

Herstellung und Charakterisierung betulinhaltiger Zubereitungen für berührungsempfindliche Haut

Dissertation

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

vorgelegt von
Christoph Rott
aus Nagold

Tübingen
2016

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

Tag der mündlichen Qualifikation:	14.07.2016
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf Daniels
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Wahl

*Die kürzesten Wörter, nämlich ja und nein,
erfordern das meiste Nachdenken.
—Pythagoras von Samos*

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Tagungsbeiträge veröffentlicht:

Rott, Christoph & Daniels, Rolf, Optimization of Foam Formulations Containing Birch Bark Dry Extract. *8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Technology*, Istanbul (2012).

Rott, Christoph & Daniels, Rolf, Reducing Particle and Droplet Size of Aqueous Suspensions and Oil-in-Water Emulsions Containing Birch Bark Dry Extract. *DPhG Annual Conference*, Freiburg (2013).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Allgemeiner Teil	3
2.1 Physiologie der Haut und Wundheilung	3
2.1.1 Aufbau der Haut	3
2.1.2 Wundheilung	4
2.1.3 Betulin in der Wundheilung	6
2.2 Birkenkorktrockenextrakt als Hilfsstoff	6
2.2.1 Pentazyklische Triterpene aus der Birkenrinde	6
2.2.2 Oleogelbildung und Emulsionsstruktur	7
2.3 Physiko-chemische Grundlagen	8
2.3.1 Emulsionen	8
2.3.2 Schäume aus feststoffstabilisierten O/W-Emulsionen	11
2.3.3 Benetzungswinkel	12
2.3.4 Tropfenprofilanalyse	12
2.3.5 Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)	13
3 Material	16
3.1 Chemikalien und Substanzen	16
3.1.1 Triterpentrockenextrakt	16
3.1.2 Verwendete Chemikalien und Substanzen	18
3.2 Verbrauchsmaterial	19
3.3 Geräte	21

4 Methoden	24
4.1 Physikochemische Methoden	24
4.1.1 Dichtebestimmung von Flüssigkeiten	24
4.1.2 Wirkstofffreisetzung	24
4.1.3 HPLC-Analytik	25
4.1.4 Konfokale Raman-Mikroskopie	26
4.1.5 Kontaktwinkelmessungen	27
4.1.6 Lichtmikroskopie	27
4.1.7 Profilanalysetensiometrie (PAT)	28
4.2 Charakterisierung der Zubereitungen	31
4.2.1 Partikelgrößen- und Tröpfchengrößenverteilung	31
4.2.2 Zetapotentialmessung	31
4.2.3 Schaumcharakterisierung	33
4.3 Herstellung der Zubereitungen	36
4.3.1 TE-Suspensionen	36
4.3.2 Emulsionen	38
4.3.3 Schäume	39
4.3.4 Oleogele	39
4.3.5 Submikronemulsionen	39
4.3.6 Schäume aus Submikronemulsionen	40
4.4 Versuchsdesigns zur Bestimmung der Einflüsse auf die Schaumqualität	40
5 Ergebnisse und Diskussion	42
5.1 Überblick der Vorgehensweise	42
5.2 Partikelgrößenverteilungen in TE-Suspensionen	44
5.3 Vergleich der Methoden zur Schaumdichtebestimmung	50
5.4 Vergleich unterschiedlicher Gelbildner zur Emulsionsstabilisierung	51
5.5 Einfluss des Treibgasdrucks und der Ölphase auf die Schaumgüte	55
5.6 Versuchsdesigns zur Bestimmung der Einflüsse auf die Schaumqualität	56
5.6.1 Paraffin als Ölphase	57
5.6.2 Sonnenblumenöl als Ölphase	63
5.7 Zetapotentiale	69

5.8	pH-Abhängigkeit der Benetzungswinkel	70
5.9	TE-haltige Submikronemulsionen	72
5.9.1	Lipidmatrix für Submikronemulsionen	72
5.9.2	Untersuchung von TE-haltigen Submikronemulsionen	75
5.9.3	Aufschäumbarkeit von TE-haltigen Submikronemulsionen	76
5.9.4	Grenzflächenrheologische Eigenschaften des TE in Kombination mit Phospholipiden	78
5.10	Freisetzungsuntersuchungen mit Franz-Diffusionszellen	82
5.10.1	Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten und Auswahl der Akzeptor- medien	82
5.10.2	Freisetzungen	84
6	Abschlussdiskussion	88
6.1	Eigenschaften wässriger TE-Dispersionen	88
6.1.1	Vorbereitung des TE	88
6.1.2	Trockene Vermahlung	88
6.1.3	Benetzungseigenschaften des TE	89
6.1.4	Eignung verschiedener Mahlverfahren zur TE-Suspensionsherstellung	90
6.2	Untersuchung TE-haltiger Emulsionen und Schäume	92
6.2.1	Stabilisatoren für TE-haltige Emulsionen und Schäume	92
6.2.2	Geeignete Ölphasen für TE-haltige Schäume	93
6.2.3	Einflüsse auf Schaumqualität	93
6.2.4	TE-haltige Submikronemulsionen mit Phospholipidanteil	94
6.3	Betulin-Freisetzung aus den Zubereitungen	95
7	Zusammenfassung	98
	Abbildungsverzeichnis	100
	Tabellenverzeichnis	104
	Literaturverzeichnis	105

Besondere Hinweise

Die Fehlerbalken in den Diagrammen geben die Stichprobenstandardabweichung in positiver und negativer Richtung um den Stichprobenmittelwert an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

1 Einleitung und Zielsetzung

Kleinere Verletzungen der Haut gehören zu unser aller täglichem Leben. Zur Ausheilung dieser Wunden ist unser Körper in den meisten Fällen auch sehr gut alleine befähigt (MARTIN, 1997), aber zahlreiche Faktoren beeinflussen diesen Vorgang (GUO & DIPIETRO, 2010). Oft ist es daher sinnvoll Zubereitungen zur Wundreinigung und beschleunigten Heilung auf die verletzte Haut aufzutragen und dementsprechend groß sind Nachfrage und Marktangebot für derartige Präparate, sowohl im Arzneimittel- als auch im Medizinproduktebereich.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Zubereitungen, die einen Birkenkork-Triterpenextrakt (TE) mit dem Hauptbestandteil Betulin als Wirksubstanz beinhalten (LASZCZYK, 2007). Oleogele aus derartigen Extrakten wurden schon erfolgreich zur verbesserten Heilung von Problemwunden eingesetzt, was in klinischen Studien im Rahmen ihrer Zulassung gezeigt werden konnte (MÜLLER-DEBUS, 2011). Darüber hinaus profitieren weitere Hautkrankheiten von einer Behandlung mit diesen Oleogelen (oder auch mit daraus hergestellten W/O-Emulsionen), wie z.B. aktinische Keratose (HUYKE ET AL., 2009), Herpes Zoster (WECKESSER ET AL., 2010) oder strahlen- und chemotherapieinduzierte Hautschädigungen (DISTELRATH ET AL., 2010).

Eine einzigartige Eigenschaft des TE besteht darin, in Oleogelen und W/O-Emulsionen eine Doppelfunktion als Wirkstoff, sowie als Stabilisationshilfsstoff auszuüben. Dadurch kann teilweise auf eine Zugabe von weiteren galenischen Hilfsstoffen verzichtet werden, bzw. sind hiervon sehr viel weniger nötig, was für Allergiker und empfindliche Haut ein wichtiger Vorteil ist.

Während die Wirksamkeit der TE-Oleogele für die topische Wundversorgung sehr positiv

ist, ist diese galenische Formulierung für diesen Einsatzzweck nicht optimal. Ein Problem ist der mechanische Stress, der zwangsläufig z.B. beim Auftragen einer viskosen Zubereitung auftritt und leicht eine frisch gebildete Zellschicht beschädigen kann, was die Wundheilung dann massiv behindert.

Ziel dieser Arbeit war es nun eine Formulierung zu entwickeln, die nach Möglichkeit die positiven Wundheilungseigenschaften der Oleogele aufweist und sich gleichzeitig leicht und irritationsarm auftragen lässt. Hierfür wurden Schaumformulierungen ausgewählt, da sie besonders angenehm in der Anwendung sind und vom Patienten gut angenommen werden (HOUSMAN ET AL., 2002). Es ist möglich einen Schaum direkt auf die Wunde aufzusprühen oder ihn aus der Hand mit sehr geringen Scherkräften aufzutragen.

Um dieses Ziel zu erreichen wurden unterschiedlichste Formulierungskonzepte entworfen, untersucht, bewertet und optimiert. Durch Kooperation mit anderen Forschungsgruppen, die die Wundheilungswirkung in ex-vivo-Modellen untersuchten, waren statistische Optimierung und praxisrelevante Veränderungen des Formulierungskonzepts möglich, die über die galenische Sichtweise hinaus gingen. Untersuchungen zum Stabilisierungsmechanismus und Freisetzungverhalten der Zubereitungen wurden außerdem durchgeführt.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Physiologie der Haut und Wundheilung

2.1.1 Aufbau der Haut

Die menschliche Haut hat primär eine Barrierefunktion, um unseren Organismus von der Außenwelt zu trennen und zu schützen. Weiterhin hat sie wichtige physiologische Funktionen bei Temperaturregulation und Wasserhaushalt und ist als größtes menschliches Sinne- und Kommunikationsorgan zusätzlich an der Immunantwort beteiligt (FALLER & SCHÜNKE, 2008).

Anatomisch kann man die Haut (*Cutis*) grob in Oberhaut (*Epidermis*), Lederhaut (*Dermis*) und Unterhaut (*Subcutis*) einteilen (siehe Abb. 2.1), wobei die Epidermis für die Barrierefunktion maßgeblich ist.

Die äußerste Schicht der Epidermis wird von dem *Stratum corneum* (Hornzellschicht) gebildet, welches einen Schutz vor Xenobiotika aller Art, wie Erregern und Chemikalien, weiterhin vor mechanischer Belastung, aber auch vor transepidermalem Wasserverlust (engl. "transepidermal water loss" oder TEWL) bietet (MADISON, 2003). Es besteht aus flachen, abgestorbenen, proteinreichen Zellen, den Corneozyten, die miteinander dicht über Corneodesmosomen verbunden sind und in eine lipophile interzelluläre Matrix eingebettet sind (PROKSCH ET AL., 2008).

Die proximal nächste Schicht stellt das *Stratum lucidum* (Glanzzellschicht) dar, welches

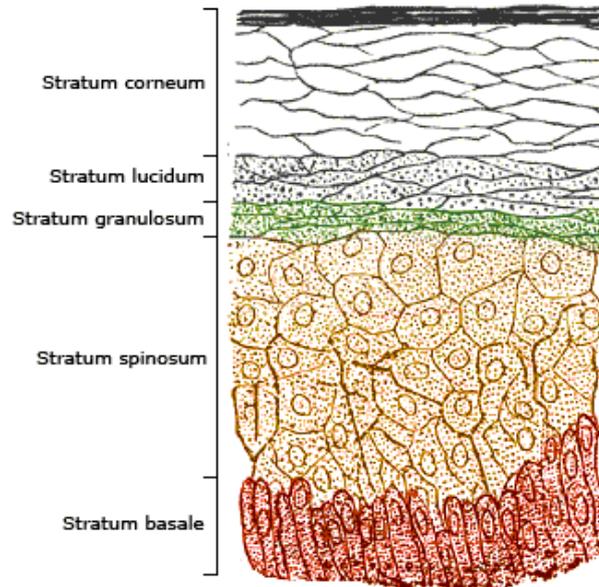


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau der Haut. Gemeinfreie Abbildung modifiziert nach Gray (GRAY, 1918).

nur in der Leistenhaut der Handflächen und Fußsohlen ausgeprägt ist. Darauf folgen *Stratum granulosum* (Körnerzellenschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und *Stratum basale* (Basalschicht).

Die Zellteilung findet in der Epidermis ausschließlich im *Stratum basale* (Basalzellschicht) statt, von wo aus die Zellen langsam nach außen geschoben werden und sich dabei zu Keratinozyten und später Corneozyten (im *Stratum corneum*) differenzieren und schließlich als Hautschuppen abgestoßen werden. So erneuert sich die Epidermis in einem ständigen fortlaufenden Prozess, so dass für eine vollständige Erneuerung etwa 27 Tage nötig sind (EPSTEIN & MAIBACH, 1965).

2.1.2 Wundheilung

Die Behandlung von Wunden hat sich im Laufe der Zeit und wachsendem Verständnis der Zusammenhänge dramatisch verändert (FORREST, 1982). Im Altertum beherrschten, neben aus heutiger Sicht lebensgefährlich anmutenden Wundauflagen, wie rohem Fleisch oder Tierfaeces, auch pflanzliche Zubereitungen, z.B. aus Johanniskraut (*Hypericum per-*

foratum) oder Frauenmantel (*Alchemilla vulgaris*) die Therapie (MAJNO, 1991).

Heutzutage sind die komplexen Zusammenhänge der Wundheilung viel besser bekannt und man kann gezielte Effekte auf die einzelnen Wundheilungsphasen *ex vivo* testen und danach zur Anwendung bringen (GILLITZER & GOEBELER, 2001; BOATENG ET AL., 2008).

Die Wundheilung wird klassischerweise in drei Phasen eingeteilt:

- Reinigungsphase (Exsudation, Inflammation und Resorption)
- Granulationsphase (Proliferation)
- Differenzierungsphase (Reepithelisierung, Narbenbildung)

Nach der Verletzung kommt es initial zu einer lokalen Vasokonstriktion (in den ersten fünf bis zehn Minuten) und anschließender Anlagerung von Blutplättchen und Aktivierung der Blutgerinnungskaskade, mit dem Ziel die Blutung zu stoppen und eine vorläufige Barriere auszubilden. Weiterhin werden Botenstoffe freigesetzt, darunter Prostaglandine, "platelet-derived growth factor" (PDGF), "epidermal growth factor" (EGF), "insulin-like growth factor" (IGF-1), "transforming growth factor- β " (TGF- β) und "fibroblast growth factor" (FGF), die weitere Zellen aktivieren und die Inflammationsphase einläuten. Nach der initialen Vasokonstriktion findet nun eine Vasodilatation statt, die auch durch die Histaminfreisetzung der Mastzellen hervorgerufen wird, und angelockten Immunzellen durch bessere Durchblutung die Beseitigung eingedrungener Erreger erleichtert (SINGER & CLARK, 1999; STADELMANN ET AL., 1998; WILLENBORG & EMING, 2014).

Schon nach wenigen Stunden beginnt die Granulationsphase. Die abgestorbene Zellmatrix wird abgebaut, während sich gleichzeitig benachbarte Epidermiszellen zu teilen beginnen. Hierbei lösen sich die Hemidesmosomen der Zellen, so dass sie lateral beweglich sind. Diese Zellen migrieren aktiv an die Grenze des abgestorbenen Schorfs und trennen diesen von den gesunden Zellen.

Nach ein bis zwei Tagen findet die Reepithelisierung vom Wundrand beginnend statt, wobei die Epithelzellen auf den vorher aktiv migrierten Zellen wandern. Etwa vier Tage nach Verwundung beginnt Granulationsgewebe die Wundhöhle auszufüllen. Gleichzeitig

wandern Makrophagen, Fibroblasten und Blutgefäße ein. Schließlich entsteht ein Fibrinreiches Narbengewebe und die Wunde zieht sich zusammen.

2.1.3 Betulin in der Wundheilung

Laut neueren Studien wirkt sich ein Oleogel aus pflanzlichem Öl und einem betulinreichen Triterpentrockenextrakt aus Birkenkork positiv auf die Regeneration schlecht heilender Wunden und Verbrennungswunden (HUYKE & SCHEMPP, 2005) aus. Weiterhin wurden diese Oleogele und daraus hergestellte W/O-Emulsionen, erfolgreich bei z.B. Neurodermitis, Aktinischer Keratose (HUYKE ET AL., 2009), in der Nachbehandlung von chirurgischen Eingriffen (MÜLLER-DEBUS, 2011), sowie zur kosmetischen Verbesserung des Wundbildes eingesetzt (METELMANN ET AL., 2012; LASZCZYK ET AL., 2009).

Mechanistische Untersuchungen mit in vitro “scratch assays” an primären humanen Keratinozyten und im porcinen ex vivo Wundmodell (BRANDNER ET AL., 2006) lassen auf einen positiven Wundheilungseinfluss des TE schließen. Es zeigt sich eine vorübergehend gesteigerte Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die die Wundheilung in Gang setzen können, außerdem eine Steigerung der Migration von Keratinozyten, die zum Schließen der Wunde beitragen (EBELING ET AL., 2014).

2.2 Birkenkorktrockenextrakt als Hilfsstoff

2.2.1 Pentazyklische Triterpene aus der Birkenrinde

Der weiße Kork der Birke (*Betula spec.*) enthält bis zu 40 % Triterpene. Diese Sekundärmetabolite bieten dem Baum Schutz vor UV-Licht durch Reflexion, Frostschutz durch den mehrschichtigen Aufbau, sowie Wasserresistenz durch den hydrophoben Charakter. Von den Triterpenen bildet Betulin mit ca. 34 % den größten Anteil (KRASUTSKY, 2006; O’CONNELL ET AL., 1988; HABİYAREMYE ET AL., 2002).

Diese Triterpene des Birkenkorks lassen sich in zwei Stoffgruppen einteilen: Verbindungen des Oleanangrundgerüsts und Verbindungen des Lupangrundgerüsts. Abbildung 2.2 zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung. Zu den bekannten, enthaltenen Triter-

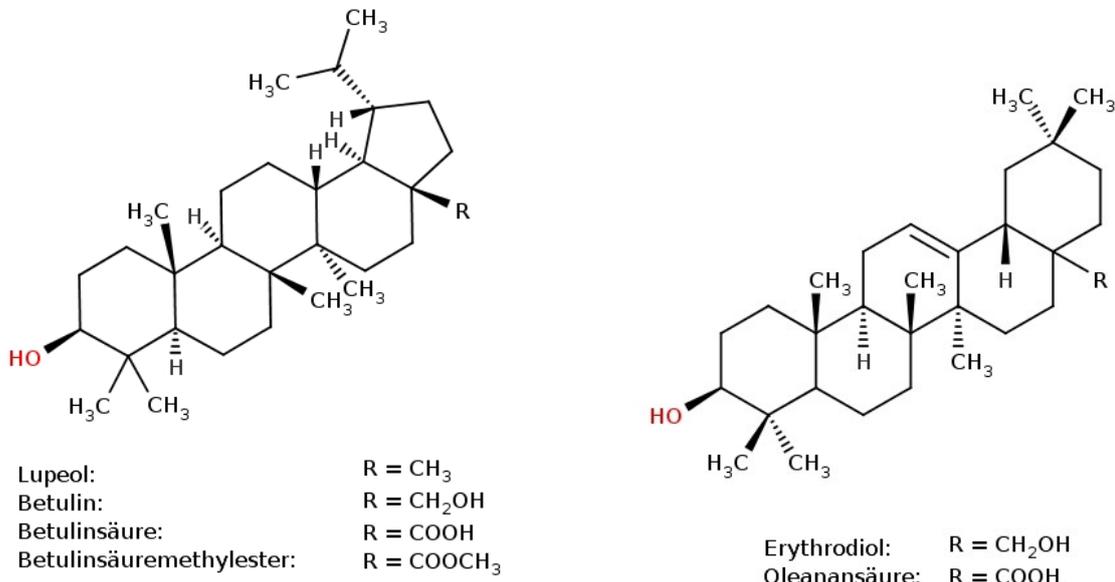


Abbildung 2.2: Strukturformeln der Triterpenbestandteile des TE.

penen des Lupan-Typs zählen Betulin, Lupeol, Betulinsäure und Betulinsäuremethylester, während vom Oleanan-Typ Erythrodiol und Oleanansäure vorhanden sind (LASZCZYK, 2007). Bei den nicht weiter definierten Anteilen des TE handelt es sich wahrscheinlich um weitere Triterpenoide, worauf es auch Hinweise in der Literatur gibt (RIMPLER ET AL., 1966; EKMAN, 1983).

