

**Stabilität, Homogenität und Permeation von
Zubereitungen mit 5-Aminolävulinsäure aus einem
Zweikammersystem mit Mikromischer**

Dissertation

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

vorgelegt von
Isabel Stefanie Steinbrenner
aus Mutlangen

Tübingen
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	23.06.2017
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 Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können und die wissenschaftliche Betreuung. Besonders dankbar bin ich für die stets offene Tür, die vielen anregenden Diskussionen, die wertvollen Ratschläge und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an Konferenzen und die fachliche Weiterbildung im Rahmen der Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie bedanken.

Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl danke ich für seine konstruktive Kritik und die Diskussionen, die mir bei der Erstellung der Arbeit geholfen haben, die Möglichkeit, die Kamera jederzeit verwenden zu können und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Lämmerhofer danke ich für die sehr freundliche und hilfreiche Beratung in analytischen Fragen.

Bei Irina Eck und Klaus Weyhing möchte ich mich für die Unterstützung in technischen Fragen bedanken. Sie waren stets mit Rat und Tat zur Stelle und haben so manches Hindernis aus dem Weg geräumt.

Meinen Kollegen möchte ich für die gute Zusammenarbeit, die gegenseitige Hilfsbereitschaft und Rücksichtnahme, das freundschaftliche Verhältnis und die gemeinsamen Unternehmungen in der Freizeit danken.

Der Firma Heraeus möchte ich für die großzügige Bereitstellung von ALA danken. Der Firma HPT GmbH & Co. KG danke ich für die Bereitstellung des Mikromischers. Darüber hinaus danke ich den Firmen BASF, Croda, Dolorgiet und Symrise für die Bereitstellung von Musterbezügen.

Für die Bereitstellung der Schweineohren danke ich der Experimentellen Medizin des Universitätsklinikums Tübingen sowie der Metzgerei Gießhaber in Öschingen. Ohne diese wären wichtige Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Der Werkstatt des pharmazeutischen Instituts der Universität Tübingen danke ich für die kreative Anfertigung und schnelle Reparatur von Gerätschaften. Dies hat das Voranbringen dieser Arbeit unterstützt.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund Jens, die immer für mich da sind, mich unterstützt haben, immer an mich geglaubt haben und so über manchen Tiefpunkt hinweggeholfen haben.

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Tagungsbeiträge (Poster) veröffentlicht:

Isabel Steinbrenner, Rolf Daniels

Suitability test of a disposable micro-mixing device for blending semi-solid preparations

DPhG Annual Conference; Freiburg; 9th-11th October 2013

Isabel Steinbrenner, Rolf Daniels

Blending of semi-solid preparations with a disposable micro-mixing device

Skin Forum 14th Annual Meeting; Prag; 4th-5th September 2014

Isabel Steinbrenner, Rolf Daniels

Stability and blending homogeneity of 5-aminolevulinic acid in a dual-chamber packaging system

10th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology; Glasgow; 4th-7th April 2016

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will“

Galileo Galilei

Besondere Hinweise:

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Die Fehlerbalken geben in den Abbildungen die Standardabweichungen vom Mittelwert an.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	ALLGEMEINER TEIL	3
2.1	Poloxamerbasierte flüssigkristalline Systeme	3
2.1.1	Flüssigkristalline Systeme	3
2.1.1.1	Lyotrope Flüssigkristalle	3
2.1.2	Poloxamere	5
2.1.2.1	Aufbau der Poloxamere	5
2.1.2.2	Allgemeiner Einsatz	6
2.1.2.3	Gelbildung und Einsatz der Gele	6
2.2	5-Aminolävulinsäure	10
2.2.1	Charakterisierung	10
2.2.2	Topische photodynamische Therapie	11
2.2.2.1	ALA in der PDT	13
2.2.2.2	Verbesserung der dermalen Verfügbarkeit von ALA	14
2.2.2.3	Fertigarzneimittel in der topischen PDT	17
2.2.3	Stabilität	18
2.3	Mischprozesse	22
2.3.1	Flüssigkeitsströmung und Mischprozesse	22
2.3.2	Mikromischer	22
2.3.2.1	Mikromischer von HPT	26
2.3.2.2	Einfluss der Viskosität auf die Mischbarkeit	26
2.4	Die Haut	28
2.4.1	Aufbau und Funktionen der Haut	28
2.4.2	Transdermalen Transport von Arzneistoffen	30
2.4.3	In-vitro Permeationsuntersuchungen	31
2.4.4	Pharmakokinetik	32
2.4.5	Permeationsverbesserung	33
3	MATERIAL UND METHODEN	36
3.1	Verwendete Materialien und Geräte	36
3.1.1	Chemikalien, Hilfsstoffe und sonstige Materialien	36
3.1.2	Geräte	38
3.1.3	Software	40
3.2	Methoden	41
3.2.1	Herstellung der Zubereitungen	41

3.2.1.1	Herstellung von PPeX.....	41
3.2.1.2	Herstellung von PHIC	41
3.2.1.3	Herstellung von Thermogel.....	41
3.2.1.4	Einarbeitung von ALA	42
3.2.2	Optimierung der PHIC-Zubereitung mit Hilfe eines statistischen Versuchsdesigns	42
3.2.3	Charakterisierung der Zubereitungen.....	45
3.2.3.1	Lichtmikroskopische Charakterisierung der Zubereitungen.....	45
3.2.3.2	Polarisationsmikroskopische Charakterisierung der Zubereitung	45
3.2.3.3	Untersuchung der Viskosität	45
3.2.4	Stabilitätsuntersuchungen PPeX.....	46
3.2.4.1	Lagerstabilität von PPeX.....	46
3.2.4.2	Stabilität von ALA in der Zubereitung.....	46
3.2.5	Untersuchung der Homogenität	47
3.2.5.1	Versuchsaufbau und Messung der Auspresskräfte	47
3.2.5.2	Überprüfung der Farbhomogenität	48
3.2.5.3	Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit	56
3.2.6	In-vitro Permeationuntersuchungen	57
3.2.6.1	Hautpräparation.....	57
3.2.6.2	In-vitro Permeationsuntersuchungen	57
3.2.7	HPLC-Analytik	58
3.2.7.1	Probenaufarbeitung	58
3.2.7.2	Vorsäulenderivatisierung	58
3.2.7.3	Verfahrensparameter	59
3.2.8	Statistik.....	60
3.2.8.1	Prüfung auf signifikante Unterschiede.....	60
3.2.8.2	Prüfung auf Äquivalenz von Permeationsdaten	60
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	61
4.1	Die Formulierungen des Zweikammersystems	61
4.1.1	Charakterisierung von PPeX.....	62
4.1.1.1	Mikroskopische Charakterisierung der Zubereitungen	62
4.1.1.2	Polarisationsmikroskopische Charakterisierung der Zubereitungen	63
4.1.1.3	Rheologische Charakterisierung der Zubereitungen	64
4.1.2	Charakterisierung von PHIC	64
4.1.2.1	Statistisches Versuchsdesign zur Optimierung von Stabilität und Viskosität von PHIC	65

4.2	Stabilität.....	73
4.2.1	Physikalische Stabilität von PPeX.....	73
4.2.1.1	Rheologische Untersuchungen.....	73
4.2.1.2	Mikroskopisch und polarisationsmikroskopische Untersuchung.....	78
4.2.1.3	Einfluss einer Rehomogenisierung.....	79
4.2.2	Chemische Stabilität von ALA in PPeX und Thermogel.....	82
4.3	Untersuchung der Homogenität bei Mischung mit dem Mikromischer.....	87
4.3.1	Überprüfung der Farbhomogenität.....	87
4.3.1.1	Rheologie und Auspresskräfte.....	87
4.3.1.2	Homogenitätsuntersuchungen.....	90
4.3.1.3	Einflussfaktoren der resultierenden Auspresskraft entsprechend der Homogenität.....	94
4.3.2	Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit.....	97
4.3.2.1	Rheologie und Auspresskräfte.....	97
4.3.2.2	Homogenität.....	100
4.3.2.3	Einflussfaktoren der resultierenden Auspresskraft entsprechend der Homogenität.....	102
4.3.2.4	Mischmuster.....	103
4.3.3	Vergleich der Methoden zur Homogenitätsbestimmung.....	105
4.3.3.1	Charakteristika der Überprüfung der Farbhomogenität.....	105
4.3.3.2	Charakteristika der Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit.....	106
4.3.3.3	Gegenüberstellung der Mischergebnisse.....	108
4.4	In-vitro Permeationsuntersuchungen.....	110
4.4.1	Vergleich der Mischungen mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und PPePr.....	110
4.4.2	Vergleich der Mischungen PPeX mit PHIC.....	113
4.4.3	Vergleich von PPePr + PHIC, Thermogel und Ameluz.....	115
5	ABSCHLUSSDISKUSSION.....	118
5.1	Chemische Stabilität von ALA.....	119
5.2	Physikalische Stabilität der Zubereitungen.....	120
5.3	Methoden zur Untersuchung der Homogenität.....	122
5.4	Einfluss der Zubereitungen auf die Homogenität.....	122
5.5	Eignung des Mikromischers.....	123
5.6	Auspresskräfte.....	124
5.7	In-vitro Permeationseigenschaften.....	125
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	127

7	FAZIT	129
8	ANHANG.....	130
8.1	Statistische Auswertung.....	130
8.1.1	Stabilität.....	130
8.1.2	Homogenitätsuntersuchungen	132
8.1.3	Permeationsuntersuchung	138
8.2	Firmenliste.....	143
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	145

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Flüssigkristalline Systeme aus Tensid, Wasser und Öl; dargestellt in einem Dreikomponentendiagramm [modifiziert nach Daniels, 2011 a].....	4
Abb. 2:	Grundstruktur der Poloxamere.....	5
Abb. 3:	Biosynthese von Häm über den Protoporphyrinstoffwechsel, Uroporphyrinogen (URO), Coproporphyrinogen (CORPO), Protoporphyrinogen (PROTO), Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) [Fotinos et al., 2006]	10
Abb. 4:	Nukleophiler Angriff eines primären Amins an eine Carbonylgruppe [McCarron et al., 2005]	18
Abb. 5:	Abbauprodukte von ALA, 5-Aminolävulinsäure (ALA), Porphobilinogen (PGB), Pseudo-Porphobilinogen (Pseudo-PGB), 2,5-Dicarboxyethyl-3,6-dihydropyrazin (DHPY), 2,5-Dicarboxyethylpyrazin (PY), modifiziert nach [Gander et al., 2003]	19
Abb. 6:	Säure-Base-Gleichgewicht von ALA [Novo et al., 1996]	20
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Mischung zweier Stränge per Diffusion [Bebee et al., 2002].....	23
Abb. 8:	Kreuzförmiger Mikromischer, links ohne statisches Mischelement, rechts mit statischen Mischelementen [Wong et al., 2003]	24
Abb. 9:	A Schematische Darstellung des SHM, B Mischkanal ohne Strukturen an den Wänden, C Mischkanal mit gestaffelten Herringbone-Strukturen; Mischbilder zweier Stränge fluorescein-gelabelter und klarer Lösung [Stroock et al., 2002].....	25
Abb. 10:	Mikromischer der Firma HPT, A in Pumpsystem eingebauter Mikromischer, B Oberseite des Mikromischers, C Unterseite des Mikromischers [HPT Pharma Packaging GmbH & Co. KG, 2001].....	26
Abb. 11:	Aufbau der Haut [Skin Care Forum, 2001]	28
Abb. 12:	Aufbau der Epidermis [Wickett et al., 2006] ohne Stratum lucidum	29
Abb. 13:	Mögliche Penetrationsrouten von Arzneistoffen [Trommer et al., 2006] adaptiert nach [Lippold, 1984].....	31
Abb. 14:	Diffusionszelle nach Franz [Lunter, 2012]	32
Abb. 15:	Schema der Angriffspunkte von Permeationsverbesserern [Lane, 2013]	34
Abb. 16:	Mischungsdesign	43
Abb. 17:	Schema des Versuchsaufbaus; A Montage am Materialprüfgerät, B aufgesteckter Mikromischer, C Auffanghalterung mit Auffangvorrichtung.....	47
Abb. 18:	Schema der Auffangvorrichtung.....	48
Abb. 19:	Position der Bildpunkte zur Erfassung der Helligkeitswerte.....	49
Abb. 20:	Bildausleuchtung blaues Bild	50
Abb. 21:	Schwankung der Bildhelligkeit auf den Messlinien des blauen Bildes; Messbereich von 30 - 70 %	51
Abb. 22:	Bildausleuchtung gelbes Bild	51
Abb. 23:	Schwankungen der Bildhelligkeit auf den Messlinien des gelben Bildes; Messbereich 30 - 70 %	52
Abb. 24:	Untersuchung der Mischungsgüte bei unterschiedlicher Lampeneinstellung	53

Abb. 25:	Einfluss des Abstandes der Beleuchtungsquelle auf Helligkeitswert und Standardabweichung, n = 5, Fehlerbalken als Standardabweichungen des Mittelwerts	54
Abb. 26:	Einfluss der Konvertierung auf die Mischungsgüte.....	55
Abb. 27:	Schema der Probennahme	56
Abb. 28:	modifizierte Reaktion von ALA mit OPA und ACC zum detektierbaren Produkt [Donnelly et al., 2006]	58
Abb. 29:	Entwicklung zweier Formulierungen für ein Zweikammersystem ausgehend von den Komponenten des Thermogels	61
Abb. 30:	Mikroskopische Aufnahmen von PPeD, PPe und PPePr, Maßstabsbalken obere Reihe 100 µm, untere Reihe 20 µm	62
Abb. 31:	Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von PPeD, PPe und PPePr, Maßstabsbalken obere Reihe 100 µm, untere Reihe 20 µm	63
Abb. 32:	Rheogramm von PPeX; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichungen	64
Abb. 33:	Versuchsdesign; markierte Eckpunkte	65
Abb. 34:	Mikroskopische Aufnahmen der Formulierungen A, B, C und D, Maßstabsbalken 20 µm	66
Abb. 35:	Konturlinien der Viskosität	68
Abb. 36:	Konturlinien der Stabilität	69
Abb. 37:	Überprüfung der Vorhersageformel bezüglich der Stabilität	71
Abb. 38:	Überprüfung der Vorhersageformel bezüglich der Viskosität	71
Abb. 39:	Rheogramm der Lagerstabilität von PPeD über 12 Monate, Zubereitung A, B und C = unabhängige Experimente, n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung	73
Abb. 40:	Viskogramm der Lagerstabilität von PPeD über 12 Monate, Zubereitung A, n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung	74
Abb. 41:	Rheogramm der Lagerstabilität von PPe über 12 Monate, Zubereitung A, B und C = unabhängige Experimente, n = 3 Fehlerbalken als Standardabweichung	75
Abb. 42:	Viskogramm der Lagerstabilität von PPe über 12 Monate, Zubereitung A, n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung	76
Abb. 43:	Rheogramm der Lagerstabilität von PPePr über 12 Monate, Zubereitung A, B und C = unabhängige Experimente, n = 3 Fehlerbalken als Standardabweichung	77
Abb. 44:	Mikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen von PPeX nach 12 Monaten Lagerung	78
Abb. 45:	Rheologische Untersuchung von PPe nach Herstellung, nach 6 Monaten Lagerung und nach Rehomogenisierung, Zubereitung A, B und C = unabhängige Experimente, n = 3 Fehlerbalken als Standardabweichung	79
Abb. 46:	Mikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen von PPe, Zubereitung nach Herstellung, nach 6 Monaten Lagerung und nach Rehomogenisierung.....	80
Abb. 47:	Stabilitätsmessung: Differenz des Zentralwerts von Nullwert und Messwert von ALA in PPeX und Thermogel nach 4 Wochen bei Lagertemperaturen von 5, 25 und 40 °C; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung	83
Abb. 48:	Gelbfärbung der Zubereitungen PPeX und Thermogel mit ALA nach Lagerung bei 25 °C nach 13 Monaten (PPeX) und 7 Monaten (Thermogel) Lagerung	84

Abb. 49:	Stabilitätsmessung: Differenz des Zentralwerts von Nullwert und Messwert von ALA in PPeX und Thermogel nach 13 Monaten (PPeX) und 7 Monaten (Thermogel) Lagerzeit bei 25 °C; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung, * Statistische Signifikanz (p < 0,05).....	84
Abb. 50:	HPLC-analytische Untersuchung der Stabilität von ALA in PPeX und Thermogel; n = 3; Fehlerbalken als Standardabweichung.....	86
Abb. 51:	Viskositätsparameter nach Herschel-Bulkley von PPe, PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und der homogenen Mischung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; n = 3 - 6, Fehlerbalken als Standardabweichung	88
Abb. 52:	Auspresskräfte der Mischung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität sowie der Einzelkomponenten PPe (PPe + PPe), PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (PHIC + PHIC) und der homogenen Mischung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (Mischung + Mischung); n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung.....	89
Abb. 53:	aufgenommene Bilder der Homogenitätsuntersuchung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität mittels Farbhomogenität, Positiv- und Negativkontrolle	90
Abb. 54:	Homogenitäten der Mischungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität mittels Überprüfung der Farbhomogenität: n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung, drei Balken stellen jeweils Ergebnisse unabhängiger Experimente dar	91
Abb. 55:	Aufsicht auf den Mikromischer.....	93
Abb. 56:	Mikromischer mit schematisch eingezeichneter Kanalführung	94
Abb. 57:	gemessene und berechnete Auspresskräfte PPe + PHIC, n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung	96
Abb. 58:	Viskositätsparameter nach Herschel-Bulkley von PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und der homogenen Mischung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung	97
Abb. 59:	Rheogramm PPe mit ALA; A, B und C = unterschiedliche Messproben mit je n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung.....	98
Abb. 60:	Mikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen von ALA in PPe; Maßstabsbalken 20 µm.....	99
Abb. 61:	Auspresskräfte von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität sowie der Einzelkomponenten PPe (PPe + PPe), PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (PHIC + PHIC) und der homogenen Mischung von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (Mischung + Mischung); n = 3 - 5, Fehlerbalken als Standardabweichung	100
Abb. 62:	Homogenitäten der Mischungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität mittels Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung; drei Balken stellen jeweils Ergebnisse unabhängiger Experimente dar	101
Abb. 63:	gemessene und berechnete Auspresskräfte von PPe + PHIC, n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung	102
Abb. 64:	Mittlere Konzentrationen der Mischextrudate der Homogenitätsuntersuchungen von PPe und PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und die Konzentration der jeweiligen Mischmuster; n = 3,	

	Fehlerbalken als Standardabweichung; Versuchsreihe 1, 2 und 3 Ergebnisse unabhängiger Experimente	104
Abb. 65:	Schema der Probenauffangvorrichtung, der Bildfläche sowie der Messpunkte	105
Abb. 66:	A: Optische Zusammensetzung des Mischextrudats; B: Einzeichnung der Probennahmeaufteilung in 3 Probenextrudatstücke; C: Probenstück inneres Quadrat.....	106
Abb. 67:	gemessene Gehalte der Probenextrudate und des inneren Quadrats entsprechend Abb. 66 B und C; n = 27 (Teilprobe 1 - 3); n = 9 (inneres Quadrat), Fehlerbalken als Standardabweichung	107
Abb. 68:	Gleichförmigkeit der verschiedenen Probenextrudatstücke entsprechend Abb. 66 B und C; n = 9 (Teilprobe 1 - 3); n = 3 (inneres Quadrat), Fehler- balken als Standardabweichung	108
Abb. 69:	Vergleich der permeierten Mengen der Mischungen PPePr mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; n = 5, Fehlerbalken als Standardabweichungen	111
Abb. 70:	Prüfung der Äquivalenz der Permeationsraten von Test- vs. Referenzformulierung: PPePr + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; n = 5, Fehlerbalken als Konfidenzintervall des Medians.....	112
Abb. 71:	Viskositätsparameter nach Herschel-Bulkley von PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und der homogenen Mischung von PPePr + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; n = 3 - 6, Fehlerbalken als Standardabweichung	113
Abb. 72:	Vergleich der Permeationen der Mischungen PPePr, PPeD und PPe mit PHIC mittlerer Viskosität; n = 5; Fehlerbalken als Standardabweichung	114
Abb. 73:	Prüfung der Äquivalenz der Permeationsraten von Test- vs. Referenzformulierung: PPeD, PPe und PPePr mit PHIC; n = 5, Fehler- balken als Konfidenzintervall des Medians.....	115
Abb. 74:	Vergleich der Permeationen von Ameluz, Thermogel und der Mischung PPePr mit PHIC mittlerer Viskosität; n = 5, Fehlerbalken als Standardabweichung	116
Abb. 75:	Prüfung der Äquivalenz der Permeationsraten von Test- vs. Referenzformulierung: PPePr + PHIC, Ameluz und Thermogel, n = 5, Fehlerbalken als Konfidenzintervall des Medians.....	117
Abb. 76:	Keto-Enol-Tautomerie von ALA [Gander et al., 2003]	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Poloxamercharakteristika nach Ph. Eur. 8.0, 2014.....	5
Tabelle 2-2:	Zusammensetzung des Thermogels.....	8
Tabelle 3-1:	Chemikalien und Hilfsstoffe	36
Tabelle 3-2:	Verbrauchsmaterialien.....	37
Tabelle 3-3:	Verwendete Geräte.....	38
Tabelle 3-4:	Verwendete Software	40
Tabelle 3-5:	Vorlagezubereitung für das statistische Versuchsdesign	42
Tabelle 3-6:	Zusammensetzung der Poloxamere	43
Tabelle 3-7:	Poloxameranteile der Zubereitungen gemäß Versuchsdesign	44
Tabelle 3-8:	Rheologie-Messprogramm.....	45
Tabelle 3-9:	Gradientenelutionsprogramm für Homogenitäts- und Stabilitätsproben	59
Tabelle 3-10:	Gradientenelutionsprogramm für Permeationsproben.....	59
Tabelle 4-1:	Poloxamerzusammensetzung der Zubereitungen A, B, C und D	65
Tabelle 4-2:	Poloxamerzusammensetzung der Formulierung mit niedriger, mittlerer und hoher Viskosität	70
Tabelle 4-3:	Differenz der Auspresskräfte der zu mischenden eingefärbten Einzelkomponenten	92
Tabelle 4-4:	Wegstreckenanteile im Mikromischer.....	95
Tabelle 4-5:	Differenz der Auspresskräfte der zu mischenden uneingefärbten Einzelkomponenten	102
Tabelle 4-6:	Berechnung der Fläche und Masse der Probe pro Pixelpunkt der Bildanalyse	106
Tabelle 4-7:	Permeationsraten und Permeationskoeffizienten von PPePr + PHIC, Thermogel und Ameluz.....	117
Tabelle 5-1:	Löslichkeitsparameter von Propylenglykol, Dimethylisorbid und Pentylenglykol, berechnet nach [Fedors et al., 1974].....	120
Tabelle 8-1:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Stabilitätsuntersuchung per Zentralwertanalyse.....	130
Tabelle 8-2:	Student Newman Keuls Test der Stabilitätsuntersuchung per Zentralwertanalyse	131
Tabelle 8-3:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskosität von PPe, PHIC und homogene Mischungen je niedrigviskos, mittelviskos und hochviskos (Überprüfung der Farbhomogenität)	132
Tabelle 8-4:	Student Newman Keuls Test der Viskosität von PPe, PHIC und homogene Mischungen je niedrigviskos, mittelviskos und hochviskos (Überprüfung der Farbhomogenität)	132
Tabelle 8-5:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Homogenität [%] von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität per Überprüfung der Farbhomogenität.....	134
Tabelle 8-6:	Student Newman Keuls Test der Homogenität [%] von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität per Überprüfung der Farbhomogenität.....	134
Tabelle 8-7:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskosität von PHIC niedriger Viskosität und seine homogene Mischung mit PPe mit ALA.....	135

Tabelle 8-8:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskosität von PHIC mittlerer Viskosität und seine homogene Mischung mit PPe mit ALA.....	135
Tabelle 8-9:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskosität von PHIC hoher Viskosität und seine homogene Mischung mit PPe mit ALA	136
Tabelle 8-10:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Gleichförmigkeit der Probenextrudate der Teilproben 1 - 3 und des inneren Quadrats	137
Tabelle 8-11:	Student Newman Keuls Test der Gleichförmigkeit der Probenextrudate der Teilproben 1 - 3 und des inneren Quadrats.....	137
Tabelle 8-12:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Permeationsraten der Mischungen PPePr mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität	138
Tabelle 8-13:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskositäten der Mischungen PPePr + PHICs niedriger, mittlerer und hoher Viskosität	139
Tabelle 8-14:	Student Newman Keuls Test der Viskositäten der Mischungen PPePr + PHICs niedriger, mittlerer und hoher Viskosität.....	139
Tabelle 8-15:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Permeationsraten von Ameluz, PPePr + PHIC und Thermogel	140
Tabelle 8-16:	Student Newman Keuls Test der Permeationsraten von Ameluz, PPePr + PHIC und Thermogel	140
Tabelle 8-17:	Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der permeierten Menge ALA nach 24 h bei Ameluz, PPePr + PHIC und Thermogel.....	141
Tabelle 8-18:	Student Newman Keuls Test der permeierten Menge ALA nach 24 h bei Ameluz, PPePr + PHIC und Thermogel	141
Tabelle 8-19:	Prüfung der Äquivalenz der Mischungen PPePr + PHICs niedriger, mittlerer und hoher Viskosität in Anlehnung an SUPAC-SS (FDA Guidance for Industry, 2004).....	142
Tabelle 8-20:	Prüfung der Äquivalenz der Mischungen PPe, PPeD und PPePr + PHIC, Ameluz und Thermogel in Anlehnung an SUPAC-SS (FDA, Guidance for Industry, 2004).....	142

Abkürzungsverzeichnis

ALA	5-Aminolävulinsäure Hydrochlorid
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
D	Schergefälle
d.h.	das heißt
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
h	Stunde
l	Liter
m/m	Masse pro Masse
m/V	Masse pro Volumen
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
nm	Nanometer
OPA	o-Phthaldialdehyd
O/W	Öl-in-Wasser
P124	Poloxamer 124
P188	Poloxamer 188
P407	Poloxamer 407
Pa	Pascal
Pas	Pascalsekunde
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea = Europäisches Arzneibuch
PPe	Zubereitung mit Poloxamer 15 %, Pentylenglykol 85 %
PPeD	Zubereitung mit Poloxamer 15 %, Pentylenglykol 75 % und Dimethylisosorbid 10 %

PPePr	Zubereitung mit Poloxamer 15 %, Pentylenglykol 75 % und Propylenglykol 10 %
PPeX	Zusammenfassung von PPe, PPeD und PPePr
s	Sekunde
SC	Stratum corneum
t	Zeit
v.a.	vor allem
V/V	Volumen pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
η	Viskosität
τ	Schubspannung
u.a.	unter anderem
μg	Mikrogramm
γ	Scherrate
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur

1 Einleitung und Zielsetzung

5-Aminolävulinsäure (ALA) ist eine physiologisch vorkommende Aminosäure, die bei der topischen photodynamischen Therapie zum Einsatz kommt. In der Praxis wird ALA meist als wässrige Lösung zum Einsatz gebracht, da sie bei Lagerung eine nur sehr kurze Lagerstabilität aufweist. Bei physiologischem pH dimerisiert ALA innerhalb kurzer Zeit und bildet diverse Abbauprodukte. Bei sauren pH-Werten ist die Stabilität deutlich erhöht, da hier das Vorhandensein des entsprechenden Anions reduziert ist, welches für die Kondensationsreaktion notwendig ist. Allerdings ist ein solch saurer pH-Wert für die topische Anwendung nicht tolerabel.

Ein Lösungsansatz ist das von Gander et. al., 2003, entwickelte, patentierte Zweikammersystem. Zweikammersysteme sind Verpackungen für instabile Wirkstoffe, bei denen in einer Kammer der Wirkstoff in einer lagerstabilen Form vorliegt, die zweite Kammer für die Applikation notwendige oder ergänzende Lösungsmittel enthält, um den Wirkstoff zur Anwendung bringen zu können oder die Eigenschaften der Mischung zu verbessern. ALA liegt in der einen Kammer in einer wasserfreien Flüssigkeit vor, in der ALA stabil ist und gelagert werden kann. Für die Anwendung wird diese wasserfreie mit einer wasserhaltigen Phase vermischt und kann so appliziert werden.

Bei der topischen Applikation von Arzneistoffen ist es notwendig, dass diese Arzneistoffe gut aus ihren Vehikeln freigesetzt werden und in die Haut penetrieren bzw. durch die Haut permeieren, um ihren Wirkort in ausreichender Menge zu erreichen. Dafür müssen Wirkstoffe eine ausreichende Lipophilie ausweisen, um die lipophile Barriere der Haut, das Stratum corneum, passieren zu können. Als sehr polares Molekül kann ALA nur schlecht in die Haut penetrieren bzw. durch die Haut permeieren. Daher ist es wichtig, die dermale Verfügbarkeit z.B. mit Hilfe von Permeationsverbesserern zu erhöhen und somit ausreichende Mengen am Wirkort gleichmäßig vorliegen zu haben. Das unter Frau Prof. Müller-Goymann entwickelte Thermogel stellt für ALA ein Vehikel mit verbesserten Permeationseigenschaften gegenüber monographierten Formulierungen dar. Seine verbesserten Permeationseigenschaften beruhen auf einem synergistischen Effekt aller fünf enthaltenen Inhaltsstoffe: Poloxamer, Isopropylalkohol, Aqua purificata, Dimethylisobutylid und mittelkettige Triglyceride.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse ist das Ziel dieser Arbeit, halb feste Formulierungen für ALA für ein Zweikammersystem auf Grundlage der Komponenten des Thermogels zu entwickeln. Dabei soll eine wasserfreie, halb feste Formulierung entwickelt werden, in der ALA lagerstabil ist. Die zweite halb feste Formulierung soll die restlichen Komponenten des Thermogels enthalten. Mit Hilfe eines Mikromischers sollen beide Formulierungen homogen vermischt werden. Für die Entnahme und sofortige Applikation auf der Haut müssen die Formu-

lierungen durch den Mikromischer gepumpt werden und homogen entnommen werden können. Dafür ist es notwendig, dass die Zubereitungen möglichst niedrigviskos sind, da sonst die Pumpfähigkeit möglicherweise nicht gewährleistet ist. Außerdem dürfen die benötigten Auspresskräfte nicht zu groß sein. Sind die Auspresskräfte zu groß, kann die Kraft für das Fördern durch den Mikromischer nicht mehr manuell aufgebracht werden und die Zubereitungen können nicht für eine Applikation entnommen werden. Die entnommene homogene Mischung aus beiden Formulierungen soll, wie das Thermogel, gute bzw. verbesserte Permeationseigenschaften aufweisen.

Für eine dauerhafte Anwendung des Zweikammersystems ist nicht nur die Stabilität des Wirkstoffes im Vehikel notwendig, sondern auch die physikalische Stabilität der Formulierungen selbst. Diese sollen während der Lagerung keine Veränderungen der Viskosität aufzeigen, die ihre Pumpfähigkeiten bzw. Auspresskräfte verändern. Sie sollten zudem keine Instabilitäten wie das Brechen der Formulierung zeigen.

Ein wichtiges Augenmerk dieser Arbeit liegt auch auf der Untersuchung der Homogenität sowie der Entwicklung von Methoden zur Untersuchung der Homogenität.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind daher folgende:

- Ist es möglich, durch Trennung von wässrigen und nicht-wässrigen Systemen ein halbfestes System auf Basis des Thermogels zu erzeugen, das eine verbesserte Stabilität für die Lagerung von ALA aufweist?
- Zeigen die Formulierungen selbst gleichbleibende Qualität über den Lagerzeitraum?
- Durch welche Methode kann man die Homogenität der Mischung zweier halbfester Systeme gut untersuchen? Welche Methode ist geeignet und gibt relevante Ergebnisse für die Praxis?
- Wie müssen die Zubereitungen beschaffen sein, damit eine gute Homogenität erzielt wird? Können auch Formulierungen mit unterschiedlichen Viskositäten homogen gemischt werden?
- Ist der Mikromischer geeignet, halbfeste Systeme homogen zu mischen?
- Wie hoch sind die resultierenden Auspresskräfte und wie kommen sie zustande?
- Zeigt dieses System vergleichbare oder bessere Permeationseigenschaften als das Thermogel?

2 Allgemeiner Teil

2.1 Poloxamerbasierte flüssigkristalline Systeme

2.1.1 Flüssigkristalline Systeme

Bei flüssigkristallinen Systemen spricht man von Mesophasen, d.h., es handelt sich um Assoziationskolloide, die mit ihren Eigenschaften zwischen denen von Flüssigkeiten und Kristallen liegen. Hier unterscheidet man thermotrope und lyotrope Mesophasen, die unter Einwirkung von Temperatur (thermotrop) oder durch den Zusatz von Lösungsmitteln (lyotrop) Assoziationskolloide ausbilden.

2.1.1.1 Lyotrope Flüssigkristalle

Bei den lyotropen Flüssigkristallen entstehen in Abhängigkeit der Tensidkonzentration unterschiedliche Assoziationsformen: kubische, hexagonale und lamellare Flüssigkristalle. Alle zeigen visko-elastisches Verhalten, d.h., sie vereinen rheologische Eigenschaften eines Festkörpers sowie einer Flüssigkeiten [Daniels, 2011 a, Müller-Goymann, 2004].

Bei niedrigen Tensidkonzentrationen liegen die Tensidlösungen als mizellare Lösungen vor. Durch Erhöhung der Tensidkonzentration entstehen aus Mizelllösungen kubische Systeme. Diese zeichnen sich durch eine hohe Kugelpackung der Mizellen aus. Sie weisen eine ausgeprägte Fließgrenze sowie visko-elastisches Verhalten auf. Nach Einwirkung mechanischer Kräfte reagieren kubische Systeme extrem elastisch und senden Schwingungen im hörbaren Bereich aus. Daher werden sie auch Brummgele genannt [Daniels, 2011 a, Kutz, 2011, Müller-Goymann, 2004].

Bei höheren Tensidkonzentrationen entstehen hexagonale Flüssigkristalle. Aus den Kugelmizellen entstehen zylinderförmige Assoziate, die sich röhrenförmig zusammenlagern. Hexagonale Systeme weisen eine geringere Viskosität als kubische Systeme auf, da sich die röhrenförmigen Aggregate besser gegeneinander verschieben lassen [Tiddy, 1980]. Wird ausgehend von diesen Systemen die Tensidkonzentration weiter erhöht, entstehen lamellare Systeme. Die Tenside lagern sich zu pallisadenartigen Doppelschichten zusammen. Diese Systeme sind besser fließfähig als kubische und hexagonale Flüssigkristalle [Tiddy, 1980] und weisen eine geringere Viskosität auf. Da hexagonale und lamellare Flüssigkristalle als anisotrope Systeme unterschiedliche Bewegungsfreiheiten in die drei Raumrichtungen besitzen, sind physikalische Eigenschaften wie z. B. Lichtbrechung richtungsabhängig. Diese Systeme können linear-polarisiertes Licht drehen und lassen sich daher im Polarisationsmikroskop aufgrund der entstehenden Texturen leicht nachweisen. Während hexagonale Strukturen flächige Texturen zeigen, werden bei lamellaren Proben Malteserkreuze (sogenannte

pinwheels = Windräder), streifige Texturen und generell eine höhere Lichtbrechung sichtbar [Rosevear, 1954].

Häufig entstehen aus den Komponenten Tensid, Wasser und Öl bei entsprechender Zusammensetzung flüssigkristalline Systeme. Ihr Einsatzbereich kann in einem Dreikomponentendiagramm dargestellt werden. Werden Tensidgele z. B. ein kubisches System, auf die Haut aufgetragen, so durchlaufen sie aufgrund der Verdunstung des Wassers, den hexagonalen, lamellaren Zustand bis hin zu inversen Mizellen (siehe Abb. 1) [Daniels, 2011 a].

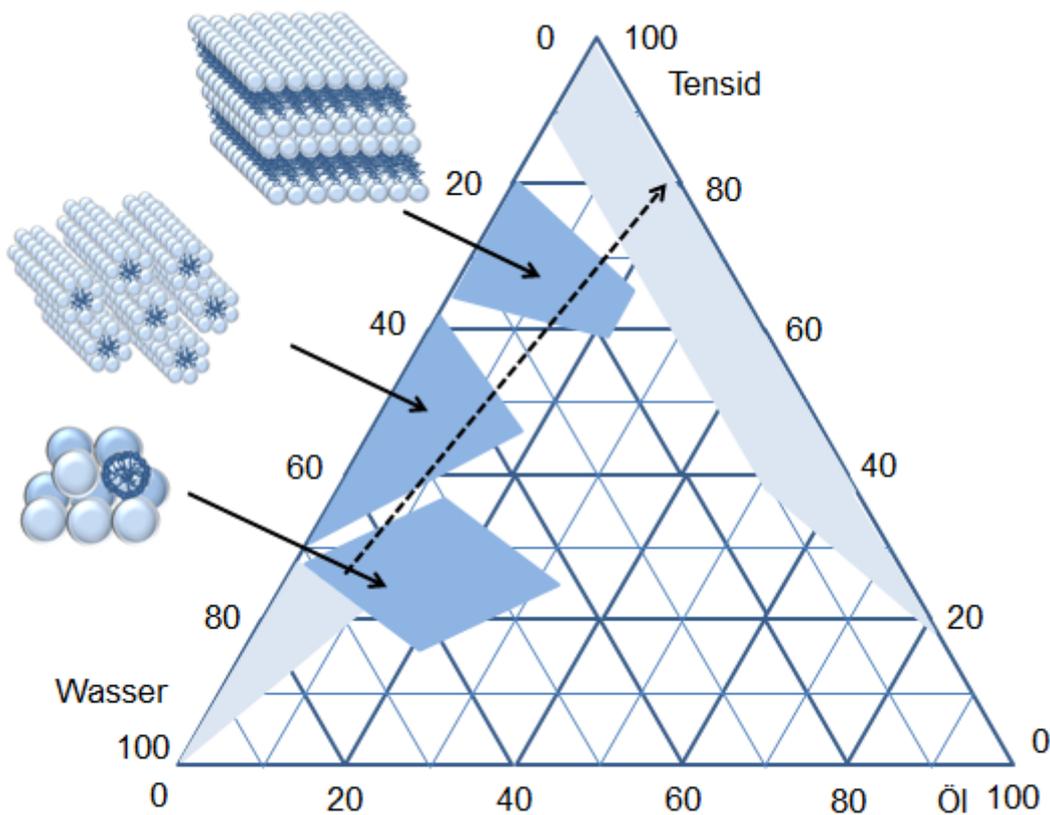


Abb. 1: Flüssigkristalline Systeme aus Tensid, Wasser und Öl; dargestellt in einem Dreikomponentendiagramm [modifiziert nach Daniels, 2011 a]

2.1.2 Poloxamere

2.1.2.1 Aufbau der Poloxamere

Bei Poloxameren handelt es sich um synthetische Makromoleküle, den Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymeren. Beim Blockpolymerisat sind Blöcke linear miteinander verknüpft. In diesem Fall handelt es sich um Propylenoxideinheiten (PO) und Ethylenoxideinheiten (EO), die durch eine Copolymerisation miteinander reagieren [BASF, 2004, Schmolka, 1972].

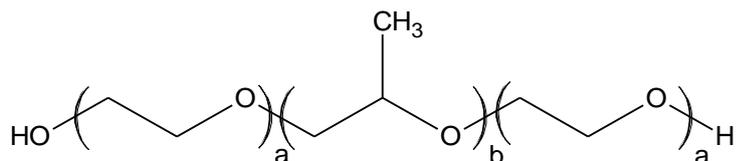


Abb. 2: Grundstruktur der Poloxamere

Je nach Poloxamertyp unterscheiden sie sich in der Monomerzusammensetzung und der mittleren relativen Molekülmasse. Zu den monographierten Poloxamertypen gehören u.a. Poloxamer 407, Poloxamer 188 und Poloxamer 124. Dabei handelt es sich bei den Typen 407 und 188 um „wachsartige, weiße bis fast weiße Pulver, Kügelchen oder Schuppen“ und beim Typus 124 um eine „farblose bis fast farblose Flüssigkeit“ [Ph.Eur. 8.0, Grundwerk 2014].

Tabelle 2-1: Poloxamercharakteristika nach Ph. Eur. 8.0, 2014

Poloxamertyp	Ethylenoxid-Einheiten (a)	Propylenoxid-Einheiten (b)	Mittlere relative Molekülmasse
124	10 bis 15	18 bis 23	2090 bis 2360
188	75 bis 85	25 bis 30	7680 bis 9510
407	95 bis 105	54 bis 60	9840 bis 14600

In der Anwendung weisen Poloxamere eine sehr geringe bis keine Toxizität auf, wobei die Toxizität mit steigendem Molekulargewicht und steigendem Ethylenoxidanteil abnimmt. Daher ist Poloxamer 407 das Polymer mit der geringsten Toxizität und wird vielfach verwendet [Patel et al., 2009, Schmolka, 1972].

2.1.2.2 Allgemeiner Einsatz

Poloxamersysteme sind vielversprechende Vehikel, um Arzneistoffe oder Therapeutika an ihren Wirkort zu bringen und finden vielfältigen Einsatz in Drug Delivery Systemen. Ihre Mizellen dienen als Carrier, um für eine erhöhte Löslichkeit, erhöhte metabolische Stabilität und eine erhöhte Verweildauer von Arzneistoffen zu sorgen [Kabanov et al., 2005]. Des Weiteren können sie auch dafür genutzt werden, Arzneistoffe gezielt in bestimmte Körperbereiche zu schleusen. Durch die Einlagerung von Peptiden oder biospezifischen Molekülen in die EO-Block-Krone der Mizellen, können diese an speziellen Regionen im Körper binden und so Arzneistoffe gezielt in bestimmte Regionen bringen [Kabanov et al., 1989]. Über die PO-Blöcke können Poloxamer-Aggregate an Oberflächen haften, mit Lipidmembranen interagieren und sogar zu Translokation in der Zelle führen. Darüber hinaus können Poloxamere die Membranmikroviskosität verändern und so zu einer Fluidisierung führen [Batrakova et al., 2001]. So werden Poloxamere z. B. in aktueller Forschung als Vehikel eingesetzt, um die Bioverfügbarkeit von Taxanen in der Krebstherapie zu verbessern [Dahmani et al., 2012, Mu et al., 2010] oder Poloxamere als Gene Delivery Systeme zu nutzen [Kabanov et al., 2005].

2.1.2.3 Gelbildung und Einsatz der Gele

Poloxamere kommen als Gelbildner, Emulgator und Stabilisator zum Einsatz und bilden Gele mit thermoreversiblen Eigenschaften [Juhasz et al., 1989, Voigt, 2010]. Die Bildung von Poloxamergelen ist sowohl von der Poloxamerkonzentration als auch der Temperatur abhängig [Artzner et al., 2007], wobei es bei steigender Temperatur zur Gelbildung kommt [Schmolka, 1972]. Dabei ist die Mizellisierung der erste Schritt der Gelbildung [Cabana et al., 1997]. Bei niedrigen Konzentrationen liegen die Monomere der Poloxamermoleküle vollständig gelöst vor. Mit steigender Konzentration bilden sich Poloxamermizellen aus, die mit den Monomeren im Gleichgewicht stehen [Mortensen et al., 1993]. Bei einer bestimmten Konzentration und einer dafür charakteristischen Temperatur kommt es zur Gelbildung [Wanka et al., 1990].

Bei niedrigen Temperaturen liegen beide Polymerblöcke, Polyoxypropylen und Polyoxyethylen hydrophil, also als gelöste Ketten vor. Durch Temperaturerhöhung kommt es zur Dehydratation der Polyoxypropylenketten. Es erniedrigt sich die Löslichkeit des Polyoxypropylenblocks, der als Kern vorliegt. Dieser ist von einem dichten Kranz aus hydrophilen Polyoxyethylenketten umgeben. Die Mizellgröße erhöht sich mit steigender Temperatur [Mortensen et al., 1993, Wanka et al., 1990], sodass es zu einer engen Packung von Mizellen und unter deren Interaktion zur Gelbildung kommt [Cabana et al., 1997, Wanka et al., 1990]. Dabei wirken Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Polyoxypropylenketten. Diese Anziehungskräfte werden von der Dehydratation der Polyoxypropylenketten begünstigt. Auf diese Weise ent-

steht das Gelgerüst. Die Polyoxyethylenketten bleiben in der Wasserphase und üben dagegen eine sterische Stabilisierung aus [Wanka et al., 1990, Yang et al., 2004].

Da die Konzentration von Mizellen linear mit steigender Temperatur steigt, kommt es bei höheren Temperaturen zu einer Formveränderung von sphärischen zu ellipsoiden Mizellen. Dies führt zu einer verringerten intermizellaren Interaktion, sodass sich das kubische Gitter bei hohen Konzentrationen bzw. Temperaturen zu stangenförmigen Strukturen, dem hexagonalen Aufbau umformt und bei weiterer Steigerung lamellare Strukturen ausbildet [Mortensen et al., 1993] (siehe auch Kapitel 2.1.1.1).

Für die Freisetzung und Permeation aus poloxamerhaltigen Gelen ist die Struktur von großer Bedeutung. So ist die Diffusion von Arzneistoffen bei mizellaren Poloxamergelen hauptsächlich limitiert von der Anzahl der Mizellen pro Volumeneinheit, die durch die Poloxamerkonzentration bestimmt wird. Dadurch wird der Diffusionsweg durch die wässrige Phase gedehnt und man erhält einen geringeren Diffusionskoeffizienten bei höheren Poloxamerkonzentrationen [Juhasz et al., 1989]. Dieser Zusammenhang kann als exponentiell beschrieben werden [Gilbert et al., 1986]. Des Weiteren können verschiedene flüssigkristalline Formulierungen als sustained-release-Formulierung eingesetzt werden. Die Arzneistoffdiffusion wird im Vergleich zu einer Lösung je nach flüssigkristallinem System um den Faktor 10-1000 reduziert [Mueller-Goymann et al., 1993, Mueller-Goymann et al., 1986, Müller-Goymann, 2004, Trotta, 1999].

Ein poloxamerhaltiges Hydrogel stellt das Gel Cordes der Ichthyol-Gesellschaft dar. Es enthält gereinigtes Wasser, Poloxamer 407, Propylenglycol, Citronensäure, Dinatriumhydrogenphosphat und Butylhydroxytoluol und dient als Hydrogel-Grundlage zur Einarbeitung diverser Wirkstoffe in Rezeptur und Defekur gemäß Apothekenbetriebsordnung [Ichthyol-Gesellschaft Cordes, Hermann & Co. (GmbH & Co.) KG, 2014]. Ein Beispiel für ein weiteres, seit 1996 im Markt befindliches, zur topischen Anwendung bestimmtes Tensidgel mit Poloxamer ist das Ibuprofen-haltige Dolgit Mikrogel. Dabei handelt es sich um ein kubisch flüssigkristallines System mit Ringing-Effekt. Es enthält neben dem Strukturgeber Poloxamer 407, Isopropylalkohol zur Permeationsverbesserung, Dimethylisobutylid, mittelkettige Triglyceride als Ölphase, Lavendel- und Bitterorangenöl zur Parfümierung und Wasser. Die dispergierte Ölphase ist mechanisch durch das flüssigkristalline System stabilisiert, da die kubische Phase eine Fließgrenze aufweist. Ein hoher Anteil an Poloxamer sorgt zum einen für die Ausbildung der flüssigkristallinen Mikrostruktur, zum anderen interagiert er mit Stratum-corneum-Lipiden und erhöht die Permeabilität. Gemeinsam mit Isopropylalkohol, welches ebenfalls die Permeabilität der Haut verbessert, resultiert eine, verschiedenen kommerziellen Formulierungen, überlegene Zubereitung [Müller-Goymann, 2004]. Eine Weiterent-

wicklung des Dolgit Mikrogels stellt das wirkstofffreie, poloxamerhaltige Thermogel dar, das im folgenden Kapitel 2.1.2.3.1 vorgestellt wird.

2.1.2.3.1 Thermogel

Winkler zeigte 2005 in seiner Arbeit eine deutlich erhöhte Permeation von ALA aus dem zuvor beschriebenen Ibuprofen-haltigen Dolgit Mikrogel im Vergleich zu Permeationen aus Basiscreme DAC, Excipial Creme und Excipial Fettcreme. Daher wurde 2008 von Grüning das Thermogel entwickelt. Es stellt eine Ibuprofen-freie, halb feste, isotrope Zubereitung mit Ringing-Effekt auf Basis des erwähnten Dolgit Mikrogels dar. Diese patentierte Zubereitung setzt sich wie folgt zusammen [Muller-Goymann et al., 2006]:

Tabelle 2-2: Zusammensetzung des Thermogels

Komponente	Anteil [%]
Poloxamer 407	20
Dimethylisosorbid	12,5
Isopropylalkohol	12,5
Mittelkettige Triglyceride = Propylenglykol dicaprylat dicaprat	5
Wasser	50

Das Thermogel ist sehr einfach im Unguator herzustellen. Man wiegt alle Einzelkomponenten in eine Kruke ein und lässt sie anschließend im Unguator homogenisieren. Des Weiteren stellt Thermogel ein gutes Vehikel für die Permeation von Wirkstoffen dar. Für ALA zeigt es einen 7,5-fach erhöhten Permeationskoeffizienten im Vergleich zur Basiscreme DAC sowie 19,5-fach erhöht im Vergleich zur Wasserhaltigen hydrophilen Salbe und 6,4-fach erhöht im Vergleich zum Dolgit Mikrogel [Grüning et al., 2007]. Die Permeationsförderung von Thermogel beruht auf dem Synergismus aller enthaltenen Komponenten und geht über den rein additiven Effekt der jeweiligen Einzelkomponenten hinaus [Grüning, 2007].

Van Hemelrijck charakterisierte das Thermogel in polarisationsmikroskopischen Untersuchungen als isotrope Zubereitung mit „dot-like texture“, also eine Textur mit kleinen eingelagerten Tröpfchen [van Hemelrijck et al., 2011]. Mittels Kleinwinkelröntgenbeugungsuntersuchungen ließ sich zeigen, dass es sich bei der flüssigkristallinen Struktur des Thermogels um

eine kubisch primitive vom Typ Pn3m mit einem Netzebenenabstand d von 15,32 nm handelt [van Hemelrijck, 2011].

Auch in der antimykotischen Behandlung von Fuß- und Nagelpilz (Tinea pedis und Onychomycosis) ist eine verbesserte Penetration der Wirkstoffe für den Therapieerfolg von besonderer Bedeutung [Müller-Goymann, 2004]. Für den lipophilen, antimykotischen Wirkstoff Terbinafin-HCl (TBF) konnte eine höhere Permeationsrate aus dem Thermogel beschrieben werden im Vergleich zu den Permeationsraten aus Basiscreme DAC und dem auf dem Markt befindlichen Produkt Lamisil. Darüber hinaus konnten durch Veränderung der Zusammensetzung des Thermogels weitere Formulierungen generiert werden, die die Löslichkeit von TBF von 1 % auf bis zu 4 % steigern konnten. Die höheren Konzentrationen in den Formulierungen führten dabei auch zu höheren Permeationsraten [Müller-Goymann, 2011]. Auch bei Permeationsuntersuchungen durch Rinderhuf zeigte sich eine signifikant höhere Permeation von TBF aus Thermogel im Vergleich zu Lamisil Dermgel. [Luisiana et al., 2010].

Mit Hilfe eines neuen mit *Trichophyton rubrum* infizierten in-vitro Nagelplattenmodells aus humanem Haarkeratin (KF) sowie aus Rinderhuf wurde die antimykotische Effizienz von Thermogel mit TBF, einem 20 %igen Poloxamerhydrogel mit TBF und diversen Marktprodukten verglichen. Dabei zeigte das Poloxamerhydrogel neben Loceryl Nagellack eine vollständige Inhibition des Pilzwachstums. Die Untersuchung des Thermogels zeigte eine fast vollständige Inhibition des Pilzwachstums und war damit den Positivkontrollen Lamisil Creme und Canesten Extra Creme überlegen [Reichl et al., 2013].

Beim Vergleich der Effizienz der antimykotischen Wirkstoffe TBF und Ciclopirox im infizierten Nagelmodell aus poloxamerhaltigen Formulierungen zeigten sich bei beiden Wirkstoffen vollständige Inhibitionen des Pilzwachstums. Damit waren diese 1 %igen Formulierungen dem 8 %igen, auf dem Markt befindlichen Nagellack, Ciclopoli trotz des niedrigeren Wirkstoffgehalts leicht überlegen [Täuber et al., 2014 a]. Das Thermogel war beim KF-Modell Ciclopoli leicht unterlegen [Täuber et al., 2014 b]. Darüber hinaus stellte Täuber weitere poloxamerhaltige Formulierungen vor, die höhere Permeationskoeffizienten von Ciclopiroxamin durch Keratinfilme, Rinderhuf und isoliertem humanem Stratum corneum zeigten als Ciclopoli und Selergo 1 % Creme [Täuber et al., 2015].

2.2 5-Aminolävulinsäure

2.2.1 Charakterisierung

Die 5-Aminolävulinsäure (ALA) ist eine Aminosäure und gehört zur Gruppe der Aminoketonen und Ketocarbonsäuren. [Fukuda et al., 2005]. Unter physiologischen Bedingungen liegt ALA hauptsächlich als Zwitterion vor, da die pK-Werte bei $pK_1 = 4,05 \pm 0,05$ und $pK_2 = 8,3 \pm 0,1$ liegen [Novo et al., 1996].

ALA spielt physiologisch eine wichtige Rolle, denn es stellt den ersten Schritt in der Biosynthese von Tetrapyrrolen und Porphyrinen dar, die in allen lebenden Zellen vorkommen. Damit ist ALA auch eine Vorstufe in der Synthese des Häm, dem physiologisch eine entscheidende Rolle zukommt. Als Beispiele sind u.a. Hämoglobin Myoglobin, Cytochrome und Katalase zu nennen [Fukuda et al., 2005]. Dabei wird ALA in den Mitochondrien über die Katalyse von 5-Aminolävulinat-Synthase (ALAS) aus Glycin und SuccinylCoA gebildet. Durch die Kondensation zweier ALA-Moleküle im Cytosol durch die 5-Aminolevulinat-Dehydrase (ALAD) entsteht Porphobilinogen (PBG). Über eine enzymatische Kaskade werden vier PBG-Moleküle zu einem Tetrapyrrolring umgesetzt, das über eine Decarboxylierung zum Protoporphyrin IX (PpIX) umgesetzt wird. Diesem kommt in der PDT die entscheidende Funktion als Photosensibilisator zu. Über das Einführen eines Eisenmoleküls über die Ferrochelatase entsteht aus PpIX Häm [Fotinos et al., 2006].

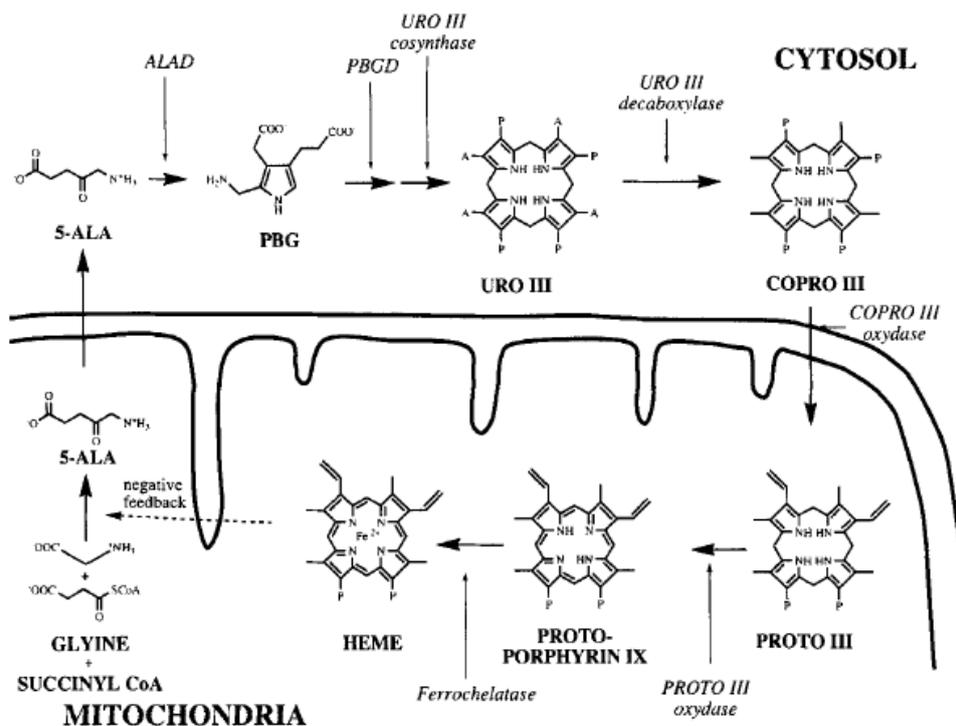


Abb. 3: Biosynthese von Häm über den Protoporphyrinstoffwechsel, Uroporphyrinogen (URO), Coproporphyrinogen (CORPO), Protoporphyrinogen (PROTO), Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) [Fotinos et al., 2006]

Normalerweise inhibiert das Häm über einen negativen Feedback-Mechanismus die endogene ALA-Bildung, schützt die Zelle vor einer übermäßigen Akkumulation von ALA und verhindert dadurch eine natürliche PpIX-Photosensibilisierung. Dieser Regulationsmechanismus wird in der photodynamischen Therapie durch die Zufuhr von exogenem ALA übergangen, was in einem Überschuss an PpIX resultiert [Fotinos et al., 2006].

Eine weitere Eigenschaft von PpIX wird therapeutisch ausgenutzt. So wird die vorkommende Fluoreszenz des Photosensibilisators in der Fluoreszenz-Photodetektion (FD) genutzt. Dieses dient zur Diagnose von Krebserkrankungen und zur Visualisierung auch während der Operation zur Abschätzung der Tumorgöße [Fukuda et al., 2005]. Allerdings sind die Ergebnisse recht inkonsistent und eine Überlegenheit der Methode konnte gegenüber klinischer Bewertung und Abschätzung nicht gezeigt werden [Morton et al., 2013].

2.2.2 Topische photodynamische Therapie

In der photodynamischen Therapie (PDT) wird ein Photosensibilisator exogen zugeführt und dieser mit Licht geeigneter Wellenlänge aktiviert [Fotinos et al., 2006, Fukuda et al., 2005]. Dabei ist das Vorhandensein von Sauerstoff eine Voraussetzung für die Zytotoxizität der PDT. Diese beruht auf photooxidativen Reaktionen, die in Typ I und Typ II unterschieden werden. Die photooxidative Reaktion vom Typ I beruht auf der direkten Reaktion des angeregten Photosensibilisators mit dem Gewebe, spielt aber nur eine untergeordnete Rolle. Bei der photooxidativen Reaktion vom Typ II kommt es durch die Aktivierung des Photosensibilisators in den Singulett-Zustand zum Übergang in den Triplett-Zustand. Im Gewebe vorhandener Sauerstoff wird durch Energieübertragung zu hochreaktiven Sauerstoffspezies [Foote, 1968, Wolf, 1999], die für immunmodulatorische und zytotoxische Effekte verantwortlich sind [Steinbauer et al., 2010]. Hochreaktive Sauerstoffspezies sind höchst zytotoxisch und zerstören zelluläre Strukturen wie Zellmembrane, Mitochondrien, Lysosomen, Zellkerne [Fotinos et al., 2006] und oxidieren Aminosäuren, Nukleinsäuren und Fettsäuren und sind damit hauptverantwortlich für die zytotoxischen Effekte der PDT [Wolf, 1999].

Photosensibilisatoren zeigen eine bevorzugte Akkumulation im Tumorgewebe, die für eine gute Selektivität der Therapie verantwortlich ist. Diese ist zumindest teilweise auf Low-Density-Lipoproteinen (LDL) zurückzuführen, die die Photosensibilisatoren aufnehmen und über die sie in Tumore aufgenommen werden. Tumorzell-Membrane weisen eine extrem hohe Dichte von LDL-Rezeptoren aus, sodass sich der Photosensibilisator in der Tumorzelle anreichert. Weitere Punkte, die die Akkumulation der Photosensibilisatoren im Gewebe begünstigen, sind die Retention im Gewebe durch herabgesetzte Löslichkeit im sauren Milieu des Tumorgewebes, eine erhöhte Gefäßpermeabilität des veränderten Gewebes und ein verminderter Abtransport durch eine schwache Lymphdrainage [Donnelly et al., 2005, Jori, 1990, Wolf, 1999].

Photosensibilisatoren können in 2 Generationen eingeteilt werden. Während die Photosensibilisatoren der 1. Generation sehr lange Photosensibilisierungen von bis zu acht Wochen zeigten, war ihr Einsatz stark eingeschränkt. Photosensibilisatoren der 2. Generation zeigen deutlich kürzere Photosensibilisierungszeiten. Außerdem sind ihre Absorptionsbanden in den längerwelligen Bereich verschoben. Dadurch werden bessere Penetrationstiefen des Lichtes erreicht und dickere Tumore können besser behandelt werden [Pass, 1993, Wolf, 1999].

Die PDT ist ein etabliertes Verfahren zur Behandlung von nicht-melanozytärem Hautkrebs. Dabei erstrecken sich die Indikationen von Hautkrebsformen und ihren Vorstufen, wie aktinische Keratose, Morbus Bowen, oberflächlichem und nodulärem Basalzellkarzinom, wofür sie die Zulassung besitzen [Kohl et al., 2013, Morton et al., 2013]. Darüber hinaus werden weitere Indikationen beschrieben wie zum Beispiel aktinische Chelitis, Akne vulgaris, Psoriasis vulgaris, vulgäre und genitale Warzen, kutane Leishmaniose und kutanes Lymphom [Klein et al., 2008, Radakovic, 2012]. Außerdem sind kosmetische, hautverjüngende Effekte in zahlreichen Studien bestätigt worden [Kohl et al., 2013, Morton et al., 2013].

