

**Hyaluronsäurederivate:
Strukturcharakterisierung, Bestimmung und
Dermatologische Anwendung**



Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
Fachbereich Pharmazie
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn

Jamal Alyoussef Alkrad
Geb. am 4.01.1974 in Syrien

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Neubert
2. Prof. Dr. S. Wartewig
3. Prof. Dr. W. Süß

Halle (Saale), 18.08.03

urn:nbn:de:gbv:3-000005437

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005437>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Theorie	3
2.1	Einsatz spektroskopischer Methoden in der HS-Strukturaufklärung	3
2.1.1	Struktur und Gewinnung	3
2.1.2	Einsatz der IR-und Raman-Spektroskopie zur HS-Strukturaufklärung	4
2.1.3	Einsatz der NMR-Spektroskopie zur HS-Strukturaufklärung	5
2.2	HS Analytik	6
2.2.1	Photometrie	6
2.2.2	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	6
2.2.3	Kapillarzonelektrophorese (CZE)	7
2.3	Die Haut	8
2.3.1	Anatomie der Haut	8
2.3.2	Hautpenetration	10
2.3.3	Hautschäden	12
2.3.3.1	Direkte Hautlichtschäden	12
2.3.3.2	Indirekte Hautlichtschäden	14
2.3.3.3	Hautschutz	14
2.4	Halbfeste Zubereitungen	15
2.5	Mikroemulsionen	16
2.5.1	Definition	16
2.5.2	Mikroemulsion für dermale Anwendungen	18
2.5.3	Zusammensetzung der Mikroemulsionen	20
2.5.3.1	Nicht-ionische Tenside	20
2.5.3.1.1	Tween 80	21
2.5.3.1.2	Span 20	21
2.5.3.2	Lipophile Phase	21
2.5.3.2.1	Isopropylpalmitat (IPP)	21
2.5.3.2.2	Mittelkettige Triglyceride (MKTG)	22
2.5.3.3	Hydrophile Phase	22
2.5.3.3.1	Aqua bidestillata	22
2.5.3.3.2	Dimethylsulfoxid (DMSO)	22

2.5.4	Charakterisierung der Mikroemulsionen	23
2.5.4.1	Tröpfchendurchmesser	23
2.5.4.1.1	Rayleigh-Streuung	23
2.5.4.1.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	24
2.5.4.2	Phasendiagramme	25
2.5.4.3	Polarisationsmikroskopie	26
2.5.4.4	Freisetzung aus Mikroemulsionen	26
3	Experimenteller Teil	27
3.1	Materialien	27
3.2	Eingesetzte Instrumente	28
3.2.1	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie-Totalreflexion. (FTIR-ATR)	28
3.2.2	Raman-Spektroskopie	28
3.2.3	^{13}C - und ^1H -NMR-Spektroskopie	28
3.2.4	UV/Vis-Spektrophotometer	28
3.2.5	Viskosimeter	28
3.2.6	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	29
3.2.7	Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	29
3.2.8	Spektralphotometer	29
3.2.9	Mikroprozessor-Labor-pH-Messgerät	29
3.2.10	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	29
3.2.11	Polarisationsmikroskopie	30
3.3	Methoden	30
3.3.1	Herstellung der Filme für HS-Derivate	30
3.3.2	Probenvorbereitung für UV/Vis-Spektren	30
3.3.3	Probenvorbereitung für Viskositätsmessungen	30
3.3.4	Löslichkeit	30
3.3.5	HPLC-Methoden (Hochleistungsflüssigchromatographie-Methoden)	31
3.3.5.1	HPLC-1	31
3.3.5.2	HPLC-2	31
3.3.6	CZE-Methoden (Kapillarzonenelektrophorese-Methoden)	31
3.3.6.1	Direkte Methode zur Bestimmung der HS1200 kDa (CZE-1, CZE-2)	31
3.3.6.2	Direkte Methode zur Bestimmung der HS31 kDa (CZE-3)	32

3.3.6.3	Indirekte Methode zur Bestimmung der HS1200 kDa(CZE-4)	32
3.3.7	Photometrische Methoden	32
3.3.7.1	Modifizierte Carbazol-Methode	32
3.3.7.2	Neue photometrische Methode	33
3.3.8	Lösungen- und Pufferherstellung	33
3.3.9	Herstellung der halbfesten Zubereitungen	33
3.3.9.1	Wasserhaltige hydrophile Salbe (DAB)	33
3.3.9.2	Amphiphile Creme (DAC)	33
3.3.9.3	Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (DAB)	34
3.3.9.4	Extraktion und Gehaltsbestimmung	34
3.3.10	Die Freisetzung	35
3.3.10.1	Mehrschichtmembransystem (MSMS)	35
3.3.10.2	Wasser-getränkte Nephrophanfolie	35
3.3.10.3	Glycerol-Collodium-Membranen	35
3.3.10.4	Durchführung der HS-Freisetzung	35
3.3.11	Mikroemulsionen	36
3.3.11.1	Mikroemulsionenvorbereitung mit DMSO für Tropfendurchmesserstudium	36
3.3.11.2	Probenvorbereitung für Wasserlöslichkeitsstudium in den Mikroemulsionsgrundlagen mittels dynamischer Lichtstreuung	37
3.3.11.3	Probenvorbereitung für Untersuchung des HS 22 kDa-Einflusses auf den Tensidmengenbedarf (Span 20)	37
3.3.11.4	HS-IPP-Mikroemulsionsherstellung	38
3.3.11.5	HS-MKTG-Mikroemulsionsherstellung	38
3.3.12	Statistik	38
4	Ergebnisse	39
4.1	HS-Strukturaufklärung und die physikochemischen Eigenschaften	39
4.1.1	Spektroskopische HS-Strukturaufklärung vor und nach dem enzymatischen Abbau	40
4.1.1.1	Charakterisierung der HS-Struktur durch FTIR-ATR vor und nach dem enzymatischen Abbau	40
4.1.1.2	Charakterisierung der HS-Struktur durch Raman- Spektroskopie vor und nach dem enzymatischen Abbau	42
4.1.1.3	Charakterisierung der HS-Struktur durch ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektroskopie vor und nach dem enzymatischen Abbau	44
4.1.1.4	Charakterisierung der HS-Struktur durch UV/Vis-Spektroskopie vor und nach dem enzymatischen Abbau	47

4.1.1.5	Zusammenfassung der Spektroskopischen Untersuchungen	48
4.1.2	Physikochemische Eigenschaften der HS vor und nach dem enzymatischen Abbau	49
4.1.2.1	Löslichkeit	49
4.1.2.2	Viskosität	50
4.1.2.3	Zusammenfassung zur Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften von HS	52
4.2	Analytische Bestimmung von HS	52
4.2.1	Photometrie	52
4.2.1.1	Modifizierte Carbazol-Methode (MCM)	52
4.2.1.2	Neue photometrische Methode (NPM)	53
4.2.2	HPLC – Methoden (Hochdruckflüssigchromatographie-Methoden)	53
4.2.2.1	HPLC-1	53
4.2.2.2	HPLC-2	53
4.2.3	CZE-Methoden (Kapillarzonelektrophorese-Methoden)	54
4.2.3.1	CZE-1 und CZE-2	54
4.2.3.2	CZE-3 (Indirekte Detektionsmethode)	55
4.2.3.3	CZE-4 (Enzymatisch abgebaute HS)	56
4.2.4	HS 1200 kDa-Bestimmung in halbfesten Zubereitungen	56
4.2.5	Zusammenfassung der analytischen Bestimmung	57
4.3	HS-Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen	59
4.3.1	HS1200 kDa-Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen	59
4.3.2	HS 22 kDa-Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen	60
4.3.3	Zusammenfassung zur Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen	62
4.4	Mikroemulsionen	63
4.4.1	Einfluss von DMSO auf den Tröpfchendurchmesser nicht-ionische Mikroemulsionen und auf ihre Tensidmenge	63
4.4.1.1	Stabilisierung von Mikroemulsionen durch Tween 80	63
4.4.1.2	Stabilisierung von Mikroemulsionen durch Span 20	64
4.4.1.3	Stabilisierung von Mikroemulsionen durch Tween 80:Span 20 im Verhältnis 3:2	65
4.4.1.4	Stabilisierung von Mikroemulsionen durch Tween 80:Span 20 im Verhältnis 2:3	66
4.4.1.5	Einfluss der Mengen von Span 20 auf den Tröpfchendurchmesser	67

4.4.1.6	Zusammenfassung	67
4.4.2	Wasseraufnahme von nicht-ionischen Mikroemulsionen	69
4.4.3	Einfluss der HS 22 kDa auf den Bedarf an Tensid und Wasseraufnahme	70
4.4.4	2 %ige HS-IPP-Mikroemulsion (IPP-Mikroemulsion)	71
4.4.4.1	Rheologische Eigenschaften	72
4.4.4.2	Dynamische Lichtstreuung	72
4.4.4.3	Die Dreiphasendiagramme	73
4.4.4.4	Freisetzung der HS 22 kDa	74
4.4.4.5	Zusammenfassung	76
4.4.5	2 %ige HS-MKTG-Mikroemulsion (MKTG-Mikroemulsion)	76
4.4.5.1	Rheologische Eigenschaften	76
4.4.5.2	Dynamische Lichtstreuung	77
4.4.5.3	Dreiphasendiagramme	78
4.4.5.4	Freisetzung der HS 22 kDa	79
4.4.5.5	Zusammenfassung	80
5	Zusammenfassung der Arbeit	81
6	Literaturverzeichnis	82

Abkürzungsverzeichnis

AC:	Amphiphile Creme
CZE-1:	direkte Methoden um nicht abgebaute HS mit CZE mit normaler Kapillare zu messen
CZE-2:	direkte Methoden um nicht abgebaute HS mit CZE mit bubble-Kapillare zu messen
CZE-3:	indirekte Methode um nicht abgebaute HS zu messen
CZE-4:	direkte Methode um enzymatisch abgebaute HS mit normaler Kapillare zu messen
DAB:	Deutsches Arzneimittelbuch
DAC:	Deutscher Arzneimittelcodex
DLS:	Dynamische Lichtstreuung
DMSO:	Dimethylsulfoxid
FTIR-ATR:	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie-Totalreflexion. (<i>Fourier transform infrared spectroscopy attenuated total reflection</i>)
GFC:	Gelfiltrationschromatographie
GAG:	Glucosaminoglycan
GPC:	Gelpermeationschromatographie
CZE:	Kapillarzonenlektrophorese
HPLC:	Hochdruckflüssigchromatographie
HPLC1:	Methode um abgebaute HS mit Schwefelsäure mit HPLC zu messen
HPLC2:	Methode um enzymatisch abgebaute HS mit HPLC zu messen
HS:	Hyaluronsäure (Hyaluronan)
IPP:	Isopropylpalmitat
IR:	Infrarot
kDa:	Kilodalton
LEC:	Leberendothelzellen
MCM:	Modifizierte Carbazol-Methode
MDT:	Mittlere Freisetzungzeit (<i>Mean Dissolution Time</i>)
ME:	Mikroemulsion
MKTG:	Mittelkettige Triglyceride
MM:	Molare Masse
MS:	Massenspektroskopie

MSMS:	Mehrschichtmembransystem
N:	Anzahl der Punkte auf der Bezugsgeraden
NMR:	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NPM:	Methode zur photometrischen Bestimmung von durch H ₂ SO ₄ abgebauter HS
NWG:	Nachweißgrenze
PCS:	Photonenkorrelationsspektroskopie
R:	Linearität
S:	Span 20
S _{rel} :	Relative Standardabweichung
T:	Tween 80
T:S:	Tween 80:Span 20
UV:	Ultraviolett
UV/Vis:	Ultraviolett /sichtbar (<i>ultraviolet/visible</i>)
W:	Wasser
WHS:	Wasserhaltige hydrophile Salbe
WWS:	Wasserhaltige Wollwachsalkohlsalbe

1 Einleitung und Zielstellung

Hyaluronsäure (HS) wurde 1934 von MEYER und PALMER zum ersten Mal aus dem Glaskörper isoliert [1]. Sie kommt in der Haut, in der extrazellulären Matrix, in der Nabelschnur, im Glaskörper des Auges, in der Gelenkflüssigkeit und im Knorpelgewebe vor [1-27].

HS wird in der Zellmembran aller Körperzellen synthetisiert, und über die Lymphgefäße zu den Lymphknoten transportiert, wo 80-90 % davon abgebaut wird. 10- 20 % werden zum Blutkreislauf transportiert und dort von den Endothelzellen der Lebersinusoiden (LEC) durch spezifische Rezeptoren aufgenommen und intrazellulär zu Glucuronsäure und N-Acylglucosamin abgebaut [4,5,10,11,14,19,20,23]. Die Produktion der HS wird durch zahlreiche Mediatoren, Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), Hormone und Entzündungsmediatoren (z.B Interleukin-1(IL-m1 β) [2] und Tumor Nekrose-Faktor (TNF α) [2,3,6,16,20,21]) beeinflusst. Die normale Konzentration im Serum liegt unter 100 μ g/l mit einem Mittelwert von 30-40 μ g/l. Der totale HS-Umsatz im Serum liegt bei 10-100 mg/24h [4,5,8,10,11,20,23,24,25,27]. Im Körper dient die HS zur Kontrolle der Gewebepерmeation [5] und der Gewebehydratation [6] sowie als Schmierfaktor in den Gelenken. Weiterhin steigert sie die Produktion von Interleukin-1 und stimuliert die phagozytotische Aktivität von Monozyten und Granulozyten. Die HS-Produktion wird während der Zellproliferation und der Mitose gesteigert [2, 3,6,5].

HS wird als diagnostischer Parameter bei vielen Krankheiten (Tumor, rheumatische Arthritis und Leberzellerkrankung) herangezogen. HS wird bei Gelenkerkrankungen injiziert und bei ophthalmologischen und otologischen Operationen (Visco-Chirurgie) eingesetzt [7,14,17,18,20]. HS beschleunigt die Wundheilung, weil sie die Verletzung vor Radikalen schützt [28]. Weiterhin berichtete TROMMER über die Eigenschaften von HS als Radikalfänger in vitro [30]. Der enzymatische Abbau verstärkt die Wirkung von HS als Radikalfänger[29]. Niedermolekulare HS (22 kDa), die als Radikalfänger wirkt, soll in Pflegecremes und Sonnenschutzmitteln eingesetzt werden. Diese Doktorarbeit konzentriert sich auf die folgenden Punkte:

- Die quantitative Bestimmung von HS vor und nach dem Abbau
- Strukturaufklärung von Hyaluronsäurederivaten

- *In vitro*-Untersuchung zur topischen Verfügbarkeit von HS vor und nach dem enzymatischen Abbau in halbfesten Zubereitungen
- Entwicklung und Charakterisierung von neuen HS- enthaltenden W/O Mikroemulsionen.

2 Theorie

2.1 Einsatz spektroskopischer Methoden in der HS-Strukturaufklärung

2.1.1 Struktur und Gewinnung

HS ist ein lineares Polysaccharid (Abb. 2.1), das aus der Disacchariduntereinheit N-Acetylglucosamin und D-Glucuronsäure [D-Glucuronsäure (1- β -3) N-Acetyl-D-Glucosamin (1- β -4)] besteht. Ein natives HS-Molekül besteht aus $2\text{--}25 \cdot 10^3$ Einheiten und hat eine Molmasse von $10^3\text{--}10^4$ kDa [32]. HS weist in wässriger Lösung eine Sekundärstruktur auf, die aus den Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Acetamidgruppen und den Carboxylgruppen resultiert. Aus diesem Grund ist sie in wässriger Lösung gegenüber Oxidantien sehr stabil. Außerdem verhält sich HS in einer wässrigen Lösung als Zufallsknäuel (*random coil*) mit einem Durchmesser von 500 nm, welches bei Konzentrationen von <1 g/l entfaltet wird [33].

HS wird enzymatisch durch verschiedene Enzyme abgebaut. Es entstehen dabei u. a. Di-, Tri-, und Tetradisaccharide. Die Vermutung, dass nur beim enzymatischen Abbau mit Hilfe von bakterieller Hyaluronidase Doppelbindungen entstehen, wie von NUHN und anderen berichtet wurde, wird in der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 4.1.1) bestätigt [31].

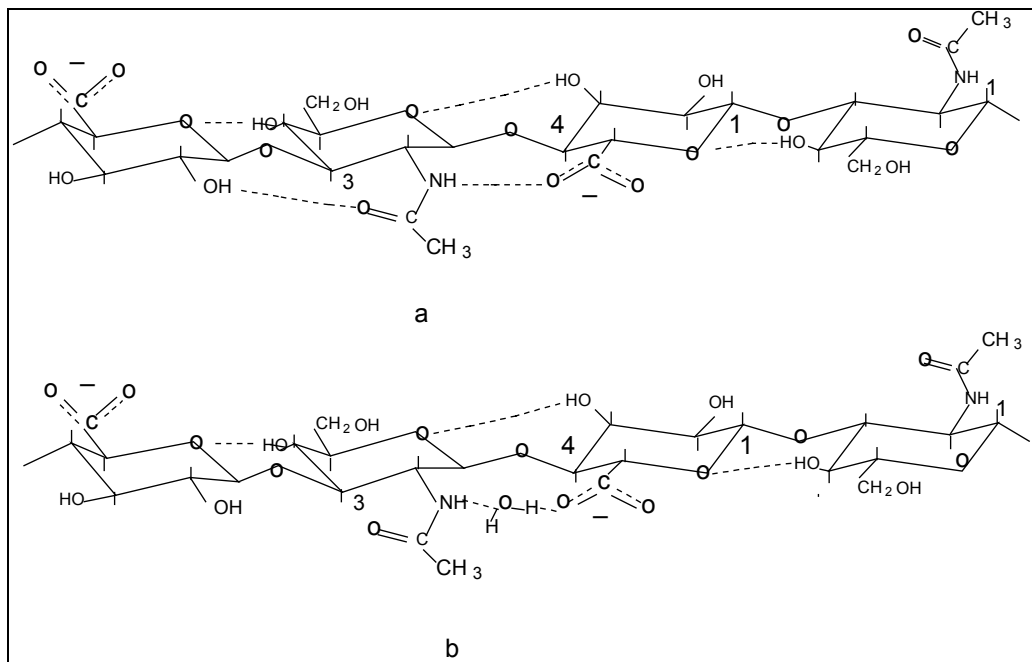


Abb. 2.1: Sekundärstruktur von Hyaluronsäure: a: in DMSO; b: in Wasser und DMSO.

HS wird aus Hahnenkämmen (*Rooster combs*) oder dem Glaskörper von Kuhaugen extrahiert. Heute wird HS oft durch Fermentation produziert und dann aufgearbeitet. Die HS, welche für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, ist mit einem hochproduktiven Bakterium der Art *Streptococcus zooepidemicus* hergestellt worden.

Um HS-Derivate kleiner Molmassen herzustellen, wurde HS [29] bis zu einem bestimmten Zeitpunkt enzymatisch abgebaut. Danach wurde die Reaktion durch plötzliches Erhitzen auf 70 °C unterbrochen und die molare Masse durch Gelpermeation bestimmt.

2.1.2 Einsatz der IR-und Raman-Spektroskopie zur HS-Strukturaufklärung

Die Infrarotspektroskopie (IR) findet in der Analytik breite Anwendung. Der wichtigste Anwendungsbereich ist die Identifizierung organischer Verbindungen durch sog. Fingerabdruck-Spektren. Diese Spektren sind in den meisten Fällen so eindeutig, dass man durch sie die verschiedenen Verbindungen gut von einander unterscheiden kann.

Lediglich optische Isomere absorbieren auf genau dieselbe Art und sind daher im IR-Spektrum ununterscheidbar. Neben der Anwendung in der qualitativen Analytik werden Infrarot-Messungen immer häufiger auch in der quantitativen Analytik verwendet. Die hohe Selektivität der Methode ermöglicht oft die quantitative Abschätzung des Anteils einer Verbindung in einer komplexen Mischung, wobei zuvor nur wenige oder keine Trennschritte nötig sind. Eine ergänzende Methode zur IR-Spektroskopie ist die Raman-Spektroskopie. IR- und Raman-Spektroskopie verhalten sich hinsichtlich ihres Informationsgehaltes teilweise komplementär zueinander. Im Jahre 1928 entdeckte der indische Physiker C. V. RAMAN, dass sich die Wellenlänge eines kleinen Teils, der von bestimmten Molekülen ausgehenden Streustrahlung, von der des einfallenden Strahls unterscheidet, und dass die Verschiebungen der Wellenlänge außerdem von der Struktur der streuenden Moleküle abhängig sind. Dieses Phänomen rührt von derselben Art gequantelter Änderung der Molekülschwingungen her, die von der IR-Absorption bekannt sind. Daher entspricht der Unterschied der Wellenlänge der einfallenden und gestreuten Strahlung den Wellenlängen im Mittinfrarot-Bereich. Man erhält Ramanstreuung, wenn eine Probe mit monofrequenter Strahlung im sichtbaren oder im IR-Bereich mittels starker Laser angeregt wird [34,46,47]. Sowohl IR als auch Raman-Spektroskopie wurden zur Mono- und Polysaccharidstrukturaufklärung eingesetzt [34-46]. GORAL et al. [37] haben die Raman-Spektroskopie benutzt, um biologische Materialien zu charakterisieren. Er hat berichtet, dass für Holzcellulose die Banden bei Wellenzahlen von 1600 [cm⁻¹] für die -C=C- Streckschwingung und bei 3100 [cm⁻¹] für =C-H liegen. FT-IR-Spektren von Pektinen, die von MAUEL et al. [40] gemessen wurden, zeigten die

charakteristischen Banden von Glukuronsäure im Bereich von 850-1200 cm^{-1} . MAGANANI et al. [41] haben die Änderung der Polyurethanfilm-Spektren mit IR untersucht, die mit sulfatisierter HS gekoppelt wurden. Weiterhin [42] haben sie die Änderung der IR-Spektren der Polysaccharide bei der Bildung eines Hydrogels untersucht und festgestellt, dass sich die Bande der Amidgruppe zu größerer Wellenzahl auf Grund der Wasserstoff-Brücken hin verschoben hat. MARLOW et al. [44] haben die Eigenschaften der derivatisierten HS-Filme mittels IR untersucht und festgestellt, dass die Schwingungen in den Bereichen 800-1000 cm^{-1} und 1150-1300 cm^{-1} C-O, C-C Streckschwingungen und C-O, C-O-H Deformationsschwingungen sind. BARBUCCI et al. [43] haben die lipophilen und hydrophilen Eigenschaften der derivatisierten HS untersucht und bewiesen, dass COO-Gruppen stärker auf der Oberfläche des Polymers als im Inneren des Polymers vertreten sind. Die Zunahme der Feuchtigkeit der Messkammer verursacht daher, aufgrund der Wasserstoffbrücken, eine Verschiebung der Banden der Amid- und Carboxyl-Gruppen von HS.

2.1.3 Einsatz der NMR-Spektroskopie zur HS-Strukturaufklärung

Zahlreiche NMR-Untersuchungen wurden bisher zur HS-Charakterisierung durchgeführt. Die Synthese von derivatisierter Polypyrrol-Hyaluronsäure wurde von COLLIER et al. mit ^{13}C -NMR [50] charakterisiert. Die Wechselwirkung zwischen den OH-Gruppen der Polysaccharide wurde von BOSCO et al. durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie [51] untersucht. Weiterhin konnte die Stabilität der HS-Struktur in wässrigen Lösungen (Sekundärstruktur, Tertiärstruktur) von SCOTT et al. mittels ^{13}C -NMR [53,59] aufgeklärt werden. Über die Strukturaufklärung des Oligomers der HS und seines Komplexes mit Kupfer II durch NMR und IR berichteten MARCHETTINI et al. [54], ohne näher auf die Doppelbindung einzugehen. Die Methode der NMR wurde benutzt, um die α - und β -Saccharide in Tetrasacchariden der HS zu identifizieren [55, 62]. COWMAN et al. haben die Stabilität der β -1,3- und β -1,4-Bindungen von HS verschiedener Molmassen in wässriger Lösung durch ^{13}C -NMR unter verschiedenen Bedingungen studiert [57]. Die Wasserstoffbrücken in der derivatisierten HS und ihr Verhalten in DMSO wurden von KVAM et al. [63] untersucht. MATSUBARA et al. studierten die Biosynthese von Hyaluronsäure mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie [65]. HS, die im Körper entweder in Synovialflüssigkeiten oder Knorpelgewebe vorhanden ist, wurden durch ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopische Messungen von vielen Autoren untersucht [49, 6,61,66,67]. GROOTVELD et al. haben die ^1H -NMR verwendet, um die Rolle des N-Acetylcysteins zum Schutz von HS vor Radikalen in

Synovialflüssigkeiten [52] zu beweisen. GHOSH et al. untersuchten die Wechselwirkung zwischen Hyaluronsäure und Phospholipiden durch ^1H -NMR-Spektroskopie [58,60].

2.2 Hyaluronsäure-Analytik

2.2.1 Photometrie

Zur Quantifizierung von HS wird die sogenannte Uronsäure-Reaktion herangezogen. Dabei reagiert die Uronsäure (Abbauprodukt der HS) mit Carbazol, wodurch eine violette Färbung entsteht, die bei 650 nm detektierbar ist [73]. BITTER et al. haben Borat mit konzentrierter Schwefelsäure zur Erhöhung der Reaktionsempfindlichkeit, der Farbstabilität, der Reproduzierbarkeit und zur Verringerung des störenden Einflusses von Chloriden und Oxidantien eingesetzt. Die Grenze der Methode liegt jedoch darin, dass die Anwesenheit von Verunreinigungen, Staub oder Chloriden (z.B. im Leitungswasser), Nitriten oder Wasserstoff-Peroxydase eine grüne Farbe hervorruft. Die Anwesenheit von Kalium-, Natrium- und Ammonium-Chloriden führen zur Veränderung der Farbtintensität [72].

2.2.2 Hochleistungschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie wurde oft zur Quantifizierung der enzymatisch verdauten HS eingesetzt. KOSHIISHI et al. haben zur Quantifizierung der enzymatisch abgebauten HS (EAHS) (durch Chondroitinase ABC) eine HPLC-Methode mit einer RP-Ionenaustauschsäule eingesetzt. Dadurch konnte HS in den Geweben bestimmt werden [74,75]. Verdaute Hyaluronsäure wurde von MORIKAWA et al. mit einer Nachweisgrenze von 1 µg/ml durch HPLC bei einer Wellenlänge von 232 nm gemessen [77]. Weiterhin wurde die HPLC eingesetzt, um Glycosaminoglycan nach enzymatischem Abbau im menschlichen Blut zu ermitteln [78]. Eine HPLC-Methode wurde von AKYAMA et al. zur HS-Ermittlung im menschlichen Urin nach Verdau mit Hyaluronidase beschrieben [79]. PAYAN et al. entwickelten eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Hyaluronsäure in der Synovialflüssigkeit. HS wurde durch Hyaluronidase verdaut und in einer umgekehrten Phase Octadecylsilyl injiziert [80]. Durch menschliche Knochenzellkulturen hergestellte HS und Protopglycan wurden von FEDAKO et al. mit Hilfe der HPLC durch eine Ionenaustauschsäule voneinander getrennt [81]. HS wurde auch von KAKEHI et al. durch HPLC mit UV-Detektor nach der Derivatisierung mit 1-(4-Methoxy)phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMPMP) analysiert. Wie die Autoren ausführen, erlaubte diese Methode die HS-Bestimmung für Standardproben mit Konzentrationen von 0,5-50 µg/ml mit hoher Reproduzierbarkeit [82].

Die Methode der Gelfiltrationschromatographie (GPC) wurde für die quantitative Bestimmung von ungesättigten Hexasacchariden und Tetrasacchariden, die Streptomyceshyaluronidase-Verdauungsprodukte der Hyaluronsäure sind, entwickelt. Durch den Einsatz einer Säule, die mit einem sulfatierten Polystyren-Divinylbenzen-Gel gepackt war, wurde die Trennung der Oligosaccharide der HS in weniger als 7 Minuten mit einer Nachweisgrenze von 65 ng/ml erreicht [84]. Andere fluorometrische Vorsäulen-Derivatisierungsmethoden mit 2-Cyanoacetamiden wurden für die Ermittlung der enzymatisch abgebauten HS entwickelt. Nach den Autoren war die Trennung innerhalb von 30 Minuten mit einer Nachweisgrenze von 10 ng/ml vollständig [85,86]. Eine weitere HPLC-Methode wurde von CHUN et al. für die quantitative Bestimmung von HS in biologischem Gewebe und Flüssigkeiten beschrieben [76]. MURATA et al. konnten mit einer Ionenaustauschsäule 100 ng von EAHS detektieren [87]. Die gleiche Nachweisgrenze (100 ng/ml) wurde auch von GHEREZGHIHER erreicht [92]. UMEDA et al. haben GFC verwendet, um die Konzentration und die Molmasse von HS in der Flüssigkeit der Kniegelenke bei Patienten, die unter rheumatoider Arthritis leiden, zu bestimmen. Bei der Ermittlung der HS-Konzentration wurde eine gute Korrelation zwischen der HS-Konzentration (0,2-1 mg/mL) und der Peakfläche erreicht [88]. YEUNG et al. haben GFC-MS benutzt, um die Molmasse von HS-Fragmenten nach enzymatischem Abbau im Speichel der Patienten zu bestimmen [89].

2.2.3 Kapillarzonenoelektrophorese (CZE)

Die Kapillarzonenoelektrophorese (CZE) hat den Vorteil, dass die Trennung und die Ermittlung im Vergleich zu Chromatographie-Methoden gleichzeitig stattfinden. Darüberhinaus erhält man bei der CZE eine hohe Auflösung. Bei der CZE basiert die Trennung auf zwei Faktoren: erstens auf der Bewegung der Substanzen in der Kapillare unter der Wirkung des elektrischen Feldes und zweitens auf der Bewegung der gesamten Lösung (Puffer) unter der Wirkung der Ladungen der Kapillarwand (Abb. 2.2) [94].

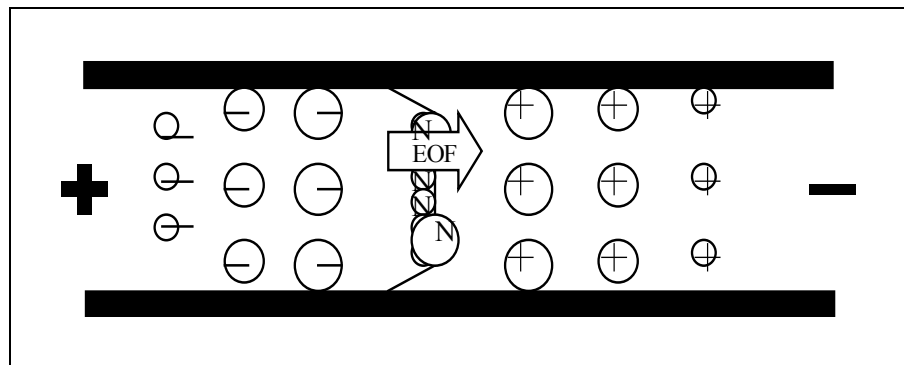


Abb. 2.2: Prinzip der Kapillarzonen- oder Feldamplifizierungselektrophorese.

Die Fluorometrie wurde zur Detektion der derivatisierten, abgebauten HS mit 2-Aminopyridin, 2-Aminoacridon oder 1,3-Naphthendisulfonsäure in Anwesenheit von Cyanoborhydrid durch HPCE und HPLC eingesetzt [96-99]. TODIA et al. haben HS mittels CZE als Komplex mit Cu^{2+} bei einer Wellenlänge von 235 nm gemessen (100). KARAMANOS et al. haben nicht-sulfatierte und sulfatierte Disaccharide mittels CZE analysiert [90,91]. Die Kapillarelektrophorese wurde von GRIMSHAW et al. für die Trennung und Bestimmung von enzymatisch verdauter HS im Glaskörper des Rindes mit einer Nachweisgrenze von 25 $\mu\text{g/ml}$ bei einer Wellenlänge von 200 nm herangezogen [100]. Weiterhin wurden HS und andere GAG in Humansynovialflüssigkeiten nach dem Abbau mit CZE-UV-Detektor quantifiziert [101-103]. Enzymatisch abgebaute HS wurde auch von ALHAKIM et al. bei einer Wellenlänge von 232 nm mit hoher Auflösung detektiert [104]. PLÄTZER et al. haben unabgebaute HS in halbfesten Zubereitungen durch CZE bei einer Wellenlänge von 195 nm quantifiziert. Die Nachweisgrenze beträgt hier 50 $\mu\text{g/ml}$ [105].

2.3 Die Haut

2.3.1 Anatomie der Haut

Die Haut erfüllt in erster Linie die Funktion einer natürlichen Barriere des Organismus gegenüber Krankheitserregern sowie mechanischen, thermischen und chemisch-physikalischen Einwirkungen. Darüber hinaus wirkt sie als Reservoir für Fette und Wasser, ist Absonderungs- und Sinnesorgan und an den Vorgängen des Gasaustausches beteiligt [106,107]. Auf der Hautoberfläche befindet sich ein Fettfilm aus einer hydrolipiden Emulsion mit einem pH von 4,2-6,5. Von Bedeutung ist der Hautoberflächenfilm, da er die Haut vor Austrocknung, Bakterien und anderen exogen bedingten Schadeinflüssen schützt [106,108].

Im anatomischen Aufbau der Haut unterscheidet man zwischen: Epidermis (Oberhaut), Stratum corneum (Hornschicht), Stratum lucidum (Glanzschicht), Stratum granulosum (Körnerschicht), Stratum spinosum (Stachelschicht) und Stratum basale (Basalschicht), in dem sich die Melanocyten befinden, die Melanin bilden (Abb. 2.3, von oben nach unten). Nur in den untersten Zellschichten der Basalzellschicht erfolgen die Zellteilungen. Die Zellen wandern kontinuierlich an die Oberfläche. Im Verlauf dieser Wanderung nach apikal kommt es zur Reifung bestimmter Zelltypen, die Keratin (Keratinocyten) produzieren. Schließlich werden die obersten Anteile der Deckschicht als feine Schüppchen abgestoßen [133,135]. Die Hornschicht besteht aus den dehydratisierten Keratinzellen, welche überwiegend aus Proteinen der Keratinreihe aufgebaut sind und dem Stratum corneum seine physikalische und chemische Stabilität verleihen. Zwischen den Keratinzellen befinden sich Lipid-Lamellen, die dem Stratum corneum seine Permeabilität verleihen [112,113,116]. Zwischen dem Stratum granulosum und Stratum corneum konzentriert sich der lipophile Bereich (Stratum lucidum). Die avaskuläre Epidermis (1.Schicht) wird nach unten durch die Basalmembran zur Dermis (2.Schicht) abgegrenzt, in welcher in einer Tiefe von ca. 300 µm der erste Blut- bzw. Lymphgefäßplexus lokalisiert ist. Hemidesmosomen bedingen eine feste Verankerung beider Schichten [116] und der dritten Schicht (Subkutis) [106]. Die mechanische Barriere der Haut wird durch die verschiedenen Hautschichten gewährleistet [106,108]. Die Hornschicht fungiert als die chemisch-physikalische Barriere, d.h. sie ist als Haupthindernis für die Penetration dermal applizierter Stoffe verantwortlich [114,115].

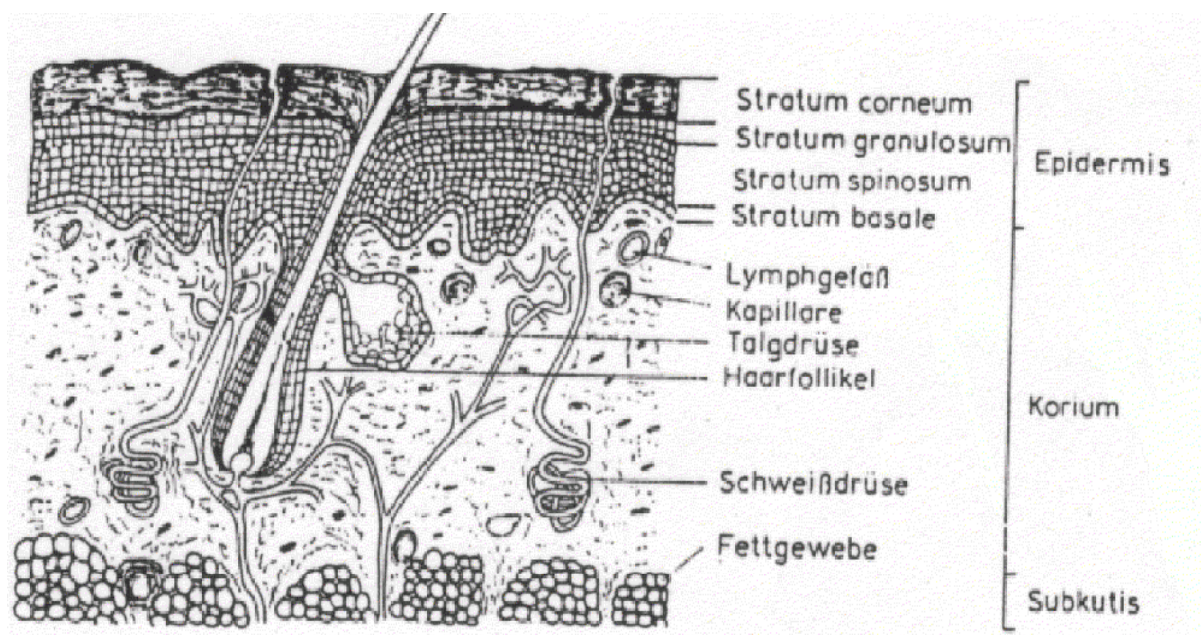


Abb. 2.3: Aufbau der Haut.