2.2.2 Oleogelbildung und Emulsionsstruktur

Ab einer gewissen Konzentration bildet TE mit lipophilen Phasen (z.B. pflanzliche Lipide wie Jojobaöl oder Sonnenblumenöl) ein Oleogel aus. Dabei bildet sich eine Netzwerkstruktur der Partikel aus, welche die Öle immobilisiert (LASZCZYK ET AL., 2006). Durch GRYSKO & DANIELS (2013) wurde der Gelbildungsmechanismus genauer betrachtet und die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerks gefunden, welches durch Wasserstoffbrückenbindungen der oberflächlichen Carboxyl- und Hydroxylgruppen sta-

bilisiert wird. Die Struktur ist vergleichbar mit aggregierten Sphärokolloiden, wie sie etwa bei Gelen aus hochdisperssem Siliciumdioxid entstehen (KUTZ ET AL., 2010).

Die Gele weisen ein plastisches Fließverhalten auf und die Gelstärke nimmt mit höheren TE-Konzentrationen zu. Die Polarität des Dispersionsmittels spielt aufgrund des Gelbildungsmechanismus über Wasserstoffbrückenbindungen ebenfalls eine zentrale Rolle. Bei sehr polaren Dispersionsmitteln wie beispielsweise Rizinusöl überwiegen die Wechselwirkungen der Partikel zu den polaren Anteilen der Ölphase und es bildet sich erst bei sehr hohen Konzentrationen eine Gerüststruktur aus. Ist das Dispersionsmittel dagegen sehr unpolar (beispielsweise Paraffin), können die interpartikulärer Bindungen nur über kurze Strecken wirken und es bilden sich schwächere Gelstrukturen.

Weiterhin wurde mit steigender spezifischer Oberfläche des Extraktes eine anwachsende Gelstärke gefunden, was ebenfalls durch die größere Zahl der oberflächlichen OH-Bindungen erklärt werden kann (GRYSKO, 2011).

Ein interessanter Aspekt der vorgestellten TE-Oleogele ist, dass man ohne weitere Hilfsstoffzugabe eine Wasserphase einarbeiten kann, was zu lagerstabilen W/O-Emulsionen führt. Die Stabilisierung findet hierbei hauptsächlich über die Feststoffpartikel statt (siehe feststoffstabilisierte Emulsionen, 2.3.1). Die komplexe Mischung aus Triterpenen zeigt zwar auch eine gewisse Grenzflächenaktivität, jedoch ist dieser Effekt nicht primär für die Stabilisierung verantwortlich (GRYSKO, 2011).

2.3 Physiko-chemische Grundlagen

2.3.1 Emulsionen

Die International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) hat eine breite Definition des Emulsionsbegriffes etabliert. Sie definiert Emulsionen als Systeme, in denen Tropfen einer Flüssigkeit und/oder Flüssigkristalle fein verteilt in einer zweiten Flüssigkeit vorliegen (EVERETT, 1972).

Als thermodynamisch instabile disperse Systeme haben die Tropfen einer Emulsion stets das Bestreben zu koaleszieren und sich somit wieder zu trennen. Eine für die praktische Anwendung ausreichende kinetische Stabilität, lässt sich aber dennoch durch Zugabe verschiedener Stabilisatoren erreichen (ISRAELACHVILI, 1994).

Bei klassischen Emulsionssystemen kommen hierfür verschiedene Tenside als Emulgatoren zum Einsatz, die durch ihre Grenzflächenaktivität die Grenzflächenspannung weit genug Absenken können, um eine Koaleszenz für praktische Zwecke ausreichend zu vermindern (BINKS, 2002). Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung einer Emulsion stellt die Zugabe eines Gelbildners dar, der durch Viskositätserhöhung und Immobilisierung eine Koaleszenz verhindern kann - hier spricht man von Pseudo- bzw. Quasi-Emulgatoren.

Feststoffstabilisierte Emulsionen

Neben den klassischen Emulsionen, beschrieb S. U. Pickering (PICKERING, 1907) eine Form der Emulsionsstabilisierung durch Feststoffpartikel und prägte damit auch die Bezeichnung "Pickering-Emulsion" für derartige Systeme.

Die Stabilisierung findet hier nicht über eine Verringerung der Grenzflächenenergie statt, sondern durch Einlagerung der Partikel in die Grenzfläche. Es bildet sich so eine mechanische Barriere, die sehr effektiv eine Koaleszenz der Emulsionströpfchen verhindern kann.

Damit Feststoffe zur Stabilisierung in Emulsionen eingesetzt werden können, müssen sie gewisse Voraussetzungen erfüllen: So sollten beispielsweise beide Flüssigkeitsphasen die Partikel ähnlich gut benetzen, damit sie nicht vollständig in eine Phase abwandern können (BINKS & LUMSDON, 2000b). Liegt ein Gleichgewichtsbenetzungswinkel vor, der von 90° verschieden ist, dann wird eine der beiden möglichen Phasenlagen begünstigt. Anschaulich lässt sich das erklären, wenn man sich die Partikel als Kugeln vorstellt, die dicht gepackt in der Grenzfläche sitzen und unterschiedlich weit in die beiden nicht mischbaren Flüssigkeiten eintauchen. Es ergeben sich dabei entsprechende Krümmungen der Grenzfläche (siehe Abb. 2.3).

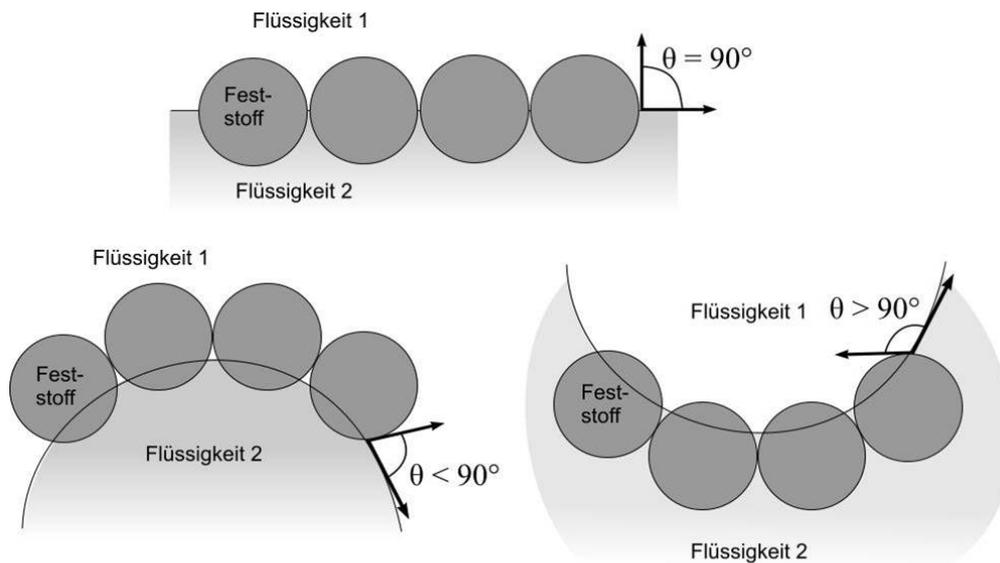


Abbildung 2.3: Darstellung der benetzungswinkelabhängigen Stabilisierung von Pickering-Emulsionen.

Durch chemische Modifikation lassen sich Partikel gestalten, die eine definierte hydrophobe Hälfte, sowie eine hydrophile Hälfte besitzen und je nach Geometrie und Größe der Partikel, gewisse Tröpfchengrößen und Phasenlagen bevorzugt stabilisieren können (WALTHER & MÜLLER, 2008). Diese Partikel sind treffend nach dem Gott Janus aus der römischen Mythologie benannt, der mit zwei entgegengesetzten Gesichtern dargestellt wird.

Abgesehen von den sehr homogenen Janus-Partikeln haben Pulver, die man zur Bereitung von Pickering-Emulsionen verwendet, üblicherweise keine diskrete Form und Größenverteilung. Dadurch wird der Stabilisierungsmechanismus deutlich komplizierter. Kleine Partikel können die Abstände zwischen den großen Partikeln in der Grenzfläche auffüllen und es ergibt sich ein Gleichgewichtsbenetzungswinkel, der zur Abschätzung des Stabilisierungsverhaltens dienen kann.

2.3.2 Schäume aus feststoffstabilisierten O/W-Emulsionen

Bringt man in feststoffstabilisierte O/W-Emulsionen ein öllösliches Treibgas ein, kann man aus diesen einen Schaum generieren. Abbildung 2.4 zeigt die schematischen Stadien des Aufschäumvorgangs einer feststoffstabilisierten Emulsion, die mit Treibgas versetzt wurde.

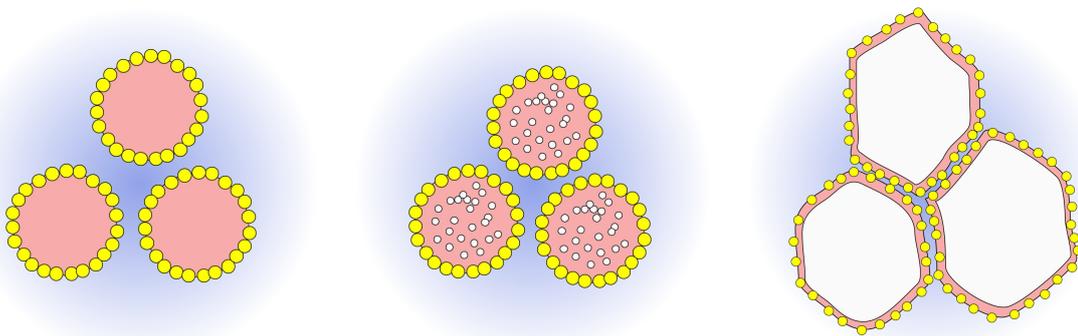


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Aufschäumvorgangs in O/W-Emulsionen

Anfangs liegt eine normale Pickering-Emulsion vor – die Feststoffpartikel befinden sich größtenteils an der Grenzfläche zwischen Öl und Wasser, während das Treibgas in der Ölphase homogen gelöst vorliegt. Beim Austritt aus der Düse und dem damit verbundenem Druckabfall, überschreitet das Treibgas die Löslichkeit in der Ölphase und es beginnen sich Gasblasen zu bilden. Diese vereinigen sich rasch und dehnen den Tropfen stark aus.

Sowohl die Ölphase, als auch die Feststoffpartikel und die wässrige Außenphase bilden die Lamellen des Schaums und können dort für eine Stabilisierung oder auch für ein schnelles Zerfallen des Schaumes sorgen. Welcher Vorgang statt findet, liegt in den physikalischen Eigenschaften des Feststoffs (unter anderem Partikelgröße und -form, Polarität, Benetzbarkeit) und weiterer vorhandener Hilfsstoffe begründet, und wie schnell die Stabilisierung eintreten kann (GONZENBACH ET AL., 2006).

2.3.3 Benetzungswinkel

Der Benetzungswinkel θ ist der Kontaktwinkel, den ein Tropfen einer Flüssigkeit auf einer Feststoffoberfläche ausbildet. Er ergibt sich aus dem Zusammenspiel der einzelnen Grenzflächenspannungen γ_{sl} (fest-flüssig), γ_{lg} (flüssig-gasförmig) und γ_{sg} (fest-gasförmig), welches durch die Young-Gleichung (Gleichung 2.1) beschrieben wird (YOUNG, 1805).

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{sg} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lg}} \quad (2.1)$$

θ : Kontaktwinkel [°]

γ_{sg} : Grenzflächenspannung fest-gasförmig [mN/m]

γ_{sl} : Grenzflächenspannung fest-flüssig [mN/m]

γ_{lg} : Grenzflächenspannung flüssig-gasförmig [mN/m]

Die Gleichung gilt, wenn es sich um eine perfekt plane Oberfläche des Feststoffes handelt und zwischen fortschreitendem Benetzungswinkel θ_A und rückschreitendem Benetzungswinkel θ_R keine Hysterese auftritt – sie somit unter Idealbedingungen identisch sind.

Für Pickering-Emulsionen und auch feststoffstabilisierte Schäume ist dieser Winkel von besonderer Bedeutung, da nur bei mittleren Benetzungswinkeln ein Teilchen an der Grenzfläche zwischen hydrophiler und lipophiler Phase immobilisiert werden kann (siehe auch 2.3.1) und zur Stabilisierung beitragen kann.

2.3.4 Tropfenprofilanalyse

Die Tropfenprofilanalyse stellt ein Verfahren zur indirekten Bestimmung von Grenzflächenspannungen und grenzflächenrheologischen Phänomenen zwischen zwei Flüssigkeiten dar. Der Methode liegt die Young-Laplace-Gleichung (Gleichung 2.2) zu Grunde, die die Krümmung und damit Form eines Tropfens in Bezug zur Grenzflächenspannung setzt.

$$\gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P_0 + \Delta \rho g h \quad (2.2)$$

γ :	Grenzflächenspannung [mN/m]
R_1, R_2 :	Hauptkrümmungsradien [m]
ΔP_0 :	Druckdifferenz zur Referenzebene [N/m ²]
g :	Erdbeschleunigung [m/s ²]
$\Delta \rho$:	Dichtedifferenz zwischen Tropfen und Außenphase [kg/m ³]
h :	vertikale Tropfenhöhe [m]

Hierbei wird ein Tropfen der Untersuchungsflüssigkeit in einer zweiten nicht mischbaren Flüssigkeit erzeugt und sein Seitenprofil von einer Kamera erfasst.

Je nachdem, ob der Tropfen eine niedrigere oder höhere Dichte als die äußere Phase besitzt, wird mit treibendem Tropfen ("buoyant drop") oder hängendem Tropfen ("pendant drop") und entsprechend angeordneter Kapillare gearbeitet (siehe Abb. 2.5). Nach Auf-

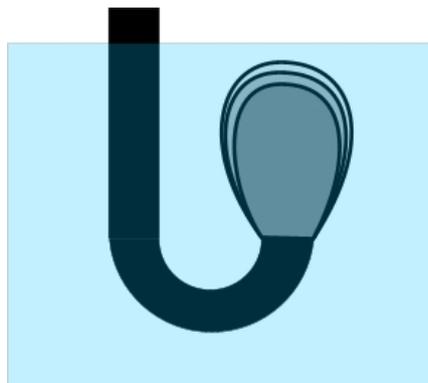


Abbildung 2.5: Skizze der Kapillare und des Tropfens für eine Messung nach "buoyant drop"-Methode.

nahme der Profile, kann über ein Fitting nach der Gleichung 2.2 eine Kurve an die Kontur angelegt werden und die Grenzflächenspannung daraus berechnet werden (MAKIEVSKI ET AL., 1997).

2.3.5 Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)

Die Hauptkomponentenanalyse (engl. "principal component analysis") ist ein Verfahren der multivariaten Statistik und dient der Auswertung und leichteren Darstellung von kom-

plexen Zusammenhängen und Einflüssen. Dies wird erreicht, indem man aus allen Datenpunkten durch Regression abstrakte “Hauptkomponenten” berechnet, die zueinander unabhängig sind und mit deren Hilfe man mit wenigen Komponenten einen möglichst großen Teil der Gesamtvarianz der Daten beschreiben kann.

Das Verfahren wurde von Pearson (PEARSON, 1901) entwickelt und ist seit Aufkommen der Rechenleistung moderner Computer von großer Bedeutung.

Ein kleines Beispiel soll das prinzipielle Vorgehen verdeutlichen. Man hat n Datenpunkte, mit je p Parametern und trägt diese in einem p -dimensionalen Hyperraum auf. Durch diese Punktwolke wird eine Regressionsgerade gelegt, die die erste Hauptkomponente darstellt. Als Regression wird hier ein “best fit”-Verfahren nach Pearson verwendet, welches die Fehlerquadrate des orthogonalen Abstands (euklidischer Abstand) minimiert, im Vergleich zur klassischen linearen Regression, bei der die Fehlerquadrate in einer Achsenrichtung minimiert werden (siehe Abb. 2.6).

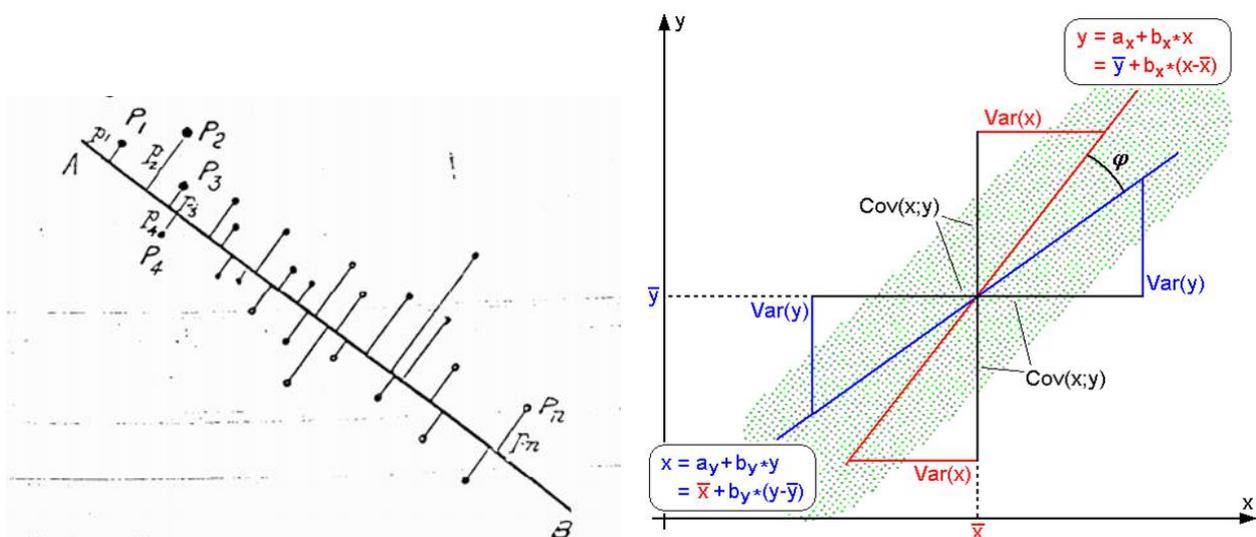


Abbildung 2.6: Vergleich zwischen “best fit”-Regression nach Pearson (PEARSON, 1901) und klassischer linearer Regression (QNIEMIEC, 2010).

Um die nächste Hauptkomponente zu erhalten, wird wieder eine Regression durch alle Punkte durchgeführt, wobei die neue Gerade orthogonal (und damit unabhängig) zur ersten Hauptkomponente sein muss. Das Verfahren kann fortgeführt werden, bis man

maximal p Hauptkomponenten erhalten hat.