Eine antimikrobielle Wirkung der PDT gegen Bakterien [Maisch et al., 2004], ist mit einer geringer ausgeprägten Resistenzbildung als bei Antibiotika in der Literatur beschrieben. Aktuell zeigt die Substanz PPA904, ein Phenothiazin-Derivat eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit bei Ulcera crurum, wobei weitere Studien notwendig sind [Kohl et al., 2013]. Darüber hinaus kommt die topische PDT auch in der Parodontologie zum Einsatz. Hier werden photoaktive Farbstoffe aus der Gruppe der Phenothiazine verwendet, um eine antimikrobielle Therapie zur Behandlung der Parodontitis durchzuführen [Meisel et al., 2014].

Bei der Behandlung der aktinischen Keratose wurde die PDT kürzlich als Methode der Wahl empfohlen. Die anderen Therapieoptionen wie Kürettage, Kryotherapie und die topische Behandlung mit 5-Fluorouracil, Diclofenac und Imiquimod zeigen ihre Nachteile. Bei der Kürettage kommt es häufig zu Vernarbungen und Infektionen des behandelten Areals. Bei der Kryotherapie kann es zu transitorischen Hyperpigmentierungen kommen und die topische Behandlung zeigt häufig schlechte Compliance und wird schlecht vertragen. Daher ist die PDT mit guten Ansprechraten und einem guten kosmetischen Ergebnis überlegen. Ein Nachteil ist allerdings die Schmerzbelastung der Patienten durch die PDT. Die Mechanismen der Schmerzentstehung sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass es durch neuronale Stimulation über nozizeptive Endigungen dünner myelinisierter A-Delta-Fasern zur Schmerzempfindung kommt. Weitere entscheidende Faktoren könnten die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Entzündungsreaktionen durch die entstehenden Zellnekrosen sein, die durch Hyperthermien noch verstärkt werden [Fink et al., 2015]. Die Verwendung des ALA-Methylester (MAL) scheint weniger schmerzhaft zu sein als ALA. Es wird angenommen, dass ALA, im Gegensatz zu MAL, über GABA-Rezeptoren in periphere Ner-

venendigungen gelangt. Daher kann die gleichzeitige Applikation kalter Luft den Schmerz reduzieren [Klein et al., 2008]. Es scheint dadurch, die transkutane Nervenstimulation limitiert zu werden. Aber auch die photodynamische Reaktion kann dadurch verlangsamt werden [Morton et al., 2013]. Durch die Behandlung der Behandlungsstellen mit Tetracain-Gel ein Lignocain/Prilocain-Gel, Morphingel, Emla[®] oder einer Capsaicincreme kommt es zu keiner signifikanten Schmerzverbesserung [Fink et al., 2015, Klein et al., 2008, Morton et al., 2013]. Daher ist die Kaltluftanalgesie die zunehmend eingesetzte Methode der Schmerzbekämpfung [Fink et al., 2015]. Weitere vielversprechende Therapieoptionen zur Schmerzbekämpfung sind die Hypnose, die Behandlung mit oralen Schmerzmitteln kombiniert mit einer subkutanen Infiltrationsanästhesie [Klein et al., 2008] und die Inhalationsanalgesie mit Lipovan [Fink et al., 2015].

Der sogenannten Tageslicht-PDT wird wegen ihrer geringeren Schmerzbelastung zunehmend mehr Interesse entgegen gebracht, obwohl sie nicht zugelassen ist. Die geringeren Schmerzen beruhen wahrscheinlich auf einer kontinuierlichen Produktion und Photoaktivierung von geringeren Mengen PpIX. Hierbei ist eine 2-stündige Tageslichtexposition notwendig. Da dem Patienten viel Verantwortung überlassen wird und die Therapie für den Arzt weniger gut kontrollierbar und reproduzierbar (z.B. Wetter, Jahreszeit) ist, besteht allerdings ein Risiko für eine ineffiziente Behandlung [Fink et al., 2015, Kohl et al., 2013].

2.2.2.1 ALA in der PDT

ALA und sein Methylester-Derivat MAL werden in der PDT nur topisch angewendet [Klein et al., 2008, Steinbauer et al., 2010], um systemische Nebenwirkungen auszuschließen. Diese sind nach parenteraler Gabe nicht unerheblich: Übelkeit, Erbrechen, transiente Leberfunktionsstörungen, erheblicher Abfall des systolischen und diastolischen Blut- und Pulmonaldruck [Fotinos et al., 2006]. Topisch zeichnet sich ALA dagegen durch eine geringe systemische Toxizität [Fotinos et al., 2006], eine geringe photosensibilisierende Wirkung [Fotinos et al., 2006, Wolf, 1999] sowie eine hervorragende Tumorselektivität aus. Diese Selektivität liegt an der langsamen Umsetzung von PpIX über die Ferrochelatase zum Häm. Durch die exogene Gabe von ALA fällt schnell ein Überschuss von PpIX an. Da dieses sehr langsam zum Häm weiterverarbeitet wird, akkumuliert es und sensibilisiert die Zelle. Die Akkumulation von PpIX im Tumorgewebe wird zusätzlich durch den hohen Hämbedarf aufgrund des erhöhten Umsatzes und dies wiederum durch einen intrazellulären entstehenden Eisenmangel verstärkt [Steinbauer et al., 2010].

Die PDT mit ALA ist höchst selektiv für die Behandlung von neoplastischen Erkrankungen, wird aber hauptsächlich bei aktinischer Keratose angewendet [Fotinos et al., 2006]. Allerdings stellt die extrem schlechte dermale Verfügbarkeit eine Schwierigkeit dar. Da ALA unter physiologischen Bedingungen als Zwitterion vorliegt [Novo et al., 1996] und es sich daher um

ein sehr hydrophiles, polares Molekül handelt, resultiert nach topischer Applikation eine schlechte Eindring- bzw. Penetrationstiefe in das Gewebe und eine inhomogene Verteilung von PpIX. Dies wirkt sich v.a. schlecht auf die Behandlung nodulärer Basalzellkarzinome aus [Fotinos et al., 2006].

Nichtsdestotrotz hat die topische Gabe entscheidende Vorteile gegenüber der oralen Gabe. Neben den bereits erwähnten Nebenwirkungen ist die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation schlecht [Fotinos et al., 2006]. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 45 min und nur etwa 60 % werden nach oraler Gabe resorbiert [Dalton et al., 2002]. Dabei wird davon ausgegangen, dass davon ein erheblicher Anteil unverändert über die Niere ausgeschieden wird und ein weiterer Teil in der Leber metabolisiert wird. Daher liegt das Augenmerk der Forschung hauptsächlich auf der Verbesserung der lokalen Verfügbarkeit von ALA bzw. ALA-Derivaten [Fotinos et al., 2006]. Dies wird im folgenden Kapitel dargelegt.

2.2.2.2 Verbesserung der dermalen Verfügbarkeit von ALA

Um die schlechte dermale Verfügbarkeit von ALA bei topischer Gabe zu verbessern, werden verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen werden Formulierungen mit Penetrationsverbesserern bzw. geeignete Vehikel eingesetzt, die die Penetration und Permeation des Wirkstoffes verbessern sollen. Ein anderer Ansatzpunkt ist die chemische Modifikation von ALA, um die Lipophilie des Moleküls zu erhöhen. Dabei spielen die ALA-Ester eine wichtige Rolle. Darüber hinaus werden physikalische Methoden angewandt, um den Transport von ALA durch das SC zu erleichtern. Diese Strategien werden im Folgenden behandelt.

2.2.2.2.1 Optimierung der Formulierung

Eine Möglichkeit, die Penetration von ALA zu verbessern, ist Penetrationsverbesserer wie beispielsweise Dimethylsulfoxid (DMSO), Ölsäure, Glycerolmonnooleat oder Ethanol [Barry, 1987, Lopez et al., 2004] in die Formulierung einzuarbeiten. Dabei wurde DMSO in verschiedenen Konzentrationen vielfach untersucht und zeigte konzentrationsabhängig sehr gute Ergebnisse [Casas et al., 2000, Donnelly et al., 2005]. Dabei wurden auch Konzentrationen deutlich über 10 % eingesetzt, die mit starken Hautirritationen einhergehen können [Donnelly et al., 2005].

Auch der Einsatz von geeigneten Vehikeln ist Gegenstand der Forschung. Valenta stellte 2005 ein kubisches Gel vor, das eine hohe in-vitro Permeationsrate und zudem eine verbesserte Lagerstabilität zeigte [Valenta et al., 2005]. Das sogenannte Thermogel, ebenfalls ein kubisches System wurde bereits in Kapitel 2.1.2.3.1 behandelt.

Eine von de Campo Araujo 2010 vorgestellte Mikroemulsion zeigte eine verbesserte in-vitro Permeation verglichen mit anderen Vehikeln. Auch in-vivo wurde eine intensive und homogene Fluoreszenz in tieferen Hautschichten durch die Mikroemulsion gezeigt [de Campos

Araújo et al., 2010]. Bragagni untersuchte niosomale Dispersionen mit ALA und konnte hier eine Verbesserung der in-vitro Permeation und Penetration zeigen, wobei die klassischen Niosomen noch vorteilhafter waren als elastische Niosomen [Bragagni et al., 2015]. Auch Liposomen wurden als Vehikel für ALA untersucht. Sie zeigten allerdings keine Verbesserung der Porphyrinsynthese. Casas et al. untersuchten ALA und ALA-Hexylester im Gewebemodell. Da die Wirkstoffe in den Liposomen eingeschlossen sind, zeigten sich sogar niedrigere PpIX-Werte verglichen mit deren freien Formulierungen [Casas et al., 2002].

Weitere interessante Vehikel stellen die Fertigarzneimittel Ameluz und Alacare dar. Diese werden im Folgenden in Kapitel 2.2.2.3 behandelt.

2.2.2.2 Chemische Modifikation von ALA

Da ALA bei physiologischen Bedingungen als Zwitterion vorliegt [Novo et al., 1996], ist ein Ansatzpunkt zur Erhöhung der Lipophilie die chemische Modifikation. Neben der Molekülgröße ist diese eine der wichtigsten Faktoren für die Permeation durch das Stratum corneum [Fotinos et al., 2006]. Dabei wurde eine Reihe von Modifikationen durchgeführt, um die Penetrationstiefe zu erhöhen. Die einfachste und häufig behandelte Lipophilisierung ist die Veresterung mit homologen Alkoholen [Lopez et al., 2001]. Dabei haben zahlreiche in-vivo und in-vitro Studien gezeigt, dass ALA-Ester die Penetration verbessern können und die PpIX-Produktion steigern können [Donnelly et al., 2005]. Dieser Effekt ist abhängig von der Kettenlänge des Esters. Kurzkettige Ester (C1-C3) zeigten geringere PpIX-Fluoreszenzen als lipophilere Ester. Allerdings ist hierbei ein Optimum vorhanden. Längerkettige Ester zeigen wieder geringere PpIX-Fluoreszenzen, was sich durch ein erhöhtes Anfallen der lipophilen Prodrugs in der Zellmembran erklären lässt [Lopez et al., 2004].

Darüber hinaus konnten die ALA-Derivate ihre Überlegenheit nur bei sehr langen Applikationszeiten von 30 h zeigen. Bei Applikationszeiten von 4-6 h, die der klinischen Anwendung entsprechen, zeigten sich keine signifikanten Unterschieden bei der Penetration ins Stratum corneum bei allen Ester-Derivaten. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die PpIX-Produktion aus ALA-Derivaten von einer Lag-Zeit begleitet wird. Diese kann durch eine Reservoirbildung im Stratum corneum und eine langsamere Freisetzung aus dem Vehikel erklärt werden [Donnelly et al., 2005].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Einsatz von ALA-Estern eine gute Therapiemöglichkeit darstellt. In-vivo Studien zeigen, dass ALA und seine Ester ähnlich gute Wirkungen erzielen und keine deutliche Überlegenheit der Ester-Derivate vorliegt [Gerscher et al., 2000, Juzeniene et al., 2002, Moan et al., 2003]. Allerdings stellt die Therapie von schweren nodulären Basalzellkarzinomen mit dem ALA-Methylester eine deutlich überlegenere Therapieoption gegenüber der konventionellen ALA-PDT dar [Donnelly et al., 2005].

2.2.2.2.3 Physikalische Methoden

Eine Reihe von physikalischen Methoden wurde bereits untersucht, um die Bioverfügbarkeit von ALA zu erhöhen. Mit Hilfe von Mikronadeln kann die Einwirkzeit von ALA reduziert werden. Bis in eine Tiefe von 1,875 mm kann ALA nach einer Mikronadel-Behandlung besser eingeschleust werden [Donnelly et al., 2008]. Auch bei der Behandlung von aktinischer Keratose bei organtransplantierten Empfängern stellte die Mikronadel-Behandlung eine effiziente Strategie mit einer hohen Heilungsrate und einem geringen Risiko eines Rezidivs dar [Bencini et al., 2012].

Intrakutane Injektion von ALA in das Tumorgewebe wurde bereits untersucht, um höhere Penetrationstiefen zu erreichen. Sie zeigte vergleichbare bis bessere Ergebnisse, verglichen mit der topischen Applikation [Casas et al., 1999, De Blois et al., 2001]. Allerdings erlaubt der Gebrauch von Nadel und Spritze keine reproduzierbare Kontrolle über die Einspritztiefe. Ferner werden mehrere Injektionen gebraucht, um eine gute Verteilung im Gewebe zu erreichen. Eine Verbesserung stellt hierbei die nadelfreie Jet-Injektion dar, die eine reproduzierbare intratumorale Wirkstoffabgabe ermöglicht. Donnelly zeigte 2007, dass ALA erfolgreich bis in eine Tiefe von 2,625 mm eingeschleust werden konnte [Donnelly et al., 2007].

Iontophorese ist eine physikalische Methode, die den Transport von bevorzugt ionischen Molekülen in die Haut über das Anlegen eines elektrischen Stroms erleichtert. Dabei wirken zwei Mechanismen, die Elektromigration und die Elektroosmose. Bei der Elektromigration wird das geladene Molekül in der Nähe der Elektrode mit der gleichen Ladung aufgetragen. Beim Anlegen des elektrischen Stroms wird das Ion von der Elektrode abgestoßen und zur Gegenelektrode gezogen. Bei der Elektroosmose kommt es zu einem konvektiven Fluss von der Anode zur Kathode, der u.a. neutrale, polare Moleküle wie ALA transportiert. Da ALA bei pH 7,4 zwitterionisch vorliegt, ist die Elektroosmose der Haupttransportmechanismus [Lopez et al., 2004]. Lopez zeigte 2003, dass im Vergleich zu einer DMSO-Formulierung viermal mehr ALA mittels Iontophorese in die Haut geschleust werden konnte [Lopez et al., 2003].

Darüber hinaus wurden weitere physikalische Verfahren untersucht, die zu einer Verbesserung der Bioverfügbarkeit in der Haut führen. Dazu gehören die Störung der Barrierefunktion des Stratum corneums u.a. durch Tape-stripping, Kürettage oder Dermabrasion, die Anwendung von Ultraschall oder die Temperaturerhöhung der Haut von 32 °C auf 37 °C [Donnelly et al., 2005].

2.2.2.3 Fertigarzneimittel in der topischen PDT

Aktuell gibt es in Europa vier zugelassene Fertigarzneimittel, die in der topischen PDT zum Einsatz kommen [Morton et al., 2013, Rote Liste, 2017].

Die seit 2002 auf dem Markt befindliche Creme Metvix enthält als Wirkstoff MAL, den Methyl-ester von ALA. Als lipophileres Derivat von ALA ist es nicht nur für die Behandlung von aktinischer Keratose, sondern auch zur Behandlung oberflächlicher und knotiger Basalzellkarzinome und Morbus Bowen zugelassen [Klein et al., 2008, Morton et al., 2013].

Bereits 2009 wurde das ALA-haltige Pflaster Alacare der Photonamic GmbH & Co. KG zur Behandlung aktinischer Keratose im Gesicht und auf der Kopfhaut zugelassen [Morton et al., 2013]. Es ist ein selbsthaftendes dünnes Pflaster, welches auf Grundlage der von Lieb publizierten Daten über selbstadhäsive dünne Filme entwickelt wurde [Hauschild et al., 2009, Lieb et al., 2002]. Vorteil ist die einfache Handhabung ohne Okklusionsverband oder vorheriger Kürettage. Die Stellen müssen haarfrei sein und pro Pflaster dürfen nur Keratosen behandelt werden, die maximal 1,8 cm im Durchmesser groß sind. Dabei können pro Sitzung insgesamt 6 Alacare-Pflaster angewendet werden. Diese werden für 4 Stunden bis zur Bestrahlung aufgeklebt. Die läsionsbedingte Abheilungsrate lag bei 82 bzw. 89 % und war damit der Kryotherapie und Placebo überlegen [Kohl et al., 2013, Morton et al., 2013].

Ameluz Gel der Biofrontera Bioscience GmbH wurde 2011 zur Behandlung leichter bis mittelschwerer aktinischer Keratose im Gesicht und auf der Kopfhaut zugelassen. Für die Behandlung müssen vor der Inkubation mit Ameluz die zu behandelnden Läsionen aufgeraut und Hyperkeratosen entfernt werden. Das Gel sollte nach Applikation 10 min auf der Haut trocknen, bevor für 3 h ein undurchlässiger Okklusionsverband angebracht wird. Anschließend erfolgt die Bestrahlung mit rotem Licht $\lambda = \text{ca. } 630 \text{ nm}$ [Kohl et al., 2013, Morton et al., 2013]. In einer großen multizentrischen Studie wurde Ameluz gegen Metvix und Placebo getestet. Die komplette Abheilung der aktinischen Keratose war mit 90,4 % deutlich überlegen gegenüber Placebo mit 37,1 % und sogar gegenüber Metvix mit 83,2 %. Das Auftreten von Schmerzen war bei Ameluz und Metvix nicht signifikant unterschiedlich [Novak et al., 2013]. Bei Ameluz Gel handelt es sich um eine Nanoemulsion, die sowohl eine verbesserte Penetration von ALA in die Zellen und ins Gewebe und damit eine verbesserte Bioverfügbarkeit zeigt sowie eine Verbesserung der chemischen Stabilität. Wie die chemische Stabilisierung zustande kommt, ist noch nicht vollständig bestimmt. Es zeigt sich aber, dass die Nanosomen eine Mikroumgebung schaffen, die sich besonders günstig auf die Stabilität von ALA auswirkt. In der vorhandenen Nanoemulsion ist ALA nicht in die Partikel eingeschlossen, sondern haftet der äußeren Monolayer an [Roca, 2009].

Seit 2016 ist das Fertigarzneimittel Luxerm auf dem Markt. Die Creme enthält den Wirkstoff MAL und ist ausschließlich zur Behandlung im Rahmen der Tageslicht-PDT bei dünnen oder nicht hyperkeratinischen Keratosen auf Gesicht und Kopfhaut bei Erwachsenen zugelassen, wenn andere Therapien als weniger geeignet anzusehen sind. In COMET-Studien wurde die Anwendung mit Tageslicht gegen die Behandlung unter Rotlicht getestet. Beide Verfahren zeigten zwischen 70 %-90 % vergleichbare Ergebnisse. Die Behandlung mit Tageslicht zeigte dabei deutlich weniger Schmerzen. Für die Behandlung muss das Wetter geeignet sein, um einen zweistündigen Aufenthalt im Freien zu ermöglichen. Vor dem Auftragen der Creme wird ein geeigneter Sonnenschutz aufgetragen und nach dem Trocknen Schuppen und Krusten entfernt [Fachinformation Luxerm, 2016, Thesen, 2017, Uter et al., 2017].

In den USA gibt es darüber hinaus ein Fertigarzneimittel mit dem Namen Levulan Kerastick, das zur Behandlung kleiner bis moderater aktinischer Keratose in Gesicht und auf der Kopfhaut zugelassen ist [Morton et al., 2013]. Es handelt sich dabei um ein Zweikammersystem in einem Kunststoffschlauch, in dem sich zwei Glasampullen befinden. In der einen Glasampulle befindet sich ALA in Pulverform, in der anderen befindet sich Ethanol 48 % (V/V). Durch leichten Druck werden die Glasampullen zerbrochen und es entsteht eine 20 %ige ALA-Lösung. Diese kann über einen dermatologischen Applikator aufgetragen werden. Es erfolgt eine Bestrahlung mit blauem Licht [Gold et al., 2004].

2.2.3 Stabilität

ALA unterliegt unter alkalischen Bedingungen einer schnellen Dimerisierung, in deren Folge es zum Ringschluss kommt und verschiedene Abbauprodukte resultieren. Durch einen nukleophilen Angriff (siehe Abb. 4) des primären Amins eines ALA-Moleküls an der Carbonylgruppe eines zweiten ALA-Moleküls entsteht ein offenkettiges Ketimin. Daraus entstehen Porphobilinogen (PBG), Pseudoporphobilinogen (Pseudo-PBG) und 2,5-Dicarboxyethyl-3,6-dihydropyrazin (DHPY). Die Oxidation von DHYP zu 2,5-Dicarboxyethylpyrazin (PY) läuft in Gegenwart von Sauerstoff ab (Abb. 5) [Bunke et al., 2000]. Dabei zeigen die Abbauprodukte DHYP und PY eine gelbe Färbung. Der Abbau von ALA wird daher unter einer makroskopisch sichtbaren Färbung der Formulierung von gelb über orange zu rot begleitet. Es wird angenommen, dass Pseudo-PBG ein rotes Abbauprodukt darstellt [De Blois et al., 2002] und unter anaeroben Bedingungen entsteht [Butler et al., 1992].

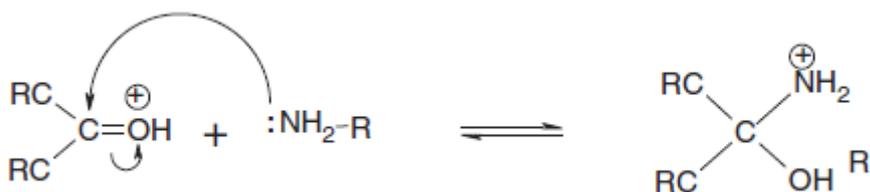


Abb. 4: Nukleophiler Angriff eines primären Amins an eine Carbonylgruppe [McCarron et al., 2005]

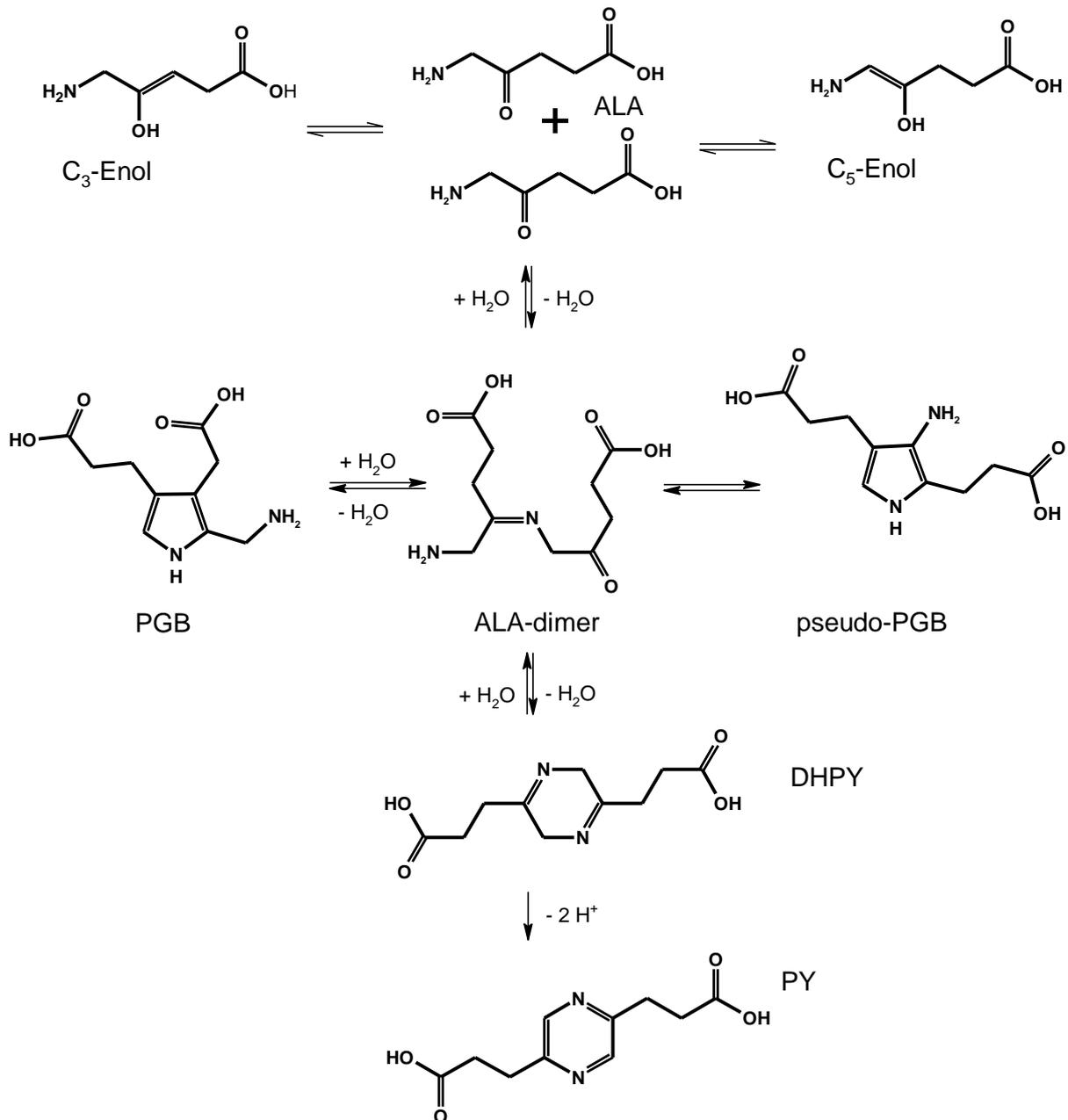


Abb. 5: Abbauprodukte von ALA, 5-Aminolävulinsäure (ALA), Prophobilinogen (PGB), Pseudo-Porphobilinogen (Pseudo-PGB), 2,5-Dicarboxyethyl-3,6-dihydropyrazin (DHPY), 2,5-Dicarboxyethylpyrazin (PY), modifiziert nach [Gander et al., 2003]

ALA ist eine sehr instabile Substanz. Ihr Abbau ist vom pH-Wert, der ALA-Konzentration, der Temperatur und vom Grad der Oxygenierung des Mediums, in dem ALA vorliegt abhängig [Bunke et al., 2000, De Blois et al., 2002, Elfsson et al., 1999, Gadmar et al., 2002, Novo et al., 1996].

Der Abbau von ALA ist stark vom pH-Wert abhängig. Für die Dimerisierung von ALA ist das Vorhandensein des Anions erforderlich. Gemäß den pK-Werten liegt ALA bei pH 5-7,5 hauptsächlich als Zwitterion vor (siehe Abb. 6). Bei pH 7,3 liegen neben dem Zwitterion etwa

10 % als Anion vor und je alkalischer es wird, umso mehr Anionen liegen vor. Bei den Anionen liegt ein freies Elektronenpaar am Stickstoff vor, über das ein nukleophiler Angriff an der Carbonylgruppe erfolgt. Daher ist für eine gute Stabilität ein niedriger pH-Wert günstig, da dadurch wenige Anionen vorliegen [Novo et al., 1996]. Elfsson konnte zeigen, dass die Halbwertszeit einer 1%igen Lösung bei pH 4,81 257 h und bei pH 7,42 3,0 h beträgt. Bei pH 2,35 konnte Elfsson im Zeitraum von 37 Tagen keinen Abbau feststellen [Elfsson et al., 1999].

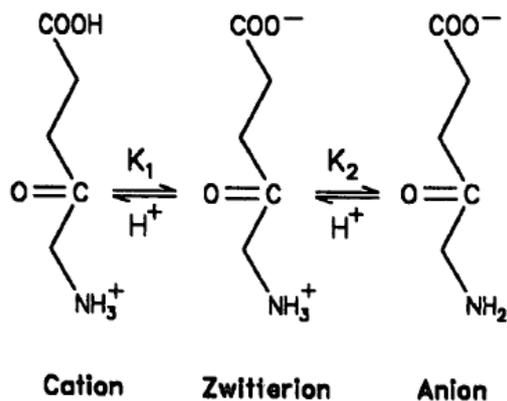


Abb. 6: Säure-Base-Gleichgewicht von ALA [Novo et al., 1996]

Elfsson und de Blois zeigten die Abhängigkeit des ALA-Abbaus von der ALA-Konzentration und der Temperatur. Je höher die Konzentration und je höher die Temperatur, umso mehr ALA zersetzt sich [De Blois et al., 2002, Elfsson et al., 1999]. Auch die Oxygenierung des Mediums hat Einfluss auf den ALA-Abbau, da für die Umsetzung von DHPY zu PY Sauerstoff notwendig ist [De Blois et al., 2002]. Bunke schlug vor, Formulierungen mit Stickstoff zu spülen, um den Sauerstoff zu entfernen und damit die Oxidation von DHPY zu PY zu verhindern [Bunke et al., 2000]. Dies ist allerdings widersprüchlich zu sehen, da dadurch die Bildung von Pseudo-PGB gefördert werden könnte [De Blois et al., 2002].

Elfsson stellte für den Abbau eine Reaktion zweiter Ordnung fest [Elfsson et al., 1999], die auch in anderen Publikationen postuliert wird [De Blois et al., 2002, Donnelly et al., 2008]. Bei Bunke zeigen sich dagegen unterschiedliche Kinetiken, je nachdem ob die Systeme be- oder entlüftet wurden [Bunke et al., 2000]. Und auch bei McCarron konnte bei der Lagerung von ALA in einem bioadhäsiven Pflaster, einem Polyethylenglykol-Gel und einem Glycerol-Gel bei verschiedenen Temperaturen keine durchgängig einheitliche Abbaukinetik beschrieben werden [McCarron et al., 2005].

Da es verschiedene Abbauprodukte und -wege von ALA gibt und sich das Vorkommen dieser Abbauprodukte je nach System unterscheiden kann, sind veröffentlichte Ergebnisse über

ALA-Abbaumechanismen und Produkte grundsätzlich kritisch zu hinterfragen, da sehr unterschiedliche Stabilitätstest-Bedingungen bestehen und in den meisten Fällen die Strukturen der Abbauprodukte nicht aufgeklärt werden [Butler et al., 1992]. Die Untersuchung der Stabilität stellt daher eine Herausforderung dar. Auch für das entwickelte Thermogel liegen bisher keine belastbaren Stabilitätsdaten vor.

Um ALA zu stabilisieren, wurden schon diverse Untersuchungen gemacht und Hypothesen aufgestellt. Die Einarbeitung von stabilisierenden Zusätzen waren nicht erfolgreich. Weder der Einsatz von EDTA [Elfsson et al., 1999] noch der Einsatz von Antioxidantien konnten eine Verbesserung bringen [Bunke et al., 2000].

Bei einem in einem Patent von 2003 von Gander entwickelten Ansatz wird ALA zur Stabilisierung in einem nicht-wässrigen Medium gelöst oder dispergiert. In nicht-wässrigen Lösungsmitteln, die weniger polar als Wasser sind, liegt ALA zumindest teilweise als Enol vor. Auch die Enolform zeigt eine Gelbfärbung, auch wenn hier noch kein Abbau stattgefunden hat. Die unpolare Enolform stabilisiert ALA und verlangsamt die Reaktion der Dimerisierung und damit auch den weiteren Abbau. Auch eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit geht mit der Enolform einher, da das Enol unpolarer als das Keton ist und damit besser durch physiologische Membrane aufgenommen werden kann [Gander et al., 2003].

McCarron untersuchte ebenfalls die Einarbeitung von ALA in nicht-wässrige Systeme, in seinem Fall in ein bioadhesives Pflaster und zwei wasserfreie Gele. Der ALA-Gehalt liegt dabei bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben nach etwa 200 Tagen zwischen 6,9 % und 56,8 % [McCarron et al., 2005]. Bunke verfolgte die Einarbeitung in nichtwässrige, wasser-mischbare Lösungsmittel wie DMSO, Glycerol und Propylenglykol nicht weiter, da eintretende Gelbfärbungen Anzeichen für Zersetzung waren [Bunke et al., 2000].

Sehr saure Lösungen können die Stabilität verbessern. Allerdings sind dafür pH-Werte < 2 notwendig, die dann für die klinische Anwendung nicht mehr geeignet sind [Bunke et al., 2000].

Das Fertigarzneimittel Ameluz kann die Stabilität von ALA deutlich verbessern. Der exakte Grund der Stabilisierung ist nicht publiziert. Eine Hypothese hierzu sieht wie folgt aus: ALA haftet in der Nanoemulsion den äußeren Membranlayern der Partikel an [Roca, 2009], bildet dort mit den Phosolipiden der Nanoemulsion ein Ionenpaar und ist so vor Abbau geschützt [Lübbert, 2016].

2.3 Mischprozesse

2.3.1 Flüssigkeitsströmung und Mischprozesse

Flüssigkeitsströme werden in zwei Kategorien eingeteilt: laminare und turbulente Ströme. Bei der laminaren Strömung kommt es zu einer geordneten und konstanten Flussbewegung mit parallelen Strömungslinien, während bei turbulenter Strömung Verwirbelungen vorherrschen. Dabei gibt die dimensionslose Reynoldszahl [Reynolds, 1883] einen Anhaltspunkt über den Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung:

$$R_e = \frac{\rho \cdot v \cdot D_H}{\mu} \qquad \text{Gleichung 2.3-1}$$

Dabei ist ρ die Dichte der Flüssigkeit, v die mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit, μ die dynamische Viskosität der Flüssigkeit und D_H der hydraulische Durchmesser, der wie folgt beschrieben wird:

$$D_H = \frac{4 \cdot A}{P_{wet}} \qquad \text{Gleichung 2.3-2}$$

A ist hier die Querschnittsfläche und P_{wet} die benetzte Umfangslänge. D_H ist abhängig von der Art bzw. Form des durchströmten Kanals, die Spalthöhe sowie Kanalhöhe und Breite [Weigl et al., 2003].

Beim Mischen von Flüssigkeiten ist es entscheidend für die Mischungsgüte, ob laminare oder turbulente Strömung im Mischer vorliegt. Bei niedriger Reynoldszahl herrscht laminare Strömung. Im Gegensatz dazu kommt es bei hohen Reynoldszahlen zur turbulenten Strömung. Diese turbulenten Verwirbelungen ermöglichen konvektiven Massentransport in alle Richtungen [Weigl et al., 2003]. Der Übergang von laminarem zu turbulentem Fließverhalten erfolgt bei den meisten Situationen typischerweise bei Reynoldszahlen zwischen 1000 und 2000 [Nguyen et al., 2002].

2.3.2 Mikromischer

Mikromischer gehören zu den Lab-on-a-chip-Technologien (LOC). Diese Systeme sind durch den Fluss von Fluiden im Mikromaßstab gekennzeichnet und finden in weiten Bereichen Anwendung. Im biomedizinischen Kontext werden LOC-Systeme für Immunoassays, der Analyse von Zellen und Gewebe, zur Krebsdiagnose, bei der Kapillarelektrophorese, aber auch in Bereichen der Pharmazie, Lebensmittelchemie, Kosmetik, für Tintenstrahldrucker, Verbrennungszellen und vielem mehr angewendet [Naher et al., 2010].

Mikromischer sollen einfach und günstig in der Herstellung sein, ohne bewegliche Teile vorliegen und einfach in komplexere LOC-Systeme einbaubar sein. Dadurch sollen günstige

Systeme entstehen, die in der Anwendung auch nur kleine Mengen von teuren Reagentien oder Enzymen benötigen und so den Einsatz kommerzialisierbar machen [Capretto et al., 2011, Naher et al., 2010, Stroock et al., 2002].

Bei Mikromischern unterscheidet man zwischen passiven und aktiven Systemen. Während bei passiven Mikromischern ausschließlich die aufgewendete Pumpenergie zur Mischung dient, nutzen aktive Mikromischer eine externe Energiequelle (Temperatur, Ultraschall, Druckfeld, magneto-hydrodynamischer Generator) [Capretto et al., 2011]. Dabei wird häufig bei Mikromischern von einer Übertragbarkeit von Miniaturversionen zu großen Mixern ausgegangen. Dies mag für manche Aspekte stimmen, trifft aber für andere Phänomene nicht zu. So zeigen sich auf Mikroebene ein erhöhtes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis oder die Allgegenwart von laminarer Strömung [Capretto et al., 2011, Weigl et al., 2003, White, 1991]. Da bei Mikromischern unter gewöhnlichen Versuchsbedingungen die Reynoldszahl typischerweise kleiner als 100 ist [Capretto et al., 2011, Stroock et al., 2002], kommen keine Turbulenzen vor. Die Mischung erfolgt daher überwiegend über Diffusion (Abb. 7) und Advektion [Capretto et al., 2011].

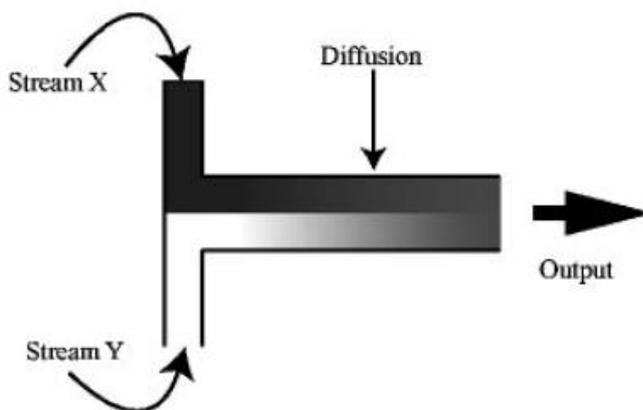


Abb. 7: Schematische Darstellung der Mischung zweier Stränge per Diffusion [Bebée et al., 2002]

Diffusion ist ein Prozess, bei dem sich Partikel in einem Medium durch die Brownsche Molekularbewegung ausbreiten, bis eine gleichmäßige Verteilung vorliegt. Eindimensional kann die Diffusion mit folgender Formel beschrieben werden:

$$d^2 = 2 * D * t$$

Gleichung 2.3-3

wobei d die Entfernung ist, die ein Partikel innerhalb einer Zeit t zurücklegt und D ist der Diffusionskoeffizient des Partikels. Da d in Potenz in die Formel eingeht, ist die Diffusion ein entscheidender Faktor, wenn man den Mikromaßstab betrachtet und Flüssigkeiten in Mikromischern mischt. So führt eine Verringerung der Wegstrecke d zu einer dramatischen Reduktion der kompletten Mischzeit. Daher ist ein Prinzip zur Verbesserung des Mischprozesses

ses bei Mikromischern, die Länge der Diffusionsstrecke innerhalb des Mischers klein zu halten [Beebe et al., 2002, Capretto et al., 2011].

Eine weitere Möglichkeit, die benötigte Mischungszeit zu verkürzen, ist, die laminare Strömung durch Fließhindernisse zu chaotischer Advektion zu manipulieren. Von Advektion spricht man, wenn ein Teilchen sich mit einer Flüssigkeit in eine Richtung mitbewegt, der sogenannten passiven Advektion. In der Strömungslehre spricht man von chaotischer Advektion, einem Zwischenglied aus turbulenter und laminarer Advektion. Durch das Vorhandensein von Fließhindernissen kommt es zu querlaufenden Flüssigkeitsströmen, also Konvektion in andere Richtungen. Diese querlaufenden Flüssigkeitsströme führen zu einer exponentiellen Erhöhung der Grenzfläche und verbessern den Mischungsprozess deutlich [Aref, 2002, Capretto et al., 2011]. Wong zeigte 2003 mit einem kreuzförmigen Mikromischer, dass eine gute Möglichkeit zur Verbesserung des Mischungsergebnisses Hindernisse, sogenannte statische Mischungselemente, im Mischungskanal sind, die zu Verwirbelungen führen (Abb. 8). Dabei können auch mit kurzen Mischzeiten und kleinen Mischungsdrücken gute Mischungsergebnisse erzielt werden [Wong et al., 2003].

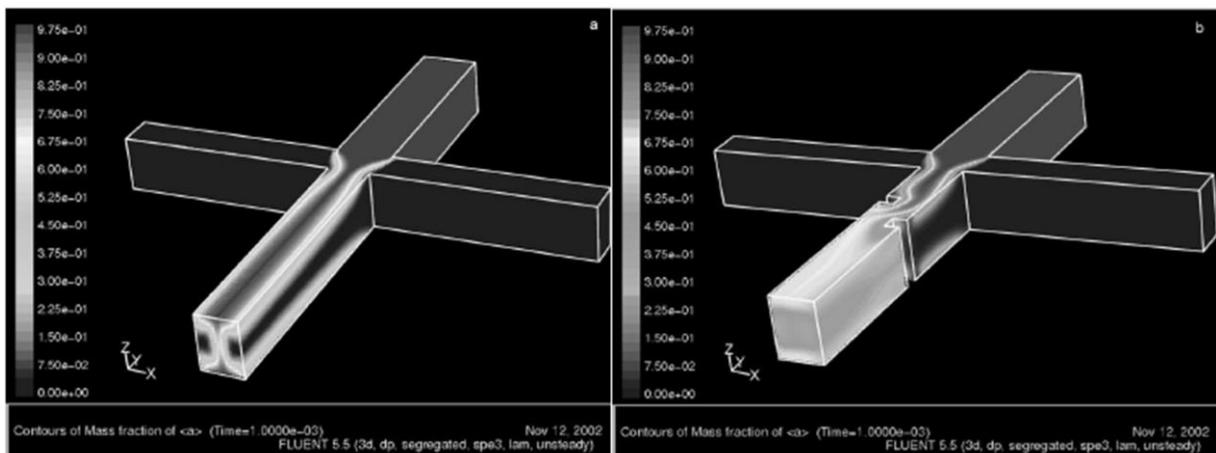


Abb. 8: Kreuzförmiger Mikromischer, links ohne statisches Mischelement, rechts mit statischen Mischelementen [Wong et al., 2003]

Eine hohe Mischungseffizienz erzielt ebenfalls der Herringbone-Mikromischer (staggered-herringbone micromixer, kurz: SHM). Durch sich wiederholende, gestaffelte Kanten kommt es trotz niedriger R_e -Werten zu Querströmungen und chaotischer Advektion (siehe Abb. 9) [Capretto et al., 2011, Stroock et al., 2002].

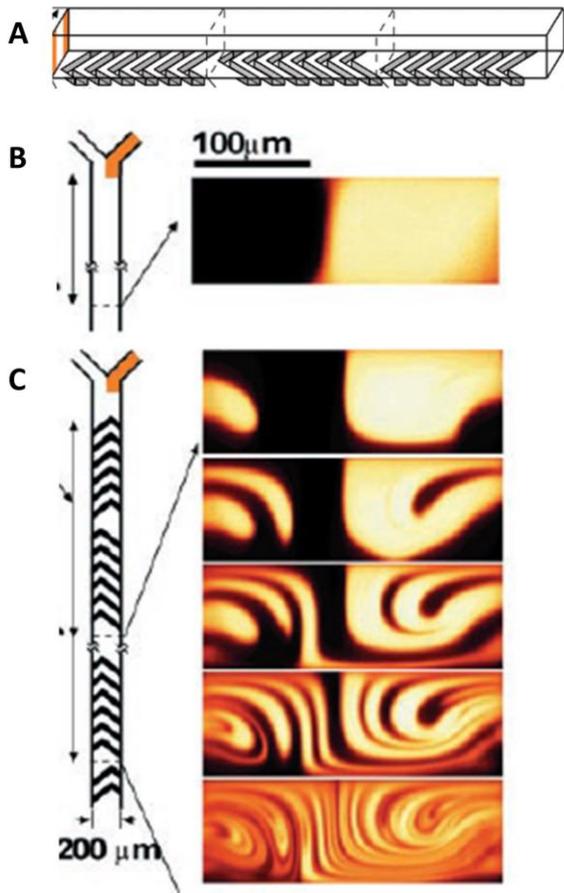


Abb. 9: A Schematische Darstellung des SHM, B Mischkanal ohne Strukturen an den Wänden, C Mischkanal mit gestaffelten Herringbone-Strukturen; Mischbilder zweier Stränge fluoresceingelabelter und klarer Lösung [Stroock et al., 2002]

Insgesamt kann man zusammenfassen, dass passive Mikromischer die Pumpenergie nutzen. Außerdem werden die Flüssigkeitskanäle so gestaltet, dass der Fluss neu geordnet wird, um die Diffusionslänge zu verkürzen und die Grenzflächen zu maximieren [Capretto et al., 2011].

2.3.2.1 Mikromischer von HPT

Beim Mikromischer von der Firma HPT Pharma Packaging handelt es sich um einen passiven Mikromischer nach dem Herringbone-Prinzip (siehe Abb. 10) [Gransee, R., 2010].

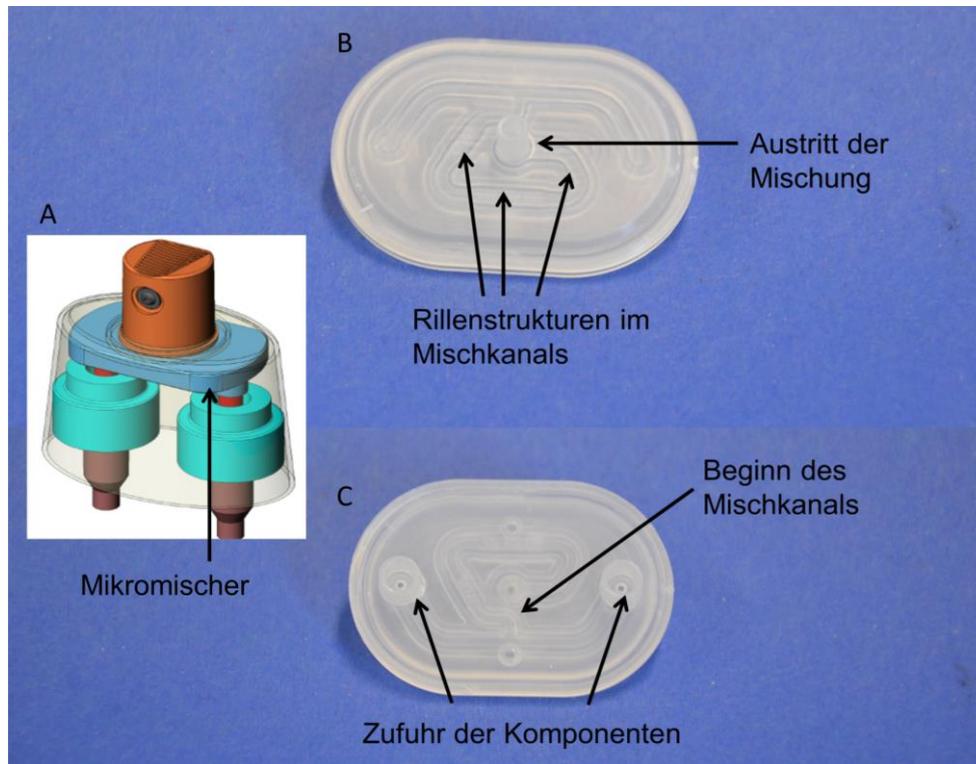


Abb. 10: Mikromischer der Firma HPT, A in Pumpsystem eingebauter Mikromischer, B Oberseite des Mikromischers, C Unterseite des Mikromischers [HPT Pharma Packaging GmbH & Co. KG, 2001]

Dieser wurde entwickelt, um die „Kombination von zwei unterschiedlich viskosen Inhaltsstoffen zu einer homogenen Flüssigkeit“ bzw. zu einem homogenen halbfesten System zu ermöglichen. Er kommt in Kombination mit einem Zweikammersystem zum Einsatz, um das Lagern einer stabilen Multi-Dose-Vorrichtung zu ermöglichen. Dies ermöglicht die leichte Handhabung, bei dem ein Produkt direkt bei der Entnahme gepumpt und gemischt wird (siehe Abb. 10 A). Außerdem können die Systeme ohne Verwendung von Konservierungsmitteln und Emulgatoren zum Einsatz kommen [HPT Pharma Packaging GmbH & Co. KG, 2001].

2.3.2.2 Einfluss der Viskosität auf die Mischbarkeit

Bei der Mischung von Fluiden mit unterschiedlicher Viskosität kommt es in den meisten Mikromischern dazu, dass die viskosere Flüssigkeit eine größere Querschnittsfläche einnimmt. Diese drückt die niedrigviskosere Flüssigkeit in eine dünnere Strömungsschicht. Dies führt dazu, dass sich die Fließgeschwindigkeiten verändern. Die viskosere Flüssigkeit wird langsamer, die niedrigviskosere Flüssigkeit wird schneller. Es entsteht ein Druckgleichgewicht in der Grenzfläche, der Fluss ist stabil und die Mischungseffizienz ist gering, sofern dies nicht

durch Aufbauten z.B. Expansionskammern oder Splitting-and-Recombination-Systemen im Mikromischer unterbrochen wird. Insgesamt wird beobachtet, dass die Mischungsgüte abnimmt, je größer die Unterschiede der Viskositäten werden [Liu et al., 2004, Xia et al., 2010].

Beim Herringbone-Mischer wurde darüber hinaus beobachtet, dass eine Erhöhung von $Re = 1$ zu $Re = 10$ nicht zu einer Erhöhung der Fließadvektion und damit zu einer Erhöhung der Mischeffizienz führte. In diesem Szenario blieb nicht nur die erwartete chaotische Advektion aus, es zeigte sich auch eine Verschlechterung der Mischungseffizienz aufgrund der kürzeren Verweilzeit der Fluide im Mischer. Dieses Phänomen war im Gegensatz dazu in einem anderen Mischsystem, dem Cross-sectional-Serpentinenmischer, nicht zu beobachten. Durch eine Erhöhung der Reynoldszahl kam es zu einer Erhöhung der chaotischen Advektion und einer besseren Mischeffizienz auch bei Mischung unterschiedlich viskoser Flüssigkeiten [Liu et al., 2004].

2.4 Die Haut

2.4.1 Aufbau und Funktionen der Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von ca. 2 m² [Hadgraft, 2001] und einem Gewicht von ca. 16 % des Gesamtkörpergewichts das größte Organ des menschlichen Körpers [Wickett et al., 2006]. Sie stellt den Kontakt zwischen dem Körper und der Umwelt her. Daher kommt der Barrierefunktion der Haut eine immense Rolle zu. Die Hautbarriere muss den Körper vor äußeren Einflüssen wie Fremdstoffe, Irritantien oder mikrobiologischen Attacken schützen. Die Haut muss zudem den Wasserhaushalt für die lebenswichtige Homöostase aufrecht erhalten [Neubert et al., 2007] und somit den Körper vor Dehydratation schützen. Darüber hinaus hat die Haut weitere Funktionen wie die Wahrnehmung von Sinnesreizen, die Regulation der Temperatur, die Vitamin-D-Produktion, immunologische Funktionen und der Schutz vor UV-Strahlung [Wickett et al., 2006].

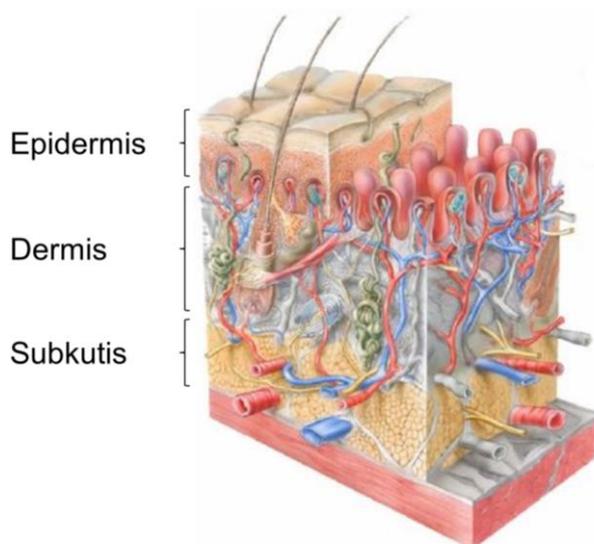


Abb. 11: Aufbau der Haut [Skin Care Forum, 2001]

Das Integument besteht aus drei Schichten (siehe Abb. 11), der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Die Subkutis besteht hauptsächlich aus Binde- und Fettgewebe [Gensthaler et al., 2012]. Die Dermis setzt sich aus Kollagenfasern zusammen, die in eine Grundsubstanz, einem Komplex aus Wasser, Elektrolyten, Plasmaproteinen und Polysaccharid-Polypeptiden, eingebettet ist. Blut- und Lymphgefäße, Nerven, Fett- und Immunzellen liegen in der Dermis vor und die Hautanhangsgebilde Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen sind in ihr verankert [Gensthaler et al., 2012, Jepps et al., 2013]. Die Epidermis stellt die äußere Schicht der Haut dar und wird in fünf Schichten unterteilt: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum (siehe Abb. 12) [Wickett et al., 2006]. Das Stratum corneum (SC) ist das ca. 15-20 µm dicke äußere Abschlussgewebe der Epidermis

[Hadgraft, 2001] und repräsentiert die zentrale Barrierefunktion der Haut [Wickett et al., 2006].

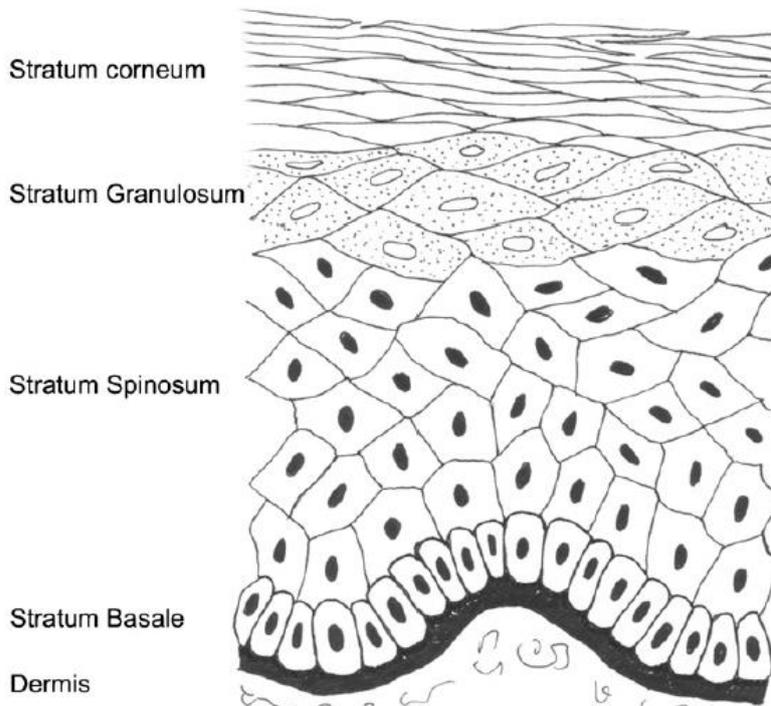


Abb. 12: Aufbau der Epidermis [Wickett et al., 2006] ohne Stratum lucidum

Während die Zellen der lebenden Epidermis, die Keratinozyten (von Stratum basale bis zum Stratum granulosum), Keratin und viele andere Proteine produzieren [Wickett et al., 2006], besteht das SC aus abgestorbenen, verhornten Keratinozyten, den sogenannten Corneozyten [Neubert et al., 2007]. Die Corneozyten sind voller Keratin und mit einer Hülle aus quervernetzten Proteinen und einer kovalent gebundenen Lipidhülle umgeben [Proksch et al., 2008]. Die so vorliegenden abgeflachten, eng gepackten, verflochtenen Corneozyten liegen in einer hoch-organisierten, dichten Lipidmatrix vor [Jepps et al., 2013]. Schon 1975 schlug Michaels für das SC das Ziegelstein-Mörtel-Modell vor [Michaels et al., 1975], in dem die Corneozyten die Ziegelsteine darstellen, die in einer Mörtelschicht vorliegen. Diese Lipide setzen sich aus Ceramiden, freien Fettsäuren sowie deren Ester, Cholesterol und Cholesterolester sowie -sulfate zusammen [Hadgraft, 2001, Wickett et al., 2006]. Die enorme Stabilität und Barrierefunktion ließ sich aber alleine mit dem Ziegelstein-Mörtel-Modell nicht erklären und so musste dieses Modell um vier Elemente erweitert werden. So sorgen hakenähnliche Strukturen der Corneozyten, Corneodesmosomen (die Desmosomen der Corneozyten), die Bilayerstruktur der SC-Lipidschicht und Schlussleisten, sogenannte Tight junctions, für die Stabilität und gute Barrierefunktion der Haut [Neubert et al., 2007].

Neue Keratinozyten werden kontinuierlich nachgebildet und alte Corneozyten werden abgeschilfert [Egelrud, 2000]. Für diese Desquamation müssen proteolytische Enzyme die Corneodesmosomen abbauen [Menon et al., 2012, Wickett et al., 2006], sodass alle 2-4 Wochen neu gebildete Zellen an die Oberfläche gelangen und dort abgestoßen werden [Gensthaler et al., 2012, Jepps et al., 2013, Wickett et al., 2006].

2.4.2 Transdermaler Transport von Arzneistoffen

Bei der Anwendung von wirkstoffhaltigen Formulierungen auf der Haut können diverse Wirkungen angestrebt werden. Bei der epidermen Wirkung ist ausschließlich die Wirkung auf der Haut erwünscht, wie dies bei Desinfektionsmitteln, Insektenschutz oder dekorativer Kosmetik der Fall ist. Es kann auch eine endoderme Wirkung erzielt werden. So können Wirkstoffe in die Haut penetrieren und dort zur Wirkung kommen. Darüber hinaus kann eine transdermale Applikation erfolgen, sodass es zu systemischen Wirkungen des Wirkstoffes kommt [Trommer et al., 2006].

Insgesamt gibt es diverse Routen, auf denen Arzneistoffe durch das Stratum corneum diffundieren (siehe Abb. 13). Beim transepidermalen Weg unterscheidet man die transzelluläre und die interzelluläre Route. Die transzelluläre Route gilt als sehr unwahrscheinlich, da Arzneistoffe abwechselnd durch sehr lipophilen und hydrophilen Schichten diffundieren müssten. Die interzelluläre Route gilt als denkbar, wobei hier eine hydrophile Route entlang der Desmosomen und eine lipophile Route entlang der lipophilen Kohlenwasserstoffketten der SC-Lipide zu erwähnen ist [Neubert et al., 2007].

Der Weg über die Hautanhangsgebilde wird unter normalen Umständen nicht als sehr signifikant betrachtet, da Schweißdrüsen und Haarfollikel nur 0,1 % der Gesamtoberfläche der Haut einnehmen. Diese Route könnte aber für langsam permeierende Substanzen eine größere Rolle spielen [Lane, 2013].

Für eine gute Wirkstoffpenetration sollten Wirkstoffe ausreichend lipophil sein, um das SC gut durchdringen zu können. Extrem lipophile Stoffe hingegen kumulieren in den Bilayern des SC und bilden hier ein Depot [Neubert et al., 2007].

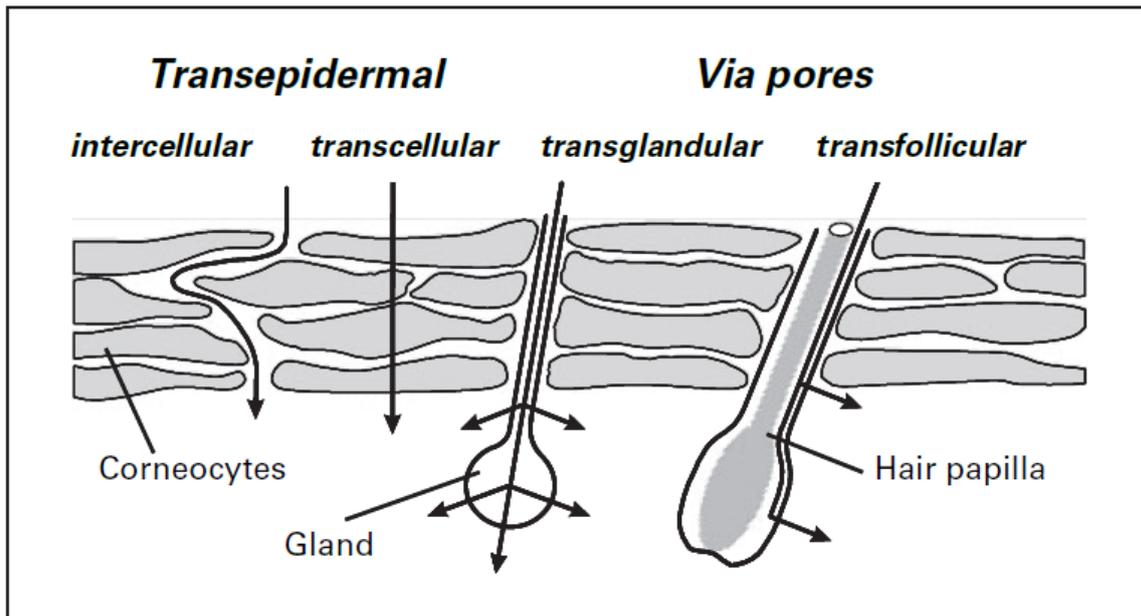


Abb. 13: Mögliche Penetrationsrouten von Arzneistoffen [Trommer et al., 2006] adaptiert nach [Lippold,1984]

2.4.3 In-vitro Permeationsuntersuchungen

Die gebräuchlichste Methode für Permeationsuntersuchungen ist die von Franz 1975 entwickelte Diffusionszelle [Franz, 1975], die in Leitlinien, wie z. B. der OECD-Leitlinie zur in-vitro Absorptionsuntersuchung von Testsubstanzen festgelegt wird [OECD, 2004]. Im Wesentlichen besteht die Franzzelle aus Akzeptor- und Donorkompartiment (siehe Abb. 14). Die Zubereitung wird im Donorkompartiment aufgegeben. Der Wirkstoff diffundiert durch die eingespannte Haut ins Akzeptormedium. Über den Probenarm kann das Akzeptormedium entnommen werden und die Menge an permeiertem Wirkstoff analysiert werden. Da menschliche Haut eine sehr begrenzte Verfügbarkeit zeigt, dient häufig Schweinehaut als Hautmodell, da es ein guter Surrogat für menschliche Haut darstellt [Barbero et al., 2009]. So sind sich menschliche Haut und die Haut von Schweinen sehr ähnlich. Sie haben eine sehr ähnliche Ausstattung an Oberflächenlipiden. Das SC ist ähnlich groß und hat eine eng gepackte Struktur. Damit ist die Barriere ähnlich aufgebaut. Auch die Anzahl an Haarfollikeln, die Größe, Orientierung und Verteilung von Gefäßen ist sehr ähnlich [Sato et al., 1991]. Auch der gemessene Flux durch die Haut und die gemessenen Konzentrationen in der Haut liegen bei Untersuchungen von Mensch und Schwein in der gleichen Größenordnung [Schmook et al., 2001]. Im Gegensatz dazu zeigt die Haut von Maus, Ratte und Meerschweinchen höhere Permeabilitäten [Sato et al., 1991] und ist demnach Schweinehaut unterlegen. Zudem fällt Schweinehaut als Schlachtabfall aus der Lebensmittelproduktion an und zeigt so eine gute Verfügbarkeit [Barbero et al., 2009].