2.3.2 Hautpenetration

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Haut für alle Substanzen total undurchlässig ist, bis SCHWENKENSBECHER 1904 zeigte [122], dass sie penetrierbar und durchlässiger für lipophile Substanzen als für Wasser und Elektrolyte ist. Es wird angenommen, dass die Haut halbdurchlässig ist und dass die Transdermalverabreichung einige Vorteile gegenüber oraler oder parenteraler Verabreichung bietet. Diese Vorteile umfassen folgende Aspekte: Die dermal applizierten Wirkstoffe können den First-Pass-Effekt umgehen, den Abbau im Gastrointestinaltrakt vermeiden und bieten die Möglichkeit verzögerter Wirkung an [106,126].

Aus dem Zusammenhang zwischen der besonderen Struktur der Hornschicht und deren Barrierefunktion lassen sich zum einen potentielle Transportwege durch die Haut ableiten, zum anderen wird deutlich, dass selbst geringfügige Veränderungen dieser Schicht erhebliche Penetrations- und Permeationssteigerungen nach sich ziehen können. Im Gegensatz dazu weisen die lebenden Schichten der Epidermis und die überwiegend aus kollagenem Bindegewebe bestehende Dermis nur noch geringe Barriereigenschaften auf [117,118].

Dem strukturellen Aufbau der Hornschicht entsprechend kann die Wirkstoffpassage interzellulär, transzellulär oder entlang der Haarschäfte, Talgdrüsen- und Schweißdrüsengänge (transglandulär) erfolgen (Abb. 2.4) [123-126].

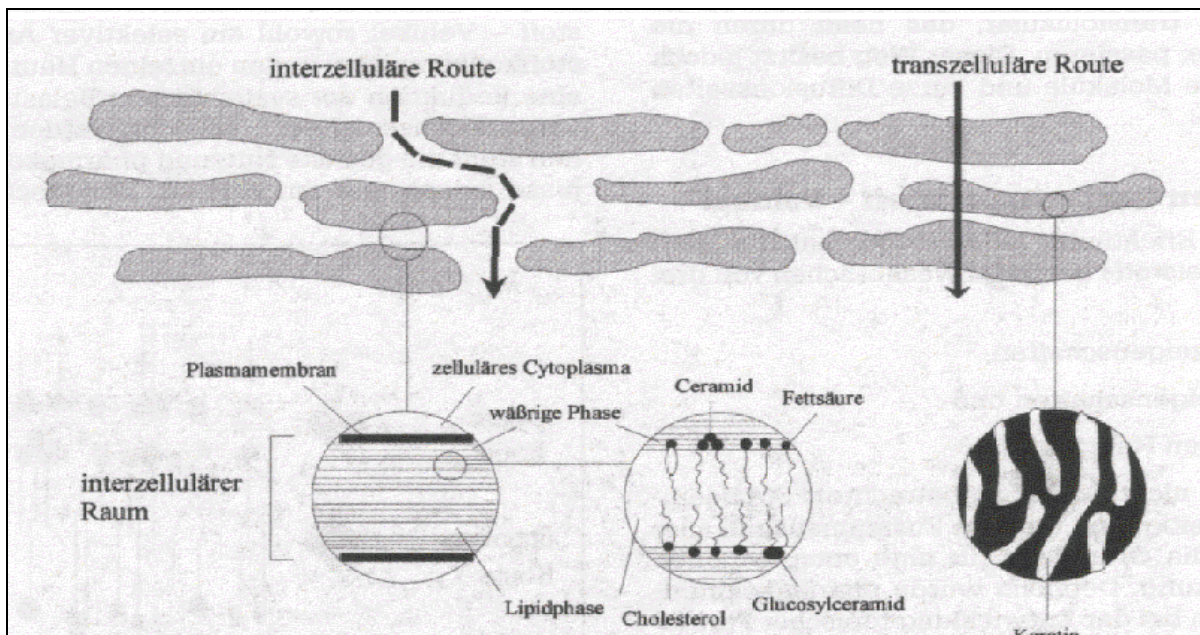


Abb. 2.4: Hautpenetrationswege eines Arzneistoffs.

Die Absorption der Arzneistoffe in der Haut ist eine Funktion, die von der Form des Arzneistoffes, dem Verhalten des Trägers (Vehikel) und dem Status der Haut abhängt [126].

Unter der Annahme eines perfekt-sink-Akzeptors (Organismus) kann der Durchtritt einer Substanz durch die einzelnen Hautschichten als passiver Transportprozess näherungsweise mit dem Fickschen Diffusionsgesetz beschrieben werden [125,134]:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DFV_k}{d} f_c \quad (1)$$

Dabei sind:

- dQ/dt: aus dem Vehikel abdiffundierende bzw. in lebender Epidermis erscheinende Arzneistoffmenge,
- D: Diffusionskoeffizient im Stratum corneum,
- F: behandelte Fläche,
- V_k: Verteilungskoeffizient zwischen Stratum corneum und Vehikel,
- d: Dicke des Stratum corneum und
- f_c: Konzentration an gelöstem, freiem, undissoziierten Arzneistoff im Vehikel.

Der Arzneistoff ist von seiner Inkorporation in die Zubereitung bis zu seinem Erscheinen in der systemischen Zirkulation nach der dermalen Applikation Verteilungsprozessen unterworfen, die von seinen physikochemischen Eigenschaften und den Eigenschaften der Medien, zwischen denen er sich verteilt, bestimmt werden. Unter der Voraussetzung eines Aktivitätskoeffizienten von ~1 lässt sich die Affinität einer Substanz zu verschiedenen Medien über ihre jeweilige Löslichkeit in diesen Medien abschätzen [128].

Der Verteilungskoeffizient stellt eine Gleichgewichtskonstante dar, die das Konzentrationsverhältnis einer Substanz in zwei aneinandergrenzenden, nicht mischbaren Lösungsmitteln beschreibt und somit den Endzustand des zeitabhängigen Prozesses der Verteilung charakterisiert:

$$K = C_1/C_2 \quad (2)$$

Dabei sind:

- C₁: Konzentration in der lipophilen Phase und
- C₂: Konzentration in der hydrophilen Phase.

Der Verteilungskoeffizient ist somit Ausdruck der Hydrophilie einer Substanz und nimmt demnach auf den Penetrationsprozess entscheidenden Einfluss [129,130]. Auf Grund des Vorkommens sowohl lipophiler als auch hydrophiler Domänen innerhalb des Stratum corneum ist ein Verteilungskoeffizient nahe 1 für den Penetrationsverlauf als am günstigsten einzuschätzen. Er beeinflusst somit die Menge an Arzneistoff, die das Stratum corneum passiert, wobei folgende Gleichung gilt [128]:

$$\frac{dc_v}{dt} = \frac{DV_k}{dV_v} f_v C_v = k_p C_v \quad (3)$$

Dabei sind:

- dC_v/dt : Änderung der Arzneistoffkonzentration pro Zeiteinheit,
- D : Diffusionskoeffizient,
- F : behandelte Fläche,
- V_k : Verteilungskoeffizient,
- d : Dicke des Stratum corneum,
- V_v : Vehikelvolumen,
- $f_v C_v$: Konzentration an gelöstem, freiem undissoziierten Wirkstoff im Vehikel und
- k_p : Penetrationskonstante 1. Ordnung.

Bezogen auf eine typische Zubereitung lässt sich der Begriff auf Stratum corneum/Vehikel-Verteilungskoeffizienten erweitern [123]. Beachtet werden muss allerdings in diesem Zusammenhang, dass Vehikelbestandteile mit in die Haut eindringen können.

Die Haut stellt auf Grund ihres Aufbaus und ihrer Eigenschaften einerseits und der Molmasse und Hydrophilie der HS andererseits eine große Herausforderung für die HS-Absorption dar. BROWN et al. haben HS als Matrix benutzt, um die Freigabe von Diclofenac in der Franzschen Diffusionszelle zu untersuchen. Die Diclofenac-Freigabe aus HS zeigte eine verzögerte Freisetzung [131]. Außerdem haben BROWN et al. mittels Autoradiographie nach 24 Stunden [^3H]-HS-Penetration durch das Stratum corneum in die Dermis und in das lymphatische Kapillarsystem bei haarlosen Mäusen nachgewiesen [132].

2.3.3 Hautlichtschäden

2.3.3.1 Direkte Hautlichtschäden UV B (280-315 nm)

Direkte UV-Schäden (Abb. 2.5) beruhen darauf, dass in den Kernsäuren zwei benachbarte Thyminer durch Cycloaddition zu Dimeren verbunden werden. Weitere Schäden an den Kernsäuren entstehen durch Hydratation am Cytosin, durch Bruch der Nukleinsäureketten und durch Vernetzung mit Proteinen. Diese veränderten Strukturen im DNA-Molekül werden durch Ersatz der geschädigten Sequenz durch neu synthetisierte DNA-Basen korrigiert. 50 % der Dimere werden in der ersten Stunde nach der Zellschädigung repariert, der Rest im Verlauf der nächsten 24 Stunden. Wenn also bei einer Bestrahlung zu viele Schäden eintreten, oder wenn durch ständig wiederholte Bestrahlung eine Überlastung erfolgt, führen höhere Strahlungsdosen zu bleibenden Schäden (Abb. 2.6).

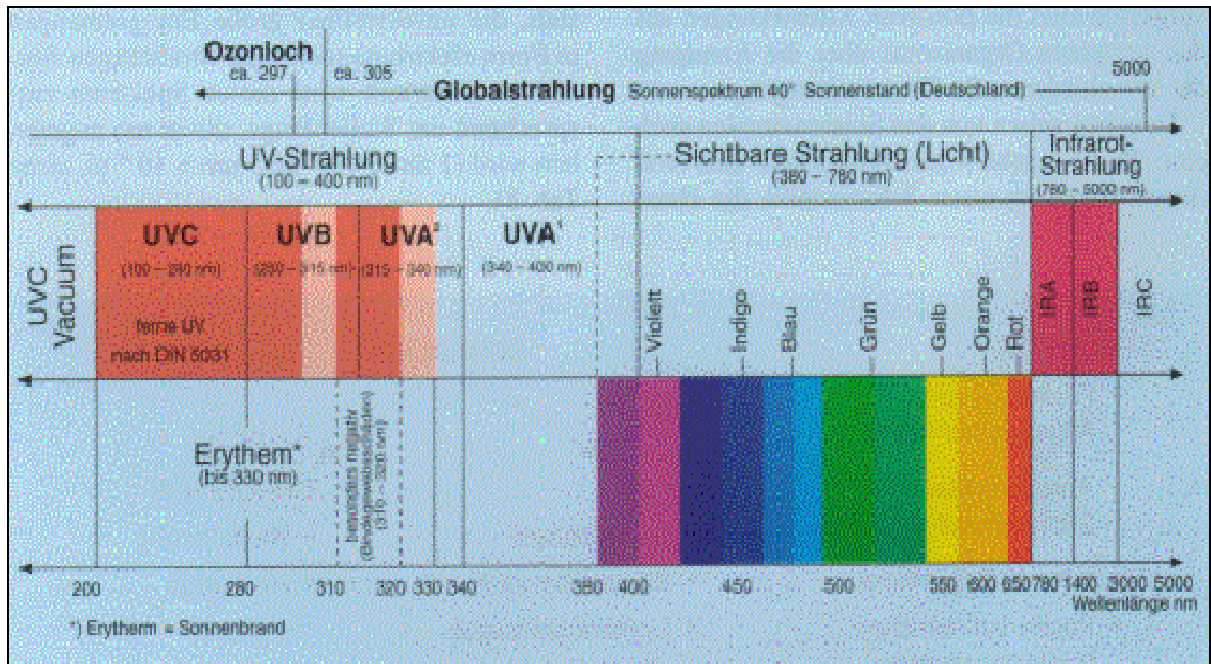


Abb. 2.5: Überblick über Spektralbereiche elektromagnetischer Strahlung (UV-Licht, sichtbares Licht und IR).

Deshalb werden bleibende Schäden durch nachfolgende Replikation auf die Tochterzellen übertragen. Damit ist der Schaden fixiert und führt zu Auswirkungen, die die Funktion der Zelle verändern. Entweder stirbt die Zelle oder es entwickeln sich maligne Tumore [121].

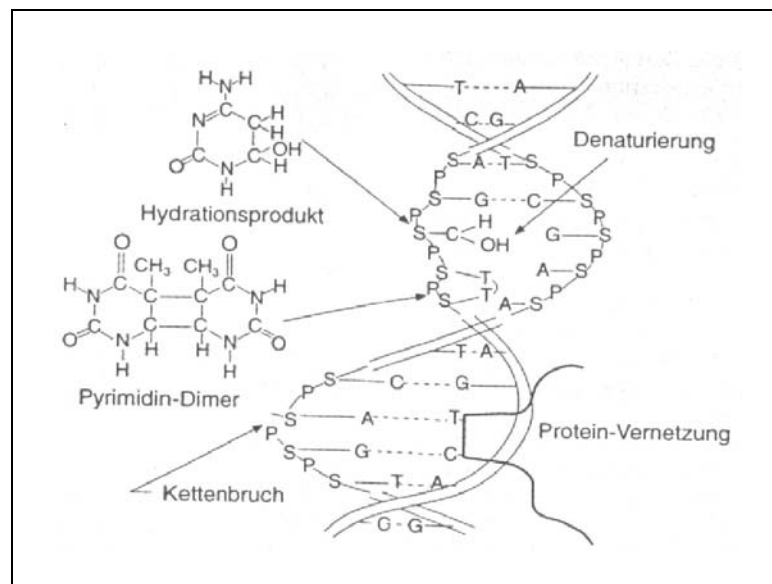


Abb. 2.6: DNA-Schäden.

2.3.3.2 Indirekte Hautlichtschäden (im Bereich UVA und UVB)

Indirekte DNA-Schäden entstehen durch Radikale. Unter der Einwirkung von Photonen des UVB-Bereichs entstehen in der Haut Radikale. Freie Radikale vermögen die Zellmembran und die Nukleinsäuren zu schädigen [121,129].

2.3.3.3 Hautschutz

Möglichkeiten des Hautschutzes sind gegeben durch UV-Filter (mittels Reflektion und Lichtstreuung) und chemischen Lichtschutz, die jeweils auf der Absorption der Strahlen beruhen (Tab. 2.1) [121].

Tab. 2.1: Chemischer Lichtschutz und physikalische Lichtschutz-Faktoren.

Chemischer Lichtschutz	Physikalischer Lichtschutz
4-Aminobenzoessäure	Zinkoxidcreme
4-Methoxy-Zimtsäureisomylester	Titandioxid-Lotion
Benzophenone	Eisenoxid-Paste (sichtbar)
Isopropyl-Dibenzoylmethan	Magnesiumoxid
	Calciumcarbonat

Weiterhin spielen Radikalfänger eine große Rolle im Hautschutz gegenüber Radikalen, die nach der Hautbestrahlung entstehen (Tab. 2.2) [121].

Tab. 2.2: Kommerziell verfügbare Radikalfänger.

Lipophile Radikalfänger	Hydrophile Radikalfänger
-Vitamin A	-Vitamin C
-Vitamin E	-Cystein
-Ubiquinon	-Gluthation

2.4 Halbfeste Zubereitungen und Arzneistofffreigabe

Halbfeste Zubereitungen sind zur oralen, ophthalmologischen und dermalen Verabreichung verfügbar. Außerdem können sie für kosmetische Zwecke oder zur lokalen und systemischen Behandlung benutzt werden [136]. Nach NEUBERT et al. sind die halbfesten Zubereitungen entweder hydrophobe (wie weiße Vaseline-Salbe) oder hydrophile (wie Polyoxyethylenglyco-Salbe) einphasige Systeme oder mehrphasige Systeme, die aus hydrophilen und lipophilen Phasen bestehen. Dabei sind je nach Phasenlage O/W-Cremes (wie wasserhaltige, hydrophile Salbe), W/O-Cremes (wie wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe) und amphiphile Cremes (wie Basis-Creme) zu unterscheiden [136].

Eine Creme wird durch die kolloidale Gelstruktur stabilisiert, die bicohärent (Schwamm-Struktur) beschaffen ist und mittels Interaktion durch van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen verursacht wird. Dabei sind die zweiteiligen Tenside und Cotenside in zwei sich wiederholenden Schichten angeordnet, indem sich die hydrophilen Gruppen und die lipophilen Anteile gegenüberstehen. Wasser und Öl werden entweder interlamillär oder in Blockaden platziert. JUNGINGER et al. beschrieben den in vitro-Einfluss der Gelstruktur auf die Arzneistoff-Freigabe aus Creme mit kristalliner Gelstruktur. Ein Arzneistoff, der ein Lamellengelnetz durchdringt, kann entweder einem interlamillären oder translamillären Weg folgen und ist abhängig von der Lokalrate der Diffusion und Verteilung in der kristallinen Gellamellenstruktur. Die Messungen, welche die Eigenschaften der Gelstruktur der Systeme hauptsächlich bestimmen, erlauben Aussagen zu den rheologischen Eigenschaften, der Stabilität, der möglichen Abhängigkeit von den Hauteigenschaften und der Arzneistoff-Freisetzung [190].

Die Arzneistoffabsorption findet nach der Freigabe des Arzneistoffs aus den Zubereitungen statt. Viele Systeme wurden beschrieben, an denen die Arzneistoff-Freigabe aus halbfesten Zubereitungen studiert wurde [137]. Das Mehrschichtmembransystem stellt eines dieser Systeme dar. Das erste solche Modell wurde von BEYER beschrieben, der Textilschichten und Filterblättermembranen benutzte [138,139]. Das Mehrschichtmembransystem (MSMS) besteht nach NEUBERT aus Grund- und Deckplatte (aus Polyacryl). Zwischen diesen können bis zu acht Versuchszellen übereinander angeordnet und per Verschraubung fixiert werden. Eine Versuchszelle setzt sich aus Grundscheibe und Schablone zusammen, zwischen denen je nach experimenteller Anforderung mehrere Membranen angeordnet werden können. Die

Schablone ist mit einer Aussparung von 4 cm^2 versehen, wodurch auf den Membranen eine Applikationsfläche für die zu untersuchende Formulierung entsteht (Abb. 2.7) [140-142].

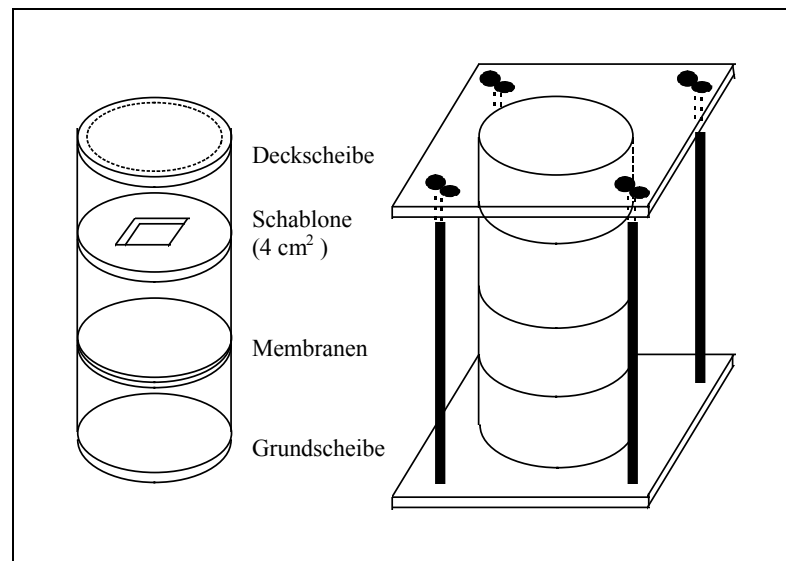


Abb. 2.7: Darstellung eines Mehrschichtmembransystems (MSMS).

2.5 Mikroemulsionen

2.5.1 Definition

Mikroemulsionen sind isotrope, thermodynamisch stabile, optisch klare bis schwach opaleszierende Systeme mit Tröpfchendurchmessern zwischen 5-200 nm und bestehen meist aus hydrophiler Phase, lipophiler Phase, Tensid und Cotensid. Sie sind geschwollene Mizellen [145]. Ihre Tröpfchengröße ist groß genug, um die physikalischen Eigenschaften der dispergierten Phase zu zeigen, die entweder Wasser oder Öl in isotroper Form sein können. Mizellen sind kleine gelöste Mengen von Öl oder Wasser in Wasser oder Öl. Weil die Differenzierung zwischen Mizellen und Mikroemulsionen schwierig ist, haben ATTWOOD et al. [145] sie beide unter dem Begriff Mikroemulsionen aufgeführt. Die einfachste Vorstellung einer Mikroemulsion ist, dass sich die innere Phase als Kügelchen (sphärisch) mit den Tensiden und Cotensiden umgibt und in der äußeren Phase verteilt. Wenn das Wasser sich in der inneren Phase befindet, handelt es sich um ein W/O System, umgekehrt um ein O/W System. Der Radius (R) der inneren Phase ist wie folgt definiert (Abb. 2.8a) [146]:

$$R = 3\phi/C_s a_o \quad (4)$$

Dabei sind:

- Φ : Volumen-Fraktion der inneren Phasen,
- C_s : Zahl der Tenside und Cotenside pro Volumeneinheit und
- a_o : Fläche pro Tensidmolekül auf der Oberfläche.

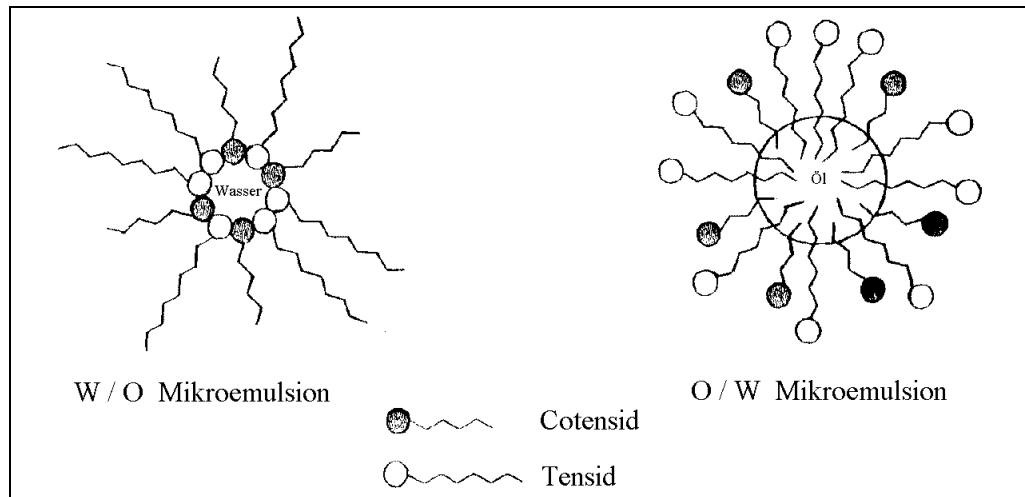


Abb. 2.8a: Modellvorstellung einer Mikroemulsionsstruktur.

O/W Mikroemulsionen entstehen nach MITCHELL et al. [147,148] erst, wenn der Kritische Packungsparameter (*Critical Packing Parameter*) P zwischen 0 und 1 liegt. Bei $P > 1$ entstehen W/O Mikroemulsionen.

$$P = V/a_0 l_c \quad (5)$$

Dabei sind:

- V : Volumen der Tensidmoleküle,
- a_0 : Fläche des Tensidkopfes und
- l_c : Länge des Tensidkopfes.

Nach TALMON und PRAGER besteht die Mikroemulsionsmakrostruktur aus randomisierten Gittern (*random lattice*). Das Modell beruht auf randomisierten, kubischen Zellen (*random cubic cells*). Die Zellen werden entweder mit Wasser oder mit Öl gefüllt und die Tenside sowie Cotenside trennen nur zwischen zwei benachbarten Zellen, die mit verschiedenen Phasen gefüllt wurden. Wenn weniger Wasser als Öl eingesetzt wird, ist die ölige Phase kontinuierlich und die Wasserzellen werden im Öl isoliert (W/O). Umgekehrt ist es, wenn weniger Öl als Wasser (O/W) vorhanden ist. Wenn die Wassermenge und die Ölmenge sich nicht sehr von einander unterscheiden, dann ist das System bikontinuierlich (*bikohärend*) (*Kapillarstruktur*). De GENNES et al. [149] bestimmten die Kubikseitenlänge ζ_k bei spontaner Krümmung. AUVRAY et al. [150] modifizierten diese Länge der Zellen der inneren Phase (Abb. 2.8b). Es gilt:

$$\zeta_k = 6\phi_o\phi_w/C_S\Sigma \quad (6)$$

Dabei sind:

- ζ_k : Kubikseitenlänge,
- ϕ_o bzw. ϕ_w : Volumenfraktion von Öl bzw. Wasser,
- Σ : Fläche pro Tensidmolekül und
- C_S : Anzahl der Tensidmoleküle pro Volumeneinheit.

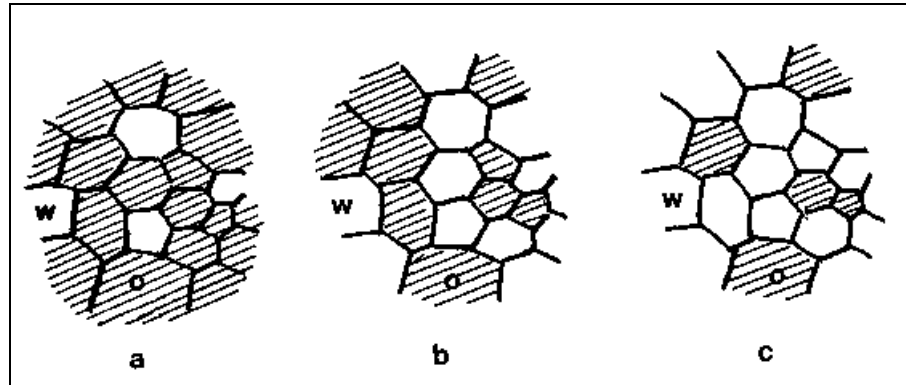


Abb. 2.8b: Talmon-Prager-Modell für Mikroemulsionsstruktur.

2.5.2 Mikroemulsionen für die dermale Anwendung

In der Therapie besitzt die transdermale Verabreichung von Arzneistoffen einige Vorteile. Ihr Einsatz ist jedoch wegen der schlechten Absorption der Arzneistoffe durch die Haut begrenzt. Um die Absorption in der Haut zu verbessern, wurden viele Vehikel-Systeme wie Liposomen, Nanokapseln und Mikroemulsionen entwickelt [151]. Mikroemulsionen werden aufgrund ihrer Eigenschaften, die Bioverfügbarkeit oder die Absorption, insbesondere bei schwerlöslichen Wirkstoffen, zu verbessern, transdermal, parenteral, oral, ophthalmologisch oder dermal eingesetzt [152-154].

Die Löslichkeit des Testosteronpropionats 2% w/w ist in den O/W Mikroemulsionen, die durch nichtionische Tenside (Polyoxyethylen-10-oleylether) stabilisiert wurden, getestet worden. Die Untersuchung zeigte, dass die Löslichkeit des Testosteronpropionats proportional zur Molvolumenabnahme des Ölteils war [155].

Die zunehmende Menge des Wassers verringert die Löslichkeit der hydrophoben Arzneistoffe. Dies führt zu einer übersättigten Mikroemulsion, die eine besonders hohe Absorptionsrate wegen der Steigerung des Diffusionsdrucks der Arzneistoffe besitzt. Um in vivo-Transdermalabsorption von wasserfreien Mikroemulsionen zu untersuchen, haben KEMKEN et al. eine gesättigte Lösung von Bupranolol (B) und Timolol (T) in einer wasserfreien Mikroemulsion (MEB) an einem definierten Bereich des dorsalen Kaninchenfells mit Flecken angewendet. Die Auswertungen wurden im Vergleich zu den Matrixflecken mit Mikroemulsion (M) durchgeführt. Schnell zunehmende Effekte und höhere Maxima wurden für beide Arzneistoffe nach der Anwendung in MEB im Vergleich zu M berechnet. Folglich stellen Mikroemulsionen einen verbesserten Träger für die transdermale Verabreichung der Testarzneistoffe dar [156,157]. MÜLLER et al. erklärten den Penetrationsmechanismus von Mikroemulsionen wie folgt [158]: Eine Mikroemulsion penetriert wegen der niedrigen oder nicht vorhandenen Grenzflächenspannung relativ schnell in das Stratum corneum und mischt

sich dort mit den Lipiden der Haut. Weiterhin wurde berichtet, dass sie dies besser kann als ein disperses System, weil sie sowohl hydrophile als auch lipophile Bereiche hat, aber nicht wie eine Emulsion eine hydrophile oder lipophile äußere Phase besitzt. Ein eingearbeiteter Wirkstoff muss nun nicht aus der Grundlage freigesetzt werden, sondern wird mit der Mikroemulsion in die Haut gezogen. In der Haut befindet sich deshalb nach kurzer Zeit die gesamte Wirkstoffmenge.

Um eine potentielle Hautpenetrationsverbesserung für hydrophile und lipophile Substanzen durch Formulierung in Mikroemulsionsvehikeln zu erreichen und ein zuverlässiges pharmakokinetisches Modell zu erstellen, haben KREILGAARD et al. nach einer aktuellen Anwendung von Mikroemulsionen im Vergleich zu im Handel erhältlicher Creme und zu Hydrogel die Konzentrationen von Lidocain und Prilocain in der Haut durch in vivo-Mikrodialyse in Ratten ermittelt.

Die Absorptionskoeffizienten sind nach Formulierung in den Mikroemulsionen für Lidocain im Vergleich zu O/W-Creme (Basis-Creme) (89 $\mu\text{g/l/min}$) auf das achtfache (753 $\mu\text{g/l/min}$) und für Prilocain im Vergleich zum Hydrogel (5,2 $\mu\text{g/l/min}$) auf nahezu das Doppelte (8,9 $\mu\text{g/l/min}$) gestiegen [159-160].

Durch Inkorporation von Azelainsäure in Mikroemulsionen, die aus Wasser, Propylenglycol, Decanoldodecanol, Tween 80, 1-Butanol und Carbapol bestehen, konnten GASCO et al. Azelainsäure-Penetration bei haarlosen Mäusen im Vergleich zu einem Gel erheblich verbessern.

Weiterhin zeigte Azelainsäure eine bessere Absorption aus einer Mikroemulsion mit DMSO gegenüber einer Mikroemulsion ohne DMSO (Penetrationsuntersuchung auf haarlosen Mäusen) [161].

Die transdermale Penetration in vitro von Nifedipin aus Mikroemulsionen wurde bei haarlosen Mäusen untersucht. Nifedipin zeigte eine wesentlich höhere Fluxrate aus den Mikroemulsionen im Vergleich zu den Fluxraten aus Gelen [162].

Um eine optimale Penetration eines hochwasserlöslichen Arzneistoffes aus einer Mikroemulsion, die aus IPP, Span 20 und Tween 80 besteht, herzustellen, hat SCHMALFUSS den Einfluss von einigen Modulatoren getestet. 2 %-iges Cholesterol oder 5 %-iges n-Hexadecyl- β -D-Triethylenglykol-Glucopyranosid führten zu einer Penetrationsverstärkung. Dieser Effekt wurde als eine Einlagerung der Modulatoren zwischen die Alkylketten der Lipidbilayer der Ceramide (Abb. 2.4) erklärt, die zu einer Störung der Bilayerintegrität geführt hat. Es kann angenommen werden, dass damit eine mögliche Raumerweiterung in den hydrophilen Domänen verbunden ist, die einen Hydratationseffekt

fördert. Währenddessen kann eine konkurrenzartige Situation zwischen Modulatoren wie Harnstoff und DPH (Diphenylhydramin) an Stratum corneum ebenfalls zu verminderter Penetration führen [134].

Die Einarbeitung von mittelkettigen Triglyzeriden, wie Capryl (C8) Caprin (C10) und Laurinsäuren (C12) sowie ihrer entsprechenden Natriumsalze in W/O-Mikroemulsionen führte zu einer Absorptionsverbesserung des Calceins, welches wasserlöslich ist und eine schlechte Absorption aufweist, von ungefähr 2 % in der wässrigen Lösung bis zu ungefähr 37 % in den Mikroemulsionen [164].

Eine Lecithin-Grundlagenmikroemulsion, die Isopropylmyristat (IPM)/Brij® 96V/Lecithin/Wasser und Amphotricin B enthält, wurde von BRIME et al. entwickelt, um Nebenwirkungen des Arzneistoffes zu verringern. Die rheologischen Studien von BRIME et al. zeigten, dass diese Mikroemulsionen einem Newtonschen Verhalten folgen [165].

2.5.3 Zusammensetzung der Mikroemulsionen

Bei der Zusammensetzung der Mikroemulsionen werden nur die Substanzen, die in den untersuchten Mikroemulsionen angewendet wurden, definiert.

2.5.3.1 Nicht-ionische Tenside

Bei den nicht-ionischen Tensiden vom PEO-Typ (Polyethylenoxid) spielt die Temperatur wegen des Löslichkeitseffekts eine große Rolle. Deshalb bilden sich unterhalb der Phaseninversionstemperatur (PIT) O/W- und oberhalb der PIT W/O-Mikroemulsionen mit einer kontinuierlichen Umwandlung aus. MÜLLER et al. zeigten, dass die PIT vom Wassergehalt der Mikroemulsionen abhängig ist und mit zunehmendem Wassergehalt abnimmt [93]. Bei niedrigen Tensidkonzentrationen bilden sich Mikroemulsionen mit mehr Wasser oder Öl oder als 3 Phasen (Wasser, Mikroemulsion, Öl) im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht wird nach WINSOR [145,166] wie folgt benannt:

Winsor I: wenn die O/W-Mikroemulsion im Gleichgewicht mit nichtsolubilisiertem Öl ist,

Winsor II: wenn die W/O-Mikroemulsion im Gleichgewicht mit nichtsolubilisiertem Wasser ist und

Winsor III: wenn die O/W-Mikroemulsion im Gleichgewicht mit nichtsolubilierten Öl und Wasser ist.

2.5.3.1.1 Tween 80

Bei Tween 80 handelt es sich um einen Polyoxyethylensorbitanfettsäureester (Abb. 2.9), der als klare, gelb-gefärbte, viskose Flüssigkeit vorliegt. Tween 80 ist löslich in Wasser, Ethanol und Toluol, unlöslich dagegen in Mineralöl, Erdnuss- und Paraffinöl. Mit einem HLB-Wert (Hydrophil-lipophil-Balance) von $15,0 \pm 0,1$ wird es als O/W-Emulgator und Lösungsvermittler eingesetzt [168,169,170].

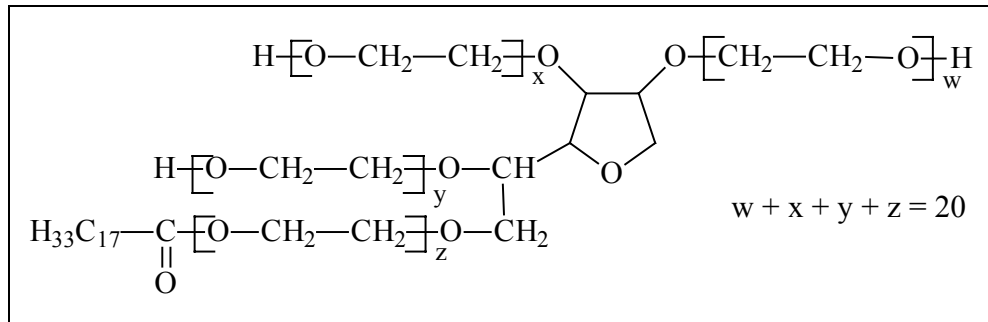


Abb. 2.9: Struktur von Tween 80.

2.5.3.1.2 Span 20

Sorbitanmonolaurat stellt einen Laurinsäureester des Sorbitans dar (Abb. 2.10), der als rötlich-braune, viskose Flüssigkeit zur Verfügung steht. Span 20 ist praktisch unlöslich, aber dispergierbar in Wasser. Es ist mischbar mit Alkoholen und löslich in Paraffin und Ethylacetat. Span 20 wird als W/O-Emulgator verwendet (HLB $8,6 \pm 0,1$) [168,169,170].

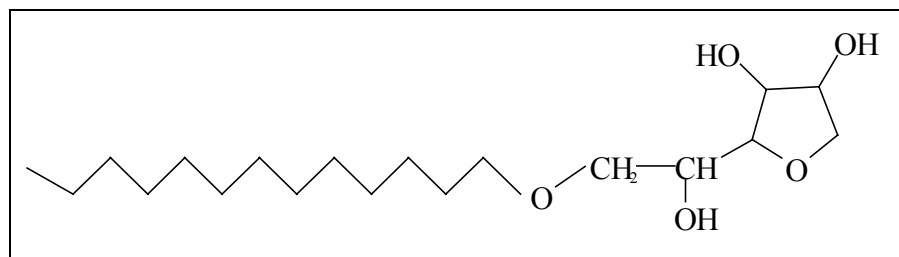


Abb. 2.10: Span 20-Struktur.

2.5.3.2 Lipophile Phase

2.5.3.2.1 Isopropylpalmitat (IPP)

Der synthetische Fettsäureester Isopropylpalmitat (Abb. 2.11) (Isopropylis Palmitas, DAB 1996; Palmitinsäureisopropylester) liegt als helle, dünnflüssige, ölige und praktisch geruchlose Substanz vor. IPP ist unlöslich in Wasser und Glycerin. In pflanzlichen Ölen oder Fetten ist IPP klar löslich. IPP wird als Lösungsvermittler, Spreitungshilfsmittel und Penetrationsverbesserer eingesetzt. IPP ist in der Lage, durch Spreitung und aufgrund

wirkender Kapillarkräfte in die Hornschicht zu penetrieren und dort u.a. die Löslichkeit für applizierte lipophile Substanzen heraufsetzen [169,170].

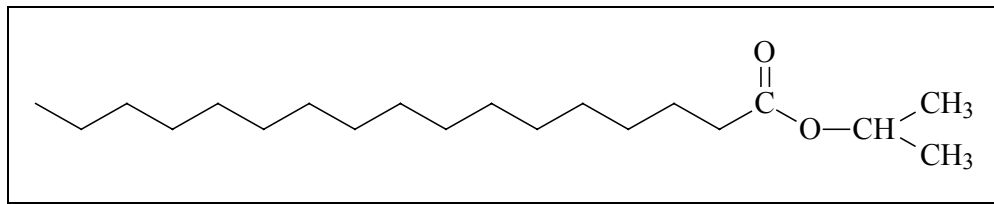


Abb. 2.11: Isopropylpalmitat-Struktur.

