und Epithelzellen fördern, wurden entsprechende Nebenwirkungen befürchtet. Jedoch konnte die Sicherheit der Capsaicintherapie in 6 großen Doppelblind-Studien belegt werden. Es wurden keine Wundheilungsprobleme oder der Verlust der schützenden Sinneswahrnehmung festgestellt, da ausreichend viele Capsaicin-insensitive Nerven in der Haut vorhanden sind, die diese Funktion übernehmen können (Anand et al. 2011).

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Flüssige Lipide

Tabelle 3-1: Verwendete flüssige Lipide.

Substanz	Chemische Bezeichnung	Hersteller
Isooctyllaurat/-myristat	2-Ethylhexyllauromyristat	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Leinöl		
Mandelöl		
Olivenöl		
Rapsöl		
Rizinusöl		
Cetiol B	Di-n-butyladipat	Cognis GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Cetiol HE	PEG-7-Glycerylmonococoat	
Cetiol J600	Oleylerucat	
Cetiol LC	Coco-Caprylat/Caprat	
Cetiol OE	Dicaprylyl-Ether	
Cetiol S	Diethylhexylcyclohexan	
Cetiol SN	Cetearylisononanoat	
Cetiol V	Decyloleat	
Eutanol G	2-Octyldodecanol	
Isopropylmyristat		
Tegosoft OS	Octylstearat	Evonik Degussa GmbH (Essen, Deutschland)
Tegosoft P	Isopropylpalmitat	
Düninflüssiges Paraffin		Hansen+Rosenthal (Hamburg, Deutschland)
Miglyol 812	Capryl-Caprinsäure-Triglyceride	Sasol (Witten, Deutschland)
Miglyol 818	Capryl-Caprin-Linolsäure-Triglyceride	

3.1.2 Silikone

Alle Silikone wurden von Dow Corning (Seneffe, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3-2: Verwendete Silikone.

Handelsname	Struktur / Bestandteile
Dow Corning 190 Surfactant	PEG/PPG-18/18-Dimethicon
Dow Corning 2502 Cosmetic Fluid	Cetyldimethicon
Dow Corning 5200 Formulation Aid	Lauryl-PEG/PPG-18/18-Dimethicon
Dow Corning 5225C Formulation Aid	Dispersion von 10 % PEG/PPG-18/18-Dimethicon in Cyclopentasiloxan
Dow Corning 9011 Elastomer Blend	Dispersion von PEG-12-Dimethicon-Crosspolymer in Cyclopentasiloxan
Dow Corning BY 11-030	Dispersion von 50 % PEG/PPG-19/19-Dimethicon in Cyclopentasiloxan
Dow Corning Emulsifier 10	Lauryl-PEG/PPG-18/18-Dimethicon

Tabelle 3-3: Verwendete Silikonöle.

Handelsname	Struktur	gemessene Viskosität
Dow Corning Q7 9120 Silicone Fluid 20 cst	Polydimethylsiloxan	16 mPas
Dow Corning Q7 9120 Silicone Fluid 100 cst		80 mPas
Dow Corning Q7 9120 Silicone Fluid 300 cst		297 mPas
Dow Corning Q7 9120 Silicone Fluid 1000 cst		819 mPas
Dow Corning Q7 9120 Silicone Fluid 12500 cst		10271 mPas
Dow Corning ST Cyclomethicone 5-NF	Cyclopentasiloxan	–

3.1.3 Sonstige Chemikalien

Tabelle 3-4: Verwendete sonstige Chemikalien.

Bezeichnung (Bezeichnung gemäß Ph. Eur.)	Hersteller	Qualität
Entionisiertes Wasser		
Pluriol E600 (Macrogol 600)	BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland)	Ph. Eur.
Propylenglykol		Ph. Eur.
Chinin	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)	Ph. Eur.
Cutina GMS (Glycerolmonostearat 60)	Cognis GmbH (Düsseldorf, Deutschland)	Ph. Eur.
Tagat S2 (Macrogol-20-glycerolmonostearat)		Ph. Eur.
Lanette N (Emulgierender Cetylstearylalkohol Typ A)		Ph. Eur.
Cetylalkohol		Ph. Eur.
weißes Vaseline	Hansen + Rosenthal (Hamburg, Deutschland)	Ph. Eur.
flüssiges Paraffin		Ph. Eur.
Methanol HPLC Gradient Grade	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)	≥ 99,9 %
Ethanol HPLC Gradient Grade		≥ 99,9 %
Natriummonohydrogenphosphatdodecahydrat	k. A.	Ph. Eur.
Kaliumdihydrogenphosphat-dihydrat		Ph. Eur.
Phosphorsäure 85%		p. a.
Natriumhydroxid-Rotuli		p. a.
Natriumchlorid		p. a.
Polyethylenglycol 600 (Macrogol 600)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	Ph. Eur.
Sudan III		Ph. Eur.
Nonivamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)	≥ 97 %

3.1.4 Membranfilter

Tabelle 3-5: Verwendete Membranfilter.

Bezeichnung	Material	Porengröße / MWCO	Hersteller
Celluloseacetat-membranfilter	Celluloseacetat	0,22 µm	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Polytetrafluorethylen-membranfilter	Polytetrafluorethylen	0,2 µm	
Polytetrafluorethylen-membranfilter	Polytetrafluorethylen	5,0 µm	
Spectra/Por 1 Dialysemembran	Regenerierte Cellulose	6000 – 8000 Da	Spectrum Laboratories, Inc. (Breda, Niederlande)
Spectra/Por 3 Dialysemembran	Regenerierte Cellulose	3500 Da	
Track-etched Polyester-membran	Polyester	5,0 µm	Sterlitech (Kent, USA)
Nuclepore track-etched Polycarbonat-membran	Polycarbonat	0,03 µm	Whatman (Dassel, Deutschland)

3.2 Geräte und Software

3.2.1 HPLC-UV-Apparatur

Tabelle 3-6: Konfiguration der HPLC-UV-Apparatur.

Geräteteil	Bezeichnung	Hersteller
Entgaser	Shimadzu DGK-20A5	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Pumpe	Shimadzu LC-20AT	
Autosampler	Shimadzu SIL-20A	
Kommunikationsmodul	Shimadzu CBM-20A	
UV/Vis-Detektor	Shimadzu SPC 20A	
Säulen-Ofen	Shimadzu CTO-10ASVP	
Software	Shimadzu LC-Solution 1.21 SP1	
HPLC-Säule	CC 125/4 Nucleosil 100-5 C8, 125 x 4 mm	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
HPLC-Vorsäule	CC 8/3 Nucleosil 100-5 C8	

3.2.2 In vitro Freisetzungs- und Permeationsapparatur

Tabelle 3-7: Konfiguration der in vitro Freisetzungs- und Permeationsapparatur.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Wasserbad	T020	Lauda GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Thermostat	Alpha A	
Mehrstellenmagnetrührer	Variomag Poly 15	Thermo Scientific – Variomag (Daytona Beach, USA)
Franz-Diffusionszellen	ohne Temperiermantel Flat-Ground-Joint 1,77 cm ² Öffnungsfläche 12 mL Akzeptorvolumen	Gauer-Glass (Püttlingen, Deutschland)
Schliff fett	Glisseal HV	Dow Corning (Wiesbaden, Deutschland)
Gestell für Franz-Diffusionszellen		institutseigene Werkstatt (Tübingen, Deutschland)
Magnetührstäbchen	Stirring Bars Micro 10 x 0,3 mm	VWR International, LLC (West Chester, USA)

3.2.3 Licht-/Fluoreszenz-Mikroskop

Hersteller aller Bestandteile des Mikroskops sowie dazugehöriger Software ist die Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland).

Tabelle 3-8: Konfiguration des Licht-/Fluoreszenz-Mikroskops.

Geräteteil	Bezeichnung
Mikroskop	Imager.Z1
ApoTome	ApoTome
Halogenlampe	HAL 100
Quecksilberdampf Lampe	HBO 100
Netzteil	Powersupply 230
Mikroskopsoftware	AxioVision Rel. 4.6.3
ApoTome-Gitter	H 15,5 LP/mm
Kamera	AxioCam MRm
Objektiv	Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil M27
Reflektor	43 HE, 43 HE, Cy 3

3.2.4 Sonstige Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-9: Sonstige verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Geräteteil bzw. Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Dermatom	GA 630	Aesculap AG (Tuttlingen, Deutschland)
Dermatomklingen	GB228R	
Skalpellklingen	BB522	
Dichtemessgerät	DMA 4500	Anton Paar GmbH (Ostfildern, Deutschland)
1 mL-Spritze	Braun Inject F 1 mL	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Probennahmekanüle	Braun Spinocan 0,70 x 88 mm	
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510/ H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
Vortexer	Vortex Mixer SA8	Bibby Scientific Limited, (Staffordshire, England)
Schüttler für Messkolben	KL 2	Edmund Bühler GmbH (Tübingen, Deutschland)
Locheisen 25 mm	Turnus 25 mm	Eduard Gottfried Ferne GmbH (Remscheid, Deutschland)
Reverse-Osmose-Anlage	ELGA Purelab Option-Q ELGA Reservoir 25L	ELGA Labwater GmbH (Celle, Deutschland)
Ultraschallprozessor	Ultrasonic Processor	Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow, Deutschland)
Ultraschallsonotrode	Mikrospitze S3	
Schüttler für Mikrozentrifugenröhrchen	VXR basic Vibrax	IKA GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Luer Lock Adapter w/w (Aluminium)		institutseigene Werkstatt (Tübingen, Deutschland)
Polycarbonatzylinder		
Thermostat	Julabo ED-5	Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach, Deutschland)
Metallklammern	No 28 INOX 18/8	k. A.
pH-Meter	Seven Easy	Mettler Toledo AG (Greifensee, Schweiz)
Waage	XP 205 Delta Range	
Spritzenvorsatzfilter	Celluloseacetat, Porengröße 0,2 µm	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Waage	Extend	
Waage	Excellence	
Freisetzungsapparatur	Sotax AT 7	Sotax GmbH (Lörrach, Deutschland)

3 Materialien und Methoden

Zentrifuge für 15 mL-Zentrifugenröhrchen	Heraeus Labofuge 200	Thermo Scientific – Heraeus GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge für 50 mL-Zentrifugenröhrchen	Heraeus Labofuge M	
HPLC-Vial-Einsätze	Micro Insert 0,1 ml 30 x 5 mm	VWR International, LLC (West Chester, USA)
HPLC-Vial-Kappen	8 mm Screw cap PP black centre hole, Rubber red orange/TEF, 60 ° ShoreA 1,3 mm	
HPLC-Vials	Clean Pack 32 x 11,6 mm	
Magnetührstäbchen	Stirring Bars Micro 10 x 0,3 mm	
Mikroskop-Deckgläser	Deckgläser 20 x 20 mm	
Mikroskop-Objektträger	76×26 mm, no frosted end, BS 7011	
Mikrozentrifugenröhrchen	Mikrozentrifugenröhrchen 2 mL	
Zentrifugenröhrchen, groß	Zentrifugenröhrchen 50 mL	
Zentrifugenröhrchen, klein	Zentrifugenröhrchen 15 mL	

3.3 Herstellung der Formulierungen

3.3.1 Ethanolische Nonivamid-Stammlösung 1,0 % und 10,0 %

Für die ethanolische Nonivamid-Stammlösung 1,0 % werden 50,00 mg Nonivamid (Mettler Toledo XP 205 Delta Range) in 5,0 mL Ethanol HPLC Gradient Grade gelöst. Für die ethanolische Nonivamid-Stammlösung 10,0 % werden 500,00 mg Nonivamid (Mettler Toledo XP 205 Delta Range) in 5,0 mL Ethanol HPLC Gradient Grade gelöst.

3.3.2 Basiscreme DAC

Die Bestandteile der Basiscreme DAC sind in Tabelle 3-10 aufgelistet.

Tabelle 3-10: Zusammensetzung der Basiscreme DAC.

Bestandteil	Anteil	Masse
Glycerolmonostearat 60	4,0 %	2,00 g
Cetylalkohol	6,0 %	3,00 g
mittelkettige Triglyceride	7,5 %	3,75 g
weißes Vaseline	25,5 %	12,75 g
Macrogol-20-glycerolmonostearat	7,0 %	3,50 g
Propylenglykol	10,0 %	5,00 g
gereinigtes Wasser	40,0 %	20,00 g

Glycerolmonostearat 60, Cetylalkohol, mittelkettige Triglyceride und weißes Vaseline werden in eine Fantaschale eingewogen (Sartorius Extend) und auf dem Wasserbad aufgeschmolzen. Das gereinigte Wasser wird 5 Minuten abgekocht und anschließend auf ungefähr 70 °C abgekühlt. Macrogol-20-glycerolmonostearat, Propylenglykol und das noch heiße Wasser werden in ein Becherglas eingewogen und dispergiert. Diese hydrophile Phase wird in die Schmelze der lipophilen Bestandteile anteilsweise eingearbeitet und anschließend bis zum Erkalten gerührt. Verdunstetes Wasser wird ergänzt. Die Grundlage wird in eine Salbenkruke abgefüllt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.3.3 Hydrophile Nonivamid-Creme 0,1 % und 1,0 %

Die Creme wird analog zur Monografie „Hydrophile Capsaicinoid-Creme 0,025 % / 0,05 % / 0,1 % (NRF 11.125)“ hergestellt, die Capsaicinoide jedoch durch Nonivamid ersetzt (ABDA 2011). Die Bestandteile der Hydrophilen Nonivamid-Creme 1,0 % und 0,1 % (HNC 1,0 % und HNC 0,1 %) sind in Tabelle 3-11 aufgeführt.

Tabelle 3-11: Zusammensetzung der Hydrophilen Nonivamid-Creme 0,1 % bzw. 1,0%.

	HNC 0,1 % (2 g)	HNC 0,1 % (4 g)	HNC 1,0 % (2 g)	HNC 1,0 % (4 g)
Basiscreme DAC	1,0 g	2,0 g	1,0 g	2,0 g
Propylenglykol	0,2 g	0,4 g	0,2 g	0,4 g
gereinigtes Wasser	0,6 g	1,2 g	0,6 g	1,2 g
ethanolische Nonivamid-Stammlösung 1 %	0,2 g	0,4 g	–	–
ethanolische Nonivamid-Stammlösung 10 %	–	–	0,2 g	0,4 g

Die Herstellung erfolgt unter Verwendung des sogenannten Spritze-zu-Spritze-Verfahrens. Dazu werden Basiscreme DAC, Propylenglykol sowie gereinigtes Wasser in eine 5 mL-Spritze eingewogen (Sartorius Extend) und die ethanolische Nonivamid-Stammlösung in eine zweite 5 mL-Spritze eingewogen (Sartorius Extend). Beide Spritzen werden mit Hilfe eines Luer Lock-Adapters w/w verbunden und durch Hin-und-Her-Bewegen der Spritzenstempel homogenisiert. Dies wird solange durchgeführt bis die Creme ein homogenes Aussehen hat und sich relativ leicht hin-und-her-bewegen lässt, jedoch mindestens 70-mal.

3.3.4 Öl-in-Öl-Emulsionen

3.3.4.1 Berechnung der Rezepturen

Die verwendeten Rezepturen bestehen aus 3 Komponenten: Silikonöl, Silikontensid und Rizinusöl, welches ggf. Nonivamid oder Sudan III enthält.

Dabei ist zu beachten, dass einige der eingesetzten Silikontenside Dispersionen sind, wobei stets ein Silikonöl als Trägerflüssigkeit fungiert. Daraus ergeben sich 2 Konsequenzen für die Berechnung der Formulierungen: (1) Um die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Emulgatoren zu gewährleisten, bezieht sich die Gehaltsangabe bzgl. des Emulgators stets auf das Silikontensid und nicht auf den Anteil der Dispersion. (2) Um das angegebene Volumenverhältnis zwischen disperser und kontinuierlicher Phase zu gewährleisten, wird der Silikonölträger des Silikontensids der Silikonölphase zugerechnet.

Beispielsweise bedeutet die Angabe 4 % BY 11-030, dass die Emulsion 4 % PEG/PPG-19/19-Dimethicon, aber insgesamt 8 % Dispersion enthält. Die restlichen 4 % sind Cyclopentasiloxan und werden der Silikonölphase zugerechnet - entsprechend weniger Silikonöl ist einzuwiegen.

Daraus ergibt sich Gleichung 3-1 als Berechnungsformel für die Rezepturen:

$$m_{\text{Dispersion}} = \frac{m_{\text{Emulsion}} \cdot \omega_{\text{TiE}}}{\omega_{\text{TiD}}} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

$$m_{\text{Silikonöl}} = [m_{\text{Emulsion}} \cdot (1 - \omega_{\text{TiE}})] \cdot (1 - PVV) - \left[m_{\text{Emulsion}} \cdot \omega_{\text{TiE}} \cdot \left(\frac{1}{\omega_{\text{TiD}}} - 1 \right) \right]$$

$$m_{\text{Rizinusöl}} = [m_{\text{Emulsion}} \cdot (1 - \omega_{\text{TiE}})] \cdot PVV$$

$m_{\text{Dispersion}}$	= Masse der Dispersion
m_{Emulsion}	= Masse der Emulsion
ω_{TiE}	= Tensidgehalt der Emulsion (m/m)
ω_{TiD}	= Tensidgehalt der Dispersion (m/m)
$m_{\text{Silikonöl}}$	= Masse des Silikonöls
$m_{\text{Rizinusöl}}$	= Masse des Rizinusöls
PVV	= Phasenvolumenverhältnis

3.3.4.2 Herstellung von O/O-Emulsionen mittels Ultraschall-Sonotrode

Die Öl-in-Öl-Emulsionen werden in 15 mL-Zentrifugenröhrchen hergestellt, da die Ansatzmengen mit ca. 5 g relativ klein sind. Die Energie, die für die Dispergierung notwendig ist, wird mittels der Hielscher Ultraschallsonotrode eingebracht. Hierzu wird die Mikrospritze S3 verwendet. Die Amplitude beträgt 100 % und Cycle wird auf 1 gesetzt. Auf Grund der starken Wärmeentwicklung, werden die Emulsionen während des Beschallens mit Hilfe von Eiswasser gekühlt.

Zunächst werden Silikonöl und Emulgator vorgelegt (Sartorius Excellence). Bei dickflüssigen Silikontensiden, wie BY 11-030 erfolgt zunächst eine Dispergierung des Emulgators im Silikonöl. Dazu wird ca. 10 Sekunden beschallt.

Zu dieser Mischung wird die erste Hälfte des Rizinusöls zugefügt. Es wird 1 Minute beschallt. Dann wird die zweite Hälfte Rizinusöl zugefügt und erneut 1 Minute geschallt. Die Emulsion wird dann geschüttelt und erneut 30 Sekunden beschallt.

3.3.4.3 Herstellung von O/O-Emulsionen mittels Spritze-zu-Spritze-Verfahren

Die einzelnen Bestandteile der Emulsion werden unter Verwendung eines Luer Lock-Adapters w/w in eine 5 mL-Spritze gewogen (Sartorius Extend). Anschließend wird eine zweite 5 ml-Spritze mit dem Luer Lock-Adapter w/w fest verbunden. Die Bestandteile werden durch Hin-und-Her-Bewegen der Spritzenstempel emulgiert. Dies wird genau 70-mal gemacht.

3.4 Methoden

3.4.1 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid

3.4.1.1 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in Akzeptormedien

Ein 100 mL-Messkolben wird mit einem deutlichen Überschuss an Nonivamid befüllt (Mettler Toledo XP 205 Delta Range). Dann werden ca. 50 mL des zu untersuchenden Mediums hinzugegeben. Der Kolben wird in den Schüttler KL 2 eingespannt und der Messkolben 1 Woche geschüttelt. Im Anschluss wird die Suspension bei 5300 U/min in der Labofuge 200 so lange zentrifugiert, bis der Überstand klar ist, mindestens jedoch 2 Stunden.

Der klare Überstand wird dann über einen Spritzenvorsatzfilter (Celluloseacetat 0,2 µm Porengröße) filtriert, wobei 40 mL Vorlauf verworfen werden. Die gelöste Nonivamidmenge im Filtrat wird mittels HPLC-UV-Analyse bestimmt (siehe Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12: HPLC-UV-Methode für die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid.

HPLC-Parameter	Wert
Fließmittel	Methanol/Phosphorsäure pH 3,0 (59,5/40,5)
Fluss	1,125 mL/min
Injektionsvolumen	40 µL
Detektionswellenlänge	230 nm
Retentionszeit	3,7 min

3.4.1.2 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in nichtwässrigen Medien

Ein 50 mL-Messkolben wird mit einem deutlichen Überschuss an Nonivamid befüllt. Dann werden ca. 10 mL des zu untersuchenden Mediums hinzugegeben. Der Kolben wird in den Schüttler KL 2 eingespannt und der Messkolben 1 Woche geschüttelt. Im Anschluss wird diese Suspension bei 5300 U/min in der Labofuge 200 so lange zentrifugiert bis der Überstand klar ist, mindestens jedoch 2 Stunden.

Bei methanolmischbaren Medien wird 1,0 mL Überstand mit Methanol auf 10,0 mL aufgefüllt. Diese Lösung kann dann per HPLC-UV analysiert werden (siehe Tabelle 3-12).

Bei Medien, die nicht mit Methanol mischbar sind, werden 1,0 mL Überstand mit 10,0 mL Methanol ausgeschüttelt. Dazu werden die 15-mL-Zentrifugengläser 5 Minuten intensiv mit dem Vortexer geschüttelt und anschließend bei 5300 U/min in der Labofuge 200 so lange

zentrifugiert bis der Überstand klar ist, mindestens jedoch 2 Stunden. Im Anschluss wird der klare Überstand mittels HPLC-UV analysiert (siehe Tabelle 3-12).

3.4.2 Untersuchung der Mischbarkeit von Silikonölen mit flüssigen Lipiden

Es werden jeweils 5 mL Silikonöl mit 5 mL flüssigem Lipid versetzt und kräftig geschüttelt. Anschließend wird das System visuell beurteilt: Sind 2 Phasen zu erkennen oder ist das System nicht klar, wird dies als Mischungslücke gewertet. Klare Systeme ohne erkennbare Phasentrennung werden als vollständig mischbar interpretiert.

3.4.3 Untersuchung der Emulgierfähigkeit verschiedener Silikontenside

3.4.3.1 Qualitative Untersuchung der Phasenlage und Lagerstabilität von O/O-Emulsionen

Die Herstellung der Emulsionen erfolgt mittels Ultraschallsonotrode gemäß 3.3.4.2. Anschließend werden die Emulsionen bei 40 °C 14 Tage eingelagert.

Zur Bestimmung der Phasenlage wird das Rizinusöl vor der Herstellung der Emulsionen mit 0,1 % Sudan III versetzt, da dieses bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung mittels CY 3 angeregt werden kann.

Bei diesem Emulgatorscreening wird die Fähigkeit der Emulgatoren zur Stabilisierung von RiO/SiO-Emulsion bei einer festen Emulgatordispersionskonzentration untersucht (siehe Tabelle 3-13). Damit wird der Tatsache Rechnung getragen, dass die Emulgatorkonzentration im Rahmen einer sinnvollen Rezeptentwicklung nicht beliebig gesteigert werden kann; bei einer 10 %igen Dispersion und einer geforderten Emulgator-Konzentration von 5 % würde die Emulsion sonst zu 50 % aus Dispersion bestehen. Folgende Formulierung wurde deshalb für das Stabilitätsscreening verwendet:

Tabelle 3-13: Zusammensetzung der Formulierungen für die qualitative Untersuchung der Phasenlage und Lagerstabilität.

Komponente	Masse
Emulgator	0,250 g
Silikonöl	2,375 g
Rizinusöl	2,375 g

3.4.3.2 Bestimmung von Tröpfchengrößen in O/O-Emulsionen

Die Bestimmung der Tröpfchengrößen erfolgt mit Hilfe des Carl Zeiss AxioImager.Z1 in Kombination mit dem Zusatzmodul ApoTome.

Bei der Herstellung der O/O-Emulsionen wird der Rizinusölphase 0,1 % Sudan III zugefügt, das im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine sehr gute Aufteilung in die fluoreszierende, weiße innere Phase und die nicht fluoreszierende, schwarze äußere Phase ermöglicht. Dadurch ist es möglich, das automatische Messprogramm von AxioVision 4.6.3 zu nutzen. Um störende Einflüsse durch Tröpfchen, die kurz über- bzw. unterhalb der Fokusebene liegen, auszuschließen, wird ein sog. optischer Schnitt mit Hilfe des ApoTomes durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden 3 Aufnahmen gemacht, wobei ein optisches Gitter bei jeder Aufnahme in eine andere Position geschoben wird. Das Programm AxioVision 4.6.3 verrechnet diese 3 Aufnahmen zu einem Bild, in dem lediglich die Fokusebene sichtbar ist.

Um die Vermessung von Agglomeraten zu vermeiden, ist es notwendig die Proben derart zu verdünnen, dass in der mikroskopischen Aufnahme einzelne Tröpfchen zu erkennen sind. Dazu werden einige Tropfen Probe in ein Mikrozentrifugenröhrchen mit der kontinuierlichen Phase auf 1,5 mL aufgefüllt und 2 Minuten bei 2000 U/min geschüttelt (IKA VXR basic Vibrax).

Die Größenbestimmung erfolgt mit Hilfe der Software AxioVision 4.6.3 und des erstellten Messprogramms. Die verwendeten Programmparameter sind im Anhang in Tabelle 8-1 aufgelistet (siehe 8.1).

Die generierten Datentabellen werden in Microsoft Excel 2007 importiert. Die Daten aus 4 Einzelbestimmungen werden gepoolt und gemeinsam ausgewertet. Die Beurteilung der Tröpfchengrößenverteilung erfolgt an Hand der Dezile D10, D50 und D90.

3.4.3.3 Quantitative Untersuchung der Lagerstabilität von O/O-Emulsionen

Die Herstellung erfolgt unter Verwendung der Ultraschallsonotrode, wie unter 3.3.4.2 beschrieben. Jede Rezeptur wird vierfach hergestellt und untersucht. Dabei werden folgende Rezepturen untersucht:

Tabelle 3-14: Rezeptur der auf Stabilität untersuchten O/O-Emulsionen; Emulgatoren: BY 11-030 und DC 5225c; Silikonöle: PDMS 20 und CPS; Rizinusöl enthält 0,1 % Sudan III

	0,5 % Emulgator		2,5 % Emulgator		5,0 % Emulgator	
	BY 11-030	DC 5225c	BY 11-030	DC 5225c	BY 11-030	DC 5225c
BY 11-030	0,050 g	–	0,250 g	–	0,500 g	–
DC 5225c	–	0,250 g	–	1,250 g	–	2,50 g
Silikonöl	2,463 g	2,263 g	2,313 g	1,313 g	2,125 g	0,125 g
Rizinusöl	2,487 g	2,487 g	2,437 g	2,437 g	2,375 g	2,375 g

Die Stabilitätsuntersuchung erfolgt über einen Zeitraum von 28 Tagen. In dieser Zeit werden die Proben bei 40 °C eingelagert. Die Untersuchungen erfolgen am Herstellungstag und nach 28 Tagen.

Die Bestimmung der Tröpfchengrößen erfolgt wie unter 3.4.3.2 beschrieben.

3.4.4 Bestimmung der Viskosität verschiedener Akzeptormedien

Die dynamische Viskosität der verwendeten Akzeptormedien wird aus der kinematischen Viskosität und der Dichte der Flüssigkeiten berechnet (Gleichung 3-2).

$$\eta = \nu \cdot k \cdot t$$

Gleichung 3-2

η = dynamische Viskosität

ν = kinematische Viskosität

k = Kapillarkonstante

t = Zeit

3.4.4.1 Bestimmung der kinematischen Viskosität verschiedener Akzeptormedien

Die Bestimmung der kinematischen Viskosität erfolgt gemäß der Monographie „2.2.9 Kapillarviskosimetrie“ des Ph. Eur. 7.1(EDQM 2012) und mit Hilfe eines Kapillarviskosimeters nach Ubbelohde (Kapillarkonstante $k = 0,00256 \text{ m}^2/\text{s}^2$). Die Untersuchungstemperatur beträgt 32 °C, da dies den Freisetzungsbedingungen entspricht.

3.4.4.2 Bestimmung der Dichte verschiedener Akzeptormedien

Die Dichtebestimmung wird mit dem Biegeschwinger-Dichtemessgerät DMA 4500 durchgeführt. Die Temperierung des Gerätes wird auf 32 °C eingestellt, da dies der Temperatur der Freisetzungsuntersuchungen entspricht.

3.4.5 In vitro Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen mit Hilfe von Franz-Diffusionszellen

Die in vitro Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen erfolgen unter Verwendung von Franz-Diffusionszellen. Das Wasserbad wird auf 32 °C temperiert. Der Mehrstellenmagnet-rührer wird auf 500 U/min eingestellt. Akzeptor- und Donorkompartimente werden an den Konnektionsstellen mit Glisseal HV eingefettet. Ein Magnetrührstäbchen wird in das Akzeptorkompartiment gelegt. Das Akzeptorkompartiment wird dann fast vollständig mit Akzeptormedium gefüllt. Nachdem die Membran bzw. Haut zentral auf das Akzeptorkompartiment aufgelegt ist, werden beide Kompartimente verbunden und der Zusammenhalt mit Hilfe einer Metallklammer sichergestellt. Anschließend wird Akzeptormedium über den Probenentnahmestutzen luftblasenfrei bis kurz unter den Kalibrierstrich aufgefüllt. Dazu muss die Franz-Diffusionszelle schräg gehalten werden. Bevor das Akzeptormedium vollständig aufgefüllt wird, werden die Franz-Diffusionszellen mit Hilfe eines entsprechenden Gestells für 30 min in das Wasserbad gestellt, um die Haut zu rehydratisieren und das Akzeptormedium auf 32 °C zu temperieren. Im Anschluss wird das Akzeptormedium exakt auf den Kalibrierstrich eingestellt.

Das weitere Vorgehen unterscheidet sich für Freisetzungsuntersuchungen und Permeationsuntersuchungen.

3.4.5.1 In vitro Freisetzungsuntersuchungen

Es werden min. 0,4 g O/O-Emulsion bzw. min. 0,6 g HNC (Sartorius Extend) pro Franz-Diffusionszelle auf die Membran aufgebracht. Die HNC wird mit Hilfe eines Wattestäbchens gleichmäßig und luftblasenfrei auf der Membran verteilt. Die Donorkompartimente werden mit Parafilm verschlossen. Die Probenentnahme erfolgt zu festgelegten Zeitpunkten. Es werden jeweils 100 µL Probe mit Hilfe einer 1 mL-Spritze entnommen und per HPLC-UV analysiert (Tabelle 3-15). Entnommenes Akzeptormedium wird durch frisches Akzeptormedium ersetzt. Aus den bestimmten Arzneistoffkonzentrationen werden kumulativ freigesetzte Arzneistoffmengen berechnet und gemäß der Higuchi-Gleichung ausgewertet (Higuchi 1961).

Tabelle 3-15: HPLC-UV-Methode für in vitro Freisetzungsuntersuchungen

HPLC-Parameter	Wert
Fließmittel	Methanol/Phosphorsäure pH 3,0 (59,5/40,5)
Fluss	1,125 mL/min
Injektionsvolumen	40 µL
Detektionswellenlänge	230 nm
Retentionszeit	3,7 min

3.4.5.2 In vitro Permeationsuntersuchungen

Für Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosierung werden min. 0,4 g O/O-Emulsion bzw. min. 0,6 g HNC (Sartorius Extend) pro Zelle auf die Haut aufgebracht. Die HNC wird mit Hilfe eines Wattestäbchens gleichmäßig und luftblasenfrei auf der Haut verteilt. Die Donorkompartimente werden mit Parafilm verschlossen.

Für Permeationsuntersuchungen mit finiter Dosierung werden ca. 2 mg Formulierung pro cm² Haut, d. h. insgesamt ca. 4 mg aufgetragen. Dazu wird ein Polycarbonatzylinder gewogen (Mettler Toledo XP 205 Delta Range), mit Hilfe eines Wattestäbchens mit ca. 8,0 mg Formulierung bestrichen und die Formulierung mittels des Polycarbonatzylinders auf die Haut aufgetragen. Der Polycarbonatzylinder wird anschließend erneut gewogen. Die Massendifferenz entspricht dann der aufgetragenen Formulierungsmenge.

Die Probenentnahme erfolgt zu festgelegten Zeitpunkten. Es werden jeweils 600 µL Probe mit Hilfe einer 1 mL-Spritze entnommen und per HPLC-UV analysiert (Tabelle 3-16). Entnommenes Akzeptormedium wird durch frisches Akzeptormedium ersetzt. Aus den bestimmten Arzneistoffkonzentrationen werden kumulativ permeierte Arzneistoffmengen berechnet und gemäß des 1. Fick'schen Gesetzes ausgewertet.

Tabelle 3-16: HPLC-UV-Methode für in vitro Permeationsuntersuchungen

HPLC-Parameter	Wert
Fließmittel	Methanol/Phosphorsäure pH 3,0 (50/50)
Fluss	1,150 mL/min
Injektionsvolumen	200 µL
Detektionswellenlänge	230 nm
Retentionszeit	10 min

3.4.5.3 Akzeptormedien

Um Phosphatpuffer pH 7,4 (PB) herzustellen, werden 6,00 g Natriumhydrogenphosphat-dodecahydrat und 0,19 g Kaliumdihydrogenphosphat (Sartorius Extend) in 1,0 L entionisiertem Wasser gelöst. Die entstandene Lösung wird mit Phosphorsäure 10 % auf pH 7,4 eingestellt.

Ethanolischer Phosphatpuffer 10 % (PBE) wird durch Mischen von 100 mL Ethanol HPLC Gradient Grade und 900 mL PB hergestellt.

Macrogol 600-haltiger Phosphatpuffer (PBP) wird durch Mischen von 200 mL Macrogol 600 und 1000 mL PB hergestellt.

Ethanolischer Phosphatpuffer 50 % (PBE50) wird durch Mischen von 500 mL Ethanol HPLC Gradient Grade und 500 mL PB hergestellt.

Alle Akzeptormedien werden in Braunglasflaschen bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Sie werden vor der Verwendung im Ultraschallbad 5 Minuten entgast.

3.4.5.4 Hautpräparation

Die verwendeten Schweineohren wurden von der Abteilung „Experimentelle Medizin“ des Universitätsklinikums Tübingen bereitgestellt und stammen von Schweinen der „Deutschen Landrasse“, einer Hausschweinart. Die Ohren wurden direkt nach der Operation bei 4 °C für maximal 72 h gelagert.

Für die Gewinnung der Schweineohrhaut werden die Ohren zunächst mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen und anschließend trockengetupft. Mit Hilfe eines Skalpells wird die Schweineohrhaut von der Ohrmuschel herunter präpariert und anschließend in Alufolie verpackt bei -30 °C für maximal 3 Monate gelagert. Vor der Verwendung wird die Haut aufgetaut.

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden Vollhaut und Spalthaut verschiedene Hautpräparationen verwendet.

Wird Vollhaut für die Permeationsuntersuchungen verwendet, muss das subkutane Fettgewebe mit Hilfe eines Skalpells gründlich entfernt werden. Im Anschluss werden mit Hilfe eines Lochsaisens 25 mm große Hautscheiben, die in die Franz-Diffusionszelle eingespannt werden,

ausgestanzt. Für die Herstellung dieser Hautstanzen wird ausschließlich der unverletzte und untätowierte Teil der Haut verwendet.

Für die Herstellung von Spalthaut wird die Haut mittels eines Skalpellens zunächst in Streifen geschnitten und dann auf einen Styroporblock gespannt. Die Breite des Blocks beträgt mindestens 25 mm. Die Haut wird dabei seitlich so am Block mit Stecknadeln fixiert, dass diese nicht beim anschließenden Dermatomisieren stören. Dazu wird das Dermatom auf 1 mm eingestellt und über die Haut geführt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Klinge einen ca. 30 °-Winkel zur Haut einnimmt. Im Anschluss werden mit Hilfe eines Locheisens 25 mm große Spalthautscheiben, die in die Franz-Diffusionszelle eingespannt werden, ausgestanzt. Für die Herstellung dieser Hautstanzen wird ausschließlich der unverletzte und untätowierte Teil der Haut verwendet.

3.4.6 Prüfung auf Wasserfestigkeit

Für die Prüfung auf Wasserfestigkeit werden mit Hilfe eines Locheisens 25 mm große Hautscheiben aus Vollhaut hergestellt. Die Hautstanzen werden gewogen (Mettler Toledo XP 205 Delta Range) und anschließend werden die zu untersuchenden Formulierungen auf die Hautstanzen aufgetragen und eingerieben. Die Hautstanzen werden erneut gewogen (Mettler Toledo XP 205 Delta Range) um die Masse an aufgetragener Formulierung zu bestimmen. Eine realistische, praxisorientierte Auftragsmenge beträgt 8 bis 15 mg.

Die Wasserfestigkeit wird dann mit einer Freisetzungsvorrichtung, die der Apparatur 2 der Monographie 2.9.3 des Europäischen Arzneibuchs entspricht, bestimmt (EDQM 2012). Die Behälter werden mit 100 mL Wasser gefüllt und auf 32 °C temperiert. Die vorbereiteten Hautstanzen werden so in die Gefäße gelegt, dass die mit Formulierung behandelte Seite zum Blattrührer zeigt. Die Hautstanzen verbleiben für 20 Minuten in der Freisetzungsvorrichtung und werden dann entnommen. Die Freisetzungslösung wird unter Verwendung eines Spritzenvorsatzfilters filtriert (45 mL Vorlauf) und das Filtrat per HPLC-UV analysiert (Tabelle 3-17).

Tabelle 3-17: HPLC-UV-Methode für Prüfung auf Wasserfestigkeit.

HPLC-Parameter	Wert
Fließmittel	Methanol/Phosphorsäure pH 3,0 (50/50)
Fluss	1,150 mL/min
Injektionsvolumen	200 µL
Detektionswellenlänge	230 nm
Retentionszeit	10 min

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Mischbarkeit von Silikonölen mit flüssigen Lipiden

Emulsionen bestehen im Wesentlichen aus zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten. Eine dieser Flüssigkeiten bildet die innere, disperse Phase und ist tröpfchenförmig in der äußeren, kohärenten Phase verteilt (Kutz et al. 2011). Die Entwicklung eines derartigen dispersen Systems war das Ziel dieser Dissertation; im Gegensatz zu konventionellen pharmazeutischen und kosmetischen Emulsionen sollte diese jedoch wasserfrei sein und ein Silikonöl die kohärente Phase bilden. Zur Herstellung solcher Emulsionen wurden flüssige Lipide als disperse Phase gesucht, die im angestrebten Phasenvolumenverhältnis (PVV) 0,5 mit den Silikonölen CPS und PDMS 20 eine Mischungslücke ausbilden, d. h. nicht mischbar sind. Ein PVV von 0,5 wurde angestrebt, um ausreichend Arzneistoff in der inneren Phase lösen zu können. Die Identifizierung solcher Flüssigkeiten erfolgte durch Mischungsversuche und anschließende visuelle Beurteilung des Systems. Die untersuchten Flüssigkeiten sind von unterschiedlicher chemischer Natur: Es handelt sich um fette Öle, flüssige Wachse sowie Paraffinöle. Als Silikonöle wurden PDMS 20 sowie CPS verwendet.