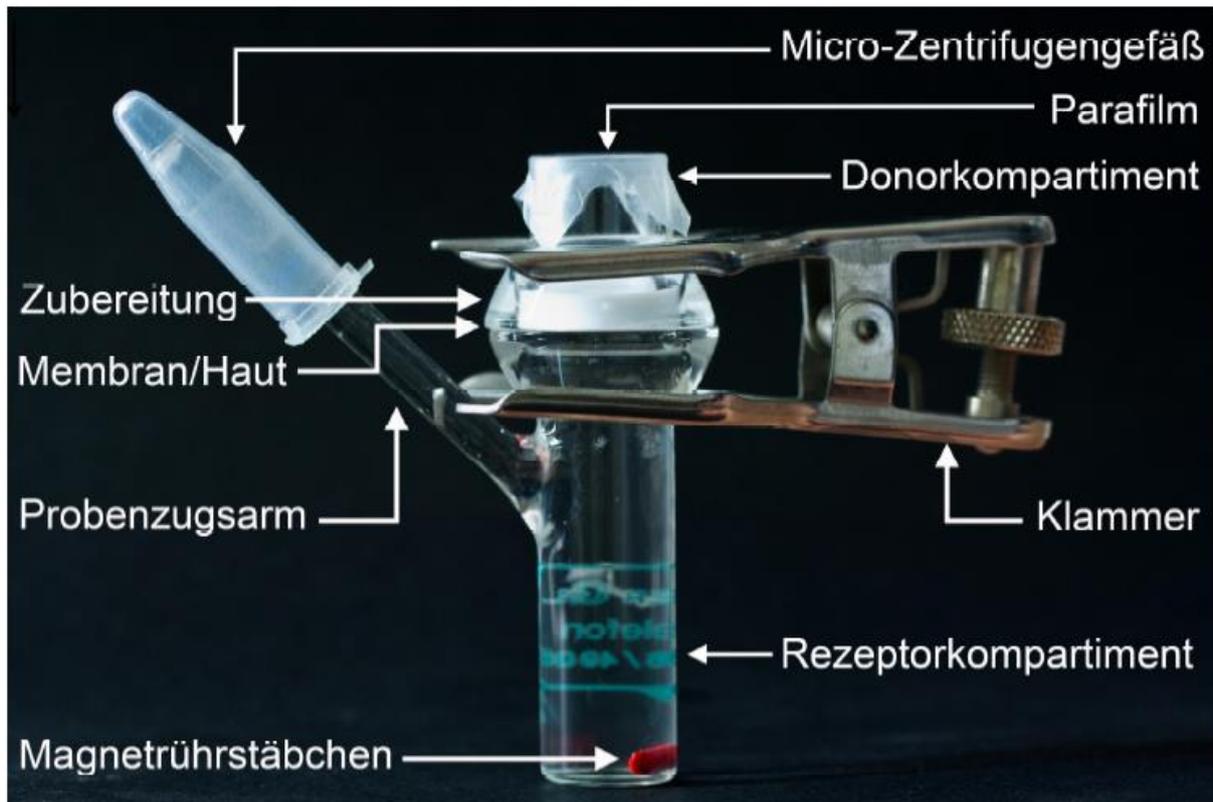


Abb. 14: Diffusionszelle nach Franz [Lunter, 2012]

2.4.4 Pharmakokinetik

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass die Permeation von Arzneistoffen durch passive Diffusion erfolgt. Die Diffusion durch die Barriere des SC stellt somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Daher kann das 1. Ficksche Diffusionsgesetz zur Beschreibung der Permeation im steady-state herangezogen werden [Hadgraft, 2001]:

$$J = \frac{DK\Delta c}{h} \quad \text{Gleichung 2.4-1}$$

Dabei ist J der Flux bzw. die Permeationsrate im steady-state, D der Diffusionskoeffizient, K der Verteilungskoeffizient, Δc der Konzentrationsgradient in der Haut und h die effektive Diffusionsstrecke. Der Diffusionskoeffizient D , der Verteilungskoeffizient K und die effektive Diffusionsstrecke h können zum Permeabilitätskoeffizienten k_p zusammengefasst werden:

$$k_p = \frac{DK}{h} \quad \text{Gleichung 2.4-2}$$

Im Normalfall ist die applizierte Konzentration deutlich größer als in der Wirkstoffkonzentration in der Haut, sodass man den Konzentrationsgradienten in der Haut Δc mit der Anfangskonzentration c_0 gleichsetzen kann:

$$\Delta c \approx c_0 \quad \text{Gleichung 2.4-3}$$

Berücksichtigt man Gleichung 2.4-2 und 2.4-3, kann Gleichung 2.4-1 vereinfacht werden [Hadgraft, 2001] zu:

$$J = k_p \cdot c_0 \quad \text{Gleichung 2.4-4}$$

Dabei ist k_p der Permeabilitätskoeffizient und c_0 die applizierte Arzneistoffkonzentration im Vehikel. Den Flux erhält man aus der Steigung der Permeationsgeraden. Der Permeabilitätskoeffizient k_p kann durch Umformung der Gleichung 2.4-4 ermittelt werden:

$$k_p = \frac{J}{c_0} \quad \text{Gleichung 2.4-5}$$

Bei infiniter Dosierung wird gewährleistet, dass der Donor nicht verarmt und die steady-state-Permeationrate erreicht wird [Franz et al., 1993]. Eine weitere Voraussetzung ist, dass sich der Wirkstoff im Akzeptormedium nicht anreichert, sondern perfect-sink Bedingungen vorliegen. Das bedeutet, dass maximal 10 % der Sättigungslöslichkeit im Akzeptormedium vorliegen [Higuchi, 1962]. Dadurch können der Flux und der Permeabilitätskoeffizient verschiedener Formulierungen bestimmt und miteinander verglichen werden [Bronaugh et al., 1982, Franz et al., 1993].

2.4.5 Permeationsverbesserung

Man unterscheidet passive und aktive Permeationsverbesserung. Unter aktive Permeationsverbesserung fallen Verfahren rund um thermale Ablation, Mikronadeln, Iontophorese, Ultraschall, Jet-Injektion etc. [Hadgraft et al., 2011]. Da aktive Methoden schon in Kapitel 2.2.2.2.3 Erwähnung finden, werden sie hier nicht weiter ausgeführt. Der Fokus liegt vielmehr bei den passiven Permeationsverbesserern, die einer Formulierung zugesetzt werden und die Permeation von Arzneistoffen erhöhen.

Permeationsverbesserer sollten pharmakologisch inert, untoxisch, nicht hautirritierend sein und idealerweise reversible Effekte verursachen. Außerdem sollten sie in der Formulierung stabil sein und für die kosmetische Akzeptanz der Formulierung akzeptabel sein [Lane, 2013].

Grundsätzlich lassen sich 2 Haupteffekte von Permeationsverbesserern in der Haut unterscheiden: die Verbesserung der Diffusionseigenschaften in der Haut sowie die Verbesserung der Löslichkeit des Wirkstoffes und damit eine bessere Verteilung in die Haut (siehe Abb. 15). Die Permeationsverbesserer, die mit den Lipidbilayern der Haut interagieren, diese stören oder fluidisieren, stören die Barriere und lassen die Haut permeabler werden [Hadgraft et al., 2011]. Sie bewirken eine verbesserte Diffusion. Eine erhöhte Löslichkeit des Wirkstoffes

in der Haut führt auch zu einer verbesserten Verteilung in die Haut. Dies geschieht durch Moleküle, die gut in die Haut aufgenommen werden und ein gutes Lösungsmittel für den Wirkstoff darstellen [Lane, 2013]. Darüber hinaus spielt die Aktivität des Wirkstoffes im Vehikel eine wesentliche Rolle. Durch die Erhöhung der Aktivität des Wirkstoffes durch Hilfsstoffe im Vehikel kann mehr Wirkstoff freigesetzt und demnach auch mehr Wirkstoff permeieren [Rolland et al., 1992].

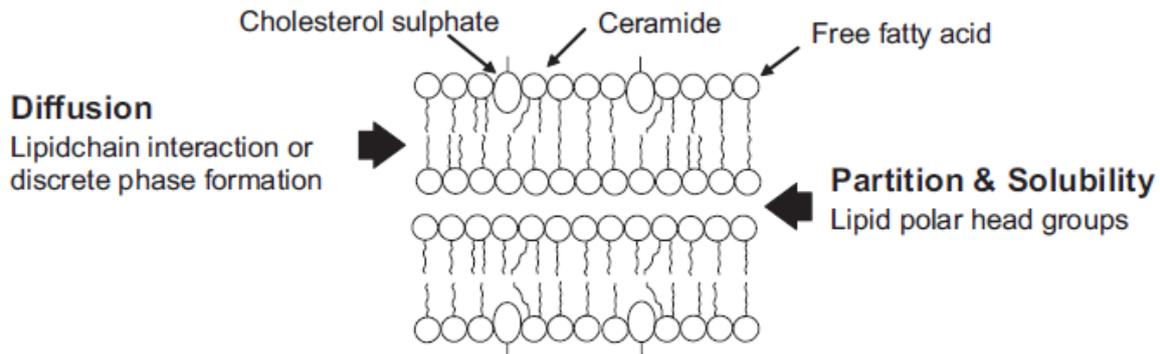


Abb. 15: Schema der Angriffspunkte von Permeationsverbesserern [Lane, 2013]

Wasser ist ein guter Permeationsverbesserer. Durch Einweichen der Haut mit Wasser oder Okklusionsverbände kann der Wassergehalt des SC deutlich gesteigert werden und über die Hydratation des SC die Permeation von hydrophilen und lipophilen Substanzen verbessern [Trommer et al., 2006]. Trotz intensiver Forschung ist nicht genau geklärt, wie dies geschieht. Man geht von einer Quellung in der Haut bzw. auch der polaren SC-Lipidbilayerköpfen aus. Allerdings bleibt die Anordnung der Lipidmatrix durch Quellung unverändert. Auch die Entstehung von „aqueous pore pathways“ wird diskutiert. Der höhere Wasseranteil sorgt auch für mehr „freies“ ungebundenes Wasser, das als Solvent für polare Substanzen in der Membran dient [Williams et al., 2012] und die Diffusions-Querschnittsfläche erhöht [Barry, 1991].

Die bekanntesten Permeationsmodulatoren, die sich als lipophile Substanzen in die Bilayer-Struktur des SC einlagern und dadurch die Struktur verändern, sind Azone und Ölsäure. Ölsäure formt innerhalb der Bilayer Pools. So kann das zu diffundierende Molekül durch die Grenzflächendefekte zwischen Ceramiden und Ölsäure oder durch die Pools diffundieren [Hadgraft, 2001]. Azone interagieren direkt mit den Hautlipiden und sorgen für eine erhöhte Lipidmobilität [Hadgraft et al., 2011, Lane, 2013].

Alkohole wie Ethanol und Isopropanol haben verschiedene Effekte, die zur Permeationsverbesserung führen [Trommer et al., 2006]. So zeigen sie eine Erhöhung der Lipidfluidität durch Störung der interzellulären Bilayerstruktur und Erhöhung der Löslichkeit in der Haut

[Lane, 2013]. Außerdem extrahieren sie Lipide und Proteine aus der Haut und führen dadurch zu einer höheren Porosität des SC. Propylenglykol als divalenter Alkohol ist das am meisten eingesetzte Cosolvens in der Dermatologie. Im Vordergrund der Permeationsverbesserung steht der Effekt als Cosolvens. Es bewirkt die Löslichkeitsverbesserung für Stoffe, die in Alkohol besser löslich sind als in Wasser [Trommer et al., 2006], und führt dadurch zu einer vermehrten Verteilung des Wirkstoffes in die Haut [Hadgraft et al., 2011]. Auch die Interkalation in die polaren Kopfgruppen der Bilayer-Lipide wird diskutiert. Zudem zeigen sich synergistische Effekte mit z.B. Azonen oder Ölsäure [Trommer et al., 2006].

DMSO ist einer der ersten Permeationsförderer, der vielfach untersucht wurde. Der Mechanismus der Permeationsförderung ist komplex. Zum einen zeigt DMSO die Denaturierung von Proteinen und ändert die interzelluläre Keratinkonfirmation. Des Weiteren interagiert es mit den Lipiddomänen des SC und erhöht als universelles Lösungsmittel die Löslichkeit des Wirkstoffes sowie seine Verteilung in die Haut. Nichtsdestotrotz ist der Einsatz aufgrund seines großen irritierenden und toxischen Potentials kritisch zu sehen [Williams et al., 2012].

Die hier vorgestellten Permeationsverbesserer kommen auch in der Praxis häufig zum Einsatz. Beispiele für die Anwendung in kommerziellen Produkten bei topischer Anwendung sind Voltaren Emulgel, das Isopropanol und Propylenglykol zur Permeationsverbesserung des Wirkstoffes Diclofenac enthalten. Beim Fertigarzneimittel Herpid wird die Penetration von Idoxuridin durch DMSO verbessert und das Ketoprofen-haltige Feldene enthält Ethanol. Auch bei transdermalen Systemen kommen Permeationsverbesserer zum Einsatz. Ein Beispiel hierfür ist das Estradiol-haltige Pflaster Estradot, das Oleylalkohol und Dipropylenglykol enthält [Lane, 2013].

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien, Hilfsstoffe und sonstige Materialien

Tabelle 3-1: Chemikalien und Hilfsstoffe

Artikel	Hersteller/ Lieferant
5-Aminolävulinsäure Hydrochlorid	Heraeus Precious Metals GmbH & Co. KG
Acetonitril	J.T. Baker GmbH
Ameluz®	Biofrontera AG
Aqua purificata	Eigenherstellung
Borsäure	Merck KGaA
Dimethylisosorbid	Dologiet GmbH & Co. KG
Ethanol absolut. Reag.	Sigma Aldrich Corporation
Isopropanol	VWR International GmbH
Methylenblau	Merck KGaA
Methylorange	Merck KGaA
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co KG
N-Acetylcystein	Caesar & Loretz GmbH
NaCl	Caesar & Loretz GmbH
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co KG
NaOH Plätzchen	Sigma Aldrich Corporation
o-Phthaldialdehyd	Sigma Aldrich Corporation
Pentylenglykol	Symrise AG, BASF SE
Poloxamer 124 (Kollisolv P 124)	BASF SE
Poloxamer 188 (Kolliphor P 188)	BASF SE
Poloxamer 407 (Kolliphor P 407)	BASF SE
Propylenglykol dicaprylat dicaprat (Crodamol PC)	Croda GmbH

3. Material und Methoden

Propylenglykol	Dr. Wilmar Schwabe GmbH & Co. KG
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich Corporation
flüssiger Stickstoff	Universitätstank

Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller/ Lieferant
Alufolie	handelsüblich
Bechergläser; Messkolben	Duran Group GmbH
Bördelkappen für HPLC-Vials NK/NR // Butyl / TEF 1,0 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Centripur pH-Kalibrierungsstandards Pufferlösungen pH 4,01, 7,00, 9,00	Merck KGaA
Combifix Adapter (w/w-Adapter)	Braun Melsungen AG
Combi-Stopper Verschlussknoten	Braun Melsungen AG
Deckgläser	VWR International GmbH
Dermatomklingen GB228R	Aesculap AG & Co. KG
Einmalspritzen 1 mL, 5 mL, 20 mL	Braun Melsungen AG
Einmalspritzen 10 mL	BD Corporation (Becton-Dickinson and Company)
Falcontubes: Cellstar Tubes 15 mL	Greiner Bio-One GmbH
Fantaschale	Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG
Glaskugeln $\varnothing=4$ mm	Assistent [®] , Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG
Glasobjektträger	VWR International GmbH
HPLC Vials: Rollrandfläschchen	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
HPLC-Säule EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Kanülen: Sterican 0,80 x 120 mm	Braun Melsungen AG
Kartenblätter	Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG
Kodak Gray Cards, weiße Seite (Reflektion ca. 90 %)	Kodak Corporation

3. Material und Methoden

Laborfett Korasilon Paste	Kurt Obermeier GmbH & Co KG
Laborfett Glisseal HV	Borer Chemie AG
Magnetrührstäbchen micro, rot, 10 x 3 mm	VWR International GmbH
Mikromischer	HPT Hochwertige Pharmatechnik GmbH & Co KG
Objektträger	VWR International GmbH
Papiertücher	Wepa Professional GmbH
Parafilm® „M“	American National Can
Pipettenspitzen 200 µL, 1000 µL	Eppendorf AG
Pipettenspitzen 5000 µL	Brand GmbH & Co. KG
Schlingazetupfer unsteril, Gr.5	Fuhrmann GmbH
Schraubdeckeldosen (5 g, 30 g, 100g)	Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG
Speedmixer-Einwegmischbecher PP50	Hauschild & Co. KG
Stecknadeln	handelsüblich
Sterile Skalpellklingen #22	Aesculap AG & Co. KG
Styroporplatte	handelsüblich
Tesa® Film kristall-klar; 10 m : 15 mm	Tesa SE
UNGUATOR®-Salbenkruken	Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG
Vorsäule Column Protection System	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Wägeschiffchen 46 x 46 x 8 mm, blau	VWR International GmbH

3.1.2 Geräte

Tabelle 3-3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller/ Lieferant
Analysenwaage Extend	Sartorius AG
Auto Sampler SIL-20A	Shimadzu Europa GmbH
Barthaartrimmer	Philips GmbH
Bördelzange	Hewett Packard Inc. (HP)
Canon EOS 5D Mark II	Canon Inc.

3. Material und Methoden

Column-Oven CTO-20A	Shimadzu Europa GmbH
Communication Bus Module CBM-20A	Shimadzu Europa GmbH
Dermatom GA 630	Aesculap AG & Co. KG
Einhängethermostat alpha	Lauda GmbH & Co. KG
Henkellocheisen Turnus $\varnothing = 25$ mm	Precitool Werkzeughandel GmbH & Co. KG
Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific GmbH
Imager.Z1	Carl Zeiss Jena GmbH
Labmixer	Somakon Verfahrenstechnik UG
Liquid Chromatograph LC-20AT	Shimadzu Europa GmbH
Materialprüfer DO-FB0.5TS	Zwick GmbH & Co. KG
Mehrstellenrührer Poly 15	Thermo Fisher Scientific GmbH
Mikroskop Axio Imager Z1 Farbkamera ICc1	Carl Zeiss Jena AG
modifizierte Franzzellen	Gauer Glas
pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo GmbH
Präzisionswaage Extend	Sartorius AG
PURELAB Option Q	ELGA LabWater Veolia Water Technologies Deutschland GmbH
Research Pipetten 5000 μ L	Brand GmbH & Co. KG
Reserch Pipetten 20 μ L, 1000 μ L	Eppendorf AG
Rheometer Physica MCR 501	Anton Paar GmbH
Schwanenhalslampe KL 1500-Z	Pulch + Lorenz Großhandels-gesellschaft mbH
Skalpellhalter	Aesculap AG & Co. KG
Speedmixer DAC 150.1 FVZ	Hauschild & Co. KG
Stereolupe Stemi SV 8	Zeiss West Germany
Stuart Scientific SA8 vortex mixer	Bibby Scientific Limited
Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510H Sonorex RK 31	Bandelin electronics GmbH & Co. KG

Unguator 2100	Gako Konietzko GmbH
UV/VIS Detector SPD-20A	Shimadzu Europa GmbH
Waagen Excellence	Sartorius AG

3.1.3 Software

Tabelle 3-4: Verwendete Software

Software	Hersteller/ Lieferant
Adobe Reader DC	Adobe Systems GmbH
Axiovision SE64 Rel. 4.9	Carl Zeiss Jena GmbH
Canon EOS Utility	Canon Inc.
Chemsketch 2015	ACD Labs (Advanced Chemistry Development, Inc.)
EndNote X6	Thomson Reuters Corporation
Jmp 11	SAS Institute Inc.
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation
Rheoplus/32 V3.62	Anton Paar GmbH
Shimadzu LCsolution	Shimadzu Europa GmbH
testXpert XLine	Zwick GmbH & Co. KG
Windows 7	Microsoft Corporation

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Zubereitungen

3.2.1.1 Herstellung von PPeX

Für die Herstellung werden 15 g Poloxamer 407 in ein Becherglas und 85 g Pentylenglykol (PPe) bzw. 75 g Pentylenglykol mit 10 g Dimethylisosorbid (PPeD) oder mit 10 g Propylenglykol (PPePr) in eine Fantaschale eingewogen. Der Labmixer wird auf 50 °C aufgewärmt. Ist die Temperatur erreicht, werden die abgewogenen Bestandteile mit Kartenblättern überführt und 30 min mit 300 rpm gerührt und aufgeschmolzen. Anschließend wird die Temperatur auf 20 °C gesenkt und mit 300 rpm für 180 min kaltgerührt. Messungen werden am Folgetag durchgeführt. Für die Homogenitätsuntersuchungen mittels Überprüfung der Farbhomogenität werden die Zubereitungen mit 0,000625 % Methylorange eingefärbt. Außerdem werden die Zubereitungen für alle Homogenitätsuntersuchungen in 10 mL-Spritzen abgefüllt.

3.2.1.2 Herstellung von PHIC

30 g wasserhaltige Zubereitung wird im Speedmixer hergestellt. Dafür werden alle Bestandteile, Poloxamer 407, Poloxamer 188, Poloxamer 124, Isopropanol, Aqua purificata und Propylenglykol dicaprylat dicaprat (Crodamol PC) (PHIC), in den Speedmixer-Einwegmischbecher eingewogen. Es werden 3 Glaskugeln ($\varnothing = 4$ mm) zugegeben. Die Kruke wird zuge dreht und mit Parafilm verschlossen. Die Homogenisierung erfolgt bei 3500 rpm für 120 s. Die Zubereitung wird über Nacht ruhen gelassen und nochmals bei 3500 rpm für 120 s homogenisiert. Messungen werden am Folgetag durchgeführt. Bei Proben für die Homogenisierungsuntersuchung wird die Zubereitung in eine 10 mL-Spritze abgefüllt. Die Verwendung erfolgt am nächsten Tag. Für die Homogenitätsuntersuchungen mittels Überprüfung der Farbhomogenität werden die Zubereitungen mit 0,00625 % Methylenblau eingefärbt.

3.2.1.3 Herstellung von Thermogel

Alle Bestandteile werden in eine Unguator-Salbenkruke (100 g) eingewogen, verschlossen und bei 1500 rpm Rührmotor und 2200 rpm Hubmotor für 90 s homogenisiert.

3.2.1.4 Einarbeitung von ALA

Dafür wird die erste Hälfte Grundlage (PPeX) in eine Unguator-Salbenkruke vorgelegt, der Wirkstoff darauf gewogen und die zweite Hälfte Grundlage PPeX (bzw. PHIC bei homogenen Mischungen) zugegeben. Die Einarbeitung erfolgt im Unguator im vorgegebenen Programm „Normal“.

3.2.2 Optimierung der PHIC-Zubereitung mit Hilfe eines statistischen Versuchsdesigns

Um eine Zubereitung zu generieren, die optimale Eigenschaften hinsichtlich Aufräumungsstabilität und niedriger Viskosität aufweist, wurde mit Hilfe einer statistischen Versuchsplanung (DOE: Design of Experiments), ein Mischungsdiagramm erstellt. Hierbei wird in einem Mischungsdesign die Stabilität maximiert und die Viskosität minimiert.

Als Vorlage wird aus Vorversuchen eine Zubereitung gewählt, die die bis dahin besten Eigenschaften aufwies. Diese setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3-5: Vorlagezubereitung für das statistische Versuchsdesign

Bestandteil	Anteil [%]
P Poloxamer 188	25
H Aqua purificata (H ₂ O)	36
I Isopropylalkohol	9
C Propylenglykol dicaprylat dicaprat (Crodamol PC)	30

Um die Eigenschaften zu optimieren, wird beim Poloxamergehalt von 25 % in einem Mischungsdesign lediglich die Zusammensetzung aus Poloxamer 407, Poloxamer 188 und Poloxamer 124 variiert. Dabei wird der Gehalt in gewissen Grenzen variiert und kann folgender Tabelle 3-6 entnommen werden.

Tabelle 3-6: Zusammensetzung der Poloxamere

Poloxamer	enthaltene Anteile [%]
407	0 – 40
188	20 – 100
124	0 - 40

Das Versuchsdesign wurde von jmp11 generiert (Abb. 16). Alle 9 Punkte stellen eine Zusammensetzung der drei Poloxamere dar, die hergestellt und vermessen werden. Die genauen Zusammensetzungen finden sich in Tabelle 3-7. Dabei werden drei Zubereitungen doppelt hergestellt und vermessen. So werden 12 Zubereitungen generiert, die jeweils dreimal hergestellt und vermessen werden.

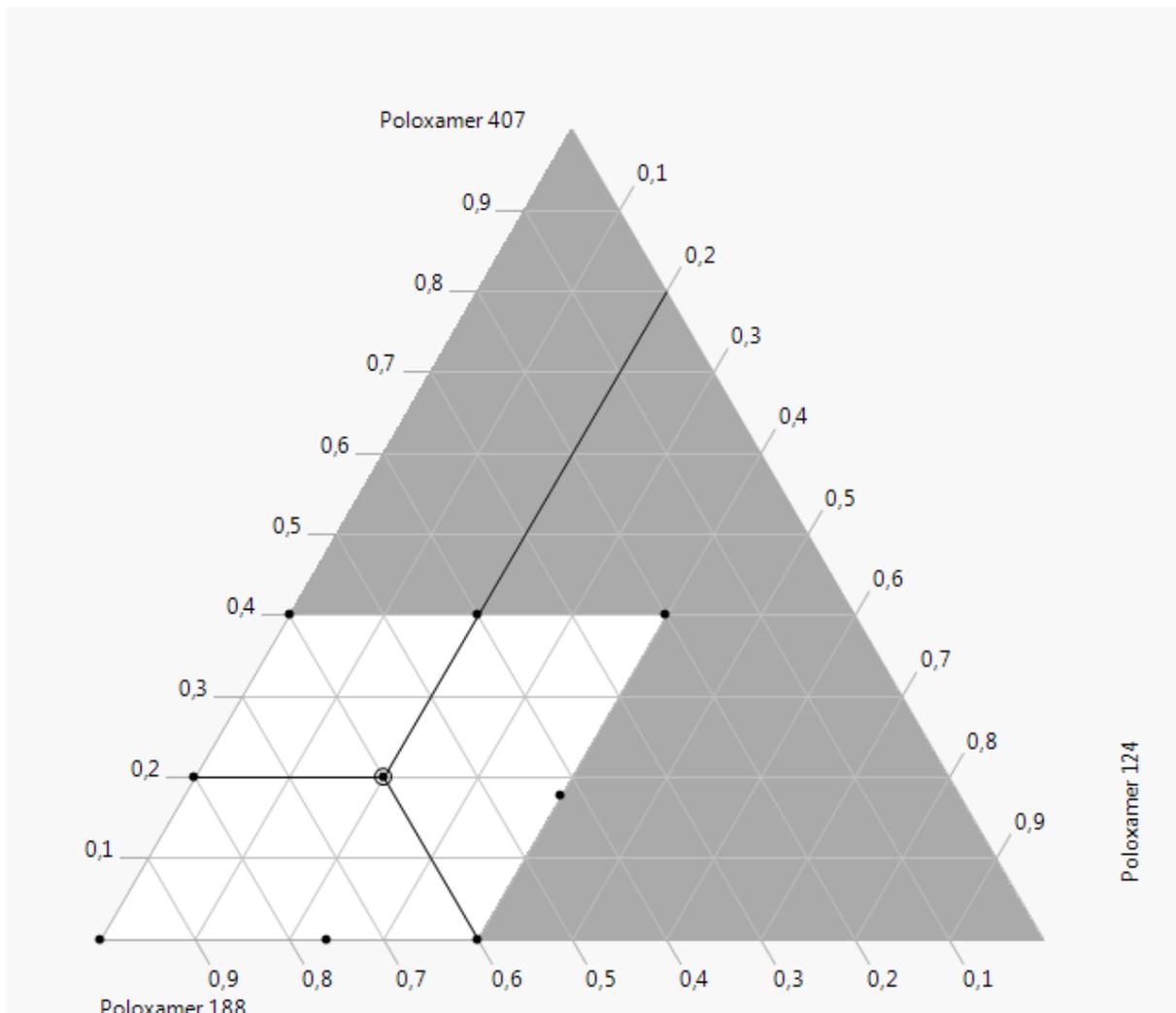


Abb. 16: Mischungsdesign

Tabelle 3-7: Poloxameranteile der Zubereitungen gemäß Versuchsdesign

Zubereitung	Anteil Poloxamer 407	Anteil Poloxamer 188	Anteil Poloxamer 124
1	0,40	0,40	0,20
2	0,40	0,60	0,00
3	0,20	0,60	0,20
4	0,00	1,00	0,00
5	0,18	0,42	0,40
6	0,00	0,76	0,24
7	0,00	0,60	0,40
8	0,40	0,60	0,00
9	0,40	0,20	0,40
10	0,00	1,00	0,00
11	0,40	0,20	0,40
12	0,20	0,80	0,00

Aus der daraus generierten Vorhersageformel werden drei Formulierungen mit niedriger, mittlerer und hoher Viskosität bzw. Stabilität ausgewählt. Diese werden je dreimal hergestellt und vermessen. Die Ergebnisse werden mit den vorhergesagten Werten verglichen, um so die Vorhersageformel zu überprüfen.

3.2.3 Charakterisierung der Zubereitungen

3.2.3.1 Lichtmikroskopische Charakterisierung der Zubereitungen

Lichtmikroskopische Aufnahmen werden mit dem Mikroskop Axio Imager Z1 gemacht. Dafür wird die Probe auf einen Objektträger aufgetragen und ein Deckgläschen aufgebracht. Bilder werden aus einem repräsentativen Ausschnitt mit der Kamera AxioCam MRm aufgenommen.

3.2.3.2 Polarisationsmikroskopische Charakterisierung der Zubereitung

Für die polarisationsmikroskopischen Aufnahmen wird am Mikroskop Axio Imager Z1 die Farbkamera AxioCam ICc1 verwendet. Ober- und unterhalb der Probe werden der Polarisator und das Lambdablättchen eingebracht. Aufnahmen werden aus repräsentativen Ausschnitten gemacht.

3.2.3.3 Untersuchung der Viskosität

Rotationsviskosimetrische Untersuchungen (Physica MCR 501) werden mit Kegel-Platte-Geometrie CP 25-1-SN6081 mit einer Spaltbreite von $d = 0,048$ mm bei 20 °C wie in Tabelle 3-8 dargestellt durchgeführt:

Tabelle 3-8: Rheologie-Messprogramm

	Programm
1. Vorschermessung	20 s bei 5 1/s
2. Wartezeit	5 min
3. lineare Scherrampe	50 Messpunkte alle 5 s Startwert: 2 1/s Endwert: 100 1/s

Die Herschel-Bulkley-Gleichung (Gleichung 3.2-1) beschreibt die Fließkurve eines Materials, das eine Fließgrenze hat und oberhalb der Fließgrenze scherverdünnendes oder scherverdickendes Verhalten aufweist [Anton Paar Software Information]. Die Fließkurven der entsprechenden Formulierungen werden linearisiert. Die Steigung der linearisierten Geraden wird als Viskositätsparameter für die Auswertung herangezogen.

$$\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n$$

Gleichung 3.2-1

τ	Schubspannung
τ_0	Fließgrenze
$\dot{\gamma}$	Schergefälle
k	Faktor
n	Koeffizient

3.2.4 Stabilitätsuntersuchungen PPeX

3.2.4.1 Lagerstabilität von PPeX

Für die Lagerstabilität von PPeX werden, wie in 3.2.1.1 beschrieben, 2 Chargen zu je 100 g hergestellt. Die Chargen werden vermengt und im Labmixer für 2 min bei 300 rpm vermischt. Anschließend wird die Probe für jeden Messzeitpunkt in eine Schraubdeckelkruke (30 g) abgefüllt und mit Parafilm verschlossen. Die Proben werden bei RT gelagert und nach 1 Tag, 2 und 4 Wochen, 3, 6, 9 und 12 Monaten rheologisch (siehe Kapitel 3.2.3.3) untersucht.

3.2.4.1.1 Rehomogenisierung der Proben und Strukturaufbau

Um den Einfluss von Gebrauchshandlungen zu untersuchen, werden 6 Monate alte Lagerproben mit einem Spatel einmalig rehomogenisiert und diese Proben werden jeweils direkt nach der Rehomogenisierung, nach 2 und 4 Wochen und nach 3 und 6 Monaten rheologisch untersucht.

3.2.4.2 Stabilität von ALA in der Zubereitung

3.2.4.2.1 Stabilitätsuntersuchung mittels Zentralwertmessung

Die Zubereitungen PPeX werden im Labmixer entsprechend Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.4, das Thermogel entsprechend Kapitel 3.2.1.3 und 3.2.1.4 hergestellt, in Schraubdeckeldosen (5 g) abgefüllt und bei 25 °C, (5 °C 40 °C) gelagert.

Für die Messung wird der Deckel abgeschraubt und ein Bild von der jeweiligen Zubereitung gemacht (Canon EOS 5D Mark II, kombiniert mit einer Stereolupe). Die Belichtung erfolgt mit einer Schwanenhalslampe (siehe Kapitel 3.2.5.2). In Adobe Photoshop CS4 Extended werden die Bilder eingelesen und ein sinkender Zentralwert als Maß für das Anfallen von Abbauprodukten ausgewertet.

3.2.4.2.2 Stabilitätsuntersuchung mittels HPLC-Analytik

Die Zubereitungen PPeX werden im Labmixer entsprechend Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.4, das Thermogel entsprechend Kapitel 3.2.1.3 und 3.2.1.4 hergestellt, in Schraubdeckeldosen (30 g) abgefüllt und bei 25 °C gelagert. Die Proben werden direkt nach Herstellung, nach 2 und 4 Wochen und nach 3, 6 und 9 Monaten aufgearbeitet und der Gehalt von ALA mittels HPLC-Analytik bestimmt (siehe Kapitel 3.2.7).

3.2.5 Untersuchung der Homogenität

3.2.5.1 Versuchsaufbau und Messung der Auspresskräfte

Für die Untersuchung der Homogenität bei Mischung zweier Komponenten durch den Mikromischer sowie die Bestimmung der Auspresskraft werden die in 10 mL-Spritzen abgefüllten Zubereitungen am Kolbenende in eine Vorrichtung eingespannt (siehe Abb. 17 A). Diese ermöglicht die Montage am Messarm des Materialprüfers DO-FB0.5TS. Am Spritzenende sorgt eine Metallführung für die Stabilität der Spritzen und der Mikromischer kann über die Luerlock-Aufsätze der Spritzen aufgesteckt werden (siehe Abb. 17 B). Die Auffanghalterung (siehe Abb. 17 C) kann am unteren Ende des Materialprüfers aufgesteckt werden. In der Auffanghalterung wird eine Auffangvorrichtung platziert. Der Mikromischer fährt passgenau in die Auffanghalterung und extrudiert die Mischung in die platzierte Auffangvorrichtung.

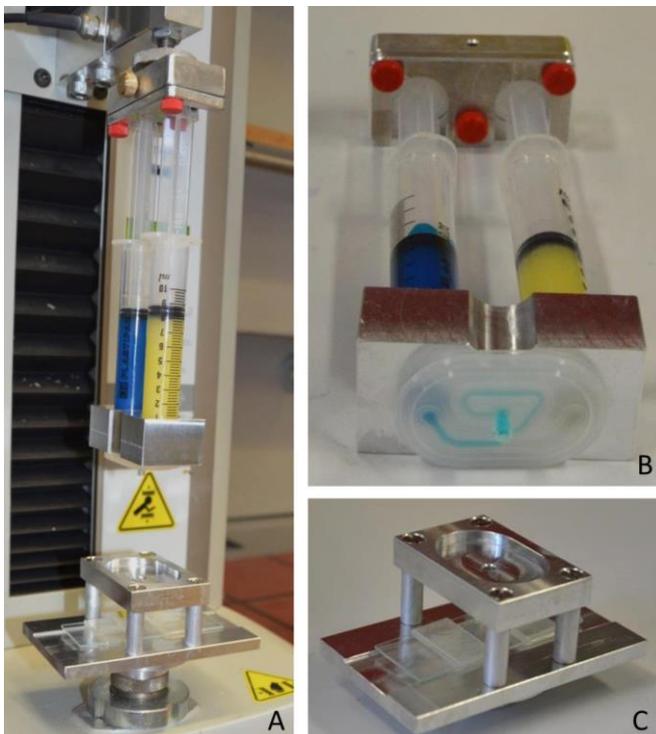


Abb. 17: Schema des Versuchsaufbaus; A Montage am Materialprüfgerät, B aufgesteckter Mikromischer, C Auffanghalterung mit Auffangvorrichtung

Vor dem Start der Messung bzw. der Extrudatbildung befindet sich die Mischvorrichtung knapp über der Auffanghalterung. Der Mikromischer hat noch keinen Kontakt zur Auffanghalterung. Mit dem Start des Programms fährt der Messarm mit einer Geschwindigkeit von 30 mm/min, 15 mm (Messung der Auspresskraft) bzw. 17 mm (Homogenitätsuntersuchung Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit) nach unten. Sitzt der Mikromischer passgenau in der Auffangvorrichtung, werden die Kolben der Spritze bewegt und beide Komponenten werden durch den Mikromischer gefördert und extrudiert. Dabei erhöht sich die Auspresskraft so lange, bis ein Gleichgewicht erreicht ist. Diese maximale Kraft wird als Auspresskraft ausgewertet. Die in der Auffangvorrichtung aufgefangene Mischung wird entsprechend Kapitel 3.2.5.2 und 3.2.5.3 untersucht. Die nächste Messung wird nach 15 min durchgeführt, um den Formulierungen nach der vorangegangenen Scherung Zeit zum Strukturaufbau zu geben.

Für die Homogenitätsuntersuchungen werden die Auspresskräfte der zu mischenden Komponenten sowie der Einzelkomponenten allein und der homogenen Mischung gemessen. Homogene Mischungen werden über das Spritze-zu-Spritze-Verfahren homogenisiert, bis eine komplette Homogenisierung stattgefunden hat.

3.2.5.2 Überprüfung der Farbhomogenität

Zur Untersuchung der Homogenität wird eine Bildanalyse genutzt. Dabei werden die gelb (PpEX) bzw. blau (PHIC) gefärbten Formulierungen entsprechend Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2 verwendet, um die Farbhomogenität der Mischung zu überprüfen und dadurch die Homogenität der Mischprobe zu ermitteln. Diese Methode wurde in Anlehnung an Stroock entwickelt, bei der ebenfalls die Standardabweichung der Helligkeitsverteilung eines fluoreszierenden Stoffes als Maß für die Mischungsgüte verwendet wird [Stroock et al., 2002].

Der Versuchsaufbau wird entsprechend Kapitel 3.2.5.1 aufgebaut. Als Auffangvorrichtung dient hier ein Objektträger mit einem Auffangbereich. Dieser besteht, durch rechts und links angebrachte Begrenzungen, aus jeweils 20 Lagen Tesafilm in Höhe von ca. 100 µm (siehe Abb. 18).



Abb. 18: Schema der Auffangvorrichtung

Ist die Mischungsprobe im Auffangbereich, wird diese mit einem Deckgläschen fixiert. Jede Mischkombination wird dreimal hergestellt und untersucht. Dabei werden bei jeder Untersuchung je drei Proben extrudiert. Von jeder extrudierten Probe werden je drei Aufnahmen mit

einer Kamera (Canon EOS 5D Mark II) und einer kombinierten Stereolupe gemacht. Die Belichtung der Aufnahmen erfolgt ausschließlich über eine Schwanenhalslampe innerhalb eines dunklen Raumes. Die Lampeneinstellung wird auf Stufe 3 bei halber Lampenstärke gewählt. Die Schwanenhälse der Lampe werden so eingestellt, dass sie die Probenplatte der Stereolupe mit ihrem Lichtkegel passgenau beleuchten.

Für die Bildanalyse werden zudem für jedes durchgeführte Experiment je 3 Aufnahmen der Ausgangskomponenten (PPeX und PHIC allein) einer per Spritze-zu-Spritze-Verfahren homogen gemischten Zubereitung als Positivkontrollen und zweier paralleler Stränge der Ausgangsformulierungen als Negativkontrolle aufgenommen.

Die Aufnahmen (Dateiformat jpg) werden mit Adobe Photoshop CS4 Extended, Version 11.0 geöffnet. Hierbei werden die Helligkeitswerte aus den drei Farbkanälen rot, blau und grün an fünf definierten Punkten (x- und y-Position in Prozent: 33,3/33,3; 33,3/66,7; 66,7/33,3; 66,7/66,7; 50/50) (siehe Abb. 19) extrahiert. Daraus werden die Standardabweichungen der fünf Bildpunkte eines Bildes im jeweiligen Farbkanal berechnet und aus den drei Farbkanälen zusammengefasst. Dabei stehen hohe Standardabweichungen für eine inhomogene Mischung, niedrige Standardabweichungen für eine gute Mischungsgüte. Die Werte der Mischungsproben werden mit denen der Positiv- und Negativkontrolle in einen Homogenitätswert [%] umgerechnet. Dabei markiert die Positivprobe 100 % Mischungsgüte, die Negativkontrolle 0 % Mischungsgüte.

Die Homogenität wird entsprechend folgender Formel, nach Xia, berechnet:

$$\sigma_i = \left(1 - \frac{I_i - I_{mix}}{I_{unmix} - I_{mix}} \right) * 100 \% \quad \text{Gleichung 3.2-2}$$

[Xia et al., 2010]

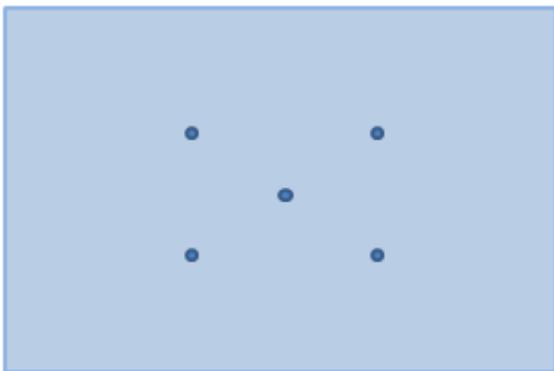


Abb. 19: Position der Bildpunkte zur Erfassung der Helligkeitswerte

3.2.5.2.1 Validierung der Methode

Um sicherzustellen, dass die Lichtverhältnisse sowie der Versuchsaufbau die Untersuchung der Mischungsgüte zuverlässig ermöglichen, werden folgende Punkte untersucht:

- Lichtverhältnisse innerhalb eines Bildes
- Einfluss unterschiedlicher Belichtung
- Einfluss des Abstands der Beleuchtungsquelle
- Einfluss der Konvertierung von raw zu jpg bzw. tiff

Lichtverhältnisse innerhalb eines Bildes

Die aufgenommenen Bilder werden mit einer Canon EOS 5D Mark II aufgenommen, die mit einer Stereolupe kombiniert ist. Daher besteht die Notwendigkeit, die gleichmäßigen Lichtverhältnisse bzw. die Kompatibilität des Kamerachips mit dem verwendeten Objektiv zu untersuchen.

Dafür werden Bilder einer blau eingefärbten Zubereitung und einer gelb eingefärbten Zubereitung untersucht und die Helligkeitswerte in den Farbkanälen R, G und B an den Achsen $x=33,3\%$ und 50% und $y=33,3\%$ und 50% in 5% -Abständen untersucht (siehe Abb. 20 und Abb. 22). Des Weiteren wird die Abweichung der Helligkeitswerte in einem Bereich von $30-70\%$ untersucht (siehe Abb. 21 und Abb. 23). Da sich der verwendete Messbereich zwischen $33,3\%$ und $67,7\%$, sowohl in x - als auch in y -Richtung befindet, werden die Grenzen mit $30-70\%$ gewählt.

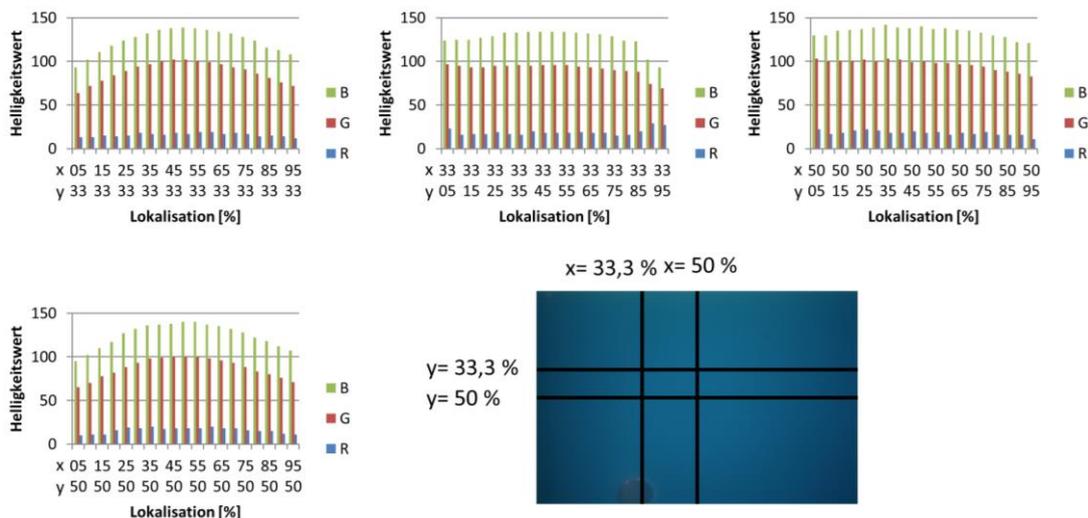


Abb. 20: Bildausleuchtung blaues Bild

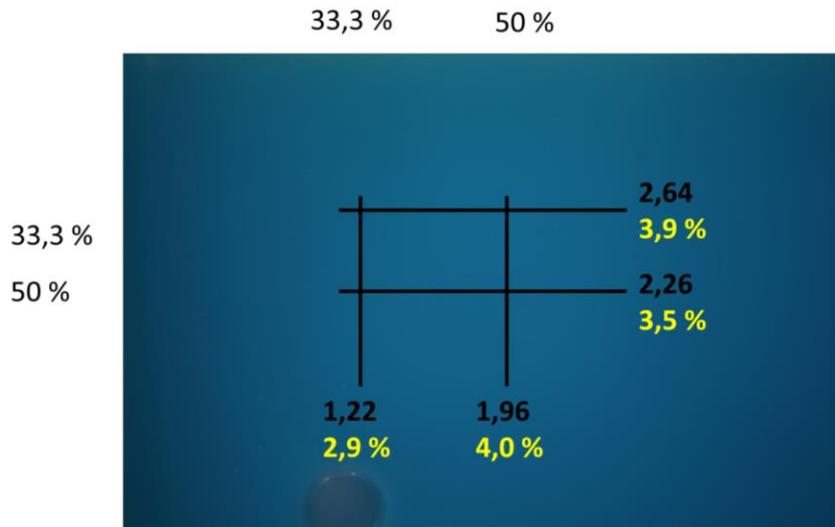


Abb. 21: Schwankung der Bildhelligkeit auf den Messlinien des blauen Bildes; Messbereich von 30 - 70 %

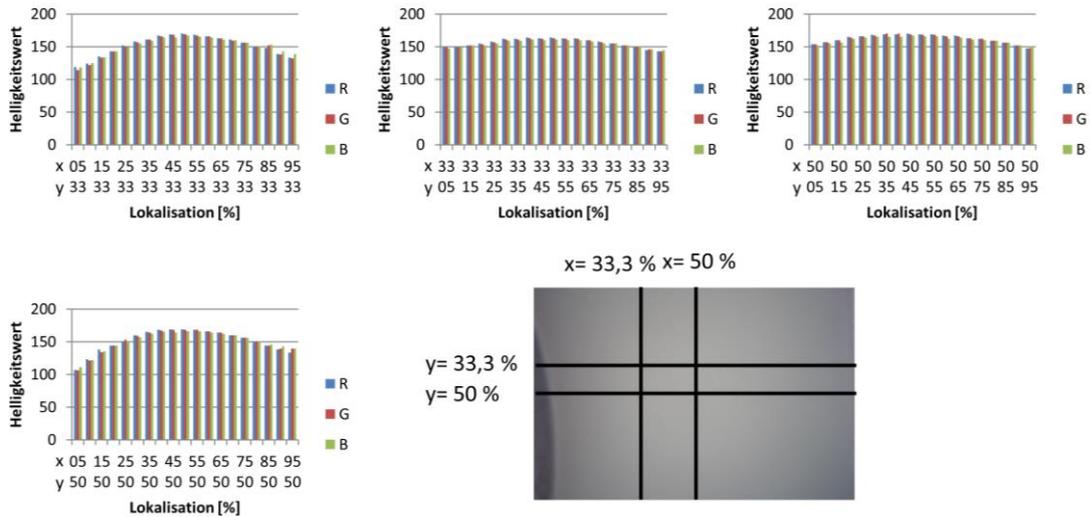


Abb. 22: Bildausleuchtung gelbes Bild

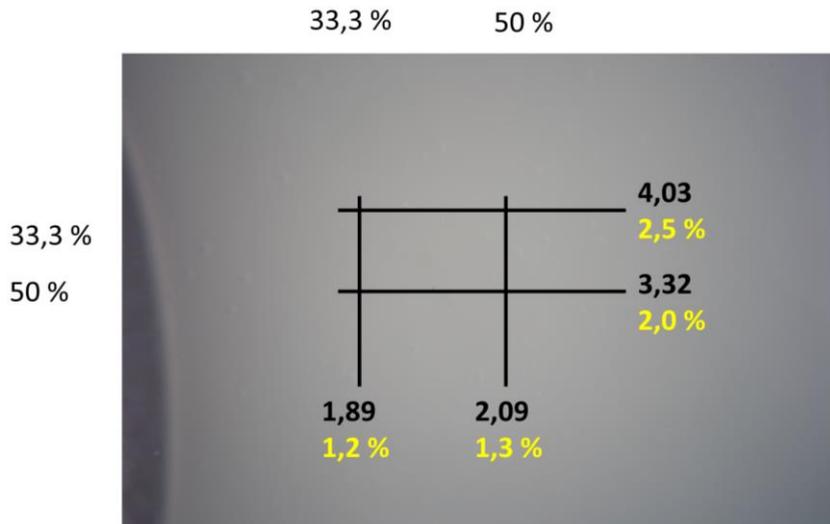


Abb. 23: Schwankungen der Bildhelligkeit auf den Messlinien des gelben Bildes; Messbereich 30 - 70 %

Es ist in Abb. 20 und Abb. 22 zu erkennen, dass die Beleuchtung nach außen abfällt. Im Inneren des Bildes herrschen allerdings sehr konstante Belichtungsverhältnisse. Dies wird bestätigt durch die Ergebnisse aus Abb. 21 und Abb. 23. Innerhalb des Messbereiches liegen alle Schwankungen der Werte, zum Teil deutlich, unter 4 %. Der Messbereich ist also mit 33,3 – 66,7 % sowohl in x- als auch in y-Richtung richtig gewählt.

Einfluss unterschiedlicher Belichtung

Für die Untersuchung der Homogenität wird die Beleuchtung der Schwanenhalslampe auf die Stärke 3 bei halber Intensität (halb 3) eingestellt. Nun wird untersucht, inwieweit sich unterschiedliche Einstellungen der Belichtung, halb 2 und halb 4, auf das Ergebnis der Homogenität auswirken. Dafür werden drei Proben mit unterschiedlicher Mischungshomogenität verwendet.

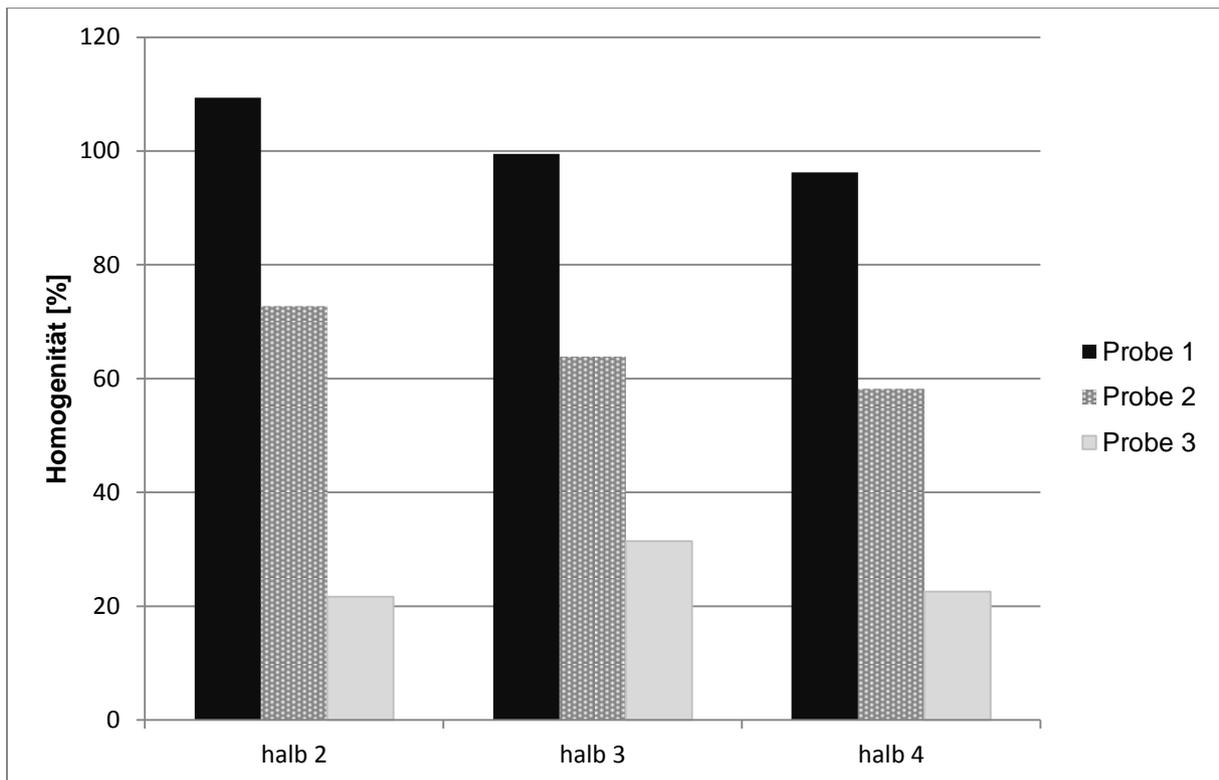


Abb. 24: Untersuchung der Mischungsgüte bei unterschiedlicher Lampeneinstellung

Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 24, so ist zu erkennen, dass die Homogenität mit steigender Beleuchtungsstärke abnimmt. Allerdings werden die unterschiedlichen Homogenitätswerte sicher ermittelt und die Unterschiede zwischen den verschiedenen Messproben können herausgearbeitet werden. Daher kann man schlussfolgern, dass die Schwankungen in der Belichtung, die im kontrollierten Versuchsaufbau auftreten, zu unwesentlichen Schwankungen bei den ermittelten Homogenitätswerten führen.

Einfluss des Abstands der Belichtungsquelle

Bei der Belichtungseinstellung der Schwanenhalslampe wird der Abstand der beiden Schwanenhalslampenteile manuell eingestellt. Dabei wird der Abstand so eingestellt, dass die Probenplatte der Stereolupe passgenau ausgeleuchtet wird. In dieser Validierung wird nun untersucht, inwieweit sich Veränderungen des Lampenabstandes auf die ermittelten Helligkeitswerte und Standardabweichungen, aus denen die Homogenitätswerte berechnet werden, auswirken. Dabei wird eine Graukarte fotografiert und ausgewertet.

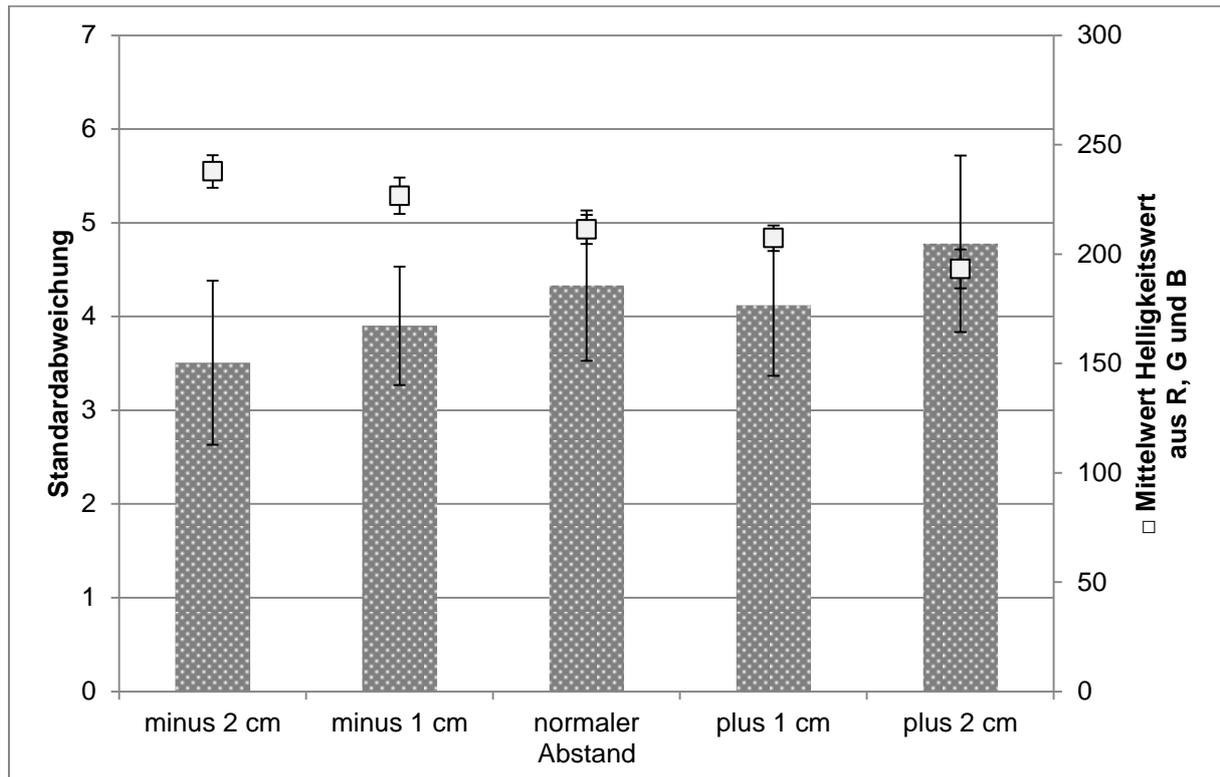


Abb. 25: Einfluss des Abstandes der Beleuchtungsquelle auf Helligkeitswert und Standardabweichung, n = 5, Fehlerbalken als Standardabweichungen des Mittelwerts

Abb. 25 zeigt, dass die ermittelten Standardabweichungen mit verändertem Belichtungsabstand leicht ansteigen, während die ermittelten Helligkeitswerte absinken. Es zeigt sich aber auch, dass der normale Belichtungsabstand sicher und reproduzierbar eingestellt werden kann. Kommt es bei der Einstellung des Belichtungsabstandes zu Schwankungen, werden die ermittelten Werte beeinflusst. Allerdings ist eine Abweichung von 2 cm des Beleuchtungsabstandes eine große Abweichung der Lampendistanz, welche wiederum nur zu kleineren Schwankungen in den ermittelten Werten führt. Die erforderliche, sichere Beleuchtung kann generiert werden.

Einfluss der Konvertierung von raw zu jpg bzw. tiff

Bei den Aufnahmen der Bilder werden von der Kamera sowohl ein raw als auch ein jpg-Dateiformat ausgegeben. Da die Aufnahmen in Adobe Photoshop CS4 Extended vermessen werden und dieses Programm nur die jpg-Auswertung ermöglicht, werden die Untersuchungen mit den jpg-Aufnahmen durchgeführt. Da jpg ein komprimiertes Dateiformat von raw ist und die Konvertierung innerhalb der Canon-Software (EOS Utility) unter nicht bekannten Vorgaben stattfindet, wird der Einfluss der Konvertierung untersucht. Dafür wurden in Canon EOS Utility zwei definierte Konvertierungen durchgeführt und vermessen. Die Ergebnisse werden mit denen aus der Autokonvertierung verglichen.