2.5.3.2.2 Mittelkettige Triglyceride (MKTG)

MKTG wurden aus *Cocos nucifera* (Palmae) extrahiert. MKTG sind unlöslich in Wasser und mischbar mit Alkohol. Sie wurden als Penetrationsverbesserer in halbfesten Zubereitungen eingesetzt [168,169,170].

2.5.3.3 Hydrophile Phase

2.5.3.3.1 Aqua Bidestillata

Unter dem Einfluss von Elektrolyten kann die Lage des Mikroemulsionsgebietes beeinflusst werden [178]. Es wurde daher für die Erstellung der Phasendiagramme und zur Herstellung der zu untersuchenden Systeme ausschließlich bidestilliertes Wasser verwendet.

2.5.3.3.2 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dimethylsulfoxid ist eine dünnflüssige und stark hygroskopische Substanz (Abb. 2.12), die mit Wasser und verschiedenen organischen Lösungsmitteln mischbar ist. In der Pharmazie wird DMSO besonders in Salben wegen seiner penetrationssteigernden, als Radikalfänger wirkenden, antiphlogistischen und hyperhämisierenden Eigenschaften eingesetzt. Nachteilig ist neben dem unangenehmen Geruch vor allem das häufige Auftreten von Hautreizungen. Deswegen sollte DMSO nur in geringen Konzentrationen verwendet werden [168,183].

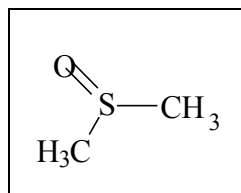


Abb. 2.12: Dimethylsulfoxid-Struktur.

2.5.4 Charakterisierung der Mikroemulsionen

2.5.4.1 Tröpfchendurchmesser

Es wurden bisher verschiedene Methoden angewendet, um die Tröpfchendurchmesser von Mikroemulsionen zu bestimmen, wie Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie, Röntgenkleinwinkelstreuung (Small Angle X-Ray Scattering), Neutronenstreuung (Small Angle Neutron Scattering) und dynamische Lichtstreuung (Photonenkorrelationsspektroskopie) [134].

Bei der Lichtstreuung werden die Strahlen einer Lichtquelle durch eine Sammellinse so konzentriert, dass sich ihr Brennpunkt in einem kolloiden System befindet und sich bei seitlicher Betrachtung deutlich eine kugelförmige Aufhellung durch das Streulicht beobachten lässt. Dieses Phänomen wird als Tyndall-Effekt bezeichnet [171].

2.5.4.1.1 Rayleigh-Streuung

Der Mechanismus der Rayleigh-Streuung beruht auf der Streuung von linear polarisiertem Licht an einem einzelnen Teilchen im Vakuum. Die entscheidende Eigenschaft für die Erzeugung einer Streustrahlung ist die Polarisierbarkeit α eines Teilchens. Durch Wechselwirkung mit der Elektronenhülle induziert das einfallende Licht im Teilchen zeitlich veränderliche, elektrische Momente, die die Streustrahlung emittieren.

Übersteigt die Lichtwellenlänge λ den Teilchenradius wesentlich ($\lambda \geq r_T$), dann ist das elektrische Feld E der einlaufenden Lichtwelle am Teilchenort homogen, und ein Dipolmoment wird induziert.

$$\mu_D = \epsilon_0 \alpha E = \epsilon_0 \alpha E_0 \cos(2\pi \nu t) \quad (7)$$

Dabei bedeuten:

- ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums,
- E_0 : Amplitude des elektrischen Feldes,
- t : Zeit und
- ν : Frequenz der Erregerwelle.

Es handelt sich um eine zeitlich veränderliche Ladungsverteilung, weshalb der Dipol als Strahlungsquelle wirkt. Bei der Einstrahlung von polarisiertem Licht hängt die Intensität der Strahlung eines einzelnen Dipols vom Winkel $\varnothing_s$ zwischen der Dipolachse und der Ausbreitungsrichtung der Streuwelle ab [171].

2.5.4.1.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Ein Ergebnis der Theorie der Rayleigh-Streuung besteht darin, dass das von den Hertzschen Dipolen emittierte Streulicht dieselbe Frequenz ν_0 wie das einfallende Licht hat. Bei einer genaueren Vermessung der Frequenz des Streulichtes stellt man jedoch fest, dass neben dem Intensitätsmaximum bei der Frequenz der Anregungsquelle auch Streulicht mit etwas veränderter Frequenz entsteht. Anstelle einer scharfen Intensitätslinie beobachtet man einen Intensitätspeak, dessen Breite je nach Partikelgröße im Bereich zwischen einigen 100 Hz und einigen 1000 Hz liegt. Diese Linienverbreiterung wird als dynamischer Lichteffect bezeichnet, weil sie ihre Ursache in der Brownschen Bewegung hat. Die Bewegung der als Strahlungsquelle fungierenden, dispergierten Teilchen relativ zum Intensitätsdetektor macht sich im Doppler-Effekt bemerkbar. Die Frequenzverschiebung des Doppler-Effekts äußert sich auch in der Intensitätsänderung des Streulichtes als Funktion der Zeit. Der stochastische Charakter der Bewegung bedingt zeitliche Intensitätsschwankungen. Die Intensitätsfluktuationen werden durch die zeitliche Autokorrelationsfunktion beschrieben:

$$g_{\text{In}}(k, \Delta t) = \overline{I(k, t) I(k, t + \Delta t)} \quad (8)$$

Der Betrag des Wellenvektors(K) ist wie folgt definiert:

$$k = (4\pi n_m / \lambda_0) \sin(\nu_s / 2) \quad (9)$$

Dabei sind:

- n_m : Brechungsindex des Dispersionsmittels,
- λ_0 : Wellenlänge der Laserlichts und
- ν_s : der Streuwinkel.

Der Strich über den Symbolen steht für die statistische Mittelwertbildung. Um den Mittelwert zu erhalten, misst man zur Zeit t die Intensität $I(k, t)$. Danach ermittelt man unter denselben Bedingungen zur Zeit $I(k, t + \Delta t)$ und multipliziert beide Werte miteinander. Diese Messungen werden für gleiche Δt sehr oft wiederholt, um darüber das arithmetische Mittel zu berechnen. Wird diese Prozedur für verschiedene k und Δt durchgeführt, erhält man die gesamte Autokorrelationsfunktion $g_{\text{In}}(k, \Delta t)$. Man kann sie experimentell durch einen Photonendetektor in Kombination mit dem Autokorrelator bestimmen und mit Hilfe der Siegert-Gleichung berechnen:

$$g_{\text{In}} = 1 + [g_e(k, t)]^2 \quad (10)$$

Für ein monodisperses System hat $g(k, \Delta t)$ die Form einer Exponentialfunktion:

$$g_e(k, \Delta t) = e^{-\Gamma \Delta t} \quad (11)$$

mit der Halbwertsbreite:

$$\Gamma = Dk^2 \quad (12)$$

Dabei ist:

D: Diffusionskoeffizient

Unter der Annahme kugelförmiger Teilchen ermittelt man dem Teilchenradius(r_T) mit folgender Formel [145,170]:

$$r_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (13)$$

Dabei sind:

k_B : Boltzmann-Konstante,

D: Diffusionskoeffizient

T: absolute Temperatur und

η : die Viskosität der äußeren Phase.

2.5.4.2 Phasendiagramme

Ein Gemisch aus vier Bestandteilen hat fünf unabhängige, thermodynamische Variablen. Die Experimente sind unter atmosphärischem Druck und bei örtlich festgelegter Temperatur durchgeführt worden. Deshalb erfordert die Darstellung des Zustandsdiagramms drei unabhängige Variablen, die entweder Dichte oder Feld sein können [174]. GRIFFITHS und WHEELER [175] zeigten, dass es in der Diskussion des Phasenübergangs der Multikomponenten-Mischungen von Vorteil ist, zwischen zwei Kategorien der intensiven thermodynamischen Variablen zu unterscheiden. Nach diesen Autoren werden Variablen, die stets konstant gehalten werden, wie der Druck, die Temperatur und das chemische Potential, als Felder bezeichnet. Andere, die im Allgemeinen veränderlich sind, wie die Konzentration und der Brechungsindex, werden Dichten genannt.

Das Mikroemulsionsexistenzgebiet-Phasendiagramm ändert sich mit Änderung der Bedingungen wie z.B. der Tensid-Verhältnisse [178]. Die Diagramme zeigen die Lage eines dreiphasigen, isotropen Mikroemulsionsgebietes. Eindeutige, klare Systeme wurden dabei als Mikroemulsionen im Diagramm markiert.

Der Effekt von Polydimethyl-Siloxan wurde auf das Phasen-Verhalten des Wasser/C12EO6/Isopropylmyristat(IPM)-Systems untersucht. Da das Silikonöl in IPM vollständig löslich ist, wurde es in IPM aufgelöst, wobei die Lösungen der Ölphase benutzt wurden, um seinen Effekt zu studieren. Das Vorhandensein des Polymers erhöht die

hydrophoben Eigenschaften von IPM und verringert dadurch die Solubilisierung des Öls in der Mikroemulsion [177].

2.5.4.3 Polarisationsmikroskopie

Als optisches Verfahren wird die Polarisationsmikroskopie zur Untersuchung anisotroper Materialien eingesetzt. Ein Polarisationskondensator (Polarisator) ermöglicht dabei die Nutzung von linear polarisiertem Licht, das bei Durchstrahlen des Objektes entsprechend dessen Eigenschaften charakteristisch verändert und von einem zweiten Polarisator (Analysator) analysiert wird. Die dabei unter optischer Doppelbrechung entstehenden Texturbilder lassen einen Rückschluss auf die vorliegenden Strukturen (thermotrope Flüssigkristalle, lyotrope Mesophasen) in der untersuchten Probe zu [178].

Die Polarisationsmikroskopie kann somit auch Aussagen darüber treffen, ob die untersuchten Systeme isotropen (fehlende Lichtdoppelbrechung) oder anisotropen Charakter aufweisen. Sie eignet sich daher zur Beurteilung der zu charakterisierenden Formulierungen bei der Erstellung von Phasendiagrammen, indem sie eine Unterscheidung zwischen flüssigkristallinen und Mikroemulsions-Systemen ermöglicht.

2.5.4.4 Freisetzung aus Mikroemulsionen

Verschiedene Parameter, die die Arzneistoff-Freisetzung aus den Mikroemulsionen beeinflussen, wurden schon erforscht. TROTTA et al. haben berichtet, dass die Freigabe der verschiedenen Arzneistoffe mit unterschiedlicher Hydrophilie aus O/W-Mikroemulsionen, die aus Isopropylmyristat, Butanol, und Puffer bestehen, proportional zum Verteilungskoeffizient Isopropylmyristat/Wasser ist [179]. Die Autoren verwendeten in ihrem Versuch das Permeabilitätsmodell mit doppelschichtiger Membran, dass aus einer hydrophilen Membran und einer lipophilen Membran besteht, um beide Haut-Eigenschaften zu berücksichtigen und um das Auflösen der Membran zu verhindern. In diesem Modell zeigten die Mikroemulsionen nach Benzylalkoholzugabe zur Verbesserung der Löslichkeit von Felodipin den höchsten Flux [180]. Es wurde gefunden, dass die Freigaberate von der Größe der inneren Phase und vom Alkohol, der in der Formulierung benutzt wird, abhängig ist [181].

Die Freisetzung des Nortriptylin-Hydrochlorids aus O/W-Mikroemulsionen, die aus Isopropylmyristat, Propylenglykol, Polysorbat 80 und Phosphatpuffer, pH 7,4, als kontinuierliche Phase bestehen, erhöhte sich durch die lipophile Membran, als die Konzentration von Polyethylenglykol 400 in der inneren Phase erhöht wurde [182].

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien

Hyaluronan-Derivate (22, 31, 235, 1200 kDa): Hans-Knöll-Institut, Jena, Deutschland

Schwefelsäure: Fluka, Buchs, Schweiz

Sodiumborat-Decahydrat: Fluka, Buchs, Schweiz

Carbazol: Fluka, Buchs, Schweiz

Span 20: Fluka, Buchs, Schweiz

Tween 80: Fluka, Buchs, Schweiz

IPP: Fluka, Buchs, Schweiz

Natronlauge: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Methanol: J. T. Baker, Deventer, Holland

Kollodium: Caelo, Hilden, Deutschland

Dikaliumhydrogenphosphat: Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat: Merck, Darmstadt, Deutschland

Sorbinsäure: Merck, Darmstadt, Deutschland

Basiscreme DAC: Wasserfuhr, Bonn, Deutschland

DMSO: Fluka, Buchs, Schweiz

Glycerol: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Acetonitril: J. T. Baker, Deventer, Holland

Methanol: J. T. Baker, Deventer, Holland

Mittelkettige Triglyceride DAB: Woelm Pharma GmbH & Co., Eschwege, Germany

Emulgierender Cetylstearylalkohol: Waaerfuth, Bonn, Deutschland

Dickflüssiges Paraffin: Wasserfuhr, Bonn, Deutschland

Glycerolmonostearat 60: Wasserfuhr, Bonn, Deutschland

Cetylstearylalkohol: Wasserfuhr, Bonn, Deutschland

Weiß Vaseline: Wasserfuhr, Bonn, Deutschland

Macrogol-1000-Glycerolmonostearat: BASF, Rheinland-Pfalz, Deutschland

Propylenglycol: Caelo, Hilden, Deutschland

Wollwachsalkohol: Croda Synopharm, Barsbüttel, Deutschland

Cetylalkohol: Wasserfuhr, Bonn, Deutschland

Borat-Puffer: Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol absolut und Diethylether absolut: Merck, Darmstadt, Deutschland

3.2 Eingesetzte Instrumente

3.2.1 Fourier -Transform-Infrarot-Spektroskopie-Totalreflexion- (FTIR-ATR)

Die IR-Spektren wurden auf einem Bruker Spektrometer IFS 28 (Karlsruhe, Deutschland), das auf Spectra-Tech-Signale-Bounce-HART-Attachment (Shelton, CT, USA) ausgerüstet ist, aufgenommen.

3.2.2 Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektren der HS-Derivate wurden mit einem RFS 100 /S-Bruker-Spektrometer (Karlsruhe, Deutschland) als Film (3.3.1) gemessen.

3.2.3 ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der HS-Derivate wurden in deuteriertem Wasser (D_2O) mit einem Spektrometer der Firma VARIAN, das bei Frequenzen von 499,8 MHz bzw. 125,7 MHz arbeitet, gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind als δ -Werte in ppm relativ zu 3-Trimethylsilylpropionat-Na-Salz (TSP) als interner Standard angegeben. Die Proben wurden in 5 mm-NMR-Röhrchen 528-PP der Firma Wilmad gefüllt. Die NMR-Spektren wurden bei 27°C aufgenommen. Für die Aufnahme von zweidimensionalen (2D)-Spektren wurde die Standard-VARIAN-Software benutzt. Die H,H-COSY-, GHMQC- und GHMBC-Spektren wurden im Absolutwertmodus gemessen und eine Sinebell-Multiplikation in beiden Zeitdomänen angewendet.

^{13}C -NMR-Festkörper-Spektren der HS-Derivate wurden mit einem Spektrometer INOVA 400 der Firma VARIAN bei einem Magnetfeld von 9,4 Tesla und einer Resonanzfrequenz von 100,4 MHz gemessen.

3.2.4 UV/Vis-Spektralphotometer

UV/Vis-Spektren wurden auf einem HP 8452 A der Firma Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland gemessen.

3.2.5 Viskosimeter

Die Lösungen wurden im Becher des Rotationsviskosimeters (Zylinder-Becher-Einrichtung) gemessen. Das Gerät besteht aus einem Rheometer-Elektronik RHEOLAB MC10 Physica, (Stuttgart, Deutschland) und Universal Messeinrichtung UM (Physica, Stuttgart, Deutschland), Universalsoftware US200 (Physica, Stuttgart, Deutschland). Die Rheogramme wurden mit steigender und verringerter Scherkraft bei 20 und 25 °C aufgenommen.

3.2.6 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Ein Chromatograph LC-10 AD SCHIMADZU (Schimadzu, Kyoto, Japan) wurde benutzt. Die HS wurde durch Säule1 (No. B7 Y76 Nucleosil –100 C 18 (5µm), 4 mm I D, Knauer, Berlin, Deutschland] und Säule2 (LichroCHRT® 125-4, Lichrospher 100 RP-8 (5 µm), Merck, Deutschland) getrennt und durch den UV-Detektor (UV-120-02, Schimadzu, Kyoto, Japan) detektiert.

3.2.7 Kapillarzonelektrophorese (CZE)

Die Kapillarelektrophorese-Messungen wurden auf einem CE-System G1600A der Firma Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland, das mit einem Dioden-Array-Detektor (190-600 nm), einer normalen Kapillare mit einem Durchmesser vom 50 µm und einer bubble-Kapillare mit einem Durchmesser vom 50 µm ausgerüstet, durchgeführt.

3.2.8 Spektrophotometer

Für die UV-Messungen wurde mit einem UV-120-02-Photometer der Firma Schimadzu, Kyoto, Japan gearbeitet.

3.2.9 Mikroprozessor-LaborPH/mV/°C-Messgerät

Bei den pH-Messungen wurde ein HI 9321 Mikroprozessor-pH-Meter der Firma Hana-Instrument (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

3.2.10 Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)

Zur Ermittlung der Tröpfchendurchmesser mittels PCS wurden die Proben durch einen Filter mit einer Porengröße von 1,2 µm der Firma Sartorius, Göttingen, Deutschland filtriert, und danach die Brechungsindizes ermittelt (ABBEMAT, Dr. Krenchen, Seelze). Die Messungen erfolgten in Streulichtküvetten aus Quarzglas der HELLMMA-Firma (Mühlheim, Deutschland), welche in die Laserlichtapparatur gestellt und auf 25 °C thermostatiert werden.

Geräteparameter

Kompakt-Goniometer (ALV), Winkelbereich: 20° bis 150°

Diodengepumpter ND-YAG Laser (ADLAS), $\lambda = 532\text{nm}$, Leistung 150 mW

Faseroptik (ALV), Detektor: Photomultiplier (EMI)

Datenerfassung: ALV-5000/E Multiple Tau Correlator (Rechnerkarte) mit fast-Option

Software: ALV-5000/E Version .3.1., SLS (1993).

Die Volumenfraktion der Mikroemulsionströpfchen (ϕ) ist wie folgt definiert:

$$\phi = \frac{v_s + v_i}{v_s + v_i + v_o} \quad (14)$$

3.2.11 Polarisationsmikroskopie

Es wurde ein Gerät von Typ S. Nr. 430837, Carl Zeiss, Jena, Deutschland verwendet

3.3 Methoden

3.3.1 Herstellung der Filme für HS-Derivate

Die HS-Derivate wurden als Filme durch FTIR-ATR gemessen. Weil die Viskositäten der wässrigen Lösungen der HS-Derivate nicht gleich waren, wurden wässrige Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen (2 % für 1200 kDa, 5 % für 235 kDa, 166 % für 31 kDa) zubereitet. Die Lösungen wurden auf Glasplatten gegossen und anschließend in einem Autoklav bei 60 °C für 6 Stunden bis zur vollständigen Trocknung gebracht.

3.3.2 Probenvorbereitung für UV/Vis-Spektren

Um die HS-Derivate mittels UV/Vis-Spektroskopie zu messen, wurden diese (31, 235 und 1200 kDa) in wässrigen Lösungen mit Konzentrationen von 50 µg/ml hergestellt und die Lösungen für 12 h über Nacht stehen gelassen.

3.3.3 Probenvorbereitung von Viskositätsmessungen

Um die HS-Viskosität zu messen, wurden 2 %-ige, wässrige Lösungen der HS-Derivate 31, 235 und 1200 kDa vorbereitet und über Nacht stehen gelassen.

3.3.4 Löslichkeit

Die HS wurden in unterschiedlichen Lösungsmitteln bis zur Sättigung aufgelöst und anschließend die Sättigungskonzentrationen mittels CZE gemessen.

3.3.5 HPLC-Methoden (Hochleistungsflüssigchromatographie-Methoden)

3.3.5.1 HPLC-1

Die Proben wurden wie bei der photometrischen Methode vorbereitet (3.3.7.2) und mit HPLC unter Verwendung von Methanol und destilliertem Wasser als Laufmittel (1:99) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,2 ml/min und einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

Die Bezugsgeraden wurden wie folgt erstellt: 30 mg HS 1200 kDa wurden in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, danach mit 1N Natronlauge neutralisiert und mit destilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Der Blindwert wurde wie folgt vorbereitet: 2,5 ml konzentrierte Schwefelsäure wurde mit 1N Natronlauge neutralisiert und auf 100 ml aufgefüllt. Die Standardkonzentrationen (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 und 1500 µg/ml) wurden aus der Stammlösung hergestellt.

3.3.5.2 HPLC-2

Die Bezugsgeraden wurden wie folgt erstellt:

1. Es wurde eine Stammlösung von HS 31 kDa mit einer Konzentration von 100 µg/ml und aus dieser Lösung wurden verschiedene Standards (10, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml) hergestellt.
2. Eine 10 µg/ml-Lösung wurde als eine Stammlösung verwendet, und weitere Standardlösungen (0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml) daraus hergestellt.
3. Aus einer 1 µg/ml-Stammlösung wurden weitere Standardlösungen (0,1, 0,2, 0,3, 0,5 und 1 µg/ml) hergestellt.
4. Aus einer 0,1 µg/ml-Stammlösung wurden ebenfalls weitere Standardlösungen (0,001, 0,005, 0,01 und 0,05 µg/ml) hergestellt.

Alle Proben wurden an einer Shimadzu-HPLC mit einer RP 8-Säule dreifach bei folgenden Bedingungen gemessen: Laufmittel Wasser:Acetonitril 96:4, Fluss 0,5 ml/min, Wellenlänge $\lambda = 195$ nm.

3.3.6 CZE-Methoden (Kapillarzonenoelektrophorese-Methoden)

3.3.6.1 Direkte Methode zur Bestimmung der HS 1200 kDa (CZE-1 und CZE-2)

Die Bezugsgerade wurde wie folgt erstellt: Eine Stammlösung von 500 µg/ml wurde hergestellt. Ausgehend von dieser Lösung wurden Standardlösungen mit Konzentrationen von

5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 und 500 µg/ml bereit. Alle Proben wurden mittels CZE mit bubble-Kapillare (CZE-2) unter folgenden Bedingungen gemessen: Phosphatpuffer 40 mM, pH 7,7, Spannung 22 kV, Wellenlänge $\lambda = 195$ nm. Für die CZE-1-Methode wurde eine Standardkapillare mit einem Durchmesser von 50 µm, 40 mM Phosphatpuffer (pH 7,7), eine Spannung von 12 kV und eine Wellenlänge von $\lambda = 195$ nm verwendet.

3.3.6.2 Direkte Methode zur Bestimmung der HS 31 kDa (CZE-3)

Die Bestimmung von HS 31 kDa erfolgte mittels CZE mit 40 mM Phosphatpuffer (pH 6,2), einer Spannung von 22 kV, einer Injektionszeit von 30 Sekunden, bei einem Druck von 50 mba, mit bubble-Kapillare und einer Wellenlänge von $\lambda = 195$ nm.

3.3.6.3 Indirekte Methode zur Bestimmung der HS 1200 kDa (CZE-4)

Die Messungen wurden bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 40 mM Phosphatpuffer, 10 mM Sorbinsäure, pH 7,7, Spannung 13 kV, Standardkapillare (40/48,5 cm lang, 50 µm I.D.), Wellenlänge $\lambda = 250$ nm.

3.3.7 Photometrische Methoden

3.3.7.1 Modifizierte Carbazol-Methode (MCM)

Folgende Lösungen wurden eingesetzt:

Lösung A: 0,025 M Natriumtetrahydroborat in konzentrierter Schwefelsäure,

Lösung B: 0,125 % Carbazol in absolutem Ethanol (w/ w) und

Lösung C: HS1200 kDa wurde in Wasser über Nacht stehen gelassen und Standards von 10, 50, 75, 100, 150, 200 und 300 µg/ml hergestellt.

Die Methode wurde wie folgt durchgeführt:

1. 3 ml Lösung A auf Eiswasser stark gekühlt,
2. 0,5 ml Probe wurde dazugegeben,
3. das Reagenzglas wurde verschlossen, kräftig geschüttelt und 10 min im Wasserbad temperiert,
4. das Reagenzglas wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und 15 min ins kochende Wasserbad gestellt,
5. das Reagenzglas wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und
6. im Spektrophotometer UV-120-02 der Firma Shimadzu, Kyoto, Japan bei einer Wellenlänge von 530 nm gegen Schwefelsäure vermessen.

3.3.7.2 Neue photometrische Methode (NPM)

100 mg HS 1200 kDa wurden in 2,5 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst, mit 1N Natronlauge auf pH 5 eingestellt und danach auf 100 ml destilliertes Wasser aufgefüllt. Es wurden folgende Standardlösungen hergestellt: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 µg/ml.

3.3.8 Lösungen- und Pufferherstellung

3.3.8.1 Phosphat-Puffer

Eine 40 mM Phosphatpufferlösung (pH 7,7) wurde hergestellt, indem 63,03 g Kaliumhydrogenphosphat und 5,13 g Kaliumdihydrogenphosphat in Wasser gelöst und auf ein Volumen von 1l aufgefüllt wurden. Der pH des Puffers wurde bei 25°C mit einem HI 9321 Mikroprozessor-pH-Meter der Firma Hana-Instrument gemessen.

3.3.8.2 Laufmittel für HPLC

Die mobile Phase Wasser:Methanol 96:4 (v/v) wurde frisch zubereitet, indem 40 ml Methanol (HPLC-Grad) zu 960 ml Wasser gegeben wurden. Diese Lösung wurde mit Ultraschall für 30 Minuten entgast und in einer fest verschlossenen Flasche aufbewahrt.

Die zweite mobile Phase Wasser:Acetonitril (v/v) wurde analog wie in Wasser:Methanol vorbereitet und im frischen Zustand benutzt.

3.3.9 Herstellung der halbfesten Zubereitungen

3.3.9.1 Wasserhaltige hydrophile Salbe (DAB)

Diese hydrophile Creme besteht aus emulgierendem Cetylstearylalkohol, dickflüssigem Paraffin, weißer Vaseline und HS (1200 oder 22 kDa), die über Nacht in Wasser gelöst wurde.

Herstellung: Emulgierender Cetylstearylalkohol, dickflüssiges Paraffin und weiße Vaseline wurden bei 70°C geschmolzen. Die wässrige Lösung von HS (1200 oder 22 kDa) wurde im Wasserbad bis 80°C erhitzt, danach wurde diese portionsweise zur ersten Lösung zugegeben und in einer Fantaschale bis Raumtemperatur gerührt [169].

3.3.9.2 Amphiphile Creme (DAC)

Diese Creme besteht aus Glycerolmonostearat, Cetylalkohol, mittelkettigen Triglyceriden, weißer Vaseline, Macrogol-1000-Glycerolmonostearat, Propylenglykol und HS(1200 oder 22 kDa), die in Wasser über Nacht gelöst wurde.

Herstellung: Glycerolmonostearat 60, Cetylalkohol, Triglyceride und weiße Vaseline wurden im Wasserbad bei 60°C geschmolzen und portionsweise mit der auf die gleiche Temperatur erwärmten Mischung aus Macrogol-1000-Glycerolmonostearat, Propylenglykol und HS(1200 oder 22 kDa)-Lösung versetzt. Die Creme wurde bis Raumtemperatur kaltgerührt [144].

3.3.9.3 Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (DAB)

Diese lipophile Creme besteht aus Wollwachsalkohol, Cetylalkohol, weißer Vaseline und HS(1200 oder 22 kDa), die über Nacht in Wasser gelöst wurde.

Herstellung: Die Creme wurde auf 60°C erwärmt. Eine wässrige HS(1200 oder 22 kDa)-Lösung wurde auf etwa 70°C erwärmt, und beide Stoffe wurden in der Fantaschale bis Raumtemperatur zusammengerührt [169].

3.3.9.4 Extraktion und Gehaltsbestimmung

100 mg von jeder Zubereitung wurden extrahiert und der Gehalt an HS wurde mit CZE, HPLC, der Carbazol-Methode und der neuen photometrischen Methode bestimmt. Die Gehaltsbestimmung an HS in den Zubereitungen wurde wie folgt durchgeführt:

- 100 mg HS wurden in 5ml destilliertem Wasser in einem verschlossenen Erlenmeyer-Kolben gelöst,
- 10 ml Diethylether wurden zu dieser Lösung gegeben,
- die Probe wurde für 10 min geschüttelt,
- die wässrige Phase wurde abgetrennt und die Ether-Phase und der Erlenmeyer-Kolben wurden mit 3 ml destilliertem Wasser gespült,
- die wässrige Phase wurde auf 10 ml aufgefüllt,
- 3 ml der wässrigen Phase wurden im Becherglas im Trockenschrank für 1 Stunde getrocknet,
- HS wurde mit HPLC1, photometrisch, wie unter 3.3.5.1 und 3.3.7.2 beschrieben, bestimmt,
- für die HS-Bestimmung mit der Carbazol-Methode wurden 0,5 ml der wässrigen Phase direkt eingesetzt und, wie unter 3.3.7.1 beschrieben, weiterverarbeitet und

- für die HS-Bestimmung mittels CZE wurde 1ml von der wässrigen Phase entnommen und direkt gemessen (s. 3.3.6.1).

3.3.10 Die Freisetzung

3.3.10.1 Mehrschichtmembransystem (MSMS)

Das MSMS nach NEUBERT und FÜRST [137,140-142] besteht aus Grund- und Deckplatte (Polyacryl), zwischen denen bis zu acht Versuchszellen übereinander angeordnet und per Verschraubung fixiert werden können. Eine Versuchszelle setzt sich aus Grundscheibe und Schablone zusammen, zwischen denen je nach experimenteller Anforderung mehrere Membranen angeordnet werden können. Die Schablone ist mit einer Aussparung von 4 cm versehen, wodurch auf den Membranen eine Applikationsfläche für zu untersuchende Formulierungen entsteht (Abb. 2.7).

3.3.10.2 Wasser-getränkte Nephrophanfolie

Nephrophanfolie wurde auf der Größe einer Versuchszelle zugeschnitten, über Nacht in destilliertem Wasser aufbewahrt und vor der Verwendung kurz zwischen zwei Filterblättern getrocknet.

3.3.10.3 Glycerol-Collodium-Membranen

4 g Glycerol wurden durch 100 g eines Diethylether-Ethanol-Gemisches (85:15) ergänzt und anschließend mit 100 g 4 %iger Collodidlösung versetzt. 120 ml dieser Lösung wurden auf einem Filterziehgerät auf einer Glasplatte ausgegossen, wobei die gleichmäßige Verteilung durch eine mit konstanter Geschwindigkeit laufende Schiene erfolgte. Nach diesem Verfahren hergestellte Membranen enthalten nach einem Tag (Verdunstungsgefahr) ca. 2,5 mg Glycerol/4 cm².

3.3.10.4 Durchführung der HS-Freisetzung

Auf die Grundscheibe einer Versuchszelle wurde Nephrophanfolie als Trennschicht zwischen Versuchsmembran und Modell aufgelegt. Darauf konnte eine Glycerol-Collodium-Membran und eine wassergetränkte Nephrophanfolie angeordnet werden. Den oberen Abschluss bildete die Schablone, in der jeweils 10 mg der halbfesten Zubereitungen oder 10 µl der Mikroemulsionen aufgetragen und vorsichtig verstrichen wurden.

Im Anschluss an das Übereinandersetzen der einzelnen Zellen wurde die Verschraubung in Alufolie eingewickelt und das Modell danach einer Temperierung in einem Becherglas im Thermostaten bei 32°C unterzogen. Nach Ablauf der Versuchszeiten von 20, 40, 60, oder 120 min bzw. 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 240 oder 360 min wurden die Zellen getrennt und die Membranen von Formulierungsrückständen befreit. Auf sogenannten "Wiederfindungszellen" wurden die Rückstände belassen, wodurch eine Überprüfung des Verfahrens ermöglicht wurde. Die hydrophile Membran wurde zusammen mit der Nephrophanfolie mit 5ml Diethylether und 1,3 ml heißem Wasser (80°C) für 30 min geschüttelt. 10 ml Diethylether wurden dieser Lösung zugegeben und für 10 min geschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und direkt mittels HPCE oder HPLC gemessen.

3.3.11 Mikroemulsionen

3.3.11.1 Mikroemulsionenvorbereitung mit DMSO für Tropfendurchmesser-studium

Fünf Serien wurden für die Messung der Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen vorbereitet. Tabelle 3.3a und Tabelle 3.3b zeigen die Zusammensetzung von Mikroemulsionen mit DMSO für die dynamischen Lichtstreuungsuntersuchungen.

Tab. 3.3a: Zusammensetzung von Mikroemulsionen mit DMSO für die Untersuchungen mit dynamischer Lichtstreuung.

	Serie 1 (Tween 80)		Serie 2 (Span 20)		Serie 3 (T:S 3:2)	
	IPP	W:DMSO	IPP	W:DMSO	MKTG	W:DMSO
	ml	1ml	ml	1ml	ml	1ml
M 1	8	0:6	8	0:6	8	0:6
M 2	8	1:5	8	1:5	8	1:5
M 3	8	2:4	8	2:4	8	2:4
M 4	8	3:3	8	3:3	8	3:3
M 5	8	4:2	8	4:2	8	4:2
M 6	8	5:1	8	5:1	8	5:1
M 7	8	6:0	8	6:0	8	6:0

Tab. 3.3b: Zusammensetzung von Mikroemulsionen mit DMSO für die Untersuchungen mit dynamischer Lichtstreuung.

	Serie 4 T:S (2:3)			Serie 5	
	MKTG	W:DMSO	Span 20	DMSO	IPP
	ml	1ml	ml	ml	ml
M 1	8	0:6	2,2	1	8
M 2	8	1:5	2,4	1	8
M 3	8	2:4	2,6	1	8
M 4	8	3:3	2,8	1	8
M 5	8	4:2	3	1	8
M 6	8	5:1			
M 7	8	6:0			

3.3.11.2 Probenvorbereitung für Wasserlöslichkeitsuntersuchungen (Wasseraufnahme) in Mikroemulsionsgrundlagen mittels dynamischer Lichtstreuung

Es wurde eine Serie von Span 20:Tween 80-Gemischen mit verschiedenen Verhältnissen (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 und 0:10) hergestellt. Jeweils 1 ml von jedem Span 20:Tween 80-Gemisch wurde mit 4 ml IPP gemischt. Zu diesem Gemisch wurde Wasser gegeben, bis sich eine nicht-klare Mikroemulsion gebildet hatte (Die Wasserzugabe wurde nach der Bildung der klaren Mikroemulsionen bis zur Entstehung einer nicht klaren Mikroemulsion fortgesetzt).

3.3.11.3 Probenvorbereitung für Untersuchung des HS 22 kDa-Einflusses auf den Tensidmengenbedarf (Span 20)

Fünf Serien wurden für Untersuchungen von HS 22 kDa als Cotensid in Mikroemulsionen hergestellt. Tabelle 3.4 zeigt die Zusammensetzungen der Mikroemulsionen.

Tab. 3.4: Zusammensetzungen der Mikroemulsionen, die zur Untersuchung von HS 22 kDa-Einfluss auf Tensidmengenbedarf hergestellt wurde.

	Serie 1			Serie 2			Serie 3			Serie 4			Serie 5		
	HS	W	IPP	HS	W	IPP	HS	W	IPP	HS	W	IPP	HS	W	IPP
	mg	ml	ml	mg	ml	ml	mg	ml	ml	mg	ml	ml	mg	ml	ml
M 1	50	0,2	4	100	0,2	4	150	0,2	4	200	0,2	4	250	0,2	4
M 2	50	0,3	4	100	0,3	4	150	0,3	4	200	0,3	4	250	0,3	4
M 3	50	0,4	4	100	0,4	4	150	0,4	4	200	0,4	4	250	0,4	4
M 4	50	0,5	4	100	0,5	4	150	0,5	4	200	0,5	4	250	0,5	4

HS (22 kDa)

3.3.11.4 HS-IPP-Mikroemulsionsherstellung

188 mg HS 22 kDa wurden in 0,4 ml Wasser gelöst und danach 7,5 ml IPP zugegeben. Bei Zimmertemperatur wurde die Mischung der Tenside (Tween 80:Span 20, 2:3) zugegeben, bis eine klare Lösung entstand. Die verbrauchte Tensidmenge betrug 1,3 ml.

3.3.11.5 HS-MKTG-Mikroemulsionsherstellung

200 mg HS 22 kDa wurden in 0,96 ml W:DMSO (0,6:3,6) gelöst. 7,24 ml MKTG wurden anschließend zu dieser Lösung gegeben. Danach wurden 1,6 ml Span 20 zugesetzt, bis eine klare Lösung entstand.

3.3.12 Statistik

Alle Messungen sind als Triplikate erfolgt. Die Resultate wurden mit dem PC-Programm Origin mit Vertrauensbereich von 95 % analysiert. Die Nachweisgrenzen (NWG) für HPLC und HPCE wurden mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{NWG} = 3\text{CN}/\text{H} \quad (15)$$

Dabei sind:

- C: niedrigste ermittelte Konzentration des Wirkstoffes,
- H: die Höhe der Spitze und
- N: Rauschen der Linie.