Tabelle 4-1: Ergebnisse der Mischbarkeitsuntersuchung von CPS und PDMS 20 mit flüssigen Lipiden. + = vollständig mischbar; – = Mischungslücke

Substanz	CPS	PDMS 20	Substanz	CPS	PDMS 20
Di-n-butyladipat	+	+	Octylstearat	+	+
PEG-7-Glycerylmonococoat	–	–	Isopropylpalmitat	+	+
Oleylerucat	+	–	Leinöl	+	–
Coco-Caprylat/Caprat	+	–	Mandelöl	+	–
Dicaprylyl-Ether	+	+	Capryl-Caprinsäure-Triglyceride	+	–
Diethylhexylcyclohexan	+	+	Capryl-Caprin-Linolsäure-Triglyceride	+	–
Cetearylisononanoat	+	+	Olivenöl	+	–
Decyloleat	+	–	Dünflüssiges Paraffin	+	+
2-Octyldodecanol	+	–	Rapsöl	+	–
Isooctyllaurat/-myristat	+	+	Rizinusöl	–	–
Isopropylmyristat	+	+			

Wie Tabelle 4-1 zeigt, sind fast alle untersuchten Lipide im untersuchten PVV mit CPS vollständig mischbar. PDMS 20 zeigt hingegen eine Mischungslücke mit einer ganzen Reihe von Lipiden. Somit weisen lediglich Rizinusöl sowie PEG-7-Glycerylmonococoat im untersuchten Mischungsverhältnis mit beiden Silikonölen eine Mischungslücke auf. Beide Lipide unterscheiden sich von den anderen untersuchten Substanzen durch polare Strukturen wie Hydroxyfettsäuren bzw. Polyethylenglykolketten, die für das Vorhandensein der Mischungslücke verantwortlich sein dürften.

CPS und PDMS 20 bestehen aus permethylierten Siloxaneinheiten, unterscheiden sich jedoch in der Anzahl der Siloxaneinheiten, die das Grundgerüst der Substanzen bilden. CPS ist eine cyclische Struktur, die aus lediglich 5 Siloxaneinheiten besteht. PDMS 20 weist hingegen ein kettenförmiges Rückgrat aus vielen Siloxaneinheiten auf (Abbildung 2-8). Da mit steigender Anzahl an Siloxaneinheiten die Lipophobie steigt, ist PDMS 20 mit deutlich weniger untersuchten Substanzen mischbar als CPS.

Da ausschließlich PEG-7-Glycerylmonococoat und Rizinusöl eine Mischungslücke beim untersuchten PVV zeigten, kamen diese grundsätzlich auch für weiterführende Untersuchungen in Betracht. Rizinusöl wird wegen seiner guten Haut- und Schleimhautverträglichkeit z. B. auch in Augentropfen und Injektionen verwendet. Außerdem zeigt es ein gutes Lösungsvermögen für viele Arzneistoffe (vergleiche 2.4). Auf Grund dieser Eigenschaften und der leichten Bezugsmöglichkeiten wurde Rizinusöl als vielversprechende Ölphase für die zukünftigen Emulsionen gewählt und PEG-7-Glycerylmonococoat nicht weiter untersucht.

4.2 Untersuchung der Emulgierfähigkeit verschiedener Silikontenside

4.2.1 Qualitative Untersuchung der Phasenlage und Lagerstabilität von O/O-Emulsionen

Nach Auswahl einer geeigneten dispersen Ölphase wurde ein Emulgator gesucht, der die gewünschte Phasenlage, Rizinusöl-in-Silikonöl (RiO/SiO), beim PVV von 0,5 stabilisiert. Zur Auswahl standen verschiedene amphiphile Silikonverbindungen, sogenannte Silikontenside. Die Phasenlage der Emulsionen wurde direkt nach der Herstellung sowie nach 14-tägiger Lagerung bei 40 °C makroskopisch sowie fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Tabelle 4-2: Bestimmung der ausgebildeten Phasenlage und Lagerstabilität nach Herstellung und 14-tägiger Lagerung bei 40 °C. PVV = 0,5. – = keine Emulsionsbildung

	CPS		PDMS 20	
	Phasenlage	lagerstabil	Phasenlage	lagerstabil
DC 5225c	RiO/SiO	ja	RiO/SiO	ja
DC 2502	–	–	–	–
DC 5200	SiO/RiO	nein	SiO/RiO	nein
DC 190	SiO/RiO	nein	–	nein
DC 9011	RiO/SiO	nein	RiO/SiO	ja
Emulsifier 10	–	–	–	–
BY 11-030	RiO/SiO	ja	RiO/SiO	ja

Tabelle 4-2 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung zur ausgebildeten Phasenlage und Lagerstabilität. Von den untersuchten Emulgatoren ermöglichen ausschließlich DC 5225c und BY 11-030 sowohl mit CPS, als auch mit PDMS 20 die Herstellung von RiO/SiO-Emulsionen, die über den Zeitraum von 14 Tagen stabil sind.

4.2.2 Quantitative Untersuchung der Lagerstabilität von O/O-Emulsionen

Nach Auswahl der Ölphase und geeigneter Emulgatoren wurden Emulsionen mit einem PVV von 0,5 und einem Emulgatoranteil zwischen 0,5 % und 5,0 % hergestellt und deren Stabilität über einen Zeitraum von 28 Tagen bei 40 °C untersucht. Dazu wurden die Tröpfchengrößen fluoreszenzmikroskopisch am Herstellungstag sowie nach 28 Tagen Lagerung bestimmt; diese sind in Abbildung 4-1 gezeigt.

Am Herstellungstag zeigen sich noch keine Unterschiede zwischen den verwendeten Silikonölen und Emulgatoren. Bei gleichem Emulgatorgehalt weisen alle Emulsionen vergleichbare Tröpfchengrößen auf. Allerdings ist eine Abhängigkeit der Tröpfchengröße vom Emulgatorgehalt erkennbar: Die Tröpfchen sind bei Verwendung von 0,5 % Emulgator mit Abstand am größten. Ab einem Emulgatorgehalt von 2,5 % zeigen alle Tröpfchengrößenverteilungen einen Median von ca. 1 µm.

Nach 28 Tagen Lagerung bei 40 °C ergibt sich ein differenzierteres Bild: Emulsionen mit PDMS 20 weisen nach 4-wöchiger Lagerung kleinere Tröpfchen als jene mit CPS auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass alle CPS-haltigen Emulsionen während der Lagerung eine deutliche Zunahme der Tröpfchengröße erfahren, während PDMS-haltige Emulsionen deutlich stabiler sind.

Innerhalb der Gruppe der PDMS-haltigen Emulsionen ist die Überlegenheit von BY 11-030 gegenüber DC 5225c zu erkennen. Während BY 11-030-haltige Emulsionen nach 28 Tagen Lagerung die gleichen Tröpfchengrößenverteilungen wie am Herstellungstag aufweisen, zeigen DC 5225c-haltige Emulsionen während der Lagerung ein Tröpfchengrößenwachstum (außer bei 5,0 % DC 5225c).

Der Emulgatorgehalt beeinflusst bei der Kombination von PDMS 20 und BY 11-030 maßgeblich die Tröpfchengröße: Bei 0,5 % BY 11-030 liegt der Median der Tröpfchengröße bei ca. 6 µm und bei Verwendung von 2,5 % BY 11-030 bereits bei ca. 1 µm - er lässt sich jedoch durch die Erhöhung auf 5,0 % BY 11-030 nicht mehr wesentlich reduzieren.

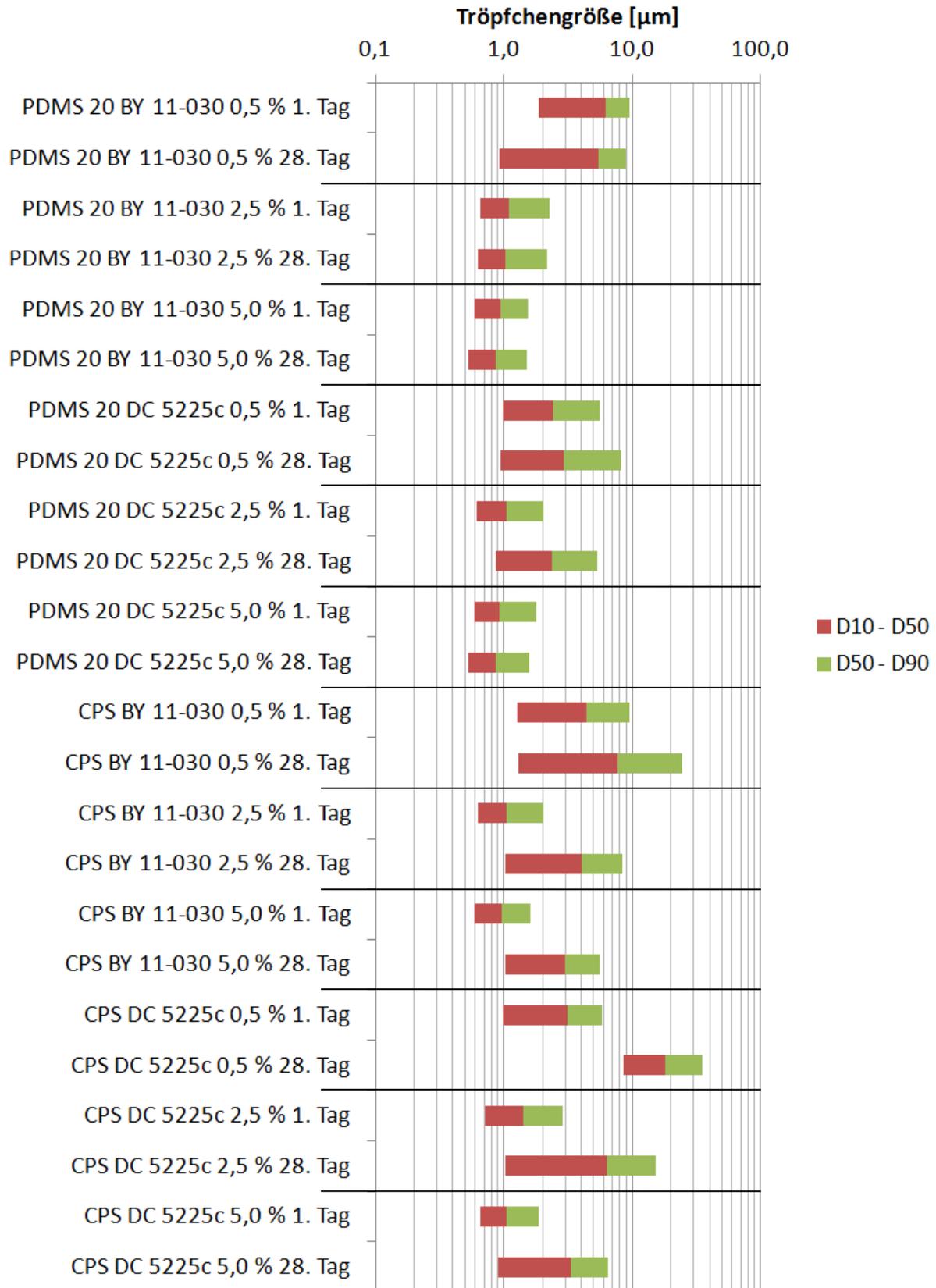


Abbildung 4-1: Untersuchung der Lagerstabilität von Emulsionen. Tröpfchengrößenentwicklung über einen Lagerzeitraum von 28 Tagen. Silikonöle = PDMS 20, CPS; Emulgatoren = BY 11-030, DC 5225c. (N = 4)

Emulsionen, die unter Verwendung von PDMS 20 und DC 5225c hergestellt wurden, profitieren ebenfalls von einer Erhöhung der Emulgatorkonzentration: 0,5 % Emulgator führt noch zu relativ großen Tröpfchen, deren Größe jedoch während der Lagerung vergleichsweise konstant bleibt ($\text{Median}_{1. \text{ Tag}} = 2,4 \mu\text{m}$; $\text{Median}_{28. \text{ Tag}} = 2,9 \mu\text{m}$). Bei Verwendung von 2,5 % Emulgator finden sich nach der Herstellung bereits kleinere Tröpfchen als bei 0,5 % ($\text{Median}_{\text{PDMS 20, 2,5 \% DC 5225c, 1. Tag}} = 1,0 \mu\text{m}$; $\text{Median}_{\text{PDMS 20, 0,5 \% DC 5225c, 1. Tag}} = 2,4 \mu\text{m}$), die Emulsionen sind jedoch nicht stabil und die Größe der Tröpfchen nimmt während der Lagerung zu ($\text{Median}_{\text{PDMS 20, 2,5 \% DC 5225c, 28. Tag}} = 2,36 \mu\text{m}$). Eine ausreichende Stabilisierung des Dispersitätsgrades findet erst ab einem Emulgatorgehalt von 5,0 % statt. Die Tröpfchengrößen bei PDMS 20 5,0 % DC 5225c und PDMS 20 BY 11-030 sind nach 4-wöchiger Lagerung vergleichbar und weisen einen Median von $0,86 \mu\text{m}$ auf.

Für die endgültige Auswahl des Emulgators sollte weiterhin beachtet werden, dass es sich bei den verwendeten Emulgatoren um Dispersionen handelt: BY 11-030 ist eine 50%-ige Dispersion, DC 5225c eine 10%-ige Dispersion. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Einwaagen so berechnet, dass der Anteil reinen Silikontensids jeweils den angegebenen Emulgatorgehalten entsprach. Das Dispersionsmittel, jeweils CPS, wurde der kohärenten Silikonölphase zugerechnet. Das bedeutet, dass eine Emulsion mit 5 % reinem Silikontensid zu 50 % aus DC 5225c-Dispersion und damit zu 45 % aus CPS bestand. Dies führt zu Einschränkungen bei der Wahl des Phasenvolumenverhältnisses und zu einem hohen Dispersionsverbrauch.

Die Kombination aus PDMS 20 und BY 11-030 ermöglichte in dieser Untersuchung die Herstellung stabiler Emulsionen mit kleinen Tröpfchengrößen bereits ab 2,5 % Emulgatorgehalt und wurde daher im Verlauf der Promotionsarbeit weiter untersucht. Sofern nichts anderes angegeben ist, bestehen O/O-Emulsionen immer aus BY 11-030, PDMS 20 und Rizinusöl.

4.3 Entwicklung eines in vitro Freisetzungssystems

Im Verlauf dieser Promotionsarbeit sollten Formulierungsparameter identifiziert werden, durch deren gezielte Veränderung das Freisetzungsverhalten der Öl-in-Öl-Emulsionen (O/O bzw. O/O-Emulsionen) gesteuert werden kann. Außerdem sollte das Freisetzungsverhalten dieser O/O-Emulsionen mit dem der Hydrophilen Nonivamid-Creme 1,0 % (HNC 1,0 %) verglichen werden. Es war daher notwendig, an die jeweiligen Formulierungen angepasste Freisetzungssysteme zu entwickeln. Aus diesem Grund wurde die Eignung verschiedener Akzeptormedien und Membranen untersucht.

Zunächst wurden potentielle Akzeptormedien hinsichtlich ihres Lösungsvermögens für Nonivamid (NVA) und ihrer Viskosität charakterisiert, da wie unter 2.2.3 beschrieben wurde, beide Faktoren einen Einfluss auf die Membranpermeabilität und damit die Freisetzungsgeschwindigkeit haben.

Neben dem FreisetzungsmEDIUM stellt die verwendete Membran einen kritischen Teil des Freisetzungssystems dar. Auf diese Membran wird die Formulierung aufgetragen. Sie dient außerdem dazu, die Formulierung vom Akzeptormedium zu trennen (Shah et al. 1999). Sie nimmt jedoch das Akzeptormedium in Poren auf und ermöglicht so die kontrollierte Verteilung des Arzneistoffs an der Grenzfläche Arzneiform-Membran (Zatz et al. 1998). Die Membran darf die Freisetzung dabei nicht derart behindern, dass die Diffusion durch die Membran zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Freisetzung wird, da sonst die Bestimmung der intrinsischen Freisetzungsrates unmöglich ist (Thakker et al. 2003). Um den Einfluss des Akzeptormediums und der Membran zu untersuchen, wurden Freisetzungsforschungen mit Hydrophiler Nonivamid-Creme 1,0 % (HNC 1,0 %) und der Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % durchgeführt.

4.3.1 Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in Akzeptormedien

Wie einleitend in Kapitel 4.3 beschrieben, muss die Löslichkeit des Arzneistoffs im Akzeptormedium ausreichend groß sein, um die intrinsische Freisetzungsrates messen zu können.

Um die Sättigungslöslichkeit zu bestimmen, wurden die Akzeptormedien mit einem Überschuss an Nonivamid versetzt und 1 Woche lang geschüttelt. Die Quantifizierung der NVA-Konzentration erfolgte per HPLC-UV-Analyse.

Es wurden in diesem Versuch 3 verschiedene Akzeptormedien untersucht: PB, PBE und PBP.

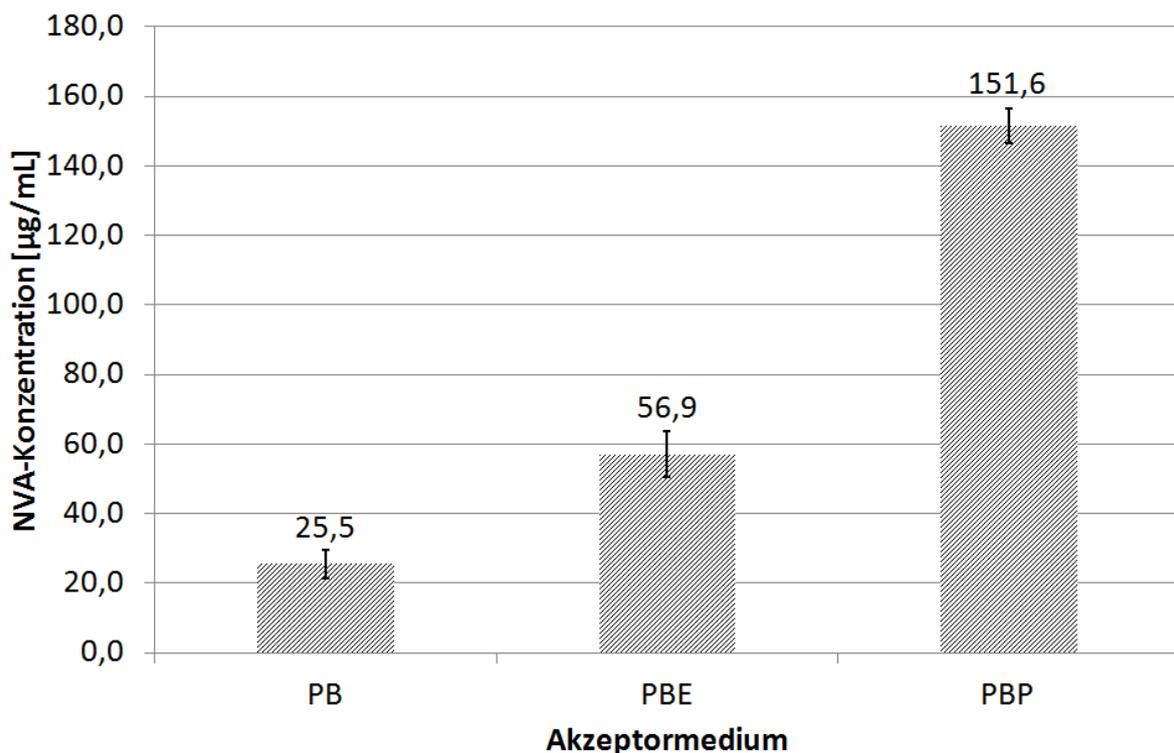


Abbildung 4-2: Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in verschiedenen Akzeptormedien. (N = 3; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Wie Abbildung 4-2 illustriert, weist NVA in den 3 Akzeptormedien deutlich unterschiedliche Löslichkeiten auf. NVA zeigt dabei in Phosphatpuffer pH 7,4 (PB) eindeutig die geringste Löslichkeit. Der Zusatz von 10 % Ethanol (PBE) steigert die Löslichkeit bereits um mehr als das Doppelte. Die höchste Löslichkeit für NVA zeigt jedoch Phosphatpuffer pH 7,4, welcher 16,67 % Macrogol 600 (PBP) enthält. Die Löslichkeit des lipophilen Nonivamids profitiert somit stark vom Zusatz dieser Co-Solventien.

Die vorliegenden Daten lassen erwarten, dass PBP die höchsten Freisetzungsraten zeigen wird, da die hohe NVA-Löslichkeit auf eine rasche Verteilung in das Akzeptormedium schließen lässt.

4.3.2 Viskosität verschiedener Akzeptormedien

In Kapitel 2.2.3 wurde einleitend dargelegt, dass eine hohe Viskosität des Akzeptormediums die Membranpermeabilität negativ beeinflusst. Um die Viskosität zu bestimmen, wurden die Akzeptormedien bei 32 °C in einem Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde sowie einem Biegeschwinger-Dichtemessgerät vermessen.

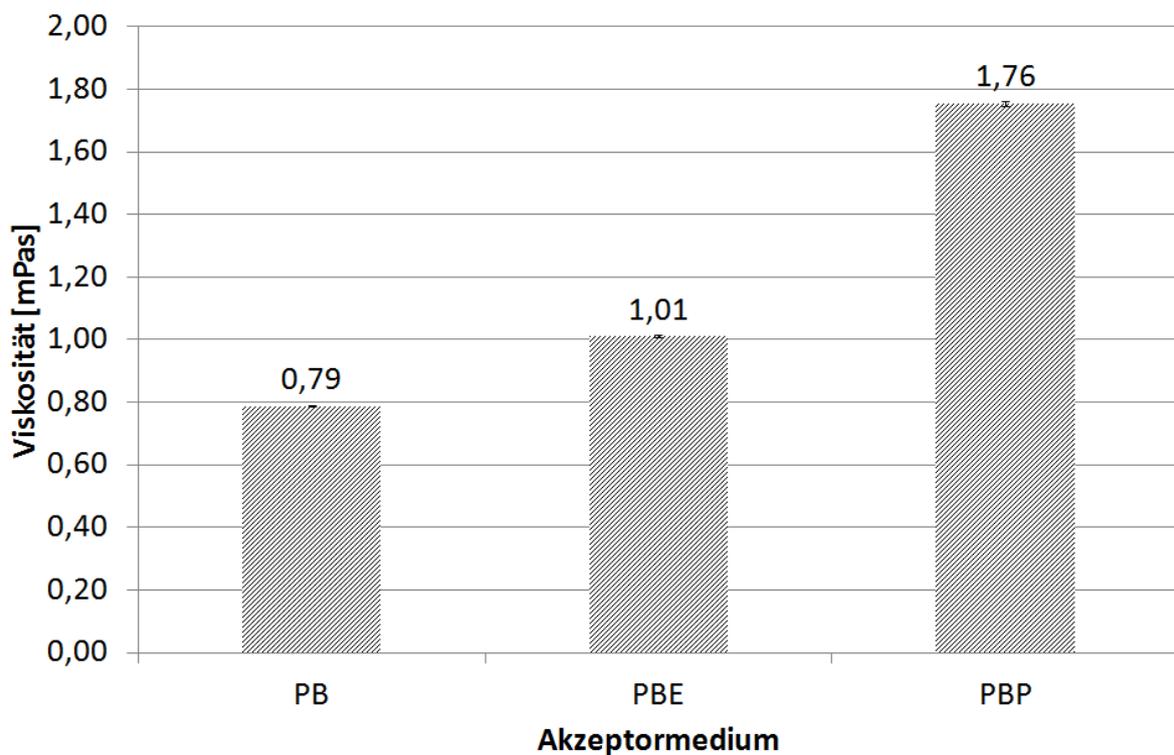


Abbildung 4-3: Viskosität wässriger Akzeptormedien. (N = 3; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-3 zeigt die Viskosität der untersuchten Akzeptormedien. PB zeigt die niedrigste Viskosität von 0,788 mPas. PBE liegt mit 1,011 mPas bereits fast 30 % darüber. PBP weist mit Abstand die höchste Viskosität auf. Sie ist mit 1,756 mPas mehr als doppelt so hoch wie die Viskosität von PB. Diese hohe Viskosität war zu erwarten, da Macrogol 600 makroskopisch als relativ hochviskos einzustufen ist.

Die Viskositätswerte lassen im Vergleich zu den ermittelten Sättigungslöslichkeiten für NVA eine umgekehrte Rangfolge der Freisetzungsgeschwindigkeiten erwarten.

Wie einleitend in 2.2.3 geschildert, gilt $P \sim VK/\eta$. Um den Einfluss der beiden Größen zu verrechnen, wurde daher der Quotienten aus den Mittelwerten der Nonivamid-Sättigungslöslichkeit von NVA und der Viskosität des jeweiligen Akzeptormediums berechnet. Abbildung 4-4 zeigt die sich daraus ergebende Rangfolge.

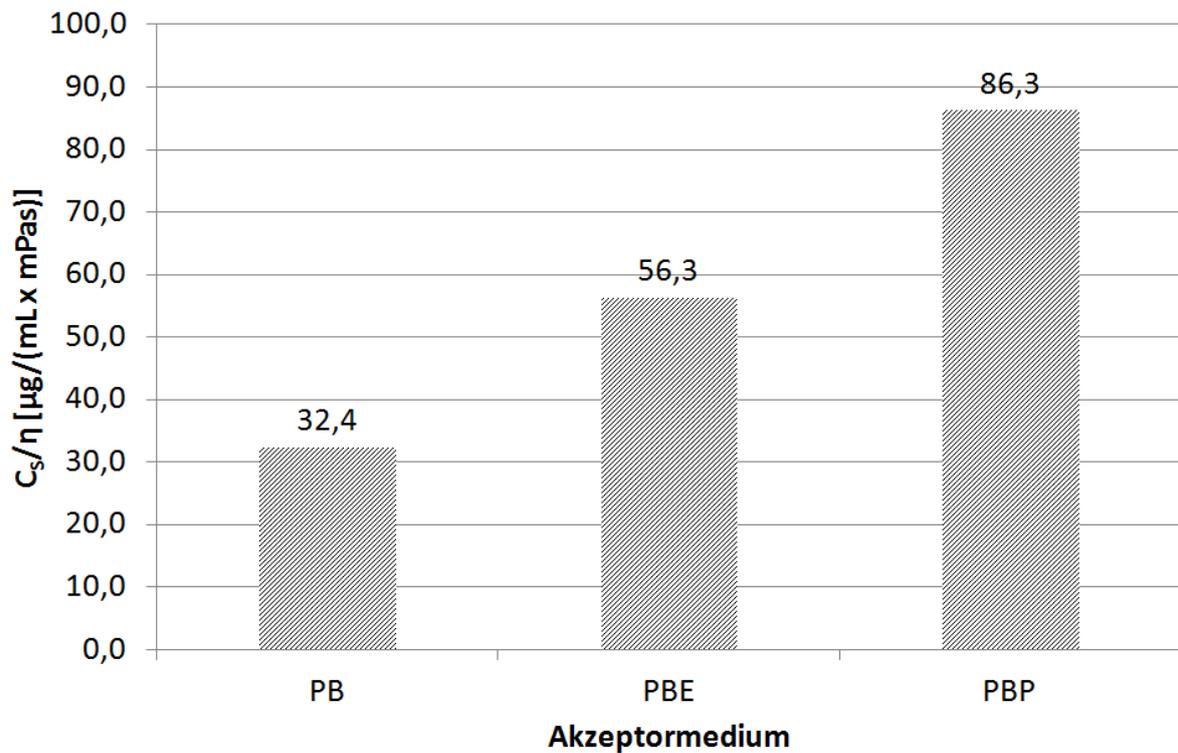


Abbildung 4-4: Vergleich der Quotienten aus Nonivamid-Sättigungslöslichkeit und Viskosität der Akzeptormedien.

Der für PBP berechnete Quotient liegt 50 % über dem für PBE berechneten und ist sogar 2,6 mal höher als der Quotient des PB. Es ist daher zu erwarten, dass PBP eindeutige Vorteile bei der Bestimmung der Freisetzungsraten haben wird und eine Messung der intrinsischen Freisetzung ermöglicht.

4.3.3 Einfluss der Membran und des Akzeptormediums auf die gemessene Freisetzungsgeschwindigkeit aus HNC 1,0 % und O/O 1,0 %

Um das optimale Freisetzungssystem zu finden, wurden Freisetzungsuntersuchungen mit Kombinationen möglicher Akzeptormedien und Membranen durchgeführt und die ermittelten Freisetzungsraten miteinander verglichen. Der Vergleich dieser Raten gibt Aufschluss über die Eignung eines Systems: Systeme, die niedrigere Freisetzungsraten als andere Systeme erbringen, sind als ungeeignet zu betrachten, da sie offensichtlich die Freisetzung beeinträchtigen.

Um zuverlässige Freisetzungsraten bestimmen zu können, muss dies in der Gleichgewichtsphase der Freisetzung erfolgen. Abbildung 4-5 illustriert die Phasen einer Freisetzung.

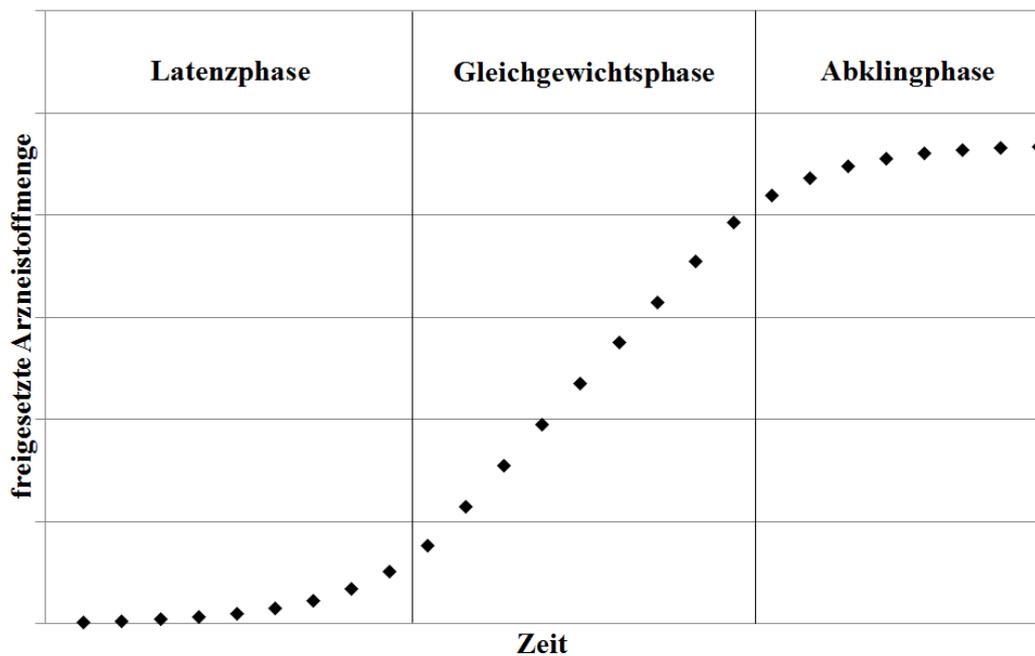


Abbildung 4-5: Exemplarische Darstellung eines Freisetzungsverlaufs.

Die Freisetzung beginnt mit einer Latenzphase, in der sich das Diffusionsgleichgewicht im Freisetzungssystem einstellt. Dieser Phase schließt sich die Gleichgewichtsphase an, in der die Freisetzung linear verläuft. Die Zeit bis zum Erreichen der Gleichgewichtsphase hängt von der Arzneiformulierung, der Membran und dem Akzeptormedium ab (Zatz et al. 1998). Sind mehr als 30 % Arzneistoff abgegeben worden, geht die Freisetzung in die Abklingphase über. Da nur in der Gleichgewichtsphase die intrinsische Freisetzungsgeschwindigkeit gemessen werden kann, ist es notwendig, die Latenzzeit für jede Kombination aus Arzneiformulierung und Freisetzungssystem vorab zu bestimmen.

4.3.3.1 Polyester- und Celluloseacetatmembranen

Polyester- und Celluloseacetatmembranen zeigen eine hohe Permeabilität für die Akzeptormedien. Dies ist besonders gut zu erkennen, wenn die Franz-Diffusionszellen ohne Arzneiform betrachtet werden. Innerhalb weniger Minuten dringt das Akzeptormedium durch die Membran in das Donorkompartiment ein. Beide Membrantypen sind folglich für die Freisetzungsuntersuchungen ungeeignet und wurden nicht weiter untersucht.

4.3.3.2 PTFE-Membranen

Im Rahmen der Promotionsarbeit standen PTFE-Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen zur Verfügung: PTFE-Membranen mit 0,2 μm bzw. 5,0 μm großen Poren (PTFE 0,2 μm bzw. PTFE 5,0 μm). Diese wurden mit den 3 Akzeptormedien PB, PBE und PBP kombiniert, um die Freisetzung aus O/O-Emulsionen (4,0 % Emulgator; $\Phi = 0,5$; 1,0 % NVA) zu untersuchen.

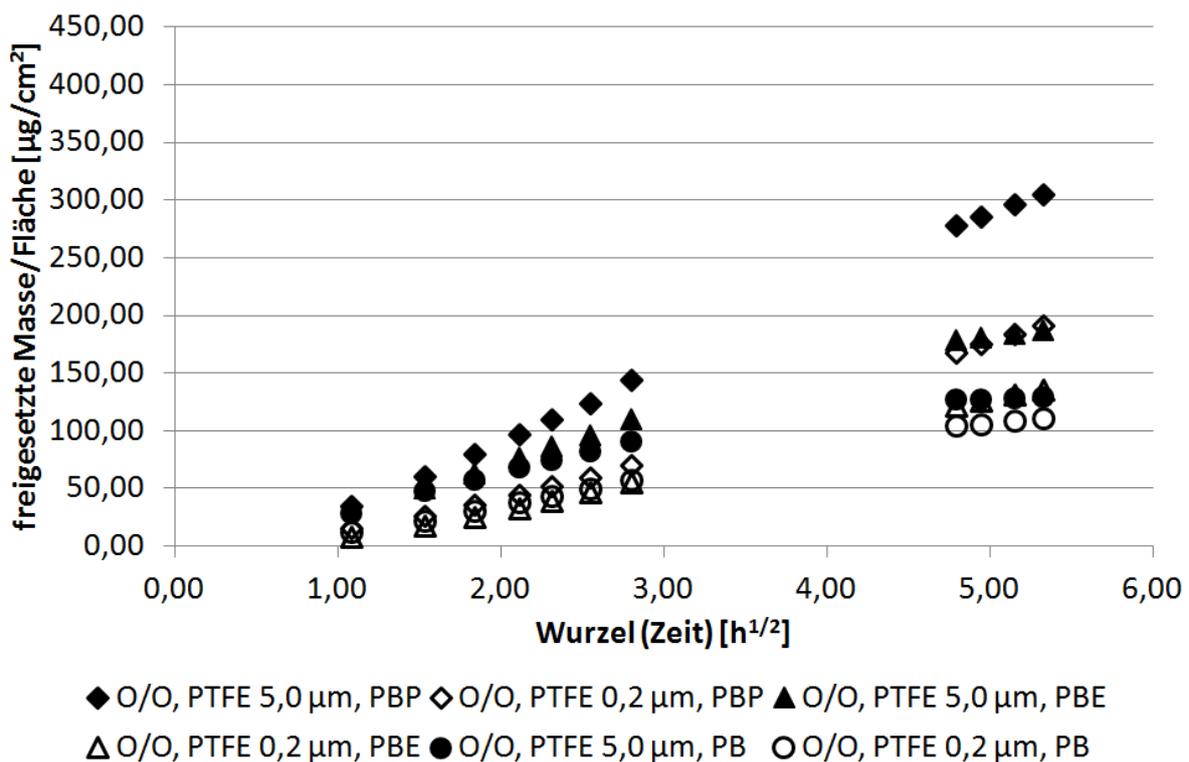


Abbildung 4-6: Messzeitpunkte für O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) bei Verwendung von PTFE 5,0 μm und PTFE 0,2 μm im Zeitraum 1h bis 28 h. Verwendete Akzeptormedien waren PB, PBE und PBP. (N = 1)

Abbildung 4-6 zeigt den Freisetzungsverlauf für die untersuchten Akzeptormedium-Membran-Kombinationen. Alle PTFE-Membranen zeigen sehr kurze Latenzzeiten, so dass bereits am ersten Messzeitpunkt nach ca. 1 Stunde die Freisetzung einer Wurzel-Zeit-Kinetik folgt. PBP zeigt diese Charakteristik bis zum letzten Messzeitpunkt des 2. Tages (ca. 28 h).

PB und PBE zeigen bereits am 2. Tag (ca. 23 h) den Übergang in eine Sättigung. In Anbetracht der ermittelten Sättigungslöslichkeiten für NVA (4.3.1) ist diese Sättigung auf die geringe Löslichkeit von NVA in PB und PBE zurückzuführen.

Die nachfolgende Bestimmung der Freisetzungsraten erfolgte auf Grund der vorliegenden Daten im Zeitraum zwischen 1,5 h und 8 h.