Zur Durchführung der nächsten Transformation der Daten muss die Eigenwertmatrix aus den Daten berechnet werden. Ein Eigenvektor ist ein Vektor, dessen Richtung durch eine Multiplikation mit einer Matrix nicht verändert wird, sondern der dabei nur skaliert wird. Die Größe der Skalierung ist der dazugehörige Eigenwert. Eine berechnete Eigenwertmatrix ist in Abb. 5.18 im Ergebnisteil dargestellt. Jetzt können die Daten in einen neuen Unterraum transformiert werden, dessen Achsen die vorher bestimmten Hauptkomponenten darstellen (Hauptachsentransformation). Hierbei geht wenig Information verloren und korrelierende Daten werden zusammengefasst.

Je nachdem wieviele Hauptkomponenten für diese Transformation verwendet werden, kann man die Gesamtvarianz des Systems vollständig (bei p Hauptkomponenten) oder zu großen Teilen (bei weniger Hauptkomponenten) abdecken. In dieser Arbeit wird zur Betrachtung der Daten eine Transformation nur über die ersten beiden Hauptkomponenten durchgeführt. Dadurch kann man einen sehr großen Teil der Gesamtvarianz abdecken, hat aber die vielen Einflussparameter auf zwei (zugegebenermaßen abstrakte) Dimensionen reduziert. Die Vektoren vom Mittelpunkt der beiden neuen Achsen (Hauptkomponente 1 und Hauptkomponente 2) zu den Eigenwert-Datenpunkten geben wiederum Aufschluss über Korrelation dieser Parameter. Haben zwei Vektoren die gleiche Richtung, dann zeigen sie eine Korrelation, sind sie dagegen orthogonal, so sind sie unabhängig voneinander (siehe als Beispiel hierzu wieder Abb. 5.18).

Die einzelnen Hauptkomponenten an sich können nicht in jedem Fall anschaulich interpretiert werden. Parameter mit großer Streuung zeigen hier den größten Einfluss auf die Analyse und sind somit in den ersten Hauptkomponenten besonders stark vertreten, was aber bei der Suche nach starken Einflüssen nicht von Nachteil ist (ANTON, 2014).

3 Material

3.1 Chemikalien und Substanzen

3.1.1 Triterpentrockenextrakt

Die für diese Arbeit verwendeten Extrakte wurden aus der Rinde weißstämmiger Birkenarten (*Betula pendula*, *Betula pubescens*) gewonnen. Sie wurden von der Birken AG (DE-Niefen-Öschelbronn) zur Verfügung gestellt, wo sie unter Verwendung eines standardisierten Extraktionsprozesses (beschleunigte Lösemittlextraktion) mit n-Heptan als Lösemittel hergestellt wurden.

Mehrere Extraktchargen (TE1, TE2 und TE3) kommen zum Einsatz, die sich hauptsächlich im Lupeolgehalt unterscheiden, welcher durch veränderte Extraktionsbedingungen angereichert wurde (Siehe hierzu auch 2.2.1). Tabelle 3.1 und Abb. 3.1 zeigen die Triterpen-Zusammensetzungen der unterschiedlichen Chargen. Wenn nicht ausdrücklich erwähnt, dann wurden die Versuche mit TE1 als Standard-Extrakt durchgeführt.

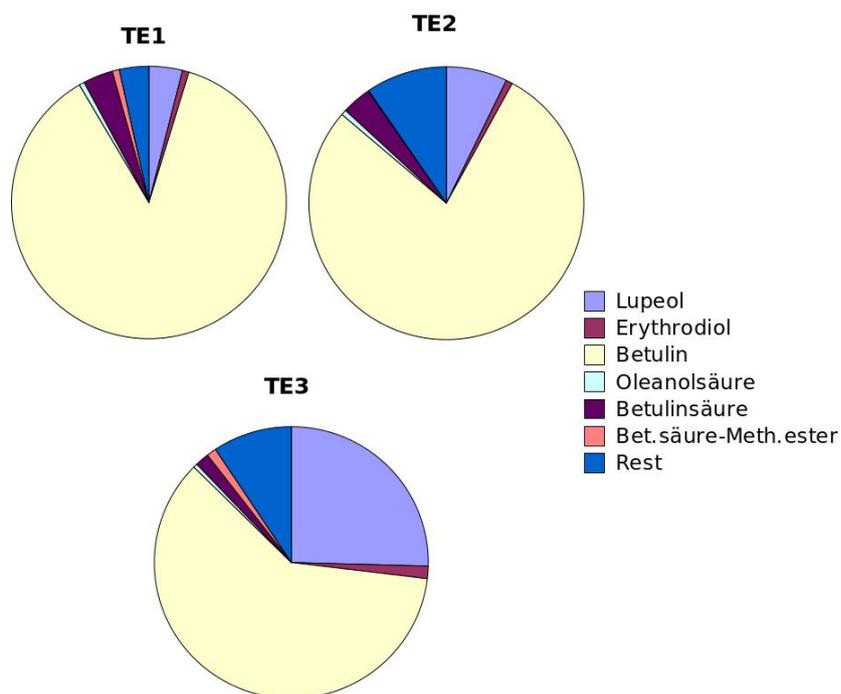


Abbildung 3.1: Graphische Darstellung der Triterpenverteilung, wie in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der unterschiedlichen Triterpenextrakte laut Gaschromatographischer Analyse der Birken AG.

	<i>TE1</i>	<i>TE2</i>	<i>TE3</i>
Lupeol	3,94%	7,18%	25,43%
Erythrodiol	0,77%	0,77%	1,47%
Betulin	86,85%	78,32%	60,50%
Oleanolsäure	0,62%	0,63%	0,48%
Betulinsäure	3,52%	3,46%	1,64%
Betulinsäuremethylester	0,83%	0,07%	1,14%
Rest	3,47%	9,57%	9,34%
Summe Triterpene	96,53%	90,43%	90,66%
Geliervermögen	<i>Mittel</i>	<i>Sehr gut</i>	<i>Sehr gut</i>

3.1.2 Verwendete Chemikalien und Substanzen

Die Tabellen 3.2 und 3.3 bieten eine Übersicht über alle verwendeten Chemikalien und Substanzen mit Hersteller- bzw. Lieferantenangaben und deren Firmensitz.

Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller, Firmensitz
Aceton	Sigma Aldrich, DE-Steinheim
Acetonitril HPLC grade	VWR International, DE-Darmstadt
Aktivkohle	Sigma Aldrich, DE-Steinheim
n-Butan-Treibgas 1,2 bar	ColepCCL, DE-Laupheim
Dinatriummonohydrogenphosphat	Caesar & Loretz, DE-Hilden
1,2-Ethandiol	Caesar & Loretz, DE-Hilden
Ethanol	Sigma Aldrich, DE-Steinheim
Haarmousse, Balea "Flex & Glossy"	dm-Drogerie, DE-Karlsruhe
HCl-Maßlösung (Titrisol)	Merck, DE-Darmstadt
2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin, Kleptose HPB oral grade	Roquette, FR-Lestrem
Jojobaöl	Birken AG, DE-Niefern-Öschelbronn
Mittelkettige Triglyceride	Sasol, ZA-Johannesburg
NaOH-Maßlösung (Titrisol)	Merck, DE-Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Caesar & Loretz, DE-Hilden
Paraffin, dickflüssig	Hansen & Rosenthal, DE-Hamburg
Paraffin, dünnflüssig	Hansen & Rosenthal, DE-Hamburg
Phosal 53 MCT	Lipoid, DE-Ludwigshafen

Tabelle 3.3: Weitere verwendete Chemikalien und Substanzen

Phospholipon 80	Lipoid, DE-Ludwigshafen
Phospholipon 80 H	Lipoid, DE-Ludwigshafen
Phospholipon 90 G	Lipoid, DE-Ludwigshafen
Phospholipon 90 H	Lipoid, DE-Ludwigshafen
Phospholipon LPC 20 H	Lipoid, DE-Ludwigshafen
Polyethylenglykol 300	Merck, DE-Darmstadt
Polyethylenglykol 600	Merck, DE-Darmstadt
Polysorbat 80	Croda, DE-Nettetal Kaldekirchen
Propan/Butan-Treibgasmischung 2,7 bar	ColepCCL, DE-Laupheim
Propan/Butan-Treibgasmischung 3,5 bar	ColepCCL, DE-Laupheim
Propan/Butan-Treibgasmischung 3,5 bar	Vema, DE-Neusäss
1,2-Propandiol	BASF, DE-Ludwigshafen
2-Propanol	Sigma Aldrich, DE-Steinheim
Rasierschaum, Balea "men Sensitive"	dm-Drogerie, DE-Karlsruhe
Rizinusöl	Caesar & Loretz, DE-Hilden
Sonnenblumenöl	Caesar & Loretz, DE-Hilden
Triterpentrockenextrakt	Birken AG, DE-Niefern-Öschelbronn

3.2 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 3.4 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller aufgeführt.

Tabelle 3.4: Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller, Firmensitz
Alufolie	Neotén, DE-Salzgitter
Aluminium-Aerosoldosen, 150 mL	
Celluloseacetat Filter 0,2 μm	Sartorius, DE-Göttingen
Celluloseacetat Filter 0,8 μm	Sartorius, DE-Göttingen
Einmalspritzen 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL und 30 mL	B. Braun, DE-Melsungen
Eppendorf ep TIPS 2 - 200 μL und 50 - 1000 μL	Eppendorf, DE-Hamburg
Glasobjektträger	VWR International, DE-Darmstadt
HPLC-Vials, 1,5 mL	Macherey-Nagel, DE-Düren
Immersol 518	Carl Zeiss, DE-Oberkochen
Kimtech Precision Wipes	Kimberly-Clark Professional, DE-Koblenz-Rheinhafen
High Vacuum Grease	Dow Corning, US-Midland
Loctite 401	Henkel, DE-Düsseldorf
Mikroskop-Deckgläser, 20 x 20 mm	VWR International, DE-Darmstadt
Mikroskop-Objektträger, 76 x 26 mm	VWR International, DE-Darmstadt
PTFE-Filter 25 mm, Porengröße 5 μm	Sartorius, DE-Göttingen
Papiertücher	Wepa, DE-Hillscheid
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, US-Chicago
Reaction Tubes, 2 mL, PP	Greiner Bio One, DE-Frickenhausen
Rundfilter, hydrophob, 90 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell, DE-Dassel
Sterican Kanülen 40 mm x 0,9 mm und 120 mm x 0,8 mm	B. Braun, DE-Melsungen

3.3 Geräte

Die Tabellen 3.5, 3.6 und 3.7 listen alle verwendeten Geräte und Instrumente auf. Jeweils angegeben sind die Gerätehersteller, sowie die genauen Typenbezeichnungen und Zubehörteile.

Tabelle 3.5: Verwendete Geräte und Instrumente

Gerät	Hersteller, Firmensitz	Typenbezeichnung/Zubehör
Zellstofftücher	Wepa, DE-Hillscheid	
Zentrifugenröhrchen PP 15 mL und 50 mL	VWR International, DE-Darmstadt	
Zetasizer-Küvetten Disposable capillary cell DTS1070 & DTS0012	Malvern Instruments, DE-Herrenberg	
Analysenwaage	Mettler-Toledo, DE-Gießen	Excellence Plus mit Drucker RS-P42
Analysenwaage	Sartorius, DE-Göttingen	CP2245
Dichtemessgerät	Anton Paar, DE-Ostfildern- Scharnhausen	DMA 4500
Franz-Diffusionszellen	Gauer Glas, DE-Püttlingen	12 mL Akzeptorvolumen 1,77 cm ² Öffnungsfläche, flacher Boden
Hochdruckhomogenisator	Avestin Europe, DE-Mannheim	EmulsiFlex-C3
Hochleistungsdispergierer	IKA-Werke, DE-Staufen	Ultra-Turrax T25
HPLC-Säule	Macherey-Nagel, DE-Düren	EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18, mit Vorsäule: EC 4/3

Tabelle 3.6: Weitere verwendete Geräte und Instrumente

HPLC-System	Shimadzu, DE-Duisburg	LC-20A Prominence Module: Entgaser DGK-20A5, Pumpe LC-20AT, Autosampler SIL-20A, Kommunikationsmodul CBM-20A, UV/Vis-Detektor SPC-20A, Säulen-Ofen CTO-10ASVP
Hydraulische Presse	Perkin-Elmer, DE-Überlingen	062566
Konduktometer	Knick, DE-Egelsbach	pH-Meter 761 Calimatic, 4-Polmesszelle ZU6985
Konfokales Raman-Mikroskop	WiTec, DE-Ulm	Alpha 300 R
Kugelmühle	W.E. Vetter, DE-Heidelberg	WM5 mit passender Keramikschale und -kugeln
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, DE-Oberkochen	Axio Imager Z1
Magnetrührer und Heizplatte	IKA-Werke, DE-Staufen	IKA Combimag RCT
Magnetrührstäbchen	VWR International, DE-Darmstadt	Stirring Bars Micro 10 x 0,3 mm
Mastersizer	Malvern Instrument, DE-Herrenberg	Mastersizer 2000 mit Nassdispergiereinheit Hydro 2000S
Muldestor	Wagner + Munz, DE-München	

Tabelle 3.7: Weitere verwendete Geräte und Instrumente

Multi-Magnetrührer	Variomag, US-Daytona Beach	Variomag Poly
pH-Meter	Mettler-Toledo, DE-Gießen	SevenEasy, Glaselektrode InLab 413
Präzisionswaage	Sartorius, DE-Göttingen	AX4202
Profilanalyse-Tensiometer	Sinterface, DE-Berlin	PAT-1
Rezepturwasserbad	Memmert, DE-Schwabach	900 W, 7 L
Thermostat	Julabo, DE-Seelbach	F25
Thermostat	Lauda, DE-Lauda-Königshofen	Alpha A
Trockenschrank	Heraeus, DE-Hanau	T5042
Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher, DE-Teltow	UP200S (Ultrasonic processor), Spitze S14
Wasseraufbereiter	Elga Berkefeld, DE-Celle	PureLab Option-Q
Zahnkolloidmühle	FrymaKoruma, DE-Neuenburg	MZ 50/R
Zentrifuge	Eppendorf, DE-Hamburg	MiniSpin
Zetasizer	Malvern Instruments, DE-Herrenberg	Zetasizer Nano-ZS mit Autotitrator MPT-2

4 Methoden

4.1 Physikochemische Methoden

4.1.1 Dichtebestimmung von Flüssigkeiten

Die Dichte der verwendeten Flüssigkeiten wurde mit einem DMA 4500 von Anton Paar bei 25 °C bestimmt. Das Gerät wird zu Beginn der Messungen mit Luft und Reinstwasser kalibriert. Dann wird die zu vermessende Flüssigkeit blasenfrei mit einer 10-mL-Einmalspritze in die saubere und trockene Messkapillare eingefüllt. Nach Start des Messprogramms wird die Flüssigkeit temperiert und dann vermessen. Es werden drei Wiederholungsmessungen durchgeführt.

4.1.2 Wirkstofffreisetzung

Franz-Diffusionszellen

Die Diffusionszellen nach Franz (Gauer Glas) werden dünn mit Silikon-Schliffett (Dow Corning) bestrichen und die PTFE-Filter (Sartorius) aufgebracht. Als Membran kommen PTFE-Filter mit einer Porengröße von 5 μm zum Einsatz. Anschließend werden die Zellen verschlossen, mit einer Klammer gesichert und je Zelle 12 mL temperierter Puffer, sowie ein Magnetrührstäbchen zugegeben. Als Puffer wird natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 nach Ph. Eur. 7 mit 10 prozentigem 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin-Zusatz

verwendet. Anschließend wird 1 g Zubereitung auf die Membran gegeben und die Franz-Zellen in ein auf 32 °C temperiertes Wasserbad mit Magnetrührfunktion gesetzt. Es ist darauf zu achten, dass der Flüssigkeitspegel im Temperierbad bis zur Höhe der Membran reicht. Der Probenzug erfolgt nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 16 h durch Entnahme von 0,5 mL Akzeptormedium mit einer Glasspritze und anschließender Volumenergänzung mit frischem Medium.

Sättigungslöslichkeit von Betulin in Akzeptormedien

Von jedem zu untersuchenden Medium werden 150 mL hergestellt und gleichmäßig auf drei 100-mL-Messkolben verteilt. In jeden Kolben wird 1 g TE zugegeben und über eine Woche mehrfach täglich für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt und geschüttelt. Nach einem weiteren Tag bei 22 °C werden Proben von 1 mL gezogen, abzentrifugiert (14500 UpM, 15 min) und der Überstand mit HPLC analysiert.

4.1.3 HPLC-Analytik

Die Bestimmung des Betulingehalts im Akzeptormedium der Freisetzungsuntersuchungen erfolgt über HPLC. Das System stammt von Shimadzu und besteht aus den Modulen Entgaser (DGK-20A5), Pumpe (LC-20AT), Autosampler (SIL-20A), Kommunikationsmodul (CBM-20A), UV/Vis-Detektor (SPC-20A), Säulen-Ofen (CTO-10ASVP) und der Software „LC-Solution 1.21 SP1“. Als Säule kommt eine Macherey-Nagel „EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18“ mit Vorsäule „EC 4/3“ zum Einsatz. Als Fließmittel wird ein 80:20 (V/V) Gemisch aus Acetonitril:Wasser verwendet, die Säule auf 40 °C temperiert und ein Volumenstrom von 1,5 mL pro Minute eingestellt. Das Probenvolumen beträgt 20 µL. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine Elution des Betulinpeaks bei ca. 5,3 min.

Kalibrierung der HPLC-Analytik

Zur Kalibrierung der Methode wurden TE-Konzentrationen von 0,2 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ und 50 $\mu\text{g/mL}$ hergestellt. Die 50 $\mu\text{g/mL}$ wurde direkt in 2-Propanol gelöst als Stammlösung hergestellt, die anderen Konzentrationen daraus durch Verdünnung mit 10 %igem Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin-Akzeptormedium hergestellt. Abb. 4.1 zeigt die erhaltene Kalibriergerade mit Regressionsgleichung und Bestimmtheitsmaß. Zur Bestimmung wurde die Peakfläche herangezogen.