Die Kalibrierung und die Prozedurstandardabweichung wurde mit Hilfe der folgenden Gleichungen berechnet [191]:

$$Y = a_0 + a_1X \quad (16)$$

4 Ergebnisse

4.1 HS-Strukturaufklärung und physikochemische Eigenschaften

Die Struktur von Radikalfängern ist durch den Besitz von Gruppen gekennzeichnet, die Komplexe mit den Radikalen bilden und zur Unterbrechung der Radikalbildungsreaktionskette führen. Die Doppelbindung und die Hydroxylgruppen in der Struktur sind wichtig als Radikalfänger für ungepaarte Elektronen in den Radikalen [68-71]. Die Phenolgruppe im Vitamin D ist für die Wirkung dieser Substanz als Radikalfänger verantwortlich [121]. CALLISTE et al. konnten zeigen, dass die Doppelbindung und die alpha- oder beta-6'-Hydroxygruppen, die in den Flavonoid-Strukturen vorkommen, für die Flavonoid-Wirkung als Radikalfänger verantwortlich sind [68]. NAITO et al. haben nach Untersuchungen zur Wirksamkeit von Rebamipid-(2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)-chinolinon-4-yl]) als Radikalfänger berichtet, dass der wichtigste und bestimmende Faktor für das Auffangen von Hydroxylradikalen die Doppelbindung des 3,4-Chinolinonringes ist [69]. HS ist ein Radikalfänger, dessen Wirkung sich nach dem enzymatischen Abbau verstärkt [29]. HS enthält viele Hydroxylgruppen und zusätzlich Carbonylgruppen, die vor und nach dem Abbau stabil bleiben. NUHN et al. und andere Autoren stellten fest, dass nach enzymatischem Abbau von HS eine Doppelbindung gebildet wird (Abb. 4.13) [31]. Bei NMR-Studien an abgebauter HS wurde die Doppelbindung bisher nicht charakterisiert [54,55]. Die vorliegende Arbeit soll als Voraussetzung für HS-Untersuchungen dienen, um die eingebrachten Beweise für die Anwesenheit der Doppelbindung durch Raman-, IR-, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR und UV/Vis-Spektroskopie zu bestätigen und damit die Verstärkung der HS-Wirkung als Radikalfänger zu erklären.

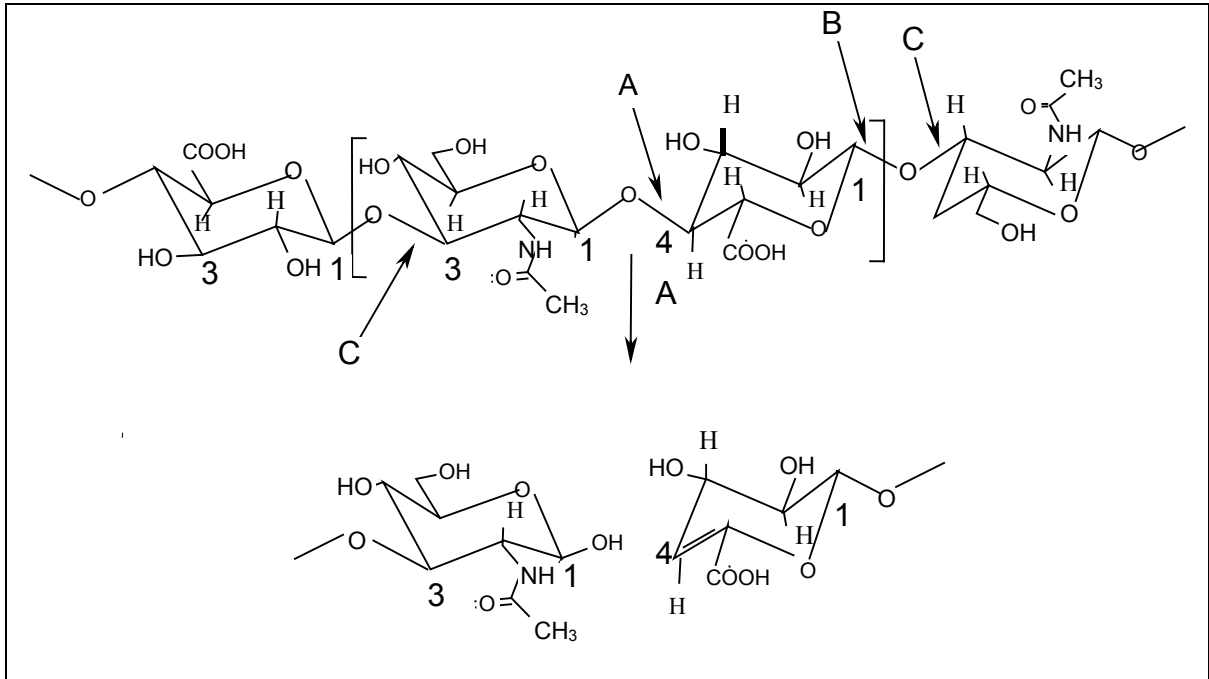


Abb. 4.13: Enzymatischer Abbau von Hyaluronsäure [D-Glucuronsäure-(1-β-3)-N-Acetyl-D-Glucosamin-(1-β-4)] und die verschiedenen Abbaumöglichkeiten. A: Bakterielle Hyaluronidase; B: Blutegel-Hyaluronidase; C: Spermatozoen-Hyaluronidase, die nur eine Doppelbindung in HS-Derivaten verursacht.

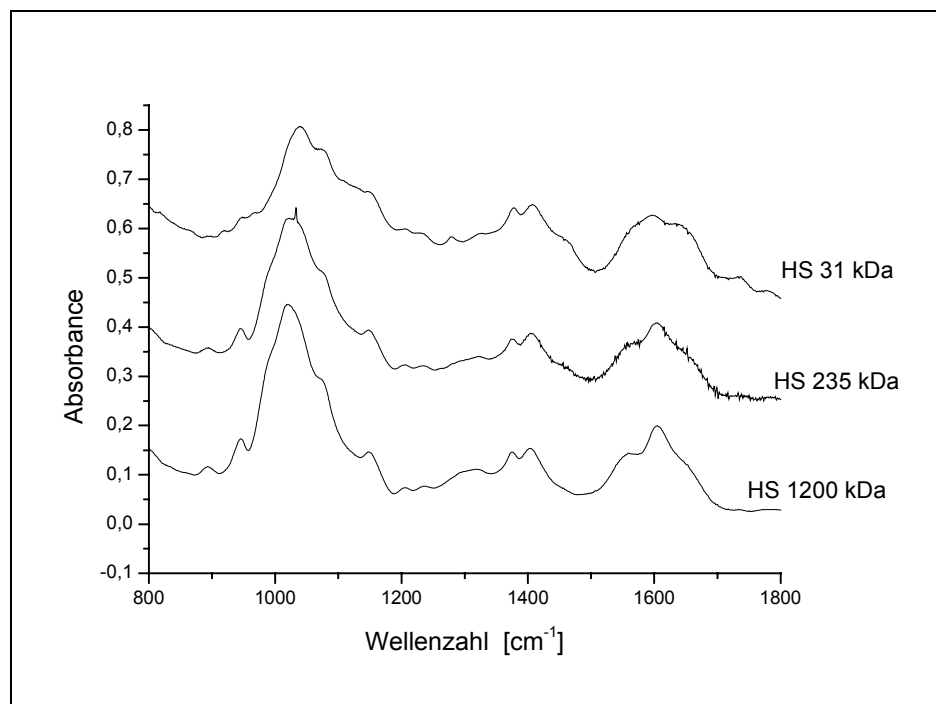
4.1.1 Spektroskopische HS-Strukturaufklärung vor und nach dem enzymatischen Abbau

4.1.1.1 Charakterisierung der HS-Struktur durch FTIR-ATR vor und nach dem enzymatischen Abbau

Mit Hilfe der FTIR-ATR-Spektroskopie wurden die HS-Derivate (3.2.1.) im Spektralbereich von 750 bis 4000 cm^{-1} untersucht (Abbildungen 4.14, 4.15). HS 1200 kDa zeigte eine scharfe Bande bei der Wellenzahl 1654 cm^{-1} , die auf die Amid-I-Schwingung der Amidgruppe zurückzuführen ist. Im Spektralbereich zwischen 1500 und 1700 cm^{-1} gibt es zwar Veränderungen in der Bandenschulter, aber eine eindeutige Interpretation diese Befunde ist schwierig. Die IR-Banden für die verschiedenen HS sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5: IR-Banden der HS-Derivate.

Probe	31 kDa	235 kDa	1200 kDa
IR-Bande	Wellenzahl [cm^{-1}]		
C – O – C- Streckschwingungen, O – H -Deformation, C = O-Deformation.	896	895	894
	946	945	946
C – O – C, C – O, C – O – H -Streckschwingungen	1038	1018	1018
	10780	1079	1079
	1156	1148	1148
CH ₂ , CH ₃ , C – O – H-Deformation, C – O mit C = O-Kombination, Amid III	1378	1375	1374
	1407	1404	1405
C = O-Carboxyl	1564	1557	1559
Amid II	1597	1603	1602
C = O -Amid I	1655	1655	1654
C - H-Streckschwingung	2854	2852	2878
	2925	2922	2921
N - H-Streckschwingung	3284	3284	3284
O - H-Streckschwingung	3386	3386	3386

Abb. 4.14: IR-Spektren von HS 31, 235, 1200 kDa im Wellenzahl-Bereich 800-1800 cm^{-1} .

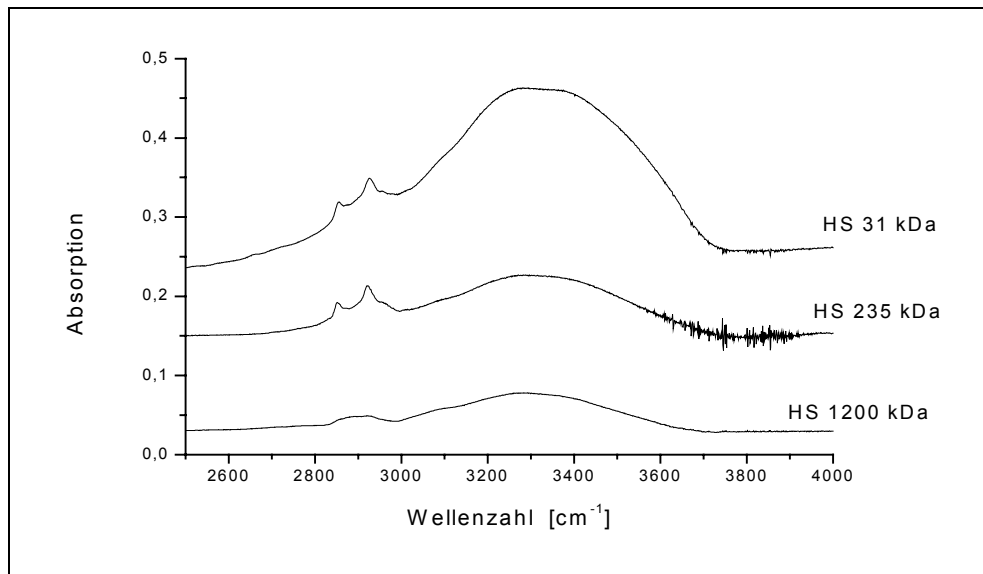


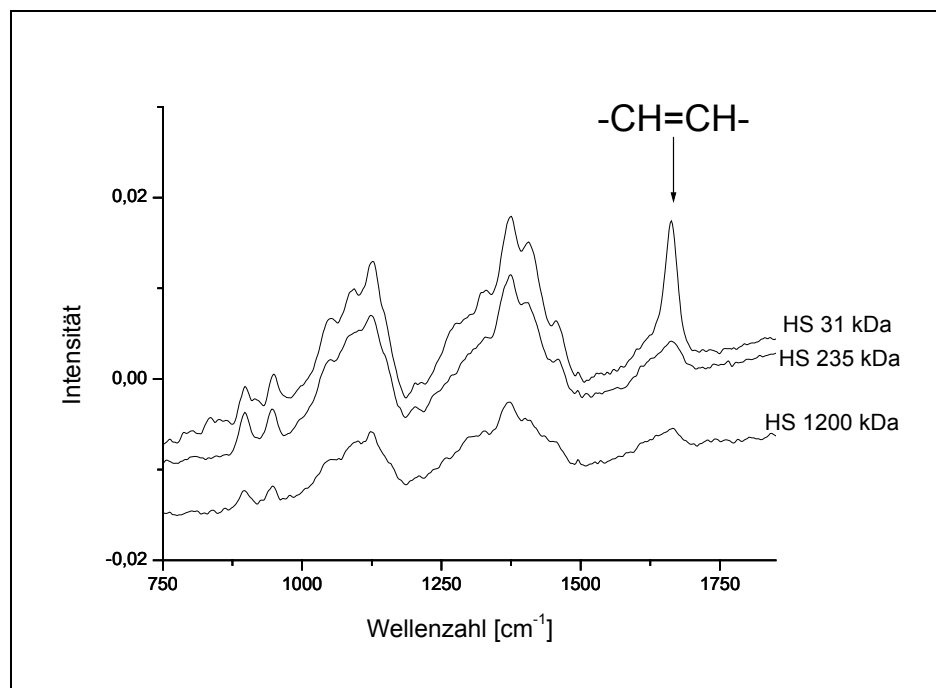
Abb. 4.15: IR-Spektren von HS 31, 235, 1200 kDa im Wellenzahl-Bereich 2500-4000 cm^{-1} .

4.1.1.2 Charakterisierung der HS-Struktur durch Raman-Spektroskopie vor und nach dem enzymatischen Abbau

Die Methode der Raman-Spektroskopie wurde auch für die Charakterisierung der Doppelbindung von HS nach dem enzymatischen Abbau verwendet (3.3.1). Die Raman-Spektren von verschiedenen HS-Derivaten (1200 kDa, 235 kDa und 31 kDa) sind im Spektralbereich 750-3500 cm^{-1} in den Abbildungen 4.16-4.17 dargestellt. Abbildung 4.16 zeigt, dass das Spektrum von HS 31 kDa eine scharfe Bande bei der Wellenzahl 1661 cm^{-1} aufweist und sich die Intensität dieser Bande offenbar mit Verringerung der Molmasse von HS erhöht. Bei HS 235 kDa und 1200 kDa wurde im Bereich 1661 cm^{-1} eine schwache Bande beobachtet, die der Amid I-Gruppe entspricht [34]. Tabelle 4.6 fasst die Raman-Banden von HS nach enzymatischem Abbau zusammen. Einen weiteren Hinweis auf die Entstehung von C=C-Doppelbindungen nach enzymatischem Abbau gibt die Valenzschwingung H-C= bei 3081 cm^{-1} , die für HS 31 zu beobachten ist.

Tabelle 4.6: Bandenzuordnung bei Raman-Spektroskopie-Untersuchungen der HS-Derivate.

Probe	31 kDa	235 kDa	1200 kDa
Raman-Bande	Wellenzahl [cm^{-1}]		
C – C, C – O Streckschwingung	1047	1047	1047
	1090	1090	1090
	1122	1125	1125
Amid III	1328	1328	1328
C – H-Deformation	1372	1374	1372
C – N-Streckschwingung und C – H –Deformation	1405	1401	1405
C = C, Amid I	1662	1630	1630
CH-Streckschwingung	2903	2903	2903
	2934	2934	2934
C – H-Streckschwingung (C von C=C)	3081		

Abb. 4.16: Raman-Spektren von 31, 235 und 1200 kDa HS im Wellenzahl-Bereich 750-1850 cm^{-1} .

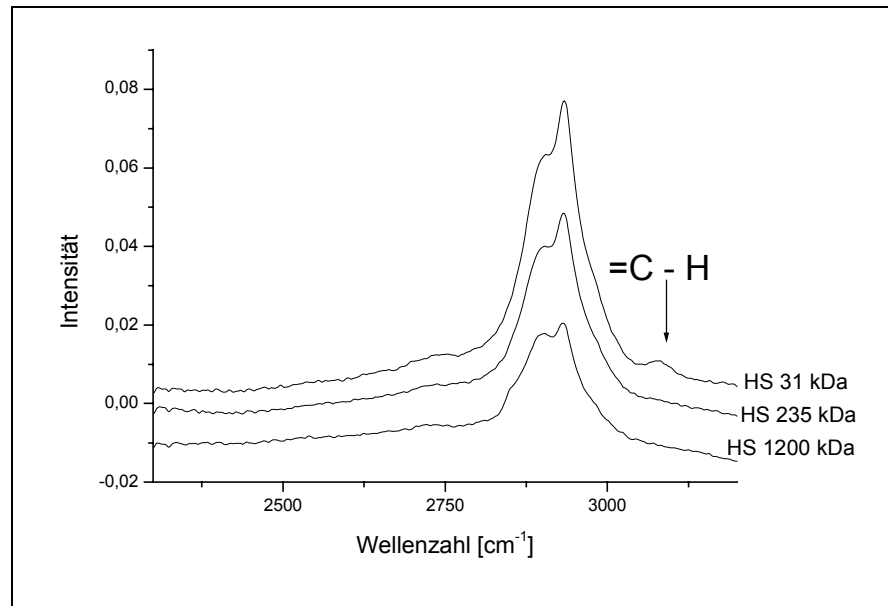


Abb. 4.17: Raman-Spektren von 31, 235 und 1200 kDa HS im Wellenzahl-Bereich 2300-3200 cm^{-1} .

4.1.1.3 Charakterisierung der HS-Struktur durch ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie vor und nach dem enzymatischen Abbau

HS-Derivate wurden mit ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowohl in D_2O als auch als Feststoff untersucht. Die ^{13}C -NMR-Spektren der HS-Derivate sind in Abb. 4.18-1, 4.18-2 dargestellt. Die Doppelbindung $\text{CH}=\text{C}$ in HS 31 kDa weist ^{13}C -chemische Verschiebungen bei 107,5 ppm und 144,8 ppm auf.

^1H -NMR-Spektren von HS 31, 235 und 1200 kDa werden in Abb. 4.19 gezeigt. In D_2O als Lösungsmittel sind die austauschbaren Protonen der funktionellen OH- und NH-Gruppen in den ^1H -Spektren nicht sichtbar. Die ^1H -chemische Verschiebung des Protons der Doppelbindung entsprechend der Abb. 4.19c liegt bei 5,77 ppm. Die Kopplungskonstante $^1J_{\text{C-5,H}}$ beträgt 169 Hz. Die relative Population des Doppelbindungsanteils wurde durch Integration der Signale im ^1H - und ^{13}C -Spektrum bestimmt (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: Relative Population der Doppelbindung in HS.

HS	^1H % der Doppelbindung (H-4) ^1H -NMR	^{13}C % der Doppelbindung (C-4, C-5) ^{13}C -NMR
31 kDa	2-3%	5-6%
235 kDa	--	--
1200 kDa	--	--

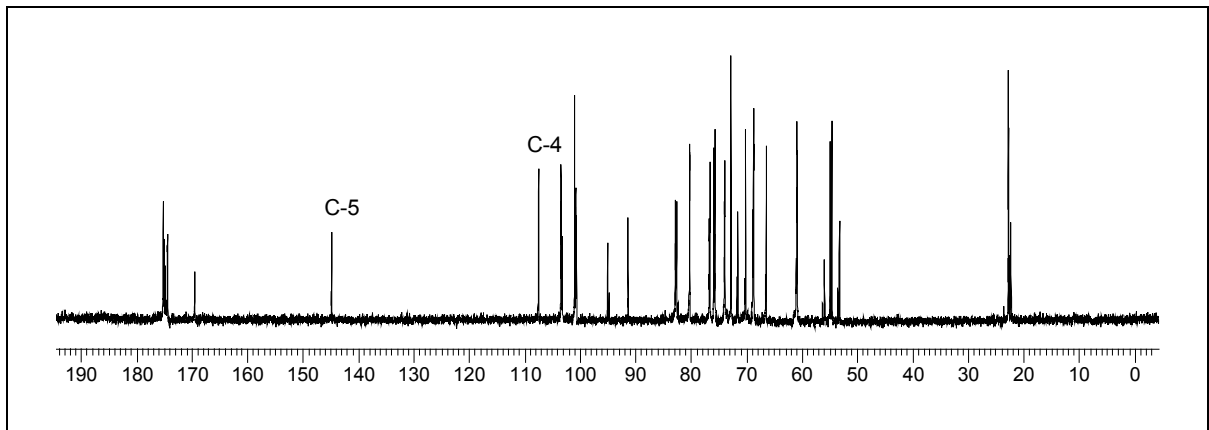
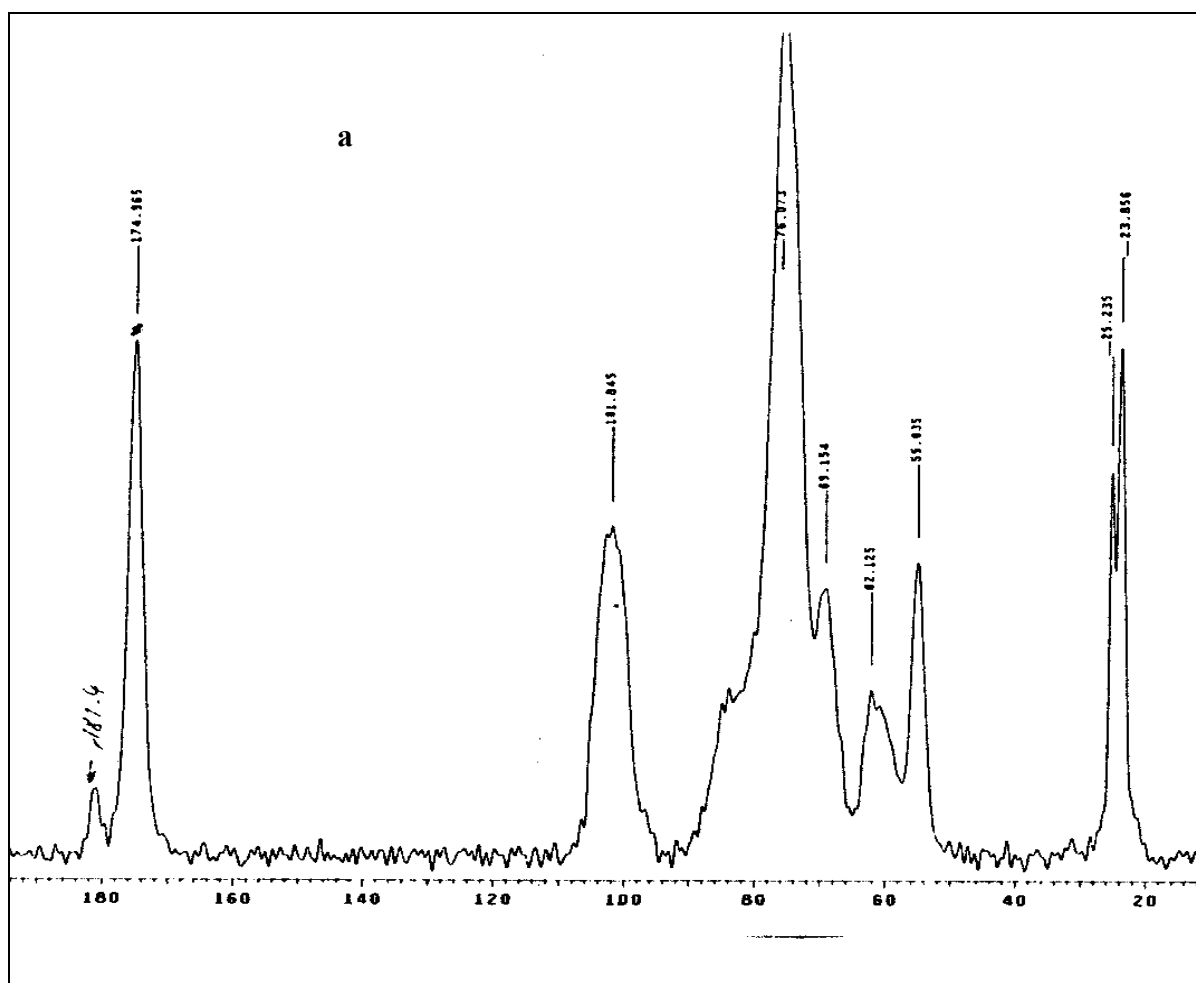


Abb. 4.18-1: ^{13}C -NMR-Spektrum in D_2O von HS 31 kDa.



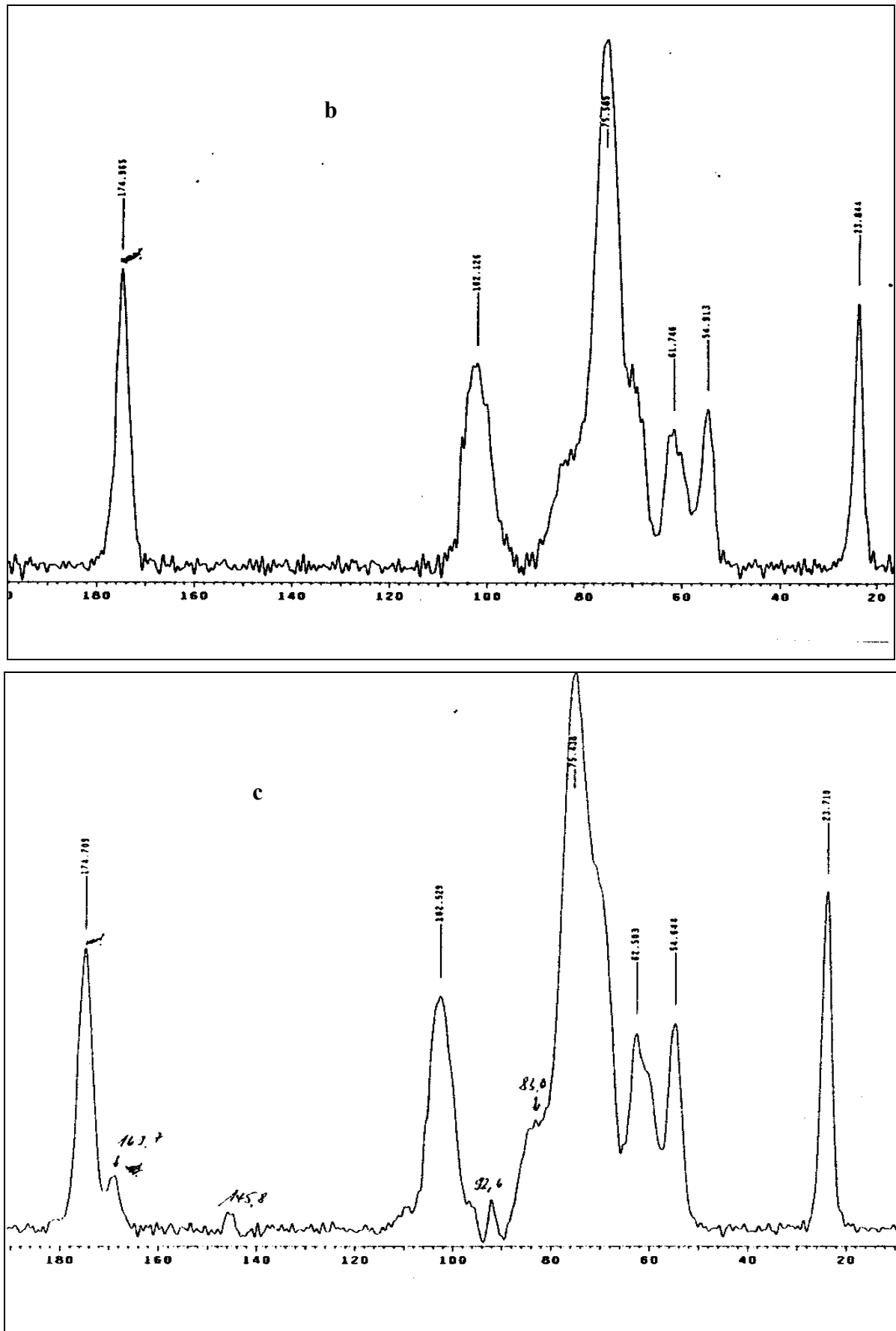


Abb. 4.18-2: ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren von HS-Derivaten. a: HS 1200 kDa, b: HS 235 kDa, c: HS 31 kDa.

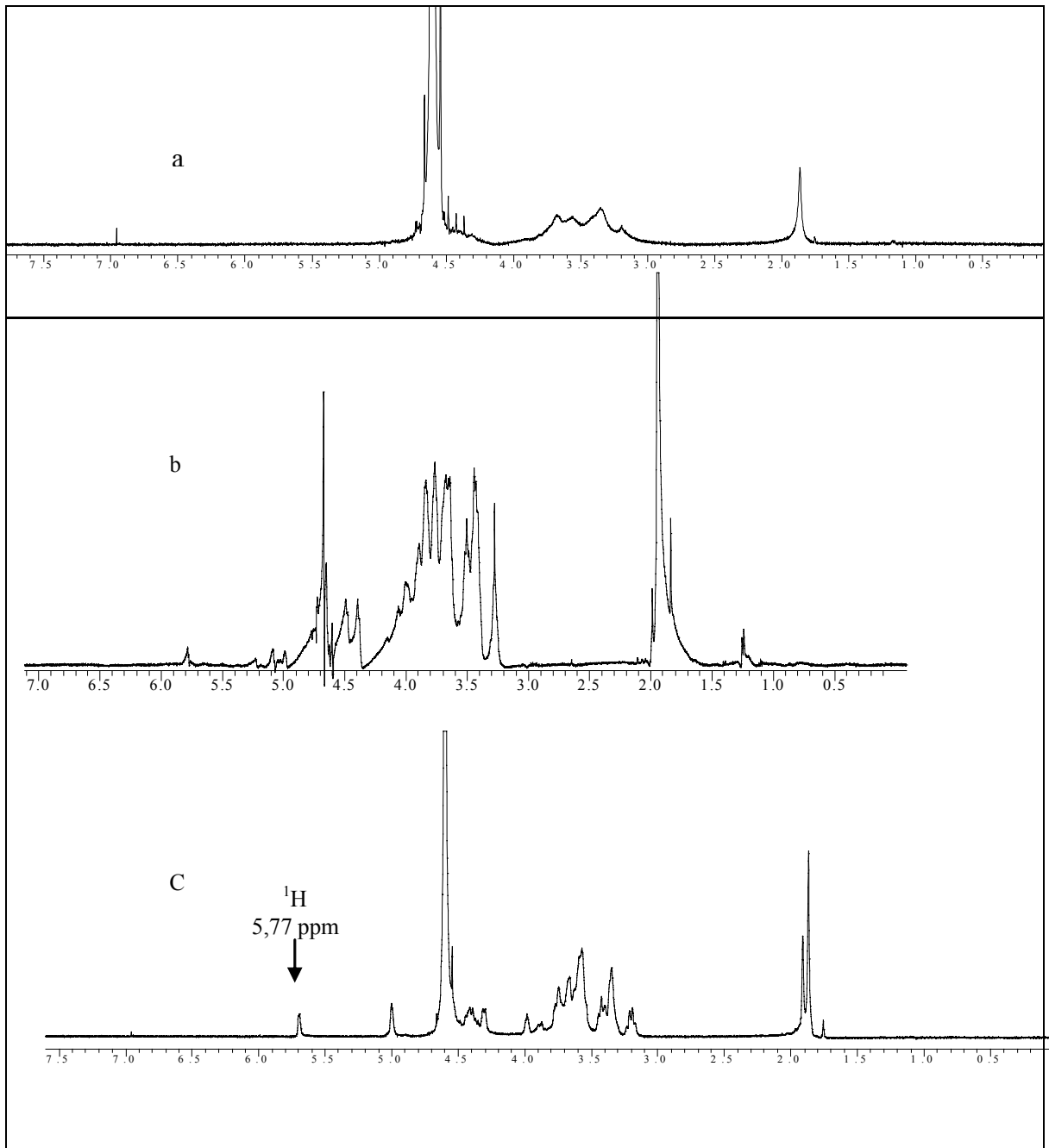


Abb. 4.19: ^1H -NMR-Spektren von HS-Derivaten. a: HS 1200 kDa, b: HS 235 kDa, c: HS 31 kDa.

4.1.1.4 HS-Strukturaufklärung durch UV/Vis-Spektroskopie vor und nach dem enzymatischen Abbau.

Weitere Untersuchungen zum Nachweis der Doppelbindung in HS nach enzymatischem Abbau wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie an HS-Derivaten in wässriger Lösung durchgeführt (s. 3.3.2) (Abb. 4.20). Die Abbildung 4.20c zeigt, dass das UV/Vis-Spektrum von HS 31 kDa nach enzymatischem Abbau eine maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 226 nm aufweist, welche für das Vorhandensein der Doppelbindung [47] spricht. Eine

Absorption bei dieser Wellenlänge wurde für HS 235 und 1200 kDa (s. Abbildungen 4.20a und 4.20b) nicht beobachtet.

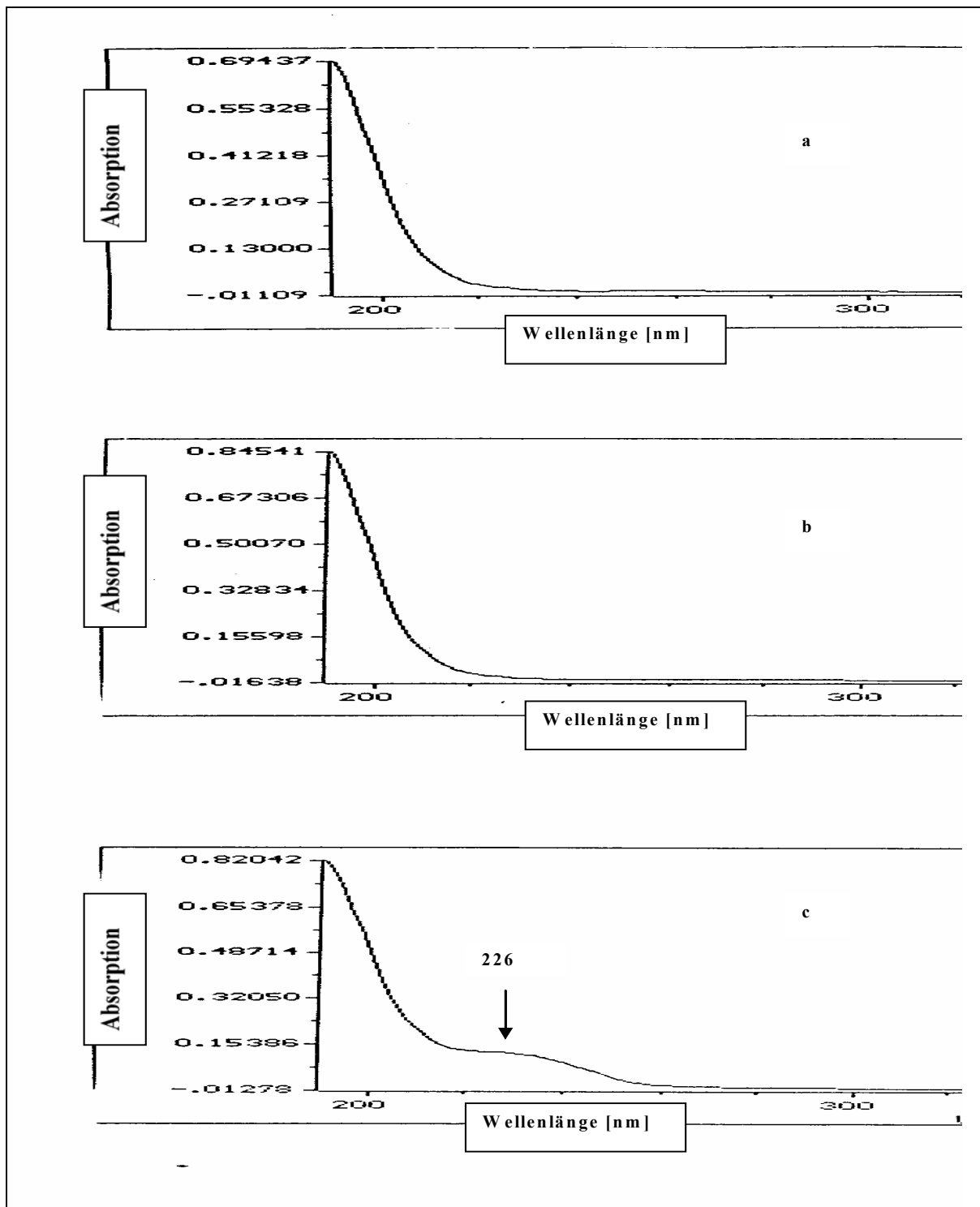


Abb. 4.20: UV/Vis-Spektren von HS. a: 1200kDa, b: 235 kDa und c: 31 kDa.

4.1.1.5 Zusammenfassung zu spektroskopischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, Raman-, IR- und UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen weisen auf das Vorhandensein einer Doppelbindung im Glucuronsäurering

nach enzymatischem Abbau von HS hin. Die Doppelbindung im Glucuronsäurering ist für die Bindung der Radikalatome, die während der UV-Bestrahlung der menschlichen Haut entstehen, notwendig. Es sollte deshalb möglich sein, enzymatisch abgebaute HS als Radikalfänger für den UV-Hautschutz zu verwenden.

4.1.2 Physikochemische Eigenschaften der HS vor und nach dem enzymatischen Abbau

Die physikochemischen Eigenschaften von HS haben einen großen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und die in Frage kommenden Anwendungswege. Die physikochemischen Eigenschaften der HS, die durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden können (z.B. durch die Löslichkeit und/oder durch die Viskosität), wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

4.1.2.1 Löslichkeit

Die Wasserlöslichkeit verschiedener HS wie HS 31, 235, 1200 kDa wurde bereits in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Hochmolekulare HS 1200 kDa nimmt Wasser in allen Verhältnissen auf und bildet Gele. Die wässrige Lösung von HS 1200 bildet ab 2,2 % ein Gel. HS 235 kDa bildet kein Gel und zeigt eine höhere Wasseraufnahme. Die Viskosität seiner wässrigen Lösung ist auch von der Konzentration abhängig, wobei HS 235 kDa eine niedrigere Viskosität als HS 1200 kDa aufweist. HS 31 kDa zeigte eine hohe Löslichkeit in (166,6 g/100g) Wasser und nur bei sehr hoher Konzentration eine hohe Viskosität. HS 1200 kDa nimmt Glycerin langsam auf und bildet ein Gel. HS 235 kDa zeigte in Glycerin wie im Falle der wässrigen Lösungen viskose Eigenschaften. Die Löslichkeit von HS 31 kDa beträgt in Glycerin 0,988 g/100g. HS aller Molmassen ist unlöslich in Acetonitril, Ethanol, DMSO, Methanol und Diethylether (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Löslichkeit von HS-Derivaten in verschiedenen Lösungsmitteln in [g/100g].