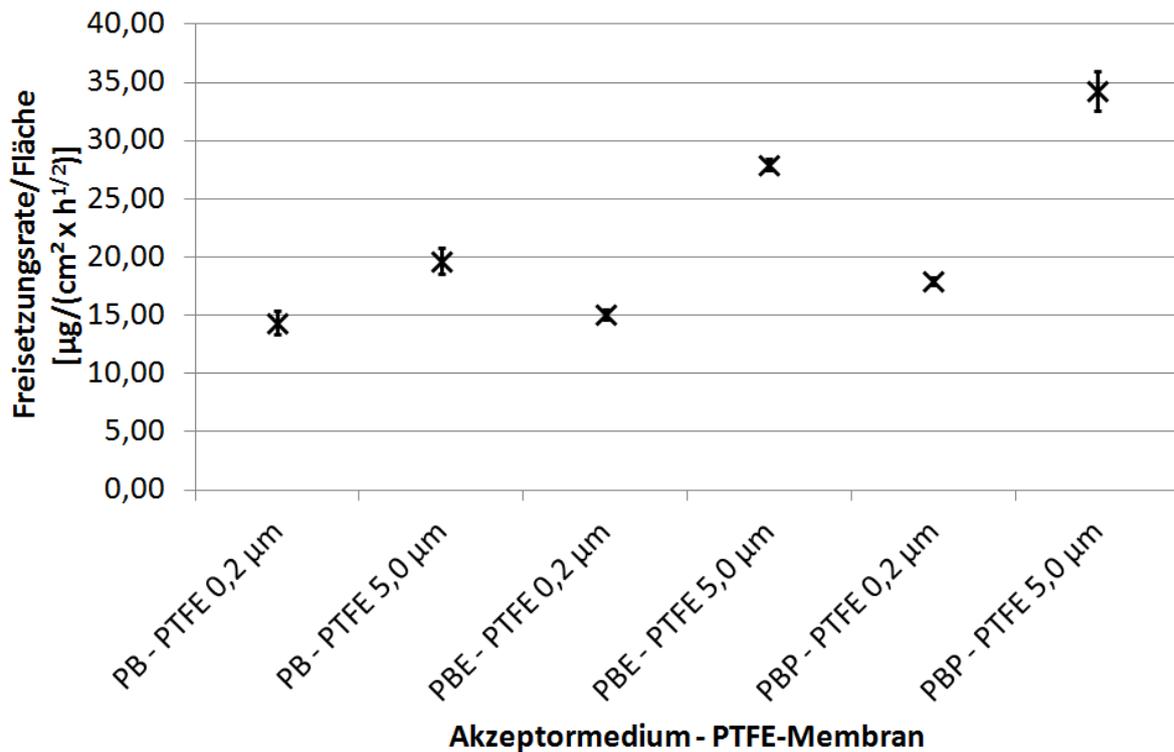


Abbildung 4-7: Freisetzungsraten für O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) bei Verwendung von PTFE 5,0 µm und PTFE 0,2 µm im Zeitraum 1,5 h bis 8 h. Verwendete Akzeptormedien waren PB, PBE und PBP. (N = 3; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-7 zeigt die Freisetzungsraten, die mit den verschiedenen Akzeptormedium-Membran-Kombinationen erhalten wurden. Bei Verwendung des gleichen Akzeptormediums erbringt die Verwendung von PTFE 5,0 µm stets größere Freisetzungsraten als PTFE 0,2 µm. Dieser Unterschied in den Freisetzungsraten ist nicht konstant sondern vom verwendeten Akzeptormedium abhängig: Während PTFE 5,0 µm bei Verwendung von PB eine 40 % höhere Freisetzungsrates als PTFE 0,2 µm zeigt, beträgt der Unterschied bei Verwendung von PBE und PBP ca. 80 %. Auffällig ist weiterhin, dass sich die mit PTFE 0,2 µm ermittelten Freisetzungsrates kaum bzw. nicht voneinander unterscheiden. Werden hingegen PTFE 5,0 µm-Membranen verwendet, zeigen die Freisetzungsrates eine ausgeprägte Abhängigkeit vom Akzeptormedium. Die Rangordnung der Freisetzungsrates entspricht dabei qualitativ der an

Hand von NVA-Sättigungslöslichkeit und Akzeptormediumviskosität berechneten Rangordnung (Abbildung 4-4).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PTFE 0,2 µm-Membranen den Einfluss des Akzeptormediums nivellieren und einen limitierenden Faktor in den untersuchten Freisetzungssystemen darstellen. Die Kombination aus PTFE 5,0 µm-Membran und PBP zeigt die höchsten Freisetzungsraten und stellt damit in diesem Versuch das optimale System dar.

Auf Grund der sehr niedrigen Freisetzungsraten für PB und des frühen Eintritts in die Sättigungskinetik (Abbildung 4-6) wurde dieses Akzeptormedium nicht weiter untersucht.

Die Untersuchungen sollten mit HNC 1,0 % ebenfalls durchgeführt werden. Das war jedoch nicht möglich, da die PTFE-Membranen in diesem Fall durchlässig für die Akzeptormedien waren.

4.3.3.3 Polycarbonatmembranen

Als weitere Option standen Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von $0,03\ \mu\text{m}$ (PC) zur Verfügung. Diese wurden mit den 2 Akzeptormedien PBE und PBP kombiniert, um die Freisetzung aus O/O 1,0 % (4,0 % Emulgator; $\Phi = 0,5$; 1,0 % NVA) zu untersuchen. Auf Grund der sehr niedrigen NVA-Löslichkeit in PB und den mit PTFE-Membranen erhaltenen Versuchsergebnissen wurde PB bei diesen Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt.

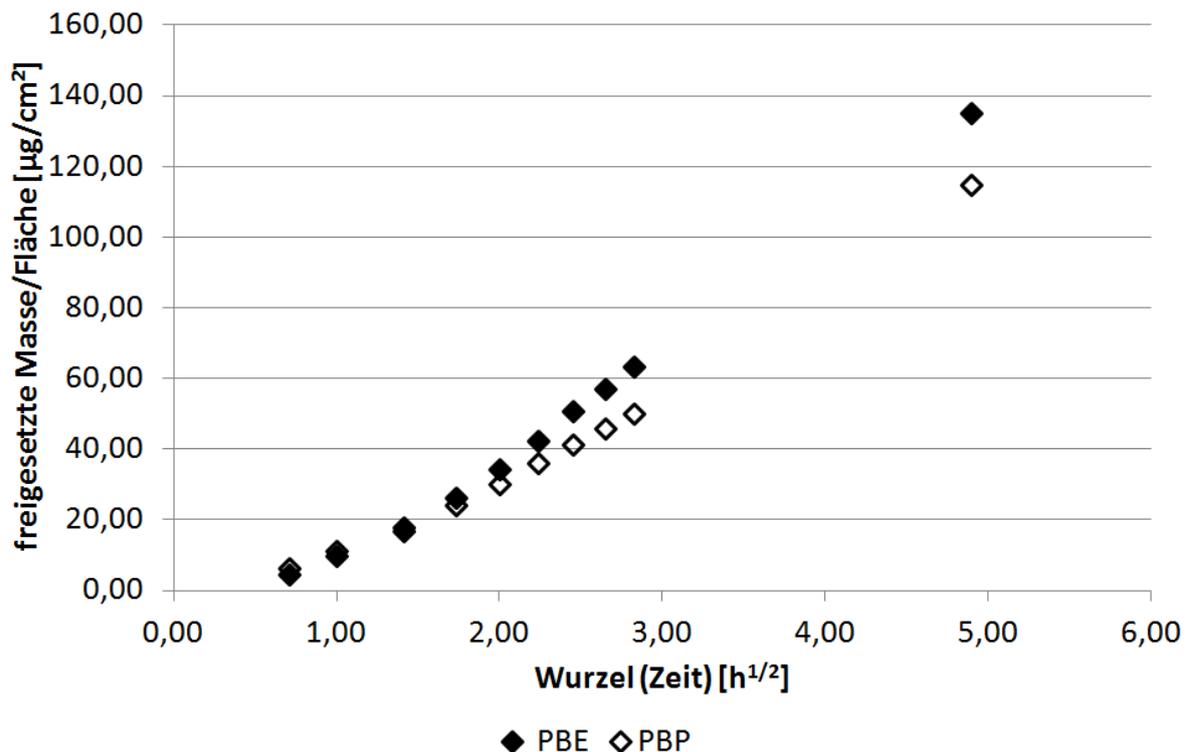


Abbildung 4-8: Messzeitpunkte für O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) bei Verwendung von PC im Zeitraum 0,5 h bis 24 h. Verwendete Akzeptormedien waren PBE und PBP. (N = 1)

Abbildung 4-8 zeigt den Freisetzungsverlauf für die O/O-Emulsion bei Verwendung der untersuchten Akzeptormedium-Membran-Kombinationen. Im Vergleich zu den PTFE-Membranen (Abbildung 4-6) weisen PC-Membranen eine höhere Latenzzeit auf. Erst nach ca. 4 h zeigen die Systeme eine Wurzel-Zeit-Kinetik, die auch beim Messzeitpunkt 24 h noch vorhanden ist.

Die Bestimmung der Freisetzungsraten wurde an Hand der vorliegenden Daten im Messzeitraum zwischen 13 h und 22 h durchgeführt.

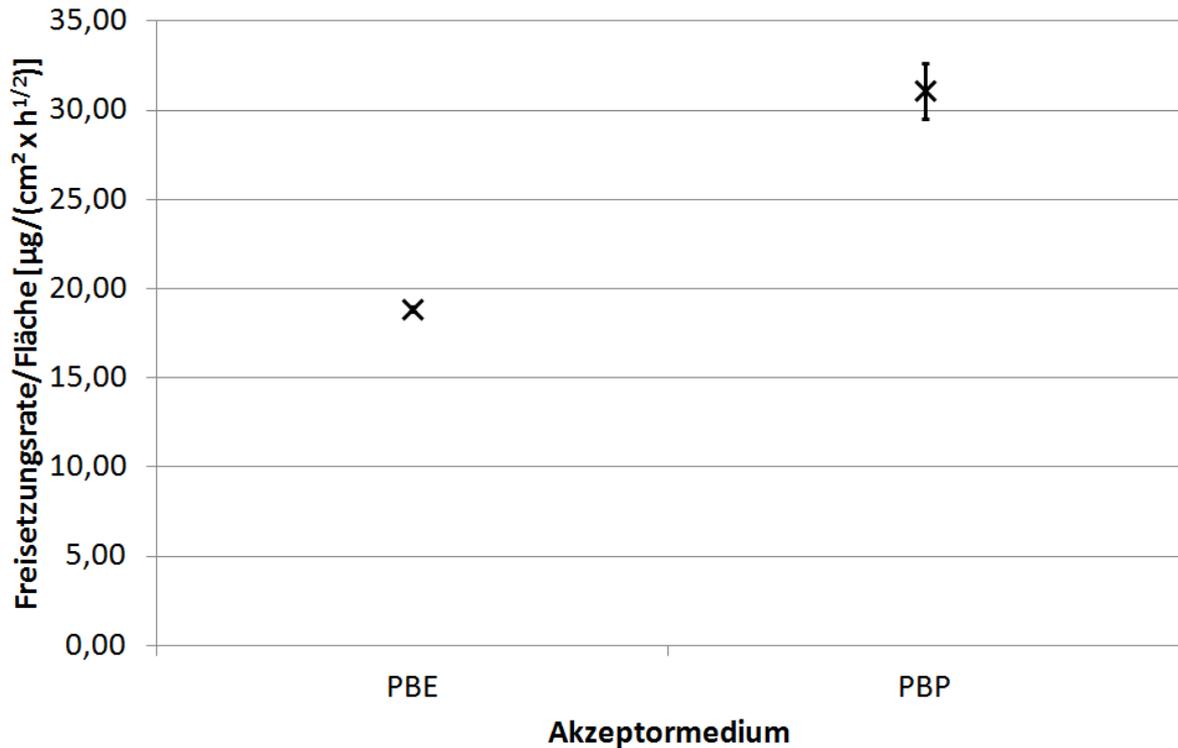


Abbildung 4-9: Freisetzungsraten für O/O ($\Phi = 0,5$) bei Verwendung von PC im Zeitraum 13,75 h bis 21,75 h. Verwendete Akzeptormedien waren PBE und PBP. (N = 3; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-9 zeigt die mit PC und PBE bzw. PBP ermittelten Freisetzungsraten. PBP zeigt in Verbindung mit PC eindeutig höhere Freisetzungsraten als PBE und ist in diesem Versuch damit das optimale Freisetzungssystem.

Bei der Untersuchung von HNC 1,0 % tritt das für PTFE-Membranen geschilderte Problem der Akzeptorpermeabilität nicht auf. PC-Membranen trennen Donor- und Akzeptorkompartiment zuverlässig und das Akzeptormedium kann die Membranen nicht durchdringen. Für die Untersuchung der NVA-Freisetzung aus HNC 1,0 % wurden zunächst die Messzeitpunkte für die Kombinationen PC-PBE und PC-PBP bestimmt.

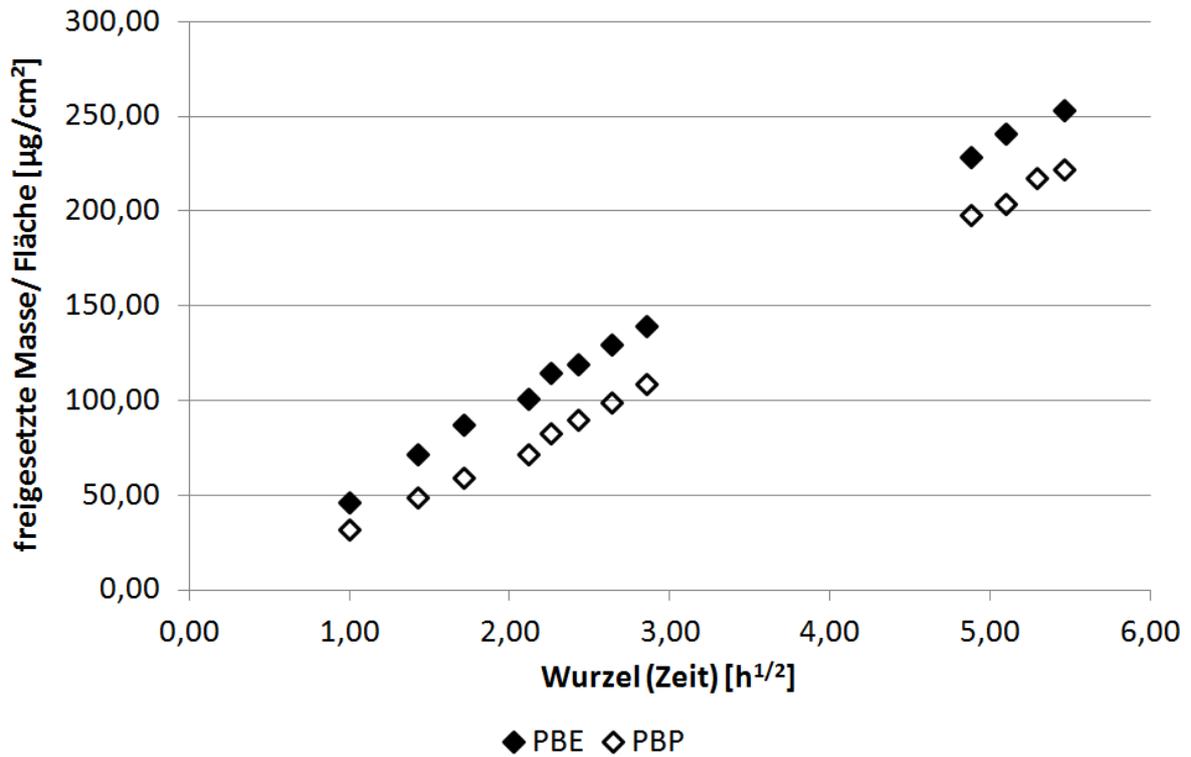


Abbildung 4-10: Messzeitpunkte für HNC 1,0 % bei Verwendung von PC im Zeitraum 1 h bis 31,5 h. Verwendete Akzeptormedien waren PBE und PBP. (N = 1)

Abbildung 4-10 zeigt den Verlauf der Freisetzung von Nonivamid aus HNC 1,0 % bei Verwendung von PC zusammen mit PBP bzw. PBE. Die Freisetzungen verlaufen über den gesamten Untersuchungszeitraum linear. Für die anschließende Bestimmung der Freisetzungsraten wurde der Messzeitraum auf ca. 11 h bis 19 h festgelegt.

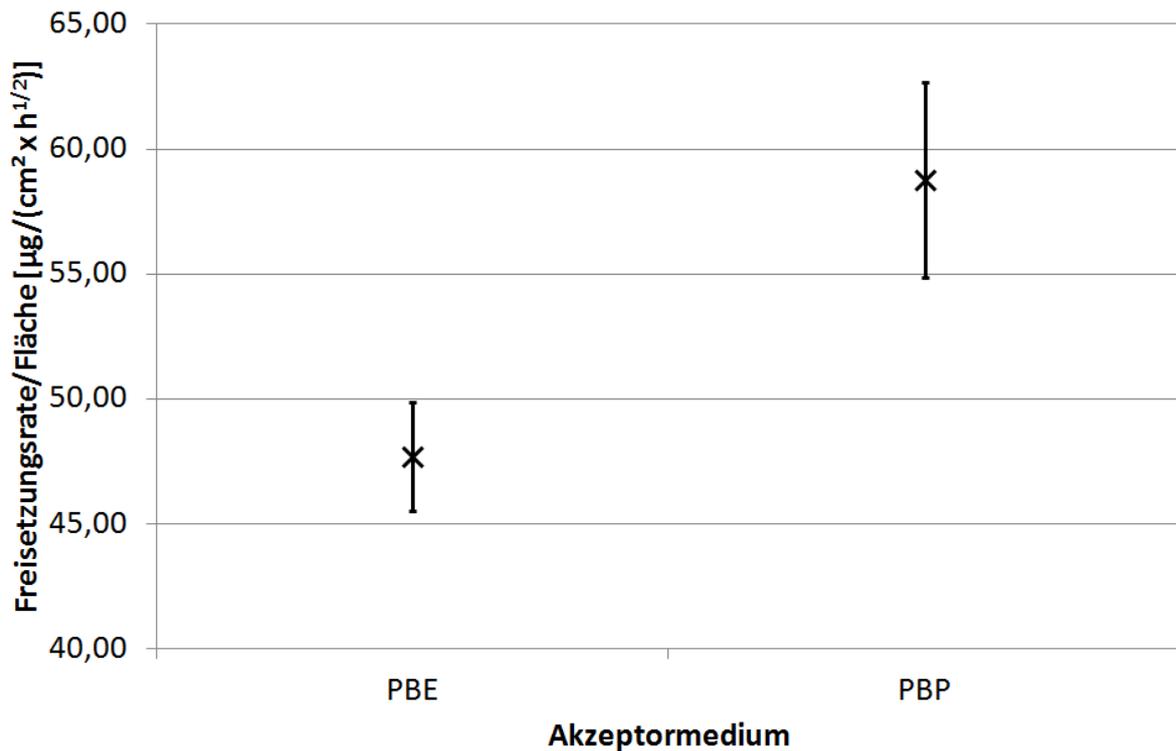


Abbildung 4-11: Freisetzungsraten für HNC 1,0 % bei Verwendung von PC im Zeitraum 10,75 h bis 18,75 h. Verwendete Akzeptormedien waren PBE und PBP. (N = 3; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-11 zeigt die ermittelten Freisetzungsraten für die Freisetzung aus HNC 1,0 %. Auch bei der Untersuchung von HNC 1,0 % zeigt PBP höhere Freisetzungsraten als PBE. Die Kombination PC und PBP ist damit auch für HNC 1,0 % das optimale Freisetzungssystem.

4.3.3.4 Zusammenfassung und Diskussion

Wie einleitend dargelegt, stellt das Akzeptormedium einen kritischen Teil eines Freisetzungssystems dar. Die Viskosität des Akzeptormediums sowie die Löslichkeit des Arzneistoffs im Akzeptormedium nehmen großen Einfluss auf die Membranpermeabilität. Diese sollte proportional zum Quotienten aus Sättigungslöslichkeit/Viskosität sein. Sowohl die Viskosität der Akzeptormedien als auch die Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in den Akzeptormedien wurden bestimmt und die Quotienten berechnet. Diese ließen hinsichtlich der Freisetzungsraten folgende Rangordnung erwarten: PBP > PBE > PB

Außerdem wurden *in vitro* Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt um die Kombinationen verschiedener Membranen und Akzeptormedien zu untersuchen. Bei Verwendung von PC- und PTFE 5,0 µm-Membranen lässt sich die an Hand der Quotienten ermittelte Rangordnung bestätigen, jedoch ist kein proportionaler Zusammenhang zwischen diesem Quotient und der Freisetzungsraten zu erkennen. PTFE 0,2 µm-Membranen zeigen stets die niedrigsten Freisetzungsraten und lassen keine Aufstellung einer Rangordnung zu, da sie die Freisetzung anscheinend stark limitieren und dadurch den Einfluss des Akzeptormediums nivellieren.

PTFE 0,2 µm-Membranen sind auf Grund ihres limitierenden Effektes als Freisetzungsmembran ungeeignet. Polyester- und Celluloseacetat-Membranen erwiesen sich ebenfalls als ungeeignet, da sie Donor- und Akzeptorkompartiment nicht trennen können, so dass Akzeptormedium durch die Membranen in das Donorkompartiment eindringt. Das gleiche Problem tritt auch bei PTFE-Membranen in Kombination mit HNC 1,0 % auf. Da dieser Effekt bei O/O-Emulsionen nicht auftritt, ist dieser möglicherweise auf die in der HNC 1,0 % enthaltenen amphiphilen Substanzen zurückzuführen, die die Grenzflächenspannung soweit herabsetzen, dass das Akzeptormedium durch die Poren der Membranen hindurchtreten kann. Auf das allgemeine Problem der Interaktion zwischen Membran und Formulierung wird auch von Thakker und Chern hingewiesen (Thakker et al. 2003).

Abbildung 4-12 vergleicht die Freisetzungsraten von O/O 1,0 % sowie von HNC 1,0 %.

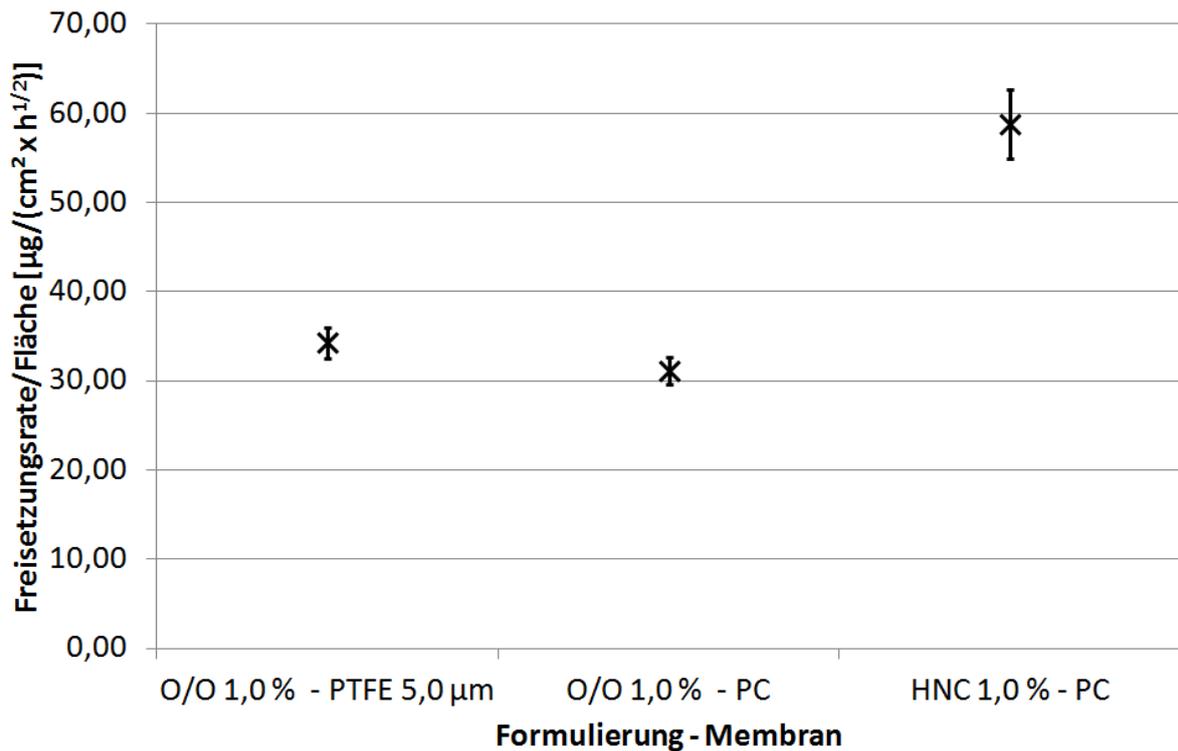


Abbildung 4-12: Freisetzungsrates von O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) sowie HNC 1,0 %. PBP war das Akzeptormedium. (N = 3; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-12 zeigt, dass PC und PTFE 5,0 µm bei Verwendung von PBP als Akzeptormedium vergleichbare Freisetzungsrates für O/O 1,0 % aufweisen. PC ermöglicht jedoch zusätzlich die Untersuchung der Nonivamidfreisetzung aus HNC 1,0 %. Es ist erkennbar, dass die NVA-Freisetzung aus HNC 1,0 % ungefähr doppelt so schnell wie aus O/O 1,0 % erfolgt. Die Kombination aus PC und PBP erwies sich damit als das optimale Freisetzungssystem und wurde für die anschließenden Untersuchungen zur Freisetzungsbeflussung verwendet.

4.4 Beeinflussung der NVA-Freisetzung aus O/O-Emulsionen

Ziel der nachfolgenden Untersuchung war es zu zeigen, welche Formulierungsparameter einen relevanten Einfluss auf die Freisetzung haben und eine gezielte Beeinflussung der Freisetzung aus O/O-Emulsionen ermöglichen. Dazu wurden zunächst potentielle Einflussparameter identifiziert und anschließend systematisch variiert um deren Einfluss auf das Freisetzungsverhalten zu ermitteln.

Die zu untersuchenden Parameter ergeben sich aus den Schritten der Arzneistofffreisetzung.

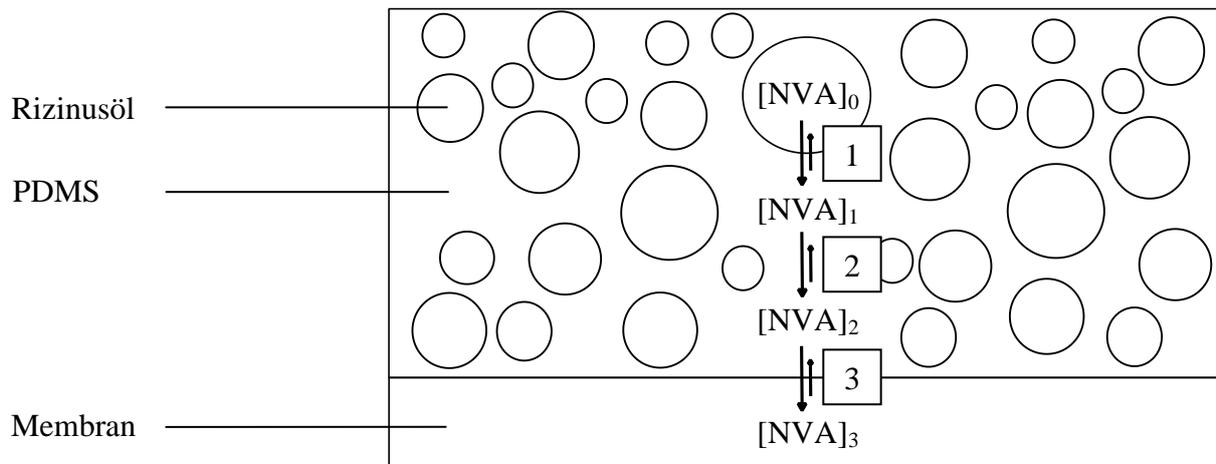


Abbildung 4-13: Freisetzung des Arzneistoffs aus einer Emulsion. 1 = NVA-Verteilung zwischen Rizinusöl und PDMS. 2 = Diffusion zur Grenzfläche PDMS/Membran. 3 = NVA-Verteilung zwischen PDMS und Membran.

Abbildung 4-13 zeigt schematisch die O/O-Emulsion, deren disperse Phase aus Rizinusöl und deren kohärente Phase aus PDMS besteht. Die Freisetzung besteht aus einer Abfolge von Diffusionsprozessen, deren Geschwindigkeit gemäß des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes proportional zur NVA-Konzentration ist. In den Rizinusöltröpfchen der dispersen Phase ist die NVA-Konzentration, $[NVA]_0$, am höchsten, da sich der Arzneistoff gemäß des Verteilungskoeffizienten Rizinusöl/PDMS zwischen kohärenter und disperser Phase verteilt; Dieser Verteilungskoeffizient ist > 1300 (siehe 8.3), so dass NVA vollständig in der dispersen Phase vorliegt. Das NVA diffundiert entlang des Konzentrationsgradienten zur Grenzfläche PDMS/Membran bzw. PDMS/Haut, wo die Freisetzung des Arzneistoffs durch einen Verteilungsvorgang in die Membran bzw. Haut erfolgt. NVA gelangt von der Membran in das Akzeptormedium, so dass der Konzentrationsgradient aufrecht erhalten wird und stets $[NVA]_0 > [NVA]_1 > [NVA]_2 > [NVA]_3$ gilt und dadurch der Diffusionsprozess aufrecht erhalten wird.

Die Überlegung ist nun, wie die Freisetzungsschritte durch Veränderungen der Formulierungsparameter gezielt beeinflusst werden können:

Die Verteilung zwischen disperser und kohärenter Phase ist abhängig vom NVA-Verteilungskoeffizienten Rizinusöl/PDMS (Gleichung 4-1). Durch entsprechende Umformung wird ersichtlich, dass die NVA-Konzentration in der kohärenten Phase proportional zur eingesetzten NVA-Gesamtmasse und indirekt proportional zum Volumen der dispersen Phasen ist. Das bedeutet, dass die Konzentration in der kohärenten Phase umso höher ist, je mehr NVA eingesetzt wird und je weniger disperse Phase vorhanden ist. Durch gezielte Variation der eingesetzten NVA-Masse sowie des Volumens der dispersen Phase sollte sich die Freisetzungsgeschwindigkeit steuern lassen, da so der Konzentrationsgradient gesteuert werden kann, welcher proportional zur Diffusionsgeschwindigkeit ist.

$$VK = \frac{C_{NVA \text{ in KP}}}{C_{NVA \text{ in DP}}} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

$$C_{NVA \text{ in KP}} = VK \cdot C_{NVA \text{ in DP}}$$

$$C_{NVA \text{ in KP}} = VK \cdot \frac{m_{NVA \text{ in DP}}}{V_{DP}}$$

$$C_{NVA \text{ in KP}} = VK \cdot \frac{m_{ges} - m_{NVA \text{ in KP}}}{V_{DP}}$$

auf Grund der hohen Löslichkeit in

Rizinusöl gilt $m_{ges} \gg m_{NVA \text{ in KP}}$

$$C_{NVA \text{ in KP}} \approx VK \cdot \frac{m_{ges}}{V_{DP}}$$

VK	= Verteilungskoeffizient []
$C_{NVA \text{ in KP}}$	= Nonivamidkonzentration in der kohärenten Phase [g/L]
$C_{NVA \text{ in DP}}$	= Nonivamidkonzentration in der dispersen Phase [g/L]
V_{KP}	= Volumen der kohärenten Phase [L]
V_{DP}	= Volumen der dispersen Phase [L]
$m_{NVA \text{ in KP}}$	= Nonivamidmasse in der kohärenten Phase [g]
m_{ges}	= Nonivamidgesamtmasse [g]

Die Diffusionsgeschwindigkeit des Arzneistoffs in der kohärenten Phase ist neben dem Konzentrationsgradienten auch von der Viskosität der Außenphase abhängig. Es besteht eine indirekte Proportionalität zwischen der Viskosität und dem NVA-Diffusionskoeffizienten in der kohärenten Phase (Einstein 1905). Es wurde daher der Einfluss unterschiedlich viskoser PDMS auf die Freisetzungsgeschwindigkeit untersucht.

Der letzte untersuchte Parameter ist der Emulgatorgehalt der Formulierungen. Dieser kann zum Einen den Dispersitätsgrad beeinflussen und zum Anderen einen lösungsvermittelnden Effekt haben. Emulgatoren lagern sich in Grenzflächen ein, setzen die Grenzflächenspannung herab, erleichtern das Emulgieren und stabilisieren die Emulsion (Kutz et al. 2011). Es wäre daher möglich, dass sich ein erhöhter Emulgatorgehalt positiv auf den Dispersitätsgrad auswirkt. Da die Verteilung des Nonivamids an der Grenzfläche Rizinusöl/PDMS stattfindet, kann diese bei einer vergrößerten Grenzfläche rascher erfolgen. Es wäre daher möglich, dass der Konzentrationsgradient in der Emulsion besser aufrecht erhalten werden kann, da freigesetztes NVA schnell nachgeliefert werden kann. Silikontenside sind amphiphile Moleküle, die sowohl mit lipophilen als auch mit silikonophilen Substanzen interagieren können. Ein sich daraus ergebender lösungsvermittelnder Effekt würde die Sättigungslöslichkeit im Silikonöl erhöhen und damit den Verteilungskoeffizienten Rizinusöl/PDMS zu Gunsten des PDMS verschieben, so dass sich mehr NVA in die kohärente Phase verteilen würde. Der dadurch erhöhte Konzentrationsgradient würde zu einer erhöhten Diffusionsgeschwindigkeit führen.

4.4.1 Einfluss der Emulgatorkonzentration auf die Tröpfchengrößenverteilung in O/O-Emulsionen mit unterschiedlich viskosen kohärenten Phasen

Bei Versuchen, die der systematischen Untersuchung der Freisetzungsbeflussung dienen, sollte möglichst immer nur ein Parameter geändert werden, während die anderen Parameter konstant gehalten werden. Daher wurde geprüft, in wie weit sich Emulgatoranteil und Viskosität der kohärenten Phase auf die Tröpfchengröße auswirken. Um das Spektrum des Viskositätseinflusses zu überprüfen, wurden die beiden Extrema der zur Verfügung stehenden Dimethicone, PDMS 20 und PDMS 12500, untersucht. Für jedes dieser Silikonöle wurden die Emulgatoranteile zwischen 1,0 % und 5,0 % untersucht.

Die Emulsionen wurden mit dem Spritze-zu-Spritze-Verfahren hergestellt und 2 Tage bei Raumtemperatur gelagert (siehe 3.3.4.3). Die 2-tägige Lagerung dient der Equilibrierung des Systems, diese Equilibrierungsphase durchliefen auch alle nachfolgend hergestellten O/O-Emulsionen, deren Freisetzungs- bzw. Permeationsverhalten untersucht wurde.

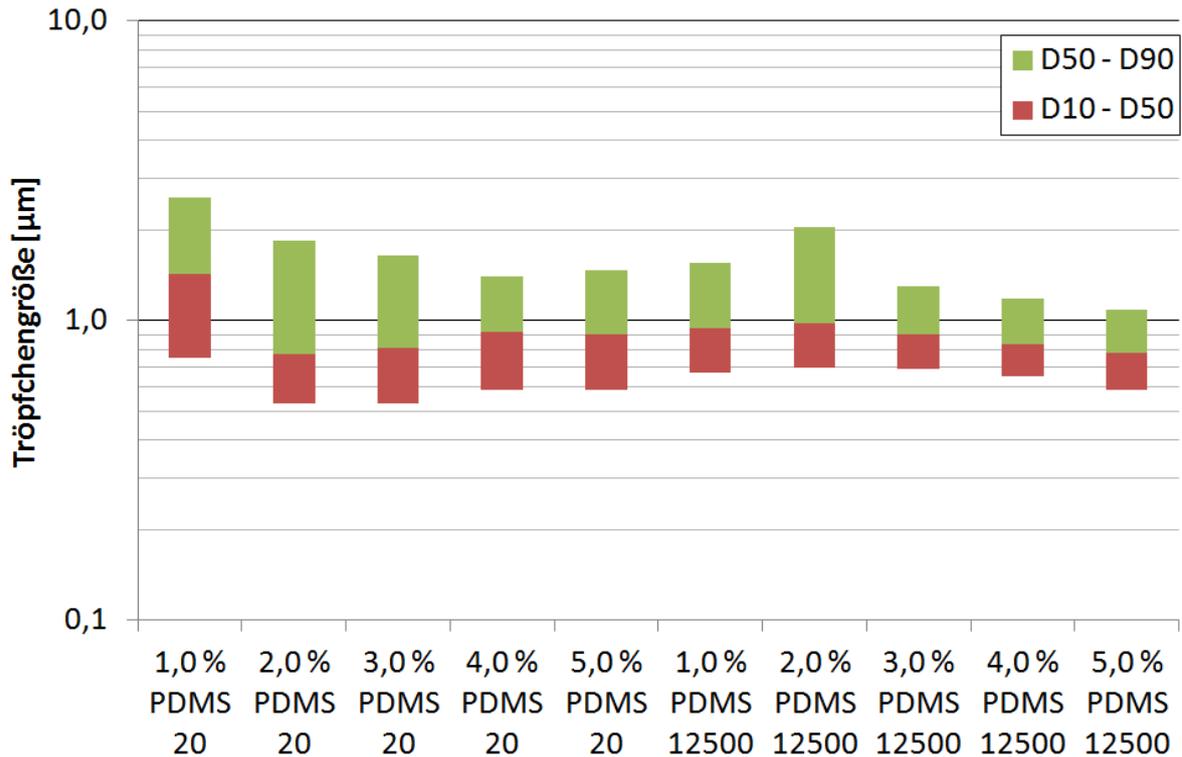


Abbildung 4-14: Tröpfchengrößenverteilung in O/O-Emulsionen ($\Phi = 0,5$) nach 2 Tagen Lagerung. Emulgatorgehalt 1,0 % bis 5,0 %. Außenphasen: PDMS 20 und PDMS 12500.

Abbildung 4-14 zeigt die Tröpfchengrößenverteilungen nach 2 Tagen Lagerung für PDMS 20 sowie PDMS 12500 bei Emulgatoranteilen zwischen 1,0 % und 5,0 %.

Alle Emulsionen zeigen kleine Tröpfchen, deren D_{10} - und D_{90} -Werte zwischen 0,5 und 3,0 μm liegen. Bis zu einem Anteil von 3 % kann eine Abnahme der Tröpfchengrößen beobachtet werden, die allerdings nur gering ist. Ab einem Emulgatorgehalt ≥ 3 % bleibt die Tröpfchengröße unverändert. Emulsionen mit PDMS 12500 zeigen etwas kleinere und engere Tröpfchengrößenverteilungen als Emulsionen mit PDMS 20, insgesamt sind sie sich jedoch sehr ähnlich.

Um bei der Untersuchung des Viskositätseinflusses auf die Freisetzungsgeschwindigkeit einen Einfluss der Tröpfchengröße zu minimieren, sollte ein Emulgatorgehalt gewählt werden, bei dem die Tröpfchengrößenverteilungen von Emulsionen mit PDMS 20 und PDMS 12500 möglichst ähnlich sind. Diese Anforderung ist bei 4,0 % und 5,0 % Emulgatorgehalt erfüllt. Es wurde dem Emulgatorgehalt von 4,0 % der Vorzug gegeben, da eine Erhöhung auf 5,0 % Emulgator keinen weiteren Vorteil erbrachte. Daher wurde im Folgenden immer mit einem Emulgatoranteil von 4,0 % gearbeitet, sofern nichts anderes angegeben ist.