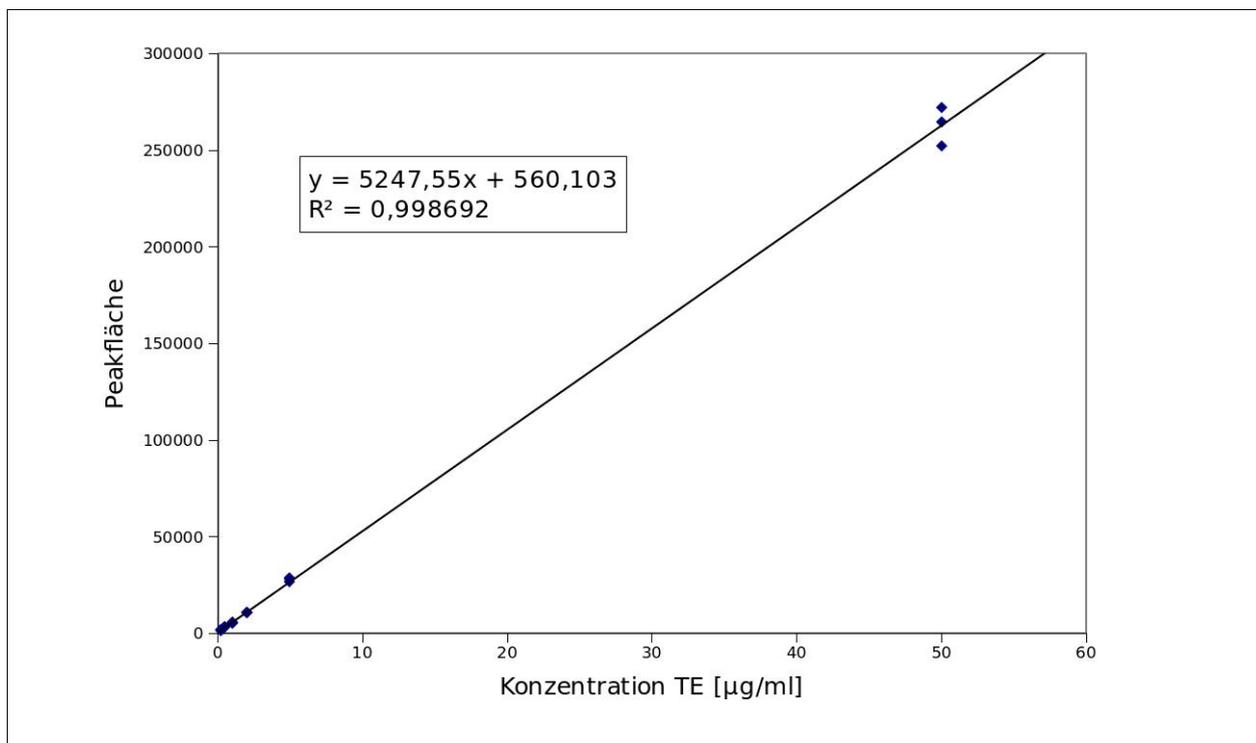


Abbildung 4.1: HPLC-Kalibriergerade mit in 2-Propanol gelöstem TE. Ausgewertet wurde der Betulinpeak. $n = 3$.

4.1.4 Konfokale Raman-Mikroskopie

Ein Tropfen der zu untersuchenden Proben wird auf einen Objektträger aufgebracht, außen um den Tropfen etwas Sekundenkleber aufgebracht und mit einem Deckglas fixiert. Die Fixierung durch den Klebstoff verhindert ein Verdampfen des Wassers während der

Laserbestrahlung und führt zu weniger Bewegung im Objekt. Die Aufnahme der Spektren und Bilder erfolgt mit einem „Alpha 300 R“ mit dem Spektrometer UHTS 300 und der CCD-Kamera DV401-BV von WiTec. Zuerst werden Fokus und Probenposition lichtmikroskopisch eingestellt, danach mit Laserlicht die eigentliche Raman-Mikroskopie durchgeführt. Die Anregungswellenlänge beträgt 523 nm, die Bildgröße 25 x 25 μm , die Auflösung 100 x 100 Pixel bei einer Integrationszeit von 100 ms. Zur Auswertung werden den Einzelspektren (TE, Wasser, Öl, Phospholipon 80H) jeweils eine Farbe zugeordnet und diese überlagert.

4.1.5 Kontaktwinkelmessungen

Die Kontaktwinkelmessung wird angelehnt an die „sessile-drop“-Methode durchgeführt. Um eine möglichst plane TE-Oberfläche zu erhalten, wird mit einer hydraulischen IR-Pressen eine TE-Tablette hergestellt. Hierzu wird ein Stempel mit 1 cm Durchmesser und ein Druck von 1,25 GPa (entspricht der an der Presse angezeigten Gewichtskraft von 10,0 t) für 10 Sekunden aufgewendet. Auf den mit einer Wasserwaage ausgerichteten TE-Pressling werden 25 μl Pufferlösung gegeben und das Seitenprofil photographiert. Anhand dieses Photos werden rechter und linker Randwinkel geometrisch am Computer mit dem Software-Goniometer „MB Ruler“ (Markus Bader, <http://www.markus-bader.de/MB-Ruler/index.d.php>) bestimmt.

4.1.6 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen werden mit einem Zeiss Axio Imager Z1 in Durchlicht und Auflicht aufgenommen. Das Mikroskop besteht aus folgenden Komponenten: Halogenlampe HAL 100, Quecksilberdampflampe HBO 100, Kameras AxioCam MRm und ICc1, Objektiv „Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil M27“. Die verwendete Software ist „Axio-Vision“ von Zeiss.

4.1.7 Profilanalysetensiometrie (PAT)

Die Messung wird mit dem PAT-1 von Sinterface im Aufbau des treibenden Tropfens („bouyant drop“) durchgeführt (siehe hierzu auch 2.3.4. Da geringste Tensidspuren die Messung stark stören, werden alle verwendeten Teile mit Aceton und anschließend mit Wasser gespült. Für diesen Versuch wird als Wasser nur frisch bereitetes Aqua bidestillata aus dem Muldestor verwendet.

Wasser wird in der Küvette vorgelegt, die Kapillare gründlich mit der zu vermessenden Ölphase vorgespült, in die Küvette eingehängt und alles auf 25 °C temperiert. Der Kapillarmund wird in den Fokus der CCD-Kamera gebracht und die Kamera mit einer Metallkugel definierten Durchmessers von 3 mm in Position des späteren Tropfens kalibriert, wobei auf Vertikalität zu achten ist. Zur Steuerung des Geräts und zur Auswertung wird die Software „SINTERFACE Profile Analysis Tensiometer PAT 1 v. 5.03.1“ verwendet.

Methode für Grenzflächenspannungsmessungen

Für Untersuchungen zur Grenzflächenspannung zwischen zwei Flüssigkeiten (wässrige und ölige Phase) wird ein statisches Messprofil verwendet. Hierzu wird ein Tropfen mit 20 mm³ erzeugt und sein Volumen nicht mehr verändert, während die Seitenprofile des Tropfens über einen Zeitraum von 16 h alle 5 s gemessen werden. Zur Auswertung wird die Grenzflächenspannung zu jedem Zeitpunkt über ein Kurvenfitting (siehe unten) bestimmt. Es stellt sich ein Gleichgewichtsendwert ein, der bestimmt wird.

Methode für grenzflächenrheologische Messungen

Um Aussagen über grenzflächenrheologische Phänomene treffen zu können, werden dynamische PAT-Messungen durchgeführt. Hierbei wird das Volumen des erzeugten Tropfens sinoidal verändert, während die Seitenprofile des Tropfens in Intervallen von 0,16 s aufgenommen werden. Es wird ein Tropfen von 7 mm² Seitenfläche erzeugt und mit einer Amplitude von 0,5 mm² und einer Schwingungsdauer von $2\pi = 6,28$ s gearbeitet.

Gemessen wird für 10 min bei 25 °C.

Aufreinigung der Ölphasen

Um den grenzflächenaktiven Einfluss eventueller Verunreinigungen in den Ölphasen zu beseitigen, werden die Öle für die grenzflächenrheologischen Messungen unter Zugabe von 10 % (m/m) Aktivkohle für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer gerührt, mit Aqua bidestillata ausgeschüttelt und anschließend zwei mal durch hydrophobe Rundfilter filtriert. Der Vorlauf der ersten Filtration wird verworfen.

Fitting

Die Auswertung der Daten erfolgt in mehreren Schritten mit der Software „SINTERFACE Profile Analysis Tensiometer PAT 1 v. 5.03.1“: Nach Aufnahme der Tropfenprofile, wird basierend auf der Young-Laplace-Gleichung (siehe 2.2, Seite 12), ein Kurvenfitting durchgeführt, um die Grenzflächenspannung jeder Messpunktes zu berechnen. Abb. 4.2 zeigt ein Beispiel hierfür.

Die gefitteten Daten werden von extremen Ausreißern bereinigt und einer Fourier Transformation unterzogen. Für die Fourier Transformation, über die die Grenzflächendilatation und -elastizität berechnet werden, werden die verwendete Amplitude und Frequenz eingegeben und das Zeitintervall der Messung markiert, für welches die Berechnung durchgeführt werden soll (jeweils ca. 200 Sekunden). Die theoretische und experimentelle Kurve sollten möglichst gut übereinander liegen, wie in Abb. 4.3 dargestellt, was bei jeder Messung kontrolliert wird.

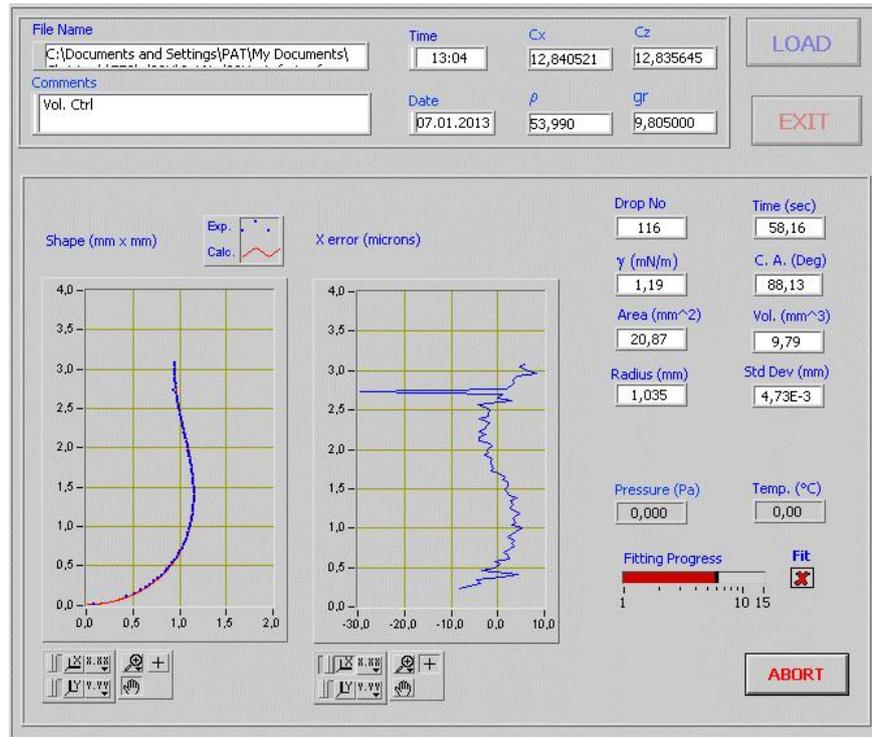


Abbildung 4.2: Screenshot der Sinterface-PAT-Software des Fitting-Prozesses.

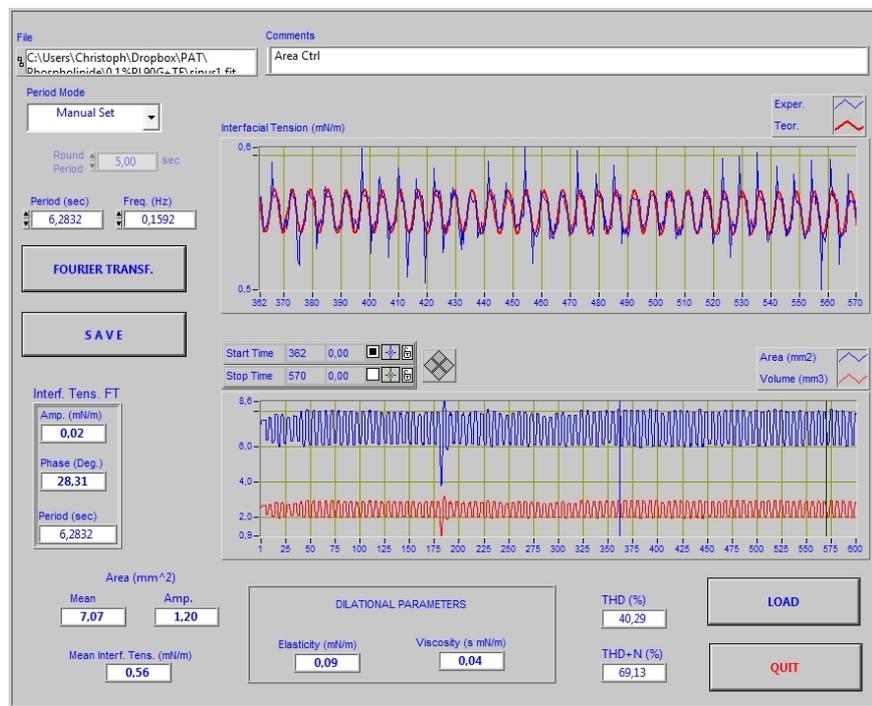


Abbildung 4.3: Screenshot der Sinterface-PAT-Software der Fourier Transformation.

4.2 Charakterisierung der Zubereitungen

4.2.1 Partikelgrößen- und Tröpfchengrößenverteilung

Laserdiffraktionsmessungen

Partikel- und Tröpfchengrößenverteilungen werden als Volumenverteilungen über Laserdiffraktion mit dem Mastersizer 2000 (Malvern) mit Modul „Hydro 2000S“ gemessen. Hierzu wird in die Nassdispersionseinheit Wasser gegeben und der Streuhintergrund für 10 Sekunden vermessen. Dann wird solange Probe zugegeben bis eine Trübung (obscuration) von ca. 13 % erreicht ist und die Messung gestartet. Es wird mit einer Rührgeschwindigkeit von 2450 UpM für jeweils 10 Sekunden bei 632,8 nm und 470 nm vermessen. Die Auswertung erfolgt nach dem Streumodell „Standard-Nass“ der Mastersizer-Software, welches für die Teilchen einen mittleren Absorptionskoeffizienten und eine Dispersion in Wasser annimmt.

Dynamische Laserlichtstreuung

Mit dem Zetasizer Nano-ZS (Malvern) können Partikelgrößen in einem Bereich von ca. 0,02 - 2000 μm nach dem Prinzip der dynamischen Laserlichtstreuung bestimmt werden. Etwa 2 mL Probe (eventuell verdünnt) werden in die Küvette (DTS0012) gefüllt und diese in den Strahlengang des Zetasizer Nano-ZS (Malvern) eingesetzt. Die Messung erfolgt bei einer Temperatur von 25 °C und einer Wellenlänge von 633 nm.

4.2.2 Zetapotentialmessung

Es werden pH-abhängige Zetapotentiale mit dem Zetasizer Nano-ZS (Malvern) bestimmt. Dazu werden 20 mL der Probe in die Küvette des Autotitrators MPT-2 (Malvern) eingebracht und über eine Schlauchpumpe im Kreislauf durch eine Küvette (DTS1070) im

Strahlengang des Zetasizers befördert. Als Probe wird eine 0,02-M-NaCl-Lösung hergestellt, in der mit der Ultraschallsonotrode 0,1 % TE suspendiert wird (siehe 4.3.1). Der NaCl-Zusatz soll eine konstante Ionenstärke über den Verlauf der Titration gewährleisten. Die pH-Einstellung erfolgt mit 0,02-M-NaOH und 0,02-M-HCl im Autotitrator von pH 9 bis pH 5 und wird mit einer Glaselektrode kontrolliert. Abb. 4.4 zeigt eine schematische Zeichnung des Messaufbaus. Es werden je Messreihe fünf Wiederholungsmessungen ($n=5$) durchgeführt. Zur Auswertung werden die gemessenen Zetapotentiale gegen die gemessenen pH-Werte aufgetragen.

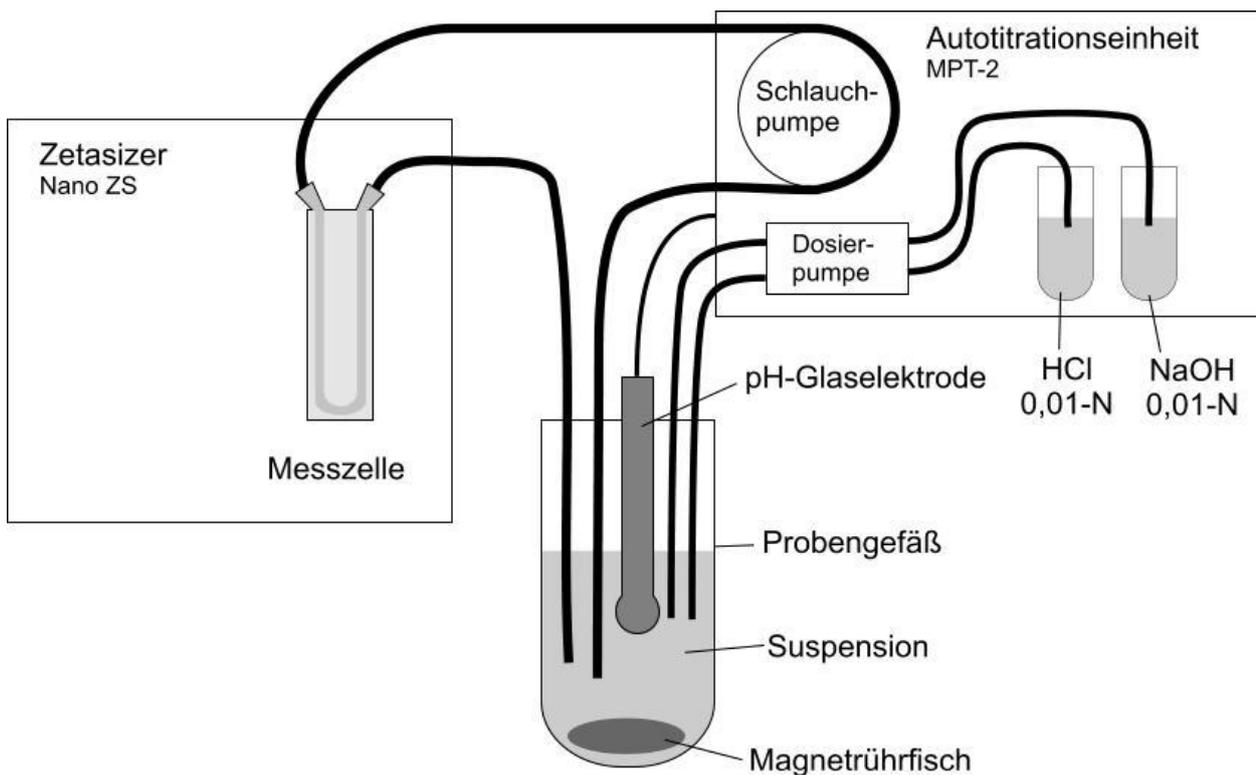


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Messaufbaus zur pH-abhängigen Zetapotentialmessung.

4.2.3 Schaumcharakterisierung

Aufschäumbarkeit

Die Aufschäumbarkeit wird nach der Methode des Europäischen Arzneibuchs (COUNCEL OF EUROPE, 2013), beschrieben unter „Musci Medicati“, durchgeführt. Hierzu werden ca. 10 mL Schaum in einem Sprühstoß in eine skalierte Bürette gegeben und das Volumen alle 10 s dokumentiert, um die zeitliche Volumenänderung bestimmen zu können (Apparatur siehe Abb. 4.5).