Konvertierung 1: Sharpness 6; color temperature:5200 K

Konvertierung 2: Sharpness 6; color temperature:5200 K; Kontrast +1

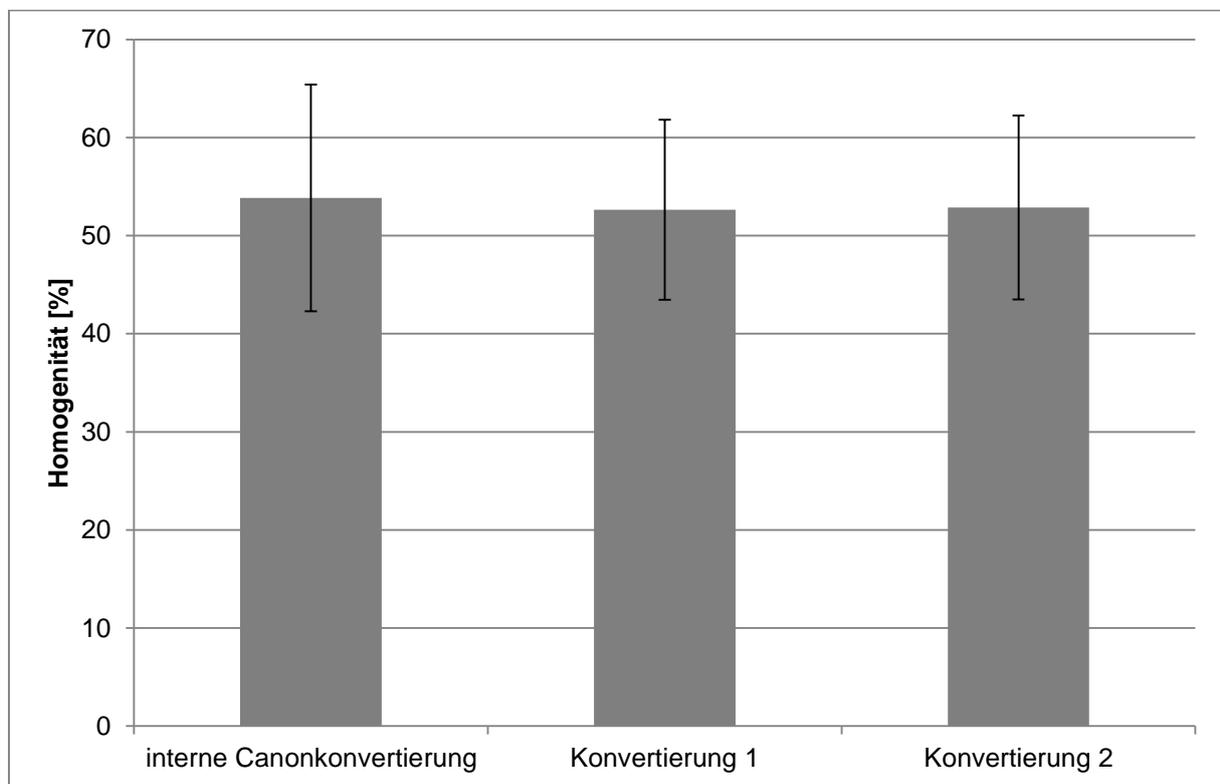


Abb. 26: Einfluss der Konvertierung auf die Mischungsgüte

Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen konvertierten Bilder, so kann man sehen, dass die ermittelte Homogenität als äquivalent anzusehen ist. Daraus kann man schließen, dass die interne Konvertierung keine wesentlichen Veränderungen am aufgenommenen Bild vornimmt, die das Ergebnis der Homogenität nachteilig beeinflussen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die eingestellten Lichtverhältnisse sowie der Versuchsaufbau eine zuverlässige Bestimmung der Homogenität ermöglichen und so verwendet werden können.

3.2.5.3 Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Homogenität ist die Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit. Dafür werden die Zubereitungen PPeX und PHIC entsprechend Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.2 und 3.2.1.4 hergestellt. Der Versuchsaufbau wird entsprechend Kapitel 3.2.5.1 aufgebaut. Als Auffangvorrichtung dient ein Wägeschiffchen. Ist die Mischprobe extrudiert, wird sie sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren, wodurch eine weitere Vermischung der Komponenten unterbunden wird. Mit einem Skalpell wird die Probe in drei gleichgroße, ca. 1 g schwere Probenstücke geteilt (siehe Abb. 27). Die Proben werden aufgearbeitet und mittels HPLC-Analytik wird der ALA-Gehalt der Probenstücke bestimmt (siehe Kapitel 3.2.7).

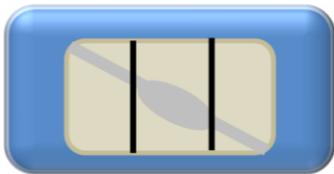


Abb. 27: Schema der Probennahme

Außerdem werden Mischmuster erstellt. Diese werden in gleicher Weise extrudiert. Nach dem Mischprozess werden die Proben mit einem Spatel homogen verrührt und ebenfalls 3 Proben gezogen, die entsprechend aufgearbeitet und analysiert werden.

3.2.6 In-vitro Permeationuntersuchungen

3.2.6.1 Hautpräparation

Die für die Permeationsstudien verwendete Haut von Schweineohren wurde von der Abteilung „Experimentelle Medizin“ des Universitätsklinikums Tübingen und der Metzgerei Grieshaber in D-Öschingen zur Verfügung gestellt.

Am Tag der Schlachtung werden die Ohren abgeholt und in isotoner Kochsalzlösung gewaschen, mit Schlinggazetupfern von Blut und Schmutz befreit und getrocknet. Mit einem Skalpell wird die Haut von der Außenseite des Schweineohrs vorsichtig von der Kopfseite bis zur Ohrenspitze abgetrennt. Die abgetrennte Haut wird in Alufolie eingeschlagen und bis zur Verwendung bei -28 °C eingefroren. Dabei ist die maximale Einfrierdauer auf 6 Monate beschränkt. Wird die Haut verwendet, wird sie auf einem mit isotoner Kochsalzlösung getränkten Papiertuch aufgetaut. Nach dem Auftauen wird sie auf einem ca. 3 cm breiten, mit Alufolie umwickelten, Styroporblock mit Stecknadeln festgesteckt. Die Haare werden mit einem Barthaartrimmer vorsichtig getrimmt. Die Haut wird mit einem mit isotoner Kochsalzlösung getränkten Schlinggazetupfer von Haarstopfeln befreit. Nun wird die Haut mit einem Dermatom (GA 630) auf eine Dicke von 0,2 mm abpräpariert. Das dermatomisierte Hautstück wird auf ein mit isotoner Kochsalzlösung getränktes Papiertuch gelegt. Mit einem Henkellocheisen werden runde Hautstücke mit einem Durchmesser von 25 mm gestanzt.

3.2.6.2 In-vitro Permeationsuntersuchungen

Für die Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosierung werden die 1975 entwickelten modifizierten Franz-Diffusionszellen eingesetzt [Franz, 1975]. Die Kontaktflächen des Donor- und des Akzeptorkompartiments werden mit Schliff fett (Korasilon Paste bzw. Glisseal HV) eingefettet. Das Akzeptorkompartiment wird mit Phosphatpuffer pH 5,0 (Ph. Eur.) gefüllt. In jede Franzzelle wird ein Magnetrührstäbchen eingebracht. Nun wird die gemäß Kapitel 3.2.6.1 präparierte und ausgestanzte Haut auf das Donorkompartiment aufgebracht. Dieses wird wiederum auf das Akzeptorkompartiment aufgebracht und das Ganze wird mit einer Klammer fixiert. Nun wird mit einer 20 mL-Spritze und einer Kanüle (Sterican) das Akzeptorkompartiment luftblasenfrei gefüllt, sodass 12 mL Akzeptormedium enthalten ist. Die Franzzelle wird in das Wasserbad gesetzt und bei 32 °C 30 min temperiert (Einhängethermostat). Über den Mehrstellenrührer wird das Akzeptormedium durch das Magnetrührstäbchen mit 500 rpm gerührt. Mit dem Auftragen von 0,5 g 7,8 %iger Formulierung startet die Permeationszeit. Der Probenzug erfolgt nach 12, (16, 20) und 24 h. Dabei werden 400 µL Akzeptormedium entnommen und durch neues temperiertes Medium ersetzt. 200 µL der Probe werden, wie in Kapitel 3.2.7.2 beschrieben, derivatisiert und der Gehalt von ALA mittels HPLC bestimmt.

3.2.7 HPLC-Analytik

3.2.7.1 Probenaufarbeitung

Um die halbfesten Proben pipettierbar zu machen, wird 1 g Zubereitung in 9 mL Wasser gelöst und gevortext (Stuart Scientific SA8). Thermogel- und Homogenitätsproben (PPeX + PHIC) werden 2 h bei 6000 rpm und 20 °C zentrifugiert. Anschließend wird die Ölphase abgenommen. Mindestens 7 Kalibrierungsproben werden bei jedem Experiment in gleicher Weise hergestellt und aufgearbeitet.

3.2.7.2 Vorsäulenderivatisierung

Für die Detektion von ALA wird dieses mit o-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert [Donnelly et al., 2006, Grüning, 2007, Winkler, 2005]. Dafür wird 27 mg OPA in 500 µL Ethanol im Ultraschallbad (Sonorex RK 31) gelöst. Dieser Lösung wird Boratpuffer (0,6 mol/L Borsäure, mit 0,2 mol/L NaOH-Lösung eingestellt auf einen pH-Wert von 12,5) und 52,2 mg N-Acetylcystein (ACC) zugesetzt. Die Lösung wird über Nacht gelagert.

Für die Derivatisierung wird 200 µL Reagenz mit 200 µL Probe versetzt. Die Reaktion zum zu analysierenden Produkt erfolgt über Nacht bei 32 °C und ist in Abb. 28 dargestellt.

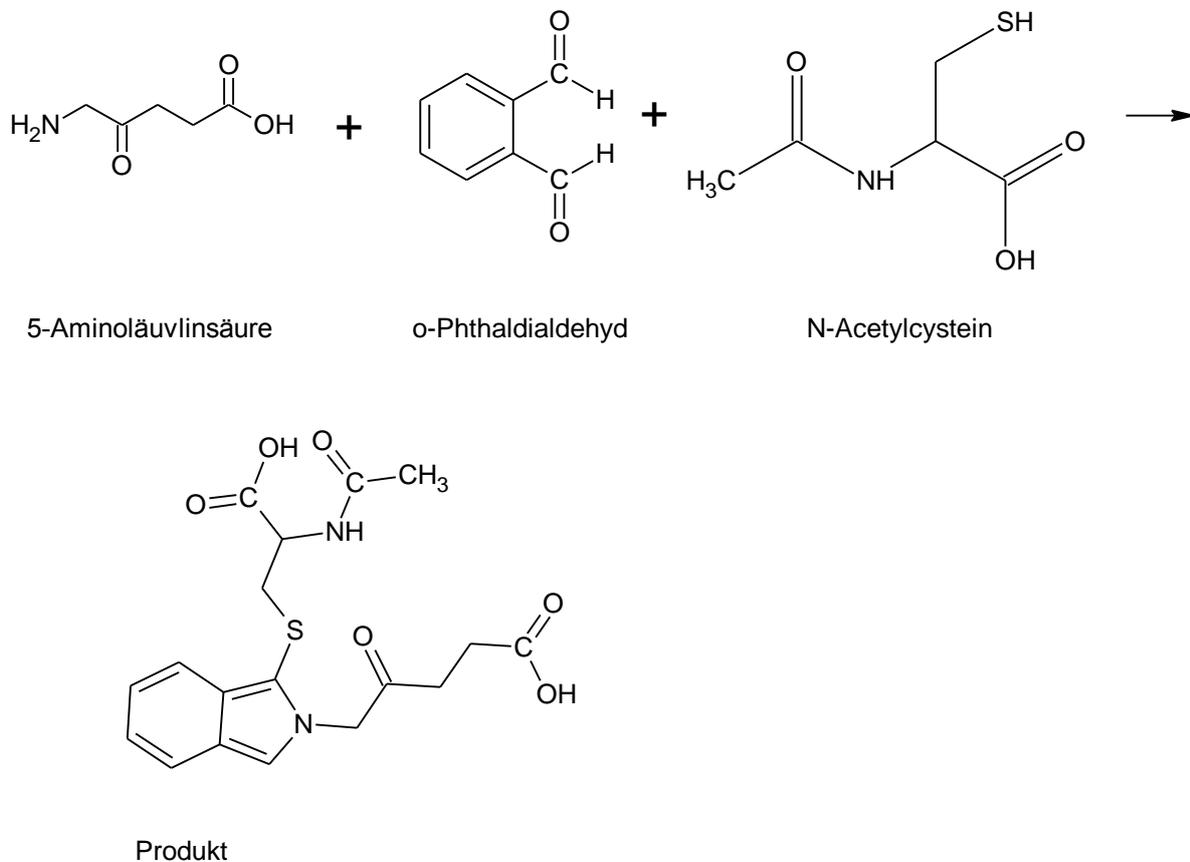


Abb. 28: modifizierte Reaktion von ALA mit OPA und ACC zum detektierbaren Produkt [Donnelly et al., 2006]

3.2.7.3 Verfahrensparameter

Für die Analyse des derivatisierten Agens, wird eine C18-Reversed-Phase-Säule verwendet. Als Fließmittel dienen H₂O und Acetonitril mit jeweils 0,1 % Trifluoressigsäure. Diese werden vor Verwendung 15 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510H) entgast. Die Programme der Gradientenelution für Stabilitäts- und Homogenitätsproben sowie für Permeationsproben sind Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10 zu entnehmen.

Tabelle 3-9: Gradientenelutionsprogramm für Homogenitäts- und Stabilitätsproben

Zeit [min]	Fließmittelzusammensetzung ACN/H ₂ O [%]
0 - 30	10/90 – 30/70
30 - 35	30/70 – 80/20
35 – 40	80/20 -10/90
40 - 55	10/90

Tabelle 3-10: Gradientenelutionsprogramm für Permeationsproben

Zeit [min]	Fließmittelzusammensetzung ACN/H ₂ O [%]
0 - 30	15/85 – 25/75
30 – 40	25/75 – 80/20
40 - 45	80/20 -15/85
45 - 60	15/85

Es werden 20 µL Probe auf die Säule injiziert und bei einer Flußrate von 1 mL/min eluiert. Die Ofentemperatur beträgt 40 °C. Die Detektion erfolgt bei 260 nm.

3.2.8 Statistik

3.2.8.1 Prüfung auf signifikante Unterschiede

Um die Prüfung auf signifikante Unterschiede durchzuführen, wird die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Diese wird anschließend mit dem Student-Newman-Keuls-Test kombiniert. Statistische Signifikanz wird mit $p < 0,05$ festgelegt. Mit * markierte Daten zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2.8.2 Prüfung auf Äquivalenz von Permeationsdaten

Um zu prüfen, ob verschiedene Formulierungen ein äquivalentes Permeationsverhalten aufweisen, wird eine Prüfung aus der sogenannten SUPAC-SS, einer Richtlinie der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA, in abgewandelter Form verwendet (FDA Guidance for Industry 2004). Dafür werden die Permeationsraten von Test- zu Referenzformulierung mit einer Stichprobenanzahl von fünf verwendet. Aus diesen Permeationsraten werden Quotienten gebildet, sodass 25 Quotienten entstehen. Aus diesen Quotienten wird der Median und die Konfidenzintervalle des Medians berechnet (siehe Gleichung 3.2-3 und 3.2-4). Liegen die berechneten Konfidenzintervalle innerhalb der vorgegebenen Grenzen von 0,75 und 1,33, so wird Äquivalenz angenommen.

$$x(h) < \tilde{x} < x(n - h + 1)$$

Gleichung 3.2-3

 \tilde{x} = Median

$$h = \frac{(n-1-z*\sqrt{n})}{2}$$

Gleichung 3.2-4

n = Anzahl der Quotienten

z = 1,64 für 90 % Konfidenzintervall

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die Formulierungen des Zweikammersystems

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend von der als Thermogel bezeichneten Formulierung, zwei halbfeste Formulierungen für ein Zweikammersystem zu entwickeln und diese zu charakterisieren. Das Thermogel besteht aus Poloxamer 407, Dimethylisosorbid, Isopropylalkohol, mittelkettigen Triglyceriden (Propylenglykol dicaprylat dicapräte) und Wasser. Die Komponenten sind dabei so zu wählen, dass eine wasserfreie Formulierung resultiert, in die der Wirkstoff ALA eingearbeitet wird. Die zweite Formulierung soll die noch fehlenden Komponenten des Thermogels enthalten (Abb. 29).

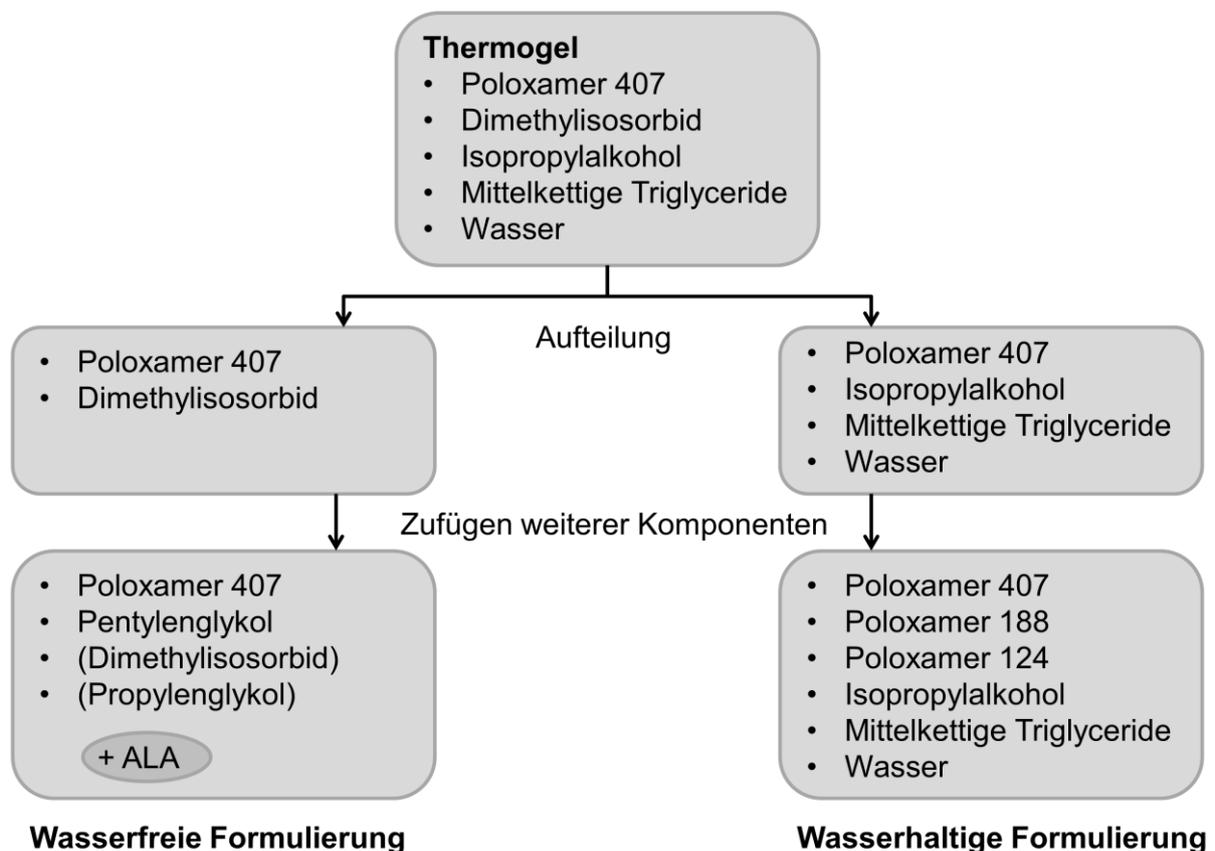


Abb. 29: Entwicklung zweier Formulierungen für ein Zweikammersystem ausgehend von den Komponenten des Thermogels

Die wasserfreie Formulierung besteht aus 15 % Poloxamer 407, 75 % Pentylenglykol und 10 % Dimethylisosorbid (PPeD 15/75/10). Außerdem wird Dimethylisosorbid durch Propylenglykol ersetzt, sodass die Formulierung PPePr 15/75/10 entsteht. Darüber hinaus wird eine Zubereitung ohne Dimethylisosorbid und Propylenglykol formuliert, die sich ausschließlich aus Poloxamer 407 und Pentylenglykol (PPe 15/85) zusammensetzt. Da die Zusammen-

setzungen nicht variieren, werden im Folgenden die Angaben des Mengenanteils hinter der Kurzbezeichnung weggelassen. Zusammengefasst wird von PPeX gesprochen.

Die wasserhaltige Formulierung enthält drei verschiedene Poloxamere und zwar 407, 188 und 124. Außerdem ist Aqua purificata, Isopropylalkohol und mittelkettige Triglyceride (Propylenglykol dicaprylat dicaprat, Crodamol PC) enthalten. Wie im folgenden Kapitel 4.1.2 erläutert wird, dient als Grundlage für weitere Untersuchungen die Formulierung mit 25 % Poloxamer 188, 36 % Wasser (Aqua purificata, H_2O), 9 % Isopropylalkohol und 30 % Propylenglykol dicaprylat dicaprat (Crodamol PC), abgekürzt: **PHIC 25/36/09/30**. In einem Mischungsdesign wird die Poloxamerzusammensetzung mit Poloxamer 407, 188 und 124 variiert, um daraus drei Formulierungen mit niedriger, mittlerer und hoher Viskosität zu erhalten, die für weitere Untersuchungen verwendet werden.

4.1.1 Charakterisierung von PPeX

4.1.1.1 Mikroskopische Charakterisierung der Zubereitungen

Die mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 30) zeigen alle drei wasserfreien, halbfesten Formulierungen PPeD, PPe und PPePr. Es ist in allen drei Zubereitungen zu erkennen, dass homogen verteilte partikuläre Strukturen vorliegen. Diese sind dem Poloxamer zuzuordnen, das typischerweise lyotrope Assoziationsaggregate bildet. Die Aufnahmen mit stärkeren Vergrößerungen zeigen diese Aggregate genauer. Sie liegen als kugel- oder röhrenförmige Aggregate vor. PPeD, PPe und PPePr zeigen einen vergleichbaren Aufbau.

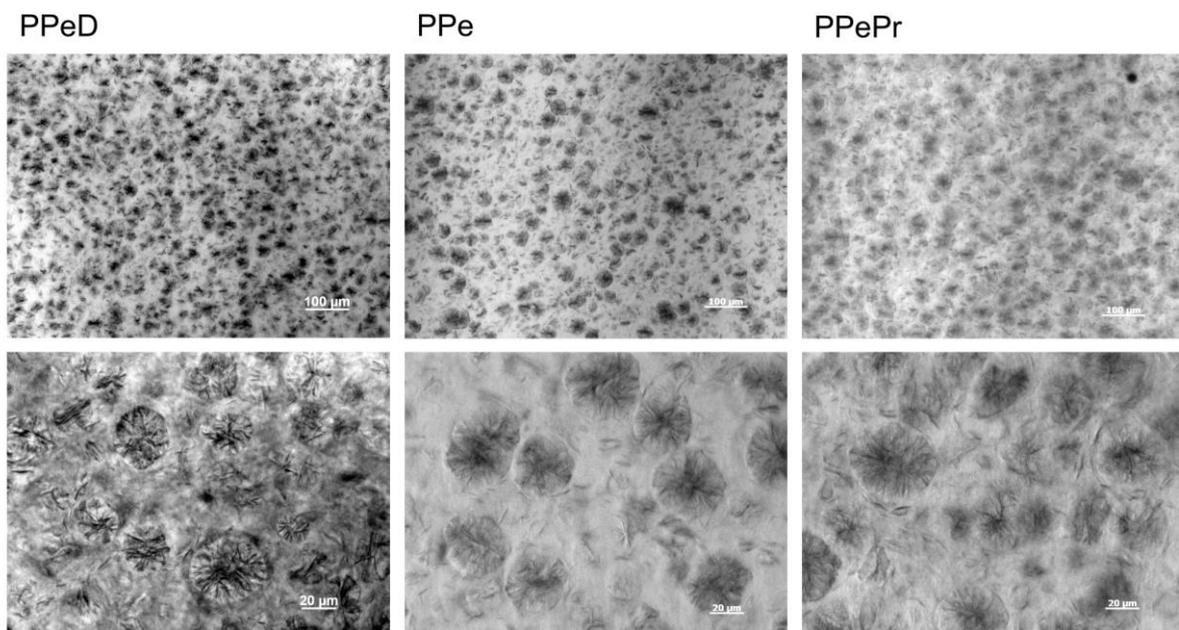


Abb. 30: Mikroskopische Aufnahmen von PPeD, PPe und PPePr, Maßstabsbalken obere Reihe 100 µm, untere Reihe 20 µm

4.1.1.2 Polarisationsmikroskopische Charakterisierung der Zubereitungen

Die polarisationsmikroskopischen Aufnahmen bestätigen das Vorhandensein flüssigkristalliner Zubereitungen (Abb. 31). Bei allen drei Zubereitungen sind viele gleichmäßig verteilte Texturen zu erkennen. Bei stärkerer Vergrößerung sind diese als Malteserkreuze zu identifizieren. Malteserkreuze sind Texturen, die durch die Drehung linear polarisiertem Licht resultieren und bei anisotropen Proben vorkommen und der lamellaren Phase zuzuordnen sind. Daher handelt es sich um anisotrope, flüssigkristalline Zubereitungen. Zwischen den Zubereitungen PPeD, PPe und PPePr sind keine Unterschiede zu erkennen, sodass man von einem gleichwertigen Strukturaufbau ausgehen kann.

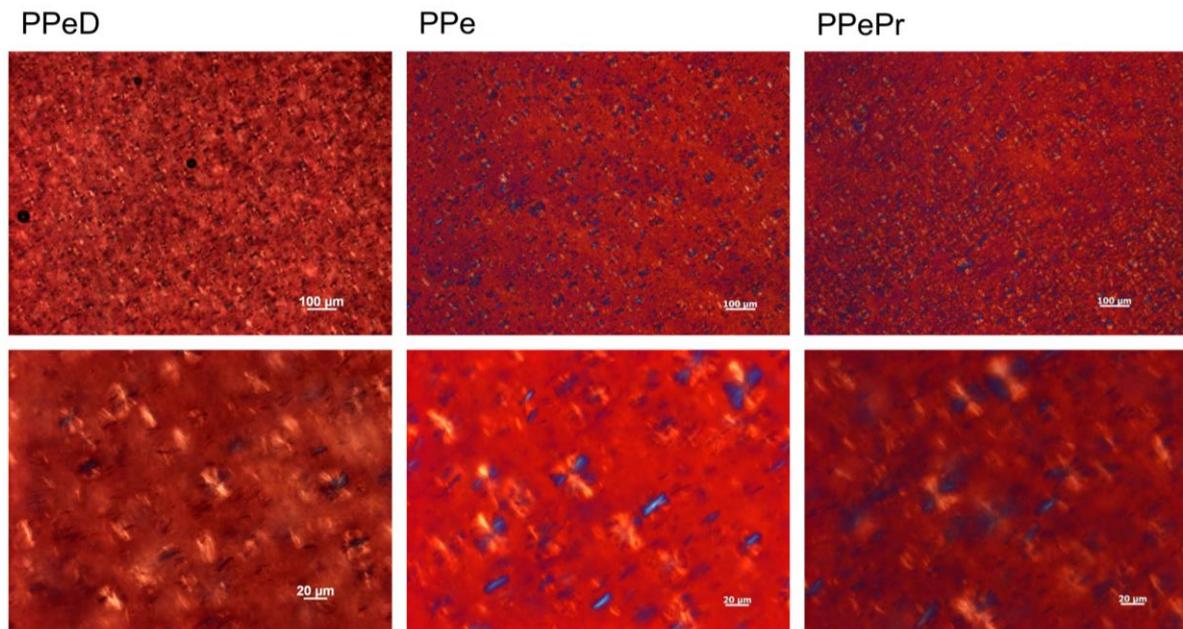


Abb. 31: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von PPeD, PPe und PPePr, Maßstabsbalken obere Reihe 100 µm, untere Reihe 20 µm

4.1.1.3 Rheologische Charakterisierung der Zubereitungen

Um das Fließverhalten der Zubereitungen zu beurteilen, werden rheologische Messungen durchgeführt. Abb. 32 zeigt das Rheogramm von PPeD, PPe und PPePr. Alle drei Zubereitungen zeigen plastisches Fließverhalten. Dabei zeigt PPe die höchste Viskosität, PPeD und PPePr eine niedrigere, aber ähnliche Viskosität. Insgesamt sind die Fließkurven sehr ähnlich zu beurteilen.

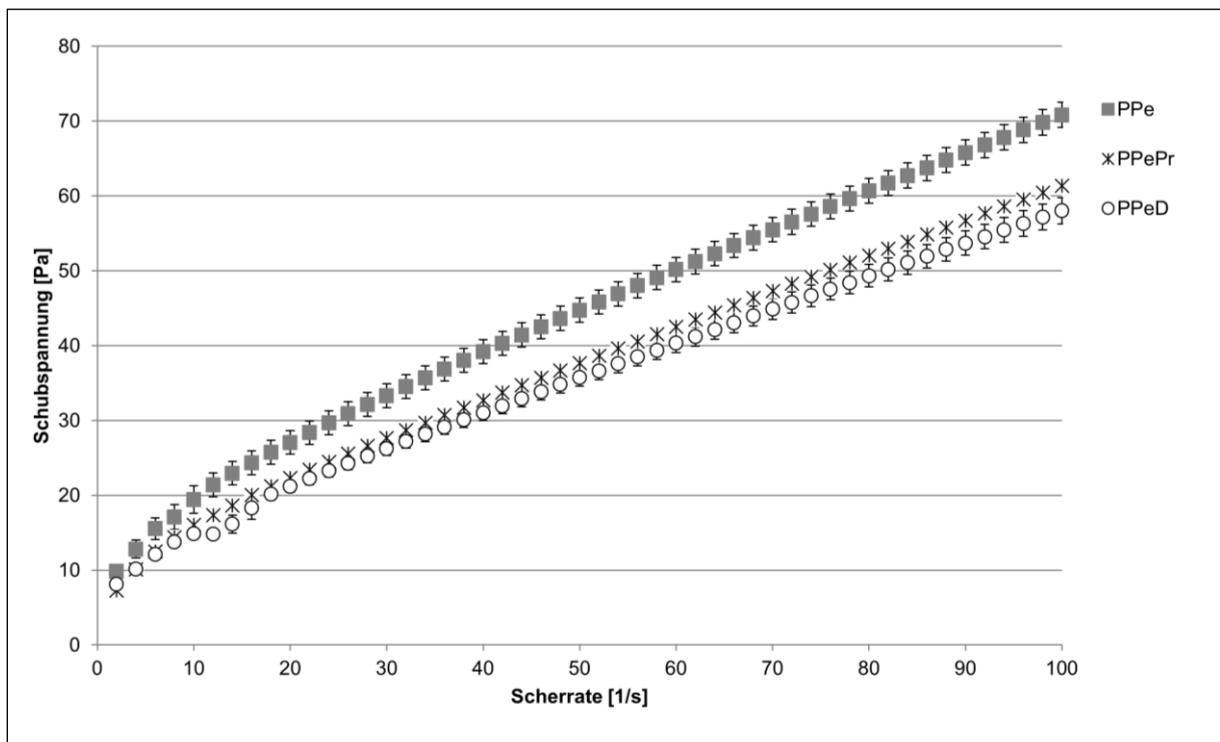


Abb. 32: Rheogramm von PPeX; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichungen

4.1.2 Charakterisierung von PHIC

Die Formulierungen **PHIC** setzen sich aus **Poloxameren** (407, 188 und 124), Aqua purificata (H_2O), Isopropanylalkohol und Propylenglykol dicaprylat dicprate (**Crodamol PC**) zusammen. Da die Poloxamere einen HLB-Wert von etwa 20 haben [BASF, 2004], handelt es sich bei der vorliegenden Formulierung um eine streichfähige Öl-in-Wasser (O/W)-Emulsion. Das enthaltene Poloxamer ist dabei viskositäts erhöhend [van Hemelrijck, 2011]. Je höher der Anteil an höhermolekularem Poloxamer ist, umso stärker wird ein Cremegerüst ausgebildet. Als Ausgangsformulierung dient dabei PHIC 25/36/09/30 mit Poloxamer 188. Diese zeigt bereits nach 2 Tagen Aufrahmungstendenzen. Daher ist die Optimierung der Stabilität ausgehend von dieser Formulierung notwendig.

4.1.2.1 Statistisches Versuchsdesign zur Optimierung von Stabilität und Viskosität von PHIC

Um Formulierungen zu generieren, die eine verbesserte Stabilität und damit eine längere Verwendbarkeitsdauer aufweisen, wird ein Versuchsdesign (siehe Abb. 33) durchgeführt. Dabei soll gleichzeitig eine niedrige Viskosität bei erhöhter Stabilität der Formulierung resultieren. Eine niedrige Viskosität ist für die Pumpfähigkeit der Zubereitung durch den Mikromischer notwendig.

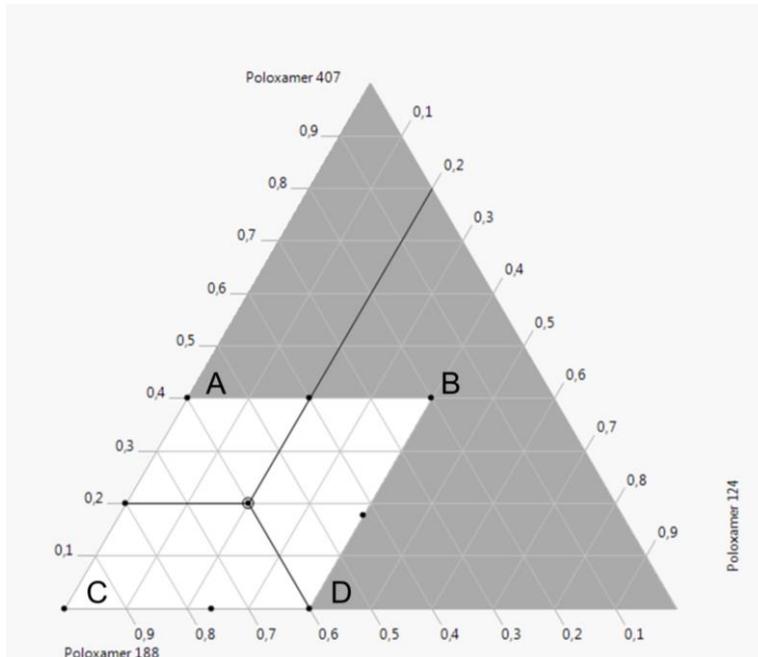


Abb. 33: Versuchsdesign; markierte Eckpunkte

Tabelle 4-1: Poloxamerzusammensetzung der Zubereitungen A, B, C und D

Zubereitung	Anteil Poloxamer 407	Anteil Poloxamer 188	Anteil Poloxamer 124
A	0,4	0,6	0,0
B	0,4	0,2	0,4
C	0,0	1,0	0,0
D	0,0	0,6	0,4

4.1.2.1.1 Mikroskopische Charakterisierung der Formulierungen aus dem Mischungsdesign

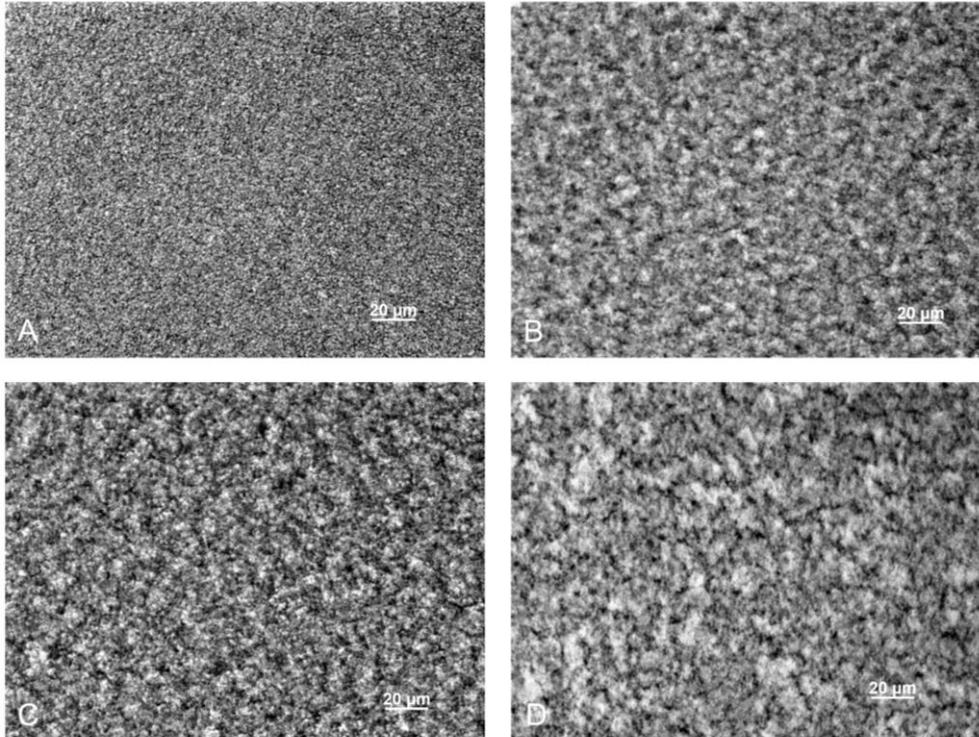


Abb. 34: Mikroskopische Aufnahmen der Formulierungen A, B, C und D, Maßstabsbalken 20 µm

Abb. 34 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der Formulierungen A, B, C und D aus dem Versuchsdesign. Dabei sind die Formulierungen der Eckpunkte dargestellt (Abb. 33). Die jeweilige Poloxamerzusammensetzung ist Tabelle 4-1 zu entnehmen. Alle drei Poloxamere, Poloxamer 407, Poloxamer 188 und Poloxamer 124 sind in Ph. Eur. monographiert. Im Vergleich hat Poloxamer 407 die höchste mittlere Molekülmasse, Poloxamer 124 die niedrigste mittlere Molekülmasse und bei Poloxamer 188 liegt die mittlere Molekülmasse zwischen der von Poloxamer 407 und Poloxamer 124 (Tabelle 2-1).

Auf den mikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass Formulierung A die feinste Struktur aufweist. Das Öl ist sehr fein dispergiert. Hier liegt mit einer Zusammensetzung von 40 % Poloxamer 407 und 60 % Poloxamer 188 die höchste Konzentration des Poloxamers 407 mit dem höchsten Molekulargewicht vor. Außerdem ist Poloxamer 124, das Poloxamer mit dem niedrigsten Molekulargewicht, nicht enthalten. Formulierung B und C weisen eine vergleichbare, aber gröbere Struktur auf. Bei Formulierung C ist ausschließlich Poloxamer 188 mit mittlerem Molekulargewicht enthalten. Diese Formulierung stellt die bereits erwähnte Ausgangsformulierung dar. Bei Formulierung B liegen 20 % Poloxamer 188 vor und gleiche Anteile des Poloxamers mit dem höchsten (Poloxamer 407) und dem niedrigsten (Poloxamer 124) Molekulargewicht. Formulierung D weist die grobdisperseste Struktur auf. Hier ist mit

40 % der größte Anteil an Poloxamer 124 mit dem niedrigsten Molekulargewicht enthalten. Poloxamer 407 ist nicht enthalten. Daraus lässt sich ableiten, dass die Struktur umso feindisperser ist, je höher der Anteil an höhermolekularen Poloxameren ist. Ein hoher Anteil an Poloxamer 407 wirkt sich positiv auf eine feine Dispersität aus, ein hoher Anteil an Poloxamer 124 wirkt sich negativ auf eine feine Dispersität aus. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die resultierenden Viskositäten mit einem Poloxamer mit höherem Molekulargewicht entsprechend seiner Kettenlänge ansteigen. Dadurch kann bei der Herstellung im Speedmixer mehr Energieeintrag durch axiale Rotation generiert werden [Massing et al., 2008], was für eine feinere Verteilung der Ölphase sorgt.

4.1.2.1.2 Aus Vorhersageformel generierte Daten zu Stabilität und Viskosität

Nach Eingabe der experimentell ermittelten Daten gemäß der Versuchsplanung gibt die Software Algorithmen vor, die die Viskosität bzw. die Stabilität darstellen. Aus dieser Vorhersageformel werden Konturlinien generiert. Dabei stellt eine Konturlinie alle Zusammensetzungen dar, die die gleiche Viskosität bzw. Stabilität repräsentiert.

Abb. 35 zeigt Konturlinien, die Zusammensetzungen gleicher Viskosität repräsentieren. Die Viskositätsparameter errechnen sich aus der Steigung des Rheogramms nach Linearisierung nach Herschel-Bulkley. Die Konturlinien verlaufen parallel von der linken unteren Ecke des Versuchsbereichs zur rechten oberen Ecke des dargestellten Versuchsbereichs. Dies zeigt, je höher der Anteil an Poloxamer 407 in der Zubereitung ist, umso höher ist der Viskositätsparameter. Bei steigendem Anteil an Poloxamer 124 sinkt der Viskositätsparameter und bei steigendem Anteil an Poloxamer 188 sinkt der Viskositätsparameter nur leicht. Poloxamer 407, das Poloxamer mit dem höchsten Molekulargewicht, führt also zu einer Erhöhung der Viskosität der Zubereitung, während Poloxamer 124, das Poloxamer mit dem niedrigsten Molekulargewicht, zu einer Senkung der Viskosität der Zubereitung führt. Der Zusatz von Poloxamer 188 führt zu einer leichten Senkung der Viskosität der Zubereitungen. Sein Molekulargewicht liegt zwischen dem von Poloxamer 407 und Poloxamer 124. Daraus lässt sich ableiten, dass die Viskosität der Zubereitung umso höher ist, je höher der Anteil an Poloxamer mit hohem Molekulargewicht bzw. je höher das mittlere Molekulargewicht der Poloxamermischung ist. Durch ein hohes Molekulargewicht der Poloxamere kommt es zu vermehrten Wechselwirkungen zwischen den Poloxamer-molekülen und dem verstärkten Ausbilden einer Cremestruktur innerhalb der Zubereitung.

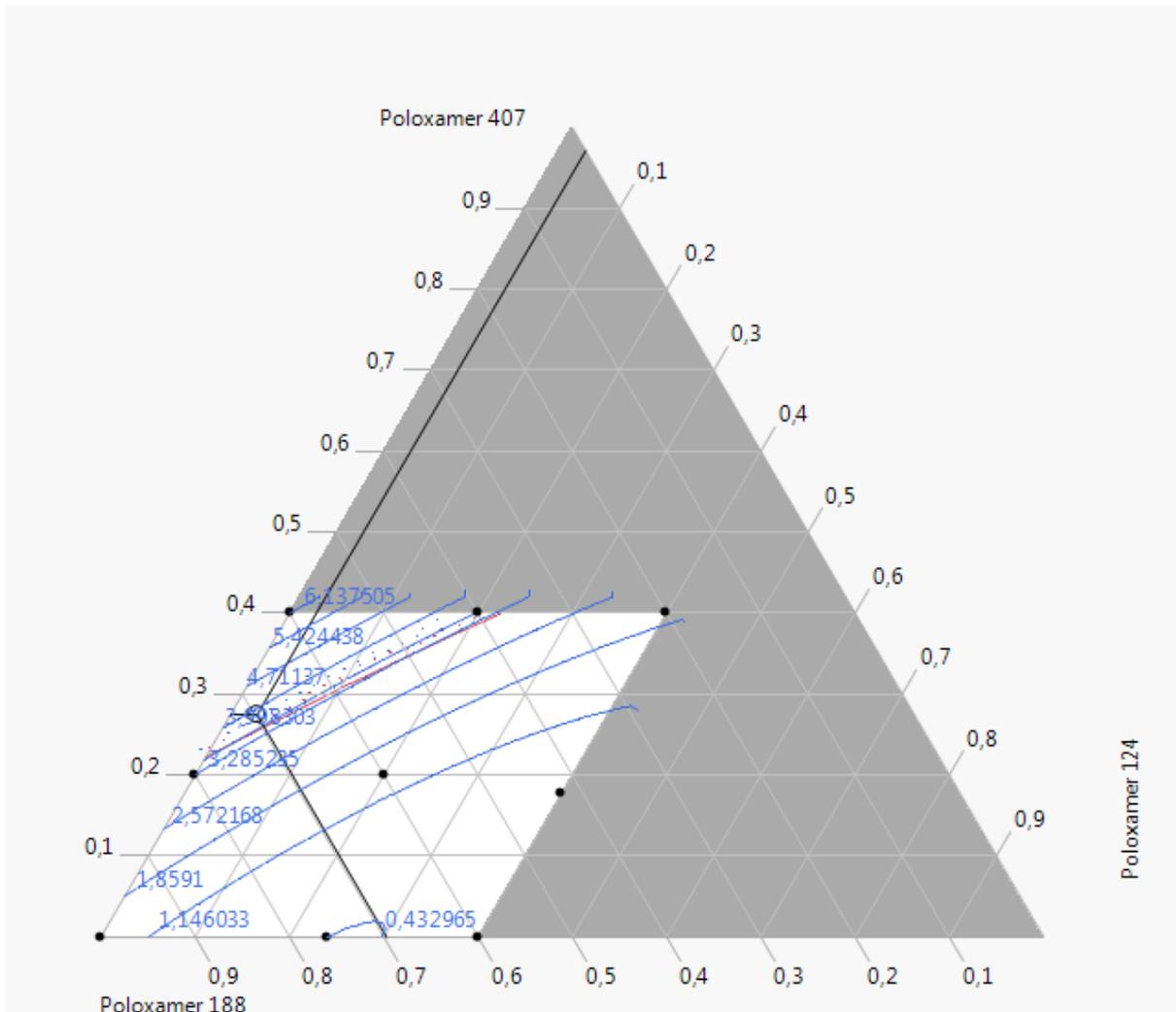


Abb. 35: Konturlinien der Viskosität

Abb. 36 stellt die Konturlinien dar, die Zusammensetzungen gleicher Stabilität repräsentieren. Bei der Stabilität handelt es sich um die Aufräumungsstabilität in Tagen. Die Konturlinien verlaufen parallel von der linken unteren zur rechten oberen Ecke des Versuchsbereichs. Es zeigt sich, dass die ermittelten Stabilitätswerte steigen, je höher der Anteil des Poloxamers 407 mit dem höchsten Molekulargewicht ist. Die Stabilitätswerte sinken, je höher der Anteil des Poloxamers 124 mit dem niedrigsten Molekulargewichts ist. Auch ein steigender Anteil an Poloxamer 188, dessen Molekulargewicht zwischen denen von Poloxamer 407 und Poloxamer 124 liegt, führt zu einer leichten Senkung der Stabilitätswerte. Demnach zeigen die Zubereitungen eine umso höhere Aufräumungsstabilität, je höher das mittlere Molekulargewicht der Poloxamermischung ist. Dies ist durch die erhöhte Viskosität dieser Zubereitungen zu erklären. Nach dem Stokeschen Gesetz ist die Aufräumgeschwindigkeit bei höherer Viskosität der Außenphase einer Emulsion verringert [Daniels, 2011 b]. Entsprechend dieses Versuchsdesigns kann eine maximale Aufräumungsstabilität von etwa 21 Tagen erreicht werden.

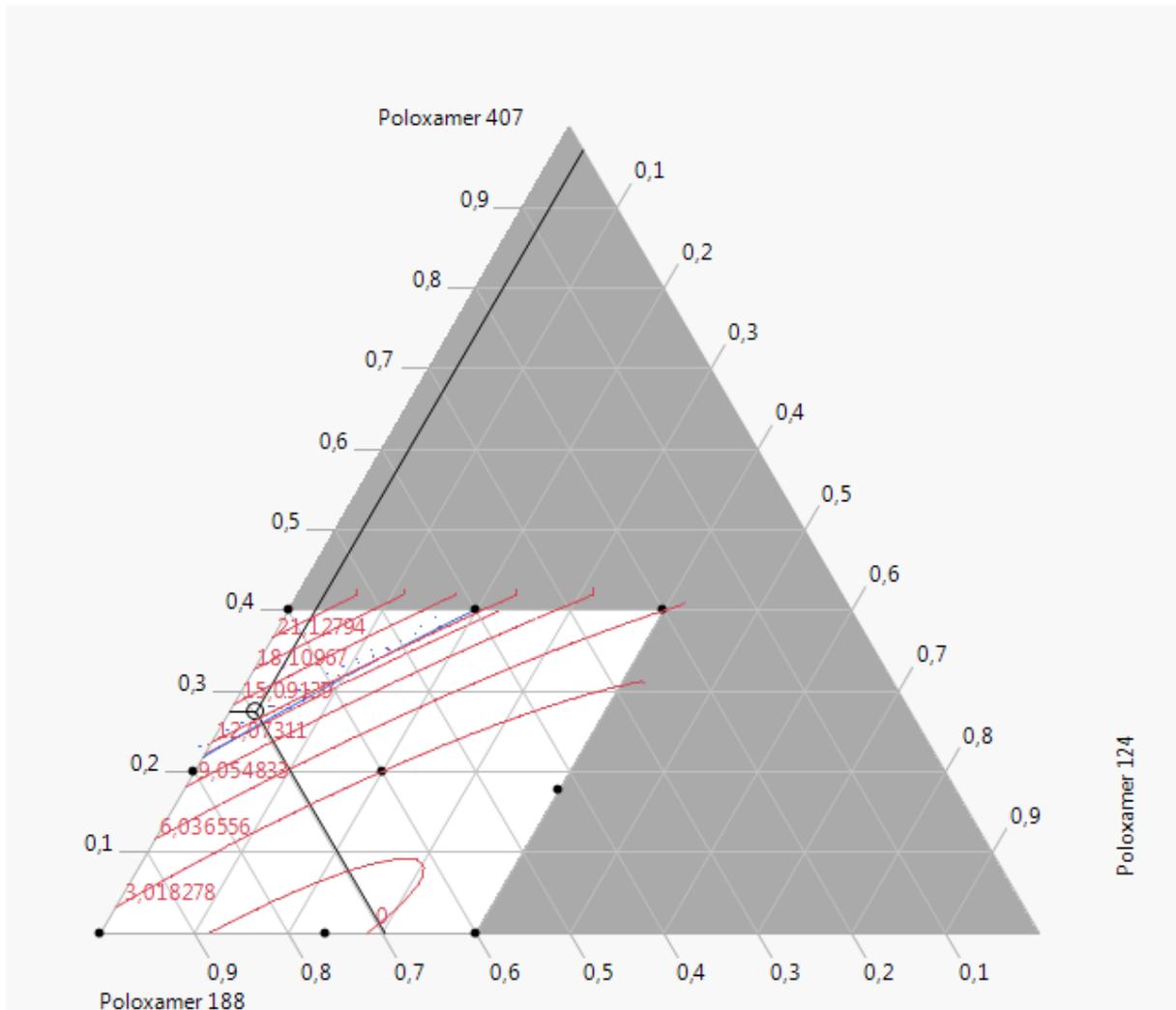


Abb. 36: Konturlinien der Stabilität

Man kann feststellen, dass eine hohe Stabilität und niedrige Viskosität gegenläufige Eigenschaften darstellen. Ist eine Zubereitung lange stabil, so ist die Viskosität höher. Eine hohe Stabilität ist für das Zweikammersystem grundsätzlich erstrebenswert, da es dadurch länger verwendbar ist. Eine damit einhergehende hohe Viskosität wirkt sich dagegen negativ aus, denn damit steigen die benötigten Auspresskräfte beim Fördern durch den Mikromischer und dies wirkt sich wiederum auf die Pumpfähigkeit aus. Im Umkehrschluss wirkt sich eine niedrigviskose Zubereitung positiv auf die Auspresskräfte und die Pumpfähigkeit aus, zeigt dagegen eine niedrige Stabilität und kann daher nicht lange verwendet werden.

4.1.2.1.3 Überprüfung der Vorhersageformel

Entsprechend der von der Software generierten Werte werden drei Zubereitungen mit niedriger, mittlerer und hoher Viskosität ausgewählt. Die Poloxamerzusammensetzungen dieser Zubereitungen sind in Tabelle 4-2 dargestellt. Es wird nun überprüft, ob die mit Hilfe der Algorithmen (Vorhersageformel) von jmp berechneten Stabilitäts- und Viskositätswerte mit denen der tatsächlich gemessenen Werte der Zubereitungen übereinstimmen.

Tabelle 4-2: Poloxamerzusammensetzung der Formulierung mit niedriger, mittlerer und hoher Viskosität

Formulierung mit	Poloxamer 407	Poloxamer 188	Poloxamer 124	Massenbezog. Mittelwert des Molekulargewichts
niedriger Viskosität	34,00 %	26,79 %	39,21 %	7330
mittlerer Viskosität	35,58 %	42,80 %	21,63 %	8508
hoher Viskosität	27,45 %	69,71 %	2,84 %	9409

Die Überprüfung der Vorhersageformel bezüglich der Stabilität zeigt sich in Abb. 37. Die Zubereitung mit niedriger Viskosität hat eine rechnerisch ermittelte Stabilität von 4,0 Tagen. Die in den Messungen experimentell ermittelte Stabilität liegt ebenfalls bei 4,0 Tagen. Die beiden Zubereitungen mit mittlerer und hoher Viskosität zeigen berechnete Werte von 9,1 und 12,9 Tagen und gemessene Werte von 8,3 und 12,3 Tagen. Es zeigt sich, dass die aus der Vorhersageformel generierte und die tatsächliche Stabilität gut übereinstimmen. Auch der aus der Vorhersageformel generierte Viskositätsparameter stimmt mit dem experimentell ermittelten Viskositätsparameter gut überein. Hier sind die rechnerisch ermittelten und experimentell gemessenen Viskositätswerte der niedrig viskosen Zubereitung bei 1,55 und 1,44, bei der Zubereitung mittlerer Viskosität 2,77 und 2,85 und bei der Zubereitung mit hoher Viskosität 3,83 und 3,89 (Abb. 38). Es lässt sich also belegen, dass die mit Hilfe der Software generierten Viskositäts- und Stabilitätswerte der Zubereitungen mit denen der experimentell ermittelten Werte gut übereinstimmen.

4. Ergebnisse und Diskussion

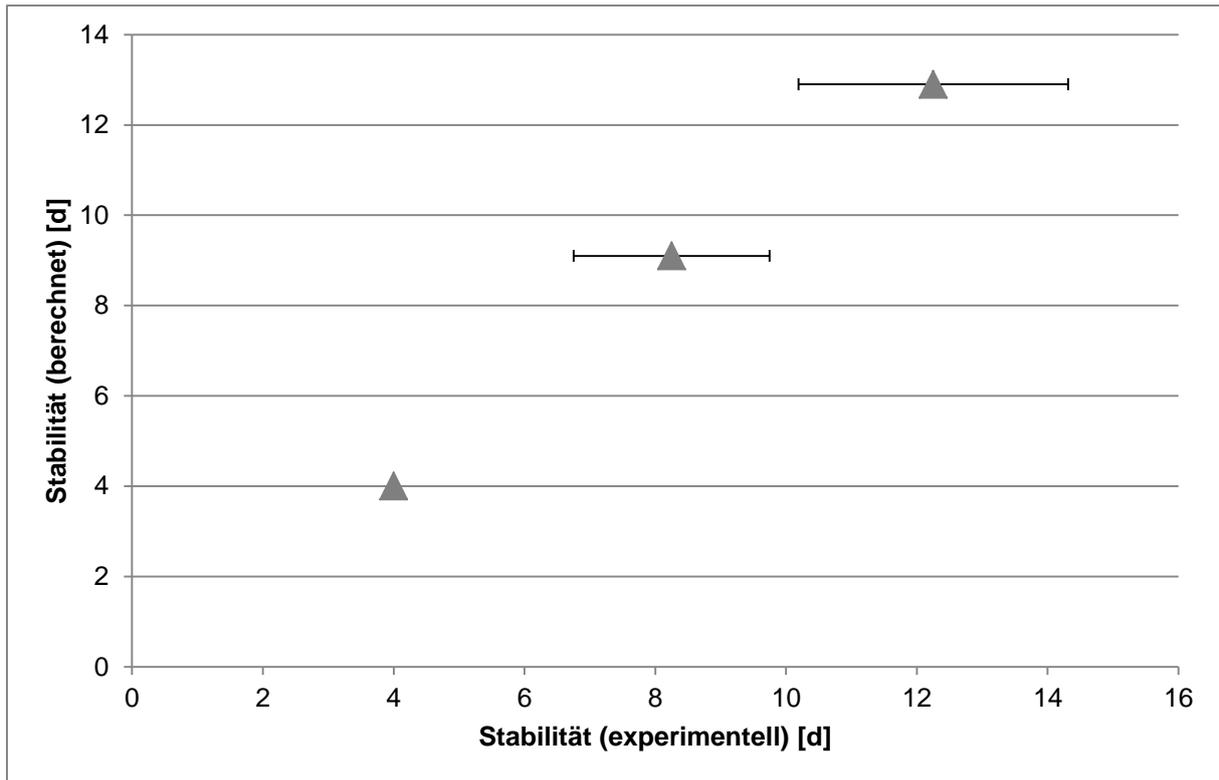


Abb. 37: Überprüfung der Vorhersageformel bezüglich der Stabilität

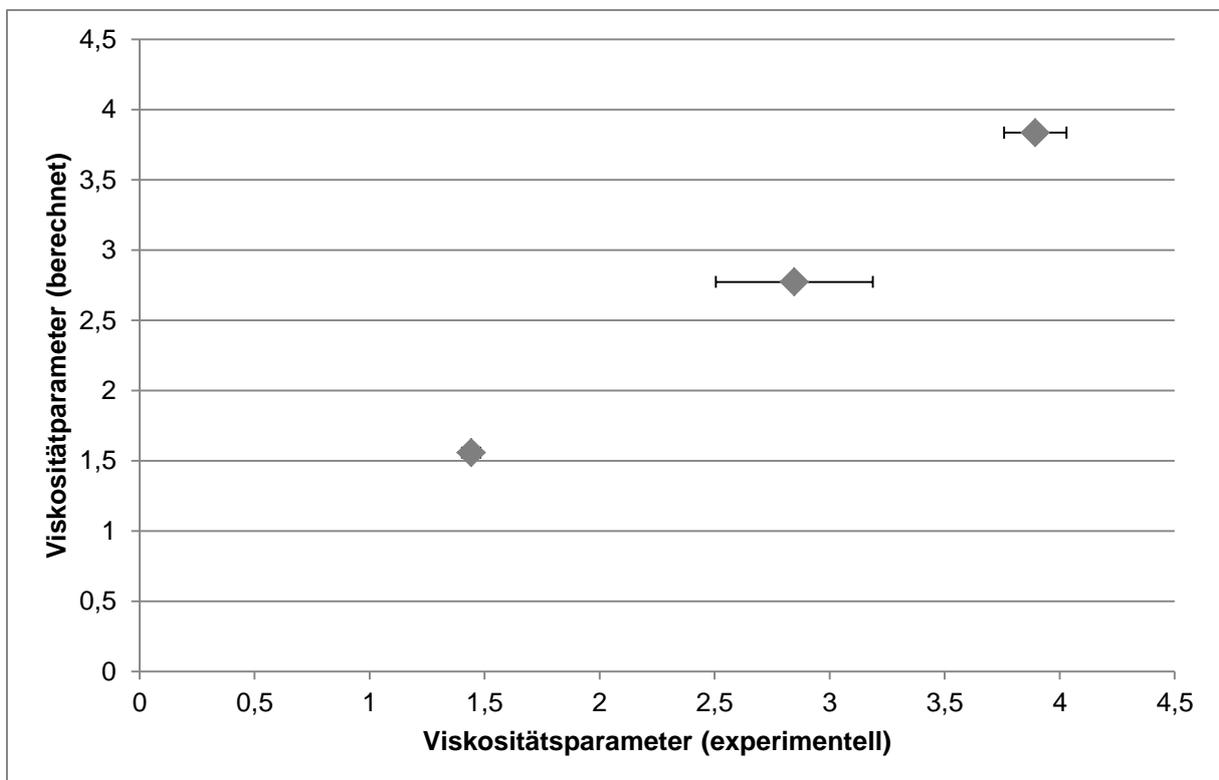


Abb. 38: Überprüfung der Vorhersageformel bezüglich der Viskosität

In den folgenden Untersuchungen werden diese drei PHIC Formulierungen mit niedriger, mittlerer und hoher Viskosität verwendet und deren Effekt auf die Homogenität bei Mischung mit PPeX untersucht.

4.2 Stabilität

4.2.1 Physikalische Stabilität von PPeX

4.2.1.1 Rheologische Untersuchungen

Um zu beurteilen, ob das Fließverhalten über die Zeit gleich bleibt oder ob sich im Laufe der Zeit Veränderungen zeigen, werden rheologische Messungen in einem Zeitraum von 12 Monaten durchgeführt. Dabei werden Messungen nach 1 Tag, nach 2 und 4 Wochen und nach 3,6,9 und 12 Monaten gewählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 39 (PPeD), Abb. 41 (PPE) und Abb. 43 (PPePr) dargestellt. Innerhalb einer Abbildung sind drei Diagramme dargestellt. Jedes Diagramm zeigt das rheologische Verhalten innerhalb einer Probe über den Messzeitraum.

PPeD

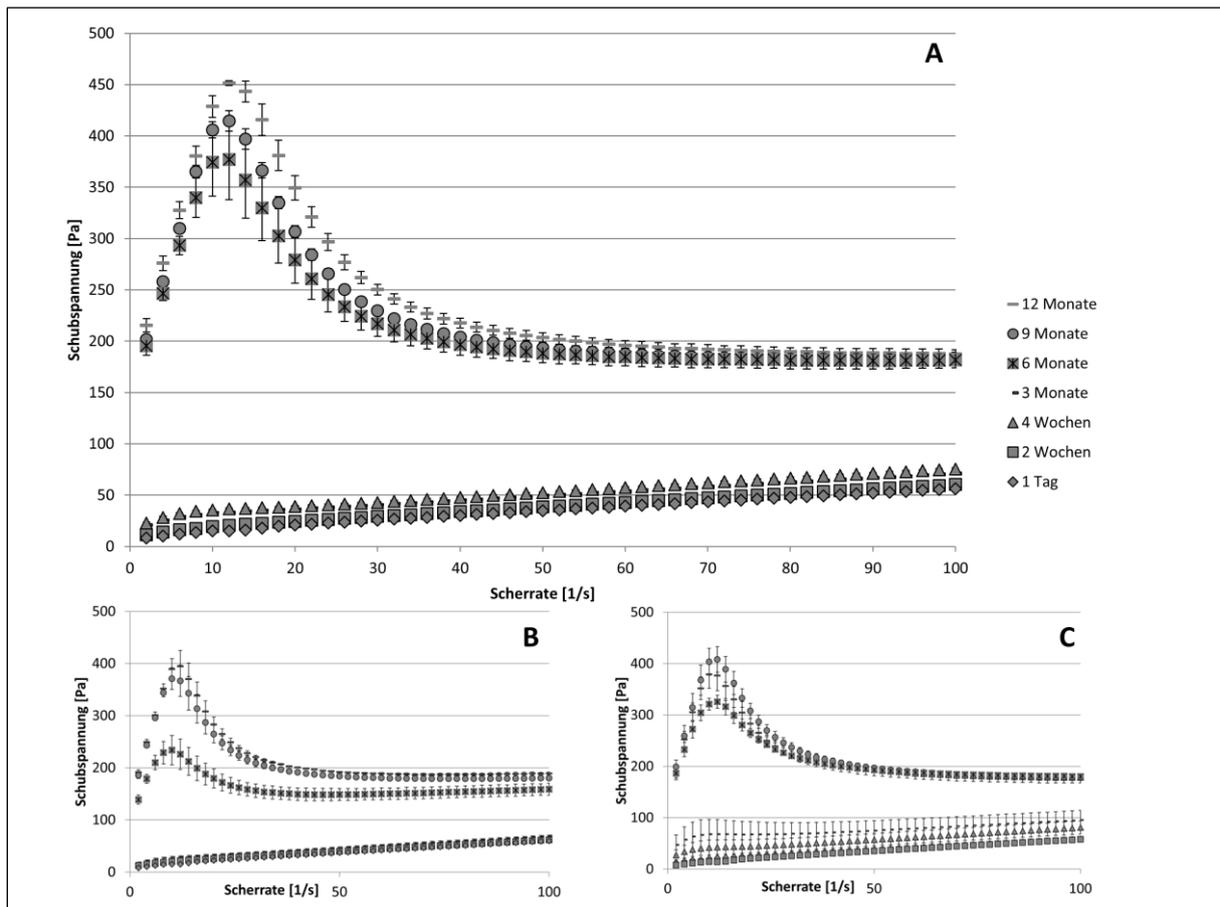


Abb. 39: Rheogramm der Lagerstabilität von PPeD über 12 Monate, Zubereitung A, B und C = unabhängige Experimente, $n = 3$, Fehlerbalken als Standardabweichung

Abb. 39 zeigt das Fließverhalten von PPeD über den Zeitraum von 12 Monaten. Nach der Herstellung zeigt sich das bereits beschriebene plastische Verhalten. Dieses bleibt über den Messzeitraum von 3 Monaten erhalten und zeigt nur kleine Anstiege der Messkurve. Nach

6 Monaten zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Fließgrenze und auch die Fließcharakteristik ändert sich. Bei niedrigen Scherraten zeigt sich anfänglich ein deutlicher Anstieg der Schubspannung, die mit steigenden Scherraten ein Maximum (bei ca. 12 1/s) erreicht, wieder abfällt und näherungsweise in einem Plateau endet.