4.4.2 Einfluss des Nonivamidgehalts auf die Freisetzungsgeschwindigkeit

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Variation des Nonivamidanteils auf die Freisetzungsgeschwindigkeit auswirkt. Dazu wurde die Freisetzung von 5 NVA-Gehalten zwischen 0,2 % und 1,0 % untersucht.

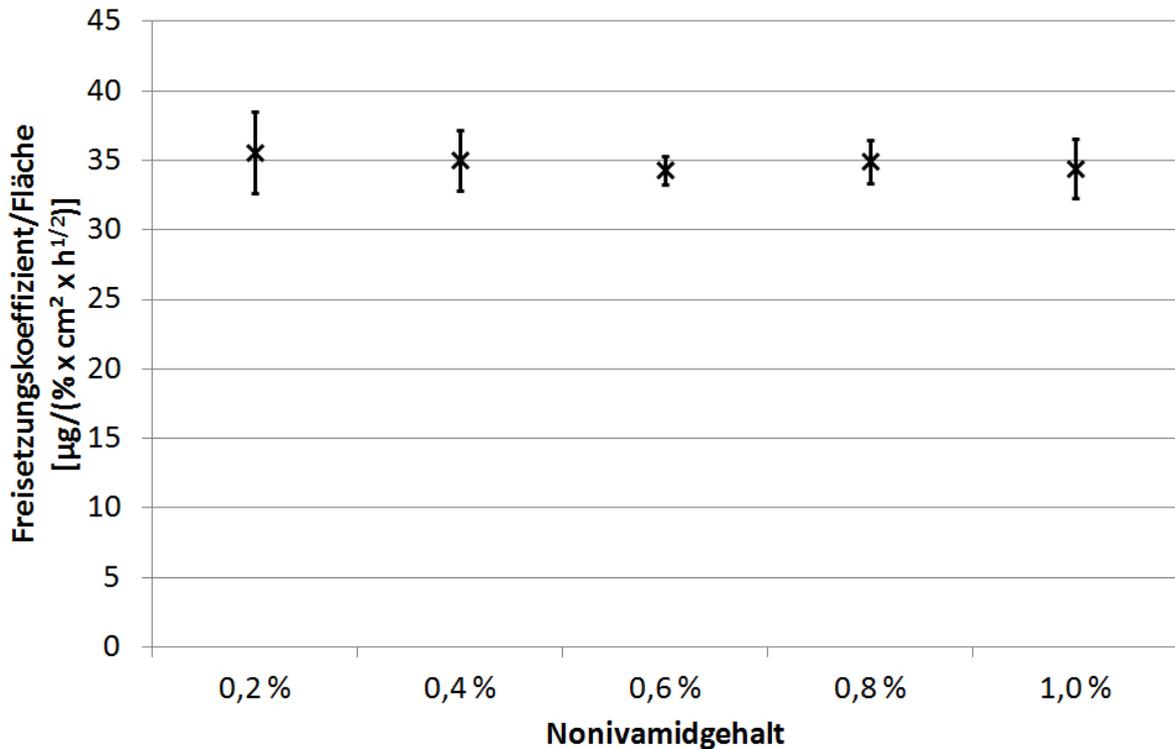


Abbildung 4-15: Vergleich der Freisetzungskoeffizienten von O/O 0,2 % bis 1,0 % ($\Phi = 0,5$) mit unterschiedlichen Nonivamidgehalten. (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Der Vergleich der Freisetzungskoeffizienten ist in Abbildung 4-15 aufgetragen. Die aus Freisetzungsraten und Gesamtkonzentration berechneten Freisetzungskoeffizienten aller untersuchten Konzentrationen sind vergleichbar.

Wie einleitend in 2.2.4 erläutert, gewährleistet ein in vitro Freisetzungssystem, dass stets die Freisetzung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Deshalb lässt sich die Kinetik mit der der Arzneistoff in das Akzeptormedium abgegeben wird, mit der Higuchi-Gleichung beschreiben (Gleichung 4-2).

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{C_{ges} \cdot D \cdot C_s}{2t}$$

Gleichung 4-2

$$\frac{dQ}{dt \cdot C_{ges}} = \frac{D \cdot C_s}{2t}$$

Q = freigesetzte Arzneistoffmenge pro Fläche

t = Zeit

C_{ges} = ArzneistoffgesamtkonzentrationC_s = Löslichkeit in der kohärenten Phase (hier: Konzentration in der kohärenten Phase)

Aus Gleichung 4-2 folgt, dass die Freisetzungsrates proportional zur Gesamtkonzentration des Arzneistoffs ist. Auf Grund dieser Grundlage können Freisetzungskoeffizienten berechnet werden, d. h. auf die Arzneistoffgesamtkonzentration normierte Freisetzungsrates. Zeigen 2 Formulierungen, die sich lediglich in ihrer Arzneistoffkonzentration unterscheiden, gleiche Freisetzungskoeffizienten, dann bedeutet das, dass sich durch die Veränderung der Arzneistoffkonzentration nichts an der Freisetzungseigenschaften der Formulierung verändert.

Bei der systematischen Untersuchung des Einflusses des NVA-Gehaltes ergeben sich konstante Freisetzungskoeffizienten. Dies bedeutet, dass die Freisetzungseigenschaften proportional zur NVA-Gesamtkonzentration ist und über diese gezielt gesteuert werden kann. Weiterhin ist es dadurch legitim, Versuchsergebnisse, die bei einem bestimmten NVA-Gehalt erhalten werden, auf andere NVA-Konzentrationen zu übertragen. Außerdem wurden in Folge dieser nachgewiesenen Proportionalität alle Freisetzungsergebnisse auf den tatsächlichen Nonivamidgehalt der Zubereitungen normiert, damit Einflüsse des herstellungsbedingt leicht schwankenden NVA-Gehaltes, untersuchte Effekte nicht verfälschen.

4.4.3 Einfluss des Phasenvolumenverhältnisses auf die Freisetzungsgeschwindigkeit

Der Einfluss des Phasenvolumenverhältnisses auf die Freisetzungsgeschwindigkeit aus O/O-Emulsionen wurde untersucht. Dazu wurden Emulsionen hergestellt, deren PVV zwischen 0,1 und 0,5 lag. Es wurden unterschiedlich konzentrierte NVA-Rizinusöllösungen verwendet um den NVA-Gesamtgehalt konstant zu halten.

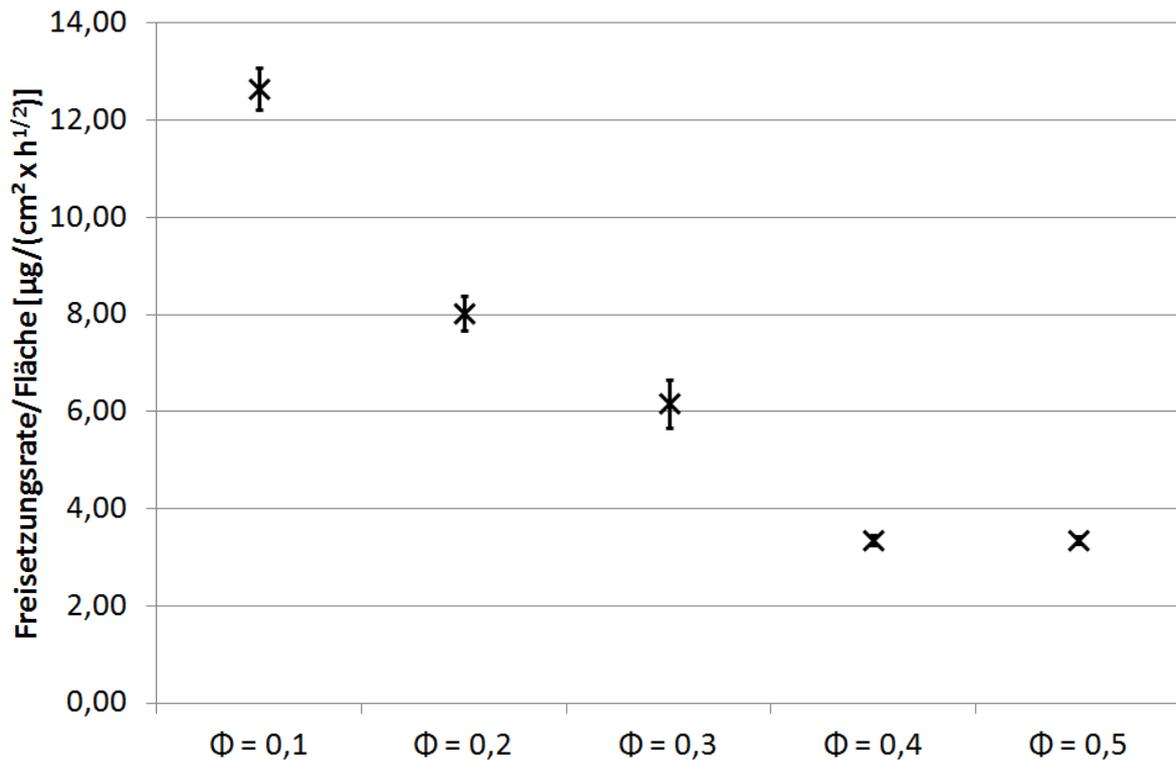


Abbildung 4-16: Einfluss des PVV auf die Freisetzungsrates von O/O 0,1 % ($\Phi = 0,1 - 0,5$). (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Der Vergleich der Freisetzungsrates bei verschiedenen PVV ist in Abbildung 4-16 dargestellt. Emulsionen mit einem PVV von 0,1 zeigen die mit Abstand höchsten Freisetzungsrates, die 3 bis 4-mal höher als bei einem PVV von 0,5 sind. Die Freisetzungsrates sinkt mit steigendem PVV und erreicht bei PVV 0,4 ihren geringsten Wert. Bei nochmals erhöhtem PVV ist kein weiteres Absinken mehr erkennbar, d. h. die Freisetzungsrates von $\Phi = 0,4$ und $\Phi = 0,5$ sind vergleichbar.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen somit bei $\text{PVV} < 0,4$ eine Korrelation zwischen dem PVV und der Freisetzungsrates erkennen.

Um zu klären, ob die Unterschiede in den Freisetzungsgeschwindigkeiten auf unterschiedliche Tröpfchengrößenverteilungen zurückzuführen sind, wurden diese untersucht.



Abbildung 4-17: Tröpfchengrößenverteilung in O/O-Emulsionen ($\Phi = 0,1 - 0,5$) nach 2 Tagen Lagerung. (N=3)

Wie in Abbildung 4-17 ersichtlich, zeigt die Zunahme der Tröpfchengröße bei steigendem PVV einen moderaten Trend. Dennoch liegen die D_{10} - und D_{90} -Werte der Emulsionen zwischen $0,5\mu\text{m}$ und $2\mu\text{m}$. Diese Zunahme war zu erwarten, denn soll bei einem größeren Volumen an disperser Phase die gleiche Tröpfchengröße erzielt werden, werden mehr Tröpfchen erzeugt. Dadurch entstehen mehr Grenzflächen, für deren Erschaffung insgesamt mehr Energie ins System eingebracht werden muss. In Folge dessen können die Tröpfchen bei höherem PVV nicht so gut zerkleinert werden. Der Vergleich zwischen den Tröpfchengrößen einerseits und den dazugehörigen Freisetzungsraten andererseits, lässt keine Korrelation zwischen den beiden Größen erkennen.

Die Änderung der Freisetzungsraten lässt sich deshalb nur mit den unterschiedlichen NVA-Konzentrationen der kohärenten Phasen erklären. Allerdings lässt sich keine proportionale Korrelation zwischen beiden Größen herstellen. Da ferner bezüglich der Freisetzungsraten keine Unterschiede zwischen Emulsionen mit PVV 0,4 und 0,5 festzustellen sind, beeinflussen offensichtlich zusätzliche Faktoren die Freisetzung.

Die einleitend in 4.4 erläuterte These, dass das Volumenverhältnis von kohärenter und disperser Phase die Freisetzungsraten beeinflusst, konnte bestätigt werden.

4.4.4 Einfluss des Emulgatorgehaltes auf die Freisetzungsgeschwindigkeit

Um den Einfluss der Emulgatorkonzentration auf die Freisetzungsraten zu untersuchen, wurde zunächst der Emulgatorgehalt der O/O-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$) zwischen 1,0 % und 5,0 % variiert und anschließend die Freisetzung untersucht.

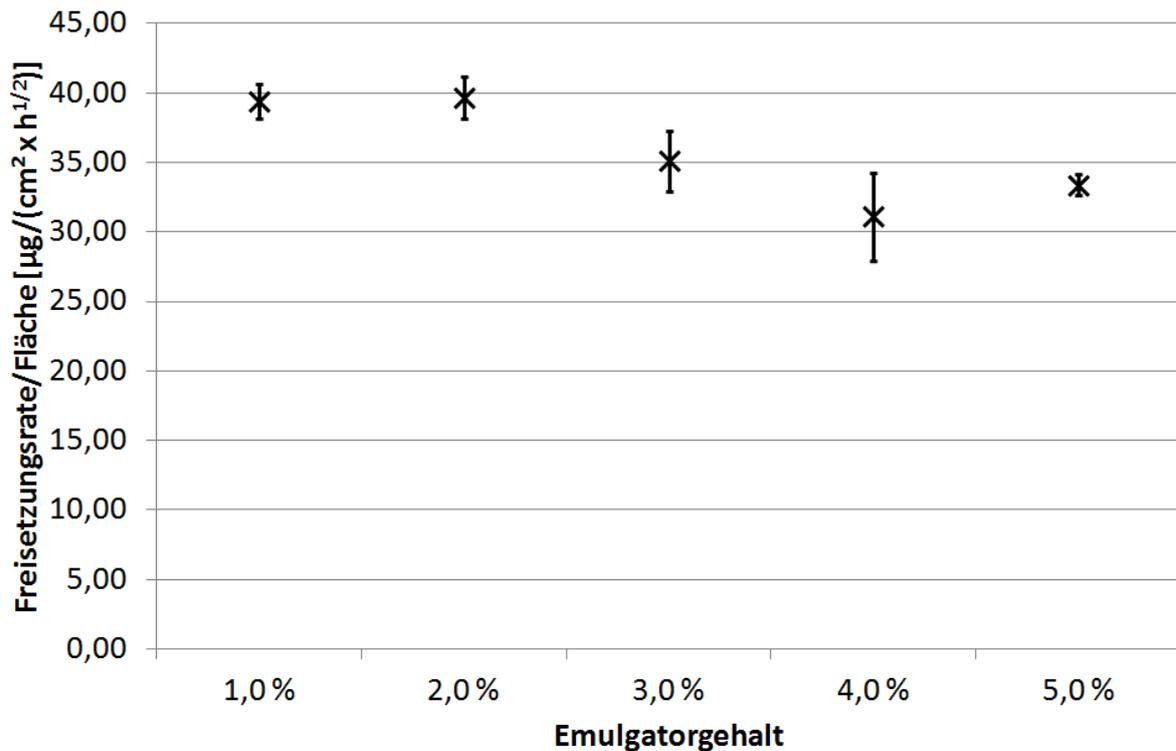


Abbildung 4-18: Einfluss des Emulgatorgehaltes auf die Freisetzungsraten von O/O 1,0 % (1,0 % bis 5,0 % Emulgator; $\Phi = 0,5$). (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-18 vergleicht die Freisetzungsraten, die mit den verschiedenen Emulgatorgehalten erhalten worden sind. Die mit 1,0 % und 2,0 % Emulgatorgehalt erzielten Freisetzungsraten sind signifikant höher als die mit den höheren Konzentrationen erhaltenen. O/O-Emulsionen mit 3,0 % bis 5,0 % Emulgator weisen vergleichbare Freisetzungsraten auf.

Betrachtet man noch einmal die Ergebnisse der Tröpfchengrößenbestimmung bei den verschiedenen Emulgatorkonzentrationen (Abbildung 4-14), fällt auf, dass bei 1,0 % und 2,0 % Emulgatorgehalt die größten Tröpfchen zu finden sind. Damit weisen die dispersen Phasen dieser Emulsionen auch die kleinsten Gesamtoberflächen auf. Daher wäre zu vermuten gewesen, dass diese Formulierungen die niedrigsten Freisetzungsraten zeigen. Offensichtlich scheint die Tröpfchengrößenverteilung einen allenfalls geringen Einfluss zu haben, da diese Emulsionen sogar die höchsten Freisetzungsraten zeigen. Aus den vorliegenden Ergebnissen

ist kein eindeutiger Trend bzw. kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Emulgatorgehalt und Freisetzungsraten zu erkennen.

Der Einfluss des Emulgatorgehaltes auf das Freisetzungverhalten wurde erneut untersucht, jedoch bei einem PVV von 0,1. Diesem Vorgehen liegt die in 4.4.3 gewonnene Erkenntnis zugrunde, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit stark vom PVV abhängig ist, jedoch zwischen $\Phi = 0,4$ und $\Phi = 0,5$ kein weiterer Unterschied festzustellen ist. Daher bestand die Vermutung, dass das O/O-System bei einem PVV von 0,5 nur wenig auf veränderte Formulierungsparameter reagiert.

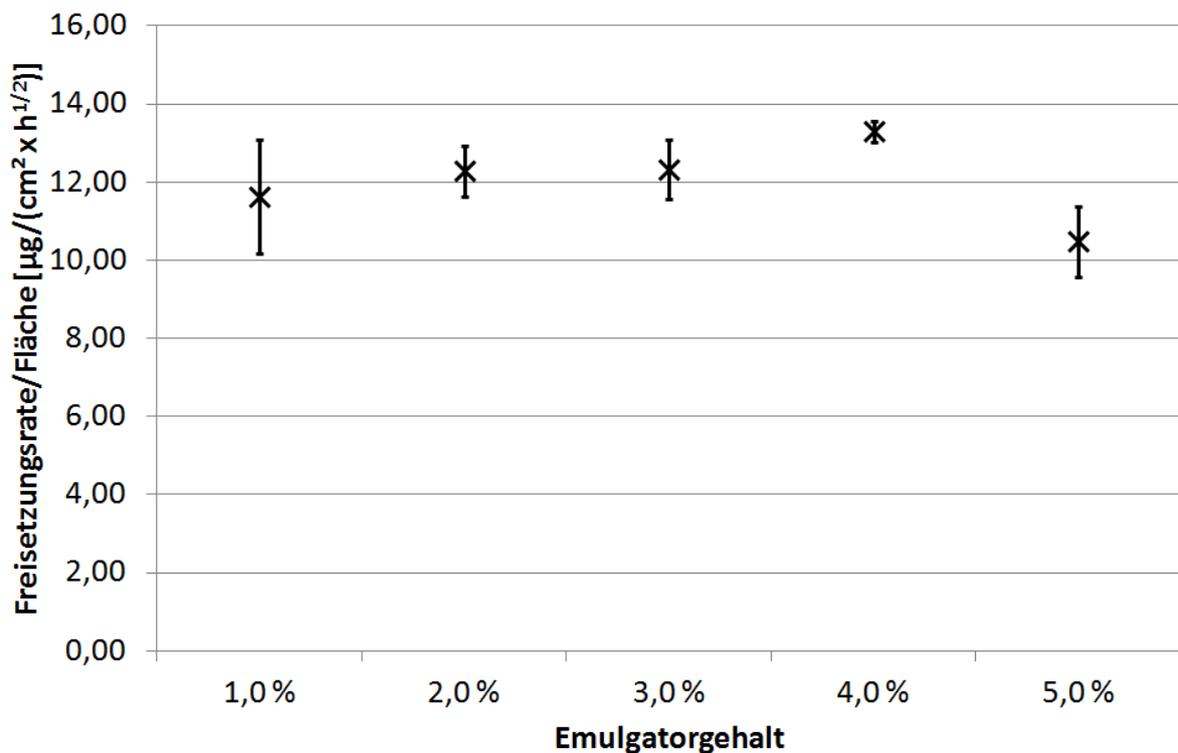


Abbildung 4-19: Einfluss des Emulgatorgehaltes auf die Freisetzungsraten von O/O 0,1 % (1,0 % bis 5,0 % Emulgator; $\Phi = 0,1$). (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Die Freisetzungsraten, die in diesem zweiten Experiment erhalten wurden, sind in Abbildung 4-19 dargestellt. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass alle Emulsionen identische bzw. fast identische Freisetzungsraten zeigen. Die Erwartung, dass ein PVV von 0,1 zu stärker ausgeprägten Unterschieden führt, bestätigt sich also nicht. Auch in diesem Versuch ist keine Korrelation zwischen Emulgatorgehalt und Freisetzungsraten festzustellen.

4.4.5 Einfluss der Viskosität der kohärenten Phase auf die Freisetzungsgeschwindigkeit

Um den Einfluss der Viskosität der kohärenten Phase auf die Freisetzungsgeschwindigkeit zu untersuchen, wurden O/O-Emulsionen mit PDMS unterschiedlicher Viskositäten hergestellt.

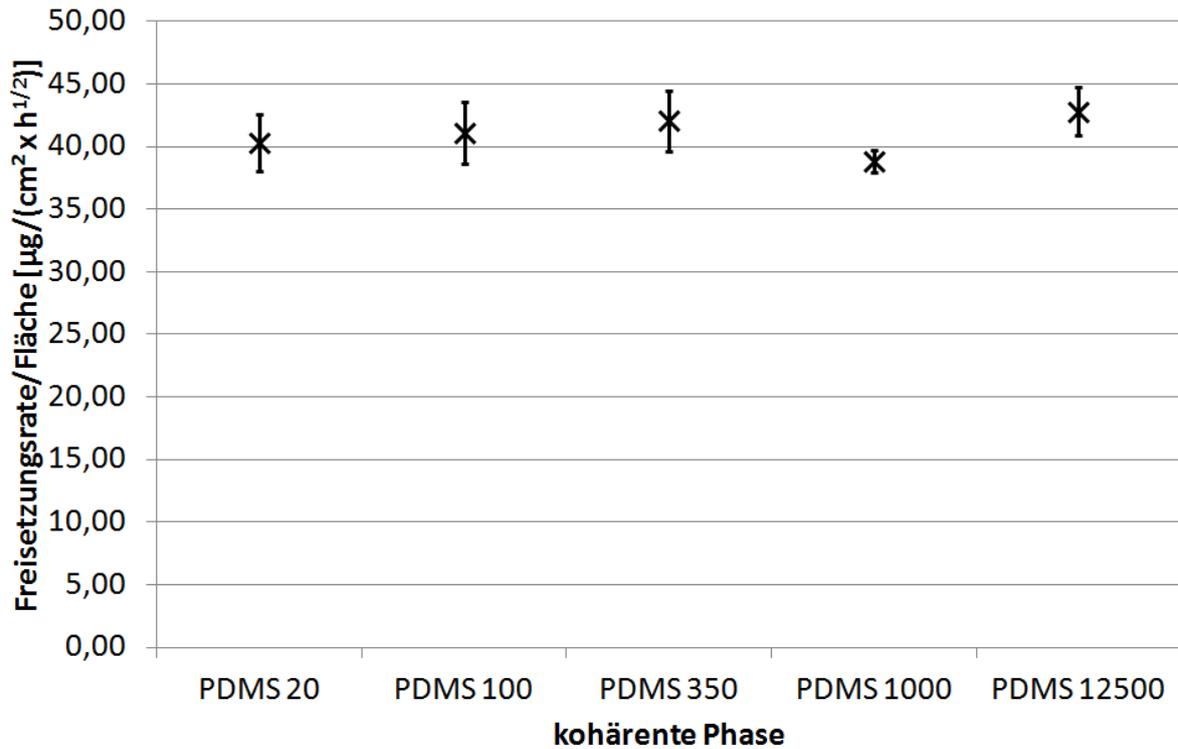


Abbildung 4-20: Einfluss der Viskosität der kohärenten Phase auf die Freisetzungsrates von O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$). (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-20 vergleicht die Freisetzungsrates, die mit den unterschiedlich viskosen Außenphasen erhalten wurden. Die Freisetzungsrates sind unabhängig von der verwendeten kohärenten Phase vergleichbar. Diese Erkenntnis kann die einleitend unter 4.4 aufgestellte Hypothese, die eine Verringerung der Freisetzungsgeschwindigkeit mit steigender Viskosität vorhersagte, nicht bestätigen.

Auch hier stellte sich die Frage, ob der Einfluss der Viskosität bei einem PVV von 0,5 durch zusätzliche Effekte nivelliert wird, da unter 4.4.3 gezeigt wurde, dass O/O-Emulsionen mit einem PVV von 0,4 und 0,5 die gleichen Freisetzungsrates zeigen, während sonst die Freisetzungsrates von $\Phi = 0,1$ nach $\Phi = 0,3$ sinkt. Es wurde daher der Einfluss der Viskosität bei verschiedenen PVV untersucht. Diese Untersuchung konnte jedoch ausschließlich mit PDMS 1000 durchgeführt werden, da alle anderen Silikonöle bei Verwendung eines PVV $< 0,5$ Instabilitäten zeigten und die 2-tägige Lagerung nicht überstanden. Außerdem wurde der

Emulgatorgehalt auf 2,0 % herabgesetzt, da PDMS 1000-haltige Emulsionen damit die höchste Stabilität aufwiesen.

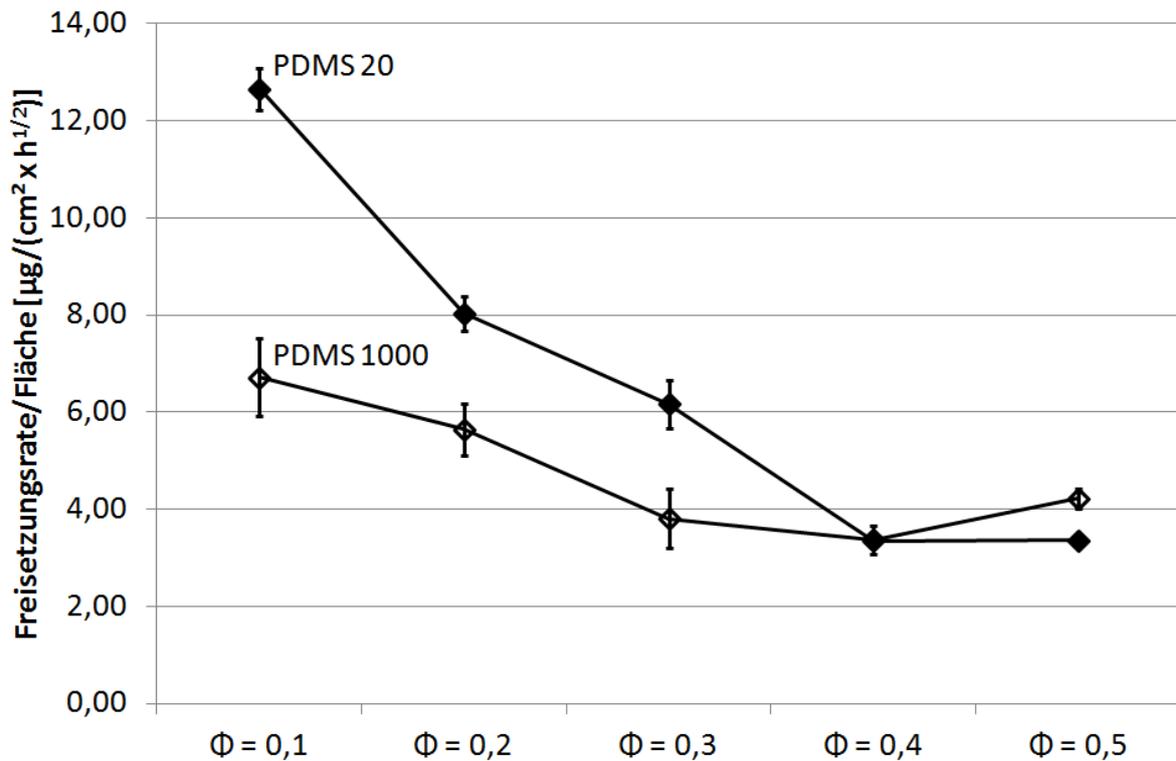


Abbildung 4-21: Einfluss der Viskosität der kohärenten Phase auf die Freisetzungsraten von O/O 0,1 % (2,0 % Emulgator; $\Phi = 0,1 - 0,5$) bei verschiedenen PVV und Verwendung von PDMS 20 bzw. PDMS 1000. (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

In Abbildung 4-21 sind die Freisetzungsraten für PDMS 20 (Werte aus 4.4.3) und PDMS 1000 zur besseren Vergleichbarkeit zusammen aufgetragen. Bei niedrigen PVV zwischen 0,1 und 0,3 erfolgt die Freisetzung aus Emulsionen mit PDMS 20 immer deutlich schneller als aus jenen mit PDMS 1000. Dieser Unterschied wird jedoch mit steigendem PVV kleiner. Ab einem PVV von 0,4 bzw. 0,5 sind die ermittelten Freisetzungsraten vergleichbar.

Diese Untersuchung erlaubt 3 Schlussfolgerungen: (1) Auch bei Verwendung von PDMS 1000 lässt sich bei niedrigen PVV die Abhängigkeit der Freisetzungsraten vom PVV nachweisen (vergleiche 4.4.3). (2) Die Erhöhung der Viskosität der Außenphase hat bei niedrigem PVV eine deutliche Verringerung der Freisetzungsraten zur Folge. Es besteht jedoch keine indirekte Proportionalität zwischen Freisetzungsraten und Viskosität der kohärenten Phase wie unter 4.4 vermutet. (3) Ab einem PVV von 0,4 wird die Viskositätsabhängigkeit der Freisetzungsraten nivelliert.

Ein Erklärungsansatz für die Nivellierung des Viskositätseinflusses soll nachfolgend erläutert werden: Wie in Abbildung 4-13 dargestellt, diffundiert der Arzneistoff entlang des Konzentrationsgradienten vom Emulsionsinneren zur Membran. Die Zeit, die der Arzneistoff zum Erreichen der Grenzfläche Emulsion/Membran benötigt, hängt von der Diffusionsgeschwindigkeit in der kohärenten Phase und von der Diffusionsstrecke ab. Diese Strecke sollte im vorliegenden Fall mit steigenden PVV abnehmen, da die Tröpfchengröße, wie in Abbildung 4-17 dargestellt, bei steigendem PVV annähernd gleich bleibt. Dies bedeutet, bei Erhöhung des Anteils an kohärenter Phase entstehen mehr Tröpfchen. Abbildung 4-22 illustriert, wie sich die Diffusionswege verkürzen, wenn die 5fache Anzahl an Tröpfchen in der Emulsion vorhanden ist. Dadurch, dass der Arzneistoff im Mittel geringere Wege bis zur Membran zurücklegen muss, hat die Diffusionsgeschwindigkeit einen geringeren Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit.

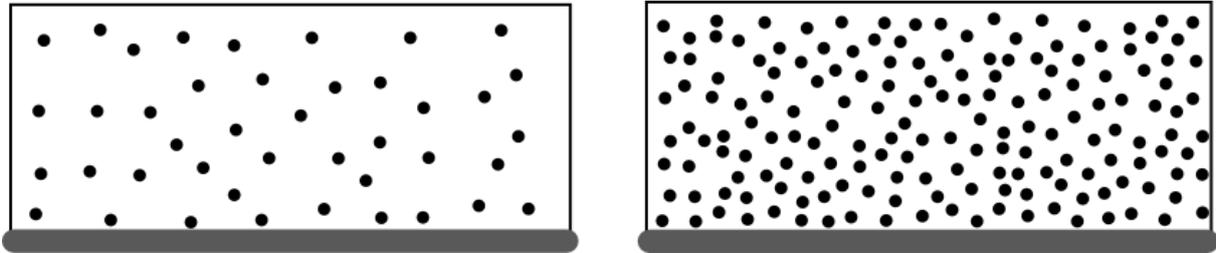


Abbildung 4-22: Modell zur Verteilung der Öltröpfchen in O/O-Emulsionen bei $\Phi = 0,1$ (links) und $\Phi = 0,5$ (rechts).

4.4.6 Zusammenfassung

Mit Hilfe der ermittelten Freisetzungsraten konnte für das O/O-Emulsionssystem eine proportionale Abhängigkeit zwischen Arzneistoffgehalt und Freisetzungsgeschwindigkeit nachgewiesen werden. Als Konsequenz dieses Befundes wurden die Freisetzungsergebnisse auf ihren NVA-Gehalt normiert.

Es konnte gezeigt werden, dass bei niedrigem PVV dessen Einfluss ausgeprägt ist, dieser jedoch mit steigendem PVV abnimmt; Ab PVV 0,4 sinkt die Freisetzungsraten nicht weiter. Diese Abhängigkeit der Freisetzungsgeschwindigkeit vom PVV konnte sowohl für Emulsionen mit PDMS 20 als auch für solche PDMS 1000 gezeigt werden. Als wesentliche Ursache wurde die PVV-abhängige NVA-Konzentration in der kohärenten Phase diskutiert.

Eine Korrelation zwischen Emulgatorgehalt und Freisetzungsraten konnte bei einem PVV von 0,1 und 0,5 nicht nachgewiesen werden.

Die Viskosität der kohärenten Phase hat nur bei einem PVV zwischen 0,1 und 0,3 einen Einfluss auf die Freisetzungsraten. $PVV \geq 0,4$ haben einen nivellierenden Effekt und zeigen keine Sensitivität für unterschiedlich viskose kohärente Phasen. Als Erklärung wurde die mit steigendem PVV abnehmende mittlere Diffusionsstrecke der NVA-Moleküle diskutiert.

4.5 In vitro Permeationsuntersuchungen

Permeationsuntersuchungen sind eine sinnvolle Ergänzung zu Freisetzungsuntersuchungen mit synthetischen Membranen, die unter sehr artifiziellen Bedingungen ablaufen. Für Permeationsuntersuchungen wird Haut verwendet, so dass die in vivo Arzneistoffpermeation wesentlich realistischer eingeschätzt werden kann. Es wurden daher Permeationsuntersuchungen durchgeführt, um die NVA-Permeation aus verschiedenen Formulierungen miteinander zu vergleichen und um zu untersuchen, ob die Permeationsrate durch gezielte Veränderung von Formulierungsparametern gesteuert werden kann.

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde Schweineohrhaut verwendet, da sie große Übereinstimmungen mit Humanhaut zeigt (siehe 2.2.6).

Haut ist ein biologisches Organ und unterliegt in seiner Struktur und Zusammensetzung einer gewissen Variabilität, was zu erhöhten Standardabweichungen führt. Jedoch findet sich diese Ungleichmäßigkeit auch bei menschlichen Individuen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass Unterschiede, die auf Grund der erhöhten Standardabweichung nicht erkannt werden, therapeutisch irrelevant sind. Es wurde daher an Hand der Ergebnisse zur Freisetzungsbeeinflussung (siehe 4.4) eine Vorauswahl der zu untersuchenden Formulierungsparameter getroffen: Formulierungsparameter, die bereits bei den in vitro Freisetzungsuntersuchungen lediglich einen geringen oder keinen Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit hatten, wurden nicht weiter untersucht.

Um die Auswirkungen systematischer Änderungen von Formulierungsparametern auf das Permeationsverhalten zu untersuchen, wurden Permeationsversuche mit infiniten Dosierung durchgeführt. Sie ermöglichen die Berechnung und statistische Auswertung von Kennzahlen, sodass quantitative Zusammenhänge besser erkannt werden können.

Zum endgültigen Vergleich der NVA-Permeation aus verschiedenen Arzneiformen wurden Permeationsuntersuchungen mit finiter Dosierung durchgeführt, da sich diese durch eine nochmals gesteigerte Praxisnähe auszeichnen. Im Allgemeinen ist der Permeationsverlauf nicht linear, so dass der Vergleich verschiedener Formulierungen an Hand der Permeationskurven und nicht mittels berechneter Kennzahlen erfolgt.

4.5.1 Entwicklung eines in vitro Permeationssystems

4.5.1.1 Einfluss verschiedener Hautpräparationen auf die NVA-Permeation aus HNC 1,0 %

Die Vorbereitung der Haut für die Permeationsuntersuchung ist ein kritischer Schritt und verlangt daher besondere Beachtung (siehe 2.2.6). Die Eignung der in der Literatur beschriebenen Hautpräparate, Vollhaut und Spalthaut wurde deshalb untersucht (OECD 2004).

Im folgenden Versuch wurde Spalthaut (1mm) mit Vollhaut verglichen. Als Referenzzubereitung diente HNC 1,0 %, da HNC eine offizinelle Standardrezeptur darstellt. Die Konzentration von 1,0 % wurde gewählt, da so die zu beobachtenden Effekte ausgeprägter auftreten und besser beurteilt werden können.

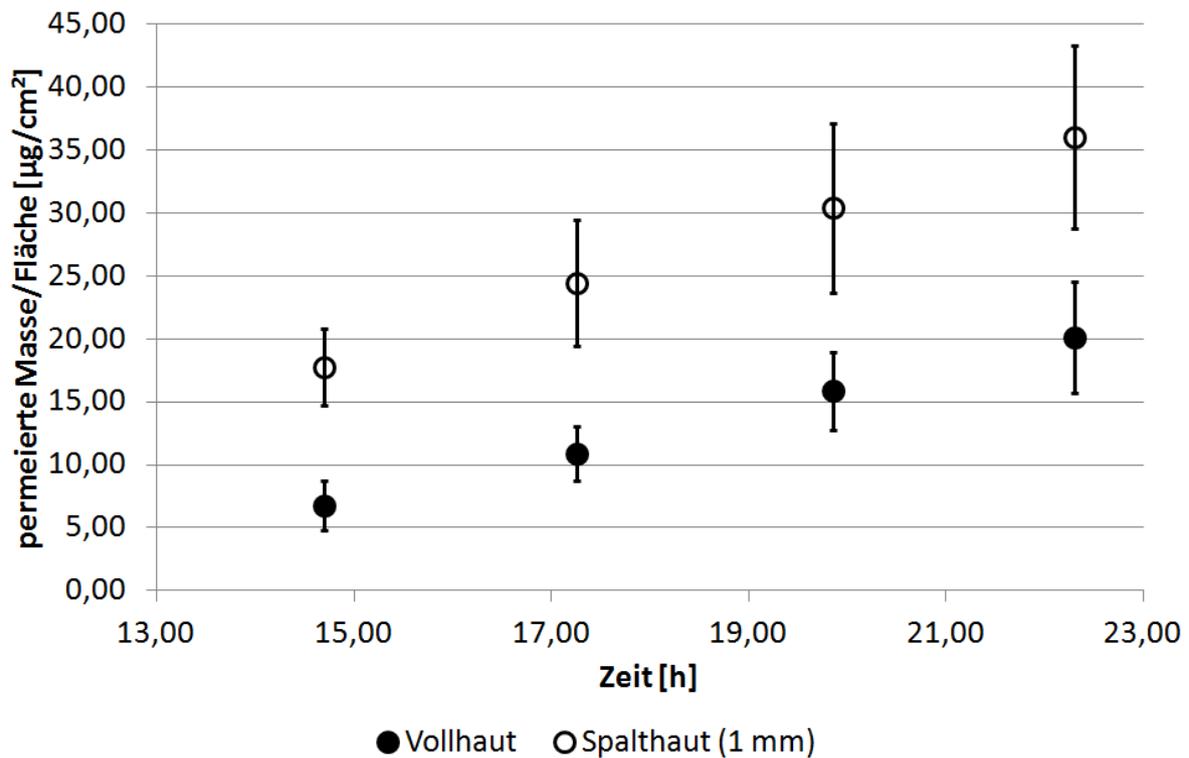


Abbildung 4-23: Permeation von NVA aus HNC 1,0 % durch Vollhaut bzw. Spalthaut und Verwendung von PBP als Akzeptormedium. (N = 5; Fehlerbalken = Standardabweichung)

Abbildung 4-23 vergleicht die Permeation von NVA durch Vollhaut und Spalthaut (1 mm). Es ist zu erkennen, dass die Permeation von NVA aus HNC 1,0 % über einen Zeitraum von ca. 8 h linear erfolgt. Die in dieser Zeit permeierende NVA-Masse ist bei Verwendung von Spalthaut wesentlich höher als bei Vollhaut. Dies lässt sich durch die ca. 4 h kürzere Latenzzeit bei Verwendung von Spalthaut erklären. Die Permeationsraten sind hingegen bei beiden

Hautpräparaten vergleichbar – das 95 %-Konfidenzintervall der Permeationsrate beträgt für Vollhaut $15,21 \pm 3,13 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\text{h}^{1/2})$ und für Spalthaut (1 mm) $20,48 \pm 5,17 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\text{h}^{1/2})$.