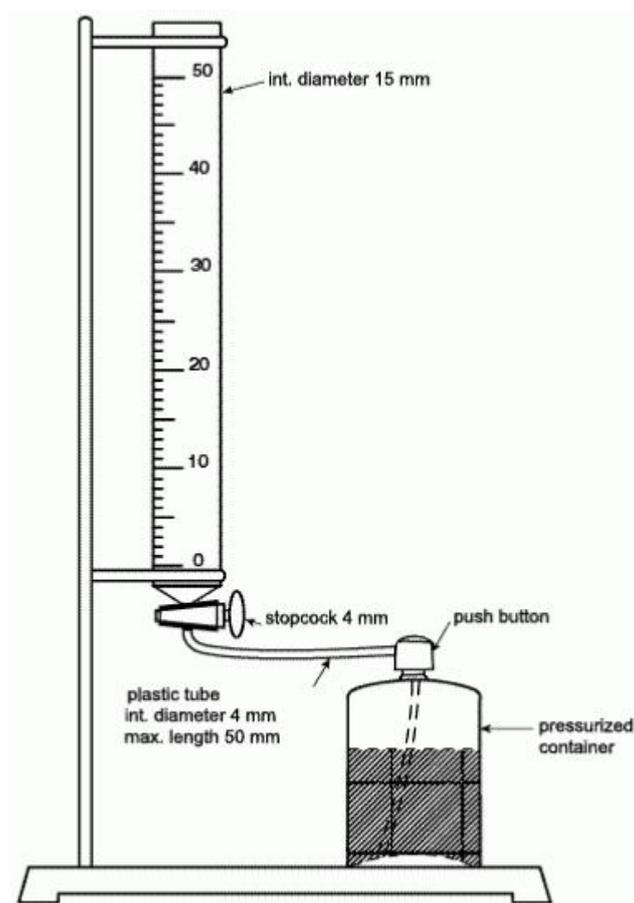


Abbildung 4.5: Messburette nach Ph. Eur. 7.8 (COUNCEL OF EUROPE, 2013) zur Bestimmung der Aufschäumbarkeit.

Schaumdichte

Die Schaumdichte wird aus dem maximalen Schaumvolumen der Aufschäumbarkeitsmessung und der Masse des zugegebenen Schaums berechnet. Die Masse des Schaums wird durch Differenzwägung der Schaumdose vor und nach der Aufschäumbarkeitsmessung bestimmt. Diese Methode hat eine geringere Streuung als die Ph. Eur.-Methode (siehe 5.3) und kann gleichzeitig mit der Aufschäumbarkeitsmessung durchgeführt werden.

Blasengröße

Die Blasengröße wird über eine Stereolupe optisch bestimmt. Hierzu wird eine Schaumprobe von ca. 8 cm³ auf einem Objektträger erzeugt und über zwei Abstandhalter von oben mit einem weiteren Objektträger abgedeckt (Abb. 4.6). Nun kann auf die Oberfläche fokussiert werden und die Blasengröße als Feret-Durchmesser bestimmt werden. Es wird eine Fläche von ca. 1 cm² ausgezählt.

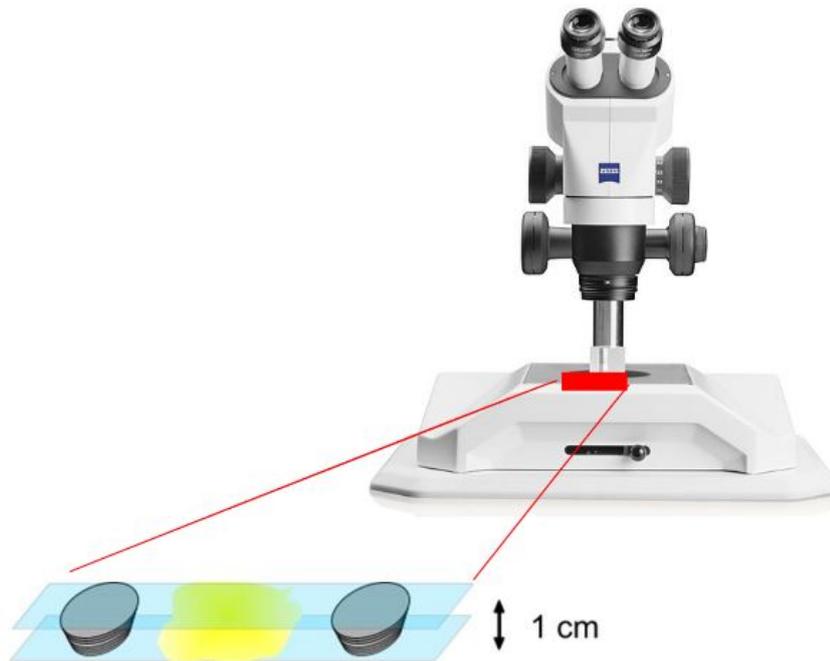


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Messaufbaus der Blasengrößenbestimmung. Modifiziert nach ZEISS (2013)

Optischer Beurteilungs-Score

Die Schaumcharakterisierung gestaltet sich zuweilen als schwierig, da objektive Parameter (wie zuvor beschrieben) noch nichts über wünschenswerte optische und kosmetische Eigenschaften eines Schaums aussagen. Um eine Optimierung der Schaumrezeptur (siehe 4.4) zu vereinfachen und die Schaumeigenschaften besser aufzuschlüsseln, wurde ein arbiträrer “optischer Beurteilungs-Score” entwickelt, der auf einer Skala von 1 (nicht wünschenswert) bis 10 (optimal) eine Gesamt-Beurteilung bietet.

Der Score setzt sich aus folgenden subjektiven, gleichmäßig gewichteten Parametern zusammen (jeweils wieder auf einer arbiträren Skala von 1 bis 10 bewertet):

- “Feinporigkeit”, als visuell geschätzte Blasengröße. Hoher Score steht für kleine Blasen und starke Feinporigkeit.
- “Stabilität” gegen Zerfall. Hoher Score für hohe Zerfallsdauer.
- “Aussehen” als Gleichmäßigkeit der Farbe, andere Auffälligkeiten. Hoher Score steht

für gleichmäßiges Erscheinungsbild.

- “Expansionszeit”. Die Zeit nach Aufschäumen, bis das Maximalvolumen erreicht ist. Hoher Score bei schnellem Erreichen des größten Volumens.

Als Referenz wurden zwei handelsübliche Schaumzubereitungen hinzugezogen: ein Haarmousse („Balea Flex & Glossy“, dm-Drogerie, DE-Karlsruhe), welches sehr grobporig aufschäumt, langsam expandiert und schnell zerfällt, sowie ein Rasierschaum („Balea men Sensitive“, dm-Drogerie, DE-Karlsruhe), der einen sehr feinporigen, stabilen und schnell expandierenden Schaum bildet. Mit diesen Schäumen, die Extremwerte im Aufschäumverhalten darstellen, konnten die Eigenschaften der TE-Schäume gut verglichen und eingeordnet werden.

Zur Messung des Scores wurden die Schäume nach zweitägiger Lagerung bei Raumtemperatur kurz geschüttelt, mit einem Schaumaufsatz versehen, der erste Sprühstoß (ca. 10 ml) verworfen, dann eine walnussgroße Schaummenge entnommen und nach den benannten Teilparametern in randomisierter Reihenfolge bewertet. Der Score der optischen Beurteilung ergibt sich dann aus dem Mittelwert der Teilparameter.

4.3 Herstellung der Zubereitungen

4.3.1 TE-Suspensionen

Mit Zahnkranz-Homogenisator

Es werden 95 mL Wasser (evtl. mit 0,1-%igem Polysorbat 80-Zusatz) in einem 150-mL-Becherglas vorgelegt, 5 g TE zugegeben und mit dem Labor-Dispergierer Ultra-Turrax T25 (IKA) bei 10000 UpM für 5 min suspendiert.

Mit Fliehkraft-Kugelmühle

Die Keramikschale für die Kugelmühle WM5 (Vetter) wird mit Keramikugeln (Durchmesser 1,5 cm bis 4 cm, ca. 30 % Volumenanteil) bestückt und 142,5 mL Wasser (evtl. mit 0,1-%igem Polysorbat 80-Zusatz), sowie 7,5 g TE beladen und verschlossen. Die Schale wird eingespannt und für 30 min geschleudert. Anschließend kann die Probe durch Siebung von den Kugeln getrennt werden.

Mit Zahnkolloidmühle

In einer Zahnkolloidmühle (FrymaKoruma, MZ 50/R), Spaltöffnung 0,3 mm, werden 760 mL Wasser (evtl. mit 0,1-%igem Polysorbat 80-Zusatz) vorgelegt und im Kreislauf geführt. In den Flüssigkeitsstrom werden 40 g TE in kleinen Portionen zugegeben, um ein Benetzen des Extraktes zu gewährleisten. Hierzu ist auch die Füllmenge mit ca. 800 mL so gewählt, dass ein ständiges Umwälzen der Flüssigkeitsoberfläche stattfindet (siehe auch Abb. 4.7). Es wird für 60 min gemahlen.

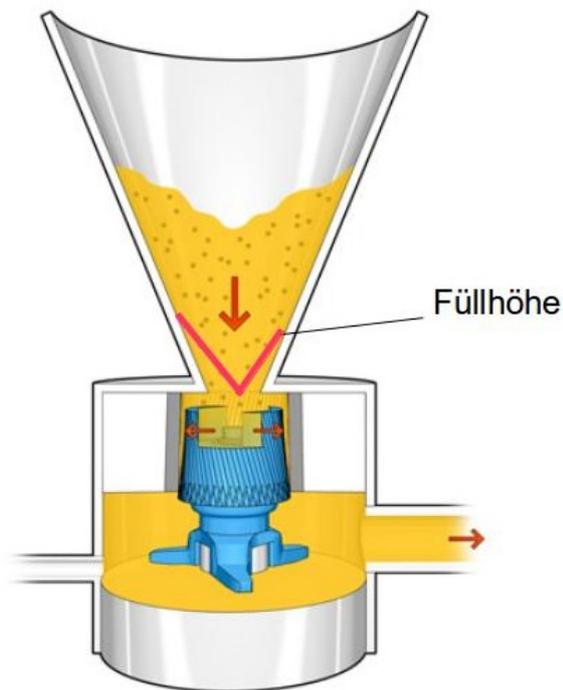


Abbildung 4.7: Links: Schematische Querschnittszeichnung der Zahnkolloidmühle, mit eingezeichnete Füllhöhe (modifiziert nach BERNER). Rechts: Fotoaufnahme der Zahnkolloidmühle im verwendeten Aufbau.

Mit Ultraschallsonotrode

In einem hohen 150-mL-Becherglas werden 80 mL Wasser (evtl. mit 0,1-%igem Polysorbat 80-Zusatz) vorgelegt und mit 5 % TE versetzt. Mit dem Ultraschallprozessor UP200S (Hielscher) und der Spitze S14 wird die Probe für 5 min bei 50 % Amplitude und einem Zyklus von 0,5 gepulst beschallt.

4.3.2 Emulsionen

Ausgehend von TE-Suspensionen, hergestellt mit der Zahnkolloidmühle wird ein Gelbildner (Natriumcarboxymethylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Polyacrylsäure (neutralisiert mit NaOH-Lösung), Na-Alginat, Xanthangummi, je nach Versuch 0,5 % bis 2 %) zugesetzt, kurz dispergiert (Ultra-Turrax T25, 10000 UpM, 1 min) und 20 min zum Quellen

stehen gelassen. Danach wird die Ölphase zugegeben und homogenisiert (10000 UpM, 5 min). Die Ansatzgröße beträgt jeweils 100 g.

4.3.3 Schäume

Zur Bereitung eines Schaums werden 100 g einer oben beschriebene Emulsion in eine 150-mL-Aluminium-Aerosoldose gefüllt und mit Ventilteller mit passendem Steigrohr verschlossen und vercrimpt. Anschließend werden 5 g Treibgas (typischerweise Propan/Butan-Mischung von 3,5 bar Sättigungsdampfdruck) zugesetzt, geschüttelt und 2 Tage bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Vor Entnahme einer Schaumprobe wird die Dose stets geschüttelt und der erste Stoß des Schaums mit ca. 10 mL Volumen verworfen.

4.3.4 Oleogele

Oleogele werden durch Zugabe von 10 g TE zu 90 g Ölphase hergestellt, bei anschließender Einarbeitung mit dem Rotor-Zahnkranz-Homogenisator Ultra-Turrax T25 bei 10000 UpM für 5 min. Danach wird das Oleogel zur Ausbildung des Gelgerüsts zwei Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen.

4.3.5 Submikronemulsionen

Zur Bereitung von Submikronemulsionen wird zuerst eine Lipidmatrix aus Ölphase (z.B. 7 g Sonnenblumenöl), Phospholipid (z.B. 2,5 g Phospholipon 80 H) und TE (z.B. 0,5 g TE1) hergestellt. Hierfür werden alle Komponenten in eine Schale eingewogen und unter Rühren von Hand auf dem Wasserbad bei 80 °C zu einem Oleogel verarbeitet. 5 g dieser Lipidmatrix werden anschließend zu 45 g auf 80 °C erhitztem Wasser gegeben und mit dem Ultra-Turrax für 2 min bei 10000 UpM voremulgiert. Die Voremulsion wird danach im auf 80 °C vorgeheizten Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex-C3 (Avestin) bei 100 MPa für 5 min in Rezirkulation homogenisiert.

4.3.6 Schäume aus Submikronemulsionen

Zur Untersuchung der Aufschäumbarkeit wurden die erhaltenen Emulsionen mit 2 % HPMC versetzt und kurz dispergiert (Ultra-Turrax T25, 10000 UpM, 1 min). Anschließend wurden 50 g der Zubereitung in eine Aerosoldose gefüllt, vercrimpt und mit 2,5 g Treibgas (Propan/Butan 3,5 bar) beaufschlagt, geschüttelt und zwei Tage bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Vor Entnahme der Schaumprobe wurde die Dose geschüttelt und die ersten ca. 10 mL verworfen.

4.4 Versuchsdesigns zur Bestimmung der Einflüsse auf die Schaumqualität

Um die Einflüsse auf die Schaumqualität von HPMC-stabilisierten, TE-haltigen Schäumen zu bestimmen, wurden verschiedene Versuchsdesigns mit dem Ziel der statistischen Auswertung über eine Hauptkomponentenanalyse (siehe 2.3.5). Der Vorteil dieser Methode liegt in der relativ geringen Anzahl der Versuchsansätze, bei der trotzdem Aussagen über den Einfluss vieler Parameter getroffen werden können.

Die Art der Ölphase wurde bei den Designs nicht variiert. Stattdessen wurden zwei Designs entworfen, einmal für Paraffin, einmal für Sonnenblumenöl als Ölphase. Paraffin wurde ausgewählt, weil es nach Vorversuchen für eine optimale Schaumqualität am vielversprechendsten war, während Sonnenblumenöl in Zwischenergebnissen der Projektpartner zur Wundheilung am positivsten bewertet wurde.

Die untersuchten und variierten Parameter waren HPMC-Anteil, TE-Anteil, Ölphasenanteil und Treibgasanteil. Als Antwortparameter für die Auswertung wurde für das Paraffin-Design ein „optischer Beurteilungs-Score“ (siehe 4.2.3) und die Schaumdichte (siehe 4.2.3) gewählt. Für das Sonnenblumenöl-Design wurde der „optische Beurteilungs-Score“ durch ein objektiveres Verfahren durch Auszählen der Blasengrößen mit der Stereolupe (siehe 4.2.3) ersetzt.

Zur Erstellung des Versuchsdesigns, sowie zur Auswertung wurde das Programm „JMP 9, Statistical Discovery“ (SAS) verwendet. Es wurden jeweils zwei Niveaus für die Anteile der Inhaltsstoffe gewählt, sowie deren Mittelpunkt. Im Einzelnen bedeutet das für das Design mit Paraffin als Außenphase: TE-Anteil 2-4 %, Paraffinanteil 10-20 %, Treibgasanteil 5-10 % und HPMC-Anteil 1-2 %. Beim Design mit Sonnenblumenöl als Außenphase wurde der Sonnenblumenölanteil bei 15 % belassen und die anderen Bestandteile entsprechend des Paraffin-Designs variiert.

Die Auswertung erfolgt über eine Hauptkomponentenanalyse (siehe 2.3.5), ebenfalls durchgeführt mit JMP. Zusätzlich zu den variablen Rezepturbestandteilen werden als Antwortparameter die optische Beurteilung, Schaumdichte, Expansionszeit, Aussehen, Stabilität und Feinporigkeit beim Paraffin-Design, sowie initiale Aufschäumgeschwindigkeit, Coarsening, Schaumdichte und Gleichmäßigkeit der Gasblasen für das Sonnenblumenöl-Design verwendet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Überblick der Vorgehensweise

Ziel der Arbeit war es, eine möglichst hautverträgliche TE-haltige Formulierung zu entwickeln. Diese Verträglichkeit soll einerseits durch Verwendung möglichst weniger und ausgewählter Hilfsstoffe gewährleistet werden, andererseits durch die Formulierung eines Schaums, der sich berührungsarm auftragen lässt.

Die denkbar einfachste Möglichkeit einer Zubereitung mit diesen Eigenschaften wäre eine Suspension des TE in Wasser oder Puffer. In der Praxis erweist sich dies jedoch als schwierig - durch die hydrophobe Natur der Triterpene ist der TE schlecht benetzbar mit Wasser. Erzwingt man eine oberflächliche Benetzung durch mechanische Verfahren (Zahnkolloidmühle, Kugelmühle, Ultraschallsonotrode, Hochleistungsdispergierer etc.) und verringert so idealerweise gleichzeitig die Partikelgröße des TE, kann man Suspensionen erhalten. Diese zeigen zwar Flotation, lassen sich aber durch Rühren oder Schütteln wieder in einen homogenen Zustand bringen.

Je nach vorherrschendem Partikelgrößenbereich verändert sich das Hautempfinden der Suspensionen von kratzend (große Partikel, die man teils noch fühlen kann) zu stumpf (sehr kleine Partikel). Dieses stumpfe Hautgefühl kommt auch bei Ausfällen des TE aus Lösung (z.B. aus 2-Propanol) zustande und lässt somit eine Anwendung der TE-Suspensionen problematisch erscheinen.

Der nächste logische Schritt ist die Zugabe einer Ölphase zur Suspension. Idealerweise stabilisiert der TE im Sinne eines Pickering-Emulgators (siehe auch 2.3.1) die Öltröpf-

chen. Das Öl beseitigt das stumpfe Hautgefühl und löst den TE deutlich besser als Wasser (LASZCZYK, 2007; GRYSKO, 2011) und kann somit ein Reservoir für die Wirkstofffreisetzung auf der Haut darstellen. Leider ist die Lager- und mechanische Stabilität dieser Emulsionen unbefriedigend und es zeigen sich schnell Flotation, Agglomeration und Aufrahmen. Die Zugabe von Treibgas und Ausbildung eines Schaums ist möglich, jedoch sind die Zubereitungen bei Raumtemperatur nur wenige Wochen stabil (ROTT, 2009).

Eine Emulsion kann nur durch Zugabe der Ölphase zu einer vorher bereiteten Suspension gewonnen werden. Wird der TE erst zur Ölphase gegeben, bildet sich ein Oleogel, welches sich nicht in die Wasserphase einarbeiten lässt. Ein ähnliches Phänomen tritt bei zu starker mechanischer Scherung der O/W-Emulsion auf, wo es zu einer irreversiblen Phaseninversion kommt und letztlich ein Oleogelagglomerat in Wasser vorliegt.