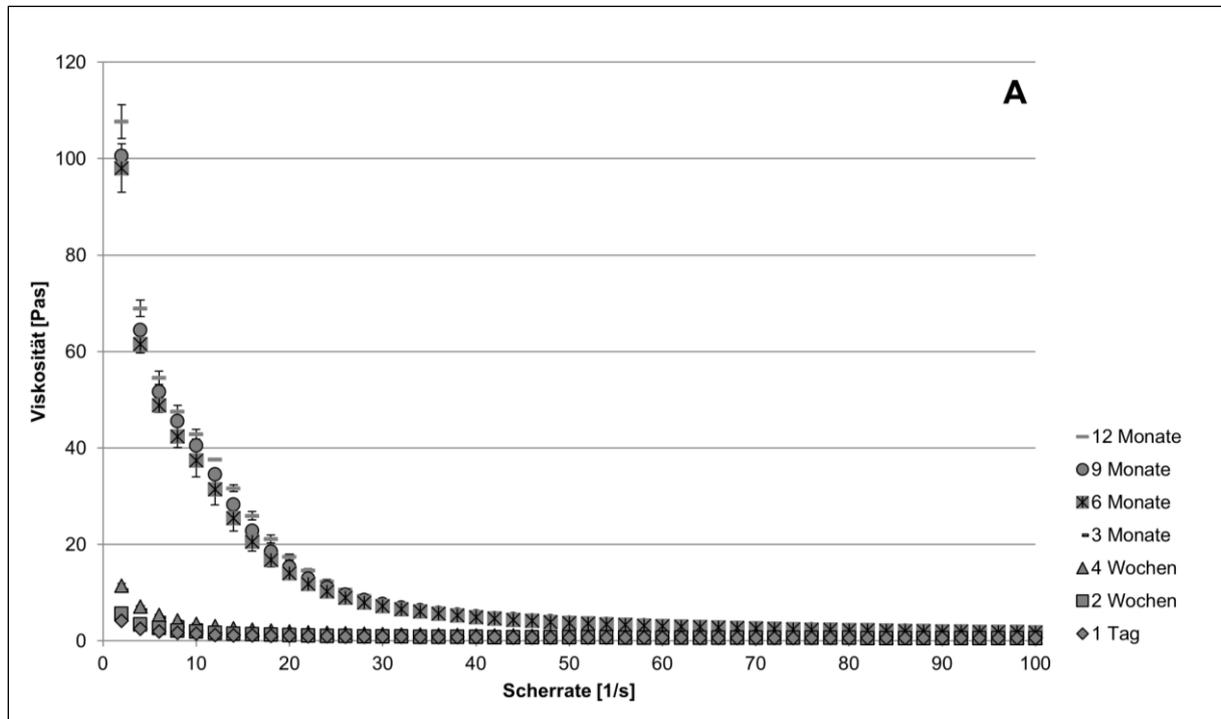


Abb. 40: Viskogramm der Lagerstabilität von PPeD über 12 Monate, Zubereitung A, n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung

Betrachtet man das Viskogramm der Zubereitung A (Abb. 40), zeigt sich, dass alle Systeme durchweg eine Scherverflüssigung aufweisen, die mit zunehmender Scherrate abnimmt. Es kommt zu einem scherbedingtem Abbau vernetzter Strukturen. Nach 6 Monaten Lagerung steigt die Viskosität der Proben deutlich an. Die Änderung der Fließcharakteristik ist hier auch zu erkennen. Die Scherverflüssigung ist im vorderen Teil des Schaubildes abnehmend. Im Bereich der Scherrate von 12 1/s kommt es zu einer zunehmenden Scherverflüssigung, die mit weiterer Steigerung der Scherrate wieder abnimmt. Aufgrund dieser Charakteristik kann man von einem Bruch des Systems während der Scherung ausgehen. Möglicherweise kommt es zum Austritt von Flüssigkeit aus der Zubereitung, die beim Auftreten zu einer nochmals stärkeren Scherverflüssigung führt, die dann langsam kleiner wird.

Makroskopisch gesehen zeigen die Zubereitungen mit der veränderten Fließcharakteristik Klumpenbildung bis hin zu einem teigigen Erscheinungsbild. Grund für dieses Verdickungsphänomen ist das enthaltene Dimethylisorbid. Dimethylisorbid gehört zu den Isosorbidethern. Diese lassen sich gut als Lösungsvermittler [Schweig et al., 2011] bzw. stabilisierende Lösungsmittel [Horstmann et al., 1997] in halb feste Formulierungen einarbeiten. Aller-

dings zeigen auch einige Isosorbisether verdickende Eigenschaften [Cognis / jetzt BASF Personal Care and Nutrition GmbH, 2006-2011]. Der Mechanismus dieser Verdickung ist in der Literatur nicht beschrieben. Bei PPeD werden diese verdickenden Eigenschaften nach 6 Monaten sichtbar. Dieses Phänomen der deutlichen Viskositätserhöhung mit einer deutlichen Änderung der Fließcharakteristik zeigt, dass sich die Struktur des Systems während der Lagerung verändert. Es kommt zu einer stärkeren Ausbildung des Gelgerüsts. Dies ist für die Verwendung nachteilig zu bewerten. Nur innerhalb der ersten drei Monate ist diese Formulierung tatsächlich im Zweikammersystem zur Anwendung zu bringen. Eine steigende Viskosität mit Inhomogenitäten macht das System für den dauerhaften Einsatz unbrauchbar.

PPe

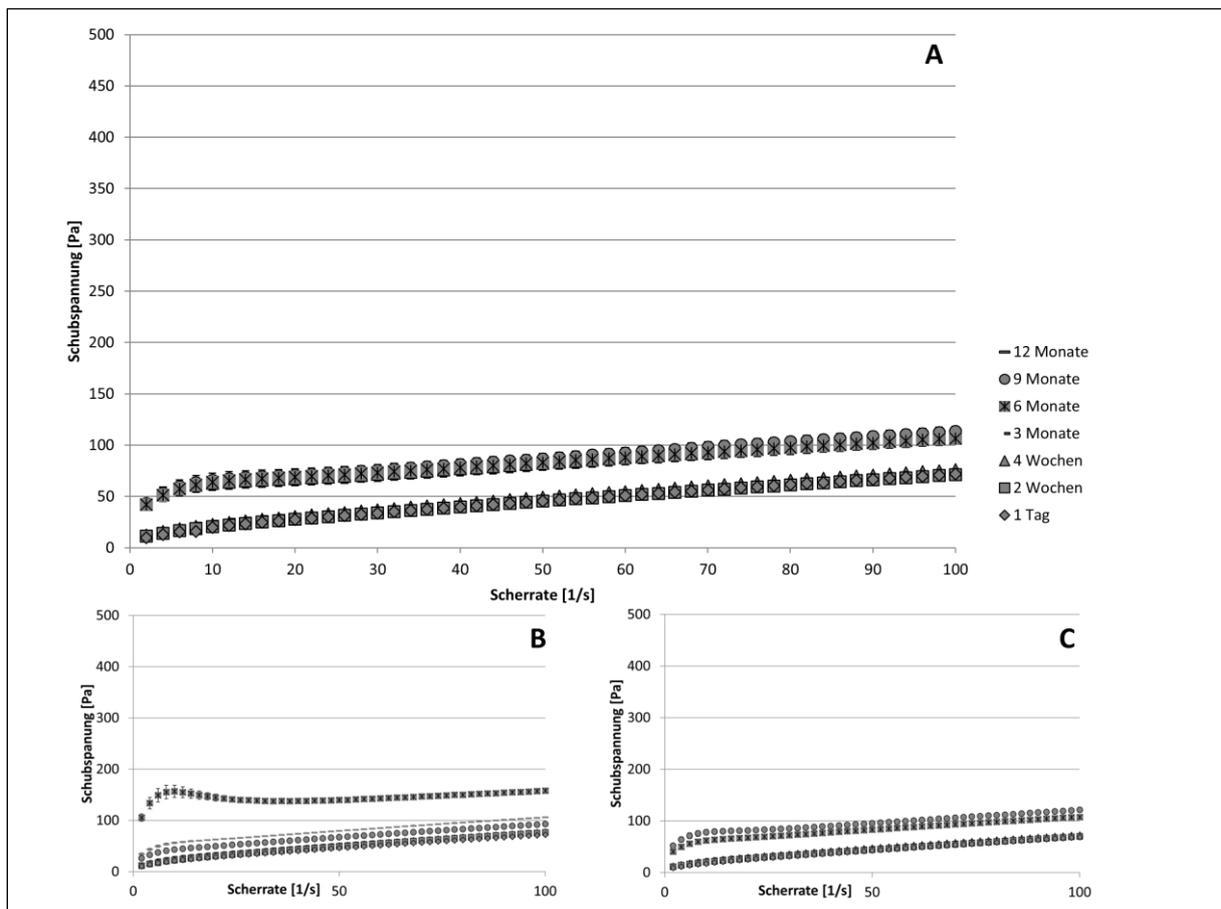


Abb. 41: Rheogramm der Lagerstabilität von PPe über 12 Monate, Zubereitung A, B und C = unabhängige Experimente, n = 3 Fehlerbalken als Standardabweichung

Das rheologische Verhalten von PPe über den Zeitraum von 12 Monaten ist in Abb. 41 dargestellt. Die Zubereitungen zeigen alle innerhalb der ersten 3 Monate plastisches Fließverhalten, das sehr konstant beibehalten wird. Ab 6 Monaten Lagerzeit kommt es zu einer leichten Erhöhung der Fließgrenze. Änderungen der Fließcharakteristika sind hier nicht zu erkennen. Die Viskosität steigt nur leicht (Abb. 42). Eine Ausnahme stellt der 6-Monatswert der

Zubereitung B dar. Während sich im Diagramm von Zubereitung B alle Messreihen über den Messzeitraum von 12 Monaten kaum verändern, zeigt die Messreihe nach 6 Monaten eine deutlichere Erhöhung der Fließgrenze, die Messkurve ist gestiegen und zeigt auch eine leichte Veränderung der Fließcharakteristik.

Zusammenfassend kann man allerdings festhalten, dass PPe über den Zeitraum von 12 Monaten nur eine kleine Erhöhung der Viskosität zeigt. Daher ist PPe für die Lagerung über 12 Monate PPeD deutlich zu bevorzugen.

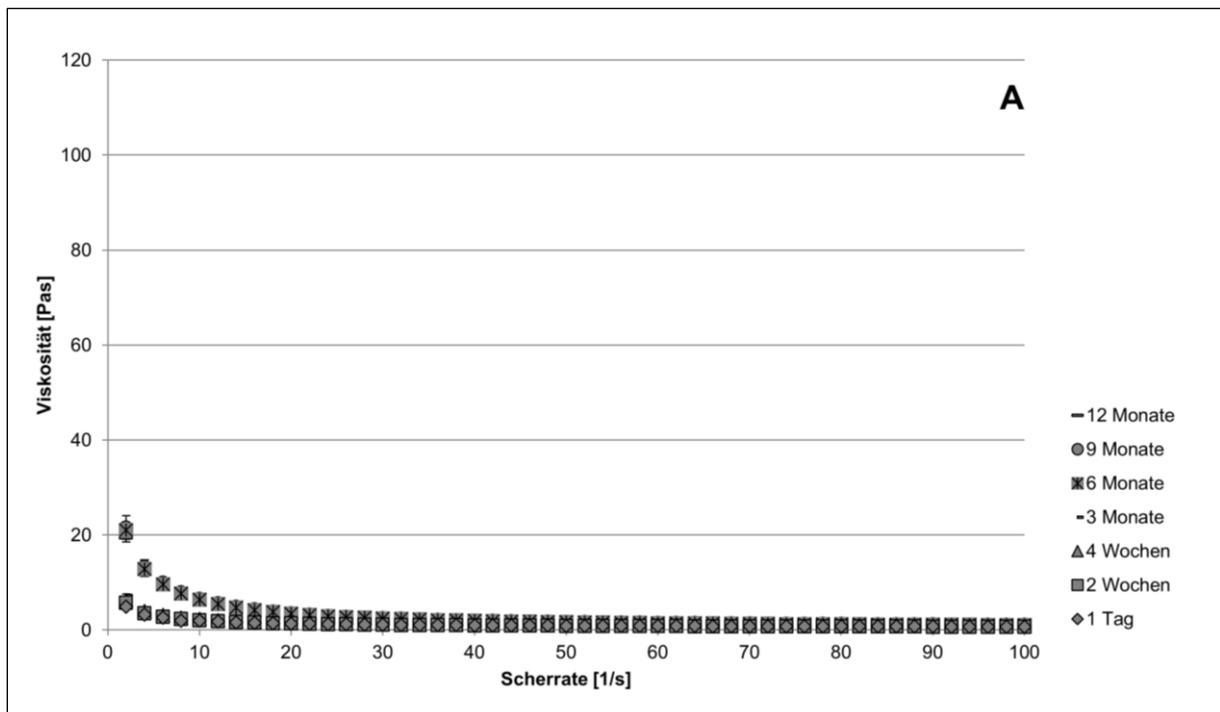


Abb. 42: Viskogramm der Lagerstabilität von PPe über 12 Monate, Zubereitung A, n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung

PPePr

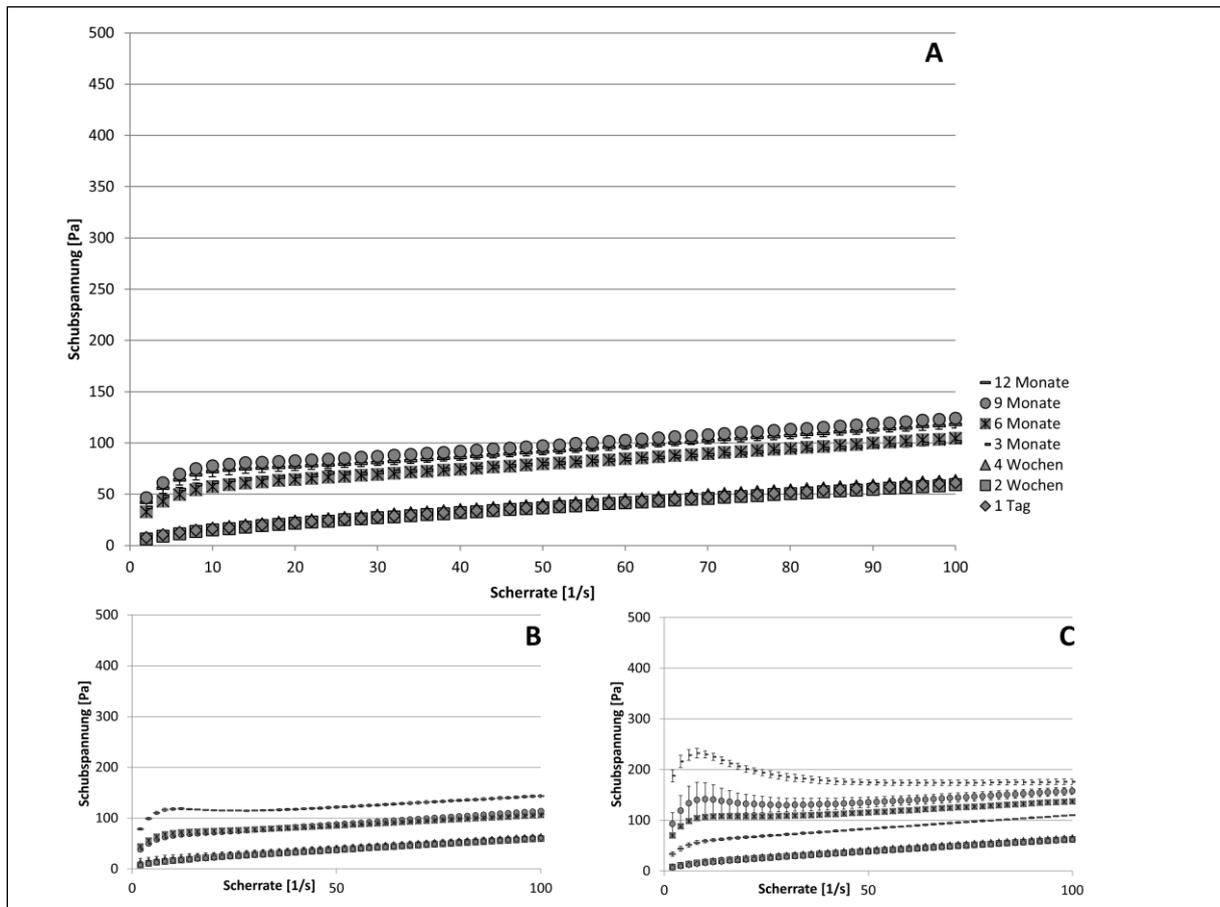


Abb. 43: Rheogramm der Lagerstabilität von PPePr über 12 Monate, Zubereitung A, B und C = unabhängige Experimente, n = 3 Fehlerbalken als Standardabweichung

Abb. 43 zeigt das rheologische Verhalten von PPePr im Zeitraum von 12 Monaten. Auch hier zeigt sich im Bereich der ersten 4 Wochen keinerlei Veränderung des plastischen Verhaltens. Allerdings zeigt sich bereits nach 3 Monaten ein leichter Anstieg der Messkurve, der sich innerhalb von 12 Monaten Lagerung nur noch gering erhöht. Auch eine Veränderung der Fließcharakteristik, wie dies bei PPeD zu beobachten ist, kann hier nur in wenigen Fällen und in geringerem Ausmaß beobachtet werden. Der 12-Monatswert der Formulierung B zeigt eine gewisse Veränderung der Fließcharakteristik. Das Diagramm der Formulierung C zeigt einen deutlich erhöhten 3-Monatswert mit veränderter Fließcharakteristik. Auch der 9-Monatswert zeigt hierzu Tendenzen, liegt aber deutlich unter dem 3-Monatswert. Insgesamt steigt die Viskosität über die Lagerzeit von 12 Monaten nur leicht an. Auch PPePr ist für die Lagerung deutlich besser geeignet als PPeD.

Betrachtet man die Lagerstabilitätswerte, so wird deutlich, dass PPeD aufgrund des enthaltenen Dimethylisobutids über die Lagerzeit von 12 Monaten sehr ungünstige Veränderungen der Rheologie zeigt. Innerhalb der ersten 3 Monate zeigen sich keine Veränderungen

des Rheogramms. Allerdings kommt es nach 6 Monaten zu einem deutlichen Anstieg der Viskosität mit einer Veränderung der Fließcharakteristik; das System zeigt Verdickung. Daher ist PPeD nicht für die Verwendung im Zweikammersystem über einen Zeitraum von 12 Monaten geeignet, da hierdurch die Auspresskräfte ansteigen können und die Pumpfähigkeit der Zubereitung gefährdet ist. PPe zeigt hier eine deutlich günstigere Prognose. Hier kommt es nach 6 Monaten Lagerung nur zu einer geringen Zunahme der Viskosität und es zeigt kaum Veränderungen der Fließcharakteristik. Auch PPePr zeigt sich PPeD deutlich überlegen. Hier kommt es nach 3 Monaten zu einem geringen Anstieg der Messkurve. Auch hier sind kaum Veränderungen der Fließcharakteristik über die Lagerung von 12 Monaten zu verzeichnen. PPe und PPePr zeigen ein ähnliches rheologisches Verhalten innerhalb von 12 Monaten. Daher sind beide Zubereitungen für die Verwendung im Zweikammersystem deutlich besser geeignet als dies bei PPeD der Fall ist.

4.2.1.2 Mikroskopisch und polarisationsmikroskopische Untersuchung

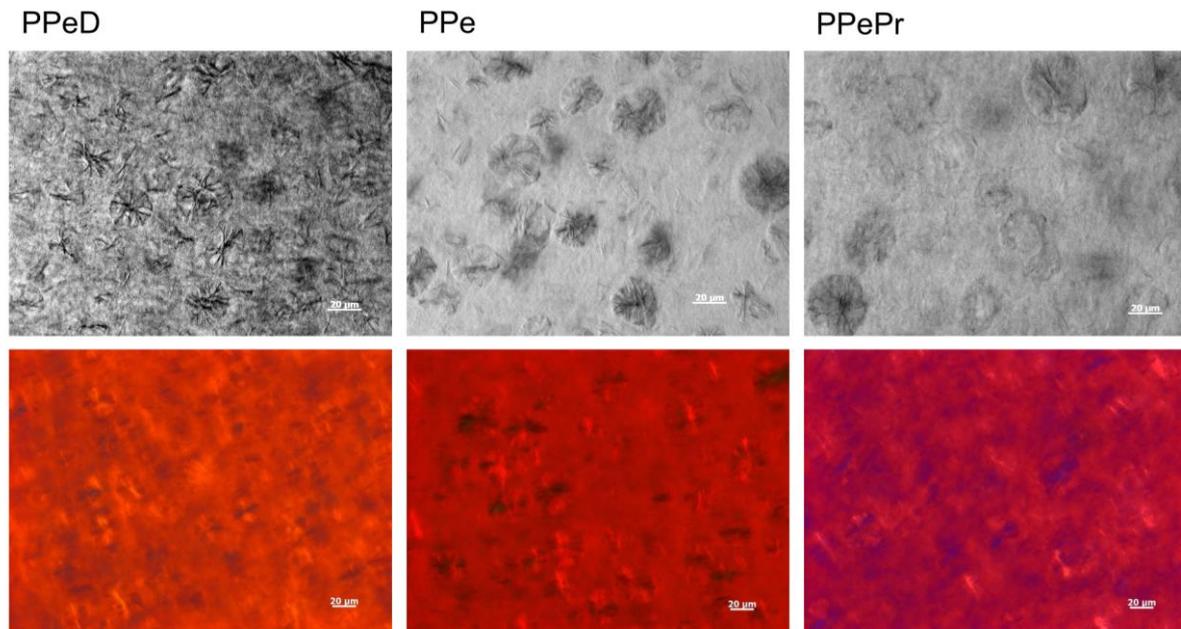


Abb. 44: Mikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen von PPeX nach 12 Monaten Lagerung

Betrachtet man die mikroskopischen Aufnahmen nach Lagerung der Zubereitungen PPeX von 12 Monaten (Abb. 44), so lassen sich keine Unterschiede zur Untersuchung der Zubereitungen 1 Tag nach der Herstellung feststellen (Abb. 31). Es sind nach wie vor Poloxamer-moleküle zu runden bzw. röhrenförmigen Strukturen zusammengelagert. Auch in den polarisationsmikroskopischen Aufnahmen lassen sich noch einige Texturen feststellen. Diese sind allerdings nicht mehr so ausgeprägt. Innerhalb der Lagerung muss es also zu einer Strukturveränderung kommen, die mit einer Verminderung der Anisotropie einhergeht. Ein Auskristallisieren von Poloxamer-molekülen müsste mit einer Verstärkung der Kristallinität und somit

mit einer stärkeren Anisotropie einhergehen. Da dies nicht der Fall ist, kann das Auskristallisieren von Poloxamer-molekülen ausgeschlossen werden. Möglicherweise kommt es im Laufe der Lagerung zu einer verstärkten Solvatation der Tensidaggregate, die die Abnahme der Texturausprägung erklärt.

4.2.1.3 Einfluss einer Rehomogenisierung

Da die Viskosität von PPe und PPePr während der Lagerung nur wenig zunimmt, wird mit Hilfe einer Rehomogenisierung untersucht, inwieweit eine einmalige Rehomogenisierung die Viskosität senken kann und wie sich die Viskosität nach diesem Vorgehen über die weitere Lagerzeit verändert. Hierfür werden Proben nach einer Lagerung von 6 Monaten mit einem Spatel solange homogenisiert, bis ein homogenes Aussehen resultiert. Diese Proben werden direkt nach der Rehomogenisierung sowie 2 und 4 Wochen und 3 und 6 Monate nach der Rehomogenisierung rheologisch, mikroskopisch und polarisationsmikroskopisch untersucht. Dies soll auch eine Abschätzung ermöglichen, inwieweit der Gebrauch des Zweikammersystems eine Scherung generiert, die die Viskosität beeinflusst. Es werden hier nun die Ergebnisse der Untersuchung von PPe vorgestellt.

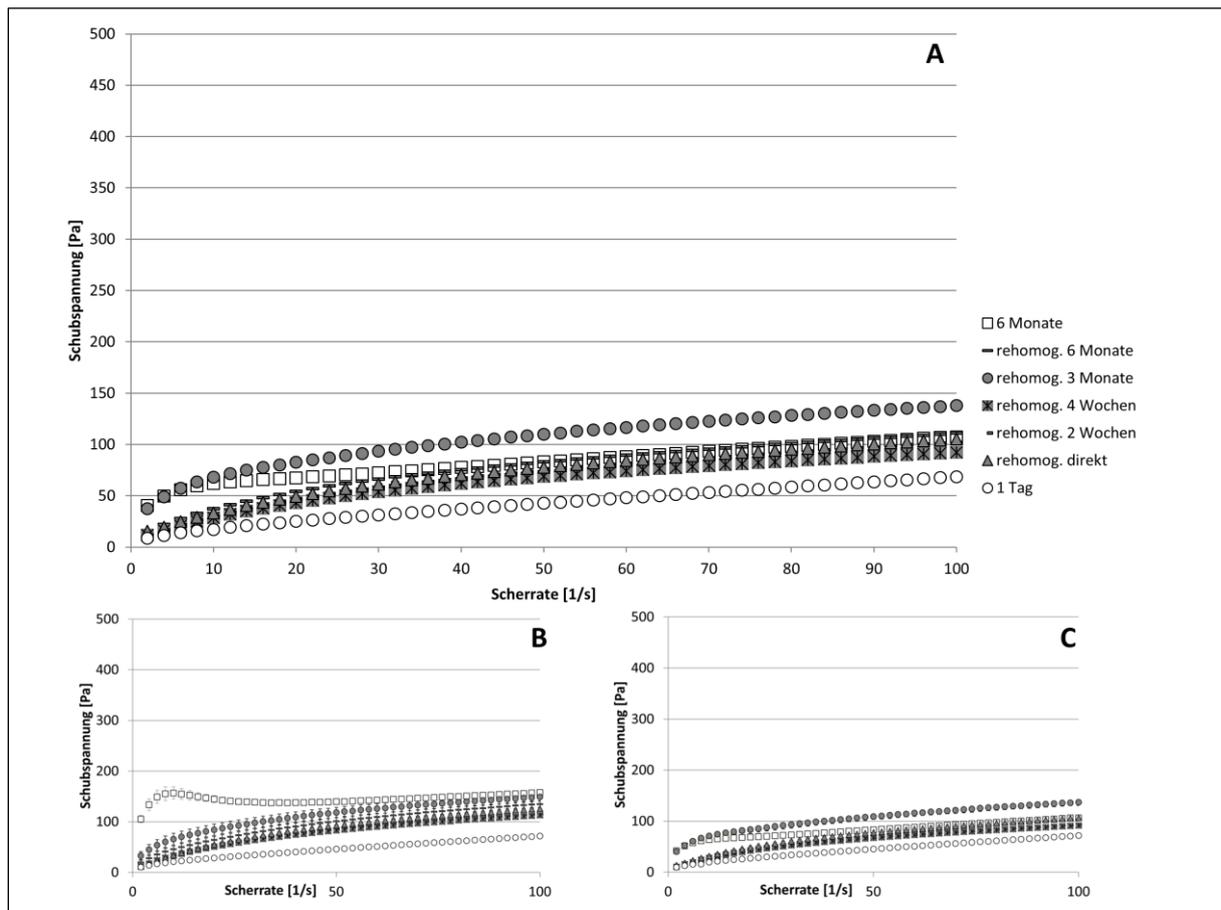


Abb. 45: Rheologische Untersuchung von PPe nach Herstellung, nach 6 Monaten Lagerung und nach Rehomogenisierung, Zubereitung A, B und C = unabhängige Experimente, n = 3 Fehlerbalken als Standardabweichung

In Abb. 45 sind alle drei Diagramme der Untersuchungen nach Rehomogenisierung von PPe dargestellt. Jedes Schaubild stellt den Rheologieverlauf einer Probe dar. Dabei sind in weiß jeweils die Messreihen der 1 Tages- und des 6-Monatsmesswertes dargestellt. Die ausgefüllten Symbole stellen die Werte direkt nach der Rehomogenisierung, nach 2 und 4 Wochen sowie nach 3 und 6 Monaten nach der Rehomogenisierung dar. In allen drei Diagrammen ist zu erkennen, dass die Rehomogenisierung die Fließgrenze unter die Fließgrenze des 6-Monatswerts senkt. Die Messkurven liegen aber alle höher als die des 1-Tagesmesswerts. Im weiteren Verlauf der Lagerung nach der Rehomogenisierung kommt es nach 3 Monaten wieder zu einem Anstieg der Fließgrenze. Bei Formulierung A und C steigen die Messkurven der Zubereitungen, die 3 Monate nach der Rehomogenisierung vermessen wurden, über die 6-Monatsmesskurve hinaus. Nur bei Formulierung B bleiben alle Messkurven auch 6 Monate nach der Rehomogenisierung zwischen der 1-Tages- und der 6-Monatsmesskurve.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine einmalige Rehomogenisierung die Fließgrenze der Zubereitungen senken kann. Es gelingt allerdings nicht, die Messkurve der Zubereitung grundsätzlich zu senken und die Messkurve der Zubereitung 1 Tag nach Herstellung zu erreichen. Die Struktur wird daher durch eine Rehomogenisierung nur geringfügig verändert und bleibt weitgehend erhalten. Auch mikroskopische und polarisationsmikroskopische Beobachtungen bestätigen diese Erkenntnis.

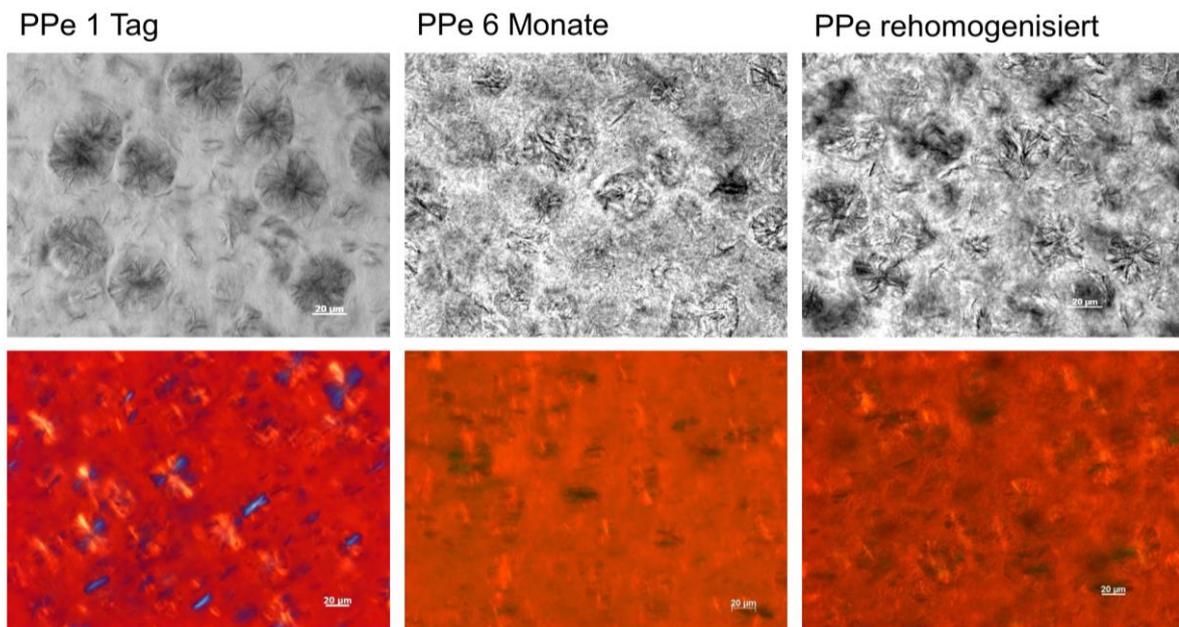


Abb. 46: Mikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen von PPe, Zubereitung nach Herstellung, nach 6 Monaten Lagerung und nach Rehomogenisierung

In Abb. 46 sind die mikroskopischen und polarisationsmikroskopischen Aufnahmen von PPe nach Herstellung, nach 6 Monaten Lagerung und direkt nach der Rehomogenisierung zu

erkennen. In den mikroskopischen Aufnahmen ist die Poloxamer-Aggregatsstruktur in allen Zubereitungen zu erkennen. Bei den polarisationsmikroskopischen Aufnahmen sind dagegen Unterschiede zu erkennen. Während die Zubereitung direkt nach der Herstellung sehr starke Texturen in Form von Malteserkreuzen zeigt, sind diese nach 6 Monaten nur noch schwach zu erkennen. Auch die Rehomogenisierung kann dieses Erscheinungsbild nicht revidieren. Die Struktur hat sich im Verlauf so verändert, dass eine einmalige Scherung nicht den Ausgangszustand wieder herstellen kann. Wie bereits in Kapitel 4.2.1.2 angesprochen, kommt es möglicherweise im Laufe der Lagerung zur vermehrten Solvatation der Poloxameraggregate, die durch die Rehomogenisierung nicht beeinflusst werden kann.

4.2.2 Chemische Stabilität von ALA in PPeX und Thermogel

Beim Abbau von ALA entstehen diverse Abbauprodukte. DHPY und PY zeigen eine Gelbfärbung. Bei PBG, das unter anaeroben Bedingungen gebildet wird, wird von einer roten Färbung ausgegangen. Die untersuchten Zubereitungen zeigen alle eine Gelbfärbung, was als Maß für das Anfallen der Abbauprodukte DHPY und PY verwendet wird. Für die Stabilitätsuntersuchungen von ALA in PPeX und Thermogel werden daher die Gelbfärbungen der Zubereitungen zur Bestimmung der Stabilität verwendet. Dafür wird ausgenutzt, dass bei einem weißen Bild der Zentralwert einen hohen Wert annimmt. Die Helligkeitswerte aller drei Farbkanäle Rot, Grün und Blau (RGB) sind gleich, sodass der Zentralwert diesen Wert annimmt. Dieser liegt bei einem ideal-weißen Bild bei 255, der oberen Grenze des Histogramms. Ein gelbes Bild ist durch das Absinken des Helligkeitswerts im Farbkanal Blau und auch im Farbkanal Grün gekennzeichnet. Dadurch sinkt der Zentralwert eines gelben Bildes im Vergleich zu einem weißen Bild. Für die Untersuchung werden die gelagerten Zubereitungen mit ALA und jeweils die Zubereitung ohne ALA vermessen. Bei Eintreten der Gelbfärbung sinkt der Zentralwert im Vergleich zur weißen „Leerformulierung“ ab. Die Differenz aus Nullwert und Messwert wird berechnet und aufgetragen. Ein hoher Wert steht für ein hohes Maß an Abbauprodukten.

In dieser Arbeit wurden auch HPLC-analytische Untersuchungen durchgeführt. Dabei zeigte sich ein Störpeak durch ein nicht identifiziertes Abbauprodukt. Daher konnte die Stabilität von ALA in Thermogel nicht gemessen werden. Und auch bei der Untersuchung von PPeX zeigten sich beim 9-Monatswert Störpeaks. Hier kommt es beim 9-Monatswert zu einem gestiegenen ALA-Wert. Daraufhin wurde die Untersuchung abgebrochen und verworfen. Die Untersuchung der Stabilität von ALA stellt aufgrund der verschiedenen Abbauprodukte und -wege, die sich je System unterscheiden können, grundsätzlich eine Herausforderung dar [Butler et al., 1992]. Auch von der Arbeitsgruppe in Braunschweig, die das Thermogel entwickelt hat und 2007 vorstellte, sind keine belastbaren Stabilitätsdaten von ALA im Thermogel publiziert.

Abb. 47 zeigt, wie beschrieben, die Differenz der Zentralwerte von Leerwert und 2 %igen Zubereitungen, die 4 Wochen bei 5, 25 und 40 °C gelagert werden. Bei PPe, PPePr und Thermogel lässt sich erkennen, dass mit steigender Lagertemperatur die Werte ansteigen. Das bedeutet, dass, wie in der Literatur beschrieben, mit steigender Lagertemperatur die Abbaureaktion schneller abläuft und somit mehr Abbauprodukte anfallen [McCarron et al., 2005]. Bei PPeD kann hier kein Trend gesehen werden. Die Werte sind sehr klein und schwanken um den Wert 0. Vergleicht man die verschiedenen Zubereitungen, so ist zwischen den Zubereitungen, die bei 5 °C gelagert wurden, noch kein Unterschied zu erkennen. Die bei 25 °C gelagerten Proben zeigen bereits einen leichten Trend in aufsteigender Rei-

henfolge: PPeD, PPe, PPePr und Thermogel. Verdeutlicht wird dies nochmals durch die Ergebnisse der Proben, die bei 40 °C gelagert werden. PPe zeigt mit einem Wert von 3,7 schon einen deutlichen Anstieg der Gelbfärbung, gefolgt von PPePr mit einem Wert von 9,3. Der deutlichste Anstieg ist beim Thermogel zu sehen. Hier zeigt ein Wert von 35,0 einen massiven Anstieg der Gelbfärbung, die mit dem Anstieg an Abbauprodukten gleichzusetzen ist. Bei PPeD ist noch kein großer Unterschied zur Leerkontrolle zu messen. Es zeigt sich hier sogar ein negativer Wert. Zusammenfassend lässt sich bereits nach 4 Wochen Lagerung zeigen, dass ALA den geringsten Hinweis auf Stabilität im Thermogel aufweist. PPeD zeigt den geringsten Wert und damit die beste Stabilität, gefolgt von PPe und PPePr. Damit zeigt sich bereits, dass PPe und PPeD die Zubereitungen sind, die die höchste Stabilität für ALA erwarten lassen.

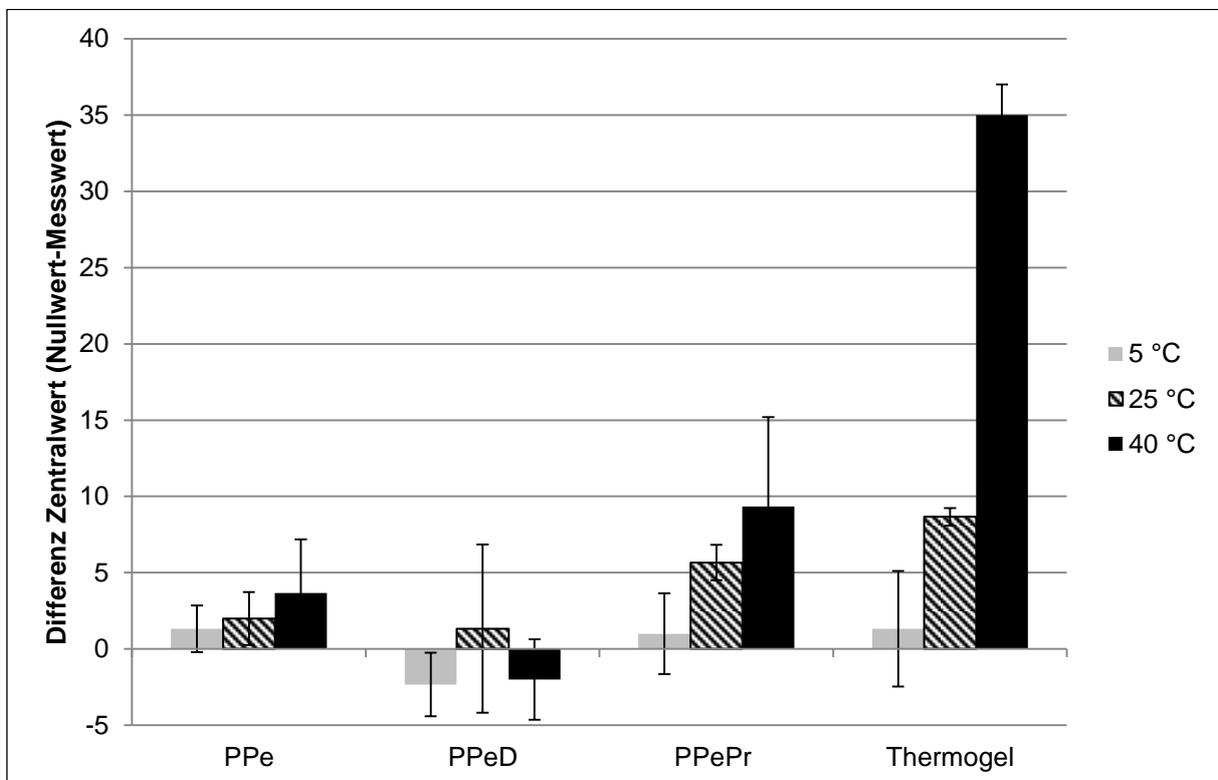


Abb. 47: Stabilitätsmessung: Differenz des Zentralwerts von Nullwert und Messwert von ALA in PPeX und Thermogel nach 4 Wochen bei Lagertemperaturen von 5, 25 und 40 °C; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung

Die gezeigten Ergebnisse werden noch verdeutlicht, wenn man die Ergebnisse in Abb. 48 und Abb. 49 betrachtet. Hier werden PPeX 13 Monate bei 25 °C gelagert. Thermogel wird hingegen nur 7 Monate ebenfalls bei 25 °C gelagert. Makroskopisch ist eine starke Gelbfärbung des Thermogels zu erkennen (Abb. 48). Bei PPe ist keine Gelbfärbung, bei PPeD nur eine leichte und bei PPePr eine deutliche Gelbfärbung zu sehen. Dies bestätigen auch die Zentralwertmessungen in Abb. 49. Thermogel zeigt nach nur 7 Monaten den höchsten Wert und damit den höchsten Gehalt an Abbauprodukten. Die Werte von PPeX sind, obwohl sie

13 Monate gelagert wurden, deutlich geringer als die des Thermogels. Unter den drei PPeX-Formulierungen zeigt PPe wieder einen kleinen Wert, während PPePr ein signifikant höheres Ergebnis zeigt. PPeD ist zwischen PPe und PPePr einzuordnen, welches allerdings nicht signifikant ist.

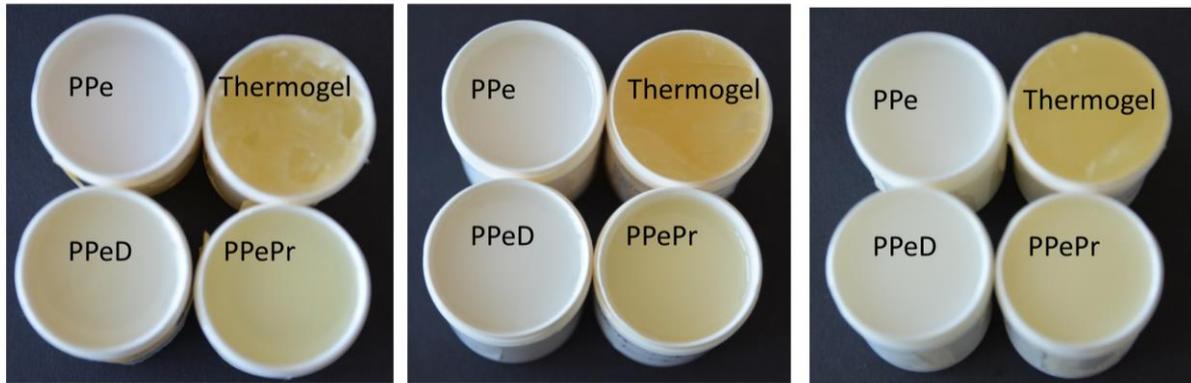


Abb. 48: Gelbfärbung der Zubereitungen PPeX und Thermogel mit ALA nach Lagerung bei 25 °C nach 13 Monaten (PPeX) und 7 Monaten (Thermogel) Lagerung

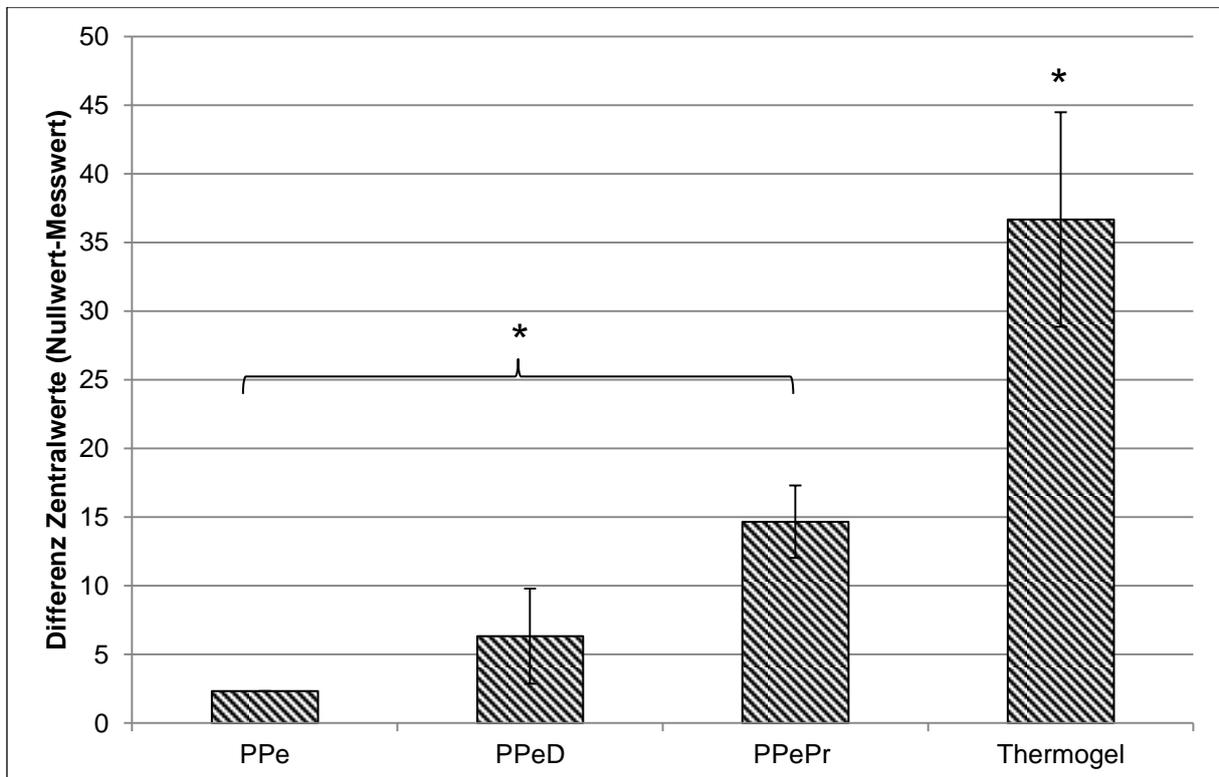


Abb. 49: Stabilitätsmessung: Differenz des Zentralwerts von Nullwert und Messwert von ALA in PPeX und Thermogel nach 13 Monaten (PPeX) und 7 Monaten (Thermogel) Lagerzeit bei 25 °C; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung, * Statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PPeX als Vehikel für die Stabilität von ALA deutlich vorteilhafter erscheint. Die in nicht-wässrigen Vehikeln beschriebene vorkommende Enolform von ALA [Gander et al., 2003] zeigt auch hier eine Stabilisierung und verlangsamte Dimerisierung und damit einen langsameren Abbau von ALA. Die Lagerung in einem nicht-wässrigen System hat einen positiven Einfluss auf die Wirkstoffstabilität. Thermogel zeigt bereits nach 4 Wochen Lagerung bei 40 °C einen deutlichen Anstieg an gelb gefärbten Abbauprodukten, was auf den enthaltenen Anteil an Wasser in der Formulierung zurückzuführen ist. Dadurch liegt das Anion von ALA im Thermogel vor, welches eine schnellere Dimerisierung zeigt als die in PPeX vorkommende Enolform. Damit ist die Stabilität von ALA im Thermogel der in PPeX unterlegen. Betrachtet man die verschiedenen PPeX-Formulierungen, so zeigt PPePr die deutlichste Instabilität. Auch PPeD zeigt eine stärkere Gelbfärbung als PPe. Daraus kann man schließen, dass der Gehalt von 10 % Propylenglykol und 10 % Dimethylisoborbid die Stabilität des Wirkstoffs im System PPe verschlechtert. Die Untersuchungen zeigen daher, dass PPe die beste Formulierung für die Stabilität von ALA darstellt.

Aus den präsentierten Ergebnissen lassen sich keine quantitativen Aussagen ableiten. Betrachtet man die verworfenen HPLC-Untersuchungen, können diese allerdings zur Abschätzung der Stabilität von ALA in den beschriebenen Systemen dienen (Abb. 50). Während der ersten 6 Monate Lagerzeit zeigt das Diagramm von ALA in PPeX eine Kinetik nullter Ordnung. Bei Reaktionen nullter Ordnung ist die Reaktion abhängig von einer Komponente. In diesem Fall könnte dies Sauerstoff sein, da der Grad der Oxygenierung nicht beeinflusst wurde. Der Grad der Oxygenierung begünstigt den Abbau von ALA, da Sauerstoff für die Oxidation von DHPY zu PY verantwortlich ist. Damit stellt die Oxidation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbaus dar. Ab dem 9-Monatsmesswert könnten relevante Mengen am störenden Abbauprodukt anfallen und die Analytik stören. Man kann daher abschätzen, dass in einem Lagerzeitraum von 6 Monaten noch etwa 60 % der ursprünglichen Menge von ALA vorhanden sind.

Prinzipiell ist eine Aufklärung der Abbauprodukte im jeweiligen System notwendig, um die Stabilität entsprechend zu untersuchen. Zudem ist der Vergleich der Stabilitäten von ALA in PPeX und in Thermogel nur unter der Voraussetzung möglich, dass die gleichen Abbauprodukte anfallen. Der Grad der Oxygenierung wurde in allen Zubereitungen nicht beeinflusst. Es liegt also in allen Zubereitungen Sauerstoff für die Oxidation von DHPY zu PY vor. Alle Zubereitungen zeigen daher auch eine Gelbfärbung.

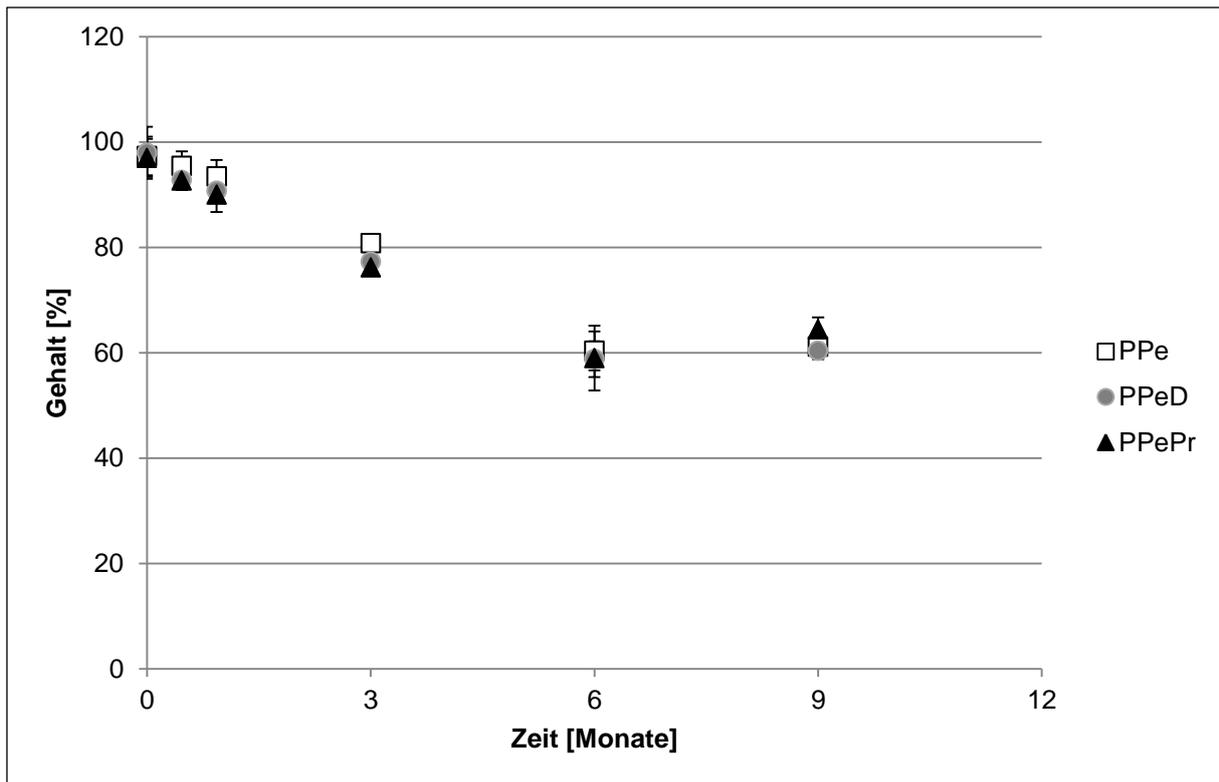


Abb. 50: HPLC-analytische Untersuchung der Stabilität von ALA in PPeX und Thermogel; n = 3; Fehlerbalken als Standardabweichung

4.3 Untersuchung der Homogenität bei Mischung mit dem Mikromischer

Die Homogenität bei Mischung von PPe mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität wird mittels zwei unterschiedlicher Methoden untersucht. Bei der Überprüfung der Farbhomogenität werden die Zubereitungen gelb bzw. blau eingefärbt. Über Aufnahmen der Mischbilder sowie Negativ- und Positivkontrolle wird die Mischungsgüte über die Auswertung der Helligkeitswerte an definierten Punkten einer Probe berechnet. Bei der Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit werden die Zubereitungen nicht eingefärbt. PPe enthält hingegen den Wirkstoff. Für die Untersuchung wird eine Mischungsprobe in 3 Analysenproben unterteilt, der Gehalt des Wirkstoffes in den Analysenproben analysiert und daraus die Mischungsgüte ermittelt.

4.3.1 Überprüfung der Farbhomogenität

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Homogenität bei Mischung von PPe mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität mittels Überprüfung der Farbhomogenität dargestellt.

4.3.1.1 Rheologie und Auspresskräfte

Da bei der Mischung von PPe und PHIC durch den Mikromischer die Zubereitungen durch den Mikromischer gefördert werden und fließen, kommt der Untersuchung der Viskosität der Zubereitung wichtige Bedeutung zu. Daher werden die Komponenten PPe und PHIC sowie eine homogene Mischung aus PPe + PHIC (1+1) rheologisch vermessen. Dies gibt Aufschluss darüber, ob die zu mischenden Komponenten ähnliche Fließeigenschaften aufweisen und wie die Fließeigenschaften der Mischungen sind. So kann der Mischprozess besser verstanden werden.

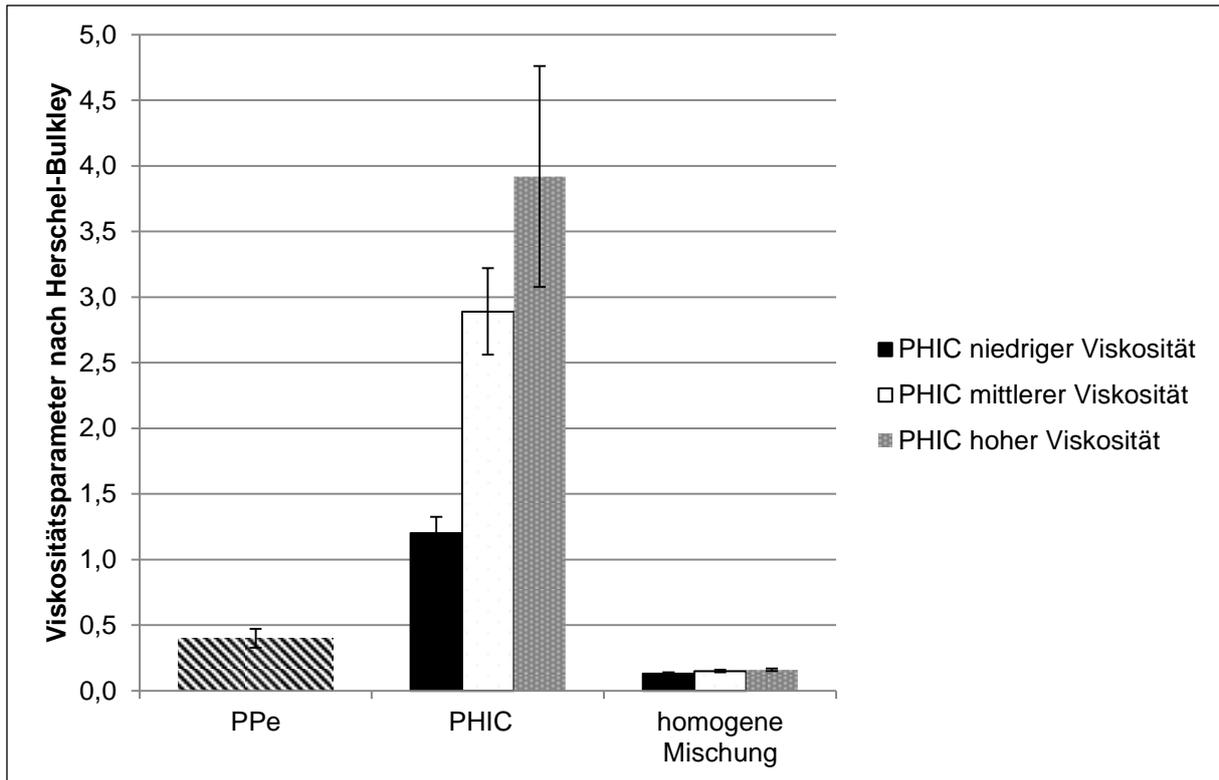


Abb. 51: Viskositätsparameter nach Herschel-Bulkley von PPe, PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und der homogenen Mischung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; n = 3 - 6, Fehlerbalken als Standardabweichung

Die Ergebnisse der rheologischen Untersuchung sind in Abb. 51 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Viskositäten der PHIC-Zubereitungen in der erwarteten Reihenfolge ansteigen. Die Viskosität von PPe liegt deutlich unter den Viskositäten von PHIC. Die Viskositäten der homogenen Mischung liegen nochmals tiefer. Dies bedeutet, dass beim Mischen von PPe mit PHIC die Viskosität der Mischung sinkt. Dies liegt daran, dass sich die Gelstruktur von PPe bzw. die Cremestruktur von PHIC beim Mischen auflöst.