Das Stratum corneum stellt die geschwindigkeitsbestimmende Permeationsbarriere dar, so dass die Permeationsrate durch das Stratum corneum bestimmt wird (Rougier 2005). Um anschließend ins Akzeptormedium zu gelangen, muss der Arzneistoff durch die restliche Epidermis und Dermis permeieren. Da Vollhaut dicker als Spalthaut ist, muss der Arzneistoff einen längeren Weg zurücklegen, bevor er das Akzeptormedium erreicht. Daher zeigt Vollhaut eine größere Latenzzeit als Spalthaut.

Die kürzere Latenzzeit, welche eine erhöhte Flexibilität bei der Festlegung des Messzeitraumes sowie eine vereinfachte Analytik erlaubt, in Verbindung mit einer einfacheren Hautpräparation haben dazu geführt, dass die weiteren Permeationsuntersuchungen mit Spalthaut (1 mm) durchgeführt wurden.

4.5.1.2 Einfluss des Akzeptormediums auf die NVA-Permeation aus O/O 1,0 %

Vorversuche zur Permeation von NVA aus O/O-Emulsionen 1,0 % hatten gezeigt, dass die im Vergleich zu HNC 1,0 % erheblich geringeren permeierten Mengen eine ausreichend genaue Quantifizierung nicht zuließen.

Gemäß der OECD-Guideline „Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies“ ist es notwendig ein Akzeptormedium zu verwenden, das eine ausreichend hohe Löslichkeit für den Arzneistoff bietet. Um ins Akzeptorkompartiment zu gelangen, muss sich der Arzneistoff aus der Haut in das Akzeptormedium verteilen. Dieser Schritt ist vom NVA-Verteilungskoeffizienten Haut/Akzeptormedium und damit von der NVA-Sättigungslöslichkeit im Akzeptormedium abhängig. Das Entfernen des Arzneistoffs aus der Haut ist notwendig, da sonst der Konzentrationsgradient innerhalb des Stratum corneums kleiner wird und die Diffusion durch die Haut langsamer verläuft. Aus diesem Grund werden für sehr lipophile Substanzen wässrige Akzeptormedien, die 50 % Ethanol (PBE50) oder 6 % Macrogol-20-Oleylether enthalten, empfohlen (OECD 2004).

Beide Akzeptormedien wurden daher mit PBP verglichen. O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) diente als Referenzzubereitung, da bei dessen Untersuchung zu geringe permeierte Mengen auftraten.

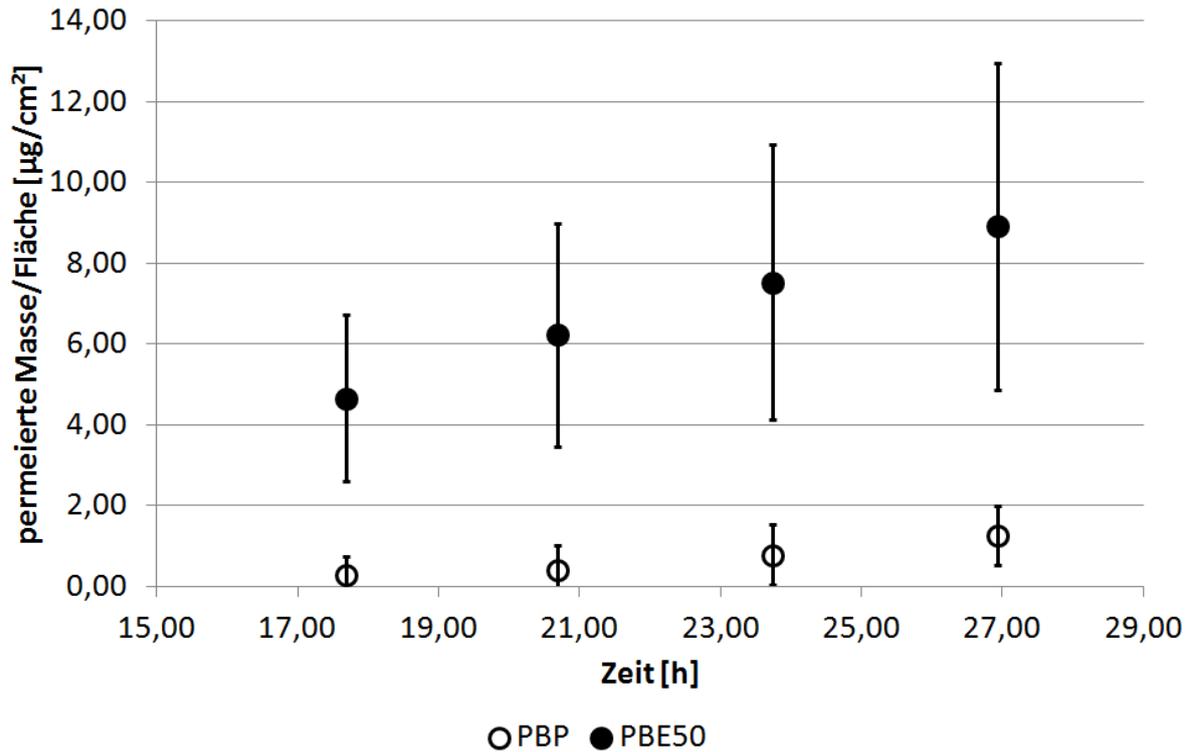


Abbildung 4-24: Permeation von NVA aus O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) bei Verwendung von PBP bzw. PBE50 als Akzeptormedium. (N = 5; Fehlerbalken = Standardabweichung)

Die Permeationsergebnisse, die bei Verwendung von PBP und PBE50 als Akzeptormedium erhalten wurden, sind in Abbildung 4-24 dargestellt. Die Verwendung von Macrogol-20-Oleylether als Akzeptormedium führte zu nicht auswertbaren HPLC-Chromatogrammen. Das Medium wurde daher nicht weiter untersucht.

Wird PBE50 als Akzeptormedium verwendet, permeiert eine wesentlich größere NVA-Masse als bei Verwendung von PBP. Außerdem ist die Permeationsrate bei Verwendung von PBE50 3 bis 4-mal höher (PBE50 = $0,46 \pm 0,16 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{h}^{1/2})$; PBP = $0,11 \pm 0,03 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{h}^{1/2})$).

Die Optimierung des Akzeptormediums verlief erfolgreich, da das Akzeptormedium PBE50 Permeationsuntersuchungen innerhalb eines sinnvollen Versuchszeitraumes ermöglicht.

4.6 Beeinflussung der NVA-Permeation aus O/O-Emulsionen

Ziel dieser systematischen Untersuchung ist es, Formulierungsparameter zu identifizieren, die genutzt werden können, um die Permeationsgeschwindigkeit zu steuern. Die zu detektierenden Effekte sollen groß genug sein um therapierelevant zu sein. Daher wurden die zu untersuchenden Formulierungsparameter und deren gezielte Variation unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Freisetzungsbeflussung (Kapitel 4.4) festgelegt (Abbildung 4-25). Die Rationale dieses Vorgehens besteht darin, dass sich die Permeation der Liberation des Arzneistoffs aus der Formulierung anschließt (Shah 2005). Es ist daher davon auszugehen, dass kleine Unterschiede in der Freisetzung durch die Barrierefunktion des Stratum corneums und die biologische Diversität der Schweinehaut nivelliert werden, sofern keine Interaktion zwischen Formulierung und Vehikel vorliegt. Da kein Einfluss des Emulgatorgehaltes auf die Freisetzungsgeschwindigkeit festgestellt wurde (4.4.4), ist die Variation des Emulgatorgehaltes an dieser Stelle nicht weiter untersucht worden. Zudem wurden ausschließlich O/O-Emulsionen mit einem NVA-Gehalt $\geq 1,0$ % verwendet, da so die zu beobachteten Effekte ausgeprägter auftreten und besser beurteilt werden können.

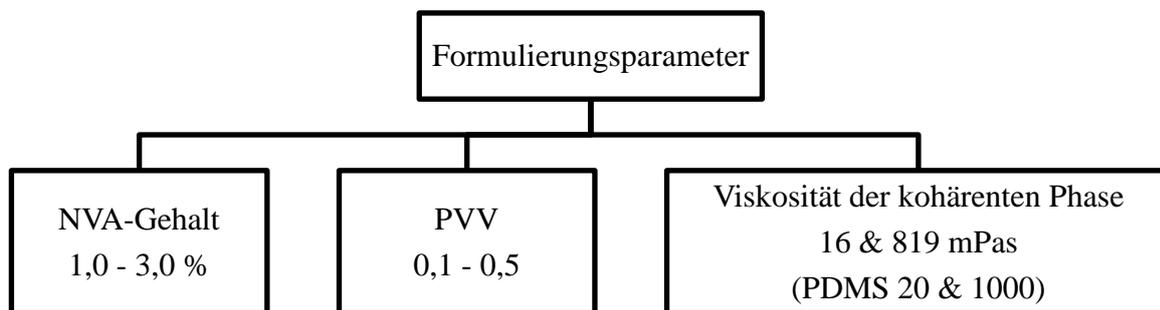


Abbildung 4-25: Untersuchte Parameter zur Permeationsbeeinflussung.

4.6.1 Einfluss des NVA-Gehalts auf die Permeationsgeschwindigkeit

Um den Einfluss des NVA-Gehalts auf die Permeationsgeschwindigkeit zu untersuchen, wurden O/O-Emulsionen mit NVA-Gehalten zwischen 1,0 % und 3,0 % untersucht.

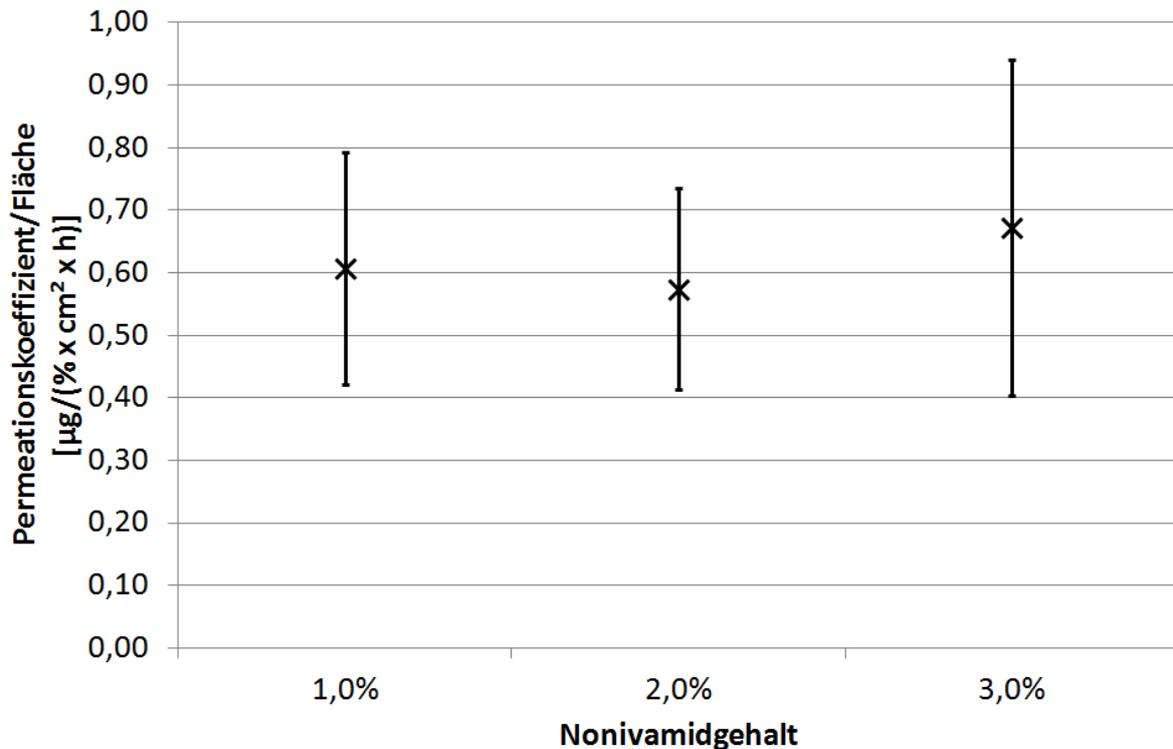


Abbildung 4-26: Einfluss des NVA-Gehalts auf die Permeationsraten von NVA aus O/O 1,0 % – 3,0 % ($\Phi = 0,5$). (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-26 zeigt, dass die Permeationskoeffizienten aller Emulsionen vergleichbar sind. Die Diffusion durch die Haut ist bei Permeationsuntersuchungen im Allgemeinen der langsamste Schritt und bestimmt deshalb die Geschwindigkeit, mit der der Arzneistoff ins Akzeptormedium gelangt. Da die Diffusion durch die Haut passiv erfolgt, lässt sie sich mit Hilfe des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes beschreiben (Hadgraft 2001). Gemäß des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes ist der Quotient aus Flux und applizierter Konzentration konstant und wird als Permeationskoeffizient bezeichnet. Ist dieser Permeationskoeffizient bei unterschiedlichen Arzneistoffgehalten nicht vergleichbar, ist es zu Veränderungen in der Arzneiform oder einer Interaktion mit der Haut gekommen.

Die Untersuchung hat gezeigt, dass die Permeationskoeffizienten unabhängig von der NVA-Konzentration sind. Das bedeutet, dass es weder zu Veränderungen der Arzneiform noch zu einer Interaktion mit der Haut gekommen ist. Es bedeutet außerdem, dass Ergebnisse, die bei einer bestimmten NVA-Konzentration erhalten werden, auf andere NVA-Konzentrationen

übertragen werden können. Als Folge dieses Ergebnisses wurden alle nachfolgend ermittelten Permeationsraten auf ihren tatsächlichen NVA-Gehalt normiert, damit die zu beobachtenden Effekte besser erkennbar sind.

4.6.2 Einfluss des Phasenvolumenverhältnisses auf die Permeationsgeschwindigkeit

Es wurden 4 unterschiedliche Emulsionen mit PVV zwischen 0,1 und 0,5 untersucht, um den Einfluss des PVV auf die Permeationsgeschwindigkeit zu evaluieren.

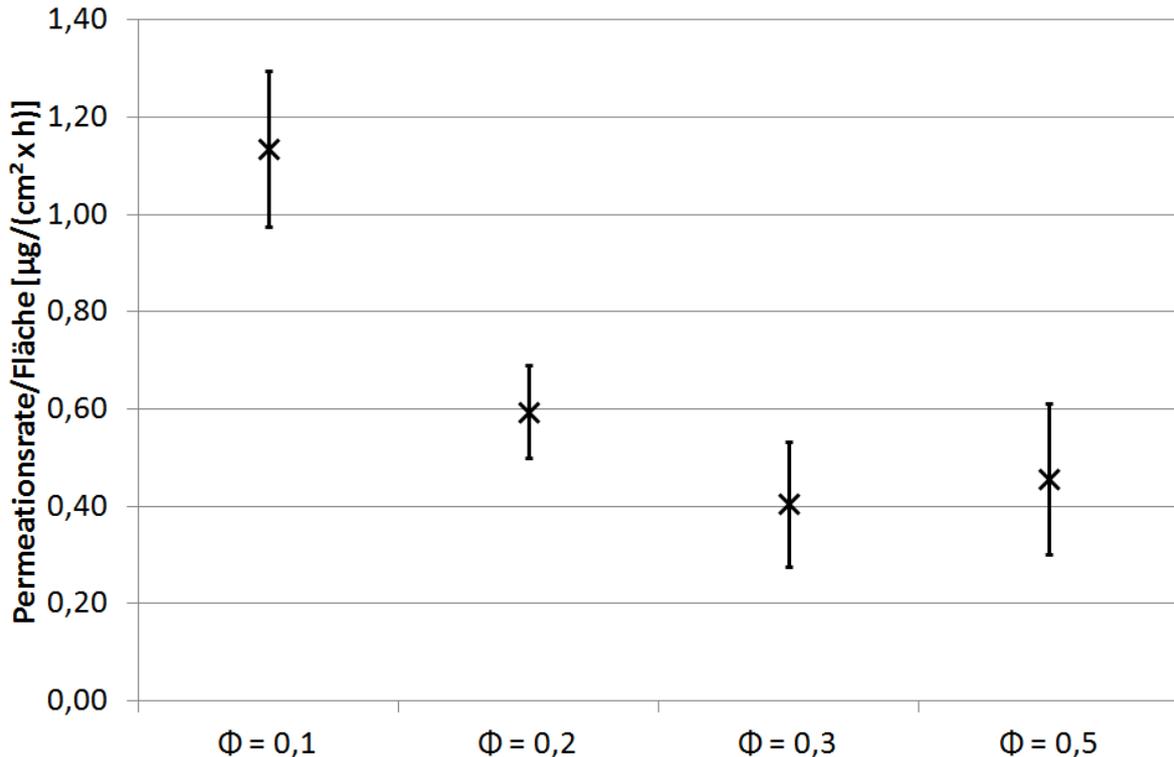


Abbildung 4-27: Einfluss des PVV auf die Permeationsraten von NVA aus O/O 1,0 % ($\Phi = 0,1$ bis 0,5). (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-27 dargestellt: Emulsionen mit einem PVV von 0,1 weisen die höchsten Permeationsraten auf. Eine Erhöhung des PVV auf 0,2 führt zu signifikant kleineren, d. h. nur noch halb so großen Permeationsraten. Eine weitere Erhöhung des PVV führt zu keiner weiteren signifikanten Verringerung der Permeationsrate.

Diese Beobachtungen decken sich prinzipiell mit denen zur PVV-Abhängigkeit der Freisetzungsrates (4.4.3), wenngleich dort noch feinere Abstufungen zwischen den Freisetzungsergebnissen der verschiedenen PVV bestehen.

Der erwartete Zusammenhang zwischen PVV und Permeationsrate kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden.

4.6.3 Einfluss der Viskosität der kohärenten Phase auf die Permeationsgeschwindigkeit

Der Einfluss der Viskosität auf die Permeationsgeschwindigkeit wurde an Hand von O/O-Emulsionen untersucht, deren kohärente Phasen, PDMS 20 bzw. PDMS 1000, sich in ihrer Viskosität wesentlich unterschieden. Das PVV betrug jeweils 0,1, da die Untersuchung zur Viskositätsabhängigkeit der Freisetzungsrates in diesem Fall die größten Unterschiede gezeigt hatte (Kapitel 4.4.5).

Es wurden in diesem Experiment Emulsionen mit 2,0 % Emulgator verwendet, da die O/O-Emulsionen mit PDMS 1000 als kohärenter Phase nur bei diesem Emulgatorgehalt ausreichend stabil waren.

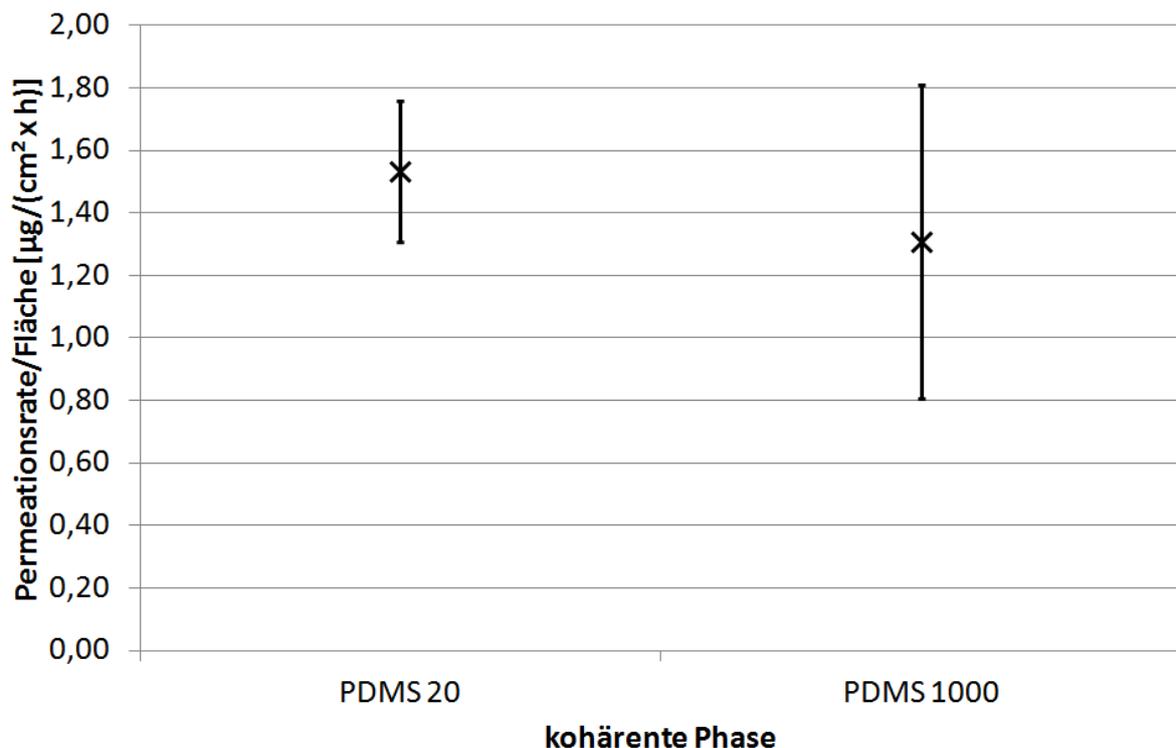


Abbildung 4-28: Einfluss der Viskosität der kohärenten Phase auf die Permeationsrate von NVA aus O/O 1,0 % (2,0 % Emulgator; $\Phi = 0,1$ PDMS 20 bzw. PDMS 1000). (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Die Permeationsraten, die mit PDMS 20 bzw. PDMS 1000 als kohärenter Phase ermittelt wurden, sind in Abbildung 4-28 dargestellt. Die Permeationsraten der beiden O/O-Emulsionen sind statistisch gleich.

Um dieses Ergebnis, das von den Ergebnissen zur Freisetzungsbeflussung abweicht, erklären zu können, ist es notwendig, die Unterschiede zwischen Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen zu berücksichtigen: Membranen für Freisetzungsuntersuchungen werden so

ausgewählt, dass sie die Freisetzung nicht behindern, d. h. die Diffusion durch die Membran ist schneller als die Diffusion in der Arzneiform. Für Permeationsuntersuchungen wird hingegen Haut verwendet, die eine starke Permeationsbarriere darstellt.

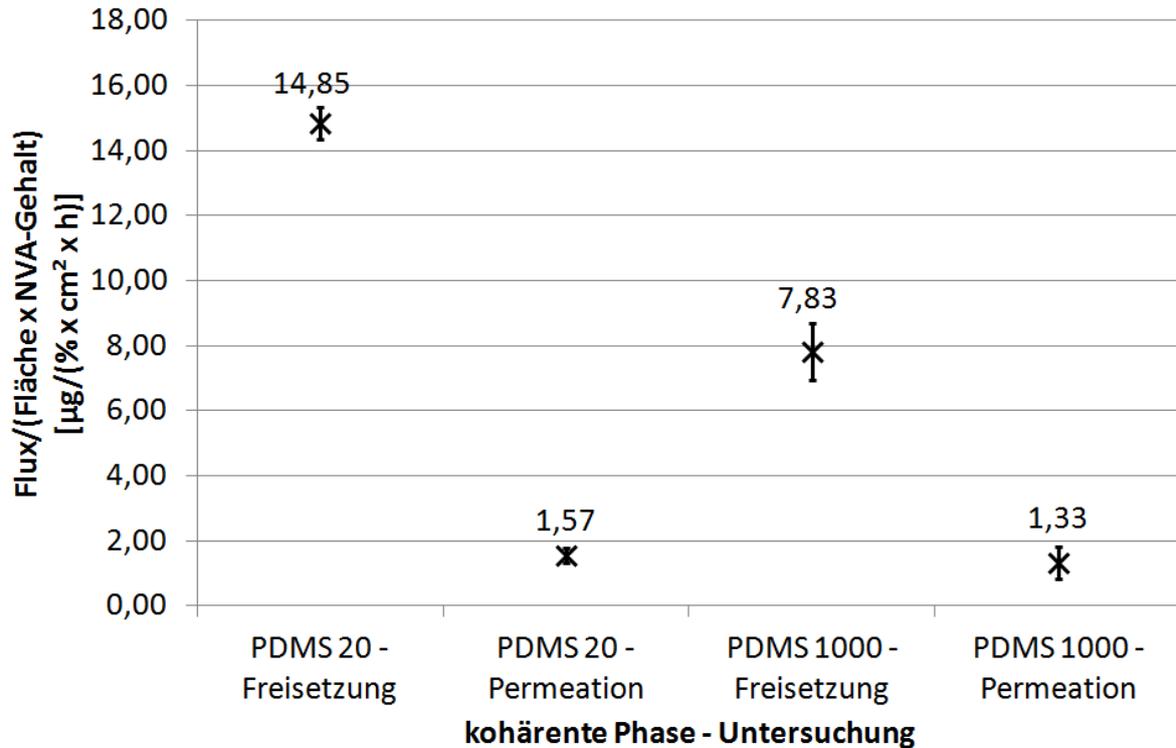


Abbildung 4-29: Vergleich der Quotienten aus Flux und NVA-Gehalt, die bei Freisetzungs- bzw. Permeationsuntersuchungen ermittelt wurden. (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-29 zeigt die Quotienten aus Flux und NVA-Gehalt, die bei Freisetzungs- bzw. Permeationsuntersuchungen ermittelt wurden. Die Abbildung zeigt, dass der Unterschied zwischen den Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen sehr deutlich ist – die Freisetzungskoeffizienten sind ca. 7- bzw. 14-mal höher als die Permeationskoeffizienten. Außerdem ist ersichtlich, dass Freisetzungen bei Verwendung von PDMS 20 doppelt so schnell verlaufen wie bei Verwendung von PDMS 1000. Bei Permeationsuntersuchungen zeigt sich hingegen kein Unterschied zwischen Emulsionen mit PDMS 20 bzw. PDMS 1000 als kohärenter Phase. Das bedeutet, dass die unterschiedlichen Freisetzungsgeschwindigkeiten der Emulsionen irrelevant sind, da nicht die Freisetzung, sondern die Permeation durch die Haut geschwindigkeitsbestimmend ist.

4.6.4 Zusammenfassung

Ein proportionaler Zusammenhang zwischen NVA-Gehalt und Permeationsgeschwindigkeit konnte gezeigt werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen zur Freisetzungsbeflussung (4.4.2) und dem aktuellen Stand der Wissenschaft (Hadgraft 2001).

Auch die Abhängigkeit der Permeationsgeschwindigkeit vom PVV konnte nachgewiesen werden. Die Unterschiede sind jedoch deutlich kleiner als bei den Untersuchungen zur Freisetzungsbeflussung. Bei einem PVV von 0,1 wird die höchste Permeationsrate erhalten. Bei einem PVV von 0,2 ist die Permeationsrate signifikant niedriger, sinkt aber nicht weiter bei nochmals gesteigerten PVV.

Der Zusammenhang zwischen der Viskosität der kohärenten Phase und der Permeationsgeschwindigkeit wurde ebenfalls untersucht. Es konnte jedoch keine Korrelation gezeigt werden. Dieses Ergebnis ist mit der ausgeprägten Barrierefunktion der Haut im Vergleich zu den synthetischen Membranen der Freisetzungsbeflussung zu erklären. Die Permeation ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und bestimmt deshalb die Permeationsrate.

Wie erwartet, fallen die Unterschiede bei Verwendung von Haut anstelle synthetischer Membranen deutlich kleiner aus, dennoch konnte gezeigt werden, dass die Permeation über die beiden Parameter NVA-Gehalt und PVV gezielt beeinflusst werden kann.

4.7 Vergleich der NVA-Permeation aus O/O 1,0 %, Rizinusöl 1,0 % sowie HNC 0,1 % und 1,0 %

4.7.1 Vergleich der Permeationsraten zwischen O/O 1,0 % und HNC 0,1 % sowie 1,0 % bei infiniter Dosierung

Da das Ziel der Dissertation die Entwicklung einer Alternative zu bereits bestehenden Formulierungen ist, wurden die Permeationsraten von O/O 1,0 %, HNC 0,1 % und HNC 1,0 % verglichen. HNC stellt eine praxisnahe Formulierung dar, die sich an der bei Pruritus verordneten, offizinellen Rezeptur „Hydrophile Capsaicinoid-Creme 0,025 % / 0,05 % / 0,1 % (NRF 11.125.)“ orientiert. Der Arzneistoffgehalt von 0,1 % entspricht der obersten therapeutisch verwendeten Konzentration. Ein Vergleich mit dessen Permeationsrate soll Aufschluss darüber geben, ob die Permeationsrate von O/O 1,0 % im therapeutischen Bereich liegt. HNC 1,0 % ermöglicht hingegen einen Vergleich mit O/O 1,0 % bei gleicher Arzneistoffkonzentration und zeigt wie stark sich die Arzneiform auf die Permeation auswirkt.

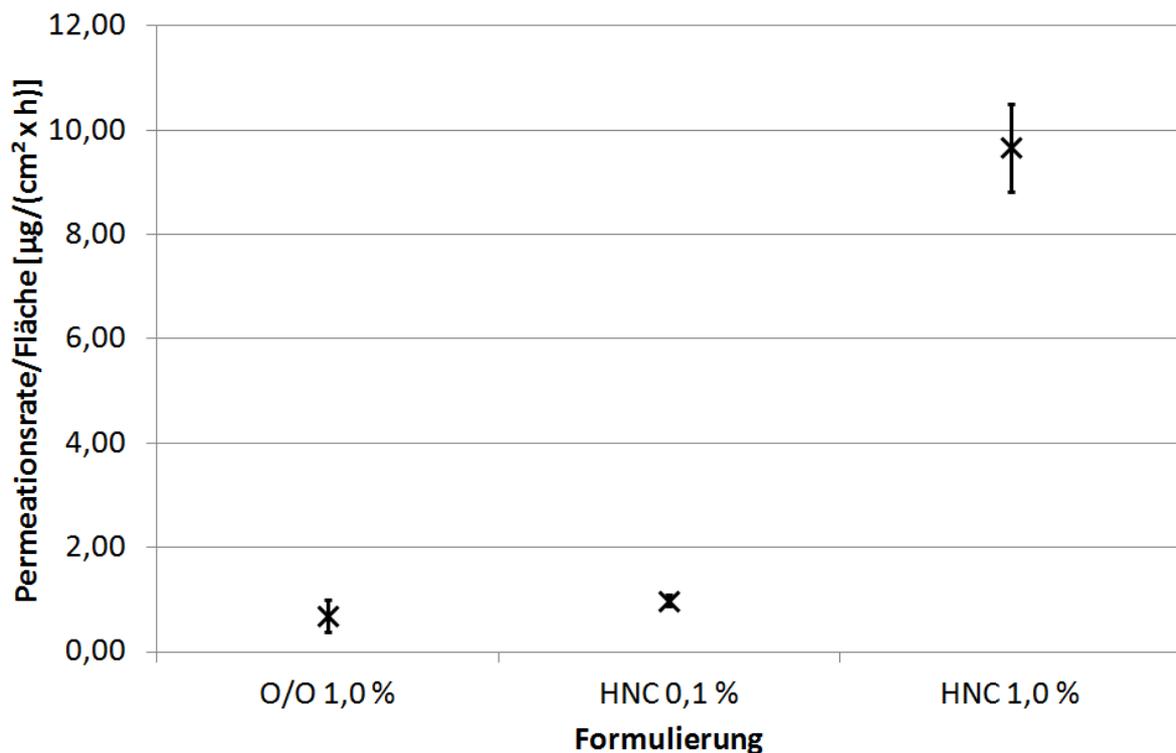


Abbildung 4-30: Vergleich der Permeationsraten von O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$), HNC 0,1 % und HNC 1,0 %. (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-30 zeigt die ermittelten Permeationsraten von O/O 1,0 %, HNC 0,1 % und HNC 1,0 %. Zwischen den Permeationsraten von O/O 1,0 % und HNC 0,1 % besteht kein Unterschied. HNC 1,0 % weist hingegen eine 10-fach höhere Permeationsrate auf.

Der Versuch hat gezeigt, dass O/O 1,0 % die gleiche Permeationsrate wie die therapeutisch verwendete HNC 0,1 % zeigt. Dadurch sollten gleiche Arzneistoffkonzentrationen am Wirkort erreicht werden können, was zu einer äquivalenten Wirksamkeit und Sicherheit der Formulierungen führen sollte (Shah 2005). Zusätzlich verfügt O/O 1,0 % über ein 10-fach größeres NVA-Reservoir als HNC 0,1 % und sollte damit NVA über einen längeren Zeitraum zur Verfügung stellen können. Damit ist O/O 1,0 % eine mögliche therapeutische Alternative zu HNC 0,1 %. Der Vergleich mit HNC 1,0 % zeigt, dass die Freigabe aus O/O 1,0 % erheblich langsamer erfolgt. Der Unterschied ist wesentlich größer als es die Freisetzungsraten vermuten ließen: Die Freisetzungsraten mit HNC 1,0 % ist 2 mal höher als die von O/O 1,0 %, die Permeationsrate von HNC 1,0 % ist jedoch 10 mal höher als die von O/O 1,0 %. Dieser Unterschied war nicht erwartet worden, da die Permeation der Freisetzung folgt und damit der Unterschied in den Permeationsraten maximal dem Unterschied der Freisetzungsraten entsprechen sollte. Diese Betrachtungsweise berücksichtigt jedoch nicht die Interaktion zwischen Arzneiform und Haut. HNC enthält relativ hohe Konzentrationen an Ethanol (10 % m/m) und Propylenglykol (15 % m/m). Beide Substanzen sind als Penetrationsförderer bekannt, die in das Stratum corneum diffundieren und dort die Löslichkeit und Diffusionsgeschwindigkeit für Arzneistoffe erhöhen (Hadgraft 1999). In der Folge ist die Haut bei Applikation von HNC permeabler für NVA als bei Applikation der O/O-Emulsionen.

4.7.2 Vergleich der NVA-Permeation aus O/O 1,0 % und HNC 0,1 % sowie 1,0 % bei finiter Dosierung

Nach dem gezeigt wurde, dass O/O 1,0 % eine Alternative zu HNC 0,1 % darstellen kann (4.7.1), sollte abschließend geklärt werden, ob sich dieses Ergebnis bei Verwendung praxisnaher Versuchsbedingungen reproduzieren lässt. Außerdem sollte geprüft werden, ob O/O 1,0 % eine konstante Permeation über ca. 24 Stunden ermöglicht, da dieser Zeitraum das angestrebte Applikationsintervall darstellt.

In der Theorie ist davon auszugehen, dass O/O 1,0 % NVA über einen längeren Zeitraum als HNC 0,1 % abgeben kann, da die Emulsion bei gleicher Permeationsrate über 10 mal mehr Arzneistoff enthält.

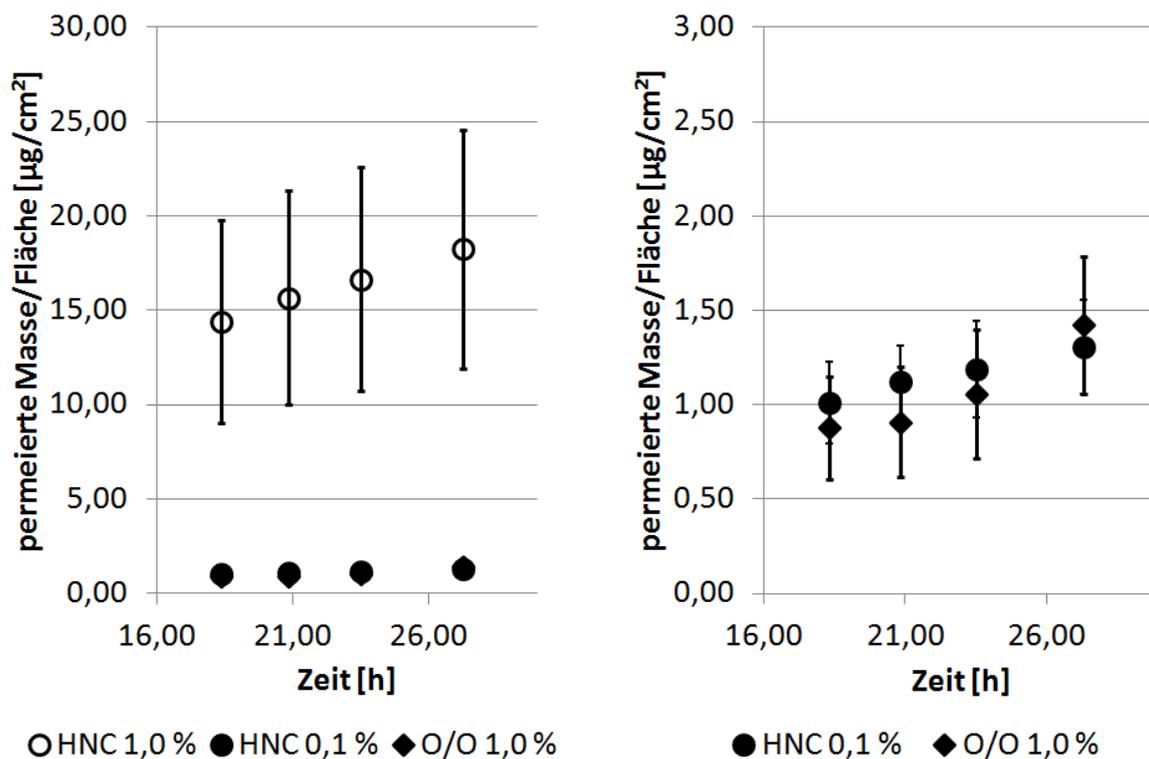


Abbildung 4-31: Permeation von NVA aus HNC 1,0 %, HNC 0,1 % und O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) bei finiter Dosierung. (N = 5; Fehlerbalken = Standardabweichung)

Abbildung 4-31 zeigt den Permeationsverlauf der untersuchten Formulierungen. Im Versuchszeitraum permeiert aus HNC 1,0 % ca. 10-mal mehr NVA als aus den übrigen Formulierungen. Die aus HNC 0,1 % sowie O/O 1,0 % permeierten NVA-Mengen sind vergleichbar. O/O 1,0 % enthält jedoch 10-mal mehr NVA als HNC 0,1 %, so dass ein Vergleich des nach 27,5 h abgegebenen NVA-Anteils, der in Abbildung 4-32 dargestellt ist, interessant ist.