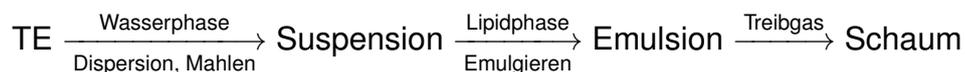


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Herstellprozesses von TE-Zubereitungen

Die Lösung für diese Stabilitätsprobleme ist die Zugabe eines Hilfsstoffs zur Suspension. Tenside wären theoretisch denkbar, wurden aber aufgrund ihres irritativen Potentials (EFFENDY & MAIBACH, 1996; WILHELM ET AL., 1994) nicht eingesetzt. Stattdessen wurden ausgewählte Gelbildner verwendet, die auch in Hydrokolloidverbänden eingesetzt werden und welche die Funktion von „Pseudoemulgatoren“ ausüben.

Diese Emulsionen sind ausreichend lagerstabil und können auch nach Zugabe eines Treibgasgemisches einen Schaum stabilisieren.

Eine gänzlich andere Herangehensweise ergibt sich, wenn man den TE nur als Wirkstoff, ohne Stabilisierungsfunktion einsetzen möchte. Hierbei sollte der TE in möglichst kleinen Partikeln vorliegen, um die Löslichkeit zu erhöhen. Es wurden hierzu Versuche mit Phospholipiden als Hilfsstoff zur Bereitung von Nano-, bzw. Submikronemulsionen durchgeführt. Die Idee dahinter ist, dass die Triterpene des TE sich in die Phospholipidmembranen und in die Ölphase einlagern und von dort molekulardispers freigesetzt werden können.

5.2 Partikelgrößenverteilungen in TE-Suspensionen

Die Verringerung der Partikelgröße und gleichzeitige Suspension des TE in wässrigem Medium ist eine Hauptanforderung zur Herstellung von hautverträglichen Zubereitungen. Zur Nassvermahlung kamen Zahnkolloidmühle, Ultra-Turrax, Ultraschallsonotrode, Hochdruckhomogenisator und Kugelmühle zum Einsatz (Methoden siehe 4.3.1). Jede Methode zeigt hier seine eigenen Vor- und Nachteile. Außerdem wurden Vergleichsversuche mit Tensidzugabe durchgeführt, obwohl in den angestrebten Formulierungen kein Tensid enthalten sein sollte, um den prinzipiellen Einfluss einer besseren Benetzung auf die TE-Zerkleinerung aufzuzeigen.

Abbildung 5.2 zeigt die Partikelgrößenverteilung einer TE-Suspension aus der Zahnkolloidmühle. Man erkennt den Modalwert in der Volumenverteilung bei etwas über 10 μm , wobei $d_{10} = 4,65 \mu\text{m}$, $d_{50} = 11,77 \mu\text{m}$ und $d_{90} = 30,28 \mu\text{m}$ betragen. Lichtmikroskopische Aufnahmen (Abb. 5.3) bestätigen optisch die Messergebnisse und zeigen unregelmäßig geformte TE-Partikel.

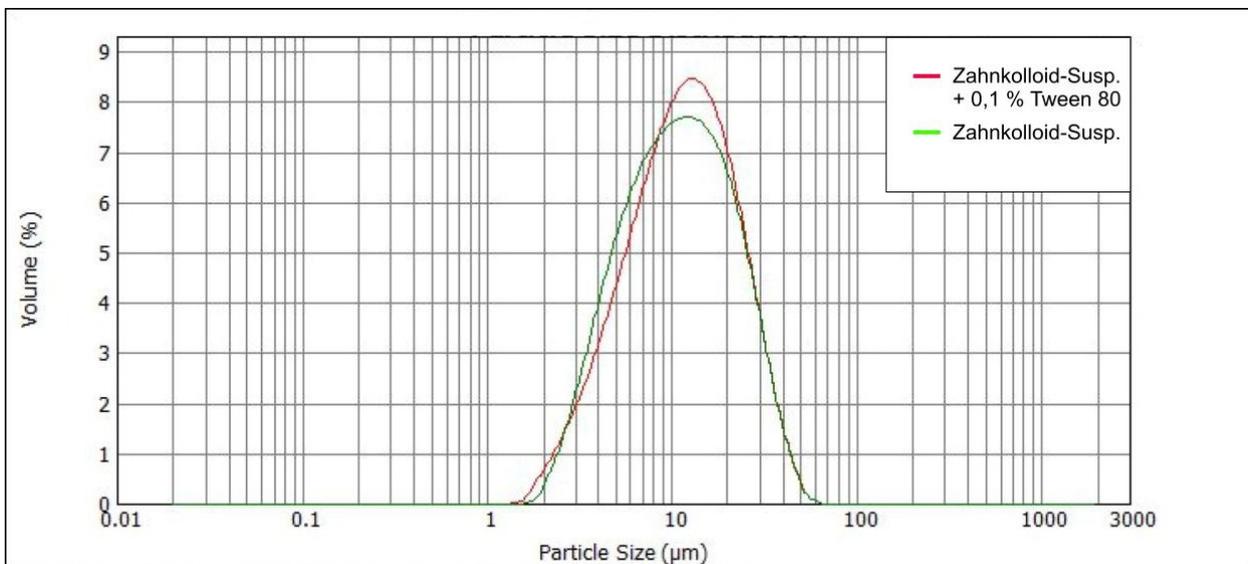


Abbildung 5.2: Partikelgrößenverteilung einer TE-Suspension aus der Zahnkolloidmühle

Durch Zusatz von 0,1 % Polysorbat 80 wird ein Einfluss der besseren Benetzbarkeit auf die Zerkleinerung der TE-Partikel untersucht. Man erkennt, dass der Tensidzusatz von 0,1 % Polysorbat 80 nur einen minimalen Einfluss auf die Zerkleinerung in der Zahnkol-

loidmühle hat ($d_{10} = 5,15 \mu\text{m}$, $d_{50} = 13,71 \mu\text{m}$, $d_{90} = 30,12 \mu\text{m}$).

Abb. 5.4 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Tensidhaltigen Suspension. Es ist auch optisch kein Unterschied zwischen Polysorbat-Zusatz und rein wässriger Zubereitung zu erkennen.

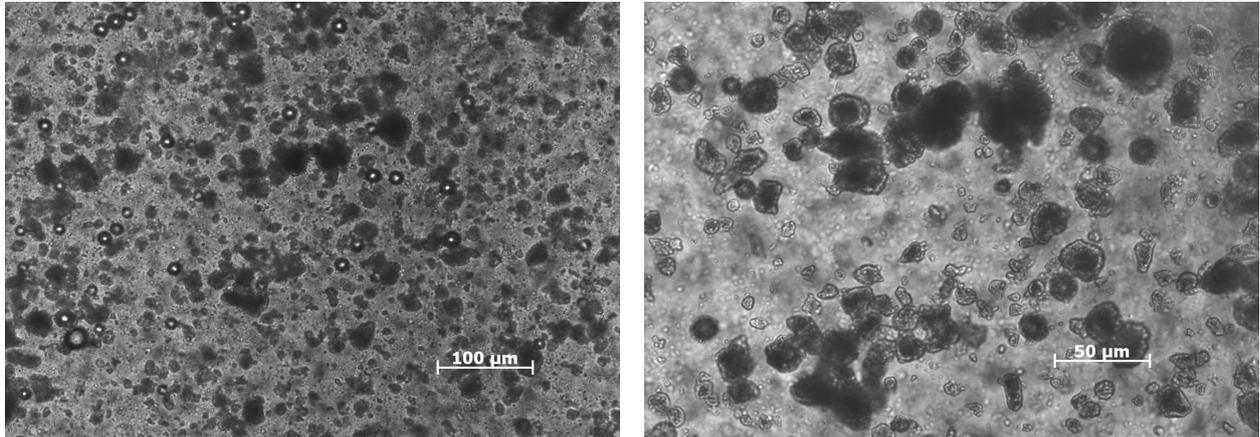


Abbildung 5.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer TE-Suspension aus der Zahnkolloidmühle

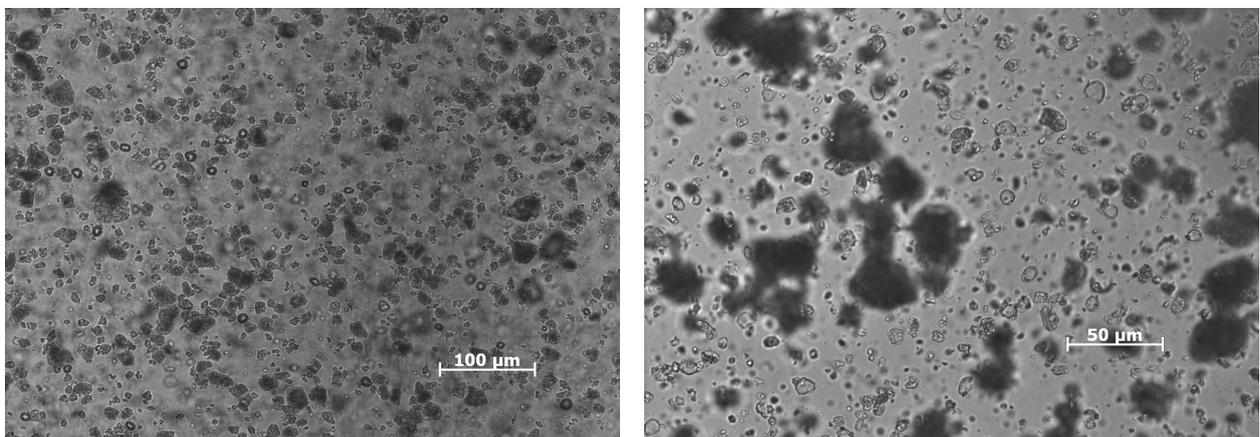


Abbildung 5.4: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer TE-Suspension aus der Zahnkolloidmühle mit 0,1 % Polysorbat 80-Zusatz

Die Partikelgrößenverteilung während des Mahlprozesses in der Zahnkolloidmühle wurde zur Bestimmung der optimalen Mahldauer bestimmt. Hierzu wurden zu Beginn des Mahlvorgangs und danach alle 15 Minuten Proben gezogen und vermessen. Abbildung 5.5 stellt die Ergebnisse in einem Schaubild dar.

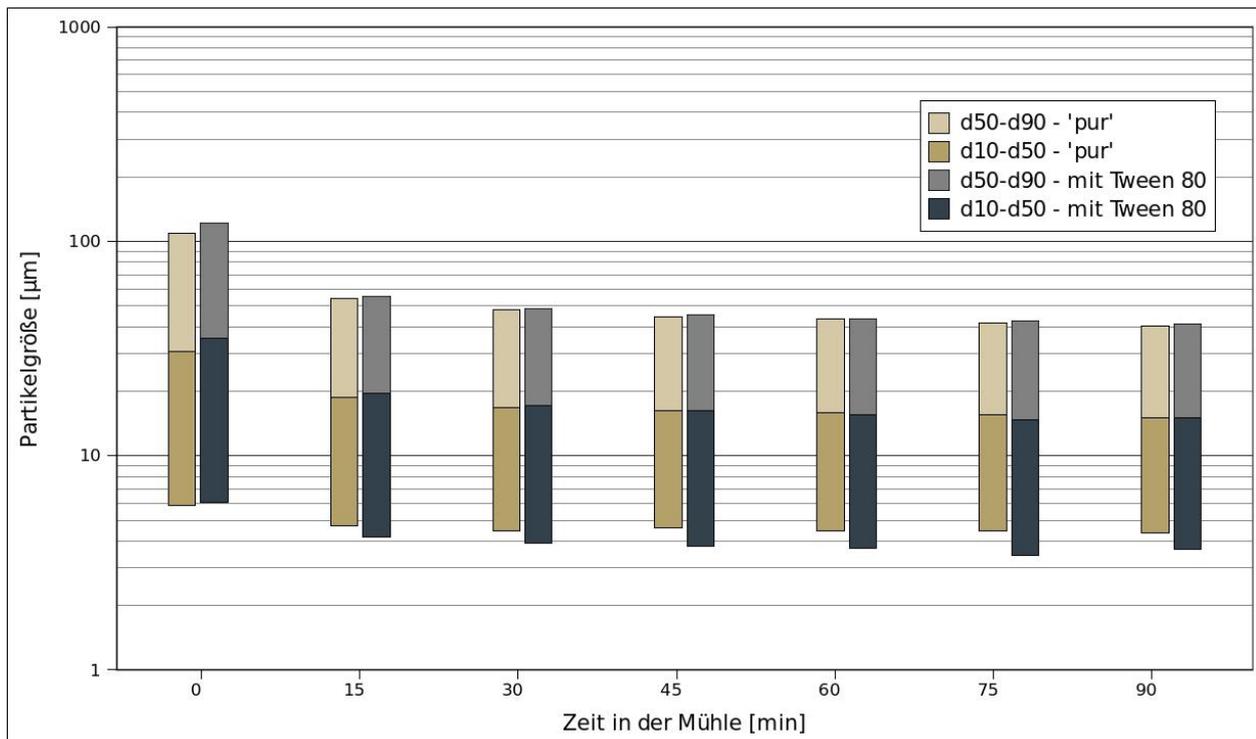


Abbildung 5.5: Veränderung der Partikelgrößenverteilungen von TE-Suspension mit zunehmender Mahldauer in der Zahnkolloidmühle. Vergleich von Suspensionen ohne (links) und mit (rechts) 0,1-%igem Tween 80-Zusatz

Die aufgetragenen Werte zeigen die Durchgangssummen d10, d50 und d90 aus der durch Laserdiffraktion bestimmten Volumenverteilung. Somit kann man sowohl eine Aussage über mittlere Partikelgröße, als auch über die Breite der Verteilung treffen. Man erkennt erwartungsgemäß innerhalb der ersten Viertelstunde eine starke Partikelgrößenreduktion, danach nur noch eine geringere Zerkleinerung. Nach der anfänglichen Zerteilung von Agglomeraten müssen die Primärpartikel des TE zerkleinert werden, was deutlich mehr Energie erfordert und dementsprechend langsamer von statten geht. Dieses Verhalten liegt durch die unregelmäßige Oberflächenstruktur des TE nahe und wird durch die Messungen bestätigt.

Bei 0,1 %iger Polysorbat 80-Zugabe, erkennt man keine schnellere Zerkleinerung, lediglich die d10-Werte werden zu etwas kleineren Werten verschoben. Die bessere Benetzung durch den Tensidzusatz wirkt sich also vernachlässigbar auf die Zerteilung der Agglomerate und Zerkleinerung der Primärpartikel aus. Da eine längere Mahldauer nur noch zu wenig weiterer Zerkleinerung führt, wurde für die Suspensionsherstellung zur

Bereitung von Emulsionen und Schäumen eine Mahldauer von 60 Minuten verwendet.

Aufgrund des für die Zahnkolloidmühle nötigen Ansatzvolumens von ca. 800 mL und des damit verbundenen großen Materialverbrauchs, ist die Bereitung im kleinen Maßstab mit Hilfe eines Ultra-Turrax T25 oder mit der Ultraschallsonotrode wünschenswert. Abbildung 5.6 zeigt einen Vergleich der Partikelgrößenverteilung zwischen einer Suspension, die mit dem Ultra-Turrax bereitet wurde (siehe 4.3.1) und einer Suspension, die mit der Zahnkolloidmühle hergestellt wurde. Die Zahnkolloidmühlensuspension zeigt deutlich kleinere Partikel und eine geringere Verteilungsbreite. Die physikalischen Zerkleinerungsmechanismen beider Methoden sind vergleichbar (Scherung, Schlag, Prall), jedoch lassen sich in der Zahnkolloidmühle flotierende, unbenetzte TE-Partikel besser einarbeiten, was eine bessere Benetzung des Extraktes und gleichmäßigere Zerkleinerung des Extraktes erzeugt. Auch die Reproduzierbarkeit der Partikelgrößenverteilungen lässt sich somit mit der Zahnkolloidmühle erhöhen. Dies zeigt sich auch daran, dass selbst bei manueller Bewegung des Mischgefäßes über die Mahldauer keine vollständige Einarbeitung der flotierenden TE-Anteile möglich ist. Eischränkend ist allerdings zu erwähnen, dass die Mahldauer der Ultra-Turrax-Suspension wesentlich kürzer gewählt ist, da eine 60-minütige Mahldauer mit dem kleinen Tischgerät nicht praktikabel ist.

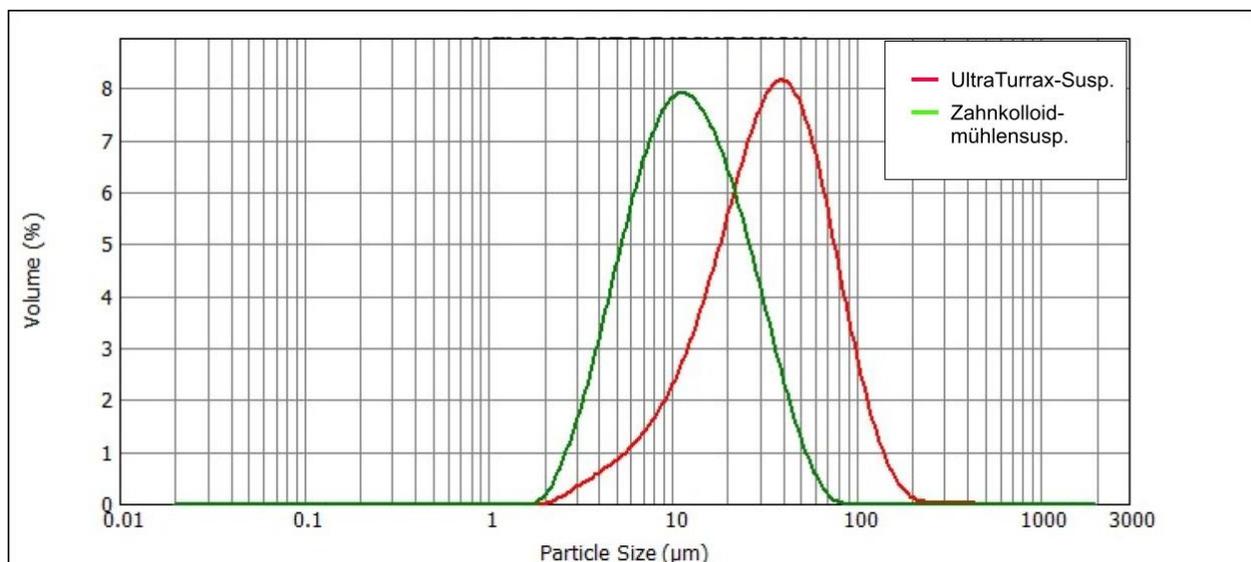


Abbildung 5.6: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von TE-Suspensionen, mit Zahnkolloidmühle und mit Ultra-Turrax hergestellt.