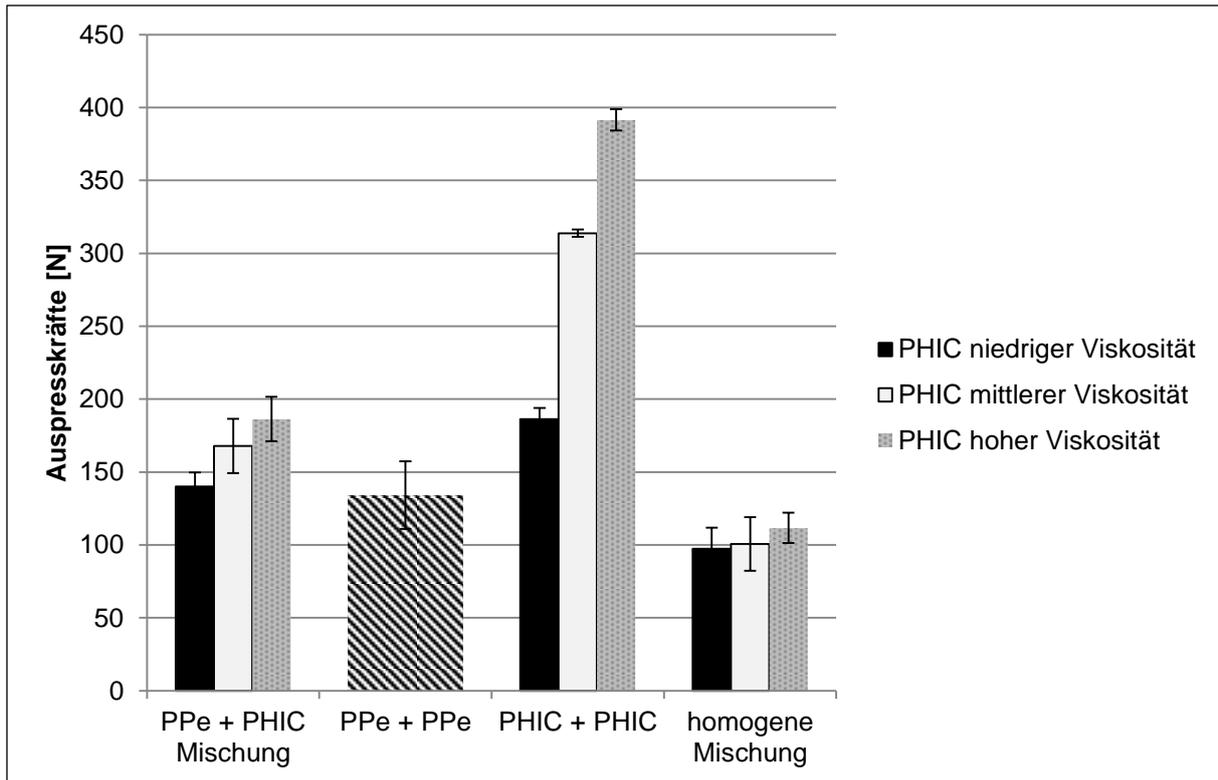


Abb. 52: Auspresskräfte der Mischung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität sowie der Einzelkomponenten PPe (PPe + PPe), PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (PHIC + PHIC) und der homogenen Mischung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (Mischung + Mischung); $n = 3$, Fehlerbalken als Standardabweichung

Zum Mischen von PPe mit PHIC mittels Mikromischer werden diese mit konstanter Geschwindigkeit gefördert. Dafür werden die Zubereitungen nach der Herstellung jeweils in eine Spritze gefüllt. Je eine Spritze gefüllt mit PPe- und PHIC-Zubereitung werden mittels Luerlok-Aufsatz auf den Mikromischer aufgeschraubt. Die Vorrichtung wird gemäß Kapitel 3.2.5.1 am Materialtester Zwick befestigt. Dessen Messarm fährt nach unten und befördert die Spritzenkolben und damit die Zubereitungen durch den Mikromischer. Die gemischte Zubereitung wird extrudiert und die Auspresskraft dabei ermittelt. Um den Einfluss der verschiedenen Komponenten zu ermitteln, werden neben den Auspresskräften der Mischung PPe + PHIC zusätzlich die Auspresskräfte der Einzelkomponenten PPe und PHIC jeweils niedriger, mittlerer und hoher Viskosität bestimmt. Dafür werden durch beide Zuführgänge die gleichen Zubereitungen zugeführt, also PPe und PPe bzw. PHIC und PHIC. Darüber hinaus werden die Auspresskräfte von zuvor homogenisierten Mischungen von PPe + PHIC niedriger, mittlerer bzw. hoher Viskosität (1+1) bestimmt (homogene Mischung und homogene Mischung). Die Ergebnisse sind in Abb. 52 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Auspresskräfte der Einzelkomponenten PHIC von PHIC niedriger Viskosität bis PHIC hoher Viskosität ansteigen. Die benötigte Auspresskraft der Einzelkomponente PPe liegt unter den Auspresskräften der PHIC-Zubereitungen. Die Auspresskräfte der homogenen Mischungen sind am niedrigs-

ten. Es zeigt sich, dass die Auspresskräfte und die ermittelten Viskositäten die gleiche Tendenz aufweisen. Hat eine Zubereitung eine hohe Viskosität, so steht dem Fließvorgang ein hoher innerer Widerstand entgegen. Um diese Zubereitung durch den Mikromischer zu fördern, ist daher eine höhere Auspresskraft notwendig, da der innere Widerstand überwunden werden muss. Bei niedrigviskoserer Zubereitungen ist der innere Widerstand, der dem Fließen entgegengesetzt wird, niedriger. Daher ist für das Fördern durch den Mikromischer auch eine geringere Auspresskraft notwendig. Betrachtet man die Auspresskräfte der Mischungen PPe + PHIC zeigen sich entsprechend der PHIC-Zubereitungen steigende Auspresskräfte von PPe + PHIC niedriger Viskosität zu PPe + PHIC hoher Viskosität. Diese Auspresskräfte liegen jeweils zwischen der Auspresskraft von PPe und dem entsprechenden PHIC. Wie die resultierenden Auspresskräfte bei der Mischung von PPe und PHIC zustande kommen, wird in Kapitel 4.3.1.3 näher beleuchtet.

4.3.1.2 Homogenitätsuntersuchungen

Für die Untersuchung der Homogenität mittels Überprüfung der Farbhomogenität werden die Mischungen, die durch den Mikromischer gemischt werden, die jeweiligen Einzelkomponenten PPe (gelb eingefärbt), PHIC (blau eingefärbt) und einer homogene Mischung aus PPe + PHIC (1+1), die als Positivkontrolle dienen, fotografiert und ausgewertet. Außerdem werden Aufnahmen zweier ungemischter parallel liegender Stränge ermittelt. Diese dienen als Negativkontrolle bei der Bildauswertung.

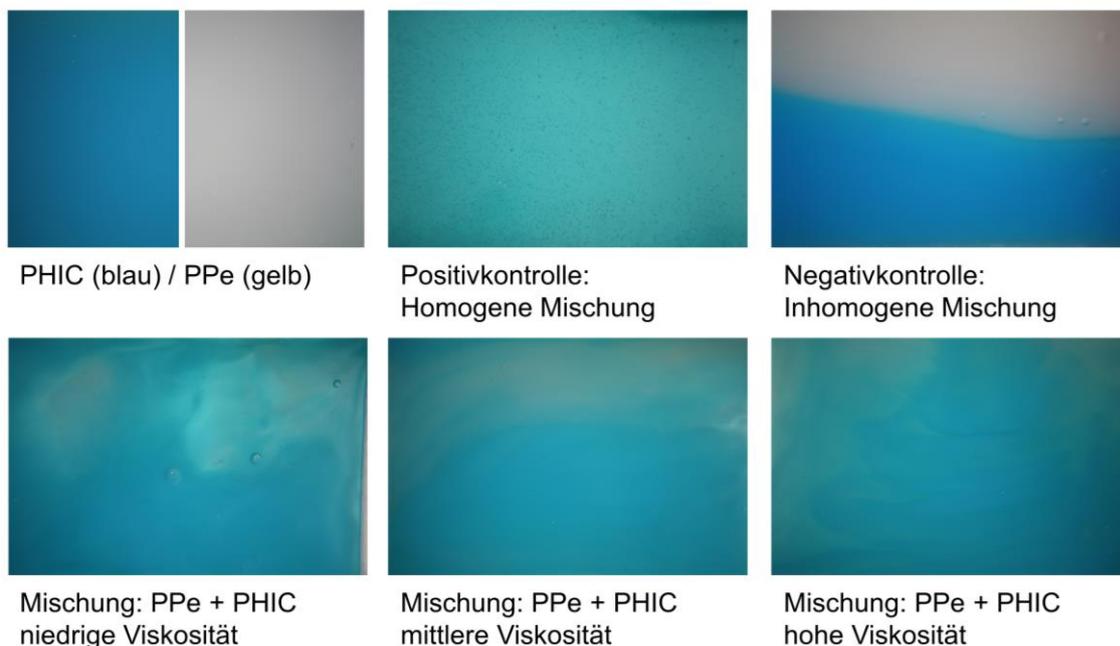


Abb. 53: aufgenommene Bilder der Homogenitätsuntersuchung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität mittels Farbhomogenität, Positiv- und Negativkontrolle

Abb. 53 zeigt von den Mischungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität, die mittels Mikromischer gemischt werden, jeweils eine Aufnahme sowie die Positiv- und Negativkontrollen. Es ist zu sehen, dass die Mischung PPe + PHIC niedriger Viskosität kein völlig homogenes Erscheinungsbild zeigt. Man sieht bereits in weiten Teilen die grüne Mischfarbe, die entsteht, wenn PPe (gelb) und PHIC (blau) gemischt werden. Im oberen Teil des Bildes, vor allem in der rechten Ecke, ist deutlich zu erkennen, dass beide Komponenten nicht ideal gemischt wurden, sondern gelbe Inseln vorliegen. Bei den Mischungen PPe + PHIC mittlerer und hoher Viskosität ist der makroskopische Eindruck der Mischungsgüte schon deutlich besser. Optisch sind der grüne Farbeindruck der Mischfarbe sowie ein homogenerer Eindruck vorherrschend. Im oberen Teil ist noch das Vorhandensein von PPe als gelber Schleier zu erkennen, als Hinweis darauf, dass keine vollständige Homogenität vorliegt.

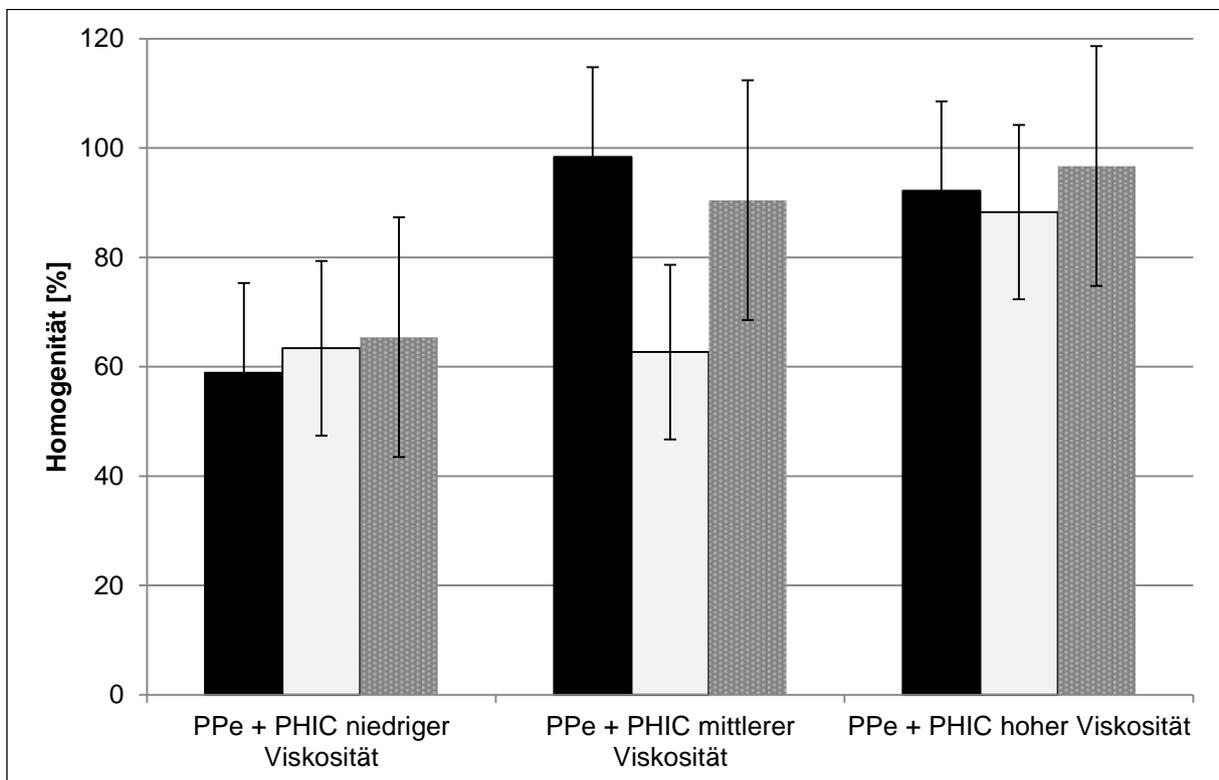


Abb. 54: Homogenitäten der Mischungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität mittels Überprüfung der Farbhomogenität: n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung; drei Balken stellen jeweils Ergebnisse unabhängiger Experimente dar

Abb. 54 gibt die dazugehörigen Homogenitätswerte der Bildauswertung wieder. Es ist zu sehen, dass die Ergebnisse aller drei Mischungsexperimente von PPe und PHIC niedriger Viskosität sehr einheitlich im Bereich um 60 % liegen. Diese Mischung weist im Durchschnitt eine Homogenität von 62,5 % auf. Bei der Mischung PPe + PHIC mittlerer Viskosität sind die Werte in den Mischungsexperimenten mit 98,4 %, 62,7 % und 90,5 % deutlich inhomogener, sodass die Homogenität im Durchschnitt bei 83,9 % liegt. Die Homogenität ist damit schon verbessert im Vergleich zu der Mischung PPe + PHIC niedriger Viskosität. Allerdings liefern

die Mischungsexperimente sehr uneinheitliche Ergebnisse. Im Mischungsbild liegen homogene und inhomogenere Bereiche vor. Je nach Bildaufnahme können hier homogene und inhomogenere Bereiche erfasst werden und ergeben daher eine mittlere Mischungsgüte. Bei der Mischung von PPe + PHIC hoher Viskosität ist die Homogenität weiter verbessert und schwankt mit Werten von 96,7 %, 88,3 % und 92,2 % nur wenig um den Durchschnittswert von 92,4 %. Damit liegt hier in allen vermessenen Bildflächen eine homogene Verteilung vor, sodass die Vermessung aller unabhängigen Experimente einheitlich sehr gute Homogenitätswerte liefert.

Tabelle 4-3: Differenz der Auspresskräfte der zu mischenden eingefärbten Einzelkomponenten

	PPe / PHIC niedrige Viskosität	PPe / PHIC mittlere Viskosität	PPe / PHIC hohe Viskosität
Δ Viskositätsparameter (PPe / PHIC) <small>Steigung des Rheogramms nach Linearisierung Herschel-Bulkley</small>	0,8	2,49	3,52
$\Delta F_{\text{Auspress}}$ (PPe / PHIC) [N]	52,1	179,7	257,4

Tabelle 4-3 zeigt die Differenz der Viskositäten sowie der Auspresskräfte der zu mischenden Einzelkomponenten. Dies legt nahe, dass die Homogenität der Mischungen steigt, je ungleicher die Viskositäten und Auspresskräfte der zu mischenden Komponenten sind. In der Literatur wird beschrieben, dass das Mischen von Fluiden unterschiedlicher Viskositäten schlechtere Mischergebnisse liefert, je höher die Unterschiede sind. Die zu mischenden Komponenten verändern die Fließgeschwindigkeiten. Die viskosere Flüssigkeit nimmt eine größere Querschnittsfläche ein und verdrängt die niedrigviskosere Flüssigkeit zu einem dünnen Strang. Die viskosere Flüssigkeit wird langsamer, die niedrigviskosere Flüssigkeit wird schneller. Dadurch entsteht ein Druckgleichgewicht in der Grenzfläche. Der Fluss ist stabil und die Mischungseffizienz gering, sofern der Fluss nicht destabilisiert wird [Liu et al., 2004, Xia et al., 2010]. Ein schlechteres Mischungsergebnis bei größeren Unterschieden in der Viskosität kann hier allerdings nicht bestätigt werden.

Beim vorliegenden Mischungsexperiment liegen die zu mischenden Komponenten jeweils in einer Spritze vor. Beide Spritzenkolben werden vom Materialtester Zwick mit konstanter Geschwindigkeit gefördert. Die Kanalführung im Mikromischer ist in Abb. 55 zu sehen. Rechts und links erfolgt die Zufuhr der Komponenten, die bis zum Beginn des Mischkanals separat gefördert werden. Mit Beginn des Mischkanals treffen die Komponenten aufeinander und werden gemeinsam gefördert und gemischt. Werden PPe und PHIC miteinander vermischt,

so kommt es zum Auflösen beider Komponenten. Treffen beide Komponenten im Mischkanal aufeinander, so sinkt die Viskosität der Mischung durch den Auflösevorgang von PPe und PHIC in der Grenzfläche ab.

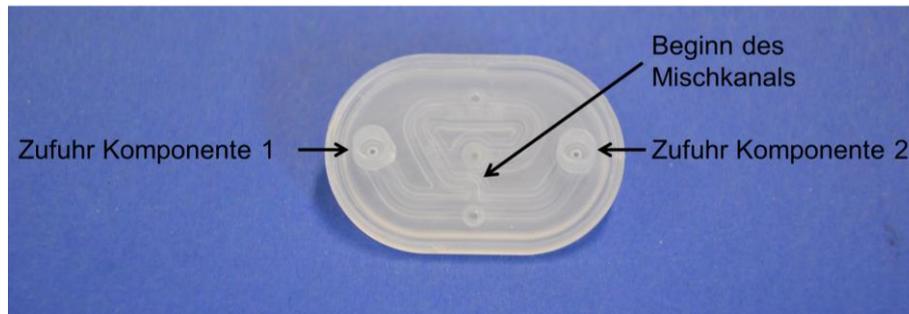


Abb. 55: Aufsicht auf den Mikromischer

In Mikromischern liegen die Reynoldszahlen üblicherweise unter 100, sodass laminare Strömung in den Mischkanälen vorherrschend ist, sofern diese nicht durch Fließhindernisse in chaotische Advektion umgewandelt werden. Werden statt Fluiden halb feste Zubereitungen verwendet, die sich durch plastisches Fließverhalten mit deutlich höheren Viskositäten auszeichnen, sind die Reynoldszahlen deutlich niedriger. Dadurch ist das Entstehen chaotischer Advektion durch die eingebaute Rillenstruktur im vorliegenden Mikromischer erschwert.

Bei der Mischung PPe + PHIC niedriger Viskosität liegt bei PPe eine leicht niedrigere Viskosität vor als bei PHIC niedriger Viskosität. Auch die Auspresskräfte der Einzelkomponenten unterscheiden sich. Es liegt eine Differenz der Auspresskräfte von 52,1 N vor (Tabelle 4-3). Wie bereits beschrieben, entsteht in der Grenzfläche ein Druckgradient, der den stabilen Fluss beider Komponenten nicht beeinträchtigt. Die Zubereitungen werden aufgrund der niedrigen Reynoldszahlen nebeneinander gefördert und kaum miteinander vermischt. Demnach bleibt das Fließen der beiden Komponenten bei der Mischung PPe + PHIC niedriger Viskosität weitgehend stabil, die resultierende Homogenität liegt bei 62,5 %. Chaotische Advektion findet nur unzureichend statt. Die Mischung erfolgt hauptsächlich durch Diffusion und den Auflösevorgang von PPe und PHIC in der Grenzfläche.

Bei PPe + PHIC mittlerer und hoher Viskosität ist der Unterschied der Viskositäten sowie die Differenz der Auspresskräfte der Einzelkomponenten der beiden Zubereitungen größer als bei PPe + PHIC niedriger Viskosität. Daher entsteht ein größerer Druckgradient in der Grenzfläche. Da es an der Grenzfläche zum Auflösevorgang der Komponenten kommt und die Viskosität sinkt, kommt es hier aufgrund des höheren Druckgradienten, zum Kollabieren des stabilen Flusses beider Komponenten. An den Rillenstrukturen des Mikromischers kommt es dadurch zu chaotischer Advektion oder sogar zu Turbulenzen. Dies führt zu einer besseren Homogenisierung der Proben. Die Homogenität ist dabei umso besser, je höher der Druck-

gradient in der Grenzfläche ist. Bei PPe + PHIC mittlerer Viskosität ist die Viskositätsdifferenz sowie die Differenz der Auspresskräfte erhöht, damit ist auch der Druckgradient in der Grenzfläche erhöht und daher liegt auch die Homogenität mit 83,9 % hoch. Die Mischung PPe + PHIC hoher Viskosität weist die höchste Differenz auf, der Druckgradient ist hier am höchsten und damit zeigt sich hier die beste Homogenität mit 92,4 %.

4.3.1.3 Einflussfaktoren der resultierenden Auspresskraft entsprechend der Homogenität

Im Folgenden soll erläutert werden, ob die resultierende Auspresskraft einer Mischung zweier verschiedener Komponenten entsprechend der resultierenden Mischungsgüte kalkuliert werden kann. Dafür werden zwei Berechnungsformeln für die Auspresskraft vorgestellt. Gleichung 4.3-1 stellt eine Berechnungsformel für die Auspresskraft bei Mischung zweier Komponenten mit guter resultierender Homogenität dar, Gleichung 4.3-2 eine Berechnungsformel für die Auspresskraft bei Mischung zweier Komponenten mit schlechter resultierender Homogenität.

Für die Berechnung ist der Aufbau des Mikromischers von entscheidender Bedeutung. Abb. 56 zeigt den Mikromischer mit schematisch eingezeichneter Kanalführung. Dabei machen die Zuführkanäle bis zum Beginn des Mischkanals jeweils ca. 25 % der Wegstrecke aus. Vom Beginn des Mischkanals bis zum Produktaustritt beträgt der Anteil der Wegstrecke ca. 50 % (Tabelle 4-4).

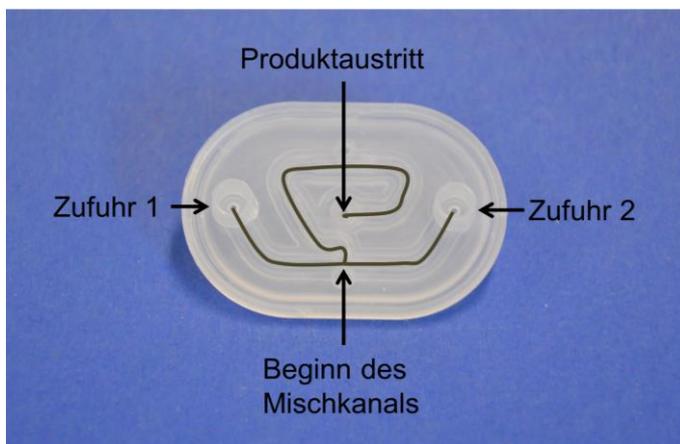


Abb. 56: Mikromischer mit schematisch eingezeichneter Kanalführung

Tabelle 4-4: Wegstreckenanteile im Mikromischer

Wegstrecke im Mikromischer	Anteil an Gesamtwegstrecke [%]
Zufuhr 1 bis Beginn des Mischkanals	ca. 25
Zufuhr 2 bis Beginn des Mischkanals	ca. 25
Beginn des Mischkanals bis Produktaustritt	ca. 50

Gleichung 4.3-1 bestimmt die „Partialauspresskraft“. Sie berücksichtigt zum einen die Auspresskräfte der Einzelkomponenten anteilig ihrer Wegstrecke. Werden diese durch den Mikromischer gefördert, so werden sie jeweils von der Zufuhr bis zum Beginn des Mischkanals gefördert. Ab dem Beginn des Mischkanals entsteht die homogene Mischung. Daher geht die Auspresskraft der homogenen Mischung entsprechend des ausmachenden Weganteils mit 50 % in die Berechnung ein.

$$F_{result.} = 0,25 \cdot F_{Auspress\ PPe} + 0,25 \cdot F_{Auspress\ PHIC} + 0,5 \cdot F_{Auspress\ Mischung}$$

Gleichung 4.3-1

Gleichung 4.3-2 beschreibt die „Mittelwertauspresskraft“. Werden zwei Komponenten durch den Mikromischer gefördert, aber nicht homogen gemischt, so geht die Auspresskraft der homogenen Mischung nicht in die Gleichung mit ein. Die beiden Komponenten werden als parallel liegende Stränge durch den Mikromischer gefördert. Demnach gehen die Auspresskräfte der Einzelkomponenten jeweils mit 50 % in die Berechnung ein.

$$F_{result.} = (F_{Auspress\ PPe} + F_{Auspress\ PHIC}) \cdot 0,5$$

Gleichung 4.3-2

Es soll nun, wie bereits erwähnt, ermittelt werden, ob die resultierenden Auspresskräfte einer Mischung zweier verschiedener Komponenten entsprechend der resultierenden Mischungsgüte kalkuliert werden können. Vergleicht man die berechneten mit den ermittelten Auspresskräften, müsste bei einer Mischung von PPe mit PHIC, bei der eine gute Homogenität resultiert, die dazu ermittelte Auspresskraft, mit der berechneten „Partialauspresskraft“ gemäß Gleichung 4.3-1 übereinstimmen. Zeigt die Mischung von PPe mit PHIC eine schlechte Homogenität, müsste die gemessene Auspresskraft wiederum mit der „Mittelwertauspresskraft“ gemäß Gleichung 4.3-2 übereinstimmen.

Die gemessenen Auspresskräfte der gefärbten Zubereitungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität sowie die rechnerisch ermittelten Auspresskräfte gemäß Gleichung 4.3-1 und 4.3-2 sind in Abb. 57 dargestellt.

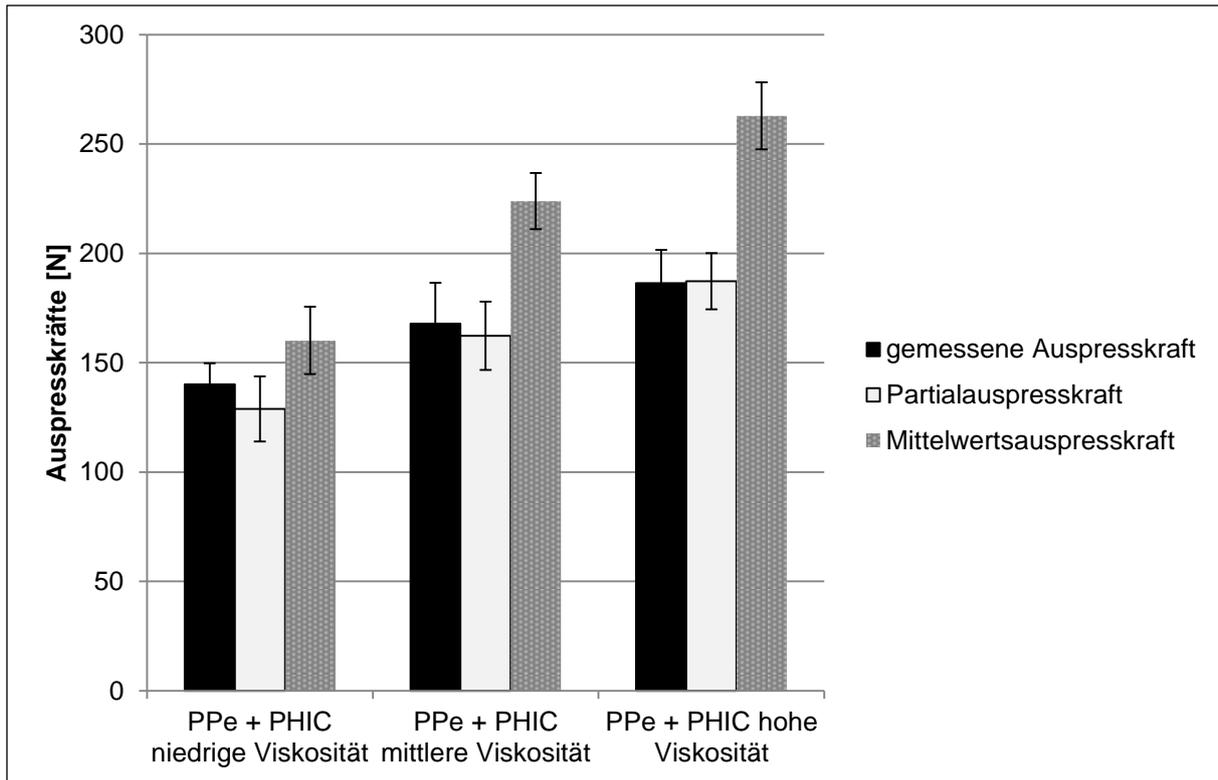


Abb. 57: gemessene und berechnete Auspresskräfte PPe + PHIC, $n = 3$, Fehlerbalken als Standardabweichung

Vergleicht man nun die gemessenen Auspresskräfte der Mischungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität mit den berechneten Auspresskräften, so zeigt sich, dass die Auspresskräfte der Mischungen PPe + PHIC mittlerer und hoher Viskosität, die mit 83,9 % und 92,4 % gute Homogenitätswerte zeigen, sehr gut mit den „Partialauspresskräften“ gemäß Gleichung 4.3-1 übereinstimmen. Die berechnete „Mittelwertsauspresskraft“ gemäß Gleichung 4.3-2 weicht deutlich von den gemessenen Auspresskräften ab. Die Mischung PPe + PHIC niedriger Viskosität weist mit 62,5 % eine schlechtere Homogenität auf. Hier lässt sich die gemessene Auspresskraft den berechneten Auspresskräften nicht eindeutig zuordnen. Sie liegt zwischen beiden berechneten Auspresskräften. Der Vergleich der ermittelten mit den berechneten Auspresskräften zeigt, dass die Berechnung der Auspresskräfte unter Berücksichtigung der im Experiment resultierenden Mischungshomogenität möglich ist. Die eingangs formulierte Hypothese wird also bestätigt.

4.3.2 Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit

Bei den folgenden Untersuchungen wird die Homogenität der Mischproben über die Bestimmung der Gehaltseinheitlichkeit bestimmt. Dafür werden die Zubereitung PPe und PHIC uneingefärbt verwendet. PPe enthält darüber hinaus 2 % des Wirkstoffs ALA. Werden beide Komponenten durch den Mikromischer extrudiert, resultiert eine Mischung, die bei Mischung gleicher Mengen PPe und PHIC einen Gehalt von 1 % ALA aufweist. Je nachdem, ob die Probe homogen oder inhomogen vorliegt, resultiert eine einheitliche oder uneinheitliche Wirkstoffverteilung im Mischextrudat. Daher wird zur Untersuchung der Homogenität das Mischextrudat in drei Proben unterteilt, deren Wirkstoffgehalt bestimmt und daraus die Homogenität ermittelt.

4.3.2.1 Rheologie und Auspresskräfte

Ergänzend werden diese Zubereitungen rheologisch vermessen und deren Auspresskräfte bestimmt. Abb. 58 zeigt die Viskosität von PHICs niedriger, mittlerer und hoher Viskosität sowie seine homogenen Mischungen mit PPe. Es ist zu entnehmen, dass die Viskosität der PHIC-Zubereitungen von PHIC niedriger Viskosität zu PHIC hoher Viskosität ansteigt. Die homogenen Mischungen von PHIC und PPe sind sehr viel geringer als die Viskositäten von PHIC. Auch hier kommt es beim Mischen von PPe mit PHIC zum Auflösen des Gel- bzw. Cremegerüsts von PPe und PHIC.

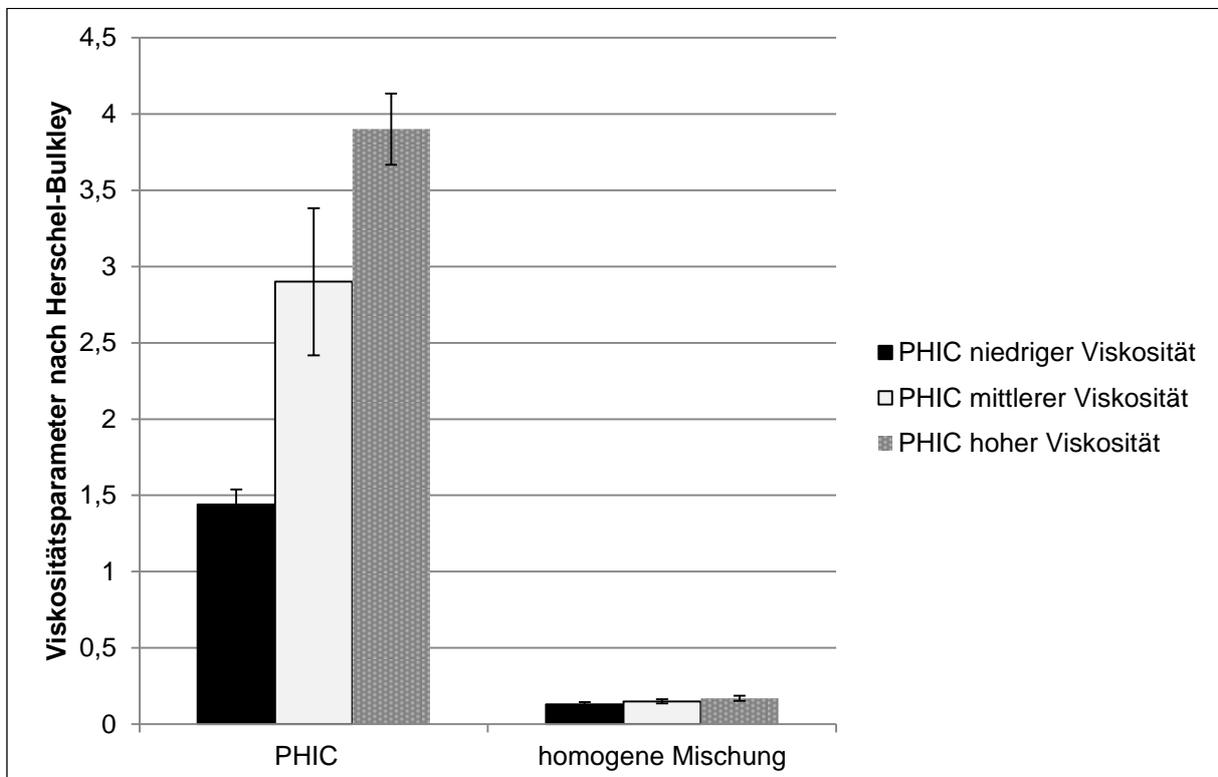


Abb. 58: Viskositätsparameter nach Herschel-Bulkley von PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und der homogenen Mischung PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung

In Abb. 59 ist das Rheogramm von PPe mit 2 % ALA dreier unterschiedlicher Messproben dargestellt. Es zeigt sich, dass die drei verschiedenen Proben sehr unterschiedliche Rheogramme aufweisen. Während Formulierung A dem Rheogramm von PPe ohne Wirkstoff einen Tag nach der Herstellung (Abb. 41) entspricht, liegt die Messkurve von Formulierung B und C deutlich höher. Außerdem zeigt das Rheogramm von Formulierung B eine leichte und von Formulierung C eine deutliche Veränderung der Fließcharakteristik und der Fließgrenze. Hier kommt es also zum Strukturaufbau innerhalb der Formulierung. Dieser Strukturaufbau ist durch das Einarbeiten von 2 % ALA zu erklären. Im Thermogel wurde ein Strukturaufbau des Gels durch einen 10%-igen Zusatz an ALA beschrieben [Grüning, 2007]. Bei PPe scheint ein 2%-iger ALA-Zusatz den Strukturaufbau zu fördern. Der Endpunkt des Strukturaufbaus ist bei den Formulierungen einen Tag nach der Herstellung noch nicht erreicht. Dies erklärt die unterschiedlich vorkommenden Rheogramme in Abb. 59. Daher lassen sich diese Proben nicht gemäß Herschel-Bulkley linearisieren und können in Abb. 58 nicht dargestellt werden.

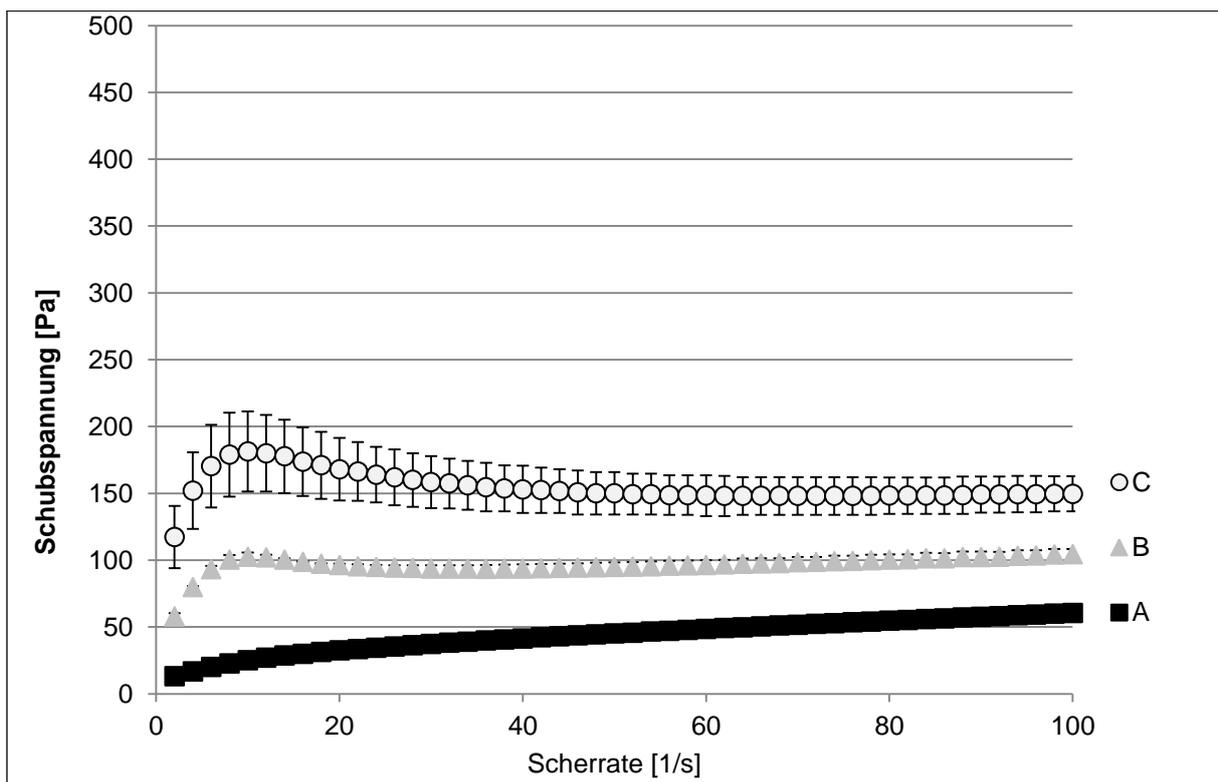
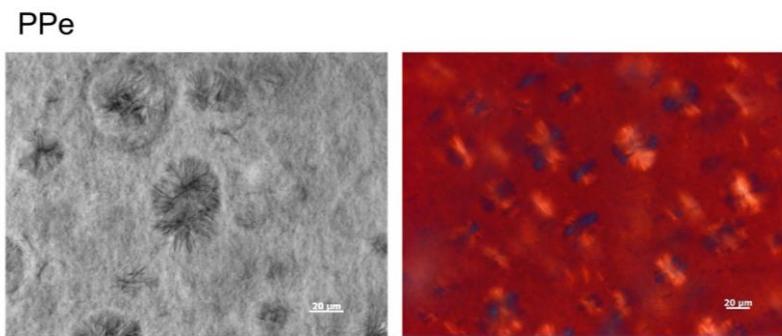


Abb. 59: Rheogramm PPe mit ALA; A, B und C = unterschiedliche Messproben mit je $n = 3$, Fehlerbalken als Standardabweichung

Betrachtet man die mikroskopischen und polarisationsmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 60) von PPe mit 2% ALA, zeigen sich Poloxameraggregate und im polarisationsmikroskopischen Bild die charakteristischen Malteserkreuz-Texturen. Eine Verminderung dieser Strukturen,

wie sie sich nach Lagerung von 6 Monaten bei PPe zeigen (Abb. 46), ist hier nicht zu erkennen.



**Abb. 60: Mikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen von ALA in PPe;
Maßstabsbalken 20 µm**

Betrachtet man die Auspresskräfte der Mischungen PPe mit ALA und PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (Abb. 61), zeigen sich steigende Auspresskräfte der Mischungen PPe +PHIC von niedriger zu hoher Viskosität. Die Auspresskräfte der Einzelkomponente PPe (PPe + PPe) liegen unter den Auspresskräften der Mischungen. Bei PHIC steigen die Auspresskräfte in der erwarteten Reihenfolge. Während die Auspresskraft von PHIC niedriger Viskosität (PHIC + PHIC) im gleichen Bereich wie die Auspresskraft der Einzelkomponente PPe liegt, liegen die Auspresskräfte der Einzelkomponenten PHIC mittlerer bzw. hoher (PHIC + PHIC) darüber und über denen der Mischungen PPe + PHIC. Betrachtet man die Auspresskräfte der homogenen Mischungen (Mischung + Mischung) so liegen diese deutlich niedriger als die Auspresskräfte der Mischungen und der Einzelkomponenten PPe und PHIC. Die hier vorgestellten Auspresskräfte weichen von den Auspresskräften der eingefärbten Zubereitungen (Abb. 52) ab, da es sich aufgrund der eingearbeiteten Farbstoffe und des Wirkstoffes um unterschiedliche Zubereitungen handelt.

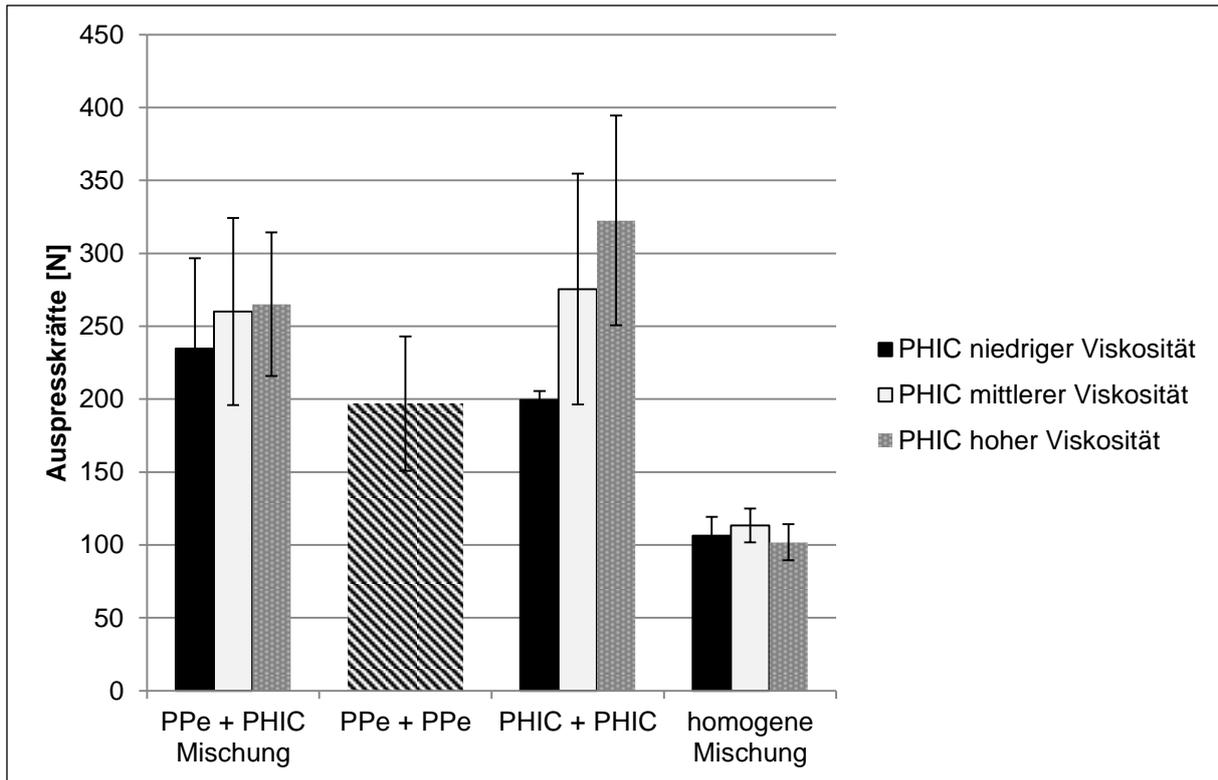


Abb. 61: Auspresskräfte von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität sowie der Einzelkomponenten PPe (PPe + PPe), PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (PHIC + PHIC) und der homogenen Mischung von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität (Mischung + Mischung); $n = 3 - 5$, Fehlerbalken als Standardabweichung

4.3.2.2 Homogenität

Die resultierenden Homogenitäten der Mischung PPe + PHIC niedrigerer, mittlerer und hoher Viskosität sind in Abb. 62 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle Mischungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität eine niedrige Homogenität von ca. 55 % zeigen. Im Durchschnitt liegt die Homogenität der Mischungen PPe + PHIC niedriger Viskosität bei 52 %, bei mittlerer Viskosität bei 57 % und bei hoher Viskosität bei 53 %. Es zeigen sich hier konstant unzureichende Mischungsgüten aller Mischungen. Demnach kommt es bei allen drei Mischungen nur unzureichend zur Bildung von chaotischer Advektion. Die Mischvorgänge beruhen hauptsächlich auf der stattfindenden Diffusion und der Auflösung der Gel/Cremestruktur in der Grenzfläche.

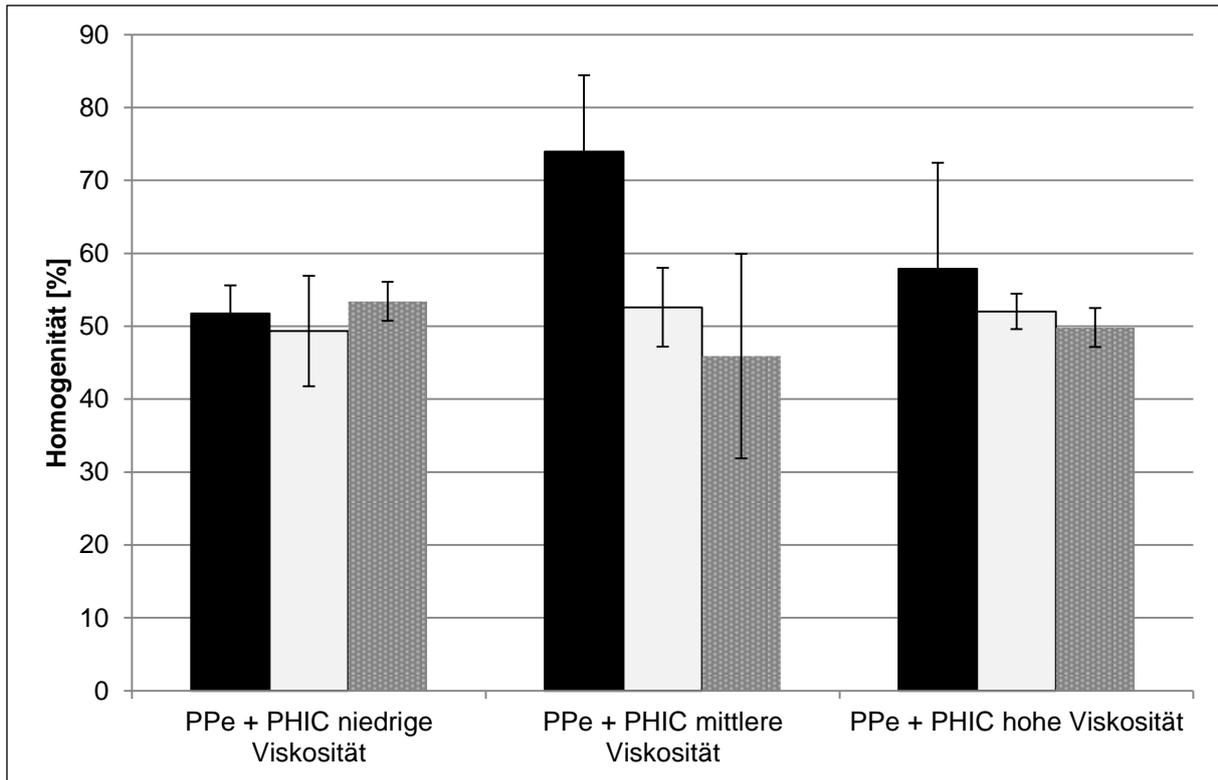


Abb. 62: Homogenitäten der Mischungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität mittels Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung; drei Balken stellen jeweils Ergebnisse unabhängiger Experimente dar

In Tabelle 4-5 ist die Differenz der Auspresskräfte der zu mischenden Komponenten PPe + PPe und PHIC+ PHIC aufgeführt. Diese Werte liegen mit Werten zwischen 2,4 -125,6 N unter den Werten der eingefärbten Zubereitungen PPe + PHIC mittlerer (179,7 N) und hoher (257,4 N) Viskosität der Untersuchung der Farbhomogenität, die gute Homogenitätswerte zeigen. Wie bei den eingefärbten Zubereitungen PPe + PHIC niedriger Viskosität, bei denen bei einer Differenz der Auspresskräfte von 52,1 N ebenfalls eine unzureichende Homogenität resultiert, ist der Druckgradient zwischen den uneingefärbten, zu mischenden Zubereitungen nicht groß genug, um den stabilen Fluss der beiden Einzelkomponenten zu destabilisieren und chaotische Advektion zu erzeugen. Es kommt bei allen drei Mischungen keine ausreichende Vermischung im Mikromischer zustande. Die zu mischenden Komponenten werden in lamellarer Strömung im Mikromischer gefördert. Die Mischung beruht auf Diffusion und dem in der Grenzfläche auftretenden Auflösprozess der beiden Komponenten. Unterschiede in den Homogenitätsergebnissen der verschiedenen Homogenitätsuntersuchungen sind darauf zurückzuführen, dass durch das Einfärben der Zubereitungen bei Überprüfung der Farbhomogenität und durch den enthaltenen Wirkstoff in den Zubereitungen bei Überprüfung der Gehaltsgleichförmigkeit Zubereitungen mit rheologisch unterschiedlichen Eigenschaften vorliegen. Dies wirkt sich unmittelbar auf die Homogenität nach dem Mischen aus und führt zu unbefriedigenden Ergebnissen bei den ALA-haltigen Systemen.

Tabelle 4-5: Differenz der Auspresskräfte der zu mischenden uneingefärbten Einzelkomponenten

	PpE / PHIC niedrige Viskosität	PpE / PHIC mittlere Viskosität	PpE / PHIC hohe Viskosität
$\Delta F_{\text{Auspress}} \text{ (PpE / PHIC) [N]}$	2,4	78,6	125,6

4.3.2.3 Einflussfaktoren der resultierenden Auspresskraft entsprechend der Homogenität

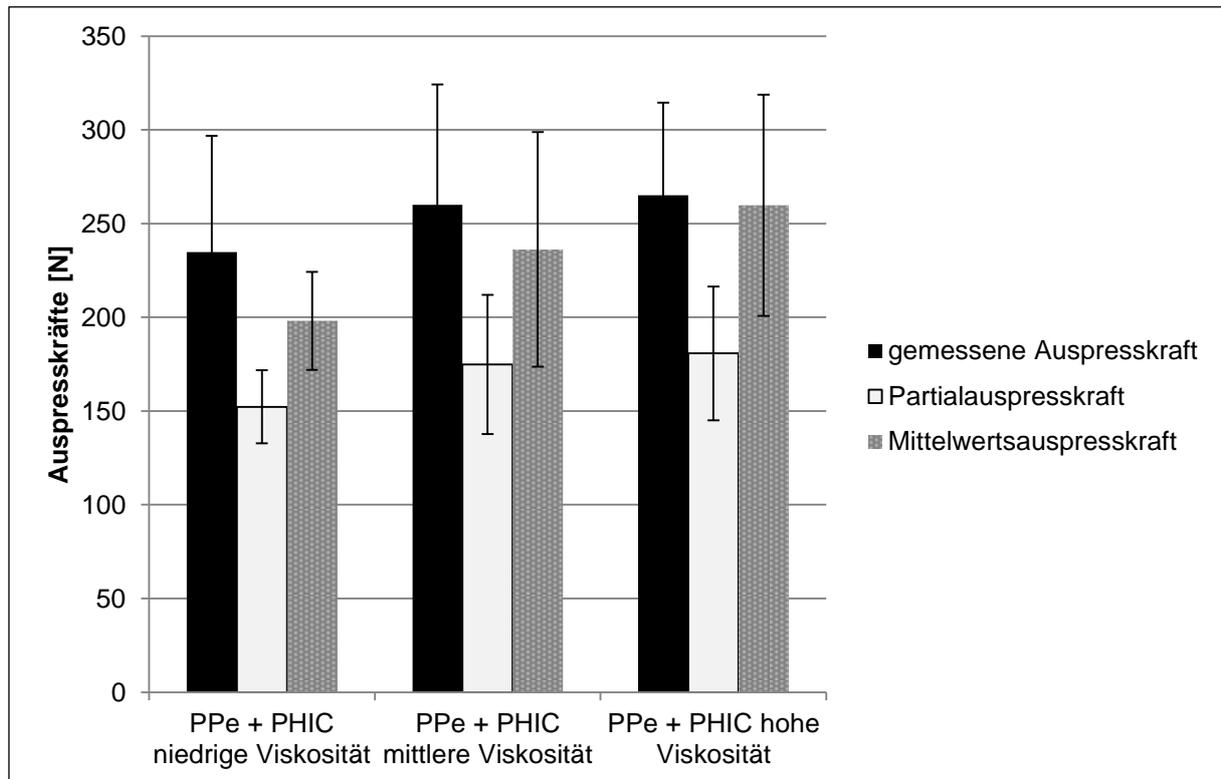


Abb. 63: gemessene und berechnete Auspresskräfte von PpE + PHIC, n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung

Entsprechend der in Kapitel 4.3.1.3 berechneten Auspresskräfte werden in Abb. 63 die gemessenen Auspresskräfte den berechneten Auspresskräften gegenübergestellt. Dabei setzt sich die „Partialauspresskraft“ (Gleichung 4.3-1) anteilig aus den Auspresskräften der Einzelkomponenten sowie der entstehenden homogenen Mischung zusammen. Diese Berechnung ist für Mischungen mit guter Homogenität relevant, da die homogene Mischung in ausreichender Menge entsteht und ihren Einfluss auf die Gesamtauspresskraft ausübt. Ist die Mischungsgüte hingegen schlecht, so werden beide Einzelkomponenten parallel durch den Mikromischer gefördert. Da die homogene Mischung kaum entsteht, geht ihre Auspresskraft

nicht in die Gesamtauspresskraft mit ein. Die Gesamtauspresskraft resultiert ausschließlich aus den beiden zu mischenden Komponenten („Mittelwertsauspresskraft“, Gleichung 4.3-2).

Die gemessenen Auspresskräfte lassen sich eindeutig der Mittelwertsauspresskraft zuordnen. Die berechnete „Partialauspresskraft“ liegt deutlich darunter. Dieses Ergebnis geht einher mit der ermittelten Homogenität, die bei allen drei Experimenten mit ca. 55 % eine nur unzureichende Homogenität aufweist. Auch hier wird die in Kapitel 4.3.1.3 aufgestellte Hypothese, dass die resultierende Auspresskraft bei Mischung zweier unterschiedlicher Komponenten anhand der Mischungshomogenität berechnet werden kann, bestätigt.

4.3.2.4 Mischmuster

In der Literatur wird beschrieben, dass es bei Mischung zweier Komponenten mit unterschiedlicher Viskosität dazu kommt, dass die viskosere Zubereitung die niedrigviskosere Zubereitung in der Querschnittsfläche verdrängt und die Fließgeschwindigkeiten der Zubereitungen sich verändern. Die viskosere Flüssigkeit wird langsamer, die niedrigviskosere Flüssigkeit wird schneller [Liu et al., 2004, Xia et al., 2010]. In der vorliegenden Arbeit werden ebenfalls Komponenten mit unterschiedlichen Viskositäten gemischt. Es wird nun untersucht, in welchem Verhältnis die vorliegenden Komponenten extrudiert werden. Da nur eine Formulierung den Wirkstoff beinhaltet, entscheidet das Mischungsverhältnis der zu mischenden Komponenten den Wirkstoffgehalt der Mischung. Für die Homogenitätsuntersuchungen werden die Mischextrudate in drei Proben geteilt, der Wirkstoffgehalt dieser Mischproben untersucht und daraus die Homogenität berechnet. Im Folgenden wird aus den ermittelten Wirkstoffgehalten die Gesamtkonzentration des Mischextrudats bestimmt. Darüber hinaus werden extrudierte Mischproben mit dem Spatel homogenisiert, die homogenisierte Mischprobe ebenfalls in drei Proben geteilt und deren Wirkstoffgehalt bestimmt. Diese werden als Mischmuster bezeichnet.

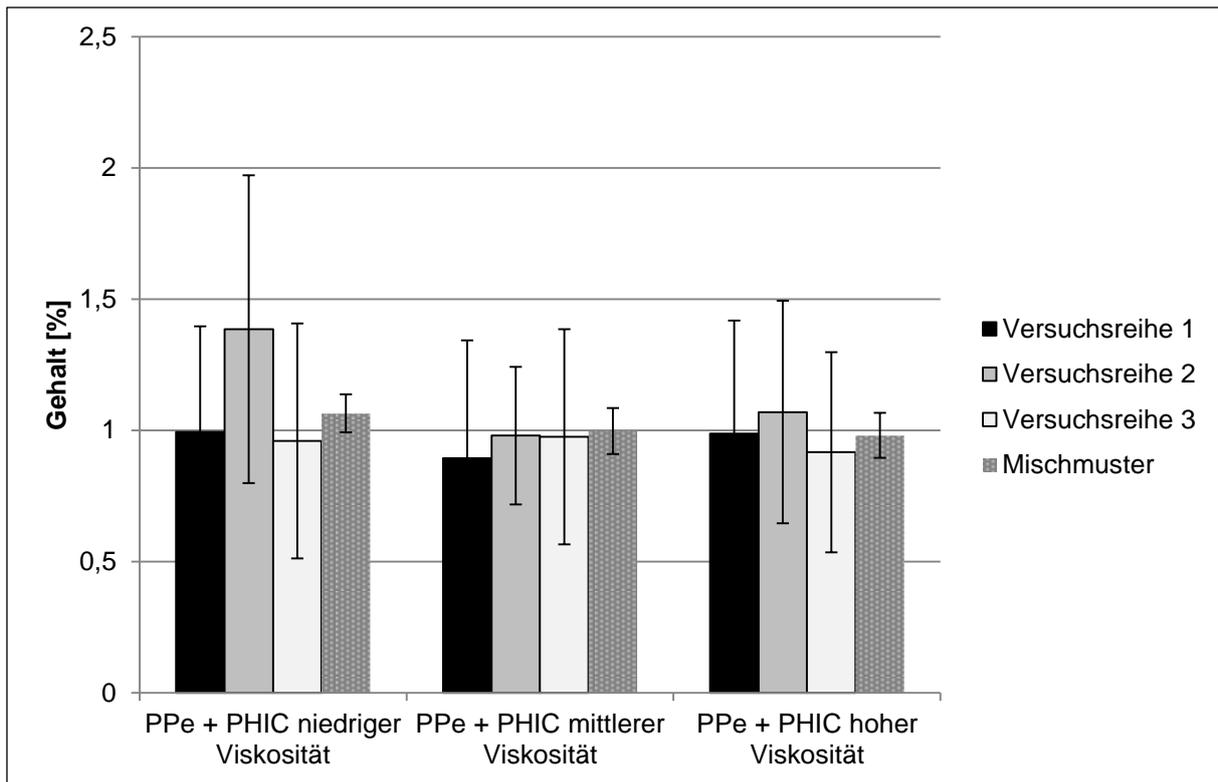


Abb. 64: Mittlere Konzentrationen der Mischextrudate der Homogenitätsuntersuchungen von PPe und PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und die Konzentration der jeweiligen Mischmuster; n = 3, Fehlerbalken als Standardabweichung; Versuchsreihe 1, 2 und 3 Ergebnisse unabhängiger Experimente

Abb. 64 zeigt die mittleren Konzentrationen der Mischextrudate der Homogenitätsuntersuchungen aus drei unabhängigen Versuchsreihen sowie die dazugehörigen Mischmuster. Im dargestellten Schaubild ist zu erkennen, dass die Konzentrationen der Mischextrudate aus den Homogenitätsuntersuchungen PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität alle bei etwa 1 % liegen. Auch die Konzentration der Mischmuster liegt bei ca. 1 %. Dies zeigt, dass es bei der Mischung von PPe und PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität beide zu mischenden Komponenten im Verhältnis 1 + 1 gefördert und extrudiert werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass beide Komponenten jeweils in einer Spritze vorliegen und mit dem Mikromischer über eine Luerlok-Vorrichtung verbunden sind. Der Materialprüfer verschiebt die Kolben der Spritzen mit konstanter Geschwindigkeit, sodass eine konstante Förderung der Komponenten mit gleichem Volumenstrom an Material durch den Mikromischer erfolgt. Wie in Kapitel 4.3.2.2 besprochen, ist der Fluss beider Komponenten stabil und lamellar. Sie werden also im gleichen Verhältnis durch den Mikromischer gefördert und extrudiert.

Da bei den Homogenitätsuntersuchungen von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität Mischungsgüten von ca. 55 % resultieren und damit alle Mischproben eine ungenügende Homogenität aufweisen, weichen die Wirkstoffgehalte der drei Mischproben pro Mischextrudat stark voneinander ab. Dies erklärt die hohen Standardabweichungen der

Wirkstoffkonzentrationen der drei Versuchsreihen. Da die Proben bei den Mischmustern vor dem Probenzug homogenisiert wurden, zeigen die Wirkstoffgehalte der Mischmuster nur kleine Abweichungen.

4.3.3 Vergleich der Methoden zur Homogenitätsbestimmung

In den zuvor beschriebenen Ergebnissen der Homogenitätsstudien mittels Überprüfung der Farbhomogenität und mittels Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit ergeben sich unterschiedliche Ergebnisse der Homogenitäten bei Mischung von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität. Wesentlicher Unterschied beider Methoden sind die verwendeten Formulierungen, die durch das Zufügen von Farbstoffen bzw. des Wirkstoffes unterschiedliche Viskositäten aufweisen. Daneben gibt es auch Unterschiede in der Probennahme sowie im Versuchsaufbau, die im folgenden Kapitel erläutert werden.

4.3.3.1 Charakteristika der Überprüfung der Farbhomogenität

In Abb. 65 ist die Fläche der Probenauffangvorrichtung dargestellt. Wird eine Mischungsprobe extrudiert, so wird die Probe mit der Auffangvorrichtung aufgefangen. So ist die Ablichtung der Probe mit einer definierten Höhe von 100 μm möglich. Die Fläche der Probe wird dabei durch 20 Lagen Tesafilm rechts und links der Probenauffangvorrichtung generiert. Diese sind in der Abbildung als dunkelgraue Begrenzungen dargestellt. Neben der Probenfläche zeigt Abb. 65 die Bildfläche, die von der Kamera erfasst wird, sowie die fünf Messpunkte, die in der Software vermessen werden und der Auswertung dienen.

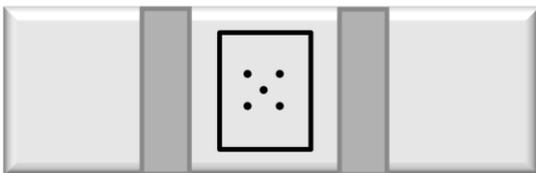


Abb. 65: Schema der Probenauffangvorrichtung, der Bildfläche sowie der Messpunkte

Tabelle 4-6 gibt zur Fläche und der Masse der Probe im entsprechenden Bereich weitere Informationen. Die Probenauffangfläche beträgt hierbei 3,83 cm^2 . Die Gesamtmenge der aufgefangenen Probe ist mit 0,4378 g gering. Die Masse der Probe, die im aufgenommenen Bild dargestellt wird, beträgt nur noch 0,2467 g. Einer der fünf Messpunkte hat eine Fläche von $2,16 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2$ und eine entsprechende Masse von 0,2467 μg . Die fünf vermessenen Bildpunkte repräsentieren daher nur eine geringe Menge an Probe.