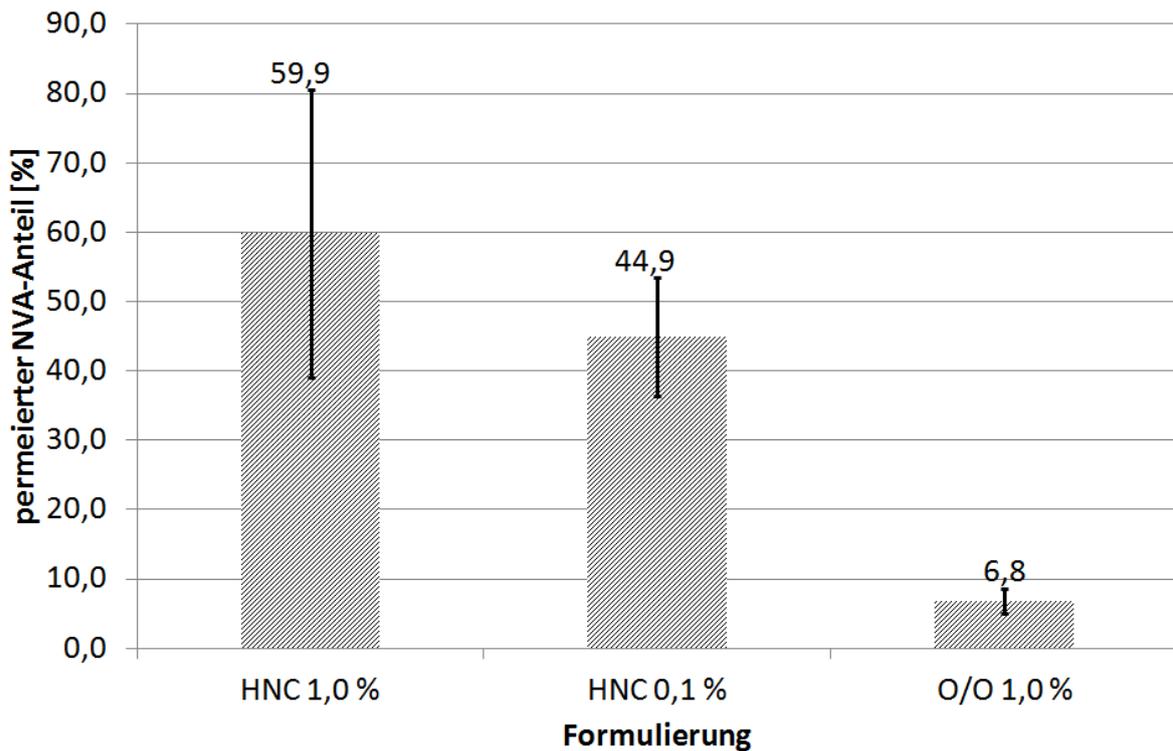


Abbildung 4-32: Permeierter NVA-Anteil nach 27,5 h bei finiter Dosierung. (N = 5; Fehlerbalken = Standardabweichung)

Der im Versuchszeitraum aus HNC 1,0 % und HNC 0,1 % permeierte NVA-Anteil ist vergleichbar und mit 35 bis 80 % wesentlich höher als bei O/O 1,0 %, aus dem weniger als 10 % des enthaltenen NVAs abgegeben werden. O/O 1,0 % enthält somit noch über 90 % des eingesetzten NVAs und ermöglicht damit theoretisch Applikationsintervalle von mehreren Tagen. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse sollte aber auch die einmalige Applikation von HNC 0,1 % ausreichend sein, was jedoch im Widerspruch zu etablierten Dosierungsangaben steht, die eine 2 bis 5-mal tägliche Anwendung vorsehen (ABDA 2011; Ständer et al. 2011).

4.7.3 Vergleich der NVA-Permeation aus O/O 1,0 % und Rizinusöl 1,0 % bei finiter Dosierung

Bei der Durchführung von Permeationsversuchen mit finiter Dosierung ist für das Applizieren der geringen Formulierungsmengen, die ca. 2 mg/cm² entsprechen, das Verreiben der Arzneiformen auf der Haut notwendig, was eine starke Scherung der Formulierung bedeutet und diese unter Umständen zerstören kann. In diesem Fall würde die Freisetzung direkt aus der dispersen Rizinusölphase erfolgen. Um zu überprüfen, ob die O/O-Emulsionen beim Verreiben auf der Haut ihre freisetzung- und permeationssteuernde Funktion einbüßen, wurde die NVA-Permeation aus O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$), O/O 1,0 % ($\Phi = 0,1$) sowie Rizinusöl 1,0 % (RiO 1,0 %) untersucht.

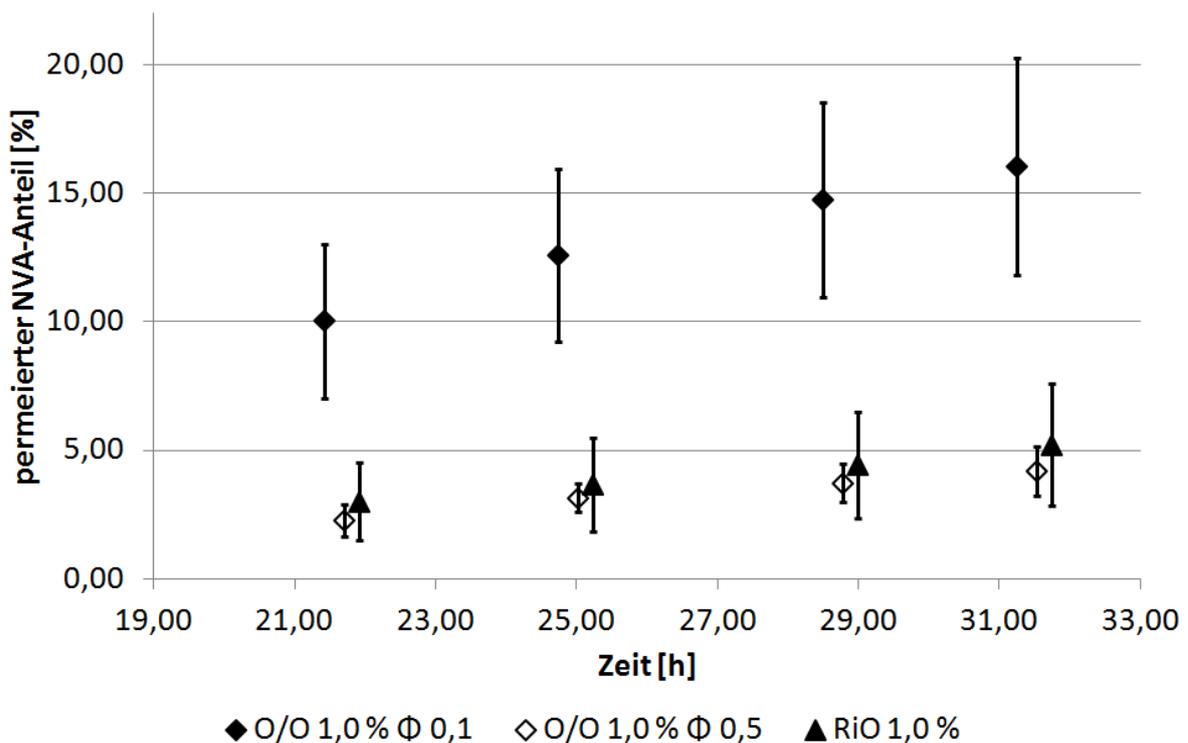


Abbildung 4-33: Permeation von NVA aus RiO 1,0 % und O/O 1,0 % ($\Phi = 0,1$ und $1,0$) bei finiter Dosierung. (N = 5; Fehlerbalken = Standardabweichung)

Abbildung 4-33 zeigt die Permeationsergebnisse der untersuchten Formulierungen. Es ist ersichtlich, dass aus O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) und RiO 1,0 % vergleichbare NVA-Mengen permeieren. Aus O/O 1,0 % ($\Phi = 0,1$) permeiert hingegen ca. 3-mal mehr NVA im Versuchszeitraum. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen zur Permeationsbeeinflussung (siehe 4.6.2) und bedeutet, dass die O/O-Emulsionen erhalten bleiben und die Freisetzung kontrollieren.

4.7.4 Zusammenfassung

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) eine therapeutische Alternative zu HNC 0,1 % darstellt, da die Permeation von NVA aus beiden Formulierungen sowohl bei finiter als auch bei infiniter Dosierung vergleichbar ist.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die O/O-Emulsionen durch die Applikation finiter Dosen, die mit starker Scherung verbunden ist, nicht zerstört werden und weiterhin die NVA-Freisetzung kontrollieren. Im Rahmen dieses Experiments wurde außerdem gezeigt, dass auch bei finiter Dosierung signifikant größere NVA-Mengen aus O/O 1,0 % ($\Phi = 0,1$) als aus O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) permeieren.

4.8 Wasserfestigkeit von O/O 1,0 % und HNC 1,0 %

Wie in 4.7.2 gezeigt wurde, lässt sich die notwendige mehrfache Applikation von HNC 0,1 % nicht allein mit Hilfe des Permeationsverlaufs erklären. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise darauf, dass niedrigdosierte Capsaicinpräparate eine mangelhafte Substantivität zeigen und daher eine häufigere Applikation erfordern (Anand et al. 2011). Um zu klären, ob dies auch bei HNC 0,1 % ein Problem sein könnte und O/O 1,0 % diesbezüglich Vorteile bietet, wurde die Wasserfestigkeit der Formulierungen getestet.

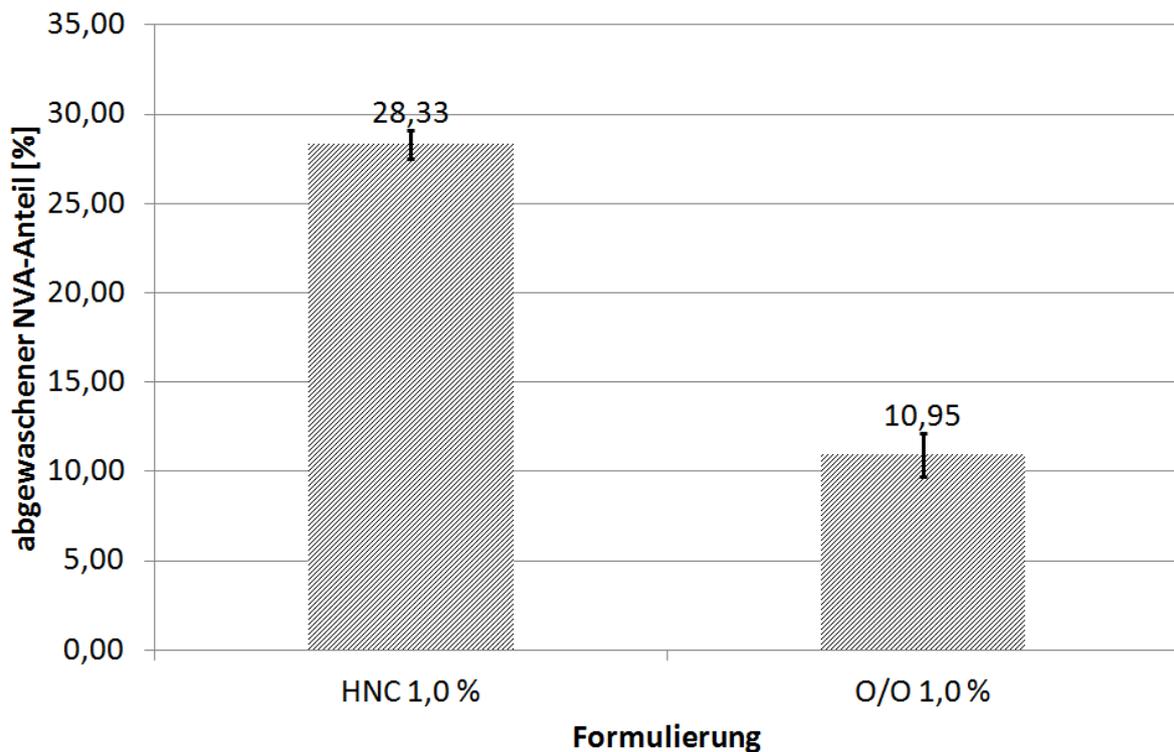


Abbildung 4-34: Wasserfestigkeit von HNC 1,0 % und O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$). (N = 6; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Abbildung 4-34 zeigt die Ergebnisse des Wasserfestigkeitstests. O/O 1,0 % zeigt eine ca. 3-mal höhere Wasserfestigkeit als HNC 1,0 %.

Die Grundlage der HNC 1,0 % ist die Basiscreme DAC (vergleiche 3.3.3), eine hydrophile Creme, die mit Wasser verdünn- und abwaschbar ist (ABDA 2010). Die O/O-Emulsion besteht hingegen aus hydrophoben Ölen und einem Emulgator, der ausschließlich Wasser-in-Öl- sowie Wasser-in-Silikonöl-Emulsionen stabilisiert. Sie sind deshalb nicht so leicht mit Wasser abwaschbar.

Die vom Patienten mit Formulierung behandelten Hautareale kommen durch Körperreinigung und Transpiration mit Wasser in Kontakt, so dass die Möglichkeit besteht, dass diese Formulierungen vorzeitig von der Haut entfernt werden. Dadurch wird der Arzneistofftransport unterbrochen und eine erneute Applikation ist notwendig. Da O/O 1,0 % eine höhere Wasserfestigkeit als HNC 1,0 % zeigt, ist davon auszugehen, dass sie länger am Applikationsort verbleibt und längere Applikationsintervalle als HNC ermöglicht.

5 Abschlussdiskussion

5.1 Die Vorhersage der Emulsionsphasenlage bei Verwendung von Silikontensiden

Silikontenside erweitern dank ihrer speziellen Eigenschaften, die in 2.3.4 besprochen wurden, das Spektrum dermalen Formulierungen. Diese Eigenschaften sind jedoch noch nicht umfassend erforscht, so dass die Datenlage im Vergleich zu kohlenwasserstoffbasierten Emulgatoren deutlich schlechter ist. Dies betrifft insbesondere die Vorhersage der zu erwartenden Phasenlage. Für diese existieren zwar Ideen, aber keine etablierten Modelle (Suiithimeathegorn et al. 2005). Zwei dieser Ideen werden nachfolgend vorgestellt und mit den im Rahmen der Dissertation erhaltenen Ergebnissen verglichen.

Suiithimeathegorn et al. (Suiithimeathegorn et al. 2005) schlussfolgern auf Grund ihrer Daten, dass die Bancroftregel auch für Silikontenside Gültigkeit besitzt, d. h. dass diejenige Phase die kohärente Phase bildet, in der sich das Silikontensid löst.

O'Lenick et al. (O'Lenick et al. 1996) stellen eine Erweiterung des HLB-Konzeptes vor, das sie „Three-dimensional HLB“ nennen. Dieses dreidimensionale HLB-Konzept bezieht die hydrophilen, lipophilen und silikonophilen Eigenschaften eines Silikontensids in die Vorhersage der Phasenlage mit ein.

Beide Modelle beruhen auf rationalen Ansätzen, haben in der Praxis aber ihre Grenzen, wie die Ergebnisse zur Emulsionsbildung und Phasenlage in Tabelle 5-1 zeigen (siehe auch 4.2.1).

Tabelle 5-1: Phasenlage der O/O-Emulsionen direkt nach Herstellung. PVV = 0,5. – = keine Emulsionsbildung.

Handelsname	Silikontensid	CPS	PDMS 20
		Phasenlage	Phasenlage
DC 5225c	PEG/PPG-18/18-Dimethicon	RiO/SiO	RiO/SiO
DC 190	PEG/PPG-18/18-Dimethicon	SiO/RiO	–
DC 2502	Cetyldimethicon	–	–
DC 5200	Lauryl-PEG/PPG-18/18-Dimethicon	SiO/RiO	SiO/RiO
Emulsifier 10	Lauryl-PEG/PPG-18/18-Dimethicon	–	–
DC 9011	PEG-12-Dimethicon-Crosspolymer	RiO/SiO	RiO/SiO
BY 11-030	PEG/PPG-19/19-Dimethicon	RiO/SiO	RiO/SiO

Betrachtet man die Ergebnisse in Tabelle 5-1, fällt auf, dass mehrere Handelspräparate die gleichen Silikontenside beinhalten, aber dennoch unterschiedliche Resultate zeigen. DC 5225c bildet unabhängig vom verwendeten Silikonöl RiO/SiO-Emulsionen aus. DC 190

bildet hingegen bei Verwendung von CPS eine SiO/RiO-Emulsion und stabilisiert PDMS 20-haltige Emulsionen gar nicht. Ebenso stabilisiert DC 5200 SiO/RiO-Emulsionen, wohingegen Emulsifier 10 überhaupt keine Emulsionen stabilisiert. Diese Ergebnisse sind reproduzierbar und wahrscheinlich auf nicht genauer spezifizierte Additive der Produkte zurückzuführen. So ist z. B. DC 5225c gemäß der Produktinformation eine Dispersion aus CPS und 10 % PEG/PPG-18/18-Dimethicon (Dow-Corning 2009). Deshalb wurde getestet, ob sich 10 % DC 190, das aus reinem PEG/PPG-18/18-Dimethicon besteht, in CPS dispergieren lassen. Diese Dispersion zeigt jedoch im Vergleich zu DC 5225c eine rasche Phasentrennung. DC 5225c muss also Zusätze zur Dispersionsstabilisierung enthalten, deren Einfluss auf die Emulsionsstabilisierung nicht abzuschätzen ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die einführend vorgestellten Modelle zur Vorhersage der Phasenlage in der Praxis schnell an ihre Grenzen stoßen und die Phasenlage bei Verwendung von Silikontensiden empirisch ermittelt werden muss.

5.2 Die Auswertung der Freisetzungsergebnisse und der Freisetzungsmechanismus der O/O-Emulsionen

Bei der Durchführung von *in vitro* Wirkstofffreisetzungsforschungen stellt sich stets die Frage nach der Auswertung. Die Auswertung kann im einfachsten Fall an Hand des vollständigen Freisetzungsverlaufs erfolgen. Die Auswertung durch berechnete Kennzahlen, die den Freisetzungsverlauf beschreiben, ist jedoch vorteilhafter, da so die Freisetzungsvorgänge verschiedener Freisetzungsforschungen statistisch miteinander verglichen werden können. Zudem erhält man so Hinweise auf den Freisetzungsmechanismus. Für diese parametrische Auswertung ergeben sich 2 verschiedene Ansätze:

(1) Die Beschreibung der Freisetzung erfolgt mit Hilfe des sogenannten Power Laws (Gleichung 5-1), das ursprünglich für polymere Arzneistoffträger entwickelt wurde. Dazu ist keine Kenntnis des genauen Freisetzungsmechanismus erforderlich – die ermittelte Kenngröße n erlaubt sogar Rückschlüsse auf den Freisetzungsmechanismus (Korsmeyer et al. 1983).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Gleichung 5-1

M_t	= zum Zeitpunkt t freigesetzte Substanzmenge
M_∞	= Substanzgesamtmenge
k	= kinetische Konstante
t	= Freisetzungszeit

(2) Die Beschreibung der Freisetzung erfolgt mit modellbezogenen Gleichungen, wie z. B. der Higuchi-Gleichung oder dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz. Diese Gleichungen ergeben sich aus konkreten Freisetzungsmechanismen und erfordern deshalb Vorstellungen oder Kenntnisse über den Freisetzungsmechanismus.

Um Informationen über den Freisetzungsmechanismus der NVA-Freisetzung aus O/O-Emulsionen zu erhalten, wurden beide Herangehensweisen der parametrischen Auswertung bei der Auswertung der NVA-Freisetzungen angewendet.

Die Verwendung des Power Law erweist sich als ungünstig, da viele Messzeitpunkte für die reproduzierbare Bestimmung der Parameter k und n notwendig sind. Außerdem reagieren die beiden Parameter sehr empfindlich auf die bei Freisetzungsversuchen üblichen Standardabweichungen, d. h. dass sich k und n bereits bei geringfügigen Schwankungen der Messwerte stark ändern. Das Power Law kann deshalb keine reproduzierbaren Informationen über den Freisetzungsmechanismus geben.

Die modellbezogene Auswertung erfolgte sowohl mit der Higuchi-Gleichung als auch mit dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz. Die Auswertung der Arzneistofffreisetzung aus Dermatika erfolgt unabhängig vom Formulierungssystem häufig mit der Higuchi-Gleichung. Zu bedenken ist allerdings, dass diese für halbfeste Suspensionssysteme entwickelt wurde. In diesen Systemen bildet sich eine Freisetzungsfrent aus, die im Verlauf der Freisetzung immer größer wird (Higuchi 1961). In einer Emulsion hingegen sind die Tröpfchen der dispersen Phase innerhalb der kohärenten Phase beweglich. Es liegt daher wahrscheinlich ein System vor, in dem es ständig zum Konzentrationsausgleich kommt und das deshalb eine homogene Arzneistoffverteilung aufweist. In diesem Fall sollte sich die Freisetzung durch das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz beschreiben lassen. Abbildung 5-1 zeigt den aus realen Freisetzungsergebnissen berechneten, theoretischen Verlauf der Freisetzungsfrent, der sich ergeben würde, wenn innerhalb der Emulsion kein Konzentrationsausgleich stattfinden würde. Als Beispiele wurden die am schnellsten (O/O $\Phi = 0,1$) und die am langsamsten (O/O $\Phi = 0,5$)

freisetzenden Emulsionen gewählt, um zu prüfen ob unterschiedliche Freisetzungsmechanismen zu erkennen sind.

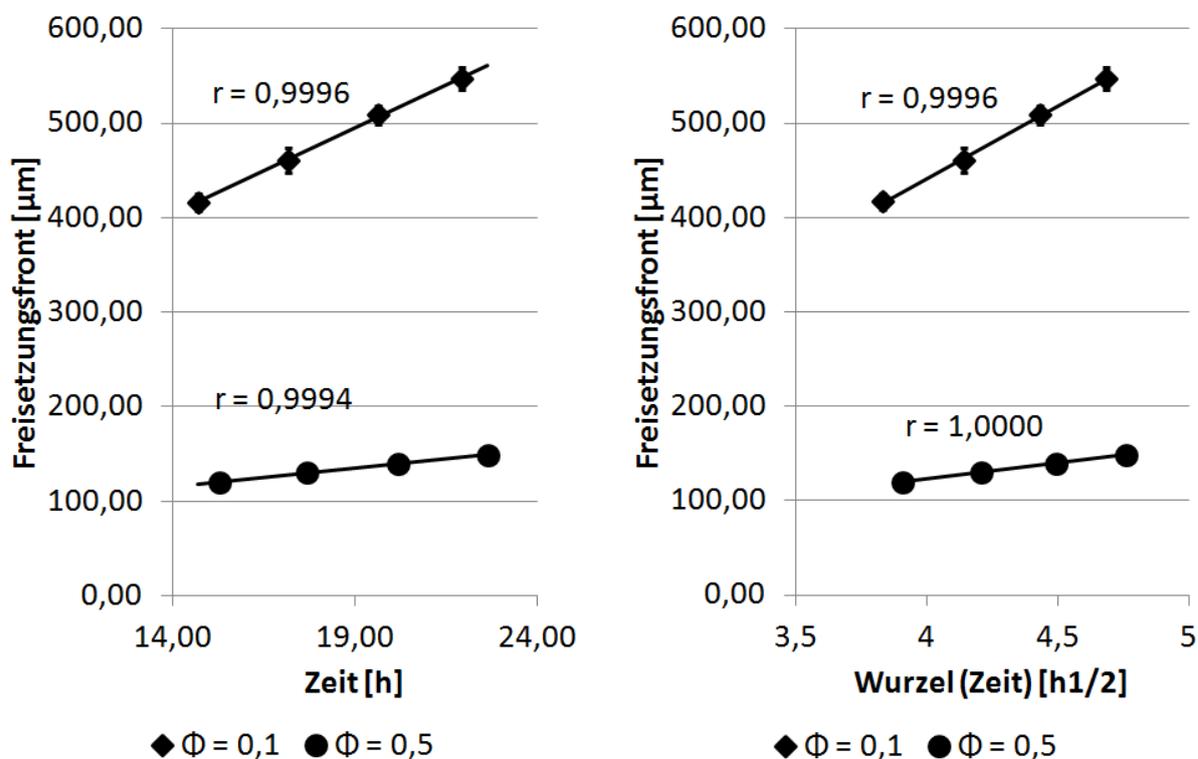


Abbildung 5-1: Theoretischer Verlauf der Freisetzungsfrent bei Untersuchungen an O/O 0,1 %. Links Auswertung gemäß des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes, rechts Auswertung gemäß der Higuchi-Gleichung ($\Phi = 0,5$ und $0,1$). ($N = 5$; Fehlerbalken = Standardabweichung).

In Abbildung 5-1 ist zu erkennen, dass bei O/O 0,1 % ($\Phi = 0,5$) am Ende des Freisetzungszeitraumes ca. 150 μm der insgesamt 2260 μm dicken Emulsionsschicht arzneistoffleer sein müssten und dass es bei O/O 0,1 % ($\Phi = 0,1$) sogar ca. 550 μm sein müssten. Das würde bedeuten, dass der Diffusionsweg der NVA-Moleküle so stark zugenommen hätte, dass bei einer Auswertung gemäß des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes eine Verlangsamung der Freisetzung zu beobachten sein müsste. Dies ist jedoch nicht der Fall, die sehr hohen Korrelationskoeffizienten sprechen eindeutig für einen linearen Zusammenhang zwischen der freigesetzten Arzneistoffmenge und der Zeit. Andererseits sind die Korrelationskoeffizienten bei einer Auftragung der freigesetzten Arzneistoffmenge gegen die Wurzel der Zeit genauso hoch. Dies lässt den Schluss zu, dass sich der Freisetzungsmechanismus weder mit der Higuchi-Gleichung, noch mit dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz vollständig erklären lässt.

Die Freisetzungsergebnisse der Dissertation wurden auf Grund der sehr guten Korrelationskoeffizienten mit Hilfe der Higuchi-Gleichung ausgewertet. Zudem ist so ein Vergleich zwischen den O/O-Emulsionen und der HNC, die ein halbfestes Matrixsystem ist, möglich.

Um weitere Hinweise über den Freisetzungsmechanismus der O/O-Emulsionen zu bekommen, wird im Folgenden die anfängliche Vorstellung, wie NVA aus der O/O-Emulsion freigesetzt wird (Abbildung 5-2), mit den Freisetzungsergebnissen in Verbindung gebracht.

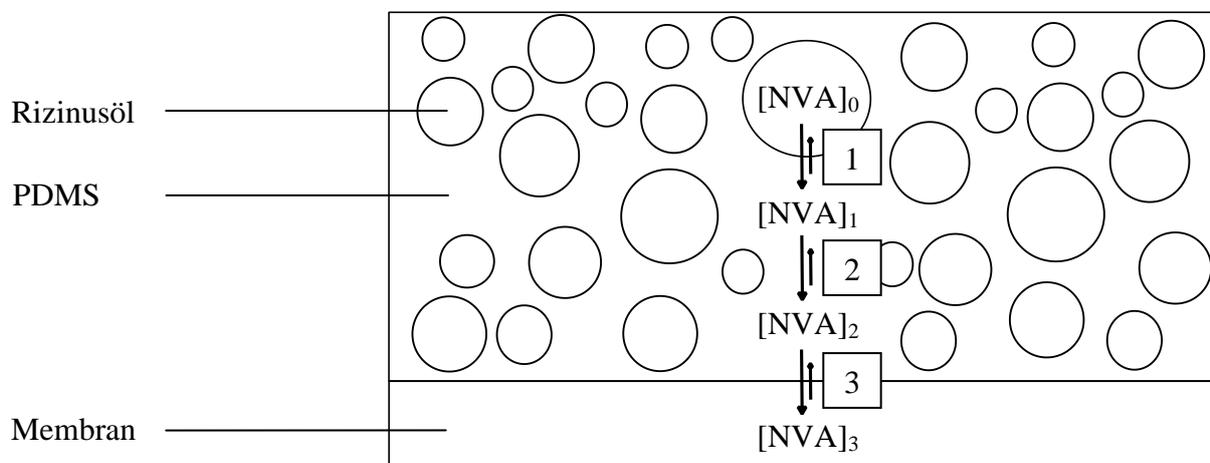


Abbildung 5-2: Freisetzung des Arzneistoffs aus einer Emulsion.
 1 = NVA-Verteilung zwischen Rizinusöl und PDMS. 2 = Diffusion zur Grenzfläche PDMS/Membran.
 3 = NVA-Verteilung zwischen PDMS und Membran.

Die ursprüngliche Vorstellung über den Freisetzungsmechanismus der O/O-Emulsionen geht davon aus, dass NVA auf Grund der sehr hohen Löslichkeit im Rizinusöl sowie der sehr niedrigen Löslichkeit im PDMS nahezu vollständig gelöst im Rizinusöl vorliegt. Die disperse Phase dient also als NVA-Reservoir. Die eigentliche Abgabe des NVAs erfolgt aus dem PDMS. Da NVA eine sehr geringe Löslichkeit in PDMS besitzt, ist der Konzentrationsgradient zwischen kohärenter Phase und Membran sehr klein, so dass die Verteilung in die Membran und damit die Freisetzung sehr langsam verlaufen sollte. Freisetzungsergebnisse haben jedoch gezeigt, dass O/O-Emulsionen eine deutlich höhere Freisetzungsgeschwindigkeit zeigen als dieser postulierte Freisetzungsmechanismus vermuten lässt. So zeigen die Ergebnisse unter 4.3.3.4, dass die NVA-Freisetzung aus O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) halb so schnell wie aus HNC 1,0 % erfolgt. Damit ist die Freisetzungsrate zwar signifikant kleiner, der Unterschied hätte aber deutlich größer sein müssen.

Als Erklärung für dieses Ergebnis liegt nahe, dass die NVA-Freisetzung sowohl aus der kohärenten als auch aus der dispersen Phase erfolgt. Die dargelegte klare Funktionstrennung zwischen disperser und kohärenter Phase funktioniert nur, wenn die disperse Phase nicht in Kontakt mit der Membran ist. Eine typische Auftragsmenge bei Freisetzungsergebnissen von ca. 0,4 mL Formulierung enthält allerdings gemäß eigener Berechnungen zwischen $2,7 \times 10^{10}$ Tröpfchen ($\Phi = 0,1$) und 9×10^{10} Tröpfchen ($\Phi = 0,5$). Das bedeutet, dass ein Teil der dispersen Phase zwangsläufig mit der Membran Kontakt hat und die NVA-Freisetzung auch aus der

dispersen Phase stattfindet. Da die NVA-Konzentration in den Tröpfchen hoch ist, ergibt sich ein großer Konzentrationsgradient zwischen der dispersen Phase und der Membran, so dass die Arzneistoffverteilung in die Membran schnell erfolgen kann.

Um diese These zu untersuchen, wären NVA-Freisetzungsuntersuchungen mit O/O-Emulsionen, deren PVV möglichst klein ist, interessant, da so der Kontakt zwischen disperser Phase und Membran minimiert wird. Dadurch sollte die NVA-Freisetzung aus der kohärenten Phase dominieren und die Freisetzungsgeschwindigkeit erwartungsgemäß klein sein. Dies würde zeigen, dass bereits bei einem PVV von 0,1 so viel disperse Phase vorhanden ist, dass die NVA-Freisetzung aus der dispersen Phase eine wesentliche Rolle spielt. Letztlich wären O/O-Emulsionen mit solch kleinen PVV jedoch nicht sinnvoll, da sie nur ein kleines Arzneistoffreservoir hätten und durch den hohen Anteil an Silikonöl unökonomisch wären.

5.3 Die Vergleichbarkeit von Permeationsergebnissen, die mit Haut unterschiedlicher Spenderindividuen ermittelt wurden

Wie einleitend in 4.5 dargelegt, ist die Haut ein Organ, dessen Struktur und Zusammensetzung einer gewissen Variabilität unterliegen. In der Folge kann die Barrierefunktion des Stratum corneums verschiedener Individuen unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde deshalb streng darauf geachtet, Permeationsuntersuchungen zu vergleichender Formulierungen immer mit Haut desselben Spenderindividuums durchzuführen. Dies hat den Vorteil, dass die Ergebnisse der untersuchten Formulierungen untereinander vergleichbar sind, da dann alle Permeationsverläufe gleichermaßen von einer veränderten Barriereeigenschaft des Stratum corneums betroffen sind. Dieses Vorgehen hat jedoch den Nachteil, dass lediglich 3 bis 4 Formulierungen miteinander verglichen werden können, da die NVA-Permeation aus einer Formulierung als Fünffachbestimmung erfolgt und 2 Ohren durchschnittlich 15 bis 20 Hautstanzen ergibt.

Um zu prüfen, ob dieser gesteigerte experimentelle Aufwand notwendig ist, werden die Permeationsraten von O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$), die in verschiedenen Untersuchungen ermittelt wurden, miteinander verglichen (Abbildung 5-3).

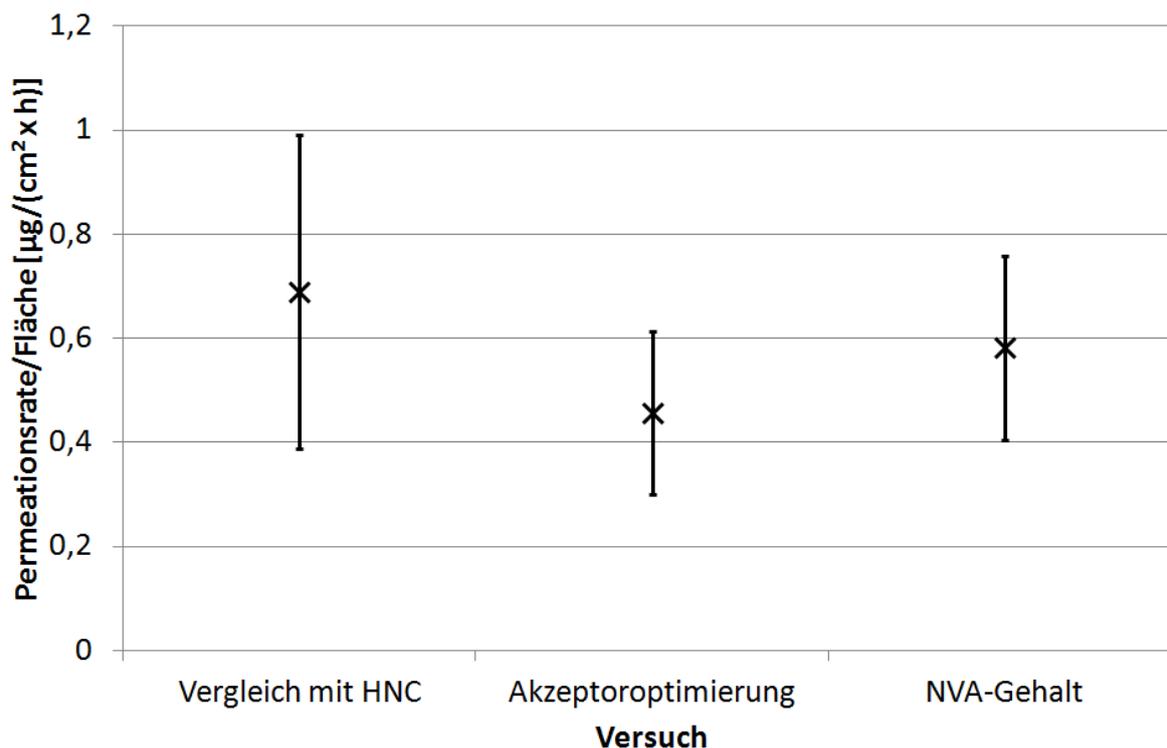


Abbildung 5-3: Permeationsraten von O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$), die im Rahmen verschiedener Permeationsversuche an verschiedenen Tagen und mit Haut verschiedener Spenderschweine ermittelt wurden. (N = 5; Fehlerbalken = 95 %-Konfidenzintervall)

Wie in Abbildung 5-3 zu erkennen ist, überlappen sich die 95 %-Konfidenzintervalle aller Permeationsraten, was bedeutet, dass die Permeationsraten und damit auch die Barriereeigenschaften der verwendeten Häute vergleichbar sind. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Permeationsergebnisse, die mit Haut verschiedener Spenderindividuen erhalten werden, verglichen werden können.

5.4 Das Dosierungsintervall der Hydrophilen Nonivamid-Creme 0,1 %

Es war das Ziel dieser Dissertation eine galenische Alternative zu den bisher zur Pruritustherapie verwendeten niedrigdosierten capsaicinhaltigen Magistralrezepturen zu entwickeln, die längere Applikationsintervalle ermöglicht. Die Frage, wodurch sich das Applikationsintervall ergibt, ist bei halbfesten Dermatika nicht einfach zu beantworten, da es in Dosisfindungsstudien auf Grund der klinischen Wirksamkeit bestimmt wird und sich nicht aus pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Größen wie z. B. der Eliminationshalbwertszeit oder der minimalen Effektkonzentration ergibt. An dieser Stelle sollen deshalb die gesammelten Versuchsergebnisse interpretiert werden, um zu klären, warum Hydrophile Nonivamid-Creme mehrmals täglich auf die Haut aufgetragen werden muss.