Lösung	Löslichkeit		
	[g/100g]		
	1200 kDa	235 kDa	31 kDa
Wasser	Ab 2.2% Gelbildung	15,75	166,6
Glycerol	Gelbildung		0,988

Die in Wasser gelösten HS-Derivate wurden bei bestimmten Verhältnissen mit verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert. Die Lösungsmittelverhältnisse, bei denen HS umkristallisiert wurde, sind in Tabelle 4.9 aufgeführt.

Tabelle 4.9: Umkristallisieren von HS-Derivaten aus verschiedenen Lösungsmitteln.

		Verhältnisse der Lösungen (v/v) und entsprechende HS-Molmasse		
		1200 kDa	235 kDa	31 kDa
Wasser:Methanol	oder	41:59	42:58	54:46
Ethanol				
Wasser:Acetonitril		55:45	54:46	73:27
Wasser:DMSO		löslich bei allen Verhältnissen	löslich bei allen Verhältnissen	löslich bei allen Verhältnissen
Wasser:Glycerol		löslich bei allen Verhältnissen	löslich bei allen Verhältnissen	löslich bei allen Verhältnissen

4.1.2.2 Viskosität

Das Fliessverhalten der 2% igen wässrigen Lösungen von 31, 235 und 1200 kDa HS wurde am Rotationsviskosimeter (3.3.3) gemessen. Die Viskositätsprofile der HS sind in den Abbildungen 4.21-4.23 dargestellt. HS 1200 kDa zeigte plastische Eigenschaften. Die Viskosität der HS 1200 kDa nimmt mit Scherratezunahme ab (Abb. 4.21). HS 235 kDa zeigt Newtonsches Fließverhalten (Abb. 4.22). Hier bleibt die Viskosität von 0,15 bis 0,17 Pa·s mit steigender Scherrate stabil. Für die 2%ige wässrige Lösung der HS 31 kDa (Abb. 4.23) war eine Viskosität von 0,0011 bis 0,0012 Pa·s zu beobachten. HS 31 wies eine 140-fach geringere Viskosität gegenüber HS 235 und eine 10^5 -fach geringere Viskosität gegenüber HS 1200 kDa auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass HS 31 kDa und HS 235 kDa idealviskose Eigenschaften im Vergleich zu HS 1200 kDa besitzen. Die kleine Viskositätsänderung bei HS 235 bzw. HS 31 kDa wird durch eine Volumen- und Temperaturänderung im Messgefäß verursacht.

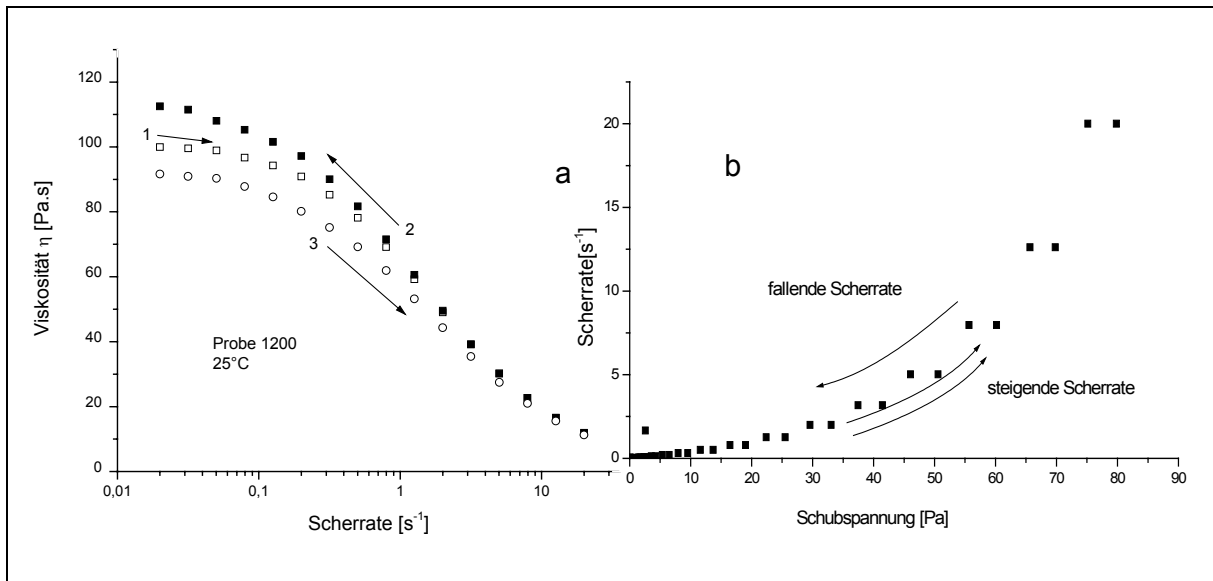


Abb. 4.21: Rheogramme einer 2%igen wässrigen Lösung von 1200 kDa HS bei 25 °C. a: Die Viskosität gegen die Scherrate, b: Die Scherrate gegen die Schubspannung.

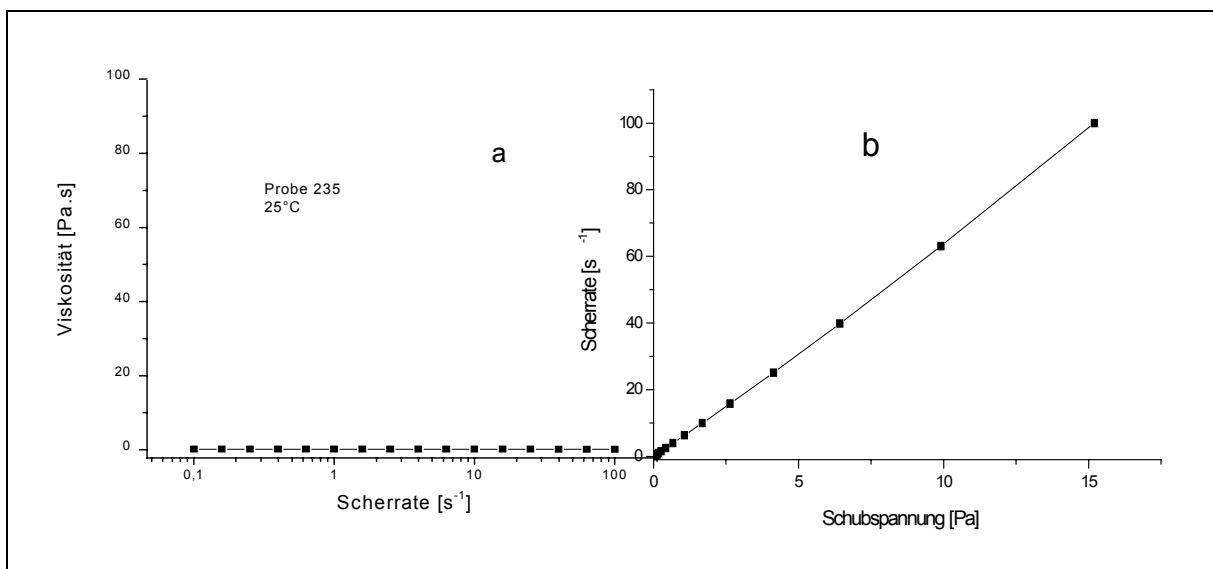


Abb. 4.22: Rheogramme einer 2%igen wässrigen Lösung von 235 kDa HS bei 25 °C, a: Die Viskosität gegen die Scherrate, b: Die Scherrate gegen die Schubspannung.

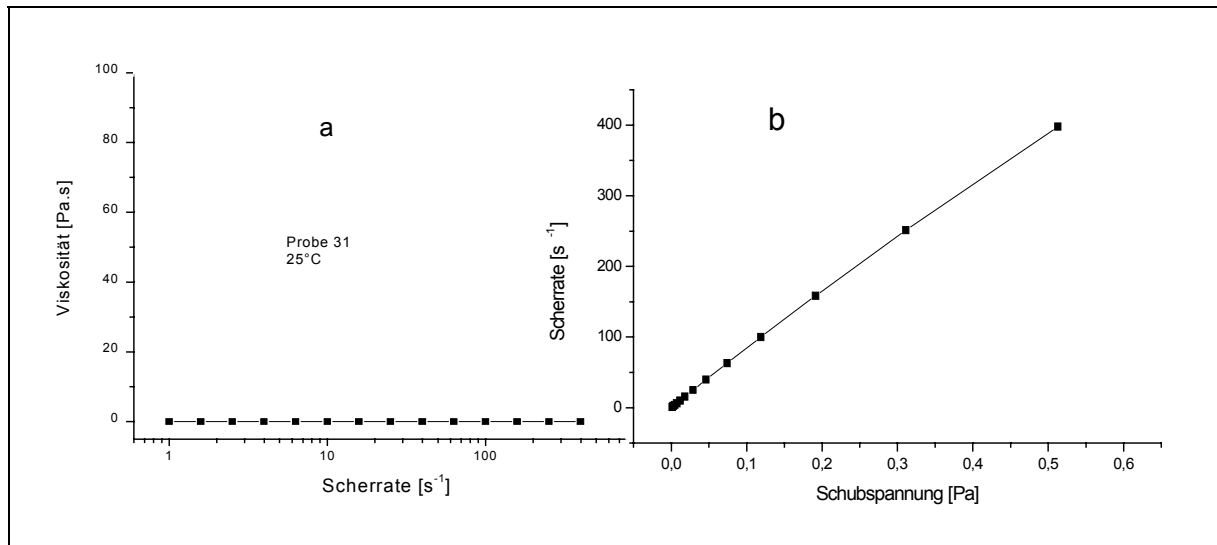


Abb. 4.23: Rheogramme einer 2%igen wässrigen Lösung von 31 kDa HS bei 25 °C, a: Die Viskosität gegen die Scherrate, b: Die Scherrate gegen die Schubspannung.

4.1.2.3 Zusammenfassung zur Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften von HS

Mit zunehmender Molmasse nimmt die HS-Viskosität zu. Der enzymatische Abbau von HS führte zu einer Viskositätsänderung. Dabei trat ein Übergang vom plastischen zum Newtonschen Fließverhalten ein. Aufgrund der Änderung der Viskositätseigenschaften und der Erhöhung der Löslichkeit in Wasser mit sinkender HS-Molmasse eignen sich diese Verbindungen für halbfeste Zubereitungen und zum Inkorporieren in Mikroemulsionen. Die enzymatisch abgebauten HS-Derivate sind sehr hydrophil und sind in lipophilen Medien unlöslich.

4.2 Analytische Bestimmung von HS

4.2.1 Photometrische Methoden

4.2.1.1 Modifizierte Carbazol-Methode (MCM)

Die photometrische Messung von durch Schwefelsäure abgebauter HS zeigt, dass nach der Reaktion mit Carbazol ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration im Bereich von 10-350 µg/ml und der Intensität der Farbe (Extinktion) nach $Y = 0,158 + 0,0035 X$ (X in µg/ml, $r = 0,997$) besteht. Die Methode lieferte eine hohe relative Standardabweichung von 26,41 und somit eine unzureichende Reproduzierbarkeit. Die Nachweisgrenze beträgt 10 µg/ml.

4.2.1.2 Neue photometrische Methode (NPM)

Die direkte photometrische Messung für durch konzentrierte Schwefelsäure abgebaute HS bei einer Wellenlänge von 280 nm zeigte Linearitäten um $r = 0,997$ ($Y = 0,0187 + 0,0013X$) für Konzentrationen von 5 bis 1500 $\mu\text{g/ml}$. Die relative Standardabweichung der Methode betrug 2,92, d. h. die Reproduzierbarkeit ist unzureichend. Die Nachweisgrenze bei dieser Methode beträgt 5 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.2 Die Methoden der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

4.2.2.1 HPLC-1

Die Messung von mit Schwefelsäure abgebauter HS 1200 kDa mittels HPLC weist eine gute Linearität zwischen der Peakfläche Y [$\text{mV} \cdot \text{min}$] und der Konzentration X [$\mu\text{g/ml}$] nach $Y = -0,072 + 0,031X$ ($r = 0,9998$) für Konzentrationen zwischen 5-1500 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 4.24) auf. Die Methode zeichnete sich darüberhinaus auch durch gute Reproduzierbarkeit mit einer akzeptablen relativen Standardabweichung von 2,26 und einer Nachweisgrenze von 1 $\mu\text{g/ml}$ aus.

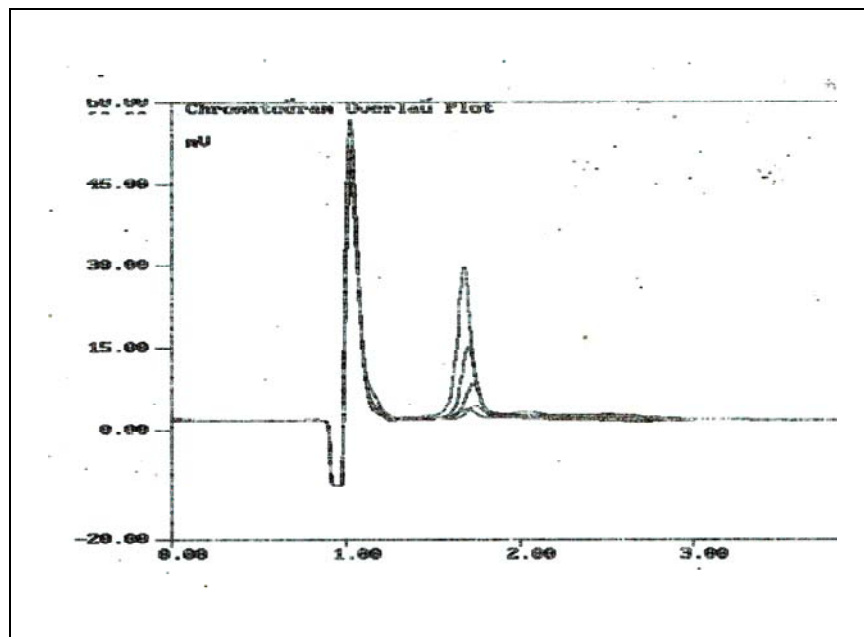


Abb. 4.24: HPLC-Chromatogramm von HS nach dem Abbau durch Schwefelsäure (1-10 $\mu\text{g/ml}$).

4.2.2.2 HPLC-2

Bei der Messung der durch Hyaluronidase enzymatisch abgebauten HS (31 kDa) (Abb. 4.25) zeigte die HPLC-Methode gute Linearität nach $Y = 1,65 + 1,66X$ ($Y[\text{mV} \cdot \text{min}]$, $X[\text{ng/ml}]$, $r =$

0,999) für den Konzentrationsbereich von 10 bis 100 µg/ml, eine relativ niedrige relative Standardabweichung von 0,13 und eine sehr niedrige Nachweisgrenze von 0,3 ng/ml.

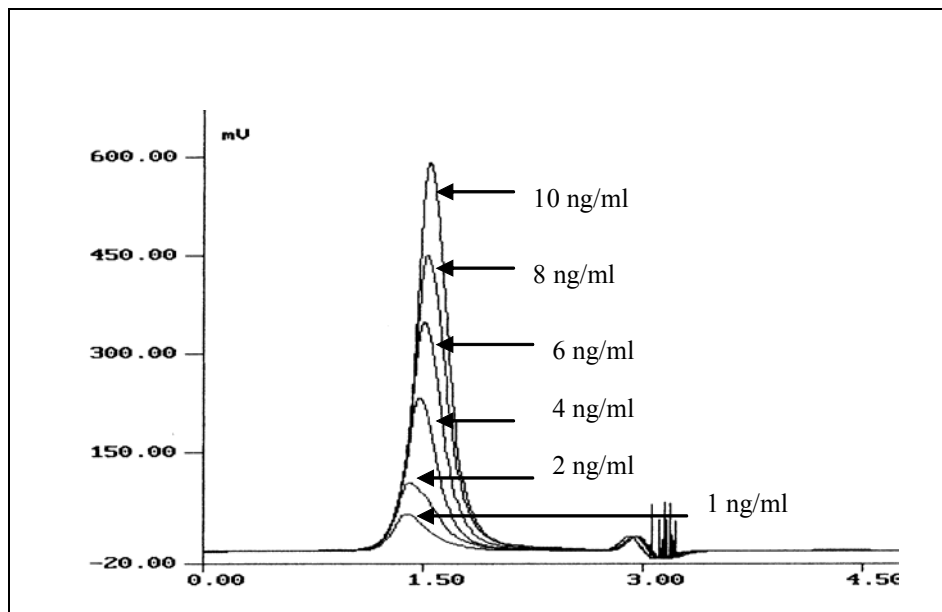


Abb. 4.25: HPLC-Chromatogramm der HS 31 kDa nach enzymatischem Abbau (1-10 ng/ml).

4.2.3 Die Methode der Kapillarzonenelktrophorese (CZE)

4.2.3.1 CZE-1 und CZE-2

HS 1200 kDa wurde direkt durch Kapillarzonenelktrophorese mit einer Standard-Kapillare (CZE-1) und einer Kapillare mit bubble-Zelle (erweiterter Lichtweg) (CZE-2) gemessen. HS 1200 kDa zeigte dabei eine negative elektrophoretische Mobilität ($\mu_e = -2,3 \pm 0,0126 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) und wanderte in Richtung der Kathode. HS 1200 kDa zeigte ebenfalls eine zunehmende Mobilität mit zunehmendem pH-Wert des benutzten Phosphatpuffers (Abb. 4.26). Bei der CZE-1-Methode betrug die Nachweisgrenze 30 µg/ml. Es wurde Linearität nach $Y = 10,192 + 2,006X$ ($r = 0,998$) für HS-Konzentrationen von 30-500 µg/ml mit einer relativen Standardabweichung von 3,7 beobachtet. Bei CZE-2 (erweiterter Lichtweg, bubble-Zelle) war es möglich, die Nachweisgrenze bis 5 µg/ml zu verbessern. Die relative Standardabweichung der Methode betrug hier 2,74 mit einem Korrelationskoeffizient von 0,998.

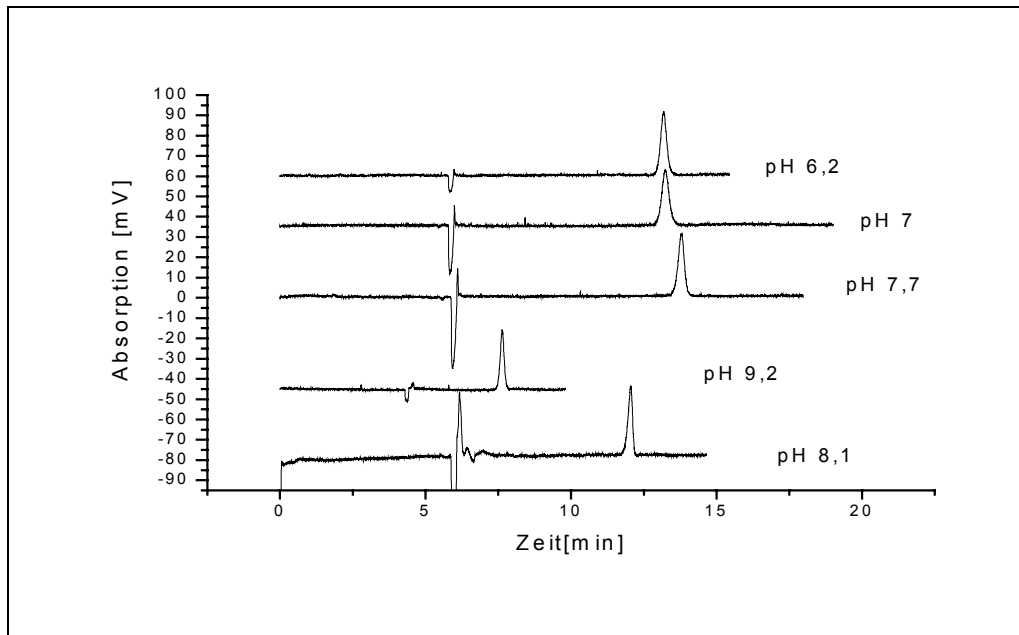


Abb. 4.26: Elektropherogramm von nicht abgebauter HS (1200 kDa) in Puffer bei verschiedenen pH-Werten (20 kV, bubble-Kapillare, Wellenlänge 192 nm).

4.2.3.2 CZE-3 (indirekte Detektionsmethode)

Bei der indirekten UV-Detektion gilt das Lambert-Beersche-Gesetz. Durch Zusatz eines UV-absorbierenden Ions (Sorbinsäure) zum Puffer wird ein hohes Hintergrundsignal erzeugt (Abb. 4.27). Die Messung wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Nachweisgrenze der HS 1200 kDa mittels CZE zu verbessern. Diese Methode zeigte eine Linearität um $r = 0,9033$ für Konzentrationen zwischen 25-500 $\mu\text{g/ml}$, eine Nachweisgrenze von 30 $\mu\text{g/ml}$ und eine relative Standardabweichung von 8,04.

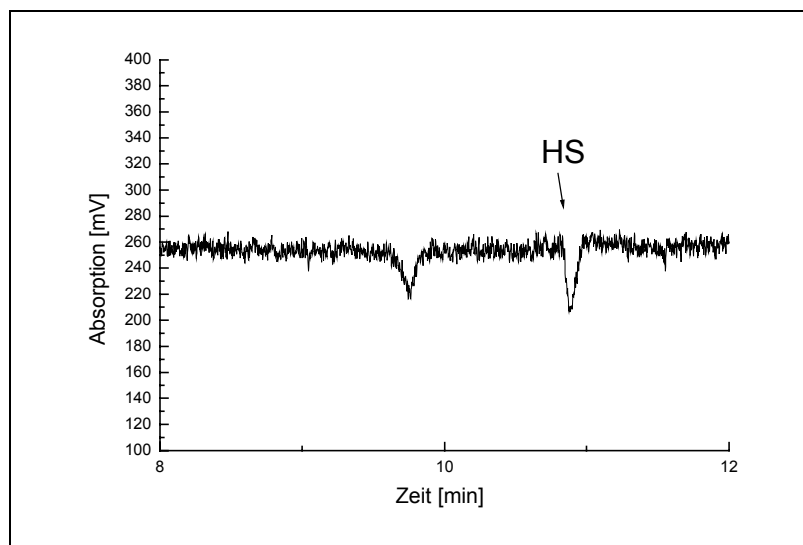


Abb. 4.27: Elektropherogramm von HS 1200 kDa, erhalten durch indirekte Methode (40 mM, pH 7,7, Phosphatpuffer, 20 kV, Wellenlänge 192 nm).

4.2.3.3 CZE-4 (Enzymatisch abgebaute HS)

CZE-4 wurde für enzymatisch abgebaute HS 31 kDa verwendet. Die Messungen wurden mit einer bubble-Kapillare durchgeführt. Die enzymatisch abgebaute HS 31 kDa zeigte bei diesem Verfahren überraschenderweise mehrere Fraktionen von HS (Abb. 4.28). Zur Quantifizierung dieser Fraktionen ist bis jetzt in der Literatur nichts bekannt. Deshalb sollte hier die CZE-MS-Kopplung für die Quantifizierung eingesetzt werden. Es wurde eine Linearität um $r = 0.999$ ($Y = 32,2 + 5,88X$) bei Konzentrationen von 10 bis 500 µg/ml und eine relative Standardabweichung von 3,25 beobachtet. Die Nachweisgrenze betrug 10 µg/ml.

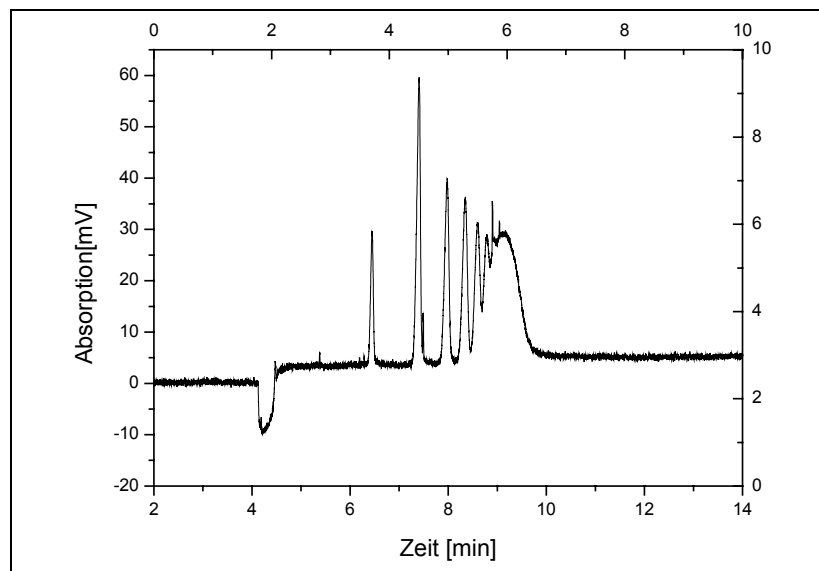


Abb. 4.28: Elektropherogramm von enzymatisch abgebauter HS 31 kDa (40 mM, pH 7, Phosphatpuffer).

4.2.4 HS 1200 kDa-Bestimmung in halbfesten Zubereitungen

Um HS in pharmazeutischen halbfesten Zubereitungen bestimmen zu können, wurden folgende Grundlagen vorbereitet und extrahiert: Wasserhaltige hydrophile Salbe (WHS) (DAB), amphiphile Creme (AC) (DAC) und wasserhaltige Wollwachsalkohlsalbe (WWS) (DAB) mit verschiedenen HS-Konzentrationen (3.3.9). Die HS-Mengen (in %) in den halbfesten Zubereitungen werden wie folgt von 1 bis 3 nummeriert (s. Tabelle 4.10):

Tabelle 4.10: Halbfeste Zubereitungen und HS-Gehalt

Halbfeste Zubereitungen		HS 1200 kDa		
Wasserhaltige hydrophile Salbe (WHS)	(1)	0,1%	2%	5%
Amphiphile Creme (AC)	(2)	0,1%	2%	5%
Wasserhaltige Wollwachsalkohlsalbe (WWS)	(3)	0,1%	2%	5%

Der Gehalt von HS in den Zubereitungen wurde mit vier Methoden: der modifizierten Carbazol- (MCM), der CZE-2-, der HPLC-1- und der photometrischen Methode gemessen. Da die Ergebnisse aus der neuen photometrischen Methode wegen der Verschmutzung mit Systempartikeln nicht einheitlich waren, wurden nur die Messergebnisse der drei anderen Methoden ausgewertet. Wie in Tabelle 4.11 dargestellt, ist die Wiederfindung der modifizierten Carbazol-Methode für die HS-Bestimmung verglichen mit den anderen zwei Methoden CZE-2 und HPLC-1 kleiner (s. Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Wiederfindung (%) von HS 1200 kDa bei unterschiedlichen Formulierungen (1-3), gemessen mit verschiedenen Methoden.

Formulierungen		Wiederfindung (%)		
		MCM	HPLC-1	CZE-2
1	(1%)	9,8±0,686	94,4± 2,5	86,9± 2,6
1	(2%)	7,0±0,49	85,0± 2,2	89,4± 2,9
1	(5%)	45,8±3,2	91,0± 2,4	95,4± 3,2
2	(1%)	----	105,0± 2,7	83,2± 2,4
2	(2%)	----	83,2± 2,2	76,4± 2,3
2	(5%)	----	93,3± 2,4	97,0± 2,9
3	(1%)	73,0±5,11	85,4± 2,24	92,8± 2,7
3	(2%)	104,3±7,3	87,5± 2,3	83,5± 2,5
3	(5%)	74,4±5,2	86,5± 2,1	89,9± 2,6

4.2.5 Zusammenfassung zu den analytischen Bestimmungen

Ein Vergleich zwischen den Parametern der einzelnen Methoden ist in Tabelle 4.12 dargestellt.

Die Quantifizierung der HS-Konzentration in den pharmazeutischen Formulierungen spielt eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden HPLC- und CZE-Methoden entwickelt, um die notwendige Menge von HS in halbfesten pharmazeutischen Zubereitungen festzustellen. HPLC zeigt die niedrigste Prozedurstandardabweichung und eine gute Nachweisgrenze, besonders bei der Messung von enzymatisch abgebauter HS. Jedoch ist der enzymatische Abbau von HS teuer und zeitaufwendig.

Tabelle 4.12: Analytische Parameter für die Quantifizierung von HS 1200 kDa mittels verschiedener Methoden.

Method	NWG	S _{rel} ± %	R	Bereich
HPLC-1	1 µg/ml	2,26	0,9998	5-1500 µg/ml
HPLC-2	0,3 ng/ml	0,13	0,9998	10-100 µg/ml
		0,2	0,998	1-10 µg/ml
		0,17	0,998	0,05-10 µg/ml
		0,11	0,876	1-100 ng/ml
MCM	10 µg/ml	26,41	0,997	10-350 µg/ml
NPM	5 µg/ml	2,92	0,995	5-1500 µg/ml
CZE-1	30 µg/ml	3,7	0,998	30-500 µg/ml
CZE-2	5 µg/ml	2,74	0,988	5-500 µg/ml
CZE-3	30 µg/ml	8,04	0,903	25-500 µg/ml
CZE-4	10 µg/ml	3,25	0,999	10-500 µg/ml

S_{rel}: relative Standardabweichung ; R: Linearität; NWG: Nachweisgrenze.

Die Verwendung von H₂SO₄ zum Abbau von HS verläuft erfolgreich und stellt eine mögliche Alternative hinsichtlich Kosten und Einfachheit der Durchführung dar. Desweiteren wirkt H₂SO₄ nicht spezifisch und kann ebenfalls zum Abbau anderer Glucosaminoglycane (GAG) wie Heparin benutzt werden. Obwohl die Nachweisgrenze der Kapillarelektrophorese im Vergleich zu den beiden anderen Methoden hoch ist, erlaubt sie die Bestimmung von HS ohne Verdau bei gleichzeitig hoher Auflösung. Die Erhöhung der Konzentration des Phosphatpuffers von 20 mM, (siehe PLÄTZER et al. 105) auf 40 mM bewirkte eine 2fache Verbesserung der Nachweisgrenze (5 µg/ml). Probleme, die mit photometrischen Messungen einhergehen, wurden bereits von BITTER et al. beschrieben [72]. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass wegen der Quantifizierungsabhängigkeit von HS-Trennungen aus der Salbenmatrix eine schlechte Wiederfindung (s. Tabelle 4.11) verursacht wird, was durch photometrische und MCM-Messungen nachgewiesen werden konnte. Demzufolge ist es schwierig, MCM und NPM (Neue Photometrische Methode) zu benutzen, um HS in halbfesten pharmazeutischen Zubereitungen zu bestimmen. Schließlich ist MCM im Vergleich zu den Methoden der HPLC und CZE weniger präzise. Bei der Ermittlung unverdauter HS ist CZE2 die beste Methode, wenn keine niedrige Nachweisgrenze notwendig ist.

Im Vergleich zur photometrischen Methode haben HPLC und CZE den Vorteil, dass die Trennung zeitgleich mit der Messung stattfindet. Da die CZE-Methode keinen Abbau erfordert, ist sie einfacher als HPLC. HPLC-1 als neue alternative Methode zur HS-Quantifizierung besitzt im Vergleich zu HPLC-2 den Vorteil, dass sie schneller und billiger ist.

4.3 HS-Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen

4.3.1 HS 1200 kDa-Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen

Wie bereits bei der Gehaltsbestimmung in Abschnitt 4.2.4 erwähnt, wurde HS 1200 kDa bei verschiedenen Konzentrationen in WHS, AC und WWS inkorporiert, um die Freigabe zu untersuchen (Tabelle 4.10). Die Bestimmung der HS-Freisetzung aus den halbfesten Zubereitungen erfolgte mit einem Mehrschichtmembransystem (MSMS). Die Herstellung der Akzeptormembran erfolgte gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.3.10. Die freigesetzten Mengen wurden nach 20, 40, 60 und 120 min extrahiert und durch HPLC-1 quantifiziert. Die Fläche unter der Kurve AUC (Konzentration-Zeit) und die mittlere Freisetzezeit (MDT) wurden mittels des PC-Programms TOPFIT 2,0 [143] bestimmt. AUC und MDT wurden als Parameter verwendet, um die Rate und den Umfang der Freigabe *in vitro* zu kennzeichnen (s. Tabelle 4.13). Die Resultate sind als Auftragung der HS-Konzentration in der Akzeptormembran in % gegen die Zeit ausgedrückt (s. Abb. 4.29).

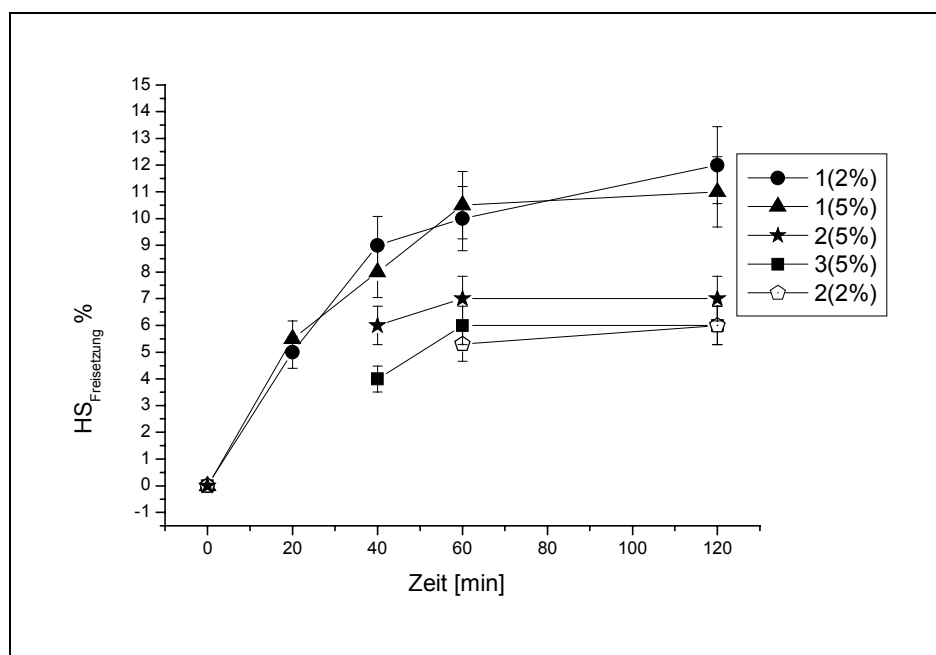


Abb. 4.29: *In vitro*-Freigabeprofil von HS 1200 kDa aus den halbfesten Zubereitungen (1: Wasserhaltige hydrophile Salbe, 2: Amphiphile Creme, 3: Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe) mittels Mehrschichtmembransystem.

Tabelle 4.13: Vergleich der Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven zur Freisetzung von HS 1200 kDa aus halbfesten Zubereitungen.

Formulierung	AUC [% · min]	MDT [min]
Wasserhaltige hydrophile Salbe 5 %	1020 ± 56.4	04±0.3
Wasserhaltige hydrophile Salbe 2 %	1040 ± 52.2	03±0.2
Amphiphile Creme 5 %	670 ± 55.5	1,7±0.1
Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe 5 %	540 ± 61.4	1,8±0.2

Abbildung 4.29 zeigt, dass die aus dem Akzeptor extrahierte Menge von HS 1200 kDa im Falle 2%iger bzw. 5% iger HS in WHS nach 20 Minuten Inkubationszeit niedriger als 6% (10, 25 µg) der im Donator ursprünglich vorliegenden Menge (200 bzw. 500 µg HS auf 10mg Salbe) enthalten war, und die maximale Freigabe aus 5%iger HS 1200 kDa in WHS 10,5 % nach 60 Minuten betrug. Lediglich 12 % wurden nach 120 Minuten aus 2%iger HS 1200 kDa in WHS freigesetzt. Die freigegebene Menge aus 1%iger HS 1200 kDa in WHS (s. Abb. 4.29), aus 1%iger in AC, aus 1%iger und 2%iger in WWS nach 20 Minuten und aus 5%iger HS 1200 kDa in WHO und 5%iger HS in AC und nach 40 Minuten aus 2%iger HS 1200 in AC lag jeweils unter der Nachweisgrenze. 5%ige HS in AC zeigt eine maximale Freigabe von 7 % nach 60 Minuten und 5,5 % aus 2%iger HS in AC. Die maximale Freigabe aus 5%iger HS 1200 kDa in WWO betrug 5,5 %. Tabelle 4.13 zeigt, dass der Wert für AUC von HS 1200 kDa in WHO höher als der von HS 1200 kDa in AC und von HS 1200 kDa in WWS ist.

4.3.2 HS 22 kDa-Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen

Analog zu HS 1200 kDa wurde HS 22 kDa in WHS, AC und WWS mit Konzentration von 2% inkorporiert. Die Extraktion der freigesetzten Menge erfolgte nach 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240 und 360 min (s. 3.3.10) und die Quantifizierung durch CZE (bubble-Kapillare).

Wegen der Hydrophilie der HS 22 kDa wurde eine hydrophile Glycerinmembran benutzt. Die *in vitro* aus allen Formulierungen freigesetzte HS wurde über eine Zeitdauer von 360 min überwacht. Mit Hilfe des PC-Programmes TOPFIT 2,0 [143] erfolgte die Bestimmung der MDT und der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC), die als quantitativer Parameter für die Messung der Rate und des Umfangs der HS 22 kDa -Freigabe verwendet wird (s. Tabelle 4.14). Die Resultate sind als Auftragung der HS-Konzentration (in %) in der Akzeptormembran gegen die Zeit in Abb. 4.30 gezeigt.