Tabelle 4-6: Berechnung der Fläche und Masse der Probe pro Pixelpunkt der Bildanalyse

	Objektträger	Bild	Pixel
Fläche [cm ²]	3,83	2,16	2,16*10 ⁻⁶
Masse Probe [g]	0,4378	0,2467	2,467*10 ⁻⁷

4.3.3.2 Charakteristika der Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit

Wird die Mischprobe für die Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit durch den Mikromischer gemischt und extrudiert, so kann aufgrund des Auflösevorgangs beim Mischprozess ein charakteristisches Mischbild beobachtet werden. Dieses ist in Abb. 66 A schematisch dargestellt. Im mittleren Teil der Mischprobe befindet sich eine Mischzone, in der die Bildung der gemischten Probe aufgrund von Auflösevorgängen zu erkennen ist. Diese Mischzone zieht sich diagonal durch die Probe. Angrenzend an die Mischzone sind in Richtung obere rechte und untere linke Ecke optisch die Einzelkomponenten auszumachen. Beim Mischvorgang werden die zu mischenden Stränge im Mischkanal „zusammengepresst“ und nebeneinander gefördert. Ein Vermischen erfolgt nur an den Kontaktflächen beider Stränge. Beim Extrudieren wird die Mischprobe im Wägeschiffchen aufgefangen. Die Mischzone ist im mittleren Bereich des Wägeschiffchens zu erkennen. Die weniger gut vermischten Stränge der Einzelkomponenten fließen von der Mitte aus nach außen. In Abb. 66 B ist dargestellt, wie die Probe in drei Teile unterteilt wird. Nach dem Einfrieren der Mischprobe mit flüssigem Stickstoff wird die Probe vertikal in drei zu untersuchende Probenstücke unterteilt und auf ihren Wirkstoffgehalt untersucht. Daraus wird die Homogenität ermittelt. Abb. 66 C zeigt eine weitere Untersuchung, bei der nur der innere Teil der Probe (= inneres Quadrat) entnommen wird und auf den Wirkstoffgehalt untersucht wird.



Abb. 66: A: Optische Zusammensetzung des Mischextrudats; B: Einzeichnung der Probennahmeaufteilung in Probenextrudatstücke Teilprobe 1 - 3; C: Probenstück inneres Quadrat

In Abb. 67 sind die Wirkstoffgehalte der Teilproben 1-3 aus den Homogenitätsuntersuchungen und die Gehaltsbestimmung des inneren Quadrats aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass die Teilproben 1-3 entsprechend ihrer mäßigen Homogenität sehr unterschiedliche Wirkstoffgehalte aufzeigen. Während in Teilstück 1 der Gehalt bei 1,45 % liegt, liegt er in Teilstück 2 bei 1,07 % und in Teilstück 3 bei 0,54 %. Im Mittel ergibt das, entsprechend der

Mischmuster, einen mittleren Wirkstoffgehalt von etwa 1 %. Wird nun nur der Wirkstoffgehalt des inneren Quadrats bestimmt, so zeigt sich, dass der mittlere Teil einen Wirkstoffgehalt von 0,97 % aufweist. Dies zeigt, dass im inneren Teil des Mischextrudats die Mischzone vorliegt, in der beide Stränge in gleichen Mengen vorliegen. Betrachtet man die Ränder der Mischprobe, liegen dort die ungemischten Einzelkomponenten vor.

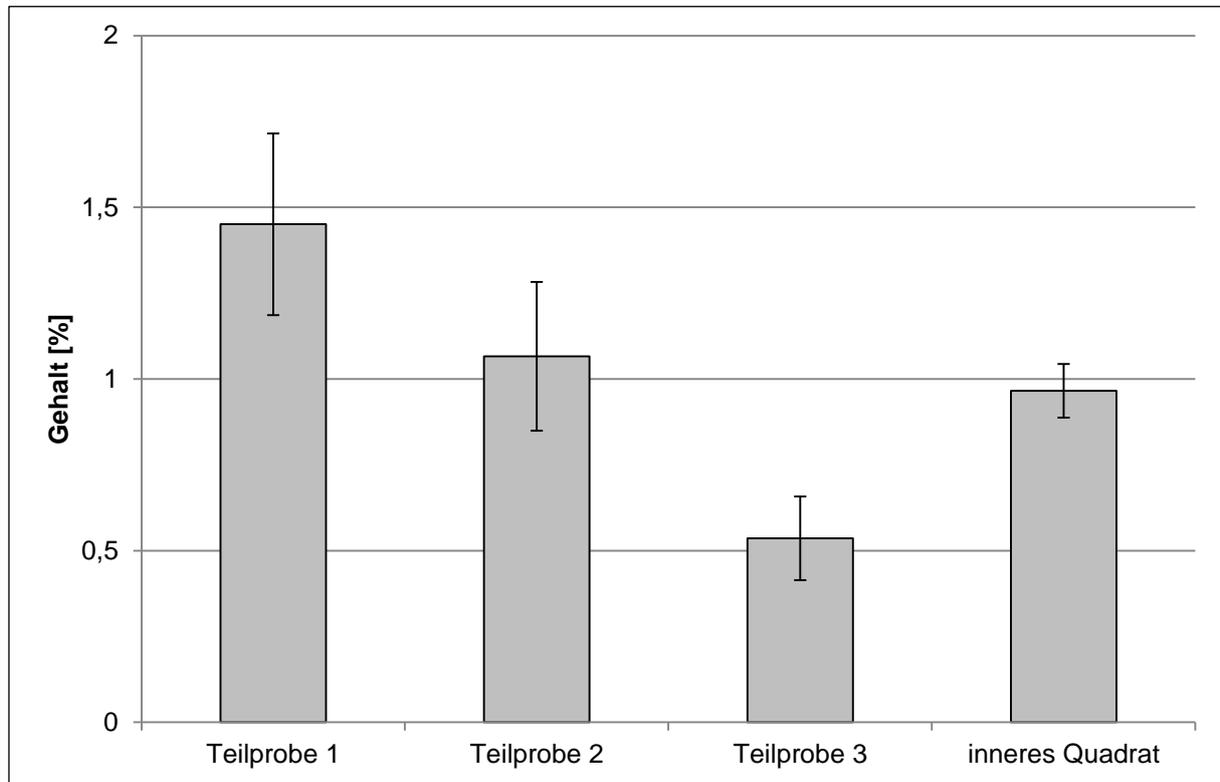


Abb. 67: gemessene Gehalte der Probenextrudate und des inneren Quadrats entsprechend Abb. 66 B und C; n = 27 (Teilprobe 1 - 3); n = 9 (inneres Quadrat), Fehlerbalken als Standardabweichung

Betrachtet man die ermittelten Wirkstoffgehalte der Proben der Teilstücke 1-3 und des inneren Quadrats, so zeigt Abb. 68, wie gleichförmig der ermittelte Wirkstoffgehalt erzielt wird. Die Gleichförmigkeit wird entsprechend Gleichung 4.3-3 ermittelt. Es wird deutlich, dass der Wirkstoffgehalt im inneren Quadrat sehr einheitlich bei 0,97 % liegt. Bei der Untersuchung der Teilstücke sind die Schwankungen der ermittelten Wirkstoffgehalte etwas größer. Daraus lässt sich wiederum schließen, dass der innere Teil der Mischprobe als Mischzone angesehen werden kann. Die Mischstränge im Mikromischer werden aneinandergespresst und vermischen sich an ihrer Kontaktfläche. Beim Auffangen der Probe im Wägeschiffchen trifft diese innere Mischzone in die Mitte des Probenauffanggefäßes. Die weniger gemischten äußeren Bereiche der Mischstränge treffen neben der Mischzone auf und fließen im Probenauffanggefäß weiter nach außen.

$$\text{Gleichförmigkeit [\%]} = 100 \% - \text{rel. Standardabweichung (Gehalt)}$$

$$\text{Gleichung 4.3-3}$$

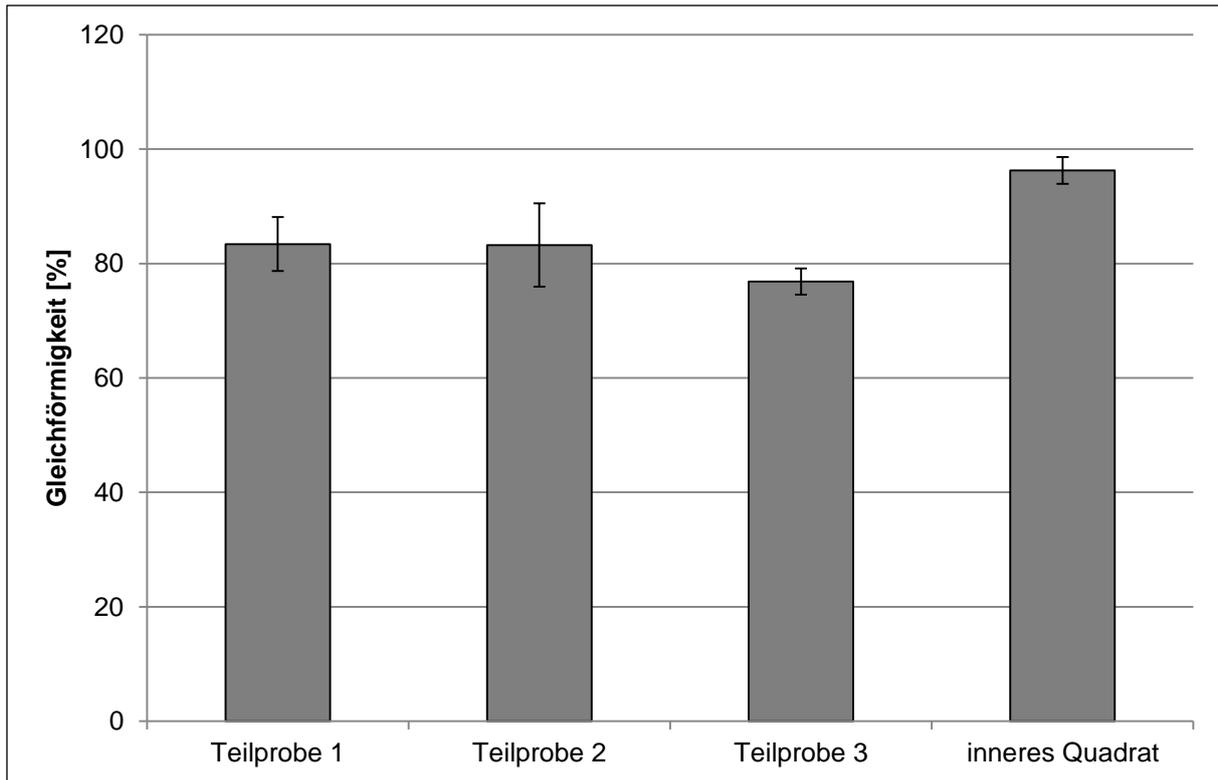


Abb. 68: Gleichförmigkeit der verschiedenen Probenextrudatstücke entsprechend Abb. 66 B und C; $n = 9$ (Teilprobe 1 -3); $n = 3$ (inneres Quadrat), Fehlerbalken als Standardabweichung

4.3.3.3 Gegenüberstellung der Mischergebnisse

Um die verschiedenen Mischergebnisse der beiden Homogenitätsmethoden in einen Kontext zu bekommen, müssen diese gegenübergestellt werden. Bei der Überprüfung der Farbhomogenität ist das untersuchte Messfenster sehr klein, wovon nur 5 Punkte untersucht werden. Der Anteil der 5 Pixelpunkte an der Gesamtmasse ist sehr gering und repräsentiert nur einen sehr kleinen Anteil der Gesamtmasse. Zudem kann nur der innere Teil der Probe ermittelt werden. Vergleicht man dies mit dem Mischbild aus Kapitel 4.3.3.2, so kann man daraus schließen, dass dabei stärker die Mischzone untersucht wird. Daraus könnten bessere Mischergebnisse resultieren, als tatsächlich vorliegen. Die Begrenzung der zu untersuchenden Mischprobe durch die Tesa-Begrenzungen können die Probe in ihrem Fließen stoppen und einem homogeneren Mischergebnis dienen.

Im Gegensatz dazu wird bei der Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit das gesamte Mischextrudat untersucht und daraus die Gesamthomogenität ermittelt. Die Mischprobe ist mit 3 g deutlich größer als 0,4378 g Probenmaterial bei der Überprüfung der Farbhomogenität. Es durchfließt also deutlich mehr Probenmaterial den Mikromischer pro Messprobe. Die Probenahme ist hierbei sicherlich die weniger Artefakt behaftete, da durch das Einfrieren der Probe direkt nach dem Extrudieren der Probe keine weitere Durchmischung der Probe erfolgen kann. Für eine Aussage über die homogene Mischbarkeit von PPE und PHIC ist die

Homogenitätsuntersuchung mittels Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit die relevantere Methode, da hier die originalen Zubereitungen ohne Zusatz von Farbstoffen untersucht werden.

Da bei der Homogenitätsuntersuchung mittels Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit schlechte Homogenitätswerte resultieren, kann der Mikromischer die entwickelten Formulierungen für das Zweikammersystem nicht ausreichend mischen. Für das Auftragen auf die Haut ist dies eher von kosmetischer Relevanz. Werden die Zubereitungen für eine direkt folgende Applikation durch den Mikromischer gemischt und entnommen, so wird durch das Auftragen und Verreiben auf der Haut die endgültige Homogenität erzeugt.

Die Homogenitätsuntersuchung mittels Überprüfung der Farbhomogenität kann über die verwendeten Zubereitungen keine Aussage machen, da die Formulierungen durch das Einarbeiten von Farbstoffen in ihren rheologischen Eigenschaften verändert werden. Allerdings kann diese Methode weitere Informationen über die Eignung des Mikromischers zur Mischung halbfester Zubereitungen liefern. Hier zeigen Homogenitätsuntersuchungen, dass die Mischung zweier Zubereitungen mit großen Viskositätsunterschieden gute Homogenitätsergebnisse zeigen. Diese Zubereitungen weisen ein Viskositätsprofil auf, das ein homogenes Mischen mittels Mikromischer ermöglicht. Es lässt sich also zeigen, dass der Mikromischer unter den in Kapitel 4.3.1.2 dargestellten Aspekten fähig ist, halbfeste Zubereitungen homogen zu mischen.

4.4 In-vitro Permeationsuntersuchungen

Für den Therapieerfolg der PDT ist es essentiell, dass ALA in ausreichender Menge aus dem Vehikel in das betroffene Gewebe penetriert. Hierfür werden Permeationsuntersuchungen durchgeführt, um festzustellen, ob ALA gut durch die Haut permeiert und damit auch gut in die Haut penetriert. Die Zubereitungen enthalten bei diesen Untersuchungen 7,8 % ALA, da dies die Konzentration des auf dem Markt befindlichen Vergleichsproduktes Ameluz ist. Da PPePr und PHIC im Zweikammersystem zwar getrennt gelagert, aber für die Applikation gemischt werden, werden Mischungen von 1 Teil PPePr und 1 Teil PHIC untersucht. Dabei werden die variierenden Anteile in der Legende der Abbildungen angegeben.

4.4.1 Vergleich der Mischungen mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und PPePr

Abb. 69 zeigt die Ergebnisse der in-vitro Permeationsuntersuchung, bei der der Einfluss der PHIC-Komponenten der Mischung mit PPePr auf die permeierte Menge ALA nach 24 h untersucht wird. Bei den Ergebnissen ist ein Trend der permeierten Mengen zu erkennen. Die Mischung von PPePr und PHIC mittlerer Viskosität zeigt die höchste permeierte Menge ALA nach 24 h. Die Mischung PPePr mit PHIC niedriger Viskosität liegt unter der permeierten Menge der Mischung PPePr mit PHIC mittlerer Viskosität. Die Mischung PPePr mit PHIC hoher Viskosität zeigt eine deutlich niedrigere permeierte Menge an ALA. Die Unterschiede sind allerdings nicht statistisch signifikant.

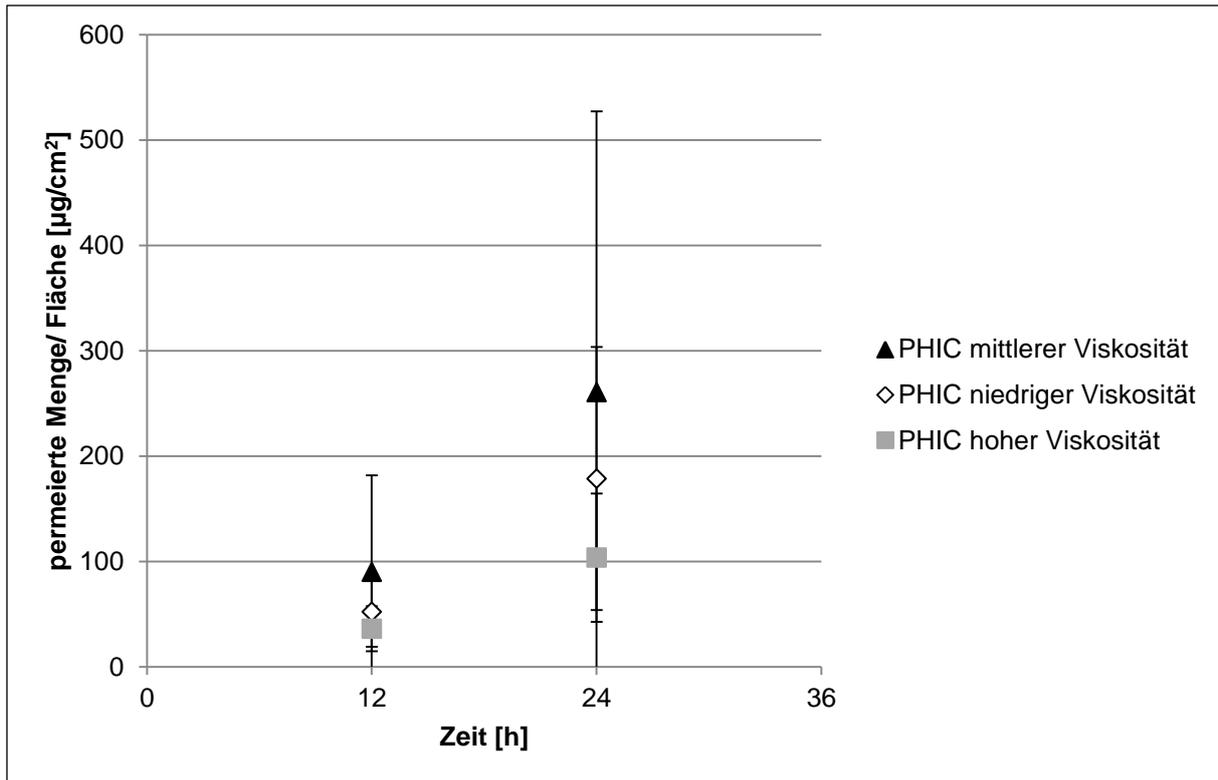


Abb. 69: Vergleich der permeierten Mengen der Mischungen PPePr mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; $n = 5$, Fehlerbalken als Standardabweichungen

Um die Äquivalenz der beschriebenen Ergebnisse näher zu erläutern, wird die Prüfung der Äquivalenz der FDA aus der Richtlinie SUPAC-SS in abgewandelter Form verwendet. Dabei werden die Permeationsraten der Formulierungen ermittelt und für die Berechnung der Äquivalenz verwendet.

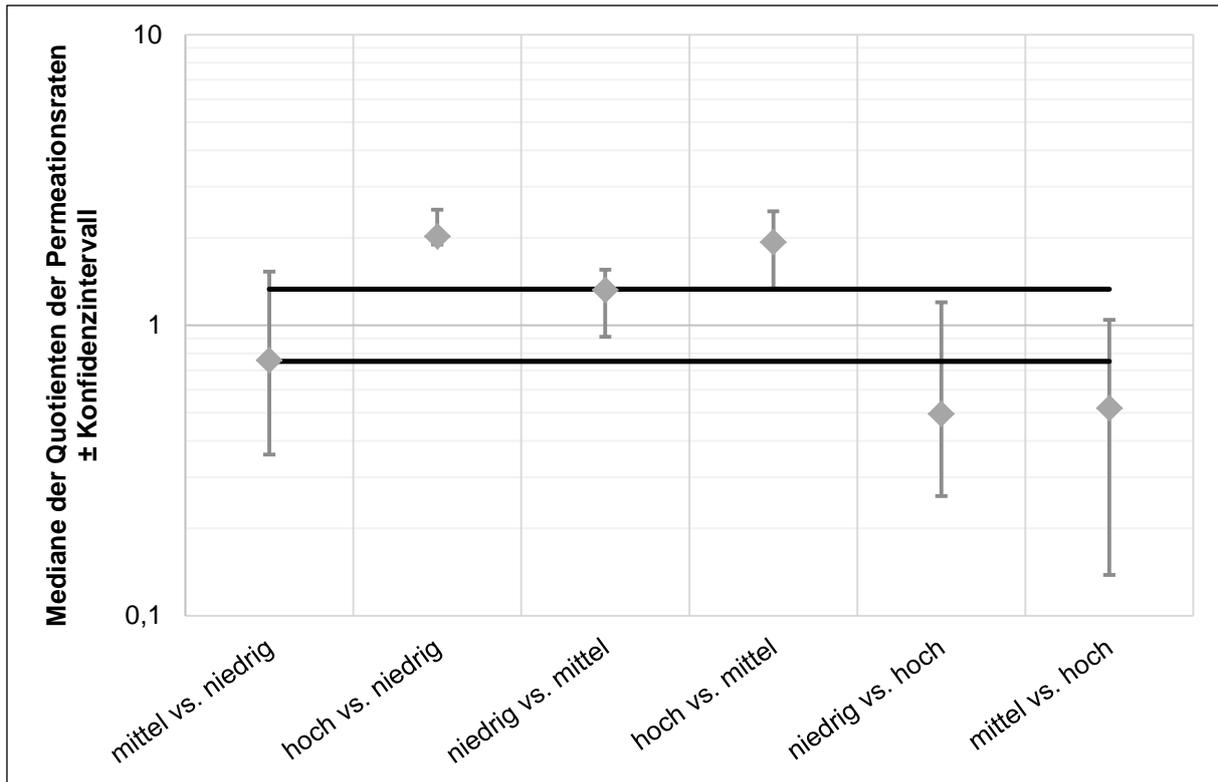


Abb. 70: Prüfung der Äquivalenz der Permeationsraten von Test- vs. Referenzformulierung: PPePr + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; n = 5, Fehlerbalken als Konfidenzintervall des Medians

Abb. 70 zeigt die Äquivalenzprüfung der Permeationsraten der Mischungen PPePr + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität. Es ist zu erkennen, dass die Quotienten der Mediane und deren Konfidenzintervalle außerhalb des eingezeichneten Grenzbereichs liegen. Es kann also keine Äquivalenz der Formulierungen angenommen werden.

Die Mischungen PPePr + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität unterscheiden sich lediglich in den Anteilen an Poloxamer 407, 188 und 124. Abb. 71 zeigt den Viskositätsparameter nach Herschel-Bulkley von PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität sowie der homogenen Mischungen von PPePr mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität. Im Gegensatz zu den PHIC-Zubereitungen, bei denen die Zusammensetzung der Poloxamer entscheidenden Einfluss auf die Viskosität hat, zeigt sich bei den Mischungen PPePr + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität nur ein kleiner Einfluss der Poloxamerzusammensetzung auf die Viskosität. Daher liegt der Unterschied der Formulierung hauptsächlich in den Molekulargewichten der enthaltenen Poloxamere. Es scheint sich in diesem Fall die Mischung mit PPePr + PHIC mittlerer Viskosität mit mittlerem massenbezogenem Mittelwert des Poloxamer-molekulargewichts (Tabelle 4-2) am günstigsten auf die Permeationsrate auszuwirken. Da die ermittelten Werte bei PPePr + PHIC mittlerer Viskosität am höchsten sind, werden in den Folgeuntersuchungen Mischungen mit PHIC mittlerer Viskosität verwendet.

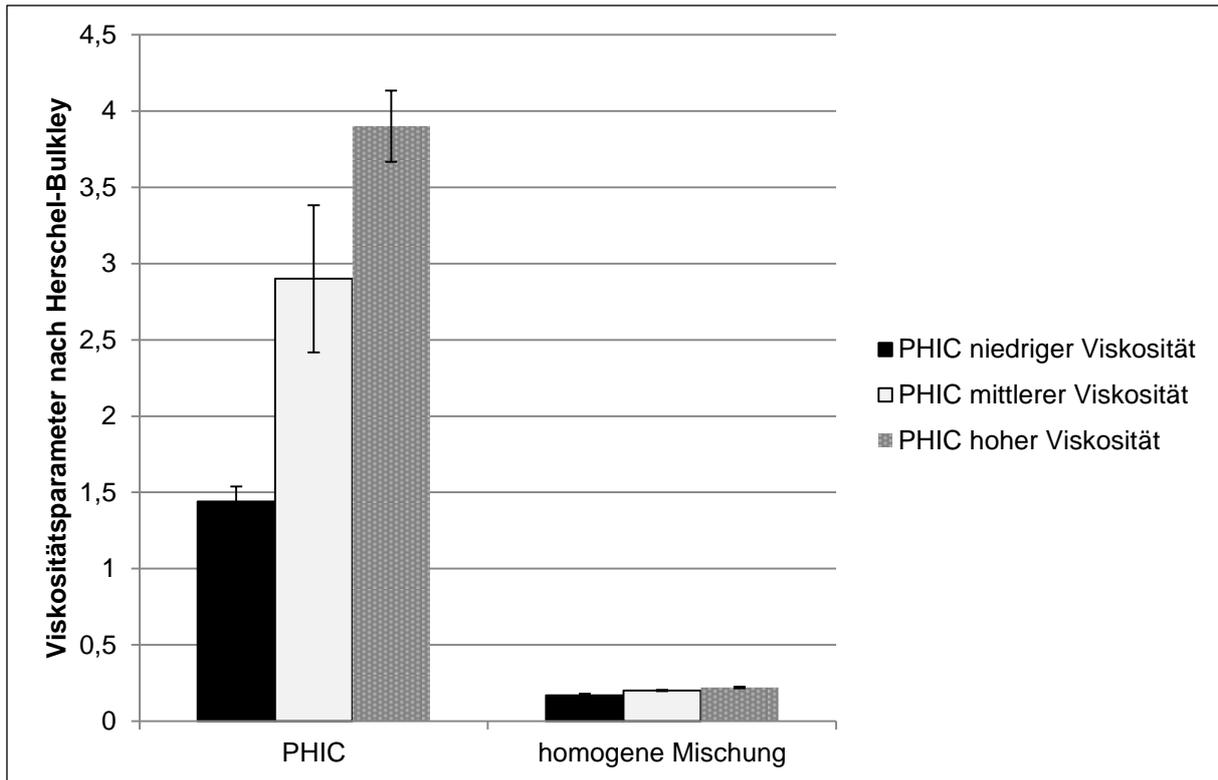


Abb. 71: Viskositätsparameter nach Herschel-Bulkley von PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität und der homogenen Mischung von PPePr + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität; $n = 3 - 6$, Fehlerbalken als Standardabweichung

4.4.2 Vergleich der Mischungen PPeX mit PHIC

Um den Einfluss von PPeX auf die Permeationsraten der Mischungen PPeX + PHIC zu untersuchen, werden in-vitro Permeationsuntersuchungen der verschiedenen Mischungen PPe, PPePr und PPeD mit PHIC mittlerer Viskosität durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 72 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass sich die permeierte Menge ALA der drei Zubereitungen nach 24 h kaum unterscheidet und bei allen Mischungen bei ca. $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ liegt. Es lässt sich daraus ableiten, dass die Wahl der PPeX-Zubereitung keinen signifikanten Einfluss auf die Permeationsrate der Mischung hat. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die verglichenen Mischungen sehr ähnlich in der Zusammensetzung sind. Die Viskosität ist bei allen Mischungen sehr gering. Die Komponenten der Mischungen PPeX + PHIC beruhen auf den Komponenten des Thermogels. Im Thermogel sind die Komponenten Poloxamer 407, Aqua purificata, Isopropylalkohol, Dimethylisobutylid und Propylenglykol dicaprylat dicaprat enthalten. Wie Grüning 2007 beschrieb, beruht die Permeationsförderung von Thermogel auf dem Synergismus aller enthaltenen Komponenten und geht über den rein additiven Effekt der jeweiligen Einzelkomponenten hinaus [Grüning, 2007]. In den Mischungen PPeX + PHIC ist mit 37,5 % bzw. 42,5 % ein großer Anteil an Pentylenglykol, einer weiteren Komponente enthalten, die möglicherweise auch permeationsfördernde Effekte beinhaltet. Vor diesem Hintergrund scheint die permeationsfördernde Wirkung der Komponenten in PPe + PHIC so

groß, dass ein 5 %iger Zusatz von Dimethylisobutylsorbit, wie er in PPeD + PHIC enthalten ist, keine weitere Verbesserung mit sich bringt. Auch Propylenglykol ist als Permeationsverbesserer bekannt, der durch diverse Mechanismen die Permeation von Arzneistoffen verbessert. Zum einen soll er über die Verbesserung der Löslichkeit des Arzneistoffes und der Verbesserung des Verteilungskoeffizienten in die Haut die Permeation verbessern. Zum anderen wird eine Interkalation in die polaren Kopfgruppen und die Membranlipide diskutiert. Eine Permeationsverbesserung durch den Anteil von 5 % Propylenglykol, wie er in PPePr + PHIC enthalten ist, ist hier allerdings nicht messbar. Es wird weiterhin mit PPePr + PHIC als Testformulierung weitergearbeitet, da in diversen Untersuchungen ein kleiner Trend zu höheren Werten zu erkennen war.

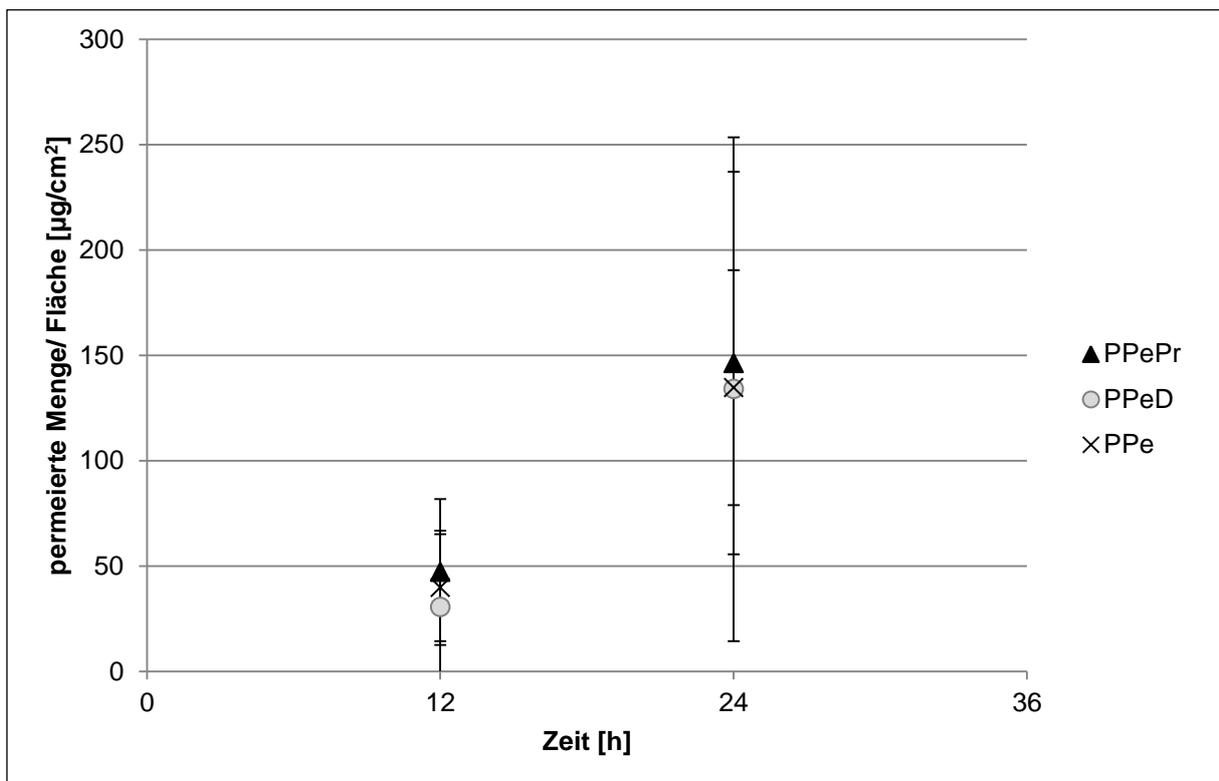


Abb. 72: Vergleich der Permeationen der Mischungen PPePr, PPeD und PPe mit PHIC mittlerer Viskosität; n = 5; Fehlerbalken als Standardabweichung

In Abb. 73 wird die Äquivalenz für die Mischungen PPeX mit PHIC mittlerer Viskosität untersucht. Die Quotienten der Mediane liegen bei den Mischungen PPeX + PHIC mittlerer Viskosität in diesem Grenzbereich. Zwischen diesen Formulierungen kann eine äquivalente Permeationsrate angenommen werden. Die Wahl der PPeX-Formulierung hat demnach keinen Einfluss auf die Permeation der Mischungen PPeX + PHIC.

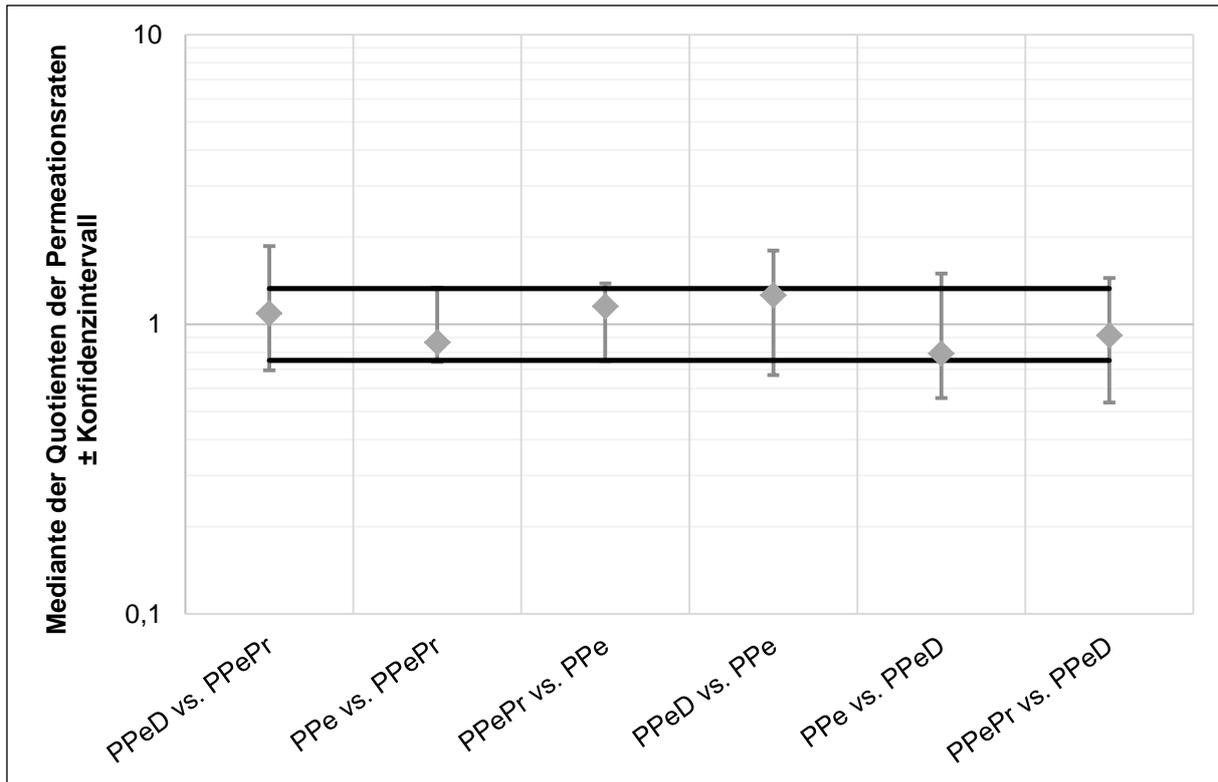


Abb. 73: Prüfung der Äquivalenz der Permeationsraten von Test- vs. Referenzformulierung: PPeD, PPe und PPePr mit PHIC; n = 5, Fehlerbalken als Konfidenzintervall des Medians

4.4.3 Vergleich von PPePr + PHIC, Thermogel und Ameluz

Um den Vergleich zu anderen Formulierungen zu erhalten, werden in-vitro Permeationsuntersuchungen mit Thermogel durchgeführt. Die Entwicklung der Zweikammerformulierungen beruht auf den Komponenten des Thermogels, das eine bis dato verbesserte Permeation von ALA im Vergleich zu Formulierungen des Arzneibuchs zeigte. Des Weiteren wird der Vergleich mit der Nanoemulsion Ameluz durchgeführt, das ein aktuelles Fertigarzneimittel mit ALA für die topischen PDT darstellt. Es zeichnet sich durch eine verbesserte Permeation und erhöhte Lagerstabilität aus.

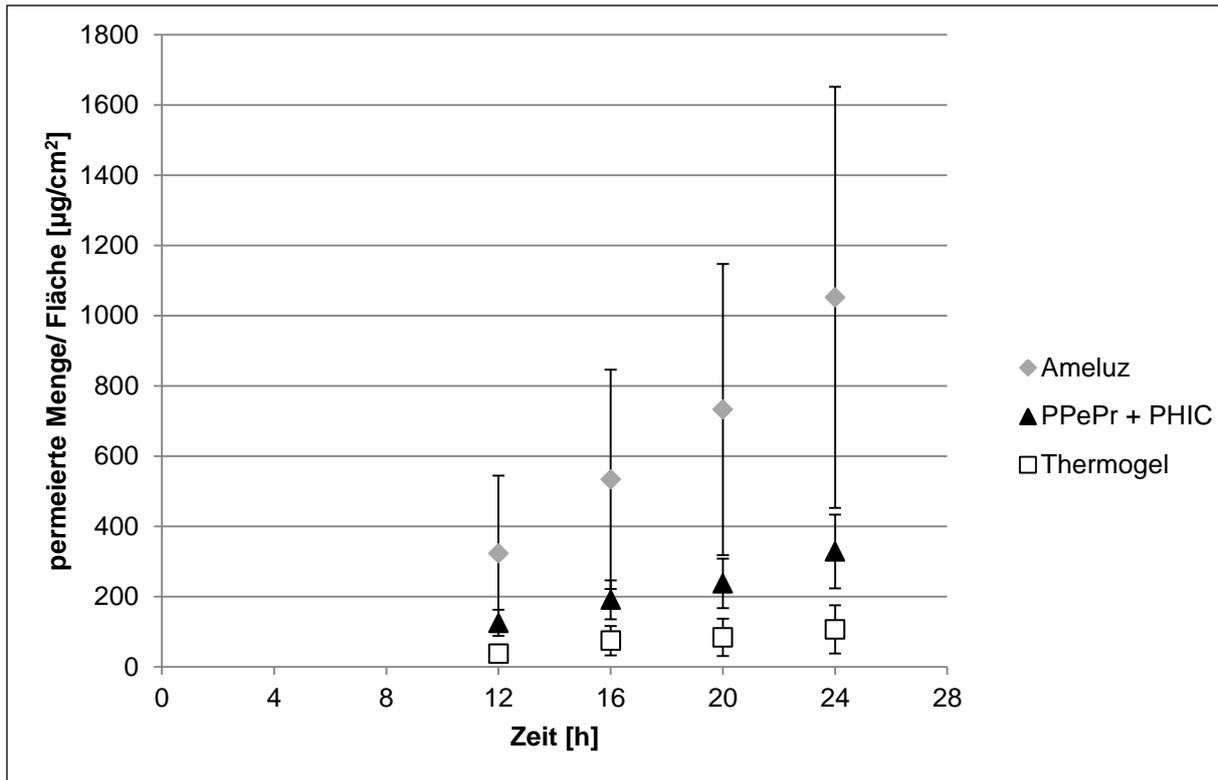


Abb. 74: Vergleich der Permeationen von Ameluz, Thermogel und der Mischung PPePr mit PHIC mittlerer Viskosität; n = 5, Fehlerbalken als Standardabweichung

Abb. 74 zeigt die Ergebnisse der vergleichenden Permeationsuntersuchung mit Ameluz, Thermogel und PPePr mit PHIC mittlerer Viskosität. Bei allen Formulierungen zeigt sich ein nahezu linearer Anstieg der permeierten Menge. Ameluz zeigt eine signifikant höhere Permeationsrate und damit einen signifikant höheren Permeationskoeffizienten (Tabelle 4-7) und auch die permeierte Menge nach 24 h ist signifikant höher als bei PPePr + PHIC und Thermogel. Ameluz, eine liposomale Nanoemulsion, ist als Vehikel für ALA sehr vorteilhaft. Hier ist der Wirkstoff im Gegensatz zu anderen liposomalen Formulierungen nicht im Lipidkern der Nanoemulsionspartikel enthalten, sondern an dessen äußere Membran gebunden. ALA ist also als polares Molekül an ein lipophiles Nanopartikel gebunden. Dieses Konstrukt ist deutlich weniger polar als ALA allein und so kann ALA gebunden an das Nanopartikel erfolgreich in die Haut geschleust werden [Roca, 2009]. Dies ist für den Therapieerfolg der PDT essentiell. Damit ist das Fertigarzneimittel Ameluz dem hier entwickelten System und Thermogel deutlich überlegen, denn in beiden Systemen ist ALA in einer wässrigen Formulierung enthalten und liegt damit bei der Permeation als Zwitterion vor. Das Vorhandensein von Permeationsverbesserern, wie es bei beiden Systemen der Fall ist, kann die Permeation nicht so weit verbessern, dass die gleiche Permeationsrate wie bei Ameluz resultiert. Allerdings zeigt PPePr + PHIC eine verbesserte Permeation von ALA im Vergleich zum Thermogel. Die Permeationsrate und die permeierte Menge nach 24 h sind nicht statistisch signifikant höher, ein Trend ist aber klar zu erkennen. Als Grund hierfür ist zum einen die deutlich

4. Ergebnisse und Diskussion

höhere Viskosität des Thermogels [Vgl. Grüning, 2007] zu nennen, das die Diffusion und damit Permeation von ALA behindert, zum anderen kann der hohe Anteil an Pentylenglykol in PPePr + PHIC einen Effekt als Permeationsverbesserer über den der anderen Komponenten hinaus ausüben.

Tabelle 4-7: Permeationsraten und Permeationskoeffizienten von PPePr + PHIC, Thermogel und Ameluz

Formulierung	Permeationsrate [$\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$]	Permeationskoeffizient [$\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$]
Ameluz	$59,6 \pm 39,1$	$7,7 * 10^{-4} \pm 5,0 * 10^{-4}$
PPePr + PHIC	$16,4 \pm 6,1$	$2,1 * 10^{-4} \pm 7,9 * 10^{-5}$
Thermogel	$5,4 \pm 5,4$	$6,9 * 10^{-5} \pm 6,9 * 10^{-5}$

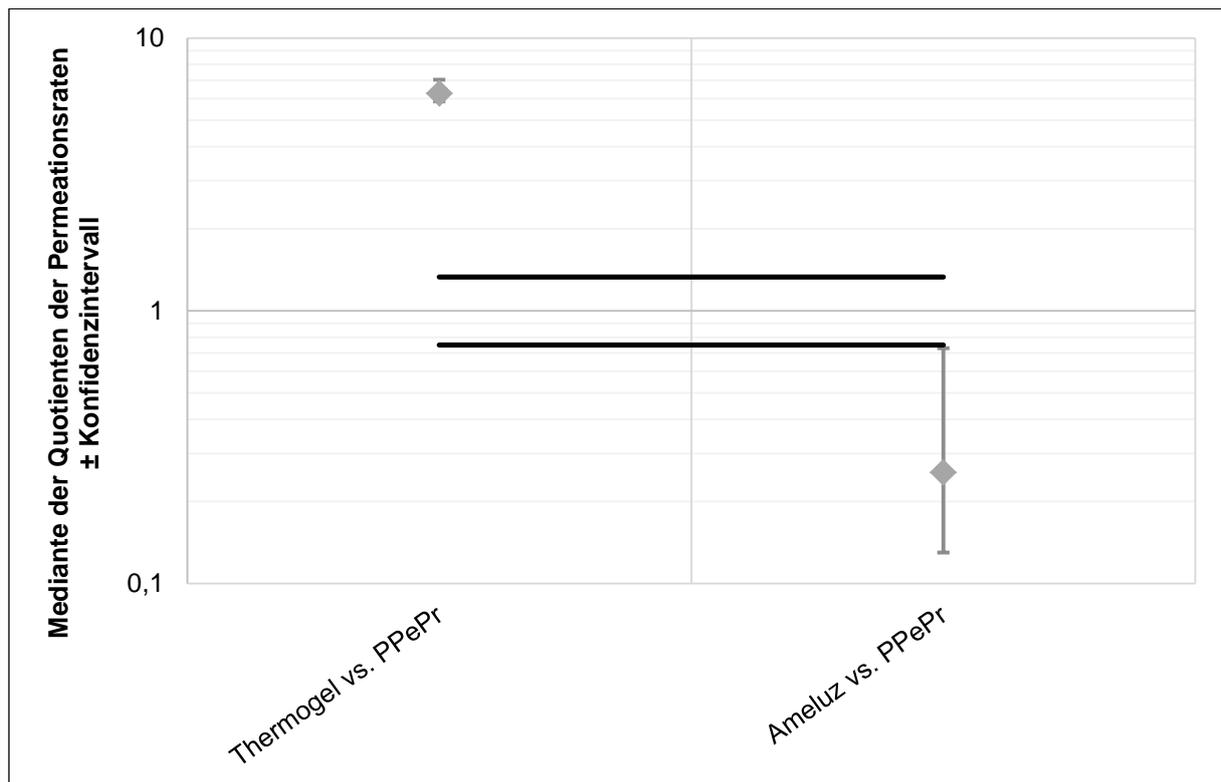


Abb. 75: Prüfung der Äquivalenz der Permeationsraten von Test- vs. Referenzformulierung: PPePr + PHIC, Ameluz und Thermogel, n = 5, Fehlerbalken als Konfidenzintervall des Medians

Abb. 75 zeigt die Äquivalenztestung von PPePr + PHIC mit Thermogel und Ameluz. Es wird deutlich, dass in diesem Fall keine Äquivalenz der Zubereitungen vorliegt.

5 Abschlussdiskussion

ALA ist ein Wirkstoff in der photodynamischen Therapie, der durch eine kurze Lagerstabilität in wässrigen Systemen gekennzeichnet ist. Zweikammersysteme ermöglichen die Lagerung von ALA in einem wasserfreien Vehikel, das eine verbesserte Lagerstabilität aufweisen soll. Außerdem soll das Zweikammersystem eine zweite, wasserhaltige Formulierung enthalten, die nach Mischung mit der wasserfreien, arzneistoffhaltigen Phase, ein applizierbares Vehikel für die Anwendung mit guten Permeationseigenschaften darstellt [Gander et al., 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür zwei halbfeste Formulierungen auf Grundlage der Komponenten des sogenannten Thermogels entwickelt. Das Thermogel stellt für ALA ein Vehikel mit deutlich verbesserten Permeationseigenschaften gegenüber monographierten Zubereitungen dar [Grüning, 2007]. Daher wurde auf Grundlage des Thermogels die wasserfreie Formulierung PPeX sowie die wasserhaltige Formulierung PHIC entwickelt. Es wurde dabei untersucht, ob die Einarbeitung von ALA in die wasserfreie Formulierung PPeX die Stabilität des Wirkstoffes verbessern kann. Dabei zeigt sich eine optimierte Stabilität von ALA in den wasserfreien Formulierungen im Vergleich zum Thermogel. Die physikalische Stabilität von PPeX wurde im Hinblick auf die Lagerstabilität des Systems im Zweikammersystem untersucht und ist abhängig von den enthaltenen Komponenten. Während PPe und PPePr über einen Lagerzeitraum von 12 Monaten nur einen geringen Anstieg der Viskosität zeigen, zeigt PPeD nach 6 Monaten einen deutlichen Anstieg der Viskosität und Fließcharakteristik. Bei der wasserhaltigen Formulierung PHIC wurde mit Hilfe eines statistischen Versuchsdesigns der Zusammenhang zwischen Viskosität und resultierender Stabilität ermittelt. Daraus wurden drei Formulierungen mit aufsteigender Viskosität ausgewählt und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Zur Untersuchung der Homogenität wurden 2 Methoden entwickelt, die Überprüfung der Farbhomogenität und die Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit. Die Ergebnisse der Überprüfung der Farbhomogenität können zeigen, dass der Mikromischer bei Vorliegen bestimmter Viskositätseigenschaften der Zubereitungen fähig ist, homogene Mischungen zu erzeugen. Die Homogenitätsuntersuchungen mittels Überprüfungen der Gehaltseinheitlichkeit können Aussagen über die Mischungsgüte der im Zweikammersystem verwendeten halbfesten Zubereitungen machen. Da für eine einfache Handhabung niedrige Auspresskräfte von Vorteil sind, wurden auch rheologische Messungen und Messungen der Auspresskräfte durchgeführt. Über die Messung der Auspresskräfte der Einzelkomponenten und homogenen Mischungen lassen sich Rückschlüsse ziehen, wie die Auspresskräfte bei Mischung zweier Komponenten zustande kommen. Über in-vitro Permeationsuntersuchungen wurde untersucht, ob die Mischung aus dem Zweikammersystem vergleichbare und bessere Permeationseigenschaften als das Thermogel zeigt. Dabei zeigt sich

ein Trend zu besseren Permeationswerten. Diese sind allerdings dem aktuellen Fertigarzneimittel Ameluz unterlegen.

5.1 Chemische Stabilität von ALA

Bei der Degradation von ALA fallen die Kondensationsprodukte DHPY und PY an, die eine gelbe Färbung aufweisen. Entsprechend dieser Gelbfärbung wird das Vorhandensein an Abbauprodukten bestimmt. Dabei wird die Stabilität von ALA in den wasserfreien Formulierungen PPe, PPeD und PPePr mit der im wasserhaltigen Thermogel verglichen. Aus HPLC-Untersuchungen lässt sich sagen, dass bei Lagerung von ALA in PPeX bei 25 °C nach 6 Monaten noch etwa 60 % des Wirkstoffes vorhanden sind. Aus den Stabilitätsuntersuchungen mittels Zentralwertmessung zeigt sich, dass bereits nach 4 Wochen Lagerung bei 40 °C bei Thermogel ein dramatischer Anstieg an Abbauprodukten zu verzeichnen ist, während die wasserfreien Formulierungen PPeX nur kleine Anstiege verzeichnen. Nach 7 Monaten Lagerung bei 25 °C ist bei Thermogel ein massiver Anteil an Abbauprodukten vorhanden, während die wasserfreien Formulierungen nach 13 Monaten Lagerung bei 25 °C deutlich darunter liegen. Demnach ist der Abbau von ALA bei Lagerung in wasserfreien Zubereitungen deutlich verlangsamt. Beim Thermogel liegt ALA in der Wasserphase unstabilisiert vor, die Dimerisierung als erster Schritt der Kondensation kann ablaufen. Daher weist ALA bei Einarbeitung in Thermogel nur eine geringe Stabilität auf. Bei den wasserfreien Formulierungen liegt ALA in Pentylenglykol gelöst vor. Diese stellt ein weniger polares Lösungsmittel als Wasser dar. Das Enol von ALA bildet sich zumindest teilweise in Flüssigkeiten, die weniger polar sind als Wasser und stellt eine unpolarere Konformation von ALA dar als das Keton (siehe Abb. 76). Diese unpolarere Konformation stabilisiert ALA und verzögert die Dimerisierung und damit den Abbau ALAs [Gander et al., 2003]. In PPe liegt ALA in einem Gel aus Poloxamer und Pentylenglykol vor. Daher liegt die Enolform in diesem System begünstigt vor. Propylenglykol ist aus der homologen Reihe der divalenten Alkohole und unterscheidet sich von Pentylenglykol in der um 2 C-Atome kürzeren Kette. Damit ist Propylenglykol etwas polarer als Pentylenglykol, was durch den nach Fedors berechneten Löslichkeitsparameter bestätigt wird (Tabelle 5-1) [Fedors, 1974]. Ist im vorliegenden System neben Poloxamer und Pentylenglykol auch 10 % Propylenglykol enthalten, verschiebt sich das Keto-Enol-Gleichgewicht leicht zu Ungunsten des Enols. Die stabilisierende Wirkung der Enolform auf den ALA-Abbau ist vermindert. Daher wird ALA in PPePr schneller abgebaut als in PPe. Auch bei PPeD wird das Gel bestehend aus Poloxamer und Pentylenglykol durch den Anteil von 10 % Dimethylisorbid verändert. Die Löslichkeitsparameter von Dimethylisorbid ist allerdings niedriger als der von Pentylenglykol. Damit ist Dimethylisorbid unpolarer als Pentylenglykol und müsste die Keto-Enol-Tautomerie mehr in Richtung des Enols verschieben und damit den Abbau von ALA stabilisieren. Dies ist in diesen Untersuchungen nicht der Fall. Während Propylenglykol und Pentylenglykol strukturell sehr verwandt sind und sich hier

eine Polaritätsveränderung deutlich auswirkt, besteht bei Dimethylisorbid und Pentylenglykol strukturell ein großer Unterschied. Daher gibt es möglicherweise andere Faktoren, die auf die Stabilität Einfluss haben und die schlechtere Stabilität von ALA im System PPeD im Vergleich zu PPe erklären.

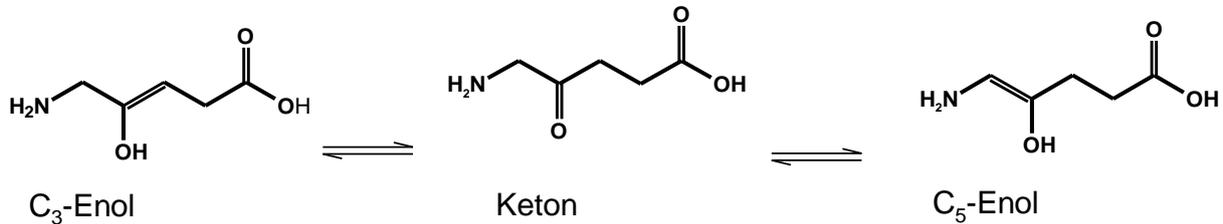


Abb. 76: Keto-Enol-Tautomerie von ALA [Gander et al., 2003]

Tabelle 5-1: Löslichkeitsparameter von Propylenglykol, Dimethylisorbid und Pentylenglykol, berechnet nach [Fedors et al., 1974]

Substanz	Löslichkeitsparameter δ [(J·mL) ^{0,5}]
Propylenglykol	32,6
Dimethylisorbid	26,2
Pentylenglykol	28,6

5.2 Physikalische Stabilität der Zubereitungen

Die physikalische Stabilität der wasserfreien Zubereitungen PPeX wird über einen Zeitraum von 12 Monaten durch rheologische Messungen untersucht. Bei PPeD zeigt sich innerhalb der ersten drei Monate keine Veränderung der Fließeigenschaften. Nach 6 Monaten Lagerung zeigt sich allerdings eine starke Verdickung der Zubereitung mit einem großen Anstieg der Viskosität. Dies ist auf die verdickenden Eigenschaften von Dimethylisorbid in tensidhaltigen Formulierungen zurückzuführen [Cognis / jetzt BASF Personal Care and Nutrition GmbH, 2006-2011]. Der Mechanismus dieser Verdickung ist in der Literatur allerdings nicht beschrieben. PPe zeigt über den Zeitraum von 3 Monaten keine Veränderung des Fließverhaltens. Nach 6 Monaten zeigt sich eine kleine Viskositätserhöhung. Auch bei PPePr bleiben die Messkurven des Rheogramms innerhalb der ersten vier Wochen konstant und zeigen nach 3 Monaten ebenfalls einen kleinen Anstieg der Fließgrenze und der Messkurve.

Im Laufe der Zeit unterliegen die Systeme einer Strukturveränderung. Poloxamermoleküle diffundieren und der Aufbau der vorhandenen Tensidaggregate verändert sich. Auch eine

Verdickung bzw. Viskositätserhöhung findet durch eine verstärkte Ausbildung des Gelgerüsts statt. Die Erhöhung der Viskosität geht bei allen Zubereitungen in polarisationsmikroskopischen Aufnahmen mit einer Abschwächung der Texturen einher. Diese sind durch die stärkere Solvatation der Poloxamermoleküle zu erklären. Diese Solvatation könnte auch eine veränderte Aggregation der Poloxamermoleküle begünstigen und damit die Strukturveränderungen mit erklären. Zusammenfassend zeigen PPe und PPePr die konstantesten rheologischen Eigenschaften und sind dadurch für den Gebrauch im Zweikammersystem am besten geeignet.

Werden Zubereitungen in einem Zweikammersystem verwendet, unterliegen sie beim Gebrauch einer gewissen Scherung. Daher wird untersucht, welchen Einfluss eine einmalige Rehomogenisierung von PPe und PPePr auf die Viskosität des Systems hat. Hier werden nur die Untersuchungen von PPe vorgestellt. Es lässt sich zeigen, dass sich die Fließgrenze und die Messkurven durch eine einmalige Scherung senken lässt, die Ursprungsmesskurve dadurch aber nicht erreicht wird. Bei weiterer Lagerung kommt es auch wieder zu einem Ansteigen der Fließgrenze und der Messkurven. Durch eine einmalige Rehomogenisierung kann die Struktur nur geringfügig verändert werden. In polarisationsmikroskopischen Aufnahmen lässt sich kein Effekt der Scherung auf die Texturen beobachten. Die nach 6 Monaten vermindert auftretenden Texturen sind auch nach einer Rehomogenisierung nach wie vor schwach ausgeprägt. Eine mit der Zeit stärker eintretende Solvatation der Poloxamermoleküle und der damit verbundenen Veränderungen der Tensidaggregation kann durch die Scherung also nicht verändert werden. Die Scherung bewirkt den scherungsbedingten Abbau von Gerüststrukturen, was das Absinken der Fließgrenze und der Messkurve erklärt. Die Gerüststrukturen bauen sich im Laufe der weiteren Lagerzeit aber wieder auf.

Bei der wasserhaltigen Formulierung PHIC handelt es sich um eine streichfähige Emulsion. Das eingesetzte Poloxamer wirkt viskositätserhöhend [van Hemelrijck, 2011] und kann das System durch den Aufbau eines Gerüsts stabilisieren. Da Emulsionen thermodynamisch instabile Systeme darstellen, kommt es nach einiger Zeit immer zu Instabilitäten. Aufräumung, Sedimentation und Flockung sind reversible Phänomene, die sich durch Aufschütteln des Systems wieder beheben lassen [Kutz et al., 2011]. Beim statistischen Versuchsdesign zur Optimierung der Stabilität von PHIC werden drei Formulierungen generiert, die nach einiger Zeit Aufräumungstendenzen zeigen. Dabei sind die Formulierungen 4, 8 und 12 Tage stabil, bevor Aufräumung einsetzt. Daher müssen diese Systeme vor der Verwendung aufgeschüttelt werden. Ein regelmäßiger Gebrauch, der das Schütteln des Systems beinhaltet, könnte möglicherweise helfen, die Instabilität zu vermeiden.

5.3 Methoden zur Untersuchung der Homogenität

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Methoden zur Untersuchung der Homogenität entwickelt, die Überprüfung der Farbhomogenität gefärbter Mischproben und die Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit von Mischproben mit Wirkstoff. In Kapitel 4.3.3 werden beide Methoden ausführlich vorgestellt und gegenübergestellt. Ein wesentlicher Unterschied beider Methoden ist die Probengröße, die verwendet wird. Während bei der Überprüfung der Farbhomogenität nur ein Bildausschnitt vermessen wird, dessen Masse nur 0,2467 g beinhaltet, wird bei der Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit ca. 3 g Probe verwendet. Bei Feststoffmischungen ist die Varianz der Massenkonzentration nach Stange, Poole und Taylor von der Gesamtmasse der Probe abhängig [Sommer, 1979]. Damit wird die ermittelte Homogenität schlechter, je kleiner die Einzelproben sind. Somit hat die Probengröße auf das Ergebnis Einfluss. Bei Proben, in denen viele Teilchen enthalten sind, nähert sich die Varianz (bzw. Variationskoeffizient) asymptotisch einer durch die Messgenauigkeit bestimmten Konstanten an. Die Probengröße bestimmt u.a. bei hinreichender genauer Messtechnik die maximale Mischungsgüte einer Mischung [Eichstädt, 1997]. Demnach müssten bei den Homogenitätsuntersuchungen mittels Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit leichter gute Mischungsgüten nachgewiesen werden können, sofern diese vorliegen. Bei der Überprüfung der Farbhomogenität dürfte es demnach schwieriger sein, eine gute Homogenität nachzuweisen. Allerdings werden bei den Untersuchungen dieser Mischproben gute Mischungsgüten erzielt. Der Grund hierfür ist, dass bei fluiden Proben selbst in kleinen Mischproben die Partikelanzahl sehr hoch liegt und daher der Einfluss der stochastischen Variabilität in den Ergebnissen zu vernachlässigen ist [Eichstädt, 1997].

5.4 Einfluss der Zubereitungen auf die Homogenität

Betrachtet man die Homogenitäten bei Mischung der uneingefärbten Zubereitungen PPe mit PHICs niedriger, mittlerer und hoher Viskosität aus der Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit, resultieren ausschließlich mäßige Homogenitätswerte um die 55 %. In allen drei untersuchten Mischungsproben kommt es nur unzureichend zur Bildung von chaotischer Advektion an den Rillenstrukturen des Mikromischers. Die Mischungsvorgänge beruhen hauptsächlich auf der stattfindenden Diffusion und der Auflösung der Gel/Cremestruktur in der Grenzfläche. Es ist kein Effekt der verschiedenen Viskositäten der Zubereitungen auf die resultierende Homogenität zu erkennen. Auch wenn die Viskosität von PHIC ansteigt und damit die Viskositätsunterschiede größer werden, so hat dies keinen Einfluss auf die Homogenität. Die Mischmuster zeigen, dass beide zu mischenden Komponenten, auch bei größeren Viskositätsunterschieden, im Verhältnis 1+1 gefördert und gemischt werden und eine mäßige Homogenität resultiert.