Die 2 bis 5-mal tägliche Anwendung capsaicinhaltiger Dermatika erscheint zunächst nicht rational, da bei einer derart lipophilen Substanz die Ausbildung eines Arzneistoffdepots im Stratum corneum wahrscheinlich ist. (Roberts et al. 2005; Dancik et al. 2008; Dancik et al. 2008). Für das strukturell stark mit Capsaicin verwandte Nonivamid ist die Ausbildung eines solchen Depots bekannt und damit auch für Capsaicin anzunehmen. Der Arzneistoff kann durch bestimmte Reize auch noch Tage nach der Anwendung aus diesem Depot freigesetzt werden und seine Wirkung entfalten (Boehringer-Ingelheim 2010). Dennoch müssen Dosisfindungsstudien sowie Anwendungsbeobachtungen für capsaicinhaltige Dermatika eine mehrfache Applikation pro Tag ergeben haben, da sich diese Angaben in allen Dosierungsangaben finden (ABDA 2011; Anand et al. 2011; Ständer et al. 2011).

Die Vermutung war daher, dass niedrigdosierte Formulierungen wie HNC 0,1 % zu wenig Arzneistoff enthalten, um ein Arzneistoffdepot aufbauen zu können und um den Arzneistoff konstant über einen Tag abgeben zu können. Deshalb wurden mit den O/O-Emulsionen Formulierungen entwickelt, die erheblich mehr Arzneistoff enthalten, diesen aber mit der gleichen Geschwindigkeit wie HNC 0,1 % abgeben. Der Vergleich zwischen O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) und HNC 0,1 % zeigt, dass O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) nach 27,5 h noch ca. 6 bis 7 mal mehr NVA als HNC 0,1 % enthält und deshalb den Arzneistoff sogar über mehrere Tage an die Haut abgeben könnte (Abbildung 4-32). Allerdings lässt sich an Hand der Permeationsergebnisse nicht erklären, warum HNC 0,1 % mehrmals täglich appliziert werden muss, denn die Formulierung zeigt über die Zeit einen linearen Freisetzungverlauf und enthält noch ca. 40-60 % Arzneistoff. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise darauf, dass die nicht ausreichende Substantivität der capsaicinhaltigen Dermatika eine häufige Applikation erforderlich macht (Anand et al. 2011). Ein durchgeführter Wasserfestigkeitstest zeigte die deutlich höhere Substantivität der O/O-Emulsion im Vergleich zu HNC (Abbildung 4-34).

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das kurze Applikationsintervall von HNC 0,1 % hauptsächlich auf eine zu geringe Substantivität der Formulierung zurückzuführen ist. O/O-Emulsionen zeigen in dieser Hinsicht einen wesentlichen Vorteil, ob sie aber tatsächlich längere Applikationsintervalle ermöglichen, kann nur eine klinische Studie klären.

6 Zusammenfassung der Dissertation

Das Ziel dieser Dissertation war es, eine galenische Alternative zu den bisher zur Pruritustherapie verwendeten capsaicinhaltigen Magistralrezepturen zu entwickeln, die längere Applikationsintervalle sowie eine auf den Patienten abgestimmte Dosierung ermöglicht. Zu diesem Zweck sollten wasserfreie Öl-in-Öl-Emulsionen hergestellt und der Einfluss der Formulierungsparameter auf die Freisetzungs- und Permeationsgeschwindigkeit untersucht werden.

Untersuchungen zur Mischbarkeit von Polydimethylsiloxan 20 und Cyclopentasiloxan mit verschiedenen flüssigen Lipiden zeigten, dass beide Silikonöle eine Mischungslücke mit Rizinusöl bei einem Phasenvolumenverhältnis von 0,5 aufweisen.

Die Untersuchung der Lagerstabilität verschiedener Rizinusöl-in-Silikonöl-Emulsionen zeigte, dass die Kombination aus Polydimethylsiloxan 20, Rizinusöl und dem Silikontensid BY 11-030 stabile Rizinusöl-in-Silikonöl-Emulsionen mit sehr geringen Tröpfchengrößen ermöglicht.

Es zeigte sich, dass in vitro Franz-Diffusionszellsysteme mit Polycarbonatmembranen und Macrogol 600-haltigem Phosphatpuffer optimal sind, um die Freisetzung von Nonivamid aus Öl-in-Öl-Emulsionen und Hydrophiler Nonivamid-Creme 1,0 % zu untersuchen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Freisetzung von NVA aus Hydrophiler Nonivamid-Creme 1,0 % ungefähr doppelt so schnell verläuft wie aus der Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$).

Die systematische Untersuchung des Einflusses verschiedener Formulierungsparameter auf die Freisetzungsgeschwindigkeit erbrachte folgende Zusammenhänge: Die Freisetzungsrate

- ist proportional zur Nonivamid-Konzentration,
- sinkt mit steigendem Phasenvolumenverhältnis, nimmt jedoch ab einem Phasenvolumenverhältnis von 0,4 nicht weiter ab,
- ist unabhängig vom Emulgatorgehalt und
- ist bei einem Phasenvolumenverhältnis zwischen 0,1 und 0,3 abhängig von der Viskosität der kohärenten Phase, ab einem Phasenvolumenverhältnis von 0,4 jedoch unabhängig von dieser.

Es wurde gezeigt, dass die Kombination aus Spalthaut mit 1 mm Dicke, hergestellt aus Schweineohrhaut und ethanolischem Phosphatpuffer 50 % geeignet ist, um die Permeation von Nonivamid aus dermalen Zubereitungen zu untersuchen.

Die systematische Untersuchung des Einflusses verschiedener Formulierungsparameter auf die Permeationsgeschwindigkeit erbrachte als Ergebnis, dass die Permeationsrate

- proportional zum Nonivamidgehalt ist,
- mit steigendem Phasenvolumenverhältnis sinkt, eine Erhöhung des Phasenvolumenverhältnisses über 0,2 jedoch zu keiner weiteren Reduktion der Permeationsrate führt und dass sie
- unabhängig von der Viskosität der kohärenten Phase ist.

Durch die Bestimmung der Permeationsraten von Nonivamid aus Öl-in-Öl-Emulsionen 1,0 % ($\Phi = 0,5$) sowie Hydrophiler Nonivamid-Creme 0,1 % und 1,0 % konnte gezeigt werden, dass O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$) eine mögliche therapeutische Alternative zu Hydrophiler Nonivamid-Creme 0,1 % ist, da beide Formulierungen vergleichbare Permeationsraten zeigen.

Permeationsuntersuchungen mit finiter Dosierung bestätigten, dass die Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$) und die Hydrophile Nonivamid-Creme 0,1 % einen vergleichbaren Permeationsverlauf zeigen. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Öl-in-Öl-Emulsion auf Grund ihres 10-mal größeren NVA-Reservoirs theoretisch Nonivamid über mehrere Tage liefern könnte.

Permeationsversuche mit finiter Dosierung zeigten, dass die Öl-in-Öl-Emulsionen durch die Scherbelastung beim Auftragen ihre freisetzungsteuernden Eigenschaften nicht einbüßen; die Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,1$) zeigt deutlich höhere permeierte Nonivamid-Mengen im Versuchszeitraum als die Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$) und Rizinusöl 1,0 %.

Die abschließende Prüfung der Wasserfestigkeit der Hydrophilen Nonivamid-Creme 1,0 % und Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$) ergab eine nur geringe Wasserfestigkeit der Hydrophilen Nonivamid-Creme 1,0 %. Die Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$) zeigte eine deutlich höhere Wasserfestigkeit. Deshalb ist davon auszugehen dass die Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$) länger am Applikationsort verbleibt und seltener als die Hydrophile Nonivamid-Creme appliziert werden muss.

Die Permeationsversuche zeigten, dass die mehrmals am Tag erforderliche Applikation von Hydrophiler Nonivamid-Creme 0,1 % nicht auf ein zu kleines Nonivamidreservoir zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Wasserfestigkeitsprüfung erlauben hingegen den Schluss, dass die häufige Applikation auf eine unzureichende Substantivität der Hydrophilen Nonivamid-Creme zurückzuführen ist.

Die entwickelten Öl-in-Öl-Emulsionen sind einfach und schnell herzustellen und ermöglichen eine auf den Patienten individuell abgestimmte Arzneistoffkonzentration. Sie zeigen ein vorteilhaftes Freisetzungs- und Permeationsprofil, durch das über einen langen Zeitraum konstante Mengen an Arzneistoff pro Zeiteinheit abgegeben werden. Ferner zeichnen sie sich durch eine hohe Wasserfestigkeit aus und schaffen so gute Voraussetzungen für eine lange Arzneistoffpermeation. Die Permeation von Nonivamid aus Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$) zeigt ein therapeutisch günstigen Verlauf. Dieser Verlauf wäre auch mit geringeren Phasenvolumenverhältnissen und entsprechend angepassten Nonivamidkonzentrationen erreichbar, allerdings sind Silikonöle relativ teure Hilfsstoffe, so dass die Öl-in-Öl-Emulsion 1,0 % ($\Phi = 0,5$) die ökonomisch sinnvollste Formulierung darstellt.

7 Literaturverzeichnis

ABDA (2010). Basiscreme (B-020). Deutscher Arzneimittel-Codex. K. D. Arzneimittel-Codex, Govi Verlag.

ABDA (2011). Hydrophile Capsaicinoid-Creme 0,025 % / 0,05 % / 0,1 % (NRF 11.125.). Neues Rezeptur-Formularium. K. D. Arzneimittel-Codex, Govi Verlag: 1-8.

Ammon, C. H. H. P. T. (1997). Pharmazeutisches Wörterbuch (9. Auflage), Gruyter.

Anand, P. and K. Bley (2011). "Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch." British Journal of Anaesthesia **107**(4): 490-502.

Azzi, C. G., J. Zhang, et al. (2005). Topical Dermatological Vehicles: Engineering the Delivery System. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 801-803.

Bernstein, J. E. (1991). "Capsaicin and substance P." Clinics in Dermatology **9**(4): 497-503.

Boehringer-Ingelheim (2010). "Fachinformation zur Finalgon Wärmecreme stark."

Bronaugh, R. L., M. Kraeling, et al. (2005). The Fate of Cutaneous Levels of Absorbed Compounds. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 265-268.

Buddenkotte, J. and M. Steinhoff (2010). "Pathophysiology and therapy of pruritus in allergic and atopic diseases." Allergy **65**(7): 805-821.

Chhabra, N., M. L. Aseri, et al. (2012). "Capsaicin: A promising therapy - A critical reappraisal." Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis **2**(1): 8-15.

Corbo, M. (1995). "Techniques For Conducting In Vitro Release Studies On Semisolid Formulations." Dissolution Technologies **2**(1).

Dancik, Y., J. Owen, et al. (2008). Beyond Stratum Corneum. Dermal Absorption and Toxicity Assessment (Second Edition). M. Roberts and K. Walters. New York, Informa Healthcare USA, Inc. **177**: 209-250.

Dancik, Y., J. Owen, et al. (2008). Physiologically Based Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Skin. Dermal Absorption and Toxicity Assessment (Second Edition). M. Roberts and K. Walters. New York, Informa Healthcare USA, Inc. **177**: 179-208.

Dow-Corning (2009). "Dow Corning 5225c Formulation Aid."

EDQM (2012). 2.2.9 Kapillarviskosimetrie. Europäisches Arzneibuch VO 7.1, Deutscher Apotheker Verlag.

EDQM (2012). 2.9.3 Wirkstofffreisetzung aus festen Arzneiformen. Europäisches Arzneibuch VO 7.1, Deutscher Apotheker Verlag.

Einstein, A. (1905). "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen." Annalen der Physik **322**(8): 549-560.

Elias, P. M. (1983). "Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation." J Invest Dermatol **80**(1s): 44s-49s.

Fiedler, H. (2001). Polydimethylsiloxane. Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete. H. Fiedler, Editio Cantor: 1207.

Floyd, D. (1999). Silicone Surfactants: Applications in the Personal Care Industry. Silicone Surfactants. R. M. Hill, Marcel Dekker Inc. **86**: 181-209.

Flynn, G., V. Shah, et al. (1999). "Assessment of Value and Applications of In Vitro Testing of Topical Dermatological Drug Products." Pharmaceutical Research **16**(9): 1325-1330.

Food and Drug Administration (1997). "SUPAC-SS."

Gooding, S. M. D., P. H. Canter, et al. (2010). "Systematic review of topical capsaicin in the treatment of pruritus." International Journal of Dermatology **49**(8): 858-865.

Grams, Y. and J. Bouwstra (2005). Penetration and Distribution in Human Skin Focusing on the Hair Follicle. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 177-188.

Grüning, B. and A. Bungard (1999). Silicone Surfactants: Emulsification. Silicone Surfactants. R. M. Hill, Marcel Dekker Inc. **86**: 209-241.

Hadgraft, J. (1999). "Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery." International Journal of Pharmaceutics **184**(1): 1-6.

Hadgraft, J. (2001). "Skin, the final frontier." International Journal of Pharmaceutics **224**(1-2): 1-18.

Hadgraft, J. and M. Lane (2008). In Vitro-In Vivo Correlations in Transdermal Drug Delivery. Dermal Absorption and Toxicity Assessment (Second Edition). M. Roberts and K. Walters. New York, Informa Healthcare USA, Inc. **177**: 299-308.

Harding, C. R. (2004). "The stratum corneum: structure and function in health and disease." Dermatologic Therapy **17**: 6-15.

Higuchi, T. (1961). "Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension." Journal of Pharmaceutical Sciences **50**(10): 874-875.

Higuchi, W. I. (1962). "Analysis of Data on the Medicament Release from Ointments." Journal of Pharmaceutical Sciences **51**(8): 802-804.

Hill, R. M. (1999). Silicone Surfactants. Silicone Surfactants. R. M. Hill, Marcel Dekker Inc. **86**: 1-48.

Hoffmann, H. and W. Ulbricht (1999). Surface Activity and Aggregation Behaviour of Siloxane Surfactants. Silicone Surfactants. R. M. Hill, Marcel Dekker Inc. **86**: 97-137.

Hwa, C., E. A. Bauer, et al. (2011). "Skin biology." Dermatologic Therapy **24**(5): 464-470.

ICH-Expert-Working-Group (1996) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).

Ikoma, A. (2010). Neuroanatomy of Itch. Pruritus. S. Ständer and L. Misery. London, Springer-Verlag: 3-7.

Kajihara, M., T. Sugie, et al. (2003). "Novel Drug Delivery Device Using Silicone: Controlled Release of Insoluble Drugs or Two Kinds of Water-Soluble Drugs." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **51**(1): 15-19.

Kasting, G., M. Miller, et al. (2005). Evaluation of Stratum Corneum Heterogeneity. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 193-209.

Korsmeyer, R. W., R. Gurny, et al. (1983). "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers." International Journal of Pharmaceutics **15**(1): 25-35.

Kutz, G., R. Daniels, et al. (2011). Emulsionen: Entwicklung, Herstellung, Prüfung, Editio Cantor Verlag.

Lauer, A. (2005). Percutaneous Drug Delivery to the Hair Follicle. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 411-426.

Leonhardt, H. (1990). Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, Thieme Verlag: 343-350.

Levin, J. and H. Maibach (2005). The Correlation Between Transepidermal Water Loss and Percutaneous Absorption: An Overview. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 583-591.

Metz, M. and S. Ständer (2010). "Chronic pruritus – pathogenesis, clinical aspects and treatment." Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology **24**(11): 1249-1260.

Misery, L. (2010). Capsaicin. Pruritus. S. Ständer and L. Misery. London, Springer-Verlag: 265-269.

Monteiro-Riviere, N., R. Baynes, et al. (2008). Animal Skin Morphology and Dermal Absorption. Dermal Absorption and Toxicity Assessment (Second Edition). M. Roberts and K. Walters. New York, Informa Healthcare USA, Inc. **177**: 17-36.

Netzlaff, F., C. M. Lehr, et al. (2005). "The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **60**(2): 167-178.

Nitsche, J. and G. Kasting (2008). Biophysical Models for Skin Transport and Absorption. Dermal Absorption and Toxicity Assessment (Second Edition). M. Roberts and K. Walters. New York, Informa Healthcare USA, Inc. **177**: 251-270.

Norlén, L. (2008). The Physical Structure of the Skin Barrier. Dermal Absorption and Toxicity Assessment (Second Edition). M. Roberts and K. Walters. New York, Informa Healthcare USA, Inc. **177**: 37-68.

O'Lenick, A. and J. Parkinson (1996). "Three-Dimensional HLB." Cosmetics & Toiletries magazine **111**(10).

OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. Paris. **28**.

Patel, K. N. and X. Dong (2010). "An Itch To Be Scratched." Neuron **68**(3): 334-339.

Potenzieri, C. and B. J. Udem (2012). "Basic mechanisms of itch." Clinical & Experimental Allergy **42**(1): 8-19.

Proksch, E., J. M. Brandner, et al. (2008). "The skin: an indispensable barrier." Experimental Dermatology **17**(12): 1063-1072.

Reddy, M. and A. Bunge (2005). Does Desquamation Reduce Permeation? Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 165-175.

Reimann, S., T. Luger, et al. (2000). "Topische Anwendung von Capsaicin in der Dermatologie zur Therapie von Juckreiz und Schmerz." Der Hautarzt **51**: 164-172.

Reyes-Escogido, M., E. G. Gonzalez-Mondragon, et al. (2011). "Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin." Molecules **16**(2): 1253-1270.

Roberts, M., S. Cross, et al. (2005). The Skin Reservoir for Topically Applied Solutes. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 213-232.

Roberts, M. and K. Walters (2008). Human Skin Morphology and Dermal Absorption. Dermal Absorption and Toxicity Assessment (Second Edition). M. Roberts and K. Walters. New York, Informa Healthcare USA, Inc. **177**: 1-16.

Ross, S. E. (2011). "Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease." Current Opinion in Neurobiology **21**(6): 880-887.

Rougier, A. (2005). In Vitro Percutaneous Absorption: A Key Role for Stratum Corneum/Vehicle Partitioning. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 123-136.

Schäfer-Korting, M. and S. Schreiber (2008). Use of Skin Equivalents for Dermal Absorption and Toxicity. Dermal Absorption and Toxicity Assessment (Second Edition). M. Roberts and K. Walters. New York, Informa Healthcare USA, Inc. **177**: 141-161.

Schreiber, S. (2006). Charakterisierung humaner Hautmodelle - Stabilität und metabolische Kapazität sowie vergleichende Untersuchungen zur perkutanen Absorption. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie. Berlin, Freie Universität Berlin. **Doktor der Naturwissenschaften**.

Shah, V. (2005). In Vitro Release from Semisolid Dosage Forms - What Is Its Value? Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 473-479.

Shah, V. P., J. S. Elkins, et al. (1999). "Evaluation of the Test System Used for In Vitro Release of Drugs for Topical Dermatological Drug Products." Pharmaceutical Development and Technology **4**(3): 377-385.

Siepmann, D., C. Weishaupt, et al. (2011). "Evaluation of the German Guideline for Chronic Pruritus: Results of a Retrospective Study on 385 Patients." Dermatology **223**(4): 374-380.

Skin-Care-Forum (2003). The life cycle of a horny cell, BASF Personal Care and Nutrition GmbH.

Somasundaran, P., S. C. Mehta, et al. (2006). "Silicone emulsions." Advances in Colloid and Interface Science **128-130**(0): 103-109.

Ständer, S., U. Darsow, et al. (2011). "Langfassung der Leitlinie "Chronischer Pruritus"." AWMF Leitlinie.

Ständer, S. and T. A. Luger (2010). Neuroreceptors and Neuromediators. Pruritus. S. Ständer and L. Misery. London, Springer-Verlag: 7-17.

Ständer, S., U. Raap, et al. (2011). "Pathogenese des Pruritus." JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft **9**(6): 456-463.

Suitthimeathegorn, O., V. Jaitely, et al. (2005). "Novel anhydrous emulsions: Formulation as controlled release vehicles." International Journal of Pharmaceutics **298**(2): 367-371.

Tandara, A. A. and T. A. Mustoe (2008). "The role of the epidermis in the control of scarring: evidence for mechanism of action for silicone gel." Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS **61**(10): 1219-1225.

Teuscher, E., M. Melzig, et al. (2004). Fette Öle mit spezifischer Wirksamkeit. Biogene Arzneimittel (6. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 465.

Teuscher, E., M. Melzig, et al. (2004). Phenylalkylamine. Biogene Arzneimittel (6. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 479-481.

Thakker, K. and W. H. Chern (2003). "Development and Validation of In Vitro Release Tests for Semisolid Dosage Forms—Case Study." Dissolution Technologies **10**(2).

Trommer, H. and R. H. H. Neubert (2006). "Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration." Skin Pharmacology and Physiology **19**(2): 106-121.

Voigt, R. and A. Fahr (2006). Pharmazeutische Technologie 10. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.

Vuia, A. G. (2007). Rekonstruierte humane Epidermis für die Bestimmung der perkutanen Absorption in vitro - eine Validierungsstudie -. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie. Berlin, Freie Universität Berlin. **Doktor der Naturwissenschaften**.

Wepf, R. and R. H. H. Neubert (2007). "Stratum corneum: Struktur und Morphologie einer Barriere." Pharmazeutische Zeitung **2007**(17).

Wester, R. C. and H. Maibach (2005). Regional Variation in Percutaneous Absorption: Principles and Applications to Human Risk Assessment. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 85-92.

Zatz, J. L. (1995). "Drug Release from Semisolids: Effect of Membrane Permeability on Sensitivity to Product Parameters." Pharmaceutical Research **12**(5): 787-789.

Zatz, J. L. and J. D. Segers (1998). "Technique For Measuring In Vitro Release From Semisolids." Dissolution Technologies **5**(1).

Zhai, H. and H. Maibach (2005). Effects of Occlusion: Percutaneous Absorption. Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. R. L. Bronaugh and H. Maibach, Taylor & Francis Group, LLC. **155**: 235-243.

8 Anhang

8.1 Parameter der Tröpfchengrößenbestimmung mit Hilfe der Software AxioVision Rel. 4.6.3

Verwendet wurde ein halbautomatisches Programm zur Tröpfchengrößenbestimmung, das mit Hilfe des Programmassistenten erstellt wurde. Folgende Parameter wurden dazu gewählt.

Tabelle 8-1: Parameter in AxioVision Rel. 4.6.3 zur automatischen Tröpfchengrößenbestimmung.

Programnteilschritt	Programm-Parameter	Wert
Sigma		10
Segmentierung	alle Phasen dürfen überlappen	ja
löschen von Artefakten, Füllen von Löchern	Entfernen	ja
	Minimum	0
	Maximum	40
	Löcher füllen	ja
	Methode	Erosion/Dilatation
	Toleranz	4
löschen von Artefakten, Füllen von Löchern	Entfernen	ja
	Minimum	0
	Maximum	4
	Löcher füllen	ja
	interaktive Korrektur der Messmaske	Liniendicke

8.2 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Octanol/Wasser für Nonivamid

Der Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser von Nonivamid beträgt 6171 ± 341 (95 %-Konfidenzintervall). Der zugehörige $\lg P$ -Wert $3,791 \pm 0,02405$. Nonivamid weist damit deutliche Lipophilie auf.

8.3 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von NVA in Rizinusöl und PDMS 20

Um abzuschätzen, wie sich NVA zwischen disperser Phase (Rizinusöl) und kohärenter Phase (PDMS 20) verteilt, wurden die NVA-Sättigungslöslichkeiten in Rizinusöl und PDMS 20 bestimmt. Eine exakte Bestimmung der NVA-Löslichkeit in Rizinusöl ist auf Grund seiner hohen Löslichkeit, aber gleichzeitig sehr geringen Lösungsgeschwindigkeit nicht möglich. Versuchsweise ist es jedoch gelungen über 100 mg NVA in 1 mL Rizinusöl zu lösen. Die Sättigungslöslichkeit in PDMS 20 wurde zu $75,4 \mu\text{g/mL}$ bestimmt. Der Verteilungskoeffizient

PDMS 20/Rizinusöl ist damit $< 7,5 \times 10^{-4}$. Es deshalb davon ausgehen, dass NVA in der Emulsion (nahezu) vollständig in der dispersen Phase vorliegt.

8.4 Freisetzungsraten der Methodenentwicklung (4.3.3)

Tabelle 8-2: 95%-Konfidenzintervalle der Freisetzungsraten aus den Versuchen zur Methodenentwicklung.

Formulierung	Membran	Akzeptormedium	Freisetzungsraten/Fläche [$\mu\text{g}/(\text{cm}^2\text{xh}^{1/2})$]
O/O 1,0 %	PTFE 0,2 μm	PB	14,37 +/- 0,97
		PBE	15,04 +/- 0,40
		PBP	17,98 +/- 0,32
	PTFE 5,0 μm	PB	19,65 +/- 1,14
		PBE	27,93 +/- 0,47
		PBP	34,26 +/- 1,69
	PC	PBE	18,84 +/- 0,139
		PBP	31,09 +/- 1,54
HNC 1,0 %	PC	PBE	47,68 +/- 2,17
		PBP	58,78 +/- 3,90

8.5 Freisetzungsraten der Freisetzungsbeflussung (4.4)

Tabelle 8-3: 95%-Konfidenzintervalle der Freisetzungsraten aus den Versuchen zur Freisetzungsbeflussung.

untersuchter Parameter	O/O-Emulsion		Freisetzungsraten/Fläche [$\mu\text{g}/(\text{cm}^2\text{xh}^{1/2})$]
NVA-Gehalt	0,20%		7,12 +/- 0,07
	0,40%		14,00 +/- 0,10
	0,60%		20,58 +/- 0,07
	0,80%		27,96 +/- 0,15
	1,00%		34,45 +/- 0,25
PVV	0,1		12,65 +/- 0,43
	0,2		8,03 +/- 0,35
	0,3		6,17 +/- 0,49
	0,4		3,35 +/- 0,11
	0,5		3,36 +/- 0,07
Emulgatorgehalt	PVV 0,5	1%	39,43 +/- 1,24
		2%	39,71 +/- 1,51
		3%	35,11 +/- 2,16
		4%	31,10 +/- 3,15
		5%	33,39 +/- 0,77
	PVV 0,1	1%	11,63 +/- 1,46
		2%	12,29 +/- 0,66
		3%	12,33 +/- 0,76
		4%	13,31 +/- 0,27
		5%	10,49 +/- 0,90
Viskosität der kohärenten Phase	PVV 0,5	PDMS 20	40,28 +/- 2,26
		PDMS 100	41,10 +/- 2,50
		PDMS 350	42,06 +/- 2,39
		PDMS 1000	38,85 +/- 0,91
		PDMS 12500	42,81 +/- 1,92
	PDMS 1000	PVV 0,1	6,72 +/- 0,81
		PVV 0,2	5,65 +/- 0,54
		PVV 0,3	3,81 +/- 0,61
		PVV 0,4	3,37 +/- 0,29
		PVV 0,5	4,22 +/- 0,20

8.6 Permeationsraten der Methodenentwicklung (4.5.1)

Tabelle 8-4: 95%-Konfidenzintervalle der Permeationsraten aus den Versuchen zur Methodenentwicklung.

Versuch		Permeationsrate/Fläche [$\mu\text{g}/(\text{cm}^2\text{xh})$]
Vergleich der Hautpräparate (HNC 1,0 %)	Vollhaut	15,21 +/- 3,13
	Spalthaut 1 mm	20,48 +/- 5,17
Optimierung des Akzeptormediums (O/O 1,0 % ($\Phi = 0,5$))	PBP	0,11 +/- 0,03
	PBE50	0,46 +/- 0,16

8.7 Permeationsraten der Permeationsbeeinflussung (4.6)

Tabelle 8-5: 95%-Konfidenzintervalle der Permeationsraten aus den Versuchen zur Permeationsbeeinflussung.

untersuchter Parameter	O/O-Emulsion	Permeationsrate/Fläche [$\mu\text{g}/(\text{cm}^2\text{xh})$]
NVA-Gehalt	1%	0,61 +/- 0,19
	2%	1,15 +/- 0,32
	3%	2,02 +/- 0,81
PVV	0,1	1,14 +/- 0,16
	0,2	0,59 +/- 0,10
	0,3	0,40 +/- 0,13
	0,5	0,46 +/- 0,16
Viskosität der kohärenten Phase	PDMS 20	1,53 +/- 0,23
	PDMS 1000	1,31 +/- 0,50

8.8 Kalibrierung zur HPLC-UV-Methode

Die Kalibrierung erfolgte für jedes Probenlösemittel und jede HPLC-Methode separat und gemäß der ICH-Richtlinie Q 2 (R1) „Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology“ (ICH-Expert-Working-Group 1996).

Bestimmt wurden die Steigung, der Achsenabschnitt sowie der Korrelationskoeffizient (r) der Regressionsgeraden.

Die Bestimmungsgrenze (QL; Gleichung 8-1) wurde gemäß Punkt 7.3.2 und die Nachweisgrenze (DL; Gleichung 8-2) Punkt 6.3.2 der ICH-Richtlinie Q 2 (R1) berechnet (ICH-Expert-Working-Group 1996).

$$QL = \frac{10 \cdot \delta}{S} \quad \text{Gleichung 8-1}$$

QL = Bestimmungsgrenze
 δ = Standardabweichung des Messsignals
S = Steigung der Kalibrierkurve

$$DL = \frac{3,3 \cdot \delta}{S} \quad \text{Gleichung 8-2}$$

DL = Nachweisgrenze
 δ = Standardabweichung des Messsignals
S = Steigung der Kalibrierkurve

8.8.1 Phosphatpuffer pH 7,4 (PB) - Freisetzungsuntersuchungen

Tabelle 8-6: Messwerte und berechnete Kenngrößen der HPLC-UV-Kalibrierung für PB (0,47 µg/mL – 12,42 µg/mL).

C [µg/mL]	Absorption	C _{ist} [µg/mL]	Absorption
12,42	572806	4,97	210309
11,90	507460	4,76	219966
11,81	531797	4,72	203344
9,94	414519	2,48	109779
9,52	404223	2,38	108041
9,45	414519	2,36	102173
7,45	306900	0,50	24013
7,14	305225	0,48	24510
7,08	293855	0,47	22301

Steigung	= 43650 mL/µg
Abschnitt	= -1029
r	= 0,9976

QL	= 0,45 µg/mL
DL	= 0,15 µg/mL

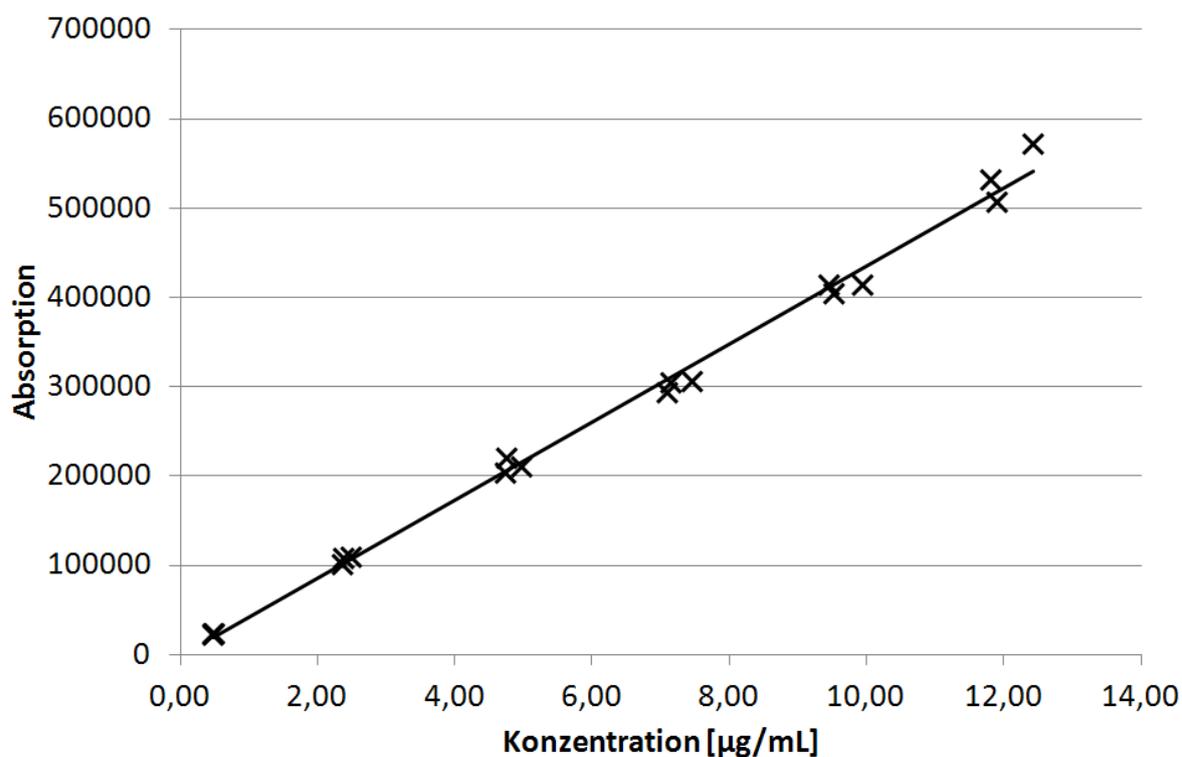


Abbildung 8-1: Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PB (0,47 µg/mL – 12,42 µg/mL).

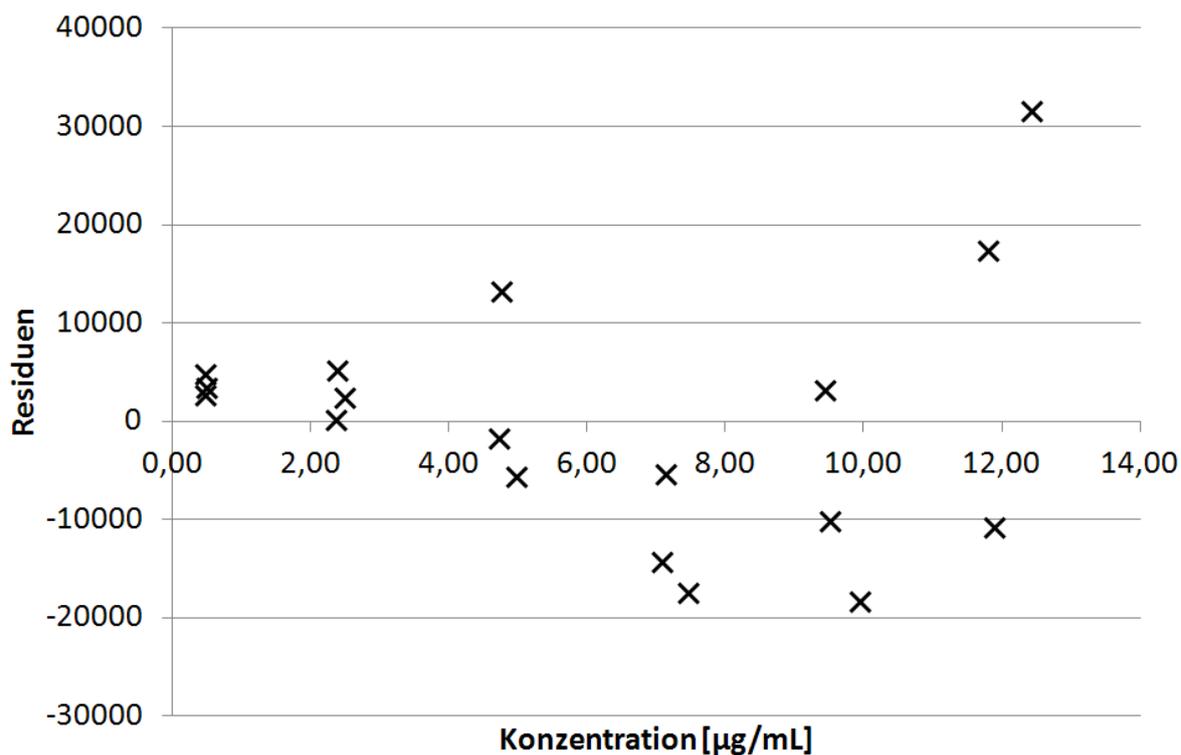


Abbildung 8-2: Residuenplot der Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PB.

8.8.2 Ethanolischer Phosphatpuffer 10 % (PBE) - Freisetzungsforschungen

Tabelle 8-7: Messwerte und berechnete Kenngrößen der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE (0,79 µg/mL – 42,00 µg/mL).

C [µg/mL]	Absorption	C _{ist} [µg/mL]	Absorption
42,00	1986074	15,79	771157
39,16	1852703	12,47	595864
38,88	1821833	12,03	575271
33,60	1577052	11,84	576321
31,33	1524147	10,39	516945
31,10	1519526	10,03	487770
25,20	1207775	9,87	479338
23,33	1087809	4,16	202420
20,78	996034	4,01	221080
20,06	971335	3,95	188540
20,06	970280	2,41	119107
19,74	954066	2,01	100466
18,80	875945	0,83	40352
16,62	789329	0,80	39353
16,04	783180	0,79	37633

Steigung	= 47258 mL/µg
Abschnitt	= 11060
r	= 0,9996

QL	= 1,85 µg/mL
DL	= 0,61 µg/mL

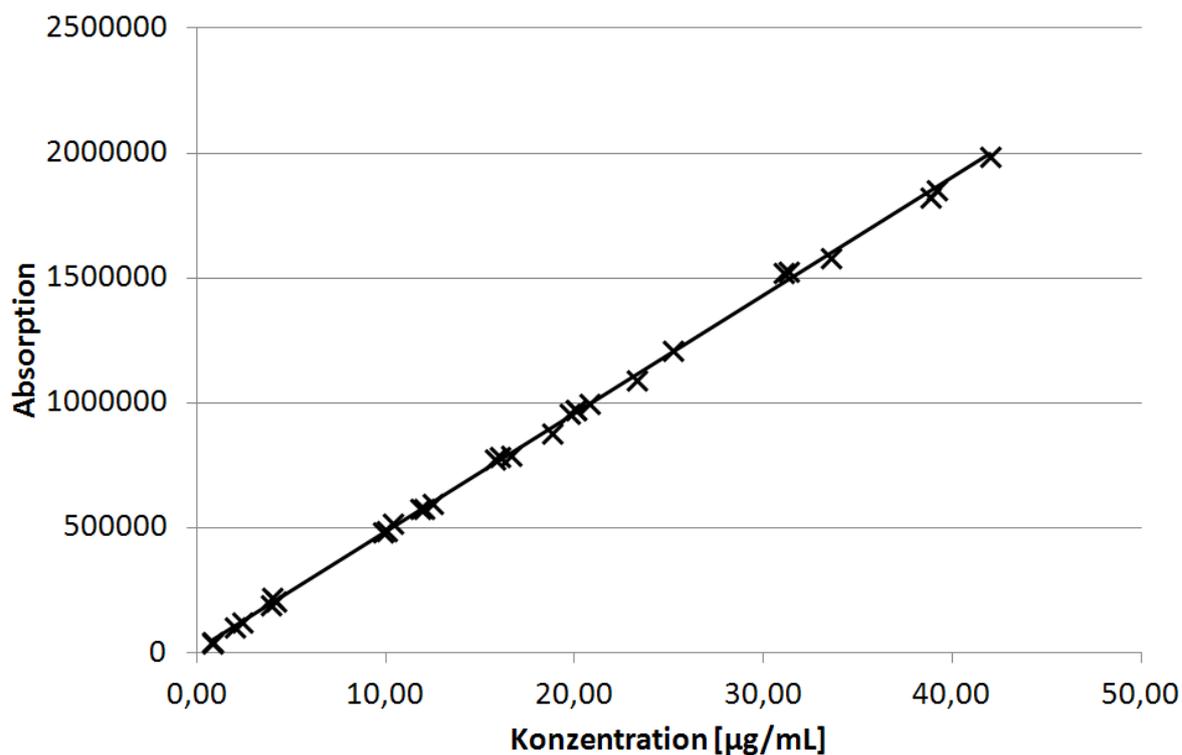


Abbildung 8-3: Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE (0,79 µg/mL – 42,00 µg/mL).