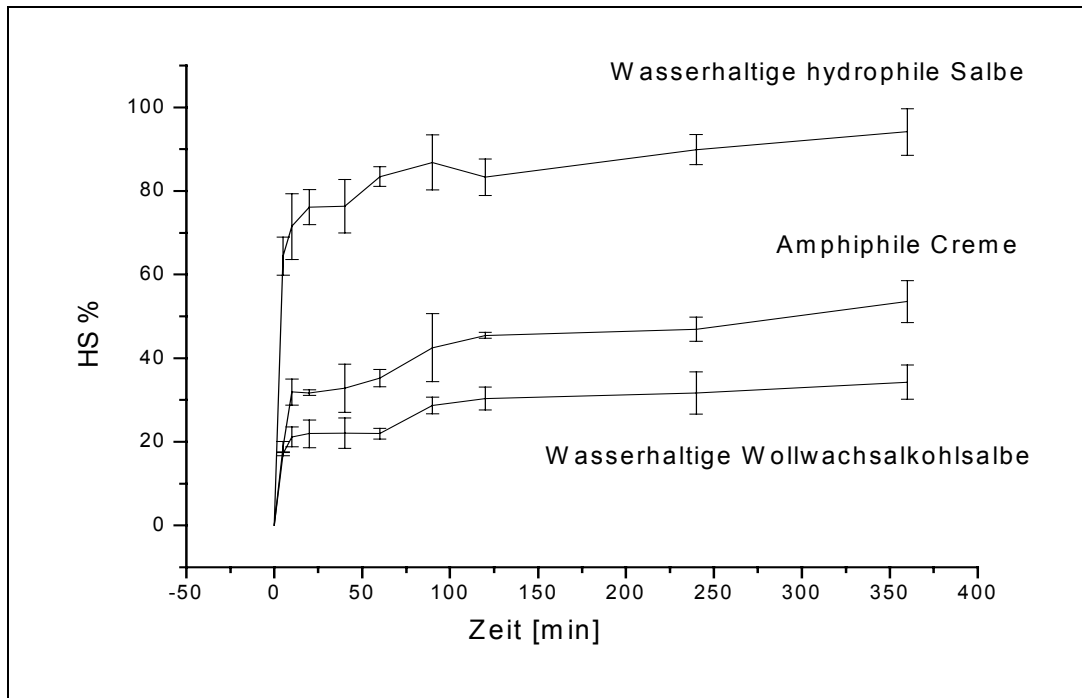


Abb. 4.30: *In vitro*-Freigabepprofile von HS 22 kDa aus drei verschiedenen halbfesten Zubereitungen.

Tabelle 4.14: Vergleich der Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven der HS 22 kDa-Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen.

Halbfeste Zubereitungen	AUC [% x min]	MDT [min]
Wasserhaltige hydrophile Salbe	30767 ± 1636	31±1.4
Amphiphile Creme	15810 ± 1310	35±2.8
Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe	10277 ± 1168	22±2.3

Die Untersuchungen an Mehrschichtmembransystemen zeigen, dass aus 2%iger HS 22 kDa in WHS 64 % nach 5 Minuten und 94 % nach 360 Minuten in die hydrophile Membran penetrieren (s. Abb. 4.30). AC zeigt höhere Affinität zu HS 22 kDa als WHS. In diesem Fall sind nach 5 Minuten nur 18 % von HS 22 kDa und nach 360 Minuten 53 % von HS 22 kDa im Akzeptor zu finden. Die niedrigste Freigabe von HS 22 kDa war für 2%ige HS 22 kDa in WWS insofern zu beobachten, dass eine Freigabe von 17 % nach 5 Minuten und 34 % nach 360 Minuten erfolgte. Die höchste HS 22 kDa-Freigabe wurde für WHS beobachtet. Die AUC von HS 22 kDa-Freigabe aus den Trägersystemen sind in Tabelle 4.14 dargestellt. Die halbfesten Zubereitungen wurden entsprechend den AUC wie folgt geordnet:

Wasserhaltige hydrophile Salbe (WHS) > Amphiphile Creme (AC) > Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (WWS).

4.3.3 Zusammenfassung zur Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen

Der Unterschied in der Freisetzung zwischen gleichen Arzneimitteln mit gleichen Molmassen aus verschiedenen Vehikelsystemen liegt an der Diffusion der HS im Träger. Bei der Inkorporation gleicher Arzneistoffe mit verschiedenen Molmassen im gleichen Träger besteht der Unterschied der Freigabe in der Änderung der physikochemischen Eigenschaften der Arzneistoffe, wie Löslichkeit im Vehikel und Verteilungskoeffizient Vehikel/Akzeptor. Folglich wird das Freigabeverhalten thermodynamisch gesteuert und durch physikochemische Parameter wie Löslichkeit, Diffusionskoeffizient und Verteilungskoeffizient [184] bestimmt.

Die Freisetzung von hydrophilen Arzneistoffen wie HS erfolgt offensichtlich aus O/W-Creme (WHS) deutlich effizienter als aus AC oder aus W/O (WWS). Das bedeutet, dass die HS-Affinität zu WHS niedriger als zu AC oder zu WWS ist. Die MSMS-Messungen der *in vitro*-Freisetzung von 1200 kDa HS aus den gleichen Formulierungen ergaben sehr niedrige Freigaben im Vergleich zu HS 22 kDa. Es ist anzunehmen, dass die Größe des Moleküls bei der Freigabe der HS eine bedeutende Rolle spielt. In dieser Arbeit wurde gefunden, dass die topische Verfügbarkeit von HS mit gleicher Molmasse nicht in unterschiedlichen Trägersystemen gleich ist. Sie ist ebenfalls nicht gleich für HS mit verschiedenen Molmassen im gleichen Vehikelsystem. Die AUC-Bestimmung mit Hilfe eines *in vitro* Modells (z. B. MSMS) ist ein wichtiger Schritt zur Optimierung der aktuellen pharmazeutischen Formulierungen. Die Affinität von HS zu WHS ist niedriger als zu AC und zu WWS. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die topische Verfügbarkeit von HS 22 kDa höher als die von HS 1200 kDa ist. Es ist vorteilhaft, enzymatisch verdaute HS anstelle von intakter HS in eine WHS (W/O) einzusetzen.

4.4 Mikroemulsionen

4.4.1 Einfluss von DMSO auf den Tröpfchendurchmesser nichtionischer Mikroemulsionen und auf ihre Tensidmenge

Die Tensidmenge spielt eine große Rolle für die Stabilität und der Toxizität von Mikroemulsionen [185]. Die Beziehung zwischen der inneren Phase der Mikroemulsionen und dem Tröpfchendurchmesser wurde bisher von vielen Autoren untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Tröpfchendurchmesser für die Mikroemulsionen-Stabilität verantwortlich sind [186,187].

EVANS et al. [163] beschrieb, dass sich die Größe der Mikroemulsionströpfchen mit zunehmender Wasserkonzentration erhöht. Alkohole haben keinen großen Einfluss auf die Größe der Mikroemulsionströpfchen. Bei konstanter Wasserkonzentration verringert sich die Tröpfchengröße nach Erhöhung der Wasser/Lezithin-Verhältnisse.

Die kolloidale Phase von W/O-Mikroemulsionen, die mit Wasser:Lezithin in molaren Verhältnissen (R) mit $R \leq 2,6$ hergestellt wurden, zeigten keine bedeutenden Änderungen in der Asymmetrie- oder Aggregationszahl nach Veränderung der Wassermenge. Mizellen in Systemen mit $R = 2,6$ sind kugelförmig [163,172].

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von DMSO auf die Tröpfchengröße und Mikroemulsionsstabilität. Das im allgemeinen benutzte Modell ist das *Hard Sphere-Model*, bei dem die Überlappung der unterschiedlichen Sphären-Tröpfchen vernachlässigt wird [163,173,189]. DMSO wird normalerweise als Penetrationsverstärker, Radikalfänger und Co-Solvens [168,183] in den halbfesten Zubereitungen verwendet.

Es wurden vier Serien nichtionischer Mikroemulsionen, die aus jeweils 1ml Wasser: DMSO-Gemisch (W:DMSO) in variierenden W:DMSO-Verhältnissen (0:6, 1:5, 2:4, 3:3, 2:4, 5:1, 6:0) und 8ml IPP oder mittelkettigem Triglycerid (MKTG) als äußeren Phasen bestanden, untersucht. Die benötigte Tensidmenge, um klare Mikroemulsionen herzustellen ist in Kapitel 3.3.11.1 beschrieben. Alle Systeme wurden als isotrope Systeme durch Polarisationsmikroskopie charakterisiert, bevor mittels dynamischer Lichtstreuung die Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen bestimmt wurden.

4.4.1.1 Stabilisierung von Mikroemulsionen durch Tween 80

Bei den Mikroemulsionen, die durch Tween 80 stabilisiert wurden (s. Abb. 4.31), betrug die geringste verbrauchte Tensidmenge von Tween 80 2 ml mit 1 ml W:DMSO im Verhältnis

3:3. Diese Mikroemulsionen zeigten gleichzeitig die größten Tröpfchendurchmesser. Wenn das Verhältnis W:DMSO kleiner als 3:3 ist, nimmt der Tröpfchendurchmesser mit zunehmender Tensidmenge geringfügig zu. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mikroemulsionen durch Tween 80 stabilisiert werden können. Die DMSO-Wirkung auf die Hydrophobizität führte zu einer Änderung des Tröpfchendurchmessers der Mikroemulsionen und der Menge des Tensides. Die Tröpfchendurchmesser variieren zwischen 25 und 66 nm.

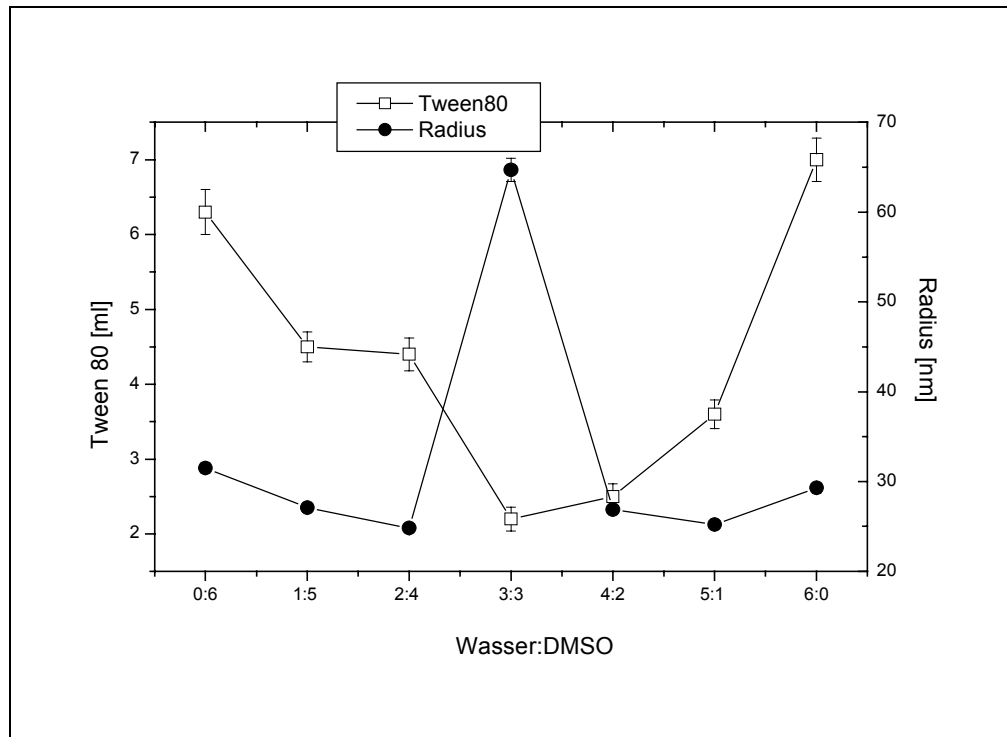


Abb. 4. 31: Änderung der Tröpfchendurchmesser und Tensidmengen bei verschiedenen Mikroemulsionen: 8 ml IPP, 1 ml W:DMSO (0:6, 1:5, 2:4, 3:3, 2:4, 5:1, 6:0) und Tween 80.

4.4.1.2 Stabilisierung von Mikroemulsionen durch Span 20

Die niedrigste Tensidmenge von Span 20, die gebraucht wird, um eine stabile, klare Mikroemulsion herzustellen, war bei der Verwendung von W:DMSO im Verhältnis 2:4 (s. Abb. 4.32) erforderlich. Diese Mikroemulsion zeigte hier auch die größten Tröpfchendurchmesser. Bei W:DMSO im Verhältnis 1:5 konnten hier keine stabilen Mikroemulsionen hergestellt werden. Die erforderliche Tensidmenge ist von der DMSO-Menge abhängig. Es wurde weiterhin beobachtet, dass die Größe der Tröpfchendurchmesser mit zunehmender Tensidmenge abnimmt (s. Abb 4.32).

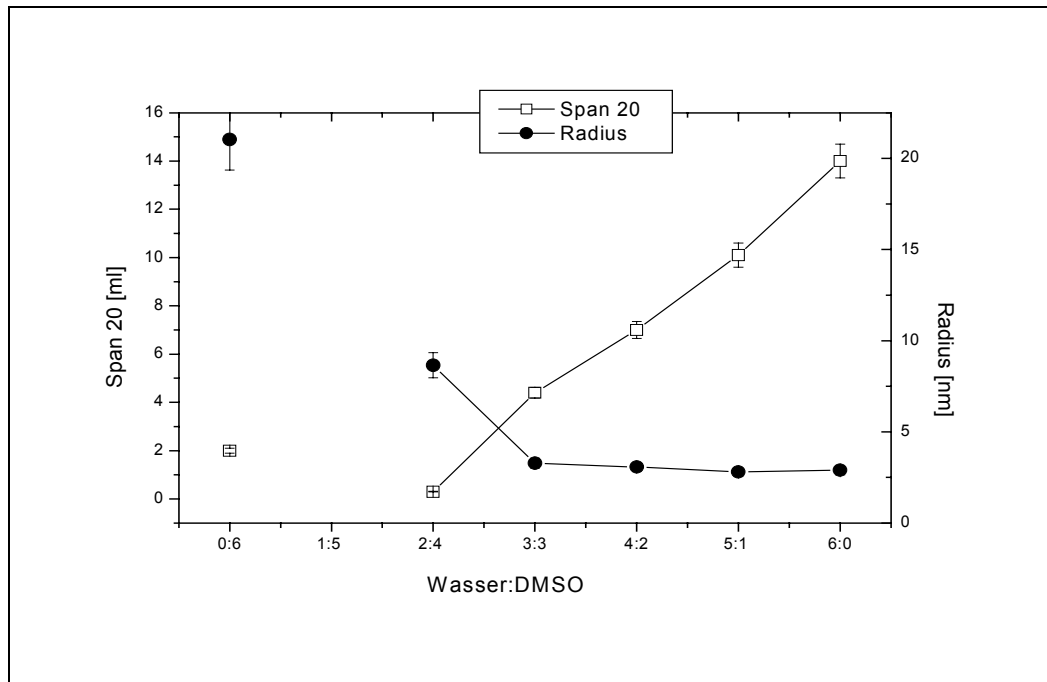


Abb. 4.32: Änderung der Tröpfchendurchmesser und Tensidmengen bei verschiedenen Mikroemulsionen: 8 ml IPP, 1 ml W:DMSO in Verhältnissen von 0:6, 1:5, 2:4, 3:3, 2:4, 5:1 und 6:0 und Span 20.

4.4.1.3 Stabilisierung von Mikroemulsionen durch Tween 80:Span 20 im Verhältnis 3:2

Das dritte System, das durch Tween 80:Span 20 im Verhältnis 3:2 stabilisiert wurde (s. Abb. 4.33), benötigte die niedrigste Tensidmenge. Bei einem W:DMSO-Verhältnis von 3:3 betrug der größte Tröpfchendurchmesser 72 nm. Bei W:DMSO-Verhältnissen von 4:2, 5:1 und 6:0 waren keine Mikroemulsionen herstellbar. Die benötigte Tensidmenge nimmt mit Zunahme der Wassermenge ab. Damit nimmt der Tröpfchendurchmesser mit der Abnahme der Tensidmenge zu.

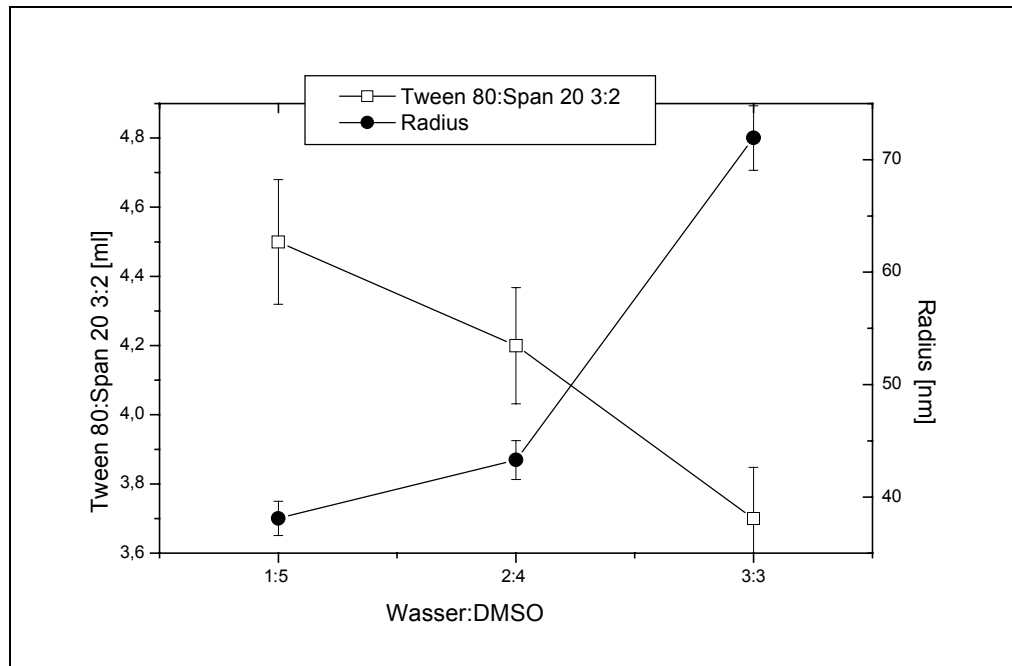


Abb. 4.33: Änderung der Tröpfchendurchmesser und Tensidmengen bei verschiedenen Mikroemulsionen: 8 ml MKTG, 1 ml W:DMSO in Verhältnissen von 0:6, 1:5, 2:4, 3:3, 2:4, 5:1 und 6:0, Tween 80:Span 20 im Verhältnis 3:2.

4.4.1.4 Stabilisierung von Mikroemulsionen durch Tween 80:Span 20 im Verhältnis 2:3

Die Mikroemulsion mit einem W:DMSO-Verhältnis von 1:5 zeigt die niedrigsten verbrauchten Tensidmengen, jedoch die größten Tröpfchendurchmesser (197,7 nm) (Abb. 4.34). Der Tröpfchendurchmesser nimmt hier mit Zunahme der Tensidmengen ab.

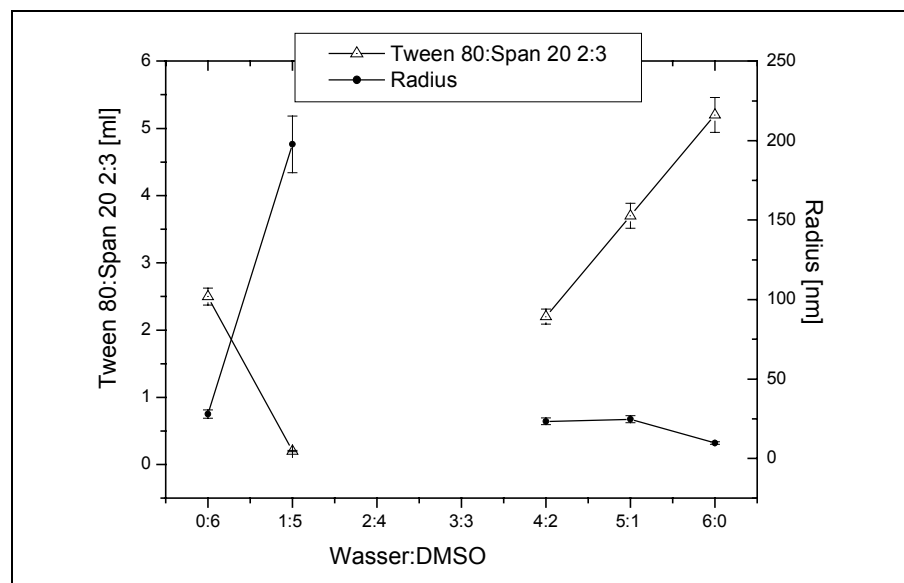


Abb. 4.34: Tröpfchendurchmesser und Änderung der benötigten Tensidmenge bei verschiedenen Mikroemulsionen: 8 ml MKTG, 1 ml W:DMSO in Verhältnissen von 0:6, 1:5, 2:4, 3:3, 2:4, 5:1, 6:0, Tween 80:Span 20 im Verhältnis 2:3.

4.4.1.5 Einfluss der Mengen von Span 20 auf den Tröpfchendurchmesser

Span 20 bildet im Vergleich zu Tween 80 und Tween 80:Span 20 Mikroemulsionen mit kleineren Tröpfchendurchmessern. Um die Wirkung der Tensidmenge von Span 20 auf den Tröpfchendurchmesser zu untersuchen, wurden die Tröpfchendurchmesser bei steigenden Tensidmengen in Mikroemulsionen, die aus 1 ml DMSO, 8 ml IPP und verschiedene Span 20-Mengen (2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3 ml) bestehen, gemessen. Abb. 4.35 zeigt, dass die Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen mit Zunahme der Tensidmengen bis 2,6 ml Span 20 zunehmen. Von 2,6 bis 3 ml nimmt der Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen ab. Ab 3 ml bildet sich keine klare Mikroemulsion mehr. Das System ist unter diesen Bedingungen nicht mehr stabil.

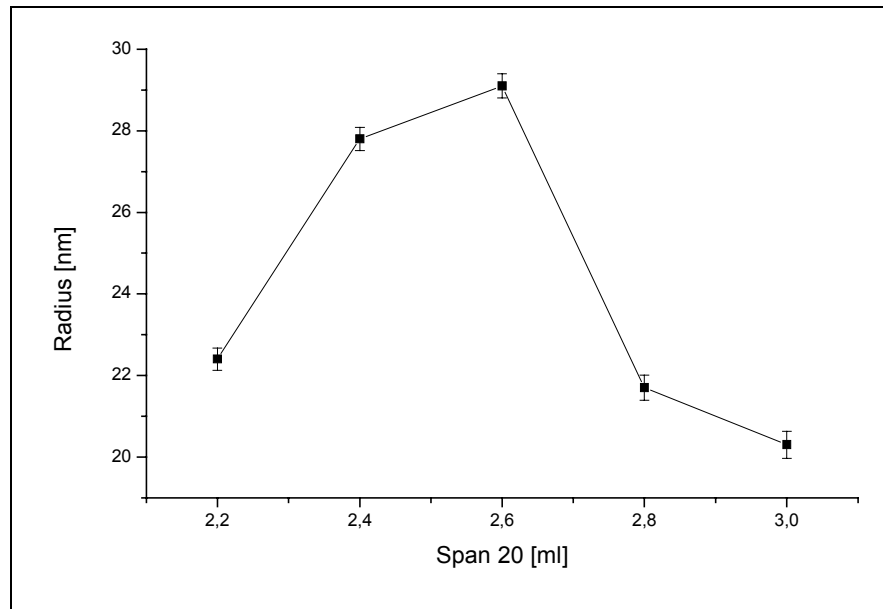


Abb. 4.35: Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen, die jeweils 1 ml DMSO, 8 ml IPP und unterschiedliche Span 20-Mengen (2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3 ml) enthalten.

4.4.1.6 Zusammenfassung

Die getesteten Mikroemulsionen waren den Ergebnissen der Polarisationspektroskopie zufolge isotrop. Weiterhin zeigen die Ergebnisse einen deutlichen systematischen Einfluss von DMSO sowohl auf die Änderung der erforderlichen Tensidmengen als auch auf die Änderung der Tröpfchendurchmesser. Im Allgemeinen nimmt der Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen mit der Zunahme der Tensidmenge ab. Bei Tween 80 nimmt der Tröpfchendurchmesser in bestimmten Bereichen der Mikroemulsionen sehr wenig zu. Das lässt sich aufgrund der Tatsache erklären, dass je größer die Tröpfchendurchmesser sind, desto kleiner ist die Grenzfläche zwischen der hydrophilen und der lipophilen Phase.

Damit benötigt die Grenzfläche im Falle großer Tröpfchendurchmesser kleinere Mengen an Tensiden, um eine stabile Mikroemulsion zu bilden. Gleichung (13) beschreibt die Beziehung zwischen Tröpfchendurchmesser (r) und Oberflächenspannung:

$$\gamma = \frac{k_B T}{4\pi r^2} \quad (16)$$

Dabei sind:

- γ : Oberflächenspannung,
- k_B : Boltzman Konstante,
- T : Absolute Temperatur und
- r : Tröpfchendurchmesser.

Man kann davon ausgehen, dass DMSO die Oberflächenspannung des Systems über die Änderung der Hydrophilie des Systems beeinflusst. Mit anderen Worten bindet DMSO die Wassermoleküle durch Wasserstoffbrücken, so dass nur noch wenige ungebundene Wassermoleküle vorhanden sind. Die Oberflächenspannung hängt von der Anzahl der freien Wassermoleküle ab. Die Änderung der Oberflächenspannung führte in unseren Untersuchungen zu einer Änderung der Tröpfchendurchmesser, die der Tensidmenge proportional ist. Die Mischung aus DMSO und Wasser in bestimmten Verhältnissen verringert die Tensidmenge, die für die Bildung von klaren Mikroemulsionen notwendig ist. Damit lassen sich durch Veränderung der Mischungsverhältnisse von Wasser:DMSO Mikroemulsionen mit geringer Toxizität herstellen. Zusätzlich kann DMSO als Penetrationsverstärker benutzt werden.

Span 20 bildete stabile Systeme mit den kleinsten Tröpfchendurchmessern im Bereich von 2,8 bis 8,6 nm im Vergleich zu den anderen hier verwendeten Systemen. Die Mischung von T:S im Verhältnis 2:3 ergab die größten Tröpfchendurchmesser im Bereich von 23 bis 197 nm. Span 20 besitzt ein kleines Molarenvolumen im Vergleich zu Tween 80. Deshalb werden Mikroemulsionen mit kleinen Tröpfchendurchmessern gebildet, wobei hier die Tröpfchendurchmesser mit Zunahme der Tensidmenge abnehmen. Weiterhin führte die Zunahme der Span 20-Mengen, die vermutlich auf den Tröpfchen-Oberflächen eingelagert wurden, zur Radiuszunahme. Gibt man mehr Tensid hinzu, führt das zur Absenkung der Oberflächenspannung bis eine kritische Stufe erreicht wird, wo sich die Tröpfchen verteilen, was zur Abnahme des Radius führt.

4.4.2 Wasseraufnahme von nicht-ionischen Mikroemulsionen

Um große Mengen von HS, die nur in Wasser löslich ist, in den Mikroemulsionsgrundlagen, die aus IPP, Tween 80 und Span 20 bestehen, zu inkorporieren, wurde die Wasseraufnahme in diesen nicht-ionischen Mikroemulsionen bei verschiedenen Tween 80:Span 20-Verhältnissen untersucht.

Es wurde dazu eine Serie von Mikroemulsionen wie in Abschnitt 3.3.11.2 hergestellt. Die Wasseraufnahmeergebnisse aus den Mikroemulsionen sind in Abb. 4.36 dargestellt. Die Mikroemulsionen zeigen bei der Mischung T:S im Verhältnis 5:5 die höchste Wasseraufnahme-Kapazität.

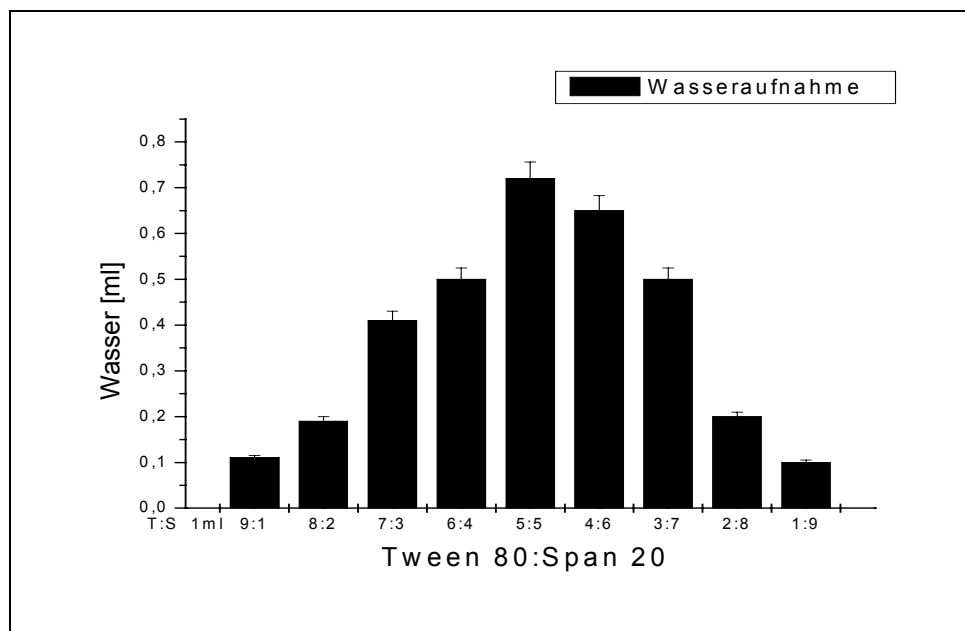


Abb. 4.36: Wasseraufnahme der Mikroemulsionen, die aus IPP und Tween 80:Span 20 bei verschiedenen Mischungsverhältnissen bestehen.

Die Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen bei verschiedenen Wasseraufnahmen wurden durch dynamische Lichtstreuung untersucht. Die Resultate sind in der Abbildung 4.37 gezeigt. Während die höchste Wasseraufnahme für die Mikroemulsion mit einem T:S-Verhältnis von 5:5 beobachtet wurde, zeigten sich die kleinsten Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen mit T:S im Verhältnis 3:7. Die Mikroemulsionen mit 2:8 und 1:9-Verhältnissen wiesen die größten Tröpfchendurchmesser auf.

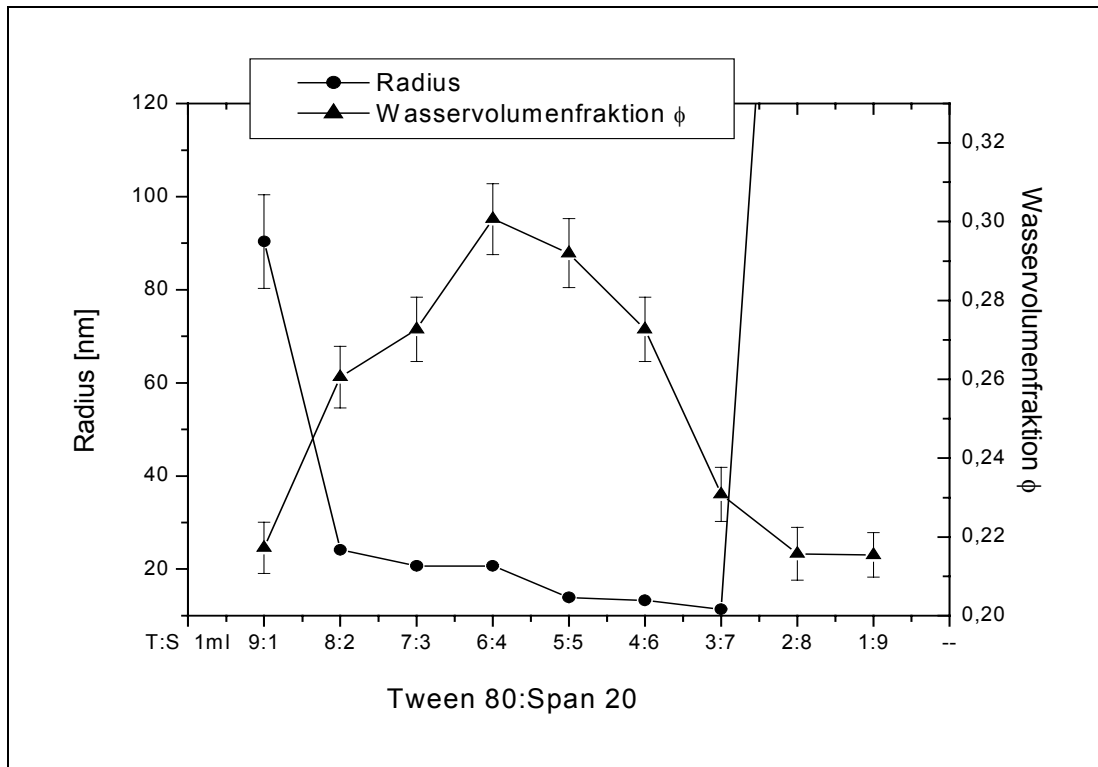


Abb. 4.37: Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen nach Wasseraufnahme. Die Mikroemulsionen bestanden jeweils aus 4 ml IPP und 1ml T:S in verschiedenen Mischungsverhältnissen.

Zusammenfassung

Die höchste Wasseraufnahme in nicht-ionischen Mikroemulsionen W/O, die mit Span 20 und Tween 80 stabilisiert sind, wurde bei einem Verhältnis T:S von 5:5 gefunden. Jedoch nimmt mit Zunahme der Span 20-Menge die Stabilität der Mikroemulsionen ab. Die Tröpfchendurchmesser nehmen mit Zunahme des Wasser- und Tween 80-Anteils ebenfalls zu. Vermutlich ist dies einerseits der im Vergleich zu Span 20 höheren Molmasse von Tween 80 zuzuschreiben, andererseits ist die zunehmende Inkorporation von Wasser in den Tröpfchen für den Anstieg der Tröpfchendurchmesser verantwortlich.

4.4.3 Einfluss der HS 22 kDa auf den Bedarf an Tensid und Wasseraufnahme

Um das Verhalten von HS 22 kDa in einer Mikroemulsion zu charakterisieren, wurden vier verschiedene Serien mit steigenden Konzentrationen an HS 22 kDa untersucht. Das Diagramm (Abb. 4.38) zeigt, dass die Menge an Tensid T:S (2:3), die benötigt wird, um klare Mikroemulsionen mit gleichem Gehalt an Wasser zu bilden, mit steigenden Konzentrationen an HS 22 kDa abnimmt, während bei Mikroemulsionen, welche die gleiche Konzentration an HS 22 kDa besitzen und steigende Mengen an Wasser enthalten, die benötigte Tensidmenge zunimmt.

Es ist anzunehmen, dass HS 22 kDa Wasser über Wasserstoffbrücken bindet. Dadurch ist weniger freies Wasser vorhanden. Dies verursacht eine Steigerung der Lipophilie der hydrophilen Phase, was sich in einer Herabsetzung der Grenzflächenspannung zwischen Wasser und IPP zeigt, und somit zu einem veränderten Tröpfchendurchmesser und einem geringeren Bedarf an Tensid führt.

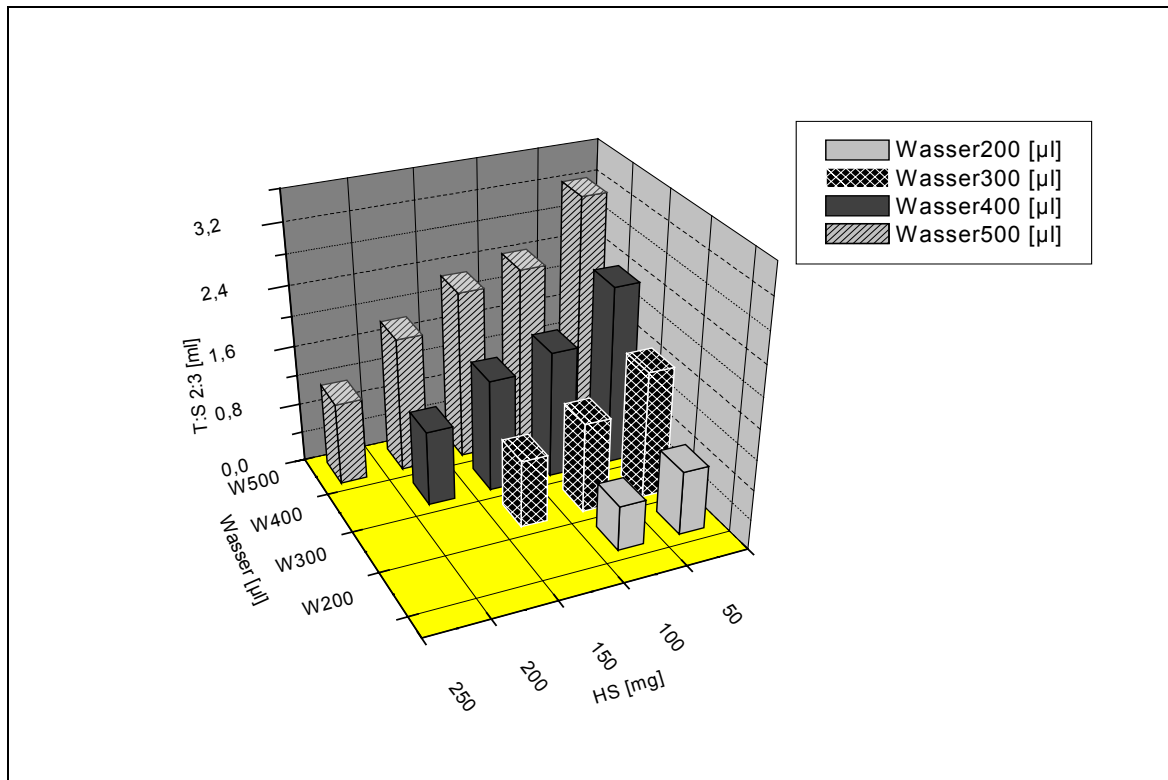


Abb. 4.38: Einfluss von HS 22 kDa auf den Bedarf an Tensid T:S (2:3).