Eine weitere untersuchte Methode zur Suspensionsherstellung ist die Verwendung ei-

nes Hochdruckhomogenisators (engl. „high pressure homogenizer“, folgend abgekürzt als „HPH“). Es lassen sich hierbei allerdings nur vorsuspendierte (Ultra-Turrax) Zubereitungen verwenden, da ansonsten das Gerät aufgrund großer Agglomerate sofort verstopft. Es wurde nach drei Umläufen bei 100 MPa vermessen. Abb. 5.8 zeigt einen Vergleich zwischen Zahnkolloidmühlensuspensionen und über Hochdruckhomogenisation hergestellten Suspensionen (HPH-Suspensionen), jeweils mit und ohne 0,1 %igem Polysorbat-80-Zusatz. Auch hier erkennt man wieder keinen signifikanten Einfluss des Polysorbat-Zusatzes. Die Partikelgrößen der HPH-Suspensionen liegen deutlich unter denen der Zahnkolloidmühlensuspensionen und zeigen gleichzeitig eine engere Verteilung.

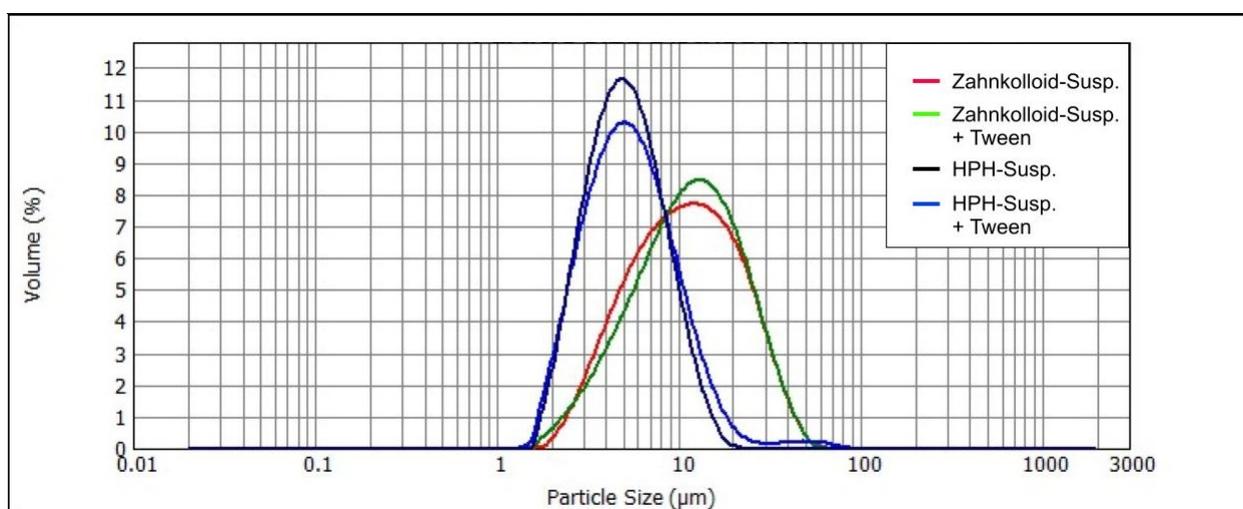


Abbildung 5.7: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von TE-Suspension, die mit der Zahnkolloidmühle und mit dem Hochdruckhomogenisator hergestellt wurden

Der Einfluss des Betriebsdrucks des Hochdruckhomogenisators auf die Partikelgrößenverteilung wurde auch untersucht und ist in Abb. 5.8 dargestellt. Hierzu wurde die gleiche Suspension jeweils drei Durchläufe bei 100 MPa, 150 MPa und 200 MPa homogenisiert und dann Proben gezogen. Es zeigt sich keine wesentlich bessere Zerkleinerung des TE bei steigendem Druck.

Abb. 5.9 gibt eine Übersicht über die Partikelgrößenverteilungen der wässrigen TE-Suspensionen, je nach Herstellungsmethode. Es sind die Durchgangssummen d_{10} , d_{50} und d_{90} logarithmisch nach Volumenverteilung aufgetragen. Man erkennt, dass die HPH-Suspension die kleinsten Partikelgrößen und die engste Verteilung aufweist. Zahnkolloidmühle und Ultraschallsonotrode liegen etwas darüber. Mit der Kugelmühle können zwar

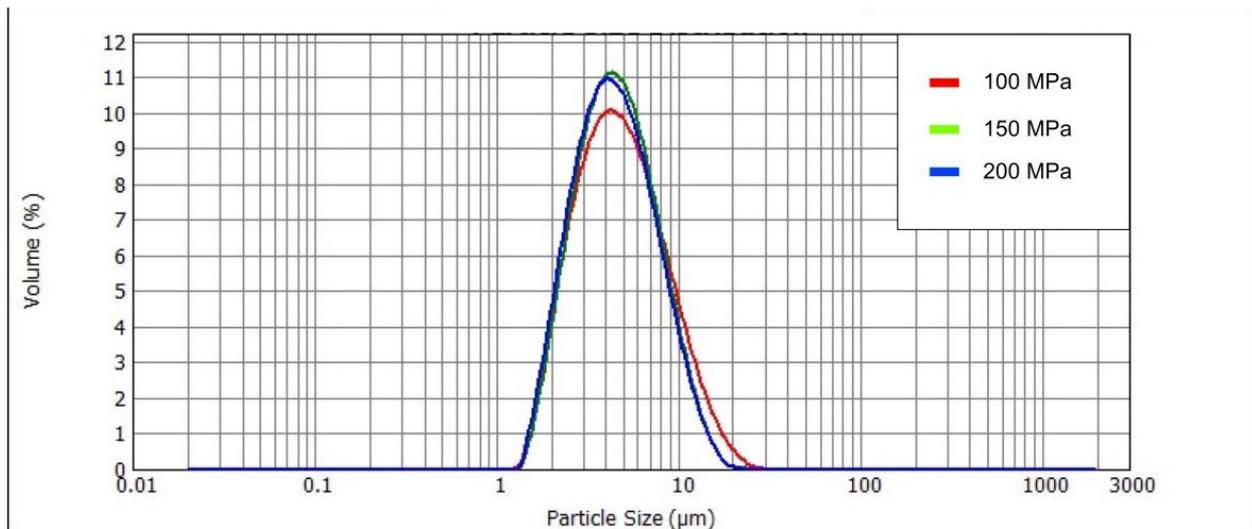


Abbildung 5.8: Veränderung der Partikelgrößenverteilungen von TE-Suspension aus dem Hochdruckhomogenisator bei unterschiedlichen Betriebsdrücken von 100, 150 und 200 MPa (von oben nach unten)

vergleichbare d_{10} -Werte erreicht werden, jedoch sind in den Suspensionen bis mehrere hundert Mikrometer große Partikel vorhanden und eine sehr breite Partikelgrößenverteilung resultiert. Mit Ultra-Turrax suspendierte Zubereitungen erreichen beim d_{10} Wert die 10 μm -Marke nicht und die Verteilung ist ebenfalls verhältnismäßig breit.

Die Messergebnisse sprechen deutlich für eine Zerkleinerung mit Hilfe des Hochdruckhomogenisators, allerdings schränkt die praktische Durchführung diese Methode ein. Zur Herstellung ausreichender Mengen TE-Suspension zur Herstellung von Schaumversuchsreihen war das vorhandene Laborgerät nicht geeignet, da es sehr leicht verstopft.

Wesentlich praktikabler gestaltet sich die Produktion mit der Zahnkolloidmühle, die auch akzeptable Partikelgrößenverteilungen liefert und leicht in größeren Maßstäben zu bewerkstelligen ist. Die Ultraschallsonotrode liefert gute Ergebnisse für Kleinstmengen (1 mL bis 50 mL), jedoch ist es problematisch flotierende TE-Anteile einzuarbeiten. Ultra-Turrax und Kugelmühle scheiden wegen des schlechten Ergebnisses aus.

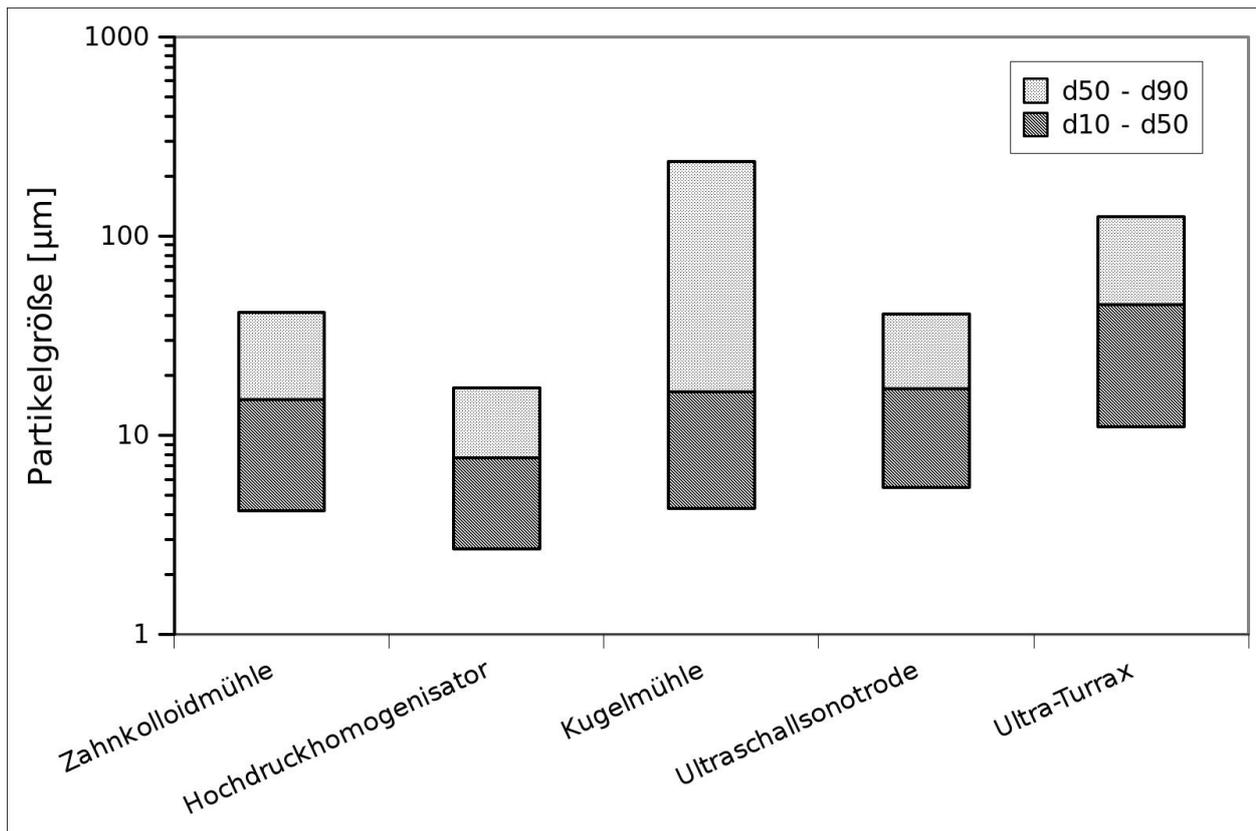


Abbildung 5.9: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von wässrigen TE-Suspensionen, nach unterschiedlicher Herstellungsmethode.

5.3 Vergleich der Methoden zur Schaumdichtebestimmung

Da zur Charakterisierung der Schäume das Aufschäumvolumen bestimmt wurde, lag es nahe diese Messwerte direkt zur Schaumdichteberechnung zu verwenden. Dazu ist nur noch die Masse des Schaums nötig, die über eine einfache Differenzwägung der Aluminium-Druckdose erhalten wurde.

Das Europäische Arzneibuch schlägt eine andere Methode vor. Abb. 5.10 zeigt einen Vergleich der Ph. Eur. Methode und der eigenen Methode als Bestimmung mit den Schaumvolumina in der Bürette.

Die absolut erhaltenen Schaumdichten der Büettenmethode und der Ph. Eur.-Methode

sind statistisch (F-Test) äquivalent. Als Vorteil der Bürettenmethode stellt sich die deutlich geringere Standardabweichung dar ($n = 5$). Der gleichzeitige geringere Versuchsaufwand spricht für die Bürettenmethode, die für die Untersuchungen dann auch verwendet wurde.

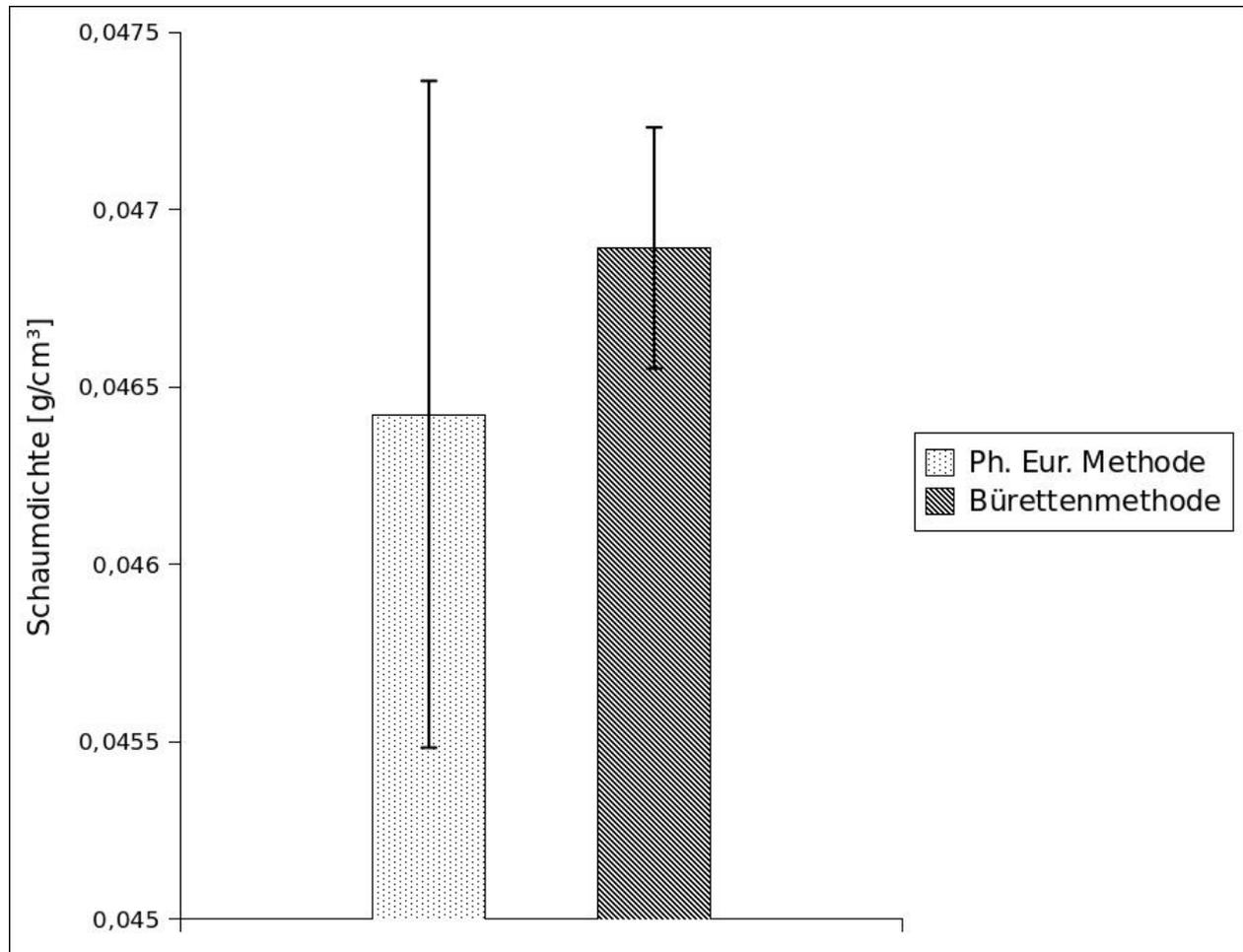


Abbildung 5.10: Vergleich der Schaumdichtebestimmung nach Ph. Eur. und nach der modifizierten Ph.Eur. Methode (Bürettenmethode). $n = 5$.

5.4 Vergleich unterschiedlicher Gelbildner zur Emulsionsstabilisierung

Wie in Abschnitt 5.1 erwähnt, ist zum Erreichen der erwünschten Schaumqualität ein weiterer Stabilisator erforderlich, der selber keine weitere Hautirritation hervorrufen darf und

die Wundheilung nicht behindern soll. Diese Anforderungen erfüllen makromolekulare Stabilisatoren am besten.

Es wurden einige Gelbildner ausgewählt, die auch in Hydrokolloidverbänden Einsatz finden und auf ihre Eignung im Zusammenspiel mit TE untersucht. Im Einzelnen waren das HPMC, Polyacrylsäure, Na-Alginat, Xanthangummi und Natriumcarboxymethylcellulose. Die Emulsionen wurden hergestellt, indem der Gelbildner zur TE-Suspension gegeben, zum Quellen gebracht und anschließend die Ölphase (Sonnenblumenöl) eingearbeitet wurde.

Das unterschiedliche Verhalten, sowie Kompatibilität mit der TE-Suspension wurde sowohl makroskopisch, als auch lichtmikroskopisch erfasst. Abb. 5.11 zeigt einen Ausschnitt aus einer Polyacrylsäure-stabilisierten Emulsion. Man erkennt gut, wie die Öltröpfchen im Gelgerüst immobilisiert sind und keinen Kontakt zu den dunkel erscheinenden TE-Partikeln aufweisen. Man kann davon ausgehen, dass der TE hier, durch den fehlenden Kontakt mit der Grenzfläche, keinen Anteil am Stabilisierungsmechanismus hat.

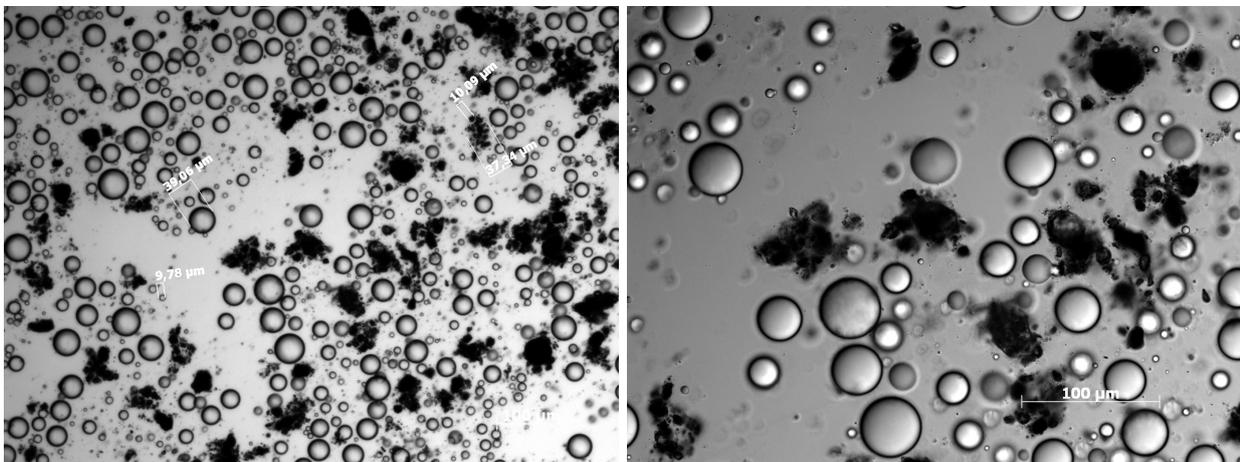


Abbildung 5.11: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % neutralisierter Polyacrylsäure stabilisierten Emulsion.