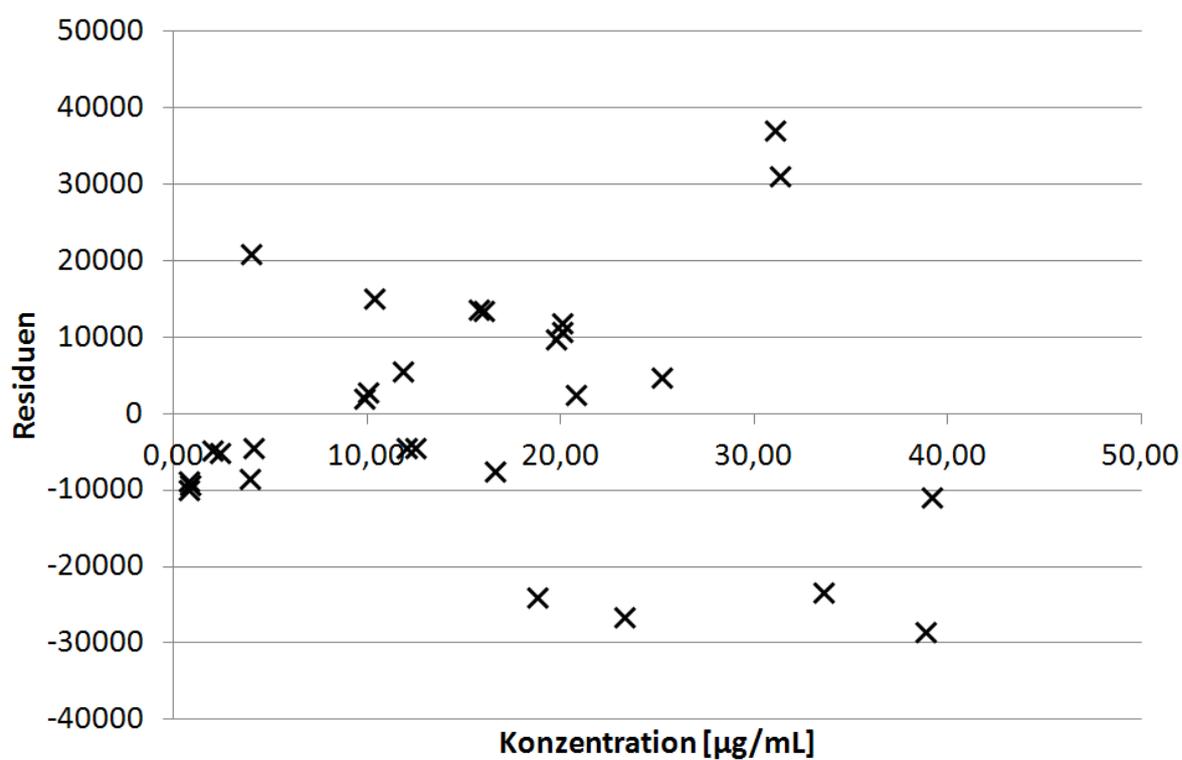


Abbildung 8-4: Residuenplot der Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE.

8.8.3 Macrogol 600-haltiger Phosphatpuffer (PBP) - Freisetzungsuntersuchungen

Tabelle 8-8: Messwerte und berechnete Kenngrößen der HPLC-UV-Kalibrierung für PBP (0,40 µg/mL – 36,72 µg/mL).

C [µg/mL]	Absorption	C _{ist} [µg/mL]	Absorption
36,72	1758621	8,25	377068
36,18	1724524	8,07	362614
33,06	1592988	8,01	356327
29,38	1410516	5,16	222472
28,94	1389488	5,04	217705
26,45	1261923	5,00	207685
22,03	1043858	2,06	79805
21,71	1032091	2,02	80509
19,84	947698	2,00	80827
18,36	890975	1,03	41468
18,09	870081	1,01	35250
16,53	787623	1,00	40545
10,31	477101	0,41	19343
10,09	456138	0,40	17618
10,01	445599	0,40	20987

Steigung	= 48389 mL/µg
Abschnitt	= -16818
r	= 0,9998

QL	= 0,93 µg/mL
DL	= 0,31 µg/mL

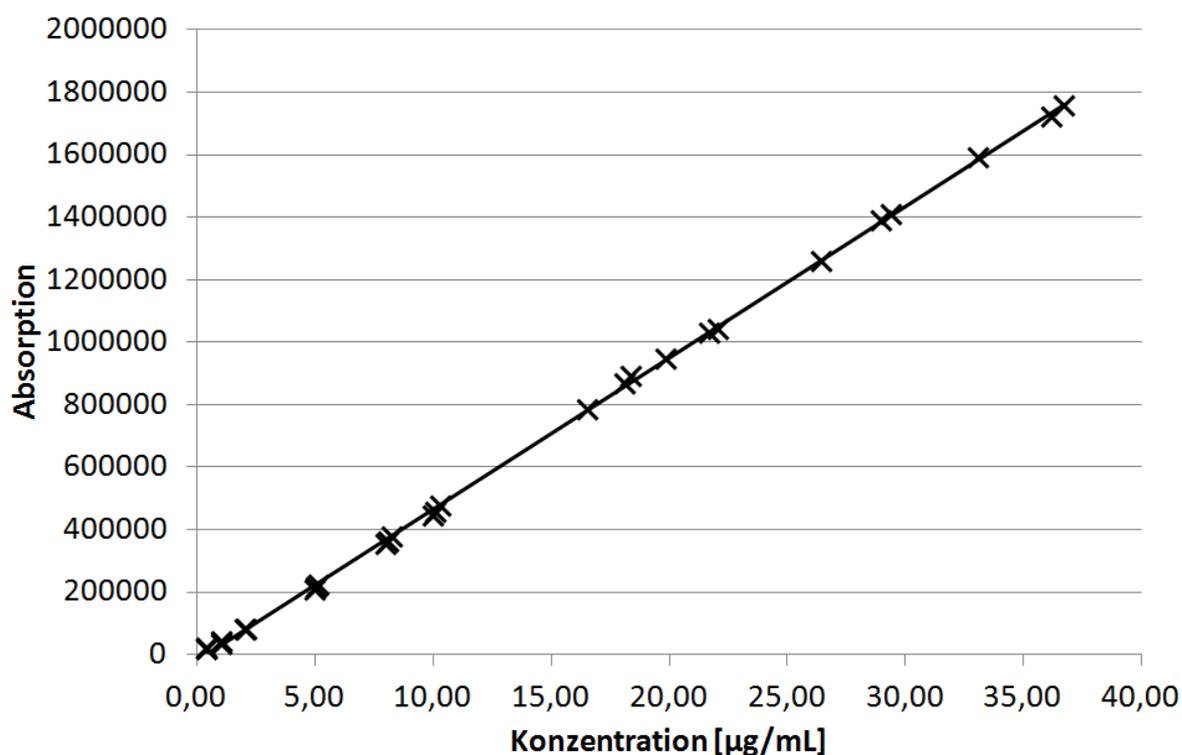


Abbildung 8-5: Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBP (0,40 µg/mL – 36,72 µg/mL).

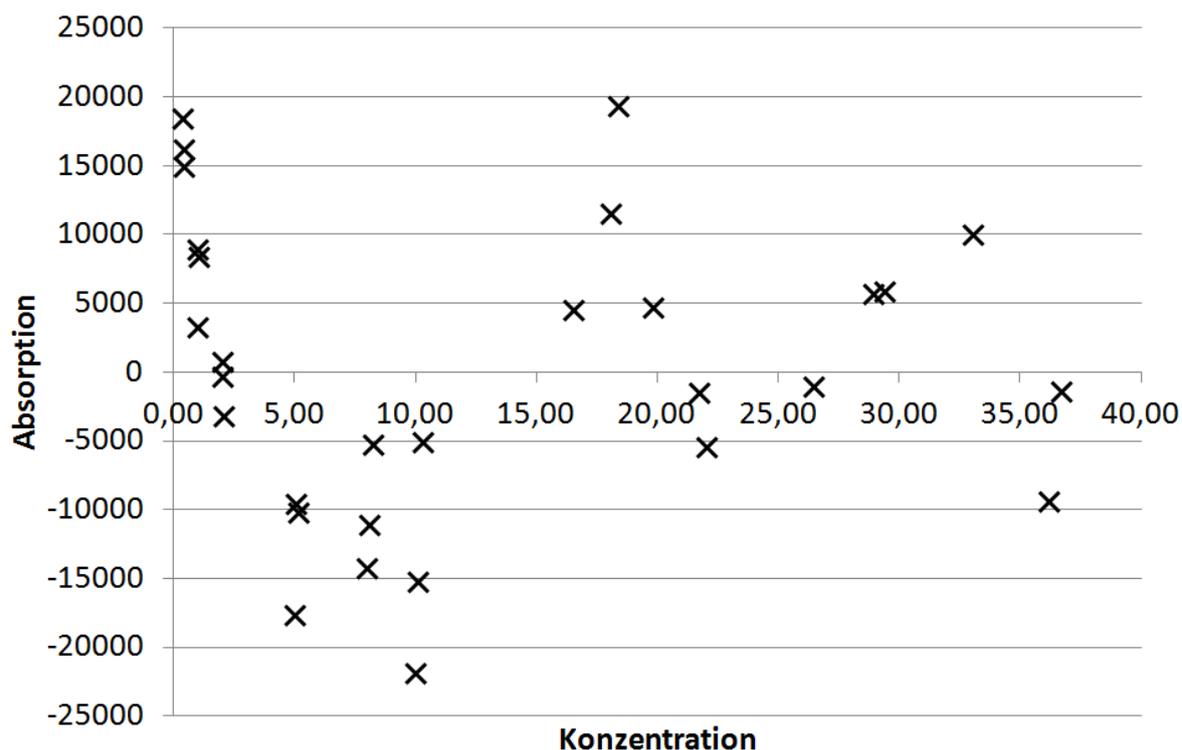


Abbildung 8-6: Residuenplot der Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBP.

8.8.4 Methanol – Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Tabelle 8-9: Messwerte und berechnete Kenngrößen der HPLC-UV-Kalibrierung für Methanol (7,94 µg/mL – 200,68 µg/mL)

C [µg/mL]	Absorption	C _{ist} [µg/mL]	Absorption
200,68	9797007	99,31	4887322
200,64	9732910	60,20	2991293
198,62	9716176	60,19	2973123
160,54	7839027	59,59	2973457
160,51	7767884	20,07	992774
158,90	7871705	20,06	1013797
120,41	5948516	19,86	1020631
120,38	5928322	8,03	397982
119,17	5908958	8,03	377809
100,34	4878378	7,94	419921
100,32	4833230		

Steigung	= 48692 mL/µg
Abschnitt	= 33378
r	= 0,9998

QL	= 10,14 µg/mL
DL	= 3,35 µg/mL

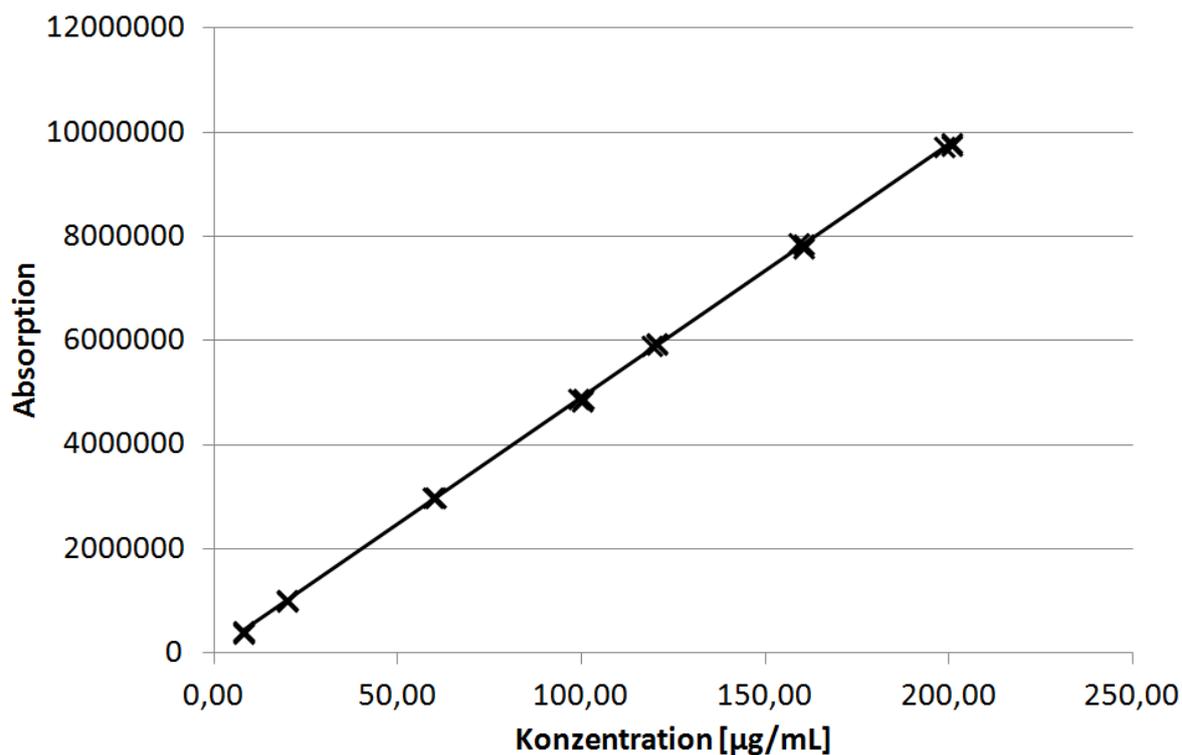


Abbildung 8-7: Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für Methanol (7,94 µg/mL – 200,68 µg/mL).

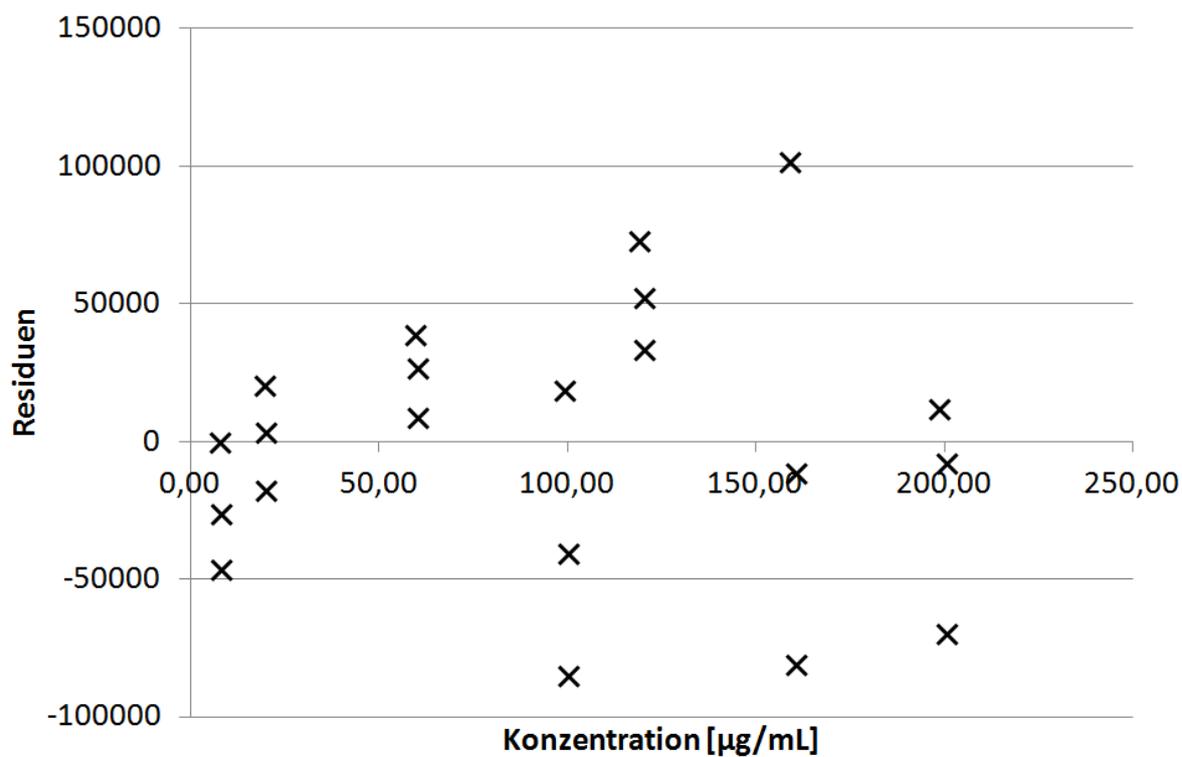


Abbildung 8-8: Residuenplot der Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für Methanol.

8.8.4.1 Macrogol 600-haltiger Phosphatpuffer (PBP) - Permeationsuntersuchungen

Tabelle 8-10: Messwerte und berechnete Kenngrößen der HPLC-UV-Kalibrierung für PBP (0,02 µg/mL – 0,63 µg/mL).

C [µg/mL]	Absorption	C _{ist} [µg/mL]	Absorption
0,63	182155	0,30	100295
0,63	182510	0,19	71716
0,60	176603	0,19	68741
0,51	140970	0,18	70386
0,51	155392	0,06	45216
0,48	144443	0,06	43954
0,38	113736	0,06	41667
0,38	122059	0,02	39784
0,36	112696	0,02	34048
0,32	107796	0,02	32606
0,32	101156		

Steigung	= 240484 mL/µg
Abschnitt	= 28224
r	= 0,9972

QL	= 0,10 µg/mL
DL	= 0,03 µg/mL

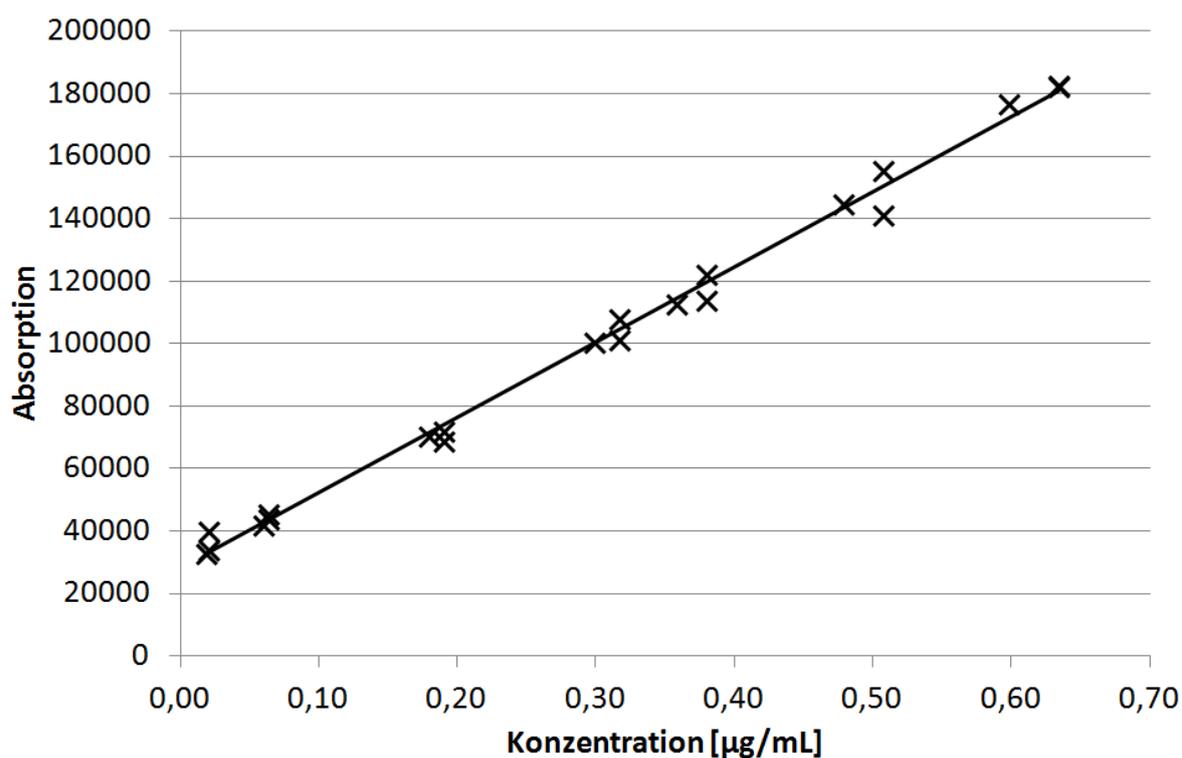


Abbildung 8-9: Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBP (0,02 µg/mL – 0,63 µg/mL).

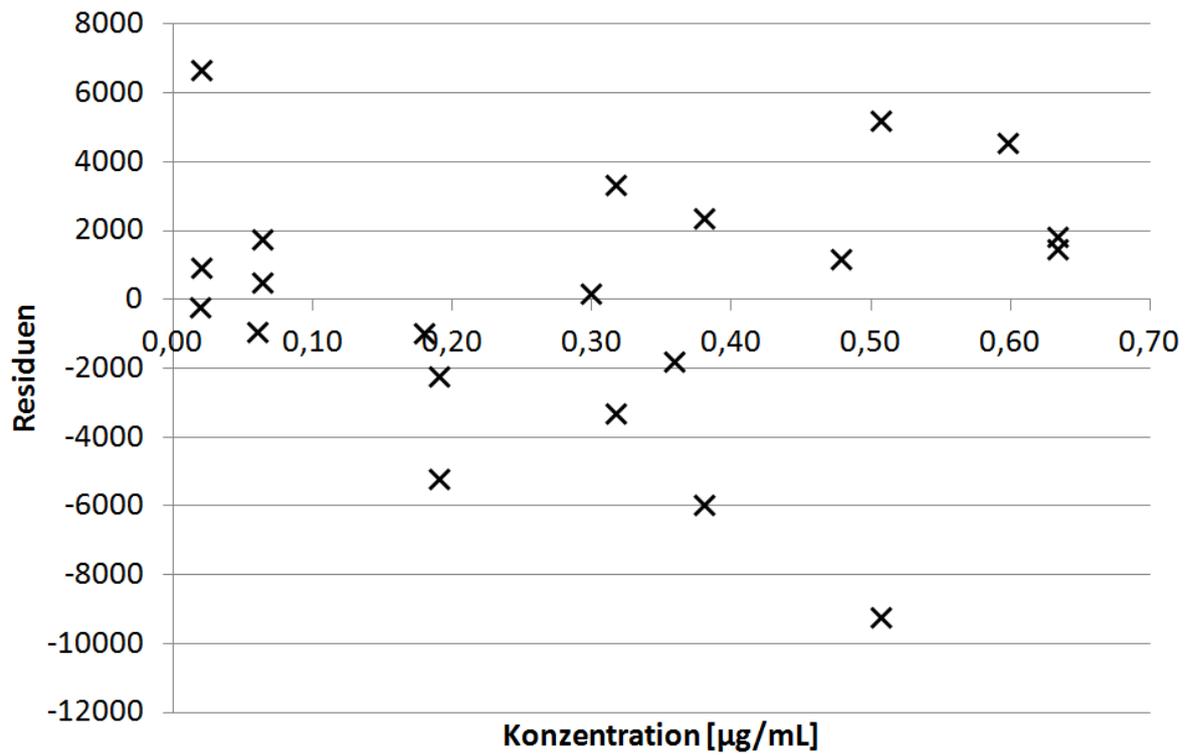


Abbildung 8-10: Residuenplot der Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBB.

8.8.5 Ethanolischer Phosphatpuffer 50 % (PBE50) – Permeationsuntersuchungen

8.8.5.1 Permeationsuntersuchungen mit finiter Dosierung

Tabelle 8-11: Messwerte und berechnete Kenngrößen der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE50 (0,008 µg/mL – 4,790 µg/mL).

C [µg/mL]	Absorption	C _{ist} [µg/mL]	Absorption
4,790	1108980	0,706	164418
4,296	1037048	0,631	145407
4,238	977278	0,621	144302
3,992	919048	0,591	134455
3,648	822576	0,316	70519
3,580	828792	0,311	70562
3,532	815449	0,296	67602
2,395	544663	0,210	48376
2,189	491107	0,207	48895
2,119	481585	0,197	45599
1,597	371329	0,105	28532
1,459	324441	0,104	23741
1,432	325530	0,099	23264
1,052	247106	0,042	10534
1,035	239911	0,041	9858
0,985	228040	0,039	9531
0,798	189103	0,008	3326
0,730	165294	0,008	2115
0,716	164988	0,008	2311

Steigung	= 231536 mL/µg
Abschnitt	= -1034
r	= 0,9996

QL	= 0,08 µg/mL
DL	= 0,03 µg/mL

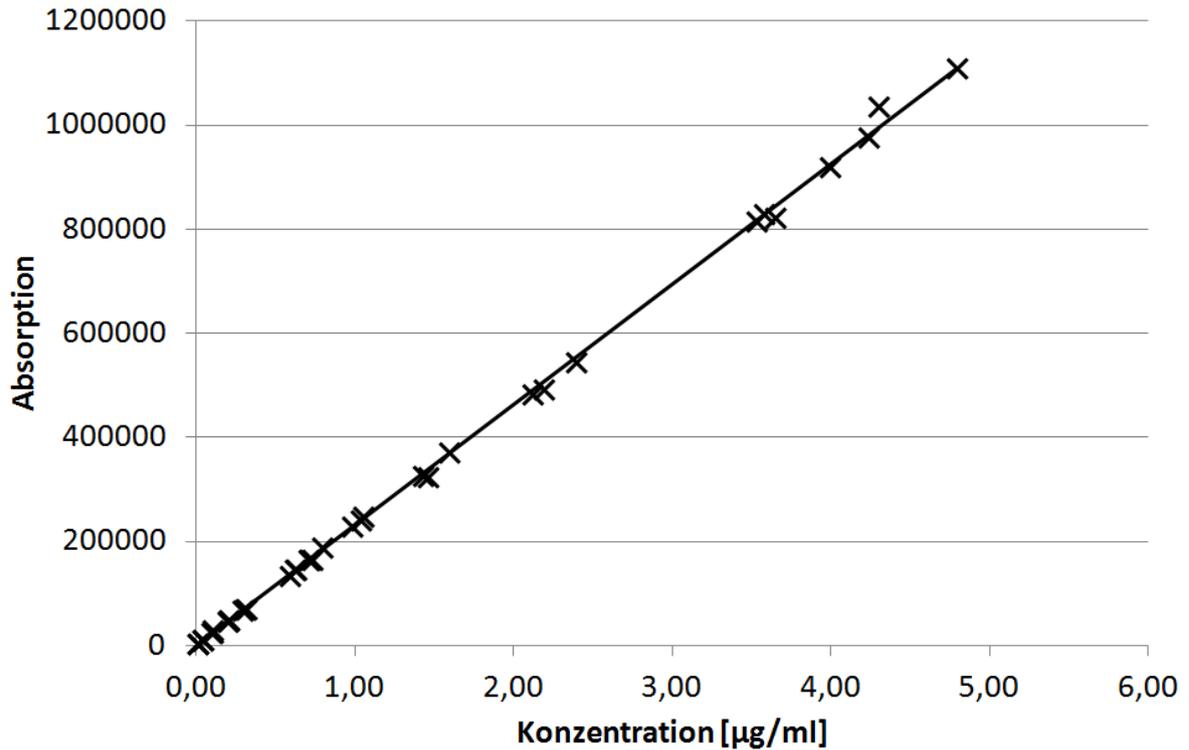


Abbildung 8-11: Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE50 - finite Dosierung (0,008 µg/mL – 4,790 µg/mL).

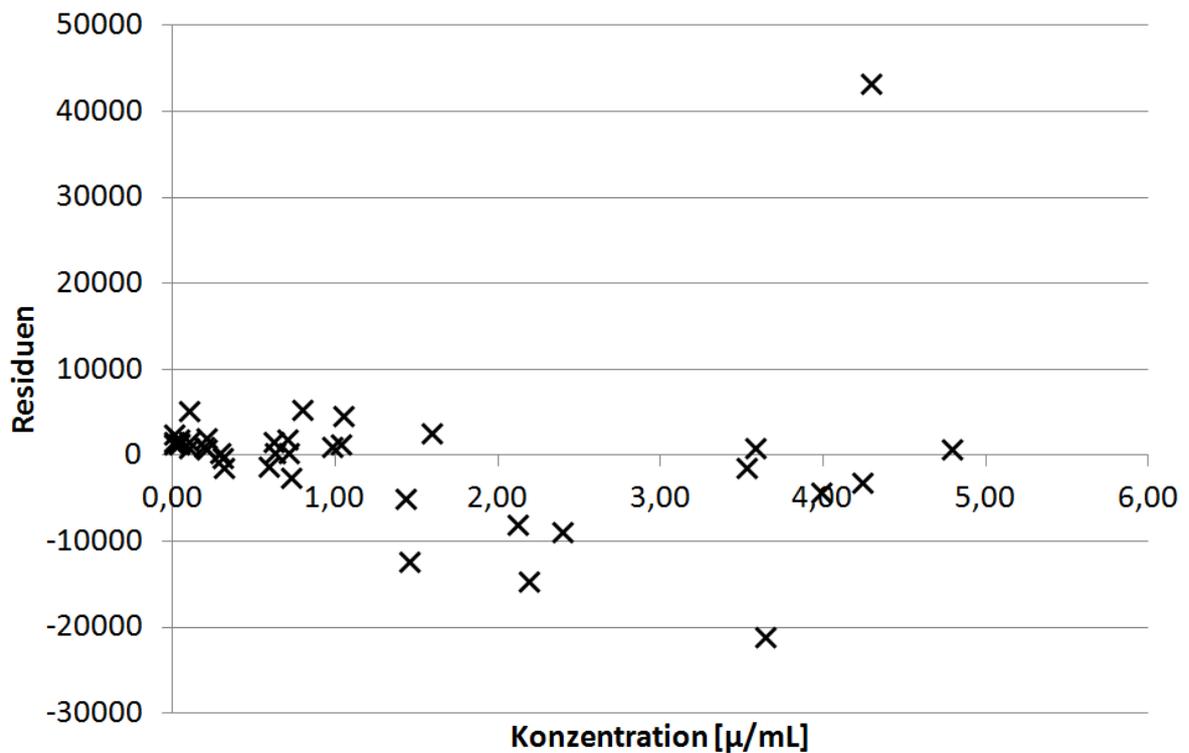


Abbildung 8-12: Residuenplot der Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE50 - finite Dosierung.

8.8.5.2 Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosierung

Tabelle 8-12: Messwerte und berechnete Kenngrößen der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE 50 (0,30 µg/mL – 38,44 µg/mL).

C [µg/mL]	Absorption	C _{ist} [µg/mL]	Absorption
38,44	8944485	3,65	822576
38,06	8940565	3,58	828792
37,66	8960633	3,53	815449
30,75	7098691	2,40	544663
30,45	7094657	2,19	491107
30,13	7105284	2,12	481585
23,06	5399599	1,60	371329
22,84	5332085	1,46	324441
22,60	5325550	1,43	325530
19,22	4476458	1,05	247106
19,03	4472714	1,04	239911
18,83	4463578	0,99	228040
11,53	2669238	0,80	189103
11,42	2659453	0,73	165294
11,30	2662360	0,72	164988
7,98	1840953	0,71	164418
7,16	1648599	0,63	145407
7,06	1639168	0,62	144302
4,79	1108980	0,59	134455
4,30	1037048	0,32	70519
4,24	977278	0,31	70562
3,99	919048	0,30	67602

Steigung	= 234705 mL/µg
Abschnitt	= -9503
r	= 0,9999

QL	= 0,23 µg/mL
DL	= 0,03 µg/mL

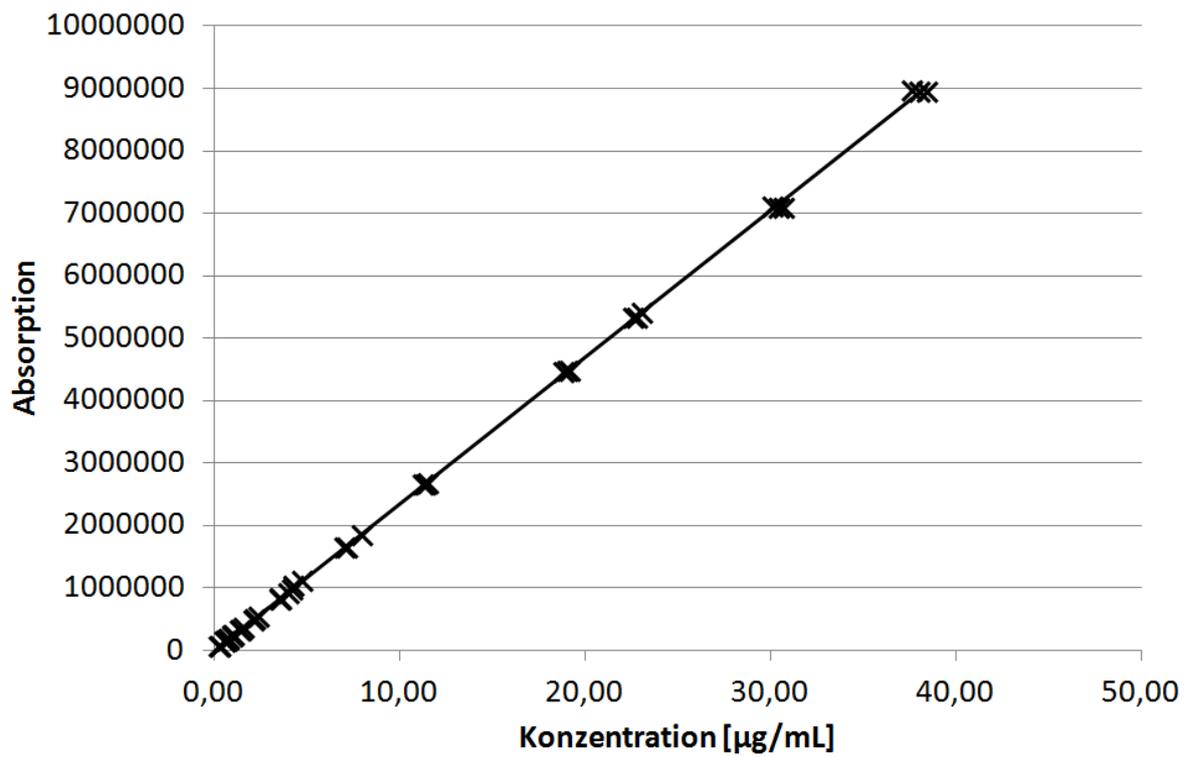


Abbildung 8-13: Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE50 - infinite Dosierung (0,30 µg/mL – 38,44 µg/mL).

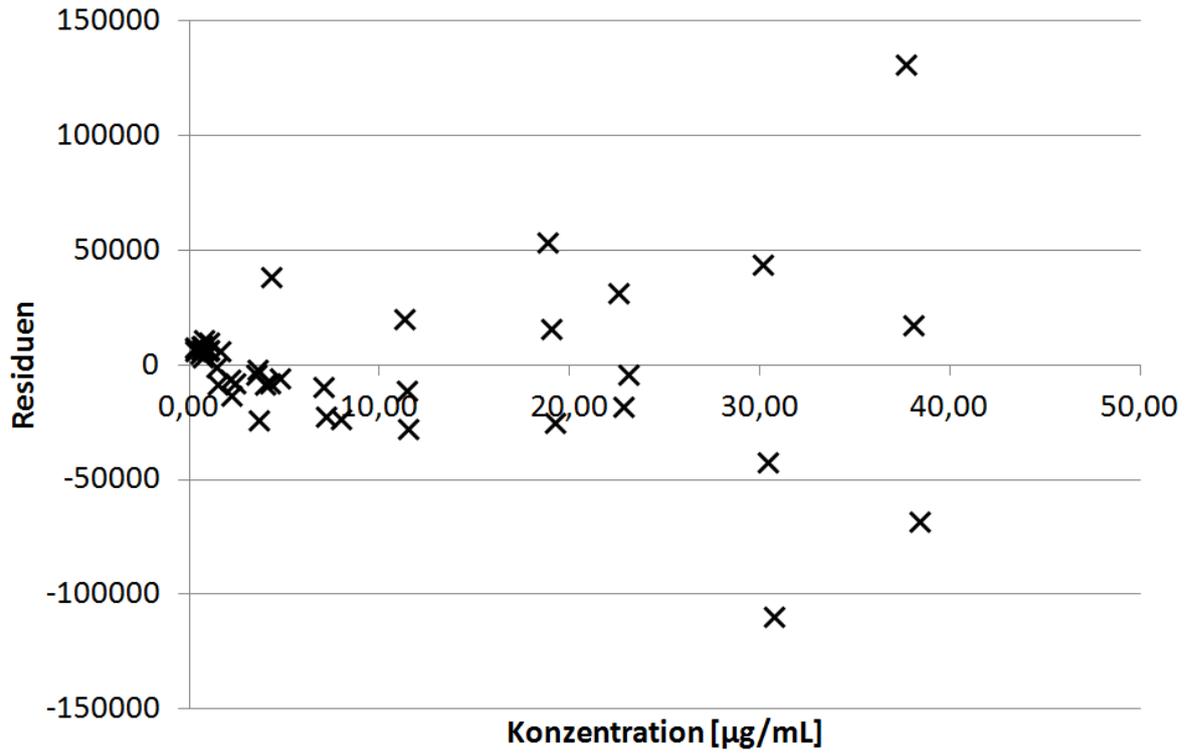


Abbildung 8-14: Residuenplot der Regressionsgerade der HPLC-UV-Kalibrierung für PBE50 - infinite Dosierung.