4.4.4 2%ige HS-IPP-Mikroemulsion (IPP-Mikroemulsion)

Mit IPP-Mikroemulsion als Vehikel sollte HS 22 kDa dermal appliziert werden können. Es handelt sich um eine W/O Mikroemulsion, welche aus 2 % HS 22 kDa, 13,8 % T:S (2:3), 4,2 % Wasser und 79,9 % IPP besteht. Sie wurde durch nicht-ionische (Span 20, Tween 80) Tenside bei Raumtemperatur stabilisiert. Als kontinuierliche Phase wurde IPP und als innere Phase entionisiertes Wasser, in dem HS 22 kDa gelöst vorlag, eingesetzt. Dieses System wurde wie in (3.3.11.4) beschrieben hergestellt. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie wurde festgestellt, dass es sich um ein isotropes System handelt. Um die Mikroemulsion zu charakterisieren, wurden die rheologischen Eigenschaften, die dynamische Lichtstreuung und die Freisetzung der HS 22 kDa untersucht.

4.4.4.1 Rheologische Eigenschaften

Die Untersuchungen zur Viskosität wurden wie in (3.3.3) beschrieben bei 20°C zum einen bei steigendem und zum anderen bei abnehmendem Schergefälle durchgeführt. In Abb. 4.39 ist die Viskosität gegen die Schergeschwindigkeit aufgetragen. Es sind keine größeren Veränderungen der Viskosität bei variierender Schergeschwindigkeit festzustellen. Das bedeutet, dass die Mikroemulsion ideale Eigenschaften besitzt. Die Viskosität beträgt 40 mPa·s.

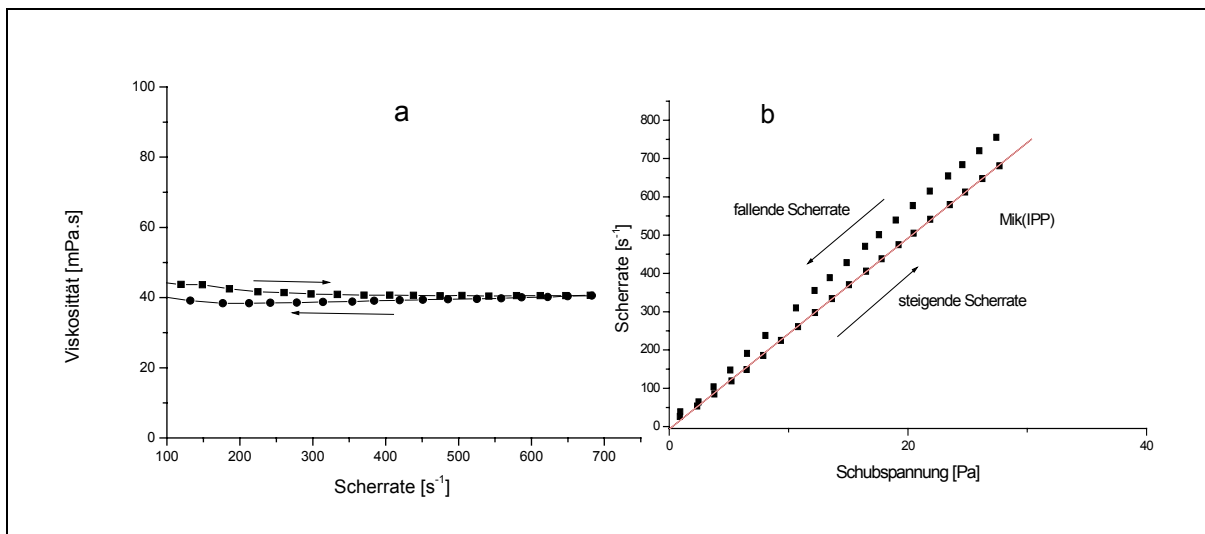


Abb. 4.39: Rheogramme einer Mikroemulsion, welche aus IPP, Tween 80: Span 20 2:3, Wasser und 2 % HS 22 kDa besteht. a: Die Viskosität gegen die Scherrate, b: Die Scherrate gegen die Schubspannung.

4.4.4.2 Dynamische Lichtstreuung

Die benötigte Tensidmenge von T:S 2:3 zur Herstellung einer klaren Mikroemulsion sinkt von 20 % bei der Mikroemulsion ohne HS auf 13,8 % bei der 2 %igen, HS 22 kDa-enthaltenden Mikroemulsion. Die Tröpfchendurchmesser der Mikroemulsionen mit und ohne HS 22 kDa wurden bei verschiedenen Temperaturen durch dynamische Lichtstreuung gemessen. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden in Abb. 4.40 dargestellt. Abb. 4.40a zeigt, dass die Tröpfchendurchmesser mit Temperaturzunahme abnahmen. Eine Erklärung dafür ist, dass die Erhöhung der Temperatur die Löslichkeit der Tenside in der inneren Phase erhöhte, die zum Absinken der Tenside auf der Oberfläche in Richtung der inneren Phase führt. Weiterhin zeigt die HS 22 kDa-enthaltende Mikroemulsion (Abb. 4.40b) eine Zunahme der Tröpfchendurchmesser mit Temperaturzunahme. Es kommt dabei zu einer Abnahme der Stabilität bei Temperaturzunahme, die zur Verschmelzung benachbarten Tröpfchen und so zur Zunahme der Tröpfchendurchmesser führt. Außerdem zeigt die HS 22 kDa-enthaltende Mikroemulsion größere Tröpfchendurchmesser als die HS-freie Mikroemulsion. Das erklärt

die Abnahme der benötigten Tensid-Menge nach der HS-Inkorporation. Die Inkorporation der HS führt zur Durchmesserzunahme, wodurch die Grenzfläche und die benötigte Tensid-Menge, die zur Abdeckung der Grenzfläche benötigt wird, abnehmen.

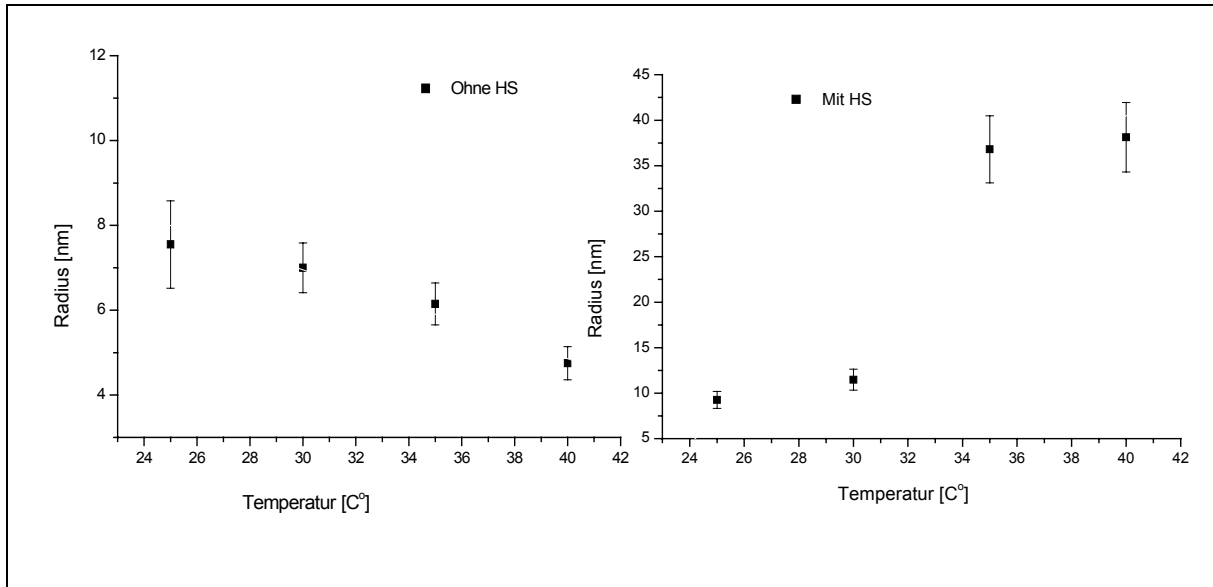


Abb. 4.40: Einfluss der Temperatur auf den Tropfendurchmesser der IPP-Mikroemulsion, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung.

4.4.4.3 Die Dreiphasendiagramme

Um den Existenzbereich der Mikroemulsion im Dreiphasendiagramm und den Einfluss der HS 22 kDa auf diesen zu definieren, wurden Dreiphasendiagramme für die Mikroemulsionen ohne HS und mit 0,5; 1; 2 % HS 22 kDa erstellt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 4.41 dargestellt. Das Existenzgebiet der Mikroemulsion im Dreiphasendiagramm verschob sich durch Zusatz von HS 22 kDa entlang der Wasserachse. Es ist davon auszugehen, dass die Wasserstoffbrücken zwischen HS und den Wassermoleküln und Durchmesserzunahme nach der HS-Inkorporation (4.4.4.2) für diese Verschiebung verantwortlich sind.

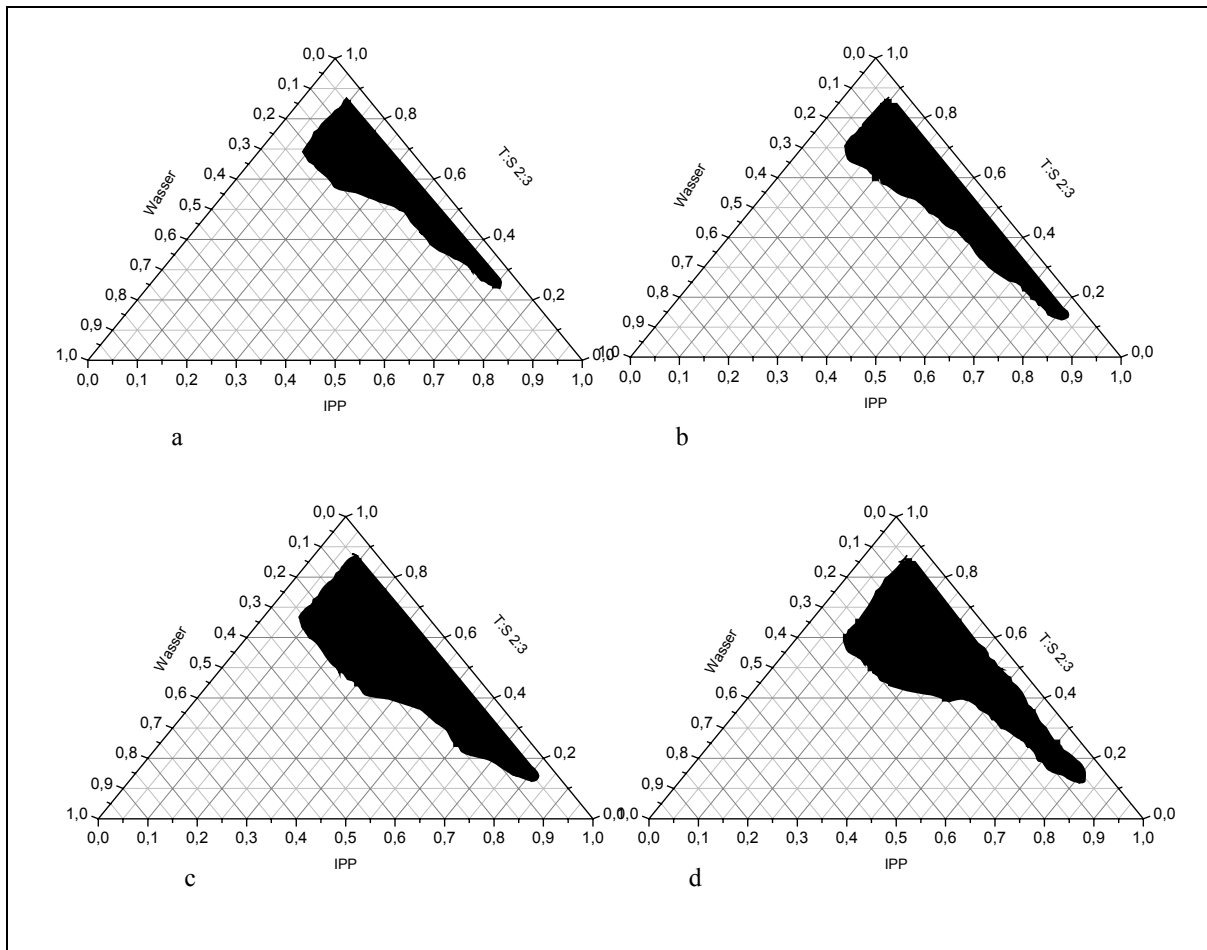


Abb. 4.41: Dreiphasendiagramme der IPP-Mikroemulsionen, a: ohne HS; b: mit 0,5 % HS 22 kDa; c: mit 1 % HS 22 kDa; d: mit 2 % HS 22 kDa.

4.4.4.4 Freisetzung der HS 22 kDa

Die Freisetzung der HS 22 kDa aus der 2%igen HS 22 kDa -IPP-Mikroemulsion wurde mit Hilfe des Mehrschichtmembransystems (MSMS) untersucht. Aufgrund der Hydrophilie der HS 22 kDa wurden 4 Membranen aus Glycerin benutzt. Die in-vitro-Freisetzung der HS 22 kDa wurde über einen Zeitraum von 360 min beobachtet. Die freigesetzten Mengen wurden nach 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240 und 360 min (3.3.10) mit 3 ml heißem Wasser extrahiert. Die Lipid-Phase wurde mit 5 ml Ether abgetrennt. Die wässrige Phase wurde durch einen 4 μ m Filter filtriert, bevor sie durch CZE (bubble-Kapillare, 10 mM, 8,22 pH Borat-Puffer, 30 kV, 30 s Injektionszeit) analysiert wurde. Das PC-Programm TOPFIT 2.0 [143] wurde eingesetzt, um die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) zu bestimmen. Die AUC und die MDT wurden als Parameter zur Charakterisierung der Kinetik und des Ausmaßes der in vitro-Freigabe verwendet. Im Konzentrations-Zeit-Diagramm wurde die HS-Konzentration in der Akzeptormembran [%] gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 4.42).

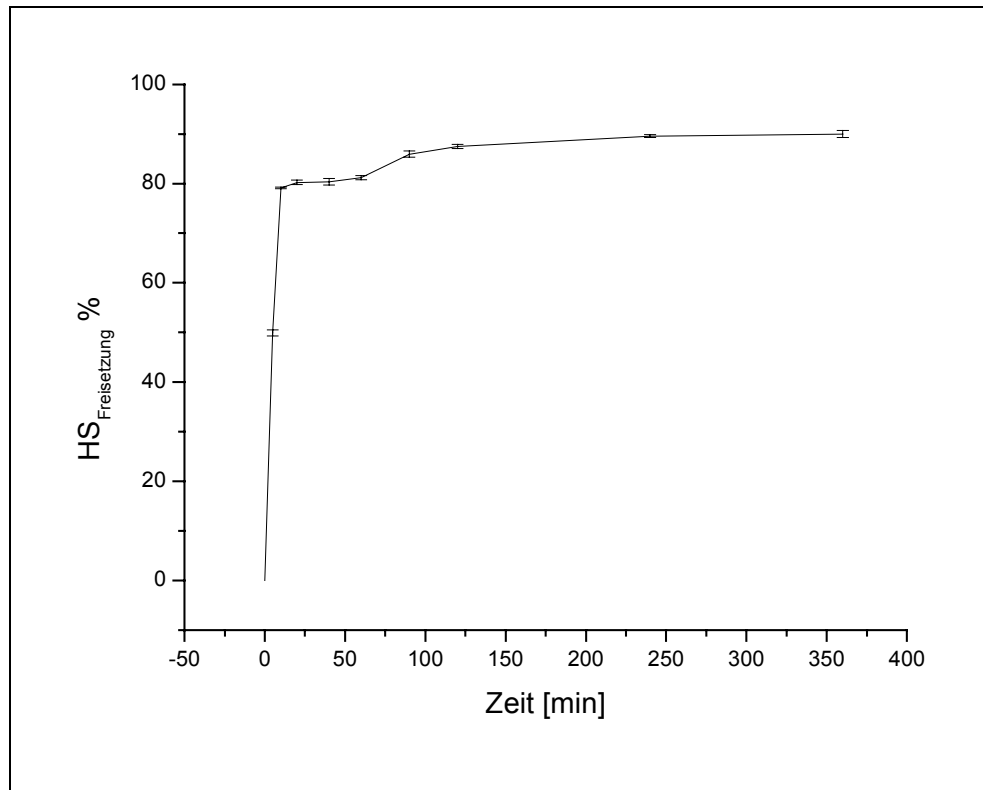


Abb. 4.42: Das Freisetzungsprofil der HS 22 kDa aus der IPP-Mikroemulsion.

Abbildung 4.42 zeigt, dass 79 % der HS 22 kDa in 10 mg Mikroemulsion nach 10 min und 88 % nach 2 h freigesetzt sind. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) beträgt $31000 \pm 1587 \text{ min} \cdot \%$ und die MDT 50 min. Die Verteilung der HS 22 kDa im MSMS (Abb. 4.43) zeigt, dass die größte Menge der HS 22 kDa sich in der ersten Membran konzentriert. Nach 15 bzw. 30 min erscheint HS 22 kDa in den ersten drei Membranen, und nach 60 min auch in der vierten Membran.

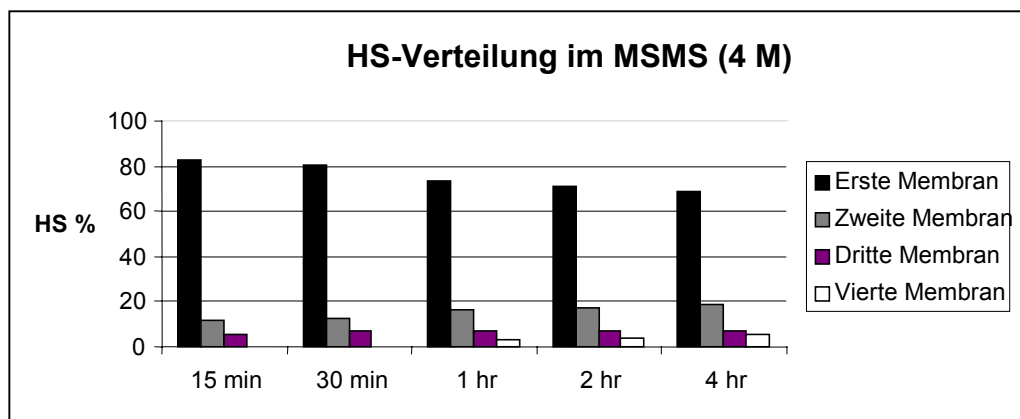


Abb. 4.43: Die Verteilung der HS 22 kDa in den vier Membranen des MSMS.

4.4.4.5 Zusammenfassung

Die IPP-Mikroemulsion bildet ein stabiles, isotropes System, welches ideale rheologische Eigenschaften besitzt. Mit 14,1 % Tensidanteil ist sie gut hautverträglich. Die Interaktion zwischen HS und der Mikroemulsion ist schwach, was eine Freisetzung von 79 % der gesamten HS 22 kDa nach 10 min zeigt.

4.4.5 2-%ige HS 22 kDa -MKTG-Mikroemulsion (MKTG-Mikroemulsion)

Mit Hilfe von MKTG-Mikroemulsion sollten Radikalfänger auf die Haut appliziert werden können. Diese Mikroemulsion enthält 2 % HS 22 kDa, 16 % Span 20, 9,6 % W:DMSO (6:3,6) und 72,4 % MKTG. In diesem System wurde DMSO als Enhancer, als Cotensid und als Wirkungsverstärker (da DMSO ein Radikalfänger ist) eingesetzt. MKTG-Mikroemulsion ist eine W/O Mikroemulsion und wurde durch nicht-ionische (Span 20) Tenside bei Raumtemperatur stabilisiert. Als kontinuierliche Phase wurden mittelkettige Triglyceride (MKTG) und als innere Phase ein Gemisch aus entionisiertem W:DMSO (0,6:0,36), in welchem HS 22 kDa aufgelöst wurde, verwendet. Dieses System wurde wie in Abschnitt 3.3.11.5 beschrieben hergestellt. Durch Polarisationsmikroskopie wurde festgestellt, dass es sich um ein isotropes System handelt. Es wurden die Viskosität, die dynamische Lichtstreuung und die Freisetzung der HS 22 kDa untersucht.

4.4.5.1 Rheologische Eigenschaften

Um die rheologischen Eigenschaften der Mikroemulsionen zu charakterisieren, wurde das System mit einem Rotationsviskosimeter untersucht. Abbildung 4.44 zeigt den Zusammenhang von Schergeschwindigkeit und Viskosität. Wie Abbildung 4.44 zeigt, ändern sich die Viskositäten (gegen 40m Pa·s) bei zunehmenden Schergefällen wie auch bei abnehmender Scherrate kaum. Dies zeigt, dass die Mikroemulsion ideale rheologische Eigenschaften besitzt.

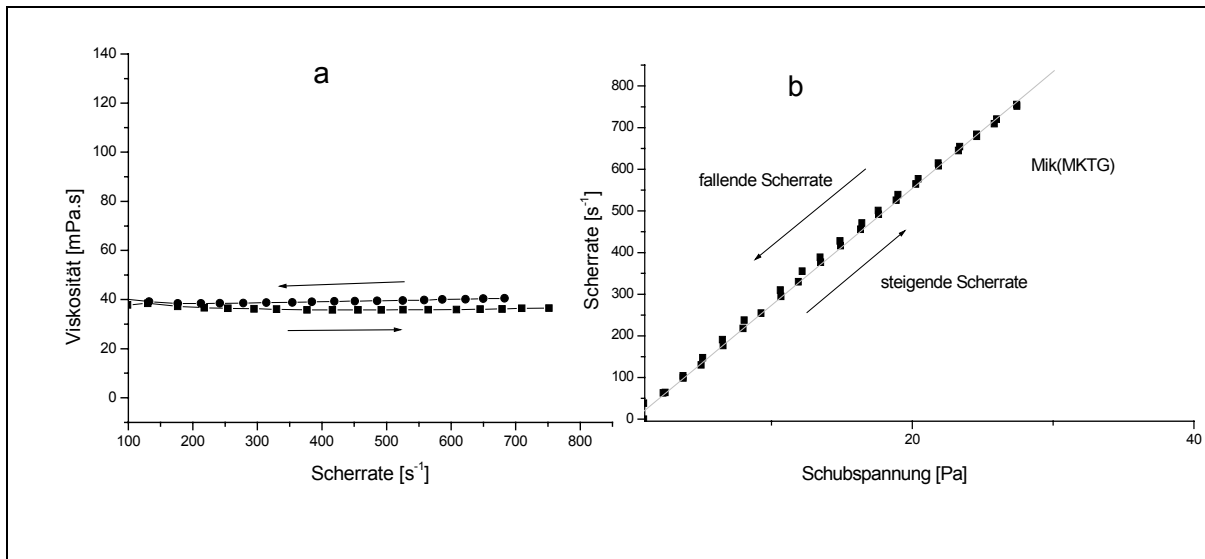


Abb. 4.44: Rheogramme der MKTG-Mikroemulsion, welche aus MKTG, Span 20, Wasser und 2 % HS 22 kDa besteht. a: Die Viskosität gegen die Scherrate, b: Die Scherrate gegen die Schubspannung.

4.4.5.2 Dynamische Lichtstreuung

Um eine klare Mikroemulsion herzustellen, wurde bei 2 %iger HS 22 kDa-MKTG-Mikroemulsion (16%) eine kleinere Tensidmenge als bei der MKTG-Mikroemulsion ohne HS (22%) benötigt. Die Tröpfchendurchmesser wurden durch dynamische Lichtstreuung (DLS) für 2 %ige HS 22 kDa-MKTG-Mikroemulsion und MKTG-Mikroemulsion ohne HS bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.45 dargestellt. Die Abbildung 4.45 zeigt, dass die Tröpfchendurchmesser sowohl im Falle der MKTG-Mikroemulsion ohne HS als auch bei der HS 22 kDa-enthaltenden MKTG-Mikroemulsion mit Temperaturzunahme während der DLS-Messung anstiegen. Die Erhöhung der Temperatur erhöhte die Löslichkeit der Tenside in der inneren Phase, die zur Senkung der Tenside in der inneren Phase und zu Tröpfchendurchmesserabnahme führt.

Wie im Fall der IPP-Mikroemulsion (4.4.4) zeigen HS 22 kDa-enthaltende Mikroemulsionen größere Tröpfchendurchmesser als HS-freie Mikroemulsionen. Dieses Verhalten hat die gleiche Erklärung wie im Fall der IPP-Mikroemulsion. Die Inkorporation der HS führt zu Durchmesserzunahme und damit zur Grenzflächenabnahme. Dadurch nimmt die benötigte Tensid-Menge ab, die zur Abdeckung der Grenzfläche erforderlich ist.

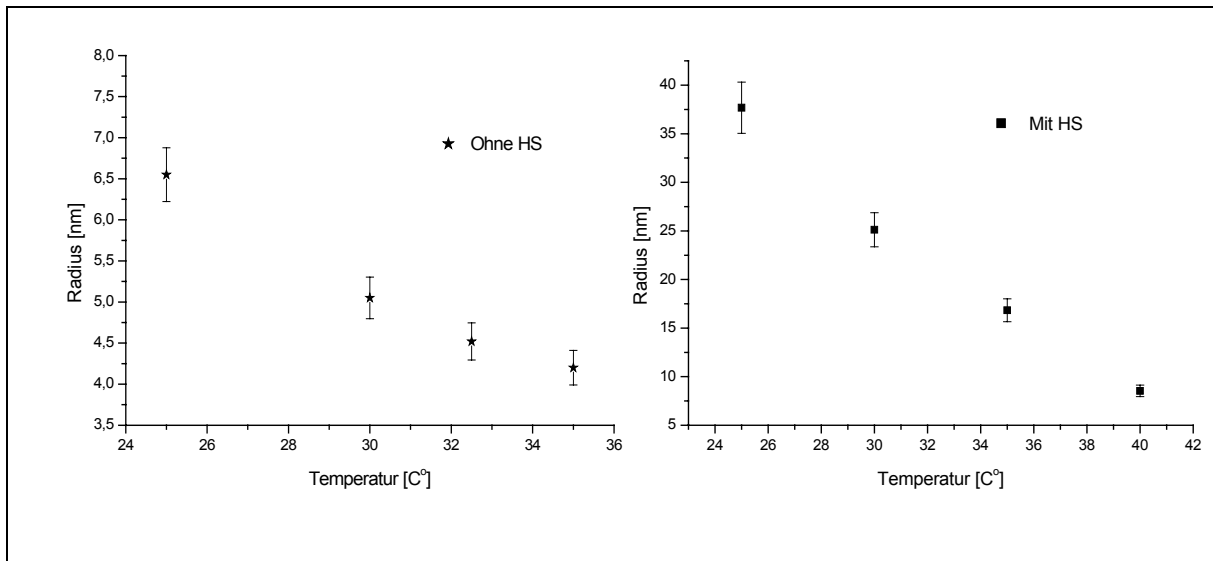


Abb. 4.45: Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf den Tröpfchendurchmesser der MKTG-Mikroemulsion durch dynamische Lichtstreuung.

Die Abbildung 4.45 zeigt, dass die Tröpfchendurchmesser der HS 22 kDa-haltigen Mikroemulsion größer sind als die der HS-freien. Deshalb ist anzunehmen, dass in Anwesenheit von HS 22 kDa in den Tröpfchen sich deren Durchmesser vergrößert. Die Vergrößerung der Tröpfchen zusammen mit der Bindung von Wassermolekülen durch HS 22 kDa, welche die Anzahl der freien Wassermoleküle wie auch die Oberflächenspannung herabsetzt, reduziert die zur Herstellung einer klaren Mikroemulsion benötigten Menge an Tensid.

4.4.5.3 Dreiphasendiagramme

Die Dreiphasendiagramme (Abb. 4.46) wurden für die MKTG-Mikroemulsionen wie in (3.3.11) gezeichnet. Es werden die Diagramme für MKTG-Mikroemulsion ohne und mit 0,5; 1; 2 %iger HS 22 kDa gezeigt, um den Einfluss der HS auf das Existenzgebiet der Mikroemulsion im Dreiphasendiagramm zu verdeutlichen. Die Abb. 4.46 zeigt, dass der Zusatz von HS zu einer deutlichen Verschiebung des Existenzgebietes der Mikroemulsion entlang der Wasserachse des Dreiphasendiagramms in Richtung Wasseraufnahme führt. Diese Verschiebung nimmt mit steigender Konzentration an HS zu. Es ist davon auszugehen, dass HS die gleiche Wirkung wie bei IPP-Mikroemulsion hat (Zunahme der Wasseraufnahme).

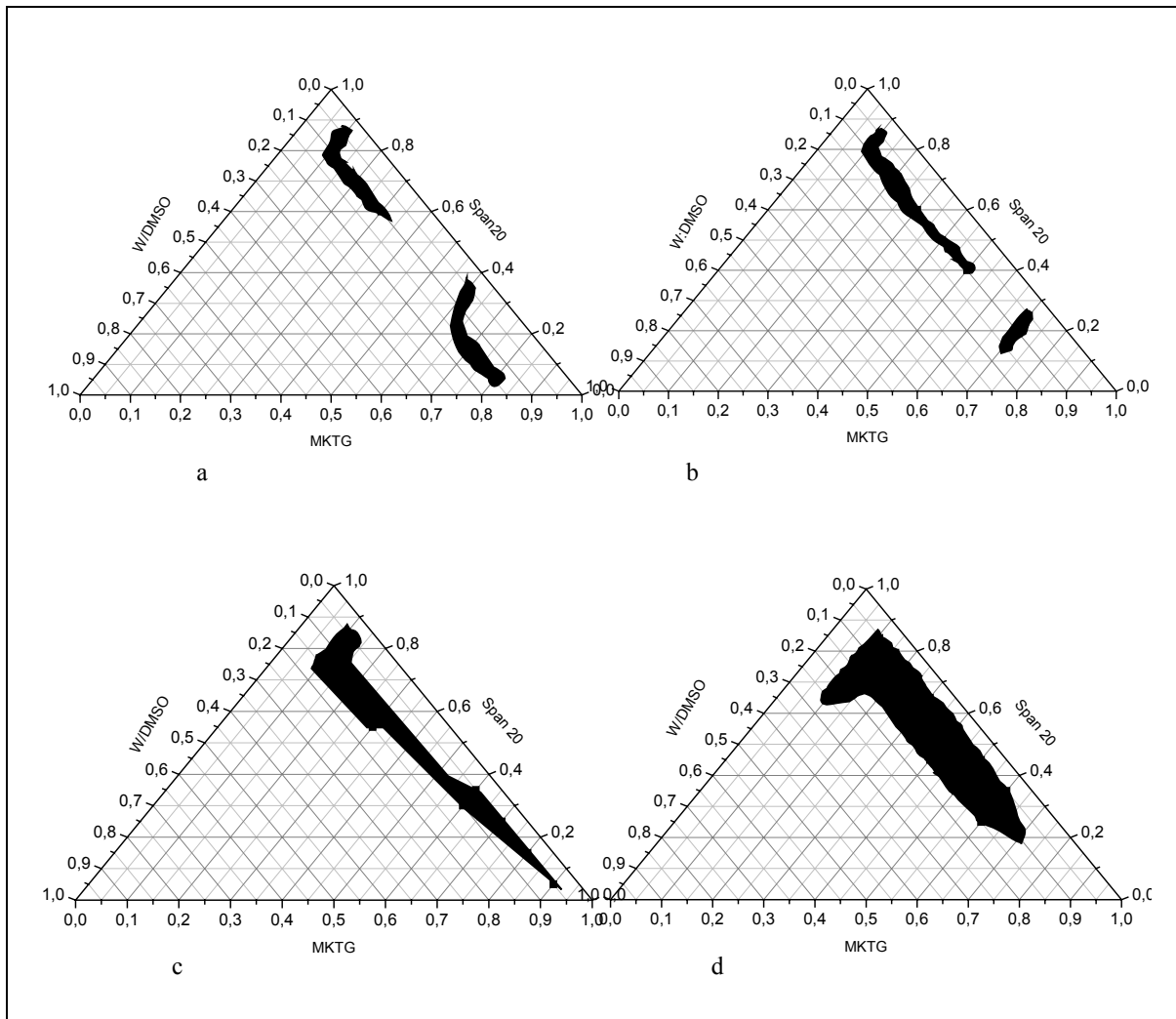


Abb. 4.46: Dreiphasendiagramme der MKTG-Mikroemulsion a: ohne HS, b: mit 0,5 HS; c: mit 1% HS, d: mit 2% HS.

4.4.5.4 Freisetzung der HS 22 kDa

Die Freisetzung der HS 22 kDa aus der 2% HS-enthaltenden MKTG Mikroemulsion wurde mit dem Mehrschichtmembransystem (MSMS) untersucht. Es wurden 4 hydrophile Glycerin-Membranen verwendet, da HS 22 kDa ein hydrophiles Molekül ist. Die in-vitro- Freisetzung von HS 22 kDa aus der Mikroemulsion wurde über eine Zeitdauer von 360 Min beobachtet. Die freigesetzten Mengen wurden nach 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240 und 360 min (3.3.10) mit 3 ml heißem Wasser extrahiert. Die Lipid-Phase wurde mit 5 ml Ether abgetrennt. Die wässrige Phase wurde durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 4µm filtriert, und dann mittels CZE analysiert (10 mM Borat-Puffer, pH 9,22 30 kV, Injektionszeit 30 sec. bubble-Kapillare, 192 nm).

Das PC-Programm TOPFIT 2.0 [143] wurde benutzt, um die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) zu ermitteln. Die AUC und MDT wurden als Parameter zur

Charakterisierung der Kinetik und des Ausmaßes der Freisetzung an HS 22 kDa verwendet. Im Konzentrations-Zeit-Diagramm wurde die HS 22 kDa-Konzentration in den Akzeptormembranen [%] gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 4.47).

Abb. 4.47 zeigt, dass die Freisetzung der HS 22 kDa aus MKTG-Mikroemulsion gegenüber der Freisetzung aus der IPP-Mikroemulsion verzögert erfolgt. Nach 5 min wurden 40 %, nach 60 min 73% und nach 4 h 80 % der HS freigesetzt. Die maximale freigesetzte Menge an HS war nach 6 Stunden mit 94 % der in der Mikroemulsion insgesamt enthaltenden HS zu verzeichnen. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) beträgt 27588 %·min und die MDT 84 min.

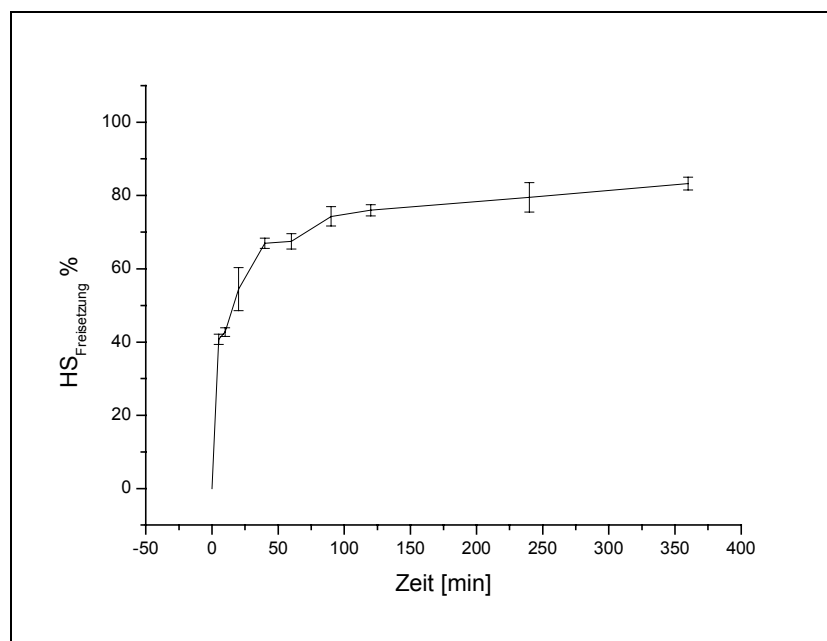


Abb. 4.47: Das Freisetzungsprofil von 2 %iger HS 22 kDa MKTG-Mikroemulsion.

4.4.5.5 Zusammenfassung

MKTG-Mikroemulsion ist ein stabiles, isotropes System mit idealen rheologischen Eigenschaften. Sie zeigt, aufgrund der Tensidmenge und deren Zusammensetzung, eine gute Verträglichkeit. Aus der Freisetzung der HS ist auf eine moderate Interaktion zwischen dieser und der Mikroemulsion zu schließen.