Ein gänzlich anderes Bild zeigt sich bei Emulsionen, die mit Na-Alginat stabilisiert wurden (Abb. 5.12). Die TE-Partikel werden nicht immobilisiert, sondern wandern in die Öltröpfchen ab, welche dann deformiert und in größeren "Oleogel"-Aggregaten vorliegen. Die Emulsionen sind instabil und zeigen nach kurzer Zeit eine Phasentrennung.

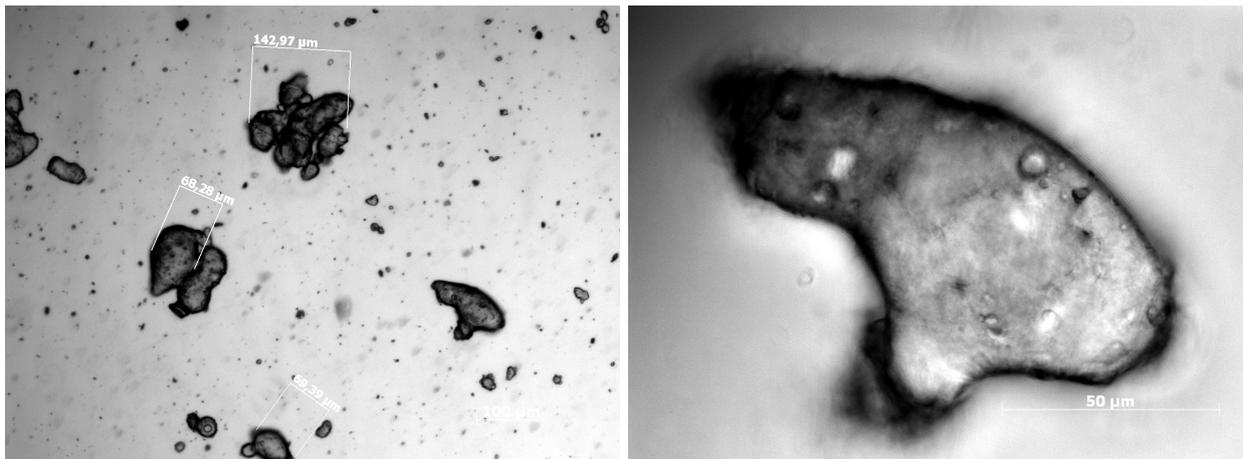


Abbildung 5.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % Na-Alginat stabilisierten Emulsion.

Emulsionen mit Xanthangummi und Natriumcarboxymethylcellulose (Abb. 5.13 & 5.14) zeigen ein Verhalten, das zwischen dem der mit Polyacrylsäure und mit Alginat stabilisierten Emulsionen liegt. Ein Teil der TE-Partikel wandert in die Öltröpfchen ab, während immer noch einige frei in der Gelphase zu erkennen sind. Die Tropfen lagern sich auch hier zu großen Aggregaten zusammen, die zu instabilen Emulsionen führen.

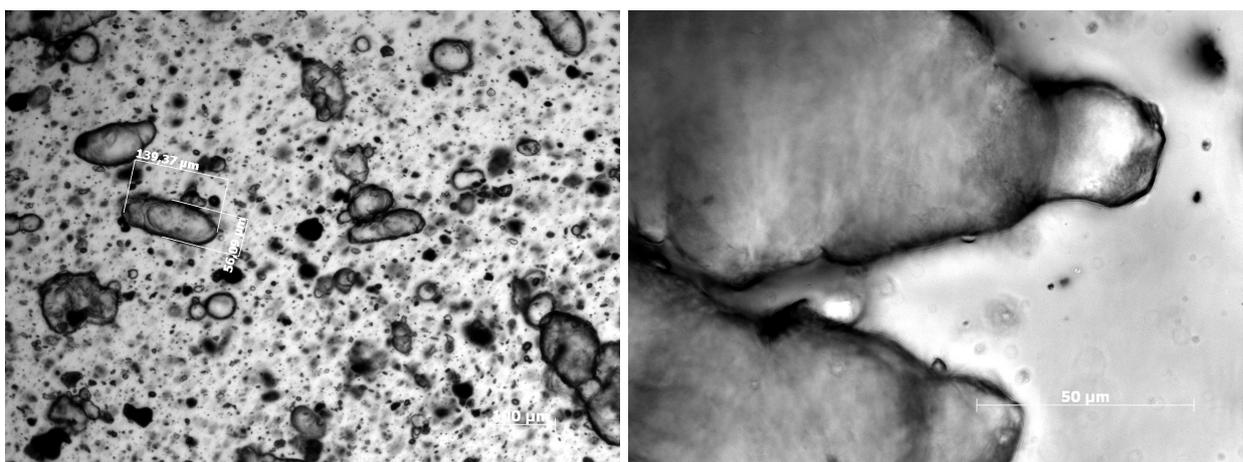


Abbildung 5.13: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % Xanthangummi stabilisierten Emulsion.

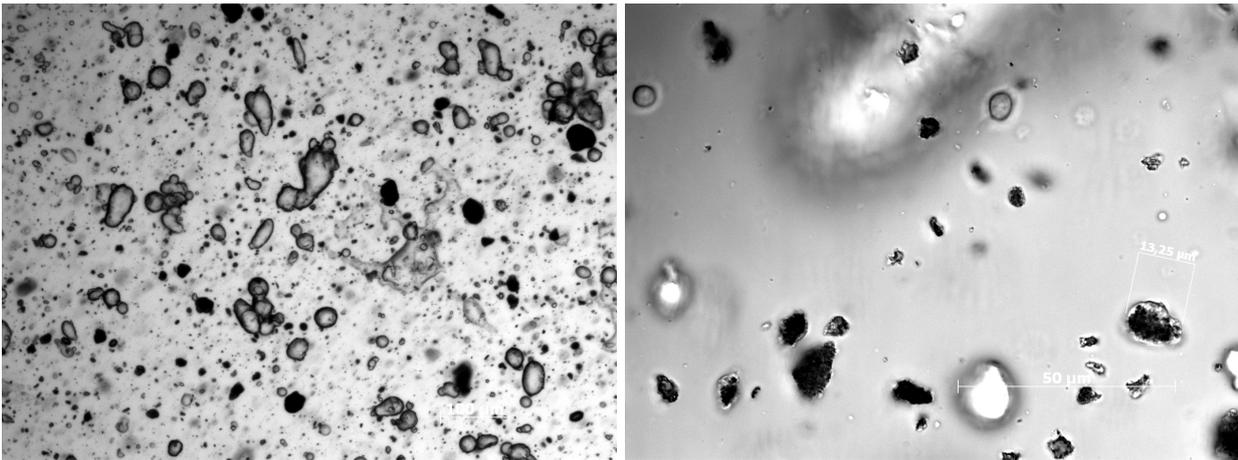


Abbildung 5.14: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % Natriumcarboxymethylcellulose stabilisierten Emulsion.

Das makroskopisch beste Ergebnis zeigt sich bei HPMC-stabilisierten Emulsionen. Es bilden sich homogene Systeme, die sich auch schon mit geringerer Viskosität, als bei den anderen Gelbildnern verwirklichen lassen, was an der Grenzflächenaktivität der HPMC liegt. Im mikroskopischen Bild (Abb. 5.15) zeigen sich hier runde Öltröpfchen und frei vorliegende TE-Partikel, wobei auch hier kein positiver Einfluss der TE-Partikel vermutet werden kann, da sie sich zumindest optisch nicht an der Grenzfläche befinden.

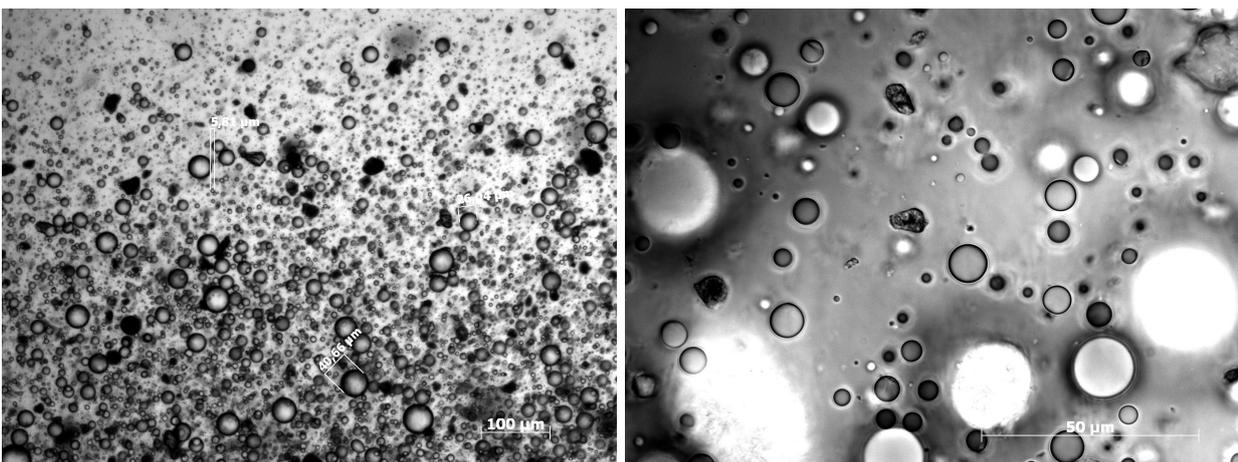


Abbildung 5.15: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % HPMC stabilisierten Emulsion.

Von den untersuchten Gelbildnern erweist sich HPMC als die vielversprechendste Varian-

te, da es die stabilsten Emulsionen erzeugen kann. Die unterschiedlichen Verhalten der Gelbildner lassen sich vermutlich auf drei Prinzipien zurückführen. Erstens auf ihre viskositätserhöhenden Eigenschaften, zweitens ihre Grenzflächenaktivität (GARTI, 1999) und drittens spezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche des TE. Die Zubereitungen unterscheiden sich in ihrer Viskosität, wobei alle noch alleine unter Schwerkrafteinfluss fließfähig sind.

5.5 Einfluss des Treibgasdrucks und der Ölphase auf die Schaumgüte

Zur Untersuchung der Einflüsse von Treibgasen unterschiedlicher Drücke (durch unterschiedliche Propan/Butan-Verhältnisse) wurde eine kleine Versuchsreihe durchgeführt, bei der neben MCT als Ölphase auch Sonnenblumenöl und dickflüssiges Paraffin eingesetzt wurden.

Abb. 5.16 stellt die Ergebnisse dar. Es zeigt sich, dass bei allen Ölphasen die Schaumdichte mit steigendem Treibgasdruck geringer wird und die optische Beurteilung (siehe 4.2.3) einen höheren Score erzielt. Nur bei Paraffin ist die Schaumdichte bei 3,5 bar etwas größer als bei 2,7 bar, liegt aber auch schon vergleichsweise niedrig.

Bei den Ölphasen zeigt sich eine unterschiedliche Eignung zu qualitativ (nach optischer Beurteilung) hochwertigen Schäumen. Mit MCT (Miglyol) werden die schlechtesten Schäume erreicht, mit Paraffin die besten. Sonnenblumenöl ordnet sich in der Mitte ein. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch gleichzeitig in der Schaumdichte, die bei MCT am höchsten ist und bei gleicher sonstiger Zusammensetzung über Sonnenblumenöl zu Paraffin geringer wird.

Nr.	Ölphase	Treibgasdruck	Optische Beurteilung	Schaumdichte [g/ml]
1	Miglyol	1,2	2,75	0,163
3	Miglyol	2,7	3	0,114
5	Miglyol	3,5	3,25	0,101
2	Sonnenbl.öl	1,2	3,25	0,106
4	Sonnenbl.öl	2,7	4,25	0,078
6	Sonnenbl.öl	3,5	4,5	0,071
7	Paraffin	1,2	5,5	0,086
8	Paraffin	2,7	6	0,055
9	Paraffin	3,5	7	0,064

Abbildung 5.16: Zusammenfassung der Ergebnisse des Treibgasdrucks auf die optische Beurteilung und die Schaumdichte.

5.6 Versuchsdesigns zur Bestimmung der Einflüsse auf die Schaumqualität

Zur Bestimmung der optimalen Zusammensetzung einer Schaumzubereitung aus TE, HPMC, Wasser, Paraffin und Treibgas wurde ein statistisches Versuchsdesign durchgeführt, mit dem Ziel der Auswertung über eine Hauptkomponentenanalyse (siehe 4.4). Schäume mit Paraffin als Ölphase wiesen in Vorversuchen die besten Schaumeigenschaften auf, während Sonnenblumenöl als Ölphase in den Wundmodellen der Projektpartner die beste Wirkung zeigte (STEINBRENNER ET AL., 2016). Es wurden zwei unterschiedliche Designs mit der jeweiligen Ölphase zur Optimierung der Formulierungen durchgeführt.

5.6.1 Paraffin als Ölphase

Die Zusammensetzung der untersuchten Zubereitungen wird aus Tabelle 5.1 ersichtlich. Die laufende Nummer der ersten Spalte gibt die durch Randomisierung erhaltene Herstellungs- und Vermessungsreihenfolge an. Der Variationsbereich der einzelnen Bestandteile ergibt sich aus Vorversuchen und wird jeweils durch einen Hoch-, Tief- und Zentralpunkt gebildet. Gleichzeitig sind in der Tabelle auch die Ergebnisse der Schaumdichtemessung und optischen Beurteilung zusammengefasst.

Der TE-Anteil wird von 2 und 4 % (m/m) variiert, der Paraffinanteil von 10 und 20 % (m/m), der Treibgasanteil von 5 bis 10 % (m/m), der HPMC-Anteil von 1 bis 2 % (m/m) - der Rest zu 100 % (m/m) wird von der Wasserphase eingenommen.

Tabelle 5.1: Zusammensetzung der Zubereitungen des Versuchsdesigns. Die Nummer gibt die randomisierte Herstellreihenfolge an.

Nr.	TE- anteil	Paraffin- anteil	Treibgas- anteil	HPMC- Anteil	optische Beurteilung	Schaum- dichte [g/ml]
1, 4, 11	0,02	0,1	0,05	0,01	5,75	0,114
5, 7, 10	0,02	0,1	0,1	0,02	6,42	0,048
8, 17, 20	0,02	0,2	0,05	0,01	5,17	0,126
9, 13, 24	0,02	0,2	0,1	0,02	6,58	0,055
14, 19, 25	0,03	0,15	0,075	0,015	6,75	0,063
12, 21, 26	0,04	0,1	0,05	0,02	5,58	0,112
2, 15, 18	0,04	0,1	0,1	0,01	4,33	0,048
3, 6, 16	0,04	0,2	0,05	0,02	5,83	0,140
22, 23, 27	0,04	0,2	0,1	0,01	4,17	0,043

Die Aufschlüsselung der einzelnen Scores, aus denen sich die optische Beurteilung ergibt ist in Tabelle 5.2 aufgetragen (siehe hierzu auch 4.2.3). Hier finden sich auch die Messergebnisse der Schaumdichte.

Tabelle 5.2: Ergebnisse der optischen Beurteilung im Einzelnen. Der Score ergibt sich als Mittelwert von "Feinporigkeit", "Stabilität", "Aussehen" und "Expansionszeit", die jeweils auf einer arbiträren Skala von 1 bis 10 (10 als ideales Ergebnis), mit Referenzschäumen als Vergleich beurteilt wurden.

Alle Scores auf einer Skala von 1 bis 10 (mit 10 als Bestnote)

Nr.	Feinporigkeit	Stabilität	Aussehen	Expansionszeit	Score	Mittelwert Score	Schaumdichte [g/ml]	mittlere Schaumdichte
22	3	3	4	7	4.25	4.167	0.047	0.043
23	3	3	4	7	4.25		0.042	
27	3	3	4	6	4		0.041	
12	7	9	4	3	5.75	5.583	0.128	0.112
21	7	9	4	2	5.5		0.101	
26	7	9	4	2	5.5		0.106	
14	6	9	6	8	7.25	6.75	0.065	0.063
19	6	9	5	6	6.5		0.065	
25	7	9	5	5	6.5		0.058	
5	6	9	6	6	6.75	6.417	0.047	0.048
7	7	9	5	7	7		0.046	
10	6	7	4	5	5.5		0.050	
1	7	8	6	4	6.25	5.75	0.085	0.114
4	6	6	6	2	5		0.152	
11	6	7	5	6	6		0.104	
3	6	9	6	3	6	5.75	0.120	0.140
6	7	9	6	3	6.25		0.161	
16	7	9	3	1	5		0.139	
8	8	8	4	1	5.25	5.167	0.155	0.126
17	6	7	4	2	4.75		0.120	
20	7	7	4	4	5.5		0.103	
9	7	9	6	6	7	6.583	0.059	0.055
13	6	9	5	6	6.5		0.059	
24	7	9	5	4	6.25		0.047	
2	4	3	5	7	4.75	4.333	0.059	0.048
15	3	3	4	7	4.25		0.043	
18	3	3	4	6	4		0.044	
Haarmousse	6	7	5	2	5	5	0.058	0.058
Rasierschaum	10	9	6	10	8.75	8.75	0.050	0.050

Zur Auswertung der Daten wurden zwei Modelle herangezogen. Einmal eine Modellierung, die sich direkt aus dem erstellten „Custom Design“ (DoE) der Software JMP ergibt, sowie eine Hauptkomponentenanalyse, um die multivariaten Einflüsse besser greifbar zu machen.

Für das Design wurden die einzelnen Bestandteile als Einflüsse gesetzt und als Antwortparameter, nach denen ausgewertet wird, die optische Beurteilung, sowie die Schaumdichte gewählt. Abb. 5.17 stellt die Ergebnisse des Modells dar. Im linken Teil ist die Güte der Vorhersage graphisch dargestellt, in dem erwartete und tatsächliche Daten dargestellt sind.

Für die optische Beurteilung wirkt sich der HPMC-Anteil signifikant in positiver Richtung aus, während der TE-Anteil einen signifikanten Einfluss in die negativer Richtung zeigt. Die restlichen Einflüsse und Kombinationen zeigen keine Signifikanz. Das bedeutet also, dass die Schaumqualität nach den untersuchten Kriterien besser wird, wenn der HPMC-Anteil erhöht und der TE-Anteil verringert wird.

Die Schaumdichte wird nur vom Treibgasanteil signifikant in negativer Richtung beeinflusst. Dies ist insofern zu erwarten, da das druckverflüssigte Propan/Butan-Gemisch die treibende Kraft beim Aufschäumvorgang darstellt.

Ein detaillierteres Bild zeigt sich bei Anwendung einer Hauptkomponentenanalyse, dargestellt in Abb. 5.18.

Im unteren Teil der Graphik ist die Komponentenmatrix aufgetragen, links oben sind die Eigenwerte gegen ihren Anteil an der Gesamtvarianz dargestellt und in der Mitte oben sind Hauptkomponente 1 gegen Hauptkomponente 2 aufgetragen. Zusammen machen sie 67,3 % der Gesamtvarianz des Systems aus. Im runden Diagramm rechts oben sind die Einflüsse und Antwortparameter in Richtung und Stärke sehr übersichtlich dargestellt. Lange Pfeile bedeuten einen starken Einfluss, kurze einen geringen. Pfeile gleicher Richtung bedeuten eine positive Korrelation, während orthogonale Pfeile eine nicht vorhandene Korrelation anzeigen.

Man erkennt auch hier wieder eine starke negative Korrelation zwischen Treibgasanteil