Bei den eingefärbten Zubereitungen PPe und PHIC niedriger Viskosität zeigt sich mit einer Homogenität von 62,5 % ein ähnliches Bild. Bei den eingefärbten Zubereitungen PPe und PHIC mittlerer und hoher Viskosität zeigen sich allerdings mit im Durchschnitt 83,9 % und 92,4 % gute Homogenitätswerte. Es zeigt sich, dass ein ausreichend großer Unterschied der Viskositäten bzw. Auspresskräfte ($\geq 179,7$ N) der zu mischenden Zubereitungen das Mischresultat verbessern kann. Werden zwei ungleiche Zubereitungen gemischt, entsteht in der Grenzfläche ein Druckunterschied, der zu einem stabilen Fluss beider Komponenten führt. Dadurch resultiert ein schlechtes Mischresultat [Xia et al., 2010]. Ist der Unterschied zwischen PPe und PHIC groß genug, kann dieser hohe Druckgradient den Fluss beider Komponenten destabilisieren. In deren Grenzfläche entsteht durch einen Auflösprozess von PPe und PHIC die Mischung mit deutlich niedrigerer Viskosität. Je größer also die Unterschiede in Viskosität und Auspresskraft und damit je höher der Druckgradient zwischen PPe und PHIC ist, umso mehr thermische Energie kann in der Grenzfläche freigesetzt werden, wenn durch den Auflösprozess von PPe und PHIC die Viskosität der Mischung abfällt. Diese thermische Energie führt zu einer guten Vermischung beider Komponenten. Möglicherweise treten auch chaotische Advektion oder Turbulenzen an den Rillenstrukturen des Mikromischers auf, die für eine weitere Vermischung sorgen. Es resultiert eine homogene Mischung, die resultierende Mischhomogenität ist gut.

5.5 Eignung des Mikromischers

Der Mikromischer ist ein Herringbone-Mischer, dessen innere Rillenstruktur chaotische Advektion erzeugen soll [Gransee, R., 2010]. In Mikromischern liegen in der Regel Reynoldszahlen kleiner 100 vor [Capretto et al., 2011, Stroock et al., 2002]. Da der Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung bei deutlich höheren Reynoldszahlen erfolgt, kommen turbulente Strömungen in Mikromischern üblicherweise nicht vor [Nguyen et al., 2002]. Die Mischung erfolgt über Diffusion und Advektion [Capretto et al., 2011]. Darüber hinaus wird versucht, durch Fließhindernisse über die Erzeugung von chaotischer Advektion das Mischresultat zu verbessern [Aref, 2002, Capretto et al., 2011]. Werden nun halbfeste Zubereitungen verwendet, welche noch deutlich höhere Viskositäten als üblicherweise verwendete Fluide wie Wasser und Glycerol aufweisen, wird die Reynoldszahl weiter verkleinert. Dies erschwert die Bildung chaotischer Advektion, die für die Verbesserung der Mischungsgüte notwendig ist. Außerdem verringert eine höhere Viskosität den Diffusionskoeffizienten, der in die Ficksche Diffusionsgleichung eingeht, und damit den Massenfluss.

Die Homogenitätsuntersuchungen der uneingefärbten Zubereitungen mit ALA, die bei der Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit verwendet werden, zeigen, dass bei Mischung zweier halbfester Zubereitungen durch den Mikromischer keine homogenen Mischungen resultieren. Eine Mischung zweier halbfester Komponenten erfolgt durch Diffusion und den Auflöspro-

zess von PPeX und PHIC in der Grenzfläche. Der Mikromischer ist demnach nicht geeignet, zwei halbfeste Systeme in ausreichender Qualität zu mischen. Bessere Homogenitätswerte kann der Mikromischer nur liefern, wenn Viskositätseigenschaften der Zubereitungen auftreten, die die Homogenität begünstigen. Dies ist der Fall, wenn sich die zu mischenden Komponenten bei Kontakt auflösen und diese Lösung eine niedrige Viskosität zeigt und wenn die zu mischenden Zubereitungen außerdem sehr unterschiedliche Viskositäten bzw. Auspresskräfte aufweisen. Zeigt die Differenz der Auspresskräfte PPe + PPe und PHIC + PHIC Werte über 179,7 N, so liefert der Mikromischer verbesserte Mischeffizienzen.

5.6 Auspresskräfte

Bei den Auspresskräften ist das Bestreben, Systeme mit möglichst niedrigen Auspresskräften zu generieren, um die von Hand aufwendbare Auspresskraft nicht zu übersteigen. Bei den eingefärbten Formulierungen, die bei der Überprüfung der Farbhomogenität verwendet werden, liegen die Auspresskräfte der Mischungen PPe + PHIC niedriger Viskosität zu PPe + PHIC hoher Viskosität zwischen 140 - 186 N. Bei den uneingefärbten Formulierungen, die für die Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit verwendet werden, ergibt sich ein anderes Bild. Die Mischungen PPe + PHIC niedriger bis PPe + PHIC hoher Viskosität liegen zwischen 235 – 265 N. In internen Untersuchungen wurde die praktische Handhabbarkeit der Auspresskräfte von in Spritzen abgefüllte Zubereitungen durch den Mikromischer untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Kräfte bis ca. 40 N gut handhabbar, ab 60 N nicht mehr gut handhabbar und Anwendung mit 250-300 N praktisch unmöglich waren [Hermann, 2014]. Und auch Kircher zeigte, dass mit dem Dreifingergriff, der zum Beispiel beim Niederdrücken einer Dose mit Zeige,- Mittelfinger und Daumen von Männern Kräfte bis ca. 115 N und von Frauen bis ca. 75 N aufgebracht werden können [Kircher, 2007]. Demnach sind die Auspresskräfte in einem Bereich, der die praktische Anwendung nur schwer ermöglicht.

Ein weiterer Punkt dieser Arbeit beschäftigte sich damit, ob die resultierende Auspresskraft einer Mischung zweier Komponenten in Abhängigkeit der resultierenden Homogenität berechnet werden kann. Dabei wurde eine Hypothese aufgestellt, die besagt, dass bei zwei zu mischenden Komponenten mit guter resultierender Homogenität, sich die gemessene Auspresskraft aus den Auspresskräften der Einzelkomponenten sowie der Auspresskraft der homogenen Mischung anteilig ihrer Wegstrecke zusammensetzt („Partialauspresskraft“, Gleichung 4.3-1). Die Zufuhrkanäle machen jeweils 25 % der Wegstrecke aus, daher gehen die Auspresskräfte der Einzelkomponenten mit je 25 % in die Formel mit ein. Im Mischkanal dominiert die homogene Mischung und so geht die Auspresskraft der homogenen Mischung mit 50 % in die Berechnung ein. Im Gegensatz dazu resultiert die Auspresskraft bei Mischungen mit unzureichender Homogenität nur aus den Auspresskräften der Einzelkomponenten („Mittelwertsauspresskraft“, Gleichung 4.3-2). In den Zufuhrgängen gehen wiederum

die Auspresskräfte der Einzelkomponenten mit je 25 % in die Berechnung ein. Die Auspresskraft der homogenen Mischung geht hier nicht mit ein, da eine homogene Mischung beider Komponenten im Mischkanal nicht in ausreichender Menge entsteht. Daher gehen im Mischkanal nochmals die Auspresskräfte der Einzelkomponenten mit je 25 % in die Berechnung ein, da beide Komponenten im Verhältnis 1+1 gefördert werden. Die Untersuchungen zeigen, dass die Auspresskräfte der Mischungen der eingefärbten Zubereitungen PPe und PHIC mittlerer und hoher Viskosität, die mit im Durchschnitt 83,9 % und 92,4 % gute Homogenitätswerte zeigen, die ermittelten Auspresskräfte mit den „Partialauspresskräften“ und nicht mit den „Mittelwertsauspresskräften“ übereinstimmen. Bei der Mischung der eingefärbten Zubereitungen PPe und PHIC niedriger Viskosität liegt die Homogenität bei 62,5 %. Die Homogenität ist deutlich schlechter als bei PPe + PHIC mittlerer und hoher Viskosität. Hier lässt sich die ermittelte Auspresskraft nicht eindeutig der „Partialauspresskraft“ oder der „Mittelwertsauspresskraft“ zuordnen. Der ermittelte Wert liegt zwischen beiden berechneten Werten. Dies ist dadurch zu erklären, dass bei einer Homogenität von 62,5 % keine absolut gute Homogenität resultiert, es aber trotzdem noch dazu kommt, dass eine homogene Mischung entsteht. Es liegen die beiden zu mischenden Komponenten im Mischkanal also weder parallel ungemischt nebeneinander, noch dominiert die homogene Mischung. Daher nehmen im Mischkanal sowohl die Auspresskräfte der Einzelkomponenten als auch die Auspresskraft der homogenen Mischung Einfluss auf die resultierende Auspresskraft. Bei den Mischungen der uneingefärbten Zubereitungen PPe mit ALA und PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität liegen die Homogenitätswerte mit im Durchschnitt 52 %, 57 % und 53 % nochmals niedriger als bei den Mischungen der eingefärbten Zubereitungen. Hier stimmen die ermittelten Auspresskräfte mit den berechneten „Mittelwertsauspresskräften“ überein. Die Hypothese, dass sich die Auspresskräfte von Mischungen entsprechend ihrer Homogenität berechnen lassen, lässt sich also bestätigen. Im Umkehrschluss lässt sich sagen, dass der Vergleich der ermittelten mit den berechneten „Partial- und Mittelwertsauspresskräften“ eine Abschätzung über die vorliegende Homogenität der Mischung ermöglicht.

5.7 In-vitro Permeationseigenschaften

Bei den in-vitro Permeationsuntersuchungen werden die verschiedenen Mischungen PPeX + PHIC in Bezug auf ihre Permeationseigenschaften untersucht. Dabei werden Mischungen mit PPePr und der drei PHIC-Formulierungen niedriger, mittlerer und hoher Viskosität miteinander verglichen. Dabei ist ein ansteigender Trend von Mischungen mit PHIC hoher Viskosität, über Mischungen mit PHIC niedriger Viskosität zu Mischungen mit PHIC mittlerer Viskosität zu erkennen. Da sich die Mischungen nur sehr gering in ihren Viskositäten, aber deutlich in ihrer Zusammensetzung der verschiedenen Poloxamere unterscheiden, ist ein mittlerer, massenbezogener Mittelwert des Poloxamermolekulargewicht dabei am vorteilhaftesten.

Daher wurden für die weiteren Untersuchungen Mischungen mit PHIC mittlerer Viskosität untersucht.

Vergleicht man Mischungen der drei verschiedenen wasserfreien Formulierungen PPe, PPePr und PPeD mit PHIC, so zeigen die Permeationsraten äquivalentes Verhalten. Der Anteil von 5 % Propylenglykol in PPePr + PHIC bzw. 5 % Dimethylisobutylol in PPeD + PHIC kann keinen zusätzlich permeationsverbessernden Effekt im Vergleich zu PPe + PHIC zeigen.

Thermogel stellt die Ausgangsformulierung für die Entwicklung der Formulierungen PPePr + PHIC des Zweikammersystems dar. Beim Vergleich von Thermogel und PPePr + PHIC konnte ein klarer Trend zur Verbesserung der Permeationsrate von PPePr + PHIC im Vergleich zum Thermogel gezeigt werden. Thermogel zeigt eine vergleichbar hohe Viskosität [Vgl. Grüning, 2007] der Zubereitung im Gegensatz zu der Mischung PPePr + PHIC. Darüber hinaus enthält die Mischung PPePr + PHIC mit 37,5 % einen hohen Anteil an Pentylenglykol. Während im Thermogel alle Komponenten einen synergistischen Effekt zur Permeationsförderung haben [Grüning, 2007], kann das im Unterschied dazu enthaltene Pentylenglykol in PPePr + PHIC diese permeationsfördernden Effekte weiter steigern. Systematische Untersuchungen zu den permeationsfördernden Effekten von Pentylenglykol sind in der Literatur allerdings nicht vorhanden. Gegenüber Ameluz, dem aktuellsten zugelassenen Fertigarzneimittel kann keine Überlegenheit von PPePr + PHIC gezeigt werden. PPePr + PHIC ist Ameluz in den Untersuchung deutlich unterlegen. Die Bindung von ALA an das enthaltene Lecithin der lipophilen Nanopartikel kann ALA erfolgreich durch die Haut schleusen und zeigt daher deutlich höhere Permeationswerte.

Aufgrund der Hautpräparation sind die Standardabweichungen der Messungen recht hoch. Da wegen der hohen Polarität von ALA Permeationsuntersuchungen durch Hautstücke mit der üblichen Dicke von 1,0 mm nicht möglich sind, wurde die Dermatomisierungsdicke mit 0,2 mm gewählt. Da die Dermatomisierung immer abhängig vom „Handling“ ist, wirken sich Schwankungen in der Präparation deutlich gravierender aus als bei Hautdicken von 1,0 mm.

6 Zusammenfassung

Da der Wirkstoff ALA, der in der photodynamischen Therapie topisch zur Anwendung kommt, eine nur sehr geringe Lagerstabilität zeigt und als polares Molekül nur schlecht durch die Haut permeieren kann, war das Ziel dieser Arbeit Zubereitungen für ein Zweikammersystem für ALA zu entwickeln. Dabei sollte die Stabilität von ALA durch Lagerung in einer wasserfreien Formulierung verbessert werden. Durch Mischung der Zubereitung mit einer wasserhaltigen Zubereitung sollte eine homogene Mischung entstehen, die appliziert werden kann. Als Komponenten sollten die Inhaltsstoffe des Thermogels verwendet werden, das bereits eine Permeationsverbesserung gegenüber monographierten Formulierungen zeigen konnte, um eine weitere Verbesserung der Permeation zu erreichen. Auf die Untersuchungen der Homogenität nach Mischung beider Komponenten mittels Mikromischer wurde ein wichtiges Augenmerk gelegt.

Die vorliegende Arbeit stellt jeweils drei wasserfreie (PPE, PPeD und PPePr) und drei wasserhaltige Formulierungen (PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität) vor, die im Zweikammersystem verwendet werden können. Für die Stabilitätsuntersuchungen von ALA stellten sich HPLC-Untersuchungen als ungeeignet heraus. Daher wurde eine Farbuntersuchung entwickelt, mit der der Anfall an Abbauprodukten bestimmt werden konnte. Es zeigt sich, dass ALA bei Lagerung in den wasserfreien Zubereitungen PPeX deutlich stabiler ist als bei Lagerung im Thermogel. Dabei zeigt sich in PPe die beste Stabilität. Um die physikalische Stabilität der Zubereitungen über einen Lagerzeitraum von 12 Monaten zu untersuchen, wurden rheologische Untersuchungen durchgeführt. Während PPeD innerhalb der Lagerzeit einen deutlichen Viskositätsanstieg zeigt, sind bei PPe und PPePr nur kleine Anstiege der Viskosität über die Lagerzeit zu verzeichnen. Diese sind daher über den Lagerzeitraum für die Anwendung am besten geeignet. Eine Rehomogenisierungsuntersuchung macht deutlich, dass ein gewisser Anstieg der Viskosität von PPe und PPePr durch eine einmalige Scherung nicht verhindert werden kann. Bei den wasserhaltigen Zubereitungen PHIC wurde mit Hilfe eines statistischen Versuchsdesigns die Abhängigkeit der Viskosität mit der resultierenden Stabilität bestimmt. Je höher die Viskosität, umso höher ist die Stabilität. Für die Untersuchung der Homogenität nach Mischung mittels Mikromischer wurden zwei Methoden entwickelt. Zum einen wurden Zubereitungen eingefärbt, gemischt und die Farbhomogenität der Mischung untersucht. Andere Untersuchungen verwendeten die uneingefärbten Zubereitungen mit Wirkstoff. Hier wurde die Homogenität über die Bestimmung der Gehaltseinheitlichkeit bestimmt. Da es sich bei den zwei Methoden zur Untersuchung der Homogenität durch das Einarbeiten von Farbstoffen um unterschiedliche Formulierungen handelt, lassen sich die Homogenitätswerte beider Methoden nicht direkt vergleichen. Für eine Aussage über die Homogenität der originalen Zubereitungen PPe + PHIC sind die Untersuchungen

zur Homogenität mittels Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit die relevanteren Ergebnisse. Die Homogenitätsuntersuchungen zeigen, dass der Mikromischer grundsätzlich nicht geeignet ist, halbfeste Zubereitungen homogen zu mischen. Die resultierenden Mischungsgüten ergeben eine unzureichende Homogenität. Eine gute Homogenität kann mit dem Mikromischer nur erreicht werden, wenn Viskositätseigenschaften der Zubereitungen vorliegen, die die Homogenität begünstigen. Bei Vorliegen hoher Viskositätsunterschiede bzw. hohe Unterschiede der Auspresskräfte der zu mischenden Komponenten ($\geq 179,7$ N) sowie eine sehr niedrige Viskosität der homogenen Mischung beider Komponenten resultieren gute Homogenitätswerte. Für die Pumpfähigkeit der Zubereitungen und die Handhabbarkeit des Zweikammersystems sind niedrige Auspresskräfte notwendig. Daher wurden die Auspresskräfte der Mischungen bestimmt. Die Auspresskräfte der Mischungen liegen zwischen 140 N – 265 N. Damit sind die aufzuwendenden Kräfte für eine einfache manuelle Betätigung zu hoch. Über die Messung der Auspresskräfte der zu mischenden Komponenten sowie der homogenen Mischungen lässt sich zeigen, dass die resultierenden Auspresskräfte abhängig von den Auspresskräften der Einzelkomponenten und je nach Homogenität auch von der Auspresskraft der entstehenden Mischung sind. Damit lässt sich die Auspresskraft entsprechend der Mischungsgüte rechnerisch ermitteln. Mit Hilfe von Mischmustern lässt sich zeigen, dass beide zu mischenden Komponenten im Verhältnis 1+1 durch den Mikromischer gefördert werden. Bei einem 2 %igen Wirkstoffgehalt in der wasserfreien Zubereitung PPeX resultiert nach Mischung mit PHIC durch den Mikromischer eine 1 %ige Zubereitung zur Applikation. Zur Untersuchung der Permeationseigenschaften wurden in-vitro Permeationsuntersuchungen mit auf 0,2 mm dermatomisierter Schweinehaut durchgeführt. Vergleicht man Mischungen mit unterschiedlichen PHIC-Komponenten, zeigt sich ein kleiner Trend zu besseren Permeationswerten bei Mischungen von PPePr mit PHIC mittlerer Viskosität. Vergleicht man Mischungen der unterschiedlichen wasserfreien Formulierungen PPe, PPeD und PPePr mit PHIC mittlerer Viskosität zeigt sich die Äquivalenz der Permeationsraten aller drei Mischungen. Im Vergleich zum Thermogel lässt sich eine verbesserte Permeationsrate zeigen. Dem aktuellsten Fertigarzneimittel Ameluz ist die Mischung PPePr + PHIC mittlerer Viskosität deutlich unterlegen.

7 Fazit

Die vorliegende Arbeit stellt jeweils drei wasserfreie (PPe, PPePr und PPeD) und drei wasserhaltige Formulierungen (PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität) vor. Durch die Lagerung von ALA in einer wasserfreien Formulierung PPeX lässt sich die Stabilität des Wirkstoffes im Vergleich zum Thermogel verbessern. Die beste chemische Stabilität von ALA zeigt sich in PPe. Die beste physikalische Stabilität zeigt dabei PPe und PPePr. Diese sind damit für die Anwendung im Zweikammersystem am besten geeignet. Bei den wasserhaltigen Zubereitungen zeigen die Zubereitungen mit der höchsten Viskosität die höchste physikalische Stabilität. Für die Homogenitätsuntersuchungen ließen sich zwei Methoden entwickeln. Es lässt sich zeigen, dass der Mikromischer grundsätzlich ungeeignet ist, halbfeste Zubereitungen homogen zu mischen. Nur bei Vorliegen ausreichend hoher Unterschiede der Viskositäten der zu mischenden Zubereitungen und einer niedrigen Viskosität der homogenen Mischung resultieren gute Homogenitätswerte. Dabei sind die Auspresskräfte der Mischungen für eine praktische Anwendung zu hoch. Die zu mischenden Zubereitungen werden im gleichen Verhältnis durch den Mikromischer gefördert und gemischt. Die zu applizierenden Mischungen zeigen im Vergleich zum Thermogel verbesserte Permeationseigenschaften, sind dem aktuellen Fertigarzneimittel Ameluz aber unterlegen.

8 Anhang

8.1 Statistische Auswertung

8.1.1 Stabilität

Tabelle 8-1: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Stabilitätsuntersuchung per Zentralwertanalyse

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
PPe	3	7	2,33	0		
PPeD	3	19	6,33	12		
PPePr	3	44	14,67	7		
Thermogel	3	110	36,67	61		
ANOVA						
Streuungs- ursachen	Quadrat- summe (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	2115,33	3	705,11	35,26	5,85E-05	4,07
Innerhalb Gruppen	160	8	$s^2(in)=20$			
Gesamt	2275,33	11				

8. Anhang

Tabelle 8-2: Student Newman Keuls Test der Stabilitätsuntersuchung per Zentralwertanalyse

	Thermogel	PPePr	PPeD	PPe
Mittelwert geordnet	36,67	14,67	6,33	2,33
Differenz mit kleinstem Wert	34,33	12,33	4	
Differenz mit 2.kleinstem Wert	30,33	8,33		
Differenz mit 3.kleinstem Wert	22			
Anzahl Ergebnisse	12			
Gruppen	4			
Wiederholungen	3			
Freiheitsgrade	8			
tabellierte Werte	4,53	4,04	3,261	
$s^2(in)$	20			
D (kleinster) Unterschied?	11,70 (ja)	10,43 (ja)	8,42 (nein)	
D (2.kleinster) Unterschied?	10,43 (ja)	8,42 (nein)		
D (3.kleinster) Unterschied?	8,42 (ja)			

8.1.2 Homogenitätsuntersuchungen

Tabelle 8-3: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskosität von PPe, PHIC und homogene Mischungen je niedrigviskos, mittelviskos und hochviskos (Überprüfung der Farbhomogenität)

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz			
PHIC niedrig viskos/ mittelviskos/ hochviskos	3	3,42/ 9,11/ 13,64	1,14/ 3,04/ 4,55	0,01/ 0,01/ 0,41			
PPe	3	1,21	0,40	0,007			
homogene Mischung niedrigviskos/ mittelviskos/ hochviskos	3	0,40/ 0,44/ 0,48	0,13/ 0,15/ 0,16	0,0001/ 0,0001/ 0,0001			
ANOVA							
Streuungsursachen	Quadratsumme (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert	
Unterschiede zw. Gruppen	1,63/ 15,30/ 36,45	2	0,81/ 7,67/ 18,22	170,88/ 1373,82/ 130,37	5,14E-06/ 1,03E-08/ 1,14E-05	5,14	
Innerhalb Gruppen	0,03/ 0,033/ 0,84	6	$s^2(in) = 0,005/0,006/0,14$				
Gesamt	1,66/ 15,37/ 37,29	8					

Tabelle 8-4: Student Newman Keuls Test der Viskosität von PPe, PHIC und homogene Mischungen je niedrigviskos, mittelviskos und hochviskos (Überprüfung der Farbhomogenität)

	PHIC niedrigviskos/ mittelviskos/ hochviskos	PPe	homogene Mischung niedrigviskos/ mittelviskos/ hochviskos
Mittelwert geordnet	1,14/ 3,04/ 4,54	0,40	0,13/ 0,15/ 0,16
Differenz mit kleinstem Wert	1,01/ 2,89/ 4,34	0,27/ 0,26/ 0,24	

8. Anhang

Differenz mit 2.kleinstem Wert	0,74/ 2,63/ 4,14	
Anzahl Ergebnisse	9	
Gruppen	3	
Wiederholungen	3	
Freiheitsgrade	6	
tabellierte Werte	4,34	3,46
$s^2(in)$	0,006	
D (kleinster) Unterschied?	0,17 (ja)/ 0,19 (ja)/ 0,94 (ja)	0,13 (ja)/ 0,14 (ja)/ 0,70 (nein)
D (2.kleinster) Unterschied?	0,14 (ja)/ 0,15 (ja)/ 0,75 (ja)	

8. Anhang

Tabelle 8-5: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Homogenität [%] von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität per Überprüfung der Farbhomogenität

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
PPe + PHIC niedr.Viskosität	3	187,65	62,55	11,08		
PPe + PHIC mittl.Viskosität	3	251,51	83,84	352,00		
PPe + PHIC hohe Viskosität	3	277,12	92,37	17,77		
ANOVA						
Streuungs- ursachen	Quadrat- summe (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	1415,49	2	707,74	5,57	0,04	5,14
Innerhalb Gruppen	761,70	6	$s^2(in) = 126,95$			
Gesamt	2177,19	8				

Tabelle 8-6: Student Newman Keuls Test der Homogenität [%] von PPe + PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität per Überprüfung der Farbhomogenität

	PPe + PHIC hoh. Viskosität	PPe + PHIC mittl. Viskosität	PPe + PHIC niedr. Viskosität
Mittelwert geordnet	92,37	83,84	62,55
Differenz mit kleinstem Wert	29,82	21,29	
Differenz mit 2.kleinstem Wert	8,54		
Anzahl Ergebnisse	9		
Gruppen	3		
Wiederholungen	3		
Freiheitsgrade	6		
tabellierte Werte	4,34	3,46	
$s^2(in)$	126,95		
D (kleinster) Unterschied?	28,23 (ja)	21,21 (ja)	
D (2.kleinster) Unterschied?	22,51 (nein)		

8. Anhang

Tabelle 8-7: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskosität von PHIC niedriger Viskosität und seine homogene Mischung mit PPe mit ALA

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
PHIC niedrige Viskosität homogene Mischung	3	4,33	1,44	0,002		
PHIC+ PPe	3	0,40	0,13	0,0003		
ANOVA						
Streuungsursachen	Quadratsumme (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	2,57	1	2,57	2637,284	8,60E-07	7,71
Innerhalb Gruppen	0,004	4	0,001			
Gesamt	2,57	5				

Prüfgröße (F) > kritischer F-Wert → signifikanter Unterschied der Ergebnisse

Tabelle 8-8: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskosität von PHIC mittlerer Viskosität und seine homogene Mischung mit PPe mit ALA

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
PHIC mittlere Viskosität homogene Mischung	3	8,29	2,76	0,17		
PHIC+ PPe	3	0,46	0,15	0,0002		
ANOVA						
Streuungsursachen	Quadratsumme (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	10,20	1	10,20	119,80	0,0004	7,71
Innerhalb Gruppen	0,34	4	0,09			
Gesamt	10,54	5				

Prüfgröße (F) > kritischer F-Wert → signifikanter Unterschied der Ergebnisse

8. Anhang

Tabelle 8-9: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskosität von PHIC hoher Viskosität und seine homogene Mischung mit PPe mit ALA

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
PHIC hohe Viskosität homogene Mischung	3	11,55	3,85	0,01		
PHIC+ PPe	3	0,50	0,17	0,0003		
ANOVA						
Streuungs- ursachen	Quadrat- summe (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	20,36	1	20,36	3717,18	4,33E-07	7,71
Innerhalb Gruppen	0,02	4	0,005			
Gesamt	20,38	5				

Prüfgröße (F) > kritischer F-Wert → signifikanter Unterschied der Ergebnisse

8. Anhang

Tabelle 8-10: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Gleichförmigkeit der Probenextrudate der Teilproben 1 - 3 und des inneren Quadrats

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
Teilprobe 3	3	230,52	76,84	5,23		
Teilprobe 2	3	249,72	83,24	53,06		
Teilprobe 1	3	250,21	83,40	22,39		
inneres Quadrat	3	288,81	96,27	5,39		
ANOVA						
Streuungsursachen	Quadratsumme (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	597,649	3	199,21	9,26	0,006	4,07
Innerhalb Gruppen	172,13	8	$s^2(\text{in})=21,52$			
Gesamt	769,77	11				

Tabelle 8-11: Student Newman Keuls Test der Gleichförmigkeit der Probenextrudate der Teilproben 1 - 3 und des inneren Quadrats

	inneres Quadrat	Teilprobe 1	Teilprobe 2	Teilprobe 3
Mittelwert geordnet	96,27	83,40	83,24	76,84
Differenz mit kleinstem Wert	19,43	6,57	6,40	
Differenz mit 2.kleinstem Wert	13,03	0,16		
Differenz mit 3.kleinstem Wert	12,86			
Anzahl Ergebnisse	12			
Gruppen	4			
Wiederholungen	3			
Freiheitsgrade	8			
tabellierte Werte	4,53	4,04	3,261	
$s^2(\text{in})$	21,52			
D (kleinster) Unterschied?	12,13 (ja)	10,82 (nein)	8,73 (nein)	
D (2.kleinster) Unterschied?	10,82 (ja)	8,73 (nein)		
D (3.kleinster) Unterschied?	8,73 (ja)			

8.1.3 Permeationsuntersuchung

Tabelle 8-12: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Permeationsraten der Mischungen PPePr mit PHIC niedriger, mittlerer und hoher Viskosität

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
PHIC niedriger Viskosität	5	52,74	10,55	60,25		
PHIC mittlerer Viskosität	5	71,06	14,21	215,00		
PHIC hoher Viskosität	5	28,18	5,64	10,89		
ANOVA						
Streuungsursachen	Quadratsumme (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	185,20	2	92,60	0,97	0,41	3,89
Innerhalb Gruppen	1144,61	12	95,38			
Gesamt	1329,81	14				

Prüfgröße (F) < kritischer F-Wert → kein signifikanter Unterschied der Ergebnisse

8. Anhang

Tabelle 8-13: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Viskositäten der Mischungen PPePr + PHICs niedriger, mittlerer und hoher Viskosität

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
PPePr + PHIC niedrig	3	0,51	0,17	8,95E-05		
PPePr + PHIC mittel	3	0,61	0,20	6,11E-07		
PPePr + PHIC hoch	3	0,64	0,21	0,0003		
ANOVA						
Streuungsursachen	Quadratsumme (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	0,003	2	0,002	12,10	0,008	5,14
Innerhalb Gruppen	0,0008	6	$s^2(in)=0,0001$			
Gesamt	0,004	8				

Tabelle 8-14: Student Newman Keuls Test der Viskositäten der Mischungen PPePr + PHICs niedriger, mittlerer und hoher Viskosität

	PPePr + PHIC hoch	PPePr + PHIC mittel	PPePr + PHIC niedrig
Mittelwert geordnet	0,21	0,20	0,17
Differenz mit kleinstem Wert	0,05	0,03	
Differenz mit 2.kleinstem Wert	0,01		
Anzahl Ergebnisse	9		
Gruppen	3		
Wiederholungen	3		
Freiheitsgrade	6		
tabellierte Werte	4,34	3,46	
$s^2(in)$	0,0001		
D (kleinster) Unterschied?	0,03 (ja)	0,02 (ja)	
D (2.kleinster) Unterschied?	0,02 (nein)		

8. Anhang

Tabelle 8-15: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der Permeationsraten von Ameluz, PPePr + PHIC und Thermogel

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
Ameluz	5	298,19	59,64	1526,19		
PPePr + PHIC	5	82,02	16,40	37,62		
Thermogel	5	26,99	5,40	29,24		
ANOVA						
Streuungs- ursachen	Quadrat- summe (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	8220,48	2	4110,24	7,74	0,007	3,89
Innerhalb Gruppen	6372,19	12	$s^2(in)=531,02$			
Gesamt	14592,68	14				

Tabelle 8-16: Student Newman Keuls Test der Permeationsraten von Ameluz, PPePr + PHIC und Thermogel

	Ameluz	PPePr + PHIC	Thermogel
Mittelwert geordnet	59,64	16,40	5,40
Differenz mit kleinstem Wert	54,24	11,01	
Differenz mit 2.kleinstem Wert	43,23		
Anzahl Ergebnisse	15		
Gruppen	3		
Wiederholungen	5		
Freiheitsgrade	12		
tabellierte Werte	3,77	3,081	
$s^2(in)$	513,02		
D (kleinster) Unterschied?	38,85 (ja)	31,75 (nein)	
D (2.kleinster) Unterschied?	31,75 (ja)		

8. Anhang

Tabelle 8-17: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der permeierten Menge ALA nach 24 h bei Ameluz, PPePr + PHIC und Thermogel

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
Ameluz	5	5259,15	1051,83	359847,34		
PPePr + PHIC	5	1640,66	328,13	11048,65		
Thermogel	5	531,05	106,21	4692,78		
ANOVA						
Streuungs- ursachen	Quadrat- summe (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat-summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zw. Gruppen	2445307,27	2	1222653,64	9,77	0,003	3,89
Innerhalb Gruppen	1502355,09	12	$s^2(in)=125196,26$			
Gesamt	3947662,36	14				

Tabelle 8-18: Student Newman Keuls Test der permeierten Menge ALA nach 24 h bei Ameluz, PPePr + PHIC und Thermogel

	Ameluz	PPePr + PHIC	Thermogel
Mittelwert geordnet	1051,83	328,13	106,210
Differenz mit kleinstem Wert	945,62	221,92	
Differenz mit 2.kleinstem Wert	723,70		
Anzahl Ergebnisse	15		
Gruppen	3		
Wiederholungen	5		
Freiheitsgrade	12		
tabellierte Werte	3,77	3,081	
$s^2(in)$	125196,26		
D (kleinster) Unterschied?	596,56 (ja)	487,53 (nein)	
D (2.kleinster) Unterschied?	487,53 (ja)		

8. Anhang

Tabelle 8-19: Prüfung der Äquivalenz der Mischungen PPePr + PHICs niedriger, mittlerer und hoher Viskosität in Anlehnung an SUPAC-SS (FDA Guidance for Industry, 2004)

	mittel vs. niedrig	hoch vs. niedrig	niedrig vs. mittel	hoch vs. mittel	niedrig vs. hoch	mittel vs. hoch
Median	0,76	2,02	1,32	1,93	0,49	0,52
KI oben	3,73	3,07	2,59	4,05	0,95	2,18
KI unten	0,39	1,05	0,27	0,46	0,33	0,25
KI oben	2,98	1,04	1,27	2,12	0,46	1,66
KI unten	0,37	0,97	1,05	1,47	0,17	0,27

Tabelle 8-20: Prüfung der Äquivalenz der Mischungen PPe, PPeD und PPePr + PHIC, Ameluz und Thermogel in Anlehnung an SUPAC-SS (FDA, Guidance for Industry, 2004)

	PPeD vs. PPePr	PPe vs. PPePr	PPePr vs. PPe	PPeD vs. PPe	PPe vs. PPeD	PPePr vs. PPeD	Thermogel vs. PPePr	Ameluz vs. PPePr
Median	1,09	0,87	1,16	1,26	0,79	0,92	6,27	0,26
KI oben	1,86	1,34	1,38	1,80	1,50	1,44	8,58	0,39
KI unten	0,69	0,74	0,75	0,67	0,56	0,54	1,87	0,18
KI oben	0,77	0,47	0,23	0,54	0,70	0,53	2,32	0,14
KI unten	0,40	0,13	0,41	0,59	0,24	0,38	4,39	0,07

8.2 Firmenliste

ACD Labs, Toronto, Canada

Adobe Systems GmbH, D-München

Aesculap AG & Co. KG, D-Tuttlingen

American National Can TM

Anton Paar GmbH, D-Ostfildern

Bandelin electronics GmbH & Co. KG, D-Berlin

BASF SE, D-Ludwigshafen

B-Braun AG, D-Melsungen

BD Corporation, UK-Barkin

Bibby Scientific Limited, UK-Stone

Biofrontera AG, D-Leverkusen

Borer Chemie AG, CH-Zuchwil

Brand GmbH & Co. KG, D-Wertheim

Caesar & Loretz GmbH (Caelo), D-Hilden

Canon Inc., Tokyo, Japan

Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe

Carl Zeiss Jena GmbH, D-Jena

Croda GmbH, D-Nettetal

Dologiet GmbH & Co. KG, D-Sankt Augustin

Duran Group GmbH, D-Wertheim

Dr. Wilmar Schwabe GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe

ELGA LabWater Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, D-Celle

Eppendorf AG, D-Hamburg

Fuhrmann GmbH, D-Munch

Gako Konietzko GmbH, D-Bamberg

Gauer Glas, D-Püttlingen

Greiner Bio-One GmbH, A-Kremsmünster,

Hauschild & Co. KG, D-Hamm
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-Schwabach
Heraeus Precious Metal GmbH & Co. KG, D-Hanau
Hewlett Packard Inc., US-Palo Alto
HPT Hochwertige Pharmatechnik GmbH & Co. KG, D-Neuhaus/Rwg
J.T. Baker GmbH, D-Darmstadt
Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, D-Bad Berleburg
Lauda GmbH & Co. KG, D-Lauda-Königshofen
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, D-Düren
Memmert GmbH & Co. KG, D-Schwabach
Merck KGaA, D-Darmstadt
Mettler-Toledo GmbH, D-Giessen
Microsoft Corporation, US-Redmond
Philips GmbH, D-Hamburg
Precitool Werkzeughandel GmbH & Co. KG, D-Neuenstein
Pulch + Lorenz Großhandelsgesellschaft mbH, D-March
Sartorius AG, D-Göttingen
SAS Institute Inc., US-Cary
Shimadzu Europa GmbH, D-Duisburg
Sigma Aldrich Corporation, US-St. Louis
Somakon Verfahrenstechnik UG, D-Lünen
Symrise AG, D-Holzminden
Tesa SE, D-Norderstedt
Thermo Fisher Scientific Inc., D-Langensfeld
Thomson Reuters Corporation, US-New York
VWR International GmbH; D-Darmstadt
Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, D-Hillscheid
Wepa Professional GmbH, D-Arnsberg
Zwick GmbH & Co. KG, D-Ulm

9 Literaturverzeichnis

Anton Paar Software Information.

Aref H. (2002)

The development of chaotic advection. *Physics of Fluids* (1994-present); 14(4):1315-25.

Artzner F., Geiger S., Olivier A., Allais C., Finet S., Agnely F. (2007)

Interactions between poloxamers in aqueous solutions: micellization and gelation studied by differential scanning calorimetry, small angle X-ray scattering, and rheology. *Langmuir*; 23(9):5085-92.

Barbero A. M., Frasch H. F. (2009)

Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicology in vitro*; 23(1):1-13.

Barry B. W. (1987)

Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release*; 6(1):85-97.

Barry B. W. (1991)

Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release*; 15(3):237-48.

BASF (2004)

Technical Bulletin; Pluronic Block Copolymer NF Grades (Poloxamer NF Grades).

Batrakova E. V., Li S., Vinogradov S. V., Alakhov V. Y., Miller D. W., Kabanov A. V. (2001)

Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 299(2):483-93.

Beebe D. J., Mensing G. A., Walker G. M. (2002)

Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual review of biomedical engineering*; 4(1):261-86.

Bencini P., Galimberti M., Pellacani G., Longo C. (2012)

Application of photodynamic therapy combined with pre-illumination microneedling in the treatment of actinic keratosis in organ transplant recipients. *British Journal of Dermatology*; 167(5):1193-4.

Bragagni M., Scozzafava A., Mastrolorenzo A., Supuran C. T., Mura P. (2015)

Development and ex vivo evaluation of 5-aminolevulinic acid-loaded niosomal formulations for topical photodynamic therapy. *International journal of pharmaceutics*; 494(1):258-63.

Bronaugh R. L., Stewart R. F., Congdon E. R., Giles A. L. (1982)

Methods for in vitro percutaneous absorption studies I. Comparison with in vivo results. Toxicology and applied pharmacology; 62(3):474-80.

Bunke A., Zerbe O., Schmid H., Burmeister G., Merkle H. P., Gander B. (2000)

Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. Journal of pharmaceutical sciences; 89(10):1335-41.

Butler A. R., George S. (1992)

The nonenzymatic cyclic dimerisation of 5-aminolevulinic acid. Tetrahedron; 48(37):7879-86.

Cabana A., Aït-Kadi A., Juhász J. (1997)

Study of the gelation process of polyethylene oxide a–polypropylene oxide b–polyethylene oxide a copolymer (Ploxamer 407) aqueous solutions. Journal of colloid and interface science; 190(2):307-12.

Capretto L., Cheng W., Hill M., Zhang X. (2011)

Micromixing within microfluidic devices. Topics in current chemistry; 304:27-68.

Casas A., Fukuda H., Di Venosa G. (2000)

The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolaevulinic acid. Implications in cutaneous photodynamic sensitization. British Journal of Dermatology; 143(3):564-72.

Casas A., Fukuda H., Meiss R., Batlle A. M. d. C. (1999)

Topical and intratumoral photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in a subcutaneous murine mammary adenocarcinoma. Cancer letters; 141(1):29-38.

Casas A., Perotti C., Saccoliti M., Sacca P., Fukuda H., del C Batlle A. (2002)

ALA and ALA hexyl ester in free and liposomal formulations for the photosensitisation of tumour organ cultures. British journal of cancer; 86(5):837-42.

Cognis / jetzt BASF Personal Care and Nutrition GmbH (2006-2011)

FNR-Schlussbericht: Isosorbide-based Value Products, FKZ 22026107.

Dahmani F. Z., Yang H., Zhou J., Yao J., Zhang T., Zhang Q. (2012)

Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in pluronic/LHR mixed polymeric micelles: preparation, in vitro and in vivo evaluation. European Journal of Pharmaceutical Sciences; 47(1):179-89.

Dalton J. T., Yates C. R., Yin D., Straughn A., Marcus S. L., Golub A. L., et al. (2002)

Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; 301(2):507-12.

Daniels R. (2011 a)

Systematik der Dermatika. In: Kutz G., Daniels R., Trommer H.; Emulsionen: Entwicklung, Herstellung, Prüfung, 83-113; Editio Cantor Verlag Aulendorf.

Daniels R. (2011 b)

Theoretische Grundlagen. In: Kutz G., Daniels R., Trommer H.; Emulsionen: Entwicklung, Herstellung, Prüfung, 12-38; Editio Cantor Verlag Aulendorf.

De Blois A., Grouls R., Ackerman E., Wijdeven W. (2002)

Development of a stable solution of 5-aminolaevulinic acid for intracutaneous injection in photodynamic therapy. *Lasers in medical science*; 17(3):208-15.

De Blois A., Thissen M., De Bruijn H., Grouls R., Dutrieux R., Robinson D., et al. (2001)

In vivo pharmacokinetics of protoporphyrin IX accumulation following intracutaneous injection of 5-aminolevulinic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 61(1):21-9.

de Campos Araújo L. M. P., Thomazine J. A., Lopez R. F. V. (2010)

Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 75(1):48-55.

Donnelly R. F., McCarron P. A., Woolfson A. D. (2005)

Drug delivery of aminolevulinic acid from topical formulations intended for photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*; 81(4):750-67.

Donnelly R. F., Morrow D. I., McCarron P. A., Garland M. J., Woolfson A. D. (2007)

Influence of solution viscosity and injection protocol on distribution patterns of jet injectors: application to photodynamic tumour targeting. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 89(2):98-109.

Donnelly R. F., Morrow D. I., McCarron P. A., Juzenas P., Woolfson A. D. (2006)

Pharmaceutical analysis of 5-aminolevulinic acid in solution and in tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 82(1):59-71.

Donnelly R. F., Morrow D. I., McCarron P. A., Woolfson A. D., Morrissey A., Juzenas P., et al. (2008)

Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: potential for enhanced topical photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*; 129(3):154-62.

Egelrud T. (2000)

Desquamation in the stratum corneum. *Acta Dermato Venereologica-Supplement*; 208:44-5.

Eichstädt O. (1997)

Kontinuierliches Mischen feiner Feststoffe in fluid-dynamischen Fallrohrmischern.

Elfsson B., Wallin I., Eksborg S., Rudaeus K., Ros A., Ehrsson H. (1999)

Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. *European journal of pharmaceutical sciences*; 7(2):87-91.

Europäisches Arzneibuch Ausgabe 8.0 (2014)

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.

Fachinformation Luxerm (2016)

Fachinfo Service, www.fachinfo.de, (Stand: September 2016).

FDA Guidance for Industry (2004)

SUPAC-SS: nonsterile semisolid dosage forms; scale up and post approval changes: chemistry, manufacturing and controls; in-vitro release testing and in vivo bioequivalence.

Fedors R. F. (1974)

A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids. *Polymer Engineering & Science*; 14(2):147-54.

Fink C., Enk A., Gholam P. (2015)

Aspekte der Schmerztherapie bei der photodynamischen Therapie. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*; 13(1):15-22.

Foote C. S. (1968)

Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science*; 162(3857):963-70.

Fotinos N., Campo M. A., Popowycz F., Gurny R., Lange N. (2006)

5-Aminolevulinic Acid Derivatives in Photomedicine: Characteristics, Application and Perspectives. *Photochemistry and photobiology*; 82(4):994-1015.

Franz T. J. (1975)

Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology*; 64(3):190-5.

Franz T. J., Lehman P. A., Franz S. F., North-Root H., Demetrulias J. L., Kelling C. K., et al. (1993)

Percutaneous penetration of N-nitrosodiethanolamine through human skin (in vitro): comparison of finite and infinite dose applications from cosmetic vehicles. *Toxicological Sciences*; 21(2):213-21.

Fukuda H., Casas A., Batlle A. (2005)

Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*; 37(2):272-6.

Gadmar O. B., Moan J., Scheie E., Ma L. W., Peng Q. (2002)

The stability of 5-aminolevulinic acid in solution. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*; 67(3):187-93.

Gander B., Bunke A., Burmeister G. (2003)

5-Aminolevulinic acid formulation dissolved/dispersed in non-aqueous solvents. 03. Juli 2003, Patentnummer US 2003/0125388 A1.

Gensthaller B. M., Hohmann-Jeddi C., Mende A. (2012)

Organ Haut: Viel mehr als nur eine Hülle. *Pharmazeutische Zeitung*; 50.

Gerscher S., Connelly J. P., Griffiths J., Brown S. B., MacRobert A. J., Wong G., et al. (2000)

Comparison of the Pharmacokinetics and Phototoxicity of Protoporphyrin IX Metabolized from 5-Aminolevulinic Acid and Two Derivatives in Human Skin In Vivo. *Photochemistry and photobiology*; 72(4):569-74.

Gilbert J. C., Hadgraft J., Bye A., Brookes L. G. (1986)

Drug release from Pluronic F-127 gels. *International journal of pharmaceutics*; 32(2):223-8.

Gold M. H., Goldman M. P. (2004)

5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy: Where We Have Been and Where We Are Going. *Dermatologic surgery*; 30(8):1077-84.

Gransee, R. (2010)

vertrauliche Mitteilung.

Grüning N. (2007)

Entwicklung und Charakterisierung eines halbfesten Systems zur Verbesserung der Permeation von 5-Aminolävulinsäure durch exzidiertes humanes Stratum corneum (Dissertation), Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

Grüning N., Müller-Goymann C. C. (2007)

Physicochemical characterisation of a novel thermogelling formulation for percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid. *Journal of pharmaceutical sciences*; 97(6):2311-23.

Hadgraft J. (2001)

Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*; 224(1):1-18.

Hadgraft J., Lane M. E. (2011)

Skin: the ultimate interface. *Physical Chemistry Chemical Physics*; 13(12):5215-22.

Hauschild A., Popp G., Stockfleth E., Meyer K. G., Imberger D., Mohr P., et al. (2009)

Effective photodynamic therapy of actinic keratoses on the head and face with a novel, self-adhesive 5-aminolaevulinic acid patch. *Experimental dermatology*; 18(2):116-21.

Hermann, Sabrina (2014)

interne Untersuchung: Untersuchung der aufbringbaren bzw. handhabbaren Kraft für die Anwendung von Arzneistoffbehältern und Pumpsystemen.

Higuchi W. I. (1962)

Analysis of data on the medicament release from ointments. *Journal of pharmaceutical sciences*; 51(8):802-4.

Horstmann M., Hoffmann G., Kindel H., Murphy M. M., (1997)

Acetylsalicylsäure enthaltendes transdermales therapeutisches System mit Resorptionsverstärkung. Patentnummer: DE 19701059 C2.

HPT Pharma Packaging GmbH & Co. KG (2001)

Homepage: <http://www.hpt.info/innovation/mikromischer/>, Gesehen am 20.01.2015.

ICH Harmonides Tripartite Guideline (2005)

Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).

Ichthyol-Gesellschaft Cordes, Hermanni & Co. (GmbH & Co.) KG (2014)

Bulletin: Cordes Grundlagen - Gel Cordes.

Jepps O. G., Dancik Y., Anissimov Y. G., Roberts M. S. (2013)

Modeling the human skin barrier—Towards a better understanding of dermal absorption. Advanced drug delivery reviews; 65(2):152-68.

Jori G. (1990)

Factors controlling the selectivity and efficiency of tumour damage in photodynamic therapy. Lasers in medical science; 5(2):115-20.

Juhasz J., Lenaerts V., Raymond P., Ong H. (1989)

Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. Biomaterials; 10(4):265-8.

Juzeniene A., Juzenas P., Iani V., Moan J. (2002)

Topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester, hexylester and octylester derivatives: considerations for dosimetry in mouse skin model. Photochemistry and photobiology; 76(3):329-34.

Kabanov A., Zhu J., Alakhov V. (2005)

Pluronic block copolymers for gene delivery. Advances in genetics; 53:231-61.

Kabanov A. V., Chekhonin V., Alakhov V. Y., Batrakova E. V., Lebedev A., Melik-Nubarov N., et al. (1989)

The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. FEBS letters; 258(2):343-5.

Kircher W. (2007)

Anwendung von Arzneimitteln: Wie sich ergonomische und audiologische Probleme lösen lassen. Pharmazeutische Zeitung online; (26).

Klein A., Babilas P., Karrer S., Landthaler M., Szeimies R. M. (2008)

Photodynamic therapy in dermatology—an update 2008. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft; 6(10):839-45.

Kohl E., Karrer S. (2013)

Neue Entwicklungen in der photodynamischen Therapie. Der Hautarzt; 64(5):363-9.

Kutz G. (2011)

Rohstoffe für Emulsionen. In: Kutz G, Daniels R, Trommer H; Emulsionen: Entwicklung, Herstellung, Prüfung, 41-82; Editio Cantor Verlag Aulendorf.

Kutz G., Daniels R., Trommer H. (2011)

Emulsionen: Entwicklung, Herstellung, Prüfung: Editio Cantor Verlag, Aulendorf.

Lane M. E. (2013)

Skin penetration enhancers. International journal of pharmaceutics; 447(1):12-21.

Lieb S., Szeimies R.-M., Lee G. (2002)

Self-adhesive thin films for topical delivery of 5-aminolevulinic acid. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics; 53(1):99-106.

Lippold B. C. (1984)

Biopharmazie: eine Einführung zu den wichtigsten Arzneiformen; mit 26 Tabellen und Schemata: Wiss. Verlag-Ges.

Liu Y. Z., Kim B. J., Sung H. J. (2004)

Two-fluid mixing in a microchannel. International journal of heat and fluid flow; 25(6):986-95.

Lopez R. F., Bentley M. V. L., Delgado-Charro M. B., Guy R. H. (2001)

Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. Pharmaceutical research; 18(3):311-5.

Lopez R. F., Bentley M. V. L., Delgado-Charro M. B., Guy R. H. (2003)

Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. Journal of controlled release; 88(1):65-70.

Lopez R. F. V., Lange N., Guy R., Bentley M. V. L. B. (2004)

Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. Advanced drug delivery reviews; 56(1):77-94.

Lübbert, H. (2016)

Pharmazeutische Charakterisierung einer 5-Aminolävulinsäurehaltigen Nanoemulsion für die photodynamische Therapie; Vortrag 20. GD-Jahrestagung 2016, Berlin.

Luisiana, Müller-Goymann C. (2010)

Formulation for nail and nail bed diseases. Technische Universität Braunschweig, 12. Januar 2012, Patentnummer US 2012/0010227 A1.

Lunter D. (2012)

Filmbildende Emulsionen zur Retardierung der dermalen Wirkstoffpermeation (Dissertation), Eberhard Karls Universität Tübingen.

Maisch T., Szeimies R.-M., Jori G., Abels C. (2004)

Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. Photochemical & Photobiological Sciences; 3(10):907-17.

Massing U., Cicko S., Ziroli V. (2008)

Dual asymmetric centrifugation (DAC)—A new technique for liposome preparation. *Journal of Controlled Release*; 125(1):16-24.

McCarron P. A., Donnelly R. F., Andrews G. P., Woolfson A. D. (2005)

Stability of 5-aminolevulinic acid in novel non-aqueous gel and patch-type systems intended for topical application. *Journal of pharmaceutical sciences*; 94(8):1756-71.

Meisel P., Kocher T. (2014)

Photodynamische Therapie in der Parodontologie; Viele Studien, wenig Evidenz. Gemeinsame Wissenschaftliche Mitteilung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DG PARO) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK).

Menon G. K., Cleary G. W., Lane M. E. (2012)

The structure and function of the stratum corneum. *International journal of pharmaceutics*; 435(1):3-9.

Michaels A., Chandrasekaran S., Shaw J. (1975)

Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. *AIChE Journal*; 21(5):985-96.

Moan J., Ma L. W., Juzeniene A., Iani V., Juzenas P., Apricena F., et al. (2003)

Pharmacology of protoporphyrin IX in nude mice after application of ALA and ALA esters. *International journal of cancer*; 103(1):132-5.

Mortensen K., Pedersen J. S. (1993)

Structural study on the micelle formation of poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) triblock copolymer in aqueous solution. *Macromolecules*; 26(4):805-12.

Morton C., Szeimies R. M., Sidoroff A., Braathen L. (2013)

European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: treatment delivery and current indications—actinic keratoses, Bowen's disease, basal cell carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*; 27(5):536-44.

Mu C.-F., Balakrishnan P., Cui F.-D., Yin Y.-M., Lee Y.-B., Choi H.-G., et al. (2010)

The effects of mixed MPEG–PLA/Pluronic® copolymer micelles on the bioavailability and multidrug resistance of docetaxel. *Biomaterials*; 31(8):2371-9.

Mueller-Goymann C., Hamann H.-J. (1993)

Sustained release from reverse micellar solutions by phase transformations into lamellar liquid crystals. *Journal of controlled release*; 23(2):165-74.

Mueller-Goymann C. C., Frank S. G. (1986)

Interaction of lidocaine and lidocaine-HCl with the liquid crystal structure of topical preparations. *International journal of pharmaceutics*; 29(2):147-59.

Müller-Goymann C. (2004)

Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 58(2):343-56.

Muller-Goymann C., Gruning N. (2006)

Formulation for dermal application. 18. September 2008, Patentnummer: US 2008/0227757 A1.

Müller-Goymann C. C. (2011)

Preparation, characterization, and in vitro permeation study of terbinafine HCl in poloxamer 407-based thermogelling formulation for topical application. *AAPS PharmSciTech*; 12(2):496-506.

Naher S., Orpen D., Brabazon D., Morshed M. M. (2010)

An overview of microfluidic mixing application. *Advanced Materials Research*; 83:931-9.

Neubert R. H., Wepf R. (2007)

Stratum corneum: Struktur und Morphologie einer Barriere. *Pharmazeutische Zeitung*; (17).

Nguyen N.-T., Wereley S. T. (2002)

Fundamentals and applications of microfluidics: Artech House.

Novak B., Schulten R., Dirschka T., Szeimies R.-M., Foguet M., Lübbert H. (2013)

Photodynamic Treatment of Actinic Keratosis Using Ameluz®: Recapitulation of Clinical Phase III Studies in the Light of Novel Preclinical Research. Elsaie, M.L.T., editor: Nova Science Publishers, Inc.

Novo M., Hüttmann G., Diddens H. (1996)

Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 34(2):143-8.

OECD (2004)

OECD Guideline for the testing of chemicals: Skin absorption: in vitro method; 428, adopted on 13th april.

Pass H. I. (1993)

Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *Journal of the National Cancer Institute*; 85(6):443-56.

Patel H. R., Patel R. P., Patel M. (2009)

Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. *International Journal of PharmTech Research*; 1(2):299-303.

Proksch E., Brandner J. M., Jensen J. M. (2008)

The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*; 17(12):1063-72.

Radakovic S. (2012)

Photodynamische Therapie in der Dermatologie. *hautnah*; 11(2):8-11.

Reichl S., Müller-Goymann C. C. (2013)

Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 84(3):599-605.

Reynolds O. (1883)

An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Proceedings of the royal society of London*; 35(224-226):84-99.

Roca M. F. (2009)

Nanoemulsion. Biofrontera Bioscience GmbH D-Leverkusen, 31. Dezember 2009, Patentnummer: US 2009/0324727 A1.

Rolland A., Demichelis G., Jamouille J. C., Shroot B. (1992)

Influence of formulation, receptor fluid, and occlusion, on in vitro drug release from topical dosage forms, using an automated flow-through diffusion cell. *Pharmaceutical research*; 9(1):82-6.

Rosevear F. B. (1954)

The microscopy of the liquid crystalline neat and middle phases of soaps and synthetic detergents. *J Am Oil Chem Soc*; 31:628-39.

Rote Liste (2017).

Sato K., Sugibayashi K., Morimoto Y. (1991)

Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *Journal of pharmaceutical sciences*; 80(2):104-7.

Schmolka I. R. (1972)

Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of biomedical materials research*; 6(6):571-82.

Schmook F. P., Meingassner J. G., Billich A. (2001)

Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International journal of pharmaceutics*; 215(1):51-6.

Schweig T., Vaals. (2011)

Topische NSAR: Schmerztherapie aus der Tube. *Pharmazeutische Zeitung online*; (16).

Skin Care Forum (2001)

Schematic diagram of the human skin, *Sci-online*, (27).

Sommer K. (1979)

Probenahme von Pulvern und körnigen Massengütern: Grundlagen, Verfahren, Geräte. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Steinbauer J. M., Schreml S., Kohl E. A., Karrer S., Landthaler M., Szeimies R. M. (2010)

Photodynamic therapy in dermatology. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft; 8(6):454-64.

Stroock A. D., Dertinger S. K., Ajdari A., Mezić I., Stone H. A., Whitesides G. M. (2002)

Chaotic mixer for microchannels. Science; 295(5555):647-51.

Täuber A., Müller-Goymann C. C. (2014 b)

In vitro permeation behaviour and antimycotic efficacy of the antimycotic agent ciclopirox olamine incorporated into a variety of poloxamer 407-based formulations. 18 GD Jahrestagung, 7 bis 9 April, Berlin.

Täuber A., Müller-Goymann C. C. (2015)

In vitro permeation and penetration of ciclopirox olamine from poloxamer 407-based formulations—comparison of isolated human stratum corneum, bovine hoof plates and keratin films. International journal of pharmaceutics; 489(1):73-82.

Täuber A., Müller-Goymann C. C. (2014 a)

Comparison of the antifungal efficacy of terbinafine hydrochloride and ciclopirox olamine containing formulations against the dermatophyte trichophyton rubrum in an infected nail plate model. Molecular pharmaceutics; 11(7):1991-6.

Thesen R. (2017)

Aktinische Keratose: Tageslich statt Rotlicht. Pharmazeutische Zeitung, (12):21.

Tiddy G. J. (1980)

Surfactant-water liquid crystal phases. Physics reports; 57(1):1-46.

Trommer H., Neubert R. (2006)

Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. Skin pharmacology and physiology; 19(2):106-21.

Trotta M. (1999)

Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. Journal of controlled release; 60(2):399-405.

Uter W., Gerber P. A., Schilling B., Piepiorka A., Schiller C., Treyer K., et al. (2017)

PharmerNews. Karger Kompass Dermatologie, 5(1):40-6.

Valenta C., Auner B. G., Loibl I. (2005)

Skin permeation and stability studies of 5-aminolevulinic acid in a new gel and patch preparation. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society; 107(3):495-501.

van Hemelrijck C. (2011)

Physikochemische Charakterisierung von Poloxamer 407-haltigen Systemen für den potentiellen Einsatz von 5-Aminolävulinsäure in der photodynamischen Therapie (Dissertation), Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

van Hemelrijck C., Müller-Goymann C. C. (2011)

Characterization of a pseudo ternary phase diagram of poloxamer 407 systems for potential application of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. International journal of pharmaceutics; 420(2):297-303.

Voigt R. (2010)

Pharmazeutische Technologie: Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.

Wanka G., Hoffmann H., Ulbricht W. (1990)

The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution. Colloid and Polymer Science; 268(2):101-17.

Weigl B. H., Bardell R. L., Cabrera C. R. (2003)

Lab-on-a-chip for drug development. Advanced drug delivery reviews; 55(3):349-77.

White F. M. (1991)

Viscous fluid flow. second ed: McGraw-Hill New York.

Wickett R. R., Visscher M. O. (2006)

Structure and function of the epidermal barrier. American journal of infection control; 34(10):S98-S110.

Williams A. C., Barry B. W. (2012)

Penetration enhancers. Advanced drug delivery reviews; 64:128-37.

Winkler A. (2005)

Untersuchungen zur Permeation von 5-Aminolävulinsäure (ALA) und ALA-n-butylester durch exzidiertes humanes Stratum corneum und organotypisches Hautkonstrukt (Dissertation), Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

Wolf P. (1999)

Photodynamische therapie-grundlagen und klinische anwendung in der dermatologie. Deutsches Arzteblatt-Arztliche Mitteilungen-Ausgabe A; 96(22):1493-8.

Wong S. H., Bryant P., Ward M., Wharton C. (2003)

Investigation of mixing in a cross-shaped micromixer with static mixing elements for reaction kinetics studies. Sensors and Actuators B: Chemical; 95(1):414-24.

Xia H., Wang Z., Koh Y., May K. (2010)

A microfluidic mixer with self-excited 'turbulent' fluid motion for wide viscosity ratio applications. Lab on a Chip; 10(13):1712-6.

Yang D., Armitage B., Marder S. R. (2004)

Kubische flüssigkristalline Nanopartikel. *Angewandte Chemie*; 116(34):4502-10.