5 Zusammenfassung der Arbeit

1. Die neu entwickelte HPLC-Methode (HPLC-1) ist eine alternative Methode, um langkettige HS in halbfesten Zubereitungen zu analysieren.
2. Die modifizierte HPCE (CZE-2)-Methode hat eine niedrigere Nachweisgrenze als die bekannten HPCE-Methoden, aber die Vorteile überwiegen sicherlich in vielen Fällen. Hierbei sind hauptsächlich die geringen Kosten, der geringe Aufwand bei der Probenvorbereitung, die kurzen Analysezeiten, die geringen Probenvolumina und die sehr schnelle und automatisierte Durchführung der Methode zu nennen.
3. Mit dieser Arbeit konnte mittels NMR-, FT-IR-ATR- und Raman-Spektroskopie der Beweis für das Entstehen von Doppelbindungen nach enzymatischem Abbau erbracht, und damit die Rolle der HS als Radikalfänger bestätigt werden.
4. Die in vitro gemessene topische Verfügbarkeit der enzymatisch abgebauten HS ist weit größer als die von HS 1200 kDa.
5. HS-enthaltende wasserhaltige hydrophile Salbe zeigt im Vergleich zu HS-haltiger amphiphiler Creme bzw. lipophiler Creme die beste topische Verfügbarkeit.
6. DMSO ist als Cotensid, als Enhancer und als Radikalfänger in den Mikroemulsionen geeignet.
7. Die Tröpfchendurchmesser der nicht-ionischen Mikroemulsionen nehmen mit zunehmendem Wassergehalt, Tween 80 und nach HS-Inkorporation zu.
8. HS 22 kDa-Zugabe zu den Mikroemulsionen verringert die Tensid-Menge, die zur Bildung einer klaren Mikroemulsion benötigt wird.
9. IPP-Mikroemulsion ist eine modifizierte stabile Mikroemulsion, welche zur dermalen Applikation von HS geeignet ist.
10. Die MKTG-Mikroemulsion und IPP-Mikroemulsion stellen Alternativen zu den halbfesten Standardzubereitungen für dermale Applikationen dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Meyer K., Palmer J. W., The polysaccharide of the vitreous humor. J. Biol. Chem. 1934, 34: 607-629.
2. Hamerman D., Wood D. D., Interleukin1 enhances synovial cell hyaluronate synthesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1984, 177: 205-210.
3. Heldin P., Laurent T. C., Heldin C. H., Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. Biochem. J. 1989, 258: 919-922.
4. Nyberg A., Engström-Laurent A., Löf L., Serum hyaluronate in primary biliary cirrhosis (PBC)-A Biochemical Marker for Progressive Damage. Hepatology 1988, 8: 142-146.
5. Laurent T. C., Biochemistry of hyaluronic acid. Acta Otolaryngol 1987, (Suppl.442): 7-24.
6. Postlethwaite A. E., Smith G. N., Lachman L. B., Endres R. O., Poppleton H. M., Hasty K. A., Seyer J. M., Kang A. H., Stimulation of glycosaminoglycan synthesis in cultured human fibroblasts by interleukin 1. J. Clin. Invest. 1989, 83: 629- 636.
7. Eriksson S., Fraser J. R. E., Laurent T. C., Pertoft H., Smedsrod B., Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. Exp. cell Res. 1983, 44: 223-227.
8. Reed R. K., Laurent U. B. G., Turnover of hyaluronan in the microcirculation. Am. Rev. Respir. Dis. 1992, 146: 37-39.
9. Fraser J. R. E., Laurent T. C., Turnover and metabolism of hyaluronan. (in): Evered D., Wehlan J., The biology of hyaluronan. Ciba foundation Symposium 143, John Wiley & Sons Ltd, Chichester 1989, 41-59.
10. Laurent T. C., Structure of hyaluronic acid. In: Balazs EA (ed). Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix. Academy Press, New York, 1970, 2: 703-732.
11. Fraser J. R. E., Alcorn D., Laurent T. C., Robinson A. D., Ryan G. B., Uptake *in situ*. Cell of circulating hyaluronic acid by the rat liver. Cellular localization in Tissue Res. 1985, 242: 505-510.
12. Fraser J. R. E., Laurent T. C., Engström –Laurent A., Laurent U. G. B., Elimination of HA from the blood stream in the human. Clin. Exp-Pharma. Physio. 1984, 11: 17-25.

13. Balazs E. A., Denliger J. L., Clinical use of hyaluronic acid. In: Evered D., Whelem J., The biology of hyaluronan. Ciba foundation Symposium 143, John Wiley & Sons Ltd, Chichester 1989, 265-280.
14. Hällgren R., Laurant A., Nisbeth U., Circulating of hyaluronan. A potential marker of altered metabolism of the connective tissue in the uraemia. *Nephron* 1990, 46: 150-154.
15. Zollner J., Sancaktaroglu T., Meurer A., Grimm W., Andreas J., Eysel P., Determination of hyaluronic acid in the nucleus pulposus in acute and chronic degenerative inter vertebral disk changes. *Z. Orthop. Ihre. Grenzgeb.* 1999, 137: 211-213.
16. Parameswaran N., Spielman W.S., Pullen M., Francis J., Brooks D. P., Nambi P., Mechanism of adrenomedullin-stimulated hyaluronic acid release in rat mesangial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 370: 313-318.
17. Peters D. C., Foster R. H., Diclofenac/hyaluronic acid. *Drugs Aging.* 1999, 14: 313-319; discussion 320-321.
18. Solomon A., Merin S., The effect of a new tear substitute containing glycerol and hyaluronate on keratoconjunctivitis sicca. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 1998, 14: 497-504.
19. Tengblad A, Laurent U. B. G., Lilja K., et al. Concentration and relative molecular mass of hyaluronate in lymph and blood. *Biochem. J.* 1986, 236: 521-525.
20. Laurent T. C., Fraser J. R. E., Hyaluronan. *J. FASEB* 1992, 6: 2397-2404.
21. Balazs E. A., Laurant T. C., Jeanloz RW. Nomenclature of hyaluronic acid. *J. Biochem.* 1986, 235: 903-910.
22. Moore A. R., Willoughby D. A., Hyaluronan as delivery system for diclofenac: a hypothesis for mode of interaction. *J. tiss. Reac.* 1995, 17: 153-156.
23. Tammi R., Agren U. M., Tuhkanen A.L., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. *Proc. Histochem. Cytochem.* 1994, 29: 1-81.
24. Fraser J. R. E., Kimpton W. G., Laurent T. C., Cahill R. N. P., Vakakis N., Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem. J.* 1988, 256: 153-158.
25. Fraser J. R. E., Laurent T. C., Pertoft H., Baxter E., Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injection intravenously in the rabbit. *Biochem. J.* 1981, 415-424.
26. Fraser J. R. E., Dahl L. B., Kimpton W. G., Laurent T. C., Cahill R. N. P., Brown T. J., Vakakis N., Elimination and subsequent metabolism of circulating hyaluronic acid in the foetus. *J. devel. Physio.* 1989, 111: 235-242.

-
27. Reed R. K., Laurent U. B. G., Fraser J. R. E., Laurent T. C., Removal rate of ^3H -hyaluronan injected subcutaneously in rabbits. *Am J. Physiol.* 1990, 259 (Heart Cric Physiol 28): H532-H535.
 28. Foschi D., Castoldi L., Radealli E., Abelli P., Calderini G., Rastrelli A., Mariscotti C., Marrazi M., Trabucchi E., Hyaluronic acid prevents oxygen free-radical damage to granulation tissue: A study in rats. *Int. J. Tiss. Raec.* XII 1990, 12: 333-339.
 29. Gerlach D., Untersuchung zum Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten unter Einfluss von Hyaluronsäurefragemnten und Bewertung der UV- Protektion. Diplomarbeit, Pharmazie, Martin-Luther-University, Halle 1999.
 30. Trommer H., Dissertation, Pharmazie, Martin-Luther-University, Halle 2002.
 31. Nuhn, P. *Naturstoffchemie: mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe.* 3. Auflage, Hirzel. 1997.
 32. Laurent T. C., Biochemistry of hyaluronic acid, *Acta. Otolaryngol. Suppl.* 1987, 442: 7-24.
 33. Scott J. E., Secondary structure in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *Ciba-Found-Symp.* 1989, 143: 6-15.
 34. Francis R., William G., Freeman F., *Characteristic Raman Frequencies of organic compounds*, Wiley-inter science Publication, John wiley and cons New York. 1972.
 35. Manoharan R., Baraga J., Feld, M. S., Rava, R. P. Quantitative histochemical analysis of human artery using Raman spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol.* 1992, B 16: 211-33.
 36. Barrett T. W., Laser Raman spectra of mono-, oligo- and polysaccharides in solution *spectrochemica Acta.* 1981, 37: 233-239.
 37. Góral J., Zichy V., Fourier Transform Raman studies of materials and compounds of biological importance. *Spectrochemica. Acta.* 1990, 46: 253-275.
 38. Henry A., Wells JR., Rajai A. H., An investigation of the vibration spectra of glucose, galactose, and mannose. *Journal of Molecular Structure* .1990, 224: 385-424.
 39. Mathlouthi M., Luu C., Marie A., Laser-Raman study of solute-solvent interaction in aqueous solution of D-fructose, D-glucose, and sucrose. *Carbohydrate Research* 1980, 81: 231-223.
 40. Mauel C., Barros A., Barros M., Douglas N., Rutledge D. I., Multivariate analysis of urnic acid and neutral sugars in whole pectin samples by FT-IR spectroscopy. *J. carbohydrate polymers* 1998, 37: 241-248.

-
41. Magnanai A., Lamponi S., Consumi M. & Barbucci R., Biological performance of tow materials based on sulphated hyaluronic acid and polyuritan. J. Material Chemistry.1999, 9: 2393-2398.
 42. Magnani A., Rappuoli R., Lamponi S., Rolando B., Noval polysaccharide hydrogels: characterization and properties. Polym.Adv. Technol. 2000, 11: 488-495.
 43. Barbucci R., Magnani A., Baszkiin A., Physico-chemical surface characterization of hyaluronic acid derivatives as new class of biomaterials. J. Biomater. Sci. Polymer. 1993, 3: 245-273.
 44. Marlowe R. L., Hoppe A., Rupprecht A., Lee S., A mediation of a phase transition in hyaluronate films by the counter ions Li, Cs, Mg and Ca as observed by infrared spectroscopy, optical microscopy, and optical birefringence. Biomol. Struct. Dyn. 1999, 17: 607-616.
 45. Zhibankov R. G., Vibrational spectra and conformations of mono- and polysaccharides. Journal of Molecular Structure.1992, 272: 347-360.
 46. Colthup N. B., Daly L. H., Introduction Infrared and Raman Spectroscopy. Academic Press, New York 1990.
 47. Leary S., Instrumentelle Analytik, 4 Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
 48. Ehlers E., Analytik II, Kurzlehrbuch Quantitative und instrumentelle pharmazeutische Analytik 9. Auflage, Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart 1999.
 49. Naji L., Kaufmann J., Huster D., Schiller., Arnold K. J., ^{13}C NMR relaxation studies on cartilage and cartilage components. Carbohydr. Res .2000, 327: 439-446.
 50. Collier J. H., Camp, J. P., Hudson T. W., Schmidt C. E., Synthesis and characterisation of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications. Biomed. Mater. Res.2000, 50: 574-584.
 51. Bosco M., Picotti, F., Radoicovich, A., Rizzo, R., Hydroxyl group interactions in polysaccharides: a deuterium-induced differential isotope shift ^{13}C -NMR investigation. Biopolymers 2000, 53: 272-280.
 52. Grootveld M., Silwood C. J. L., Lynch E. J. P., The role of N-acetylcysteine in protecting synovial fluid biomolecules against radiolytically-mediated oxidative damage: a high field proton NMR study Free Radical Res. 1999, 30: 351-369.
 53. Scott, J. E., Heatley F., Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ^{13}C NMR study Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999, 96: 4850-4855.
 54. Marchettini N., Barbucci R., Bonechi C., Donati A., Magnani A., Niccolucci V., Tiezzi E., Structural study of hyaluronic acid oligomers and their complexes with copper in

-
- water by NMR and IR and molecular dynamics calculations *Macromol. Symp.* 138(Polymer-Solvent Complexes and Intercalates II). 1999, 203-208.
55. Almond A., Brass A., Sheehan J., K. Dynamic exchange between stabilized conformations predicted for hyaluronan tetrasaccharides: comparison of molecular dynamics simulations with available NMR data *Glycobiology*. 1998, 8: 973-980.
 56. Schiller J., Arnhold J. and Arnold K., Action of hypochlorous acid on polymeric components of cartilage. Use of ^{13}C NMR spectroscopy. *Z. Naturforsch.* 1995, 50: 721-728.
 57. Cowman M. K., Hittner D. M., Feder-Davis J., ^{13}C -NMR Studies of Hyaluronan: Conformational Sensitivity to Varied Environments. *Macromolecules*. 1996, 29: 2894-2902.
 58. Ghosh P., Hutadilok N., Adam N., Lentini A., Interactions of hyaluronan (hyaluronic acid) with phospholipids as determined by gel permeation chromatography, multi-angle laser-light-scattering photometry and ^1H -NMR spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 1994, 16: 237-244.
 59. Mikelsaar R. H., Scott J. E., Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution. *Glycoconjugate J.* 1994, 11: 65-71.
 60. Ghosh P., Hutadilok N., Lentini A., Nuclear magnetic resonance studies of hyaluronan (HA): evidence of competitive inhibition of interchain associations by phospholipids which may result in decreased anti-inflammatory and cartilage protecting properties of HA. *Heterocycles*. 1994, 38: 1757-1774.
 61. Albert Klaus., Michele S., Guenther U., Fial M., Gall H., Saal J., ^{13}C NMR investigation of synovial fluids *Magn. Reson. Med.* 1993, 30: 236-240.
 62. Livant P., Roden L., Krishna, N. R., NMR studies of a tetrasacchride from hyaluronic acid. *Carbohydr. Res.* 1992, 237: 271-281.
 63. Kvam B. J., Atzori M., Toffanin R., Paoletti S., Biviano F., Proton- and carbon-13-NMR studies of solutions of hyaluronic acid esters and salts in methyl sulfoxide: comparison of hydrogen-bond patterns and conformational behaviour *Carbohydr. Res.* 1992, 230: 1-3.
 64. Pouyani T., Kuo J. W., Harbison G. S., Prestwich, Glenn D. Solid-state NMR of N-acylureas derived from the reaction of hyaluronic acid with isotopically-labeled carbodiimides. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114: 5972-5976.

-
65. Matsubara C., Kajiwarra M., Akasaka H., Haze S., Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies on the biosynthesis of hyaluronic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 1991, 39: 2446-2448.
 66. Parkes H. G., Grootveld M. C., Henderson E. B., Farrell A., Blake D. R., Oxidative damage to synovial fluid from the inflamed rheumatoid joint detected by proton NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1991, 9: 75-82.
 67. Grootveld, M., Henderson E. B., Farrell A., Blake D. R., Parkes H. G., Haycock P., Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton NMR spectroscopy. *Biochem. J.* 1991, 273: 459-467.
 68. Calliste C. A., Le Bail J. C., Trouillas P., Pouget C., Habrioux G., Chulia A. J., Duroux J. L., Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities. *Anticancer. Res.* 2001, 21: 3949-3956.
 69. Naito Y., Yoshikawa T., Tanigawa T., Sakurai K., Yamasaki .K, Uchida M., Kondo M.,Hydroxyl radical scavenging by rebamipide and related compounds: electron paramagnetic resonance study. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 18: 117-123.
 70. Seche E., Sabattier R., Bajard J. C., Blondiaux G., Breteau N., Spothem-Maurizot M., Charlier M., Direct effect in DNA radiolysis. Boron neutron capture enhancement of radiolysis in a medical fast-neutron beam. *Radiat Res* 2002, 158: 292-301.
 71. Walter B., *Lehrbuch der Organischen Chemie*, 23 Auflage Hirzel-Verlag Stuttgart, Leipzig 1998.
 72. Bitter T. and Muir H. M., A modification uronic Acid carbazole Reaction. *Analytical Biochemistry.* 1962, 4: 330-334.
 73. Dische Z., A new specific colour reaction of hexauronic acid. *Biochem. Z.* 1947, 167: 189-199.
 74. Koshiishi I., Takenouchi M., Hasegawa T., Imanari T., Enzymatic method for the simultaneous determination of hyaluronan and chondroitin sulfates using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1998, 265: 49-54.
 75. Koshiishi I., Horikoshi E., Imanari T., Quantification of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfates in the tissue sections on glass slides. *Anal. Biochem.* 1999, 267: 222-226.
 76. Chun L. E., Koob T. J., Eyre D. R., Quantitation of hyaluronic acid in tissues by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography of oligosaccharide cleavage products. *Anal. Biochem.* 1988, 171: 197-206.

-
77. Morikawa A., Microscale determination of hyaluronic acid synthesized by cultured fibroblasts and its application. *Hirosaki Igaku* 1993, 45: 284-290.
 78. Goessler N., Reissner C., Janzen N., Kaehnert H., Kleesiek K., A high-performance liquid chromatography method for the determination of glycosaminoglycans in human blood. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1993, 31: 503-511.
 79. Akiyama H., Toyoda H., Yamanashi S., Sagehashi Y., Toida T., Imanari T., Microdetermination of hyaluronic acid in human urine by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 1991, 5: 189-192.
 80. Payan E., Jouzeau, J. Y., Lapique F., Muller N., Payan, J. P., Gegout P., Bertin P., Netter P., Assay of synovial fluid hyaluronic acid using high-performance liquid chromatography of hyaluronidase digests. *J. Chromatogr.* 1991, 566: 9-18.
 81. Fedarko N. S., Termine J. D., Robey P. G., High-performance liquid chromatographic separation of hyaluronan and four proteoglycans produced by human bone cell cultures. *Anal. Biochem.* 1990, 188: 398-407.
 82. Kakehi K., Ueda Minako., Suzuki S., Honda S., Determination of hyaluronic acid by high-performance liquid chromatography of the oligosaccharides derived therefrom as 1-(4-methoxy)phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *J. Chromatogr.* 1992, 630: 141-146.
 83. Motohashi N., Mori I., Quantitation of hyaluronic acid and chondroitin sulfates in rabbit synovial fluid by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides enzymically derived there of *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38: 769-773.
 84. Saari H., Konttinen Y. T., Determination of synovial fluid hyaluronate concentration and polymerization by high performance liquid chromatography *Ann. Rheum. Dis.* 1989, 48: 565-570.
 85. Mitsuma R., Yamanashi S., Toyoda H., Imanari T., Determination of hyaluronic acid in rabbit plasma by HPLC with fluorometric postcolumn detection. *Bunseki Kagaku* 1989, 38: 92-93.
 86. Toyoda H., Motoki K., Tanikawa M., Shinomiya K., Akiyama H., Imanari T. J., Determination of human urinary hyaluronic acid, chondroitin sulphate and dermatan sulphate as their unsaturated disaccharides by high-performance liquid chromatography. *Chromatogr.* 1991, 565: 141-148.
 87. Murata K., Yokoyama Y., Liquid chromatographic assay for constituent disaccharides of hyaluronic acid and chondroitin sulfate isomers. *J. Chromatogr.* 1987, 415: 231-240.

-
88. Umeda T., Miyoshi T., Sawai T., Determination of synovial fluid hyaluronic acid concentration and molecular weight by gel chromatography. *Connect. Tissue* 1994, 26: 127-133.
 89. Yeung B., Marecak D., Molecular weight determination of hyaluronic acid by gel filtration chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption ionization. *J. Chromatogr. A* 1999, 852: 573-581.
 90. Karamanos, N. K., Hjerpe A., High-performance capillary electrophoretic analysis of hyaluronan in effusions from human malignant mesothelioma. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1997, 697: 277-281.
 91. Karamanos N. K., Axelsson S., Vanky P., Tzanakakis G., Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture. proteoglycans *J. Chromatogr. A.* 1995, 696: 295-305.
 92. Gherezghiher T., Koss M. C., Nordquist R. E., Wilkinson, .Rapid and sensitive method for measurement of hyaluronic acid and isomeric chondroitin sulfates using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1987, 413: 9-15.
 93. Müller B. W., Kleinebudde P., Untersuchung an so genannten Mikroemulsionsystemen, 1. Teil: Untersuchungen an Arzneistofffreien-Systemen, *Pharm. Ind.* 1988, 50 Nr. 3: 370-385.
 94. Holland L. A., Chetwyn N. P., Perkins M. D. and Lunte S. M., Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Research* 1997, 4: 373-387.
 95. Suzuki S., Honda S., A tabulated review of capillary electrophoresis of carbohydrates. *Elektrophoresis* 1998, 19: 2539-2560.
 96. Lee Kung B. L., Kim Yeong S., Robert J. L., Capillary zone electrophoresis for the quantitation of oligosaccharides formed through the action of chitinase. *Electrophoresis* 1991, 12: 636-640.
 97. Kitagawa H., Kinshita A. and Sugahara K., Microanalysis of Glycosaminoglyca-Derived Disaccharide's Labelled with the Fluorophore 2-Aminoaridone by Capillary Electrophoresis and High-performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 1995, 232: 114-121.
 98. Mitsuma R., Yamanashi S., Toyoda H., Imanari T., Determination of hyaluronic acid in rabbit plasma by HPLC with fluorometric postcolumn detection. *Bunseki Kagaku.* 1989, 38: 92-103.

-
99. Toyoda H., Shinomiya K., Yamanashi S., Koshiishi I., Imanari T., Microdetermination of unsaturated disaccharide's produced from chondroitinsulfates in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Anal. Sci.* 1988, 4: 381-384.
 100. Toida T., Robert J., Detektion of glycosaminoglycans as a copper (II) complex in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1996, 17: 341-346.
 101. Grimshaw J., Kane A., Trocha G. J., Douglas A., Usha C., Desmond A., .Quantitative analysis of hyaluronan in vitreous humor using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1994, 15: 936-944.
 102. Grimshaw J., Grimsch J. T., Quantitative analysis of Hyaluronan in human synovial fluid using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1996, 17: 396-400.
 103. Grimshaw J., Analysis of glycosaminoglycans and their oligosaccharide fragments by capillary electrophoresis. *Elektrophoresis* 1997, 18: 2408-2414.
 104. Al-Hakim A., and Linhardt R. J., Capillary Electrophoresis for the analysis of chondroitin sulfat- and dermatan sulfat-derived disaccharides. *Analytical Biochemistry* 1991, 195: 68-73.
 105. Plätzer M., Ozegowski J. H., Neubert R. H. H., Quantification of hyaluronan in pharmaceutical formulations using high performance capillary electrophoresis and the modified uronic acid carbazole reaction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 21: 491-496.
 106. Niedner R., Ziegenmeyer J., *Dermatika. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart* 1992.
 107. Jäckle R., *Salutas Lexikon Dermatologie* (Hrsg: Lexikonredktion der Verlages). Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1992.
 108. Stüttgen G., Schaefer H., *Funktionelle Dermatologie*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1974.
 109. Stüttgen G., *Die normale und patholoische Physiologie der Haut*. Fischer, Jena 1965.
 110. Hölzle E., Plewig G., Ledolter A., Corneocyte exfoliative cytology: A model to study normal and diseased stratum corneum.(in) Marks R., Plewig G., *Skin models*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo 1986: 183-193.
 111. Barry B. W., Structure, function, diseases and topical treatment of human skin. (in) Barry, B. W. (Hrsg.), *Dermatological formulations: Percutaneous absorption*. Dekker, New York-Basel 1983, 1-48.

-
112. Stüttgen G., Drug absorption by intact and damaged skin. (in): Brandua R., Lippold B. H. (Hrsg.): Dermal and transdermal absorption (1st International Symposium from 12-14 January, 1981, Munchen) Wissenschaftliche Verlags mbH, Stuttgart 1982: 27-40.
 113. Landmann L., Die Permeabilitätsbarriere der Haut. Pharmazie in Unserer Zeit 1982, 20: 155-160.
 114. Gloor M., Pharmakologie dermatologischer Externa. Springer, Berlin, 1974.
 115. Idson B., Percutaneous absorption. J. Pharm. Sci. 1975, 64: 901-924.
 116. Elias J., The microscopic structure of the epidermis and its derivatives. In: Brandua R., Lippold B. H. (Hrsg.): Dermal and transdermal absorption (1st International Symposium from 12-14 January, 1981, München) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1982, 7: 3-26.
 117. Schaefer H., Percutaneous absorption of topically applied drugs in relation to their toxicity. Br. J: Dermatol. 1986, 115: 71-75.
 118. Rougier A., Dupuis D., Lotte C., Rogeut T., Scheafer H., In vitro Correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. J. Invest. Dermatol. 1983, 81: 275-278.
 119. Rougier A., Dupius D., Lotte C., Rogeut T., The measurement of the stratum corneum reservoir. A predictive method for in vivo percutaneous absorption studies: influence of application time. J: Invest. Dermatol. 1985, 84: 66-68.
 120. Boss N., Jäckle R., Hexal Taschenlexikon Medizin. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1993.
 121. Kidl G., Raab W., Licht und Haut, 4 Auflage, Govi-Verlag. Eschbon, 1998.
 122. Schwenkenbecher A., Das Absorptionsvermögen der Haut. Arch Anat. Physiol. 1904: 121-165
 123. Barry B. W., Action of skin penetration enhancers-the lipid protein partition theory. Int. J. Cosmet. Sci. 1988, 10: 281-293
 124. Loth H., Grundlagen des intra-und transdermalen Transports von Arzneistoffen. I. Acta. Pharm. Technol. 1986, 32 (3): 109-114.
 125. Pfeifer S., Pfügel P., Bochert H. H., Grundlagen der Biopharmazie. 2. Auflage, Verlag Volk und Gesundheit 1988.
 126. Sznitowska M., Brner B., Maibach H. I., Percutaneous Penetration of multipolar ions: evidence for porous transport. Int. J. Parm. 1995, 123: 41-45.
 127. Guzzo C. A., Lazarus G. S., Werth V. P., Dermatological pharmacology. (in) Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddan R. W., Gilman A. G., The

-
- pharmacological basis of therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill , New York, 1996, 593-1595.
128. Lippold B., Kutane Resorption–Möglichkeiten, Modelle, Beeinflussung. Acta. Pharm. Technol. 1981, 27: 1-9.
 129. Menczel E., Touitou E., Cutaneous Permeation of Lipophilic molecules: Effects of enhancers. (in) Bronaugh R. L., Maibach H. I., (Hrsg.): Percutaneous absorption. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 1989.
 130. Stüttgen G., Die biologische Funktionen des Stratum corneum. Pharmakokinetische Bedingungen für topische Applikation. (in): Rietbrock N., Die Haut als Transportorgan für Arzneistoffe. Steinkopf-Verlag Darmstadt 1990.
 131. Brown M. B., Marriott C., Martinin G. P., A study of transdermal drug delivery properties of hyaluronan in drug delivery. Round Table Series 40.Londen: Royal society of Medicine Press Limtid, 1995, 53-73.
 132. Brown T. J., Alcorn D., Fraser J. R. E., Absorption of Hyaluronan applied to the Surface of Intact Skin. The Society for Investigative Dermatology, Inc. 1999: 740-746.
 133. Bauer K. H., Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie, 6 Auflage, Stuttgart, 1999.
 134. Schmalfuß U., Dissertation, Martin Luther Universität, Fachbereich Pharmazie, Halle, 1997.
 135. Schargel L., Yu B. C., Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 3 ed. APPETN & LANGE, 1993.
 136. Neubert R., Wohlrab W., Marsch., Dermatopharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2002.
 137. Neubert R. & Wohlrab W., In vitro methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations. J. Pharm. Technol. 1990, 36: 197- 206.
 138. Beyer C., Spreitung von Salben am Modell, 1. Mitt. Arch Pharm. 1977, 310: 473-481.
 139. Beyer C., Spreitung von Salben am Modell, 2. Mitt. Arch Pharm. 1977, 310: 729-737.
 140. Knorst M. T., Neubert R. & Wohlrab W., Release of Urea from Semisolid Formulations Using a Multilayer Membrane System. Drug development and Industrial Pharmacy 1997, 23: 259-263.
 141. Huth S, Neubert R., Blotze L. & Bürge A., Experimental Determination and Mathematical Modelling of Propylene Glycol Transport from semisolid vehicles. Chem. Pharm. Bull. 1996, 44: 1263-1266.

-
142. Huth S., Blotze L., Neubert R., Mathematical assessment of different penetration mechanisms from vehicles with propylene glycol. *Journal of controlled Release* 1997, 49: 141-148.
 143. Heinzel G., Woloszczak R., & Thomann P., TOPFIT 2.0 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis for the PC, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1993.
 144. Deutscher Arzneimittel Codex (DAC), Govi-Verlag, Frankfurt (Eschborn), 2000.
 145. Attwood D., Microemulsions. (in): Kreuter J., Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc. New York•Basel•Hong Kong 1994.
 146. Lnagevin D., Microemulsion Interfacial aspects. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1991 34: 583-595.
 147. Mitchell D. J. & Niham B., Micelles, vesicles and microemulsions. *J. chem. Soc. Faraday Trans* 1981, 77: 601-629.
 148. Tanford C., Micelles: The Hydrophobic effect: Formulation of Micelles and Biological Membranes. John Wiley, New York 1980: 42.
 149. De Gennes P. G., Taupin C., Microemulsion and flexibility of oil/water interfaces *Sci.* 1982, 86: 2294-2304.
 150. Auvray, L., Cotton, J. P., Ober, R., & Taubin, C., Evidence of zero mean curvature microemulsions. *J. Phys. Chem.* 1984, 88: 4586-4589.
 151. Neubert R., Schmalfuß U., Huschka C., Wohlrab W. A., Neuer Entwicklung auf dem Gebiet der Dermalen Wirkstoffapplikation. *Pharm. Ind.* 1998, 60: 149-156.
 152. Kawakami K., Yoshikawa T., Hayashi T., Nishihara Y., Masuda K., Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. II. In vivo study. *J. Control Release* 2002, 81: 75-82.
 153. Park K., M., Kim C. K., Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. *Int. J. Pharm.* 1999, 181: 173-179.
 154. Kim J. Y., Ku Y. S., Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats. *Int. J. Pharm.* 2000, 194: 81-89.
 155. Malcolmson C., Satra C., Kantaria S., Sidhu A., Lawrence M. J., Effect of oil on the level of solubilization of testosterone propionate into nonionic oil-in-water microemulsions. *J. Pharm. Sci.* 1998, 87: 109-116.
 156. Kemken J., Ziegler A., Muller B. W., Pharmacodynamic effects of transdermal bupranolol and timolol in vivo: comparison of microemulsions and matrix patches as vehicle. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 1991, 13: 361-365.

-
157. Kemken J., Ziegler A., Muller B. W., Influence of supersaturation on the pharmacodynamic effect of bupranolol after dermal administration using microemulsions as vehicle. *Pharm. Res.* 1992, 9: 554-558.
 158. Müller R. H., Hildebrand G. E., *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen.* 2 Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1998.
 159. Kreilgaard M., Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vivo microdialysis. *Pharm. Res.* 2001, 18: 367-373.
 160. Kreilgaard M., Kemme M. J., Burggraaf J., Schoemaker R. C., Cohen A. F. Influence of a microemulsion vehicle on cutaneous bioequivalence of a lipophilic model drug assessed by microdialysis and pharmacodynamics. *Pharm. Res.* 2001, 18: 593-599.
 161. Gasco M. R., Gallarate M., and Pattarino F., In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. *Int. J. of Pharm.* 1991, 69: 193-196.
 162. Boltri L., Morel S., Trotta M., Gasco M. R. In vitro transdermal permeation of nifedipine from thickened microemulsions. *J. Pharm. Belg.* 1994, 49: 315-320.
 163. Aboofazeli R., Barlow D. J., Lawrence M. J., Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions I. Total intensity light scattering. *AAPS PharmSci* 2000, 2(2): E13.
 164. Constantinides P. P., Welzel G., Ellens H., Smith P. L., Sturgis S., Yiv S. H., Owen A. B., Water-in-oil microemulsions containing medium-chain fatty acids/salts: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation. *Pharm. Res.* 1996, 13: 210-215.
 165. Brime B., Moreno M. A., Frutos G., Ballesteros M. P., Frutos P., Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: Formulation and toxicity evaluation *J. Pharm. Sci.* 2002, 91: 1178-1185.
 166. Biais J., Clin B. & Lalanne P., Phase diagrams and pseudophase assumption. (in) Friberg S. E., Bothorel P., *Microemulsions: structure and dynamics.* CRC press, florida 1987.
 167. Warisnoicharoen W., Lansley A. B., Lawrence M. J., Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. *Int. J. Pharm.* 2000, 198: 7-27.
 168. Reynoolds J. E. F., Parfitt K., Parsons A. V., Sweltman S. C., (Hrsg.): *Martindale. The extra pharmacopoeia.* Thirty-first Editions. The Royal Pharmaceutical Society, London 1996.
 169. *Deutsches Arzneibuch (DAB) Amtliche Ausgabe.* Govi-Verlag, Stuttgart, 1996.

-
170. Fiedler H. P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete 4. Auflage, Editio Cantor-Verlag, Aulendorf 1996.
 171. Brezesinnki G., Mögel H. J., Grenzflächen und Kolloide. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 1993.
 172. Aboofazeli R., Barlow D., Lawrence M. J., Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. *AAPS Pharm. Sci.* 2000, 2: E19.
 173. Warisnoicharoen W., Lansley A. B., Lawrence M. J., Light scattering investigations on dilute nonionic oil-in-water microemulsions. *AAPS Pharm. Sci.* 2000, 2: E12.
 174. Bellocq A. M. & Roux D., Phase Diagram and critical Behaviour of quarternary Microemulsion System. (in) Structure and Dynamics. Freiberg S. E., Bothorel P., CRC press, Inc Florida 1967.
 175. Griffiths R. D. & Wheeler J. C., Critical points in multicomponent systems. *Phys. Rev. A* 1970, 2, 1047-1055.
 176. Attwood D., Mallon C., Ktistis G. & Tayler C. J., A study on factors influencing the droplet size in nonionic oil-in-water microemulsions. *Int. J. Pharm.* 1992, 88: 417-422.
 177. John A. C., Uchiyama H., Nakamura K., Kunieda H., Phase Behaviour of a Water/Nonionic Surfactant/Oil Ternary System in the Presence of Polymer Oil. *J Colloid Interface Sci* 1997, 186: 294-299.
 178. Friberg S. E., Bothorel P., Microemulsions: Structure and Dynamics. CRC press, Florida 1987.
 179. Trotta M., Gasco M. R. & Morel S., Release of Drugs from Oil-Water Microemulsios. *J Controlled Release* 1989, 10: 237-243.
 180. Trotta M., Morel S., Gasco M. R., Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from o/w microemulsions. *Pharmazie* 1997, 52: 50-53.
 181. Trotta M., Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. *J Control Release* 1999, 60: 399-405.
 182. Moreno M., Frutos P., Ballesteros M. P., Lastres J. L., Castro D., Release of nortriptyline hydrochloride from oil-water microemulsions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000, 48: 1623-1627.
 183. Kennedy A. R., Symons M. C., Water structure 'versus' radical scavenger theories as explanations for the suppressive effects of DMSO and related compounds on radiation-induced transformation in vitro. *Carcinogenesis* 1987, 8: 683-688.

-
184. Brockmeier D., In vitro/ in vivo correlation of dissolution using moments of dissolution and transit times, *Act. Pharm. Technol.* 1986, 32: 164-173.
 185. Jelinek A., In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose. Dissertation, Pharmazie, Martin Luther Universität, Halle 2001.
 186. Constantinides P. P., Yiv S. H., Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. *Int. J. Pharm.* 1995, 115: 225-234.
 187. Müller B. W., Müller R. H., Particle size distributions and particle size alterations in microemulsions. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73: 919-922.
 188. Evans R. M., Attwood D., Chatham S. M., Farr S. J., The effect of solubilized water on the size and shape of lecithin micelles in an a polar solvent. *J. Pharm. Pharmacol.* 1990, 42: 601-605.
 189. Shukla A., Janich M., Krause A., Kiselev M. A., Neubert R., Investigation of pharmaceutical O/W microemulsions by small angle scattering. *Pharm. Res.* In presse. 2002.
 190. Kreuter J., Colloidal drug delivery systems, J. Marcel Deker, INC. New York V. 66, 1994.
 191. Funk W., Dammann V., Vonderheid C & Oehlmann G., Statistische Methoden in der Wasseranalytik. Verlagsgesellschaft, Weinheim 1985.

Danksagung

Zum Schluss dieser Arbeit möchte ich dankende Worte an alle, die mich bei der Anfertigung der Arbeit unterstützten, richten.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Betreuer und wissenschaftlichen Lehrer **Prof. Dr. Neubert** für die Überlassung des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft, zahlreiche Anregungen, seine Unterstützung und die mir gewährte Freiheit bei der Bearbeitung der Problematik. Weiterhin möchte ich mich bei **Dr. Mrestani** sehr herzlich für die tatkräftige Hilfe bei den CZE-Messungen sowie für die Beratung und Unterstützung bei der Realisierung der Arbeit bedanken.

Für die Aufnahme von IR- und Raman-Spektren sowie die Beratung und Unterstützung bei ihrer Auswertung bedanke ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Wartewig**. Bei Herrn Dr. Dieter Stroehl bedanke ich mich sehr für die Durchführung von ^1H - und ^{13}C -NMR-Messungen. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Günter Hempel für die ^{13}C -NMR-Festkörper-Messungen, Herrn Dr. Klaus Schröter für die Viskositätsmessungen und Herrn Anuj Shukla für die Messungen der dynamischen Lichtstreuung. Bei den Mitarbeitern der Hautklinik möchte ich mich für die Bereitstellung der Hyaluronsäure bedanken. Allen Mitarbeitern des Fachbereiches Pharmazie, insbesondere der Abteilung pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, die durch Hilfsbereitschaft und in einer freundschaftlichen Atmosphäre einen Anteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, sei herzlich gedankt. Schließlich möchte ich dem syrischen Gesundheitsministerium für das Stipendium und der Martin-Luther-Universität für die Ermöglichung der Promotion danken.

Lebenslauf

Name:	AlYoussef Alkrad
Vorname:	Jamal
Ort- und Geburtsdatum:	Deraa, 14.01.74
Staatsangehörigkeit:	Syrisch
Geschlecht:	Männlich
Familienstand:	ledig

Ausbildung:

1980-1986	Elementarschule (Deraa in Syrien)
1986-1989	Vorbereitungsschule (Deraa in Syrien)
1089-1992	Sekundärschule (Deraa in Syrien)
1992:	Abitur (Deraa in Syrien)
1992-1997	Pharmaziestudium, Fachbereich Pharmazie Damaskus-Universität, Syrien
10.1997-08.1999	Apotheker in Deraa, Syrien
04.10.1999-bis jetzt:	Doktorand, Fachbereich Pharmazie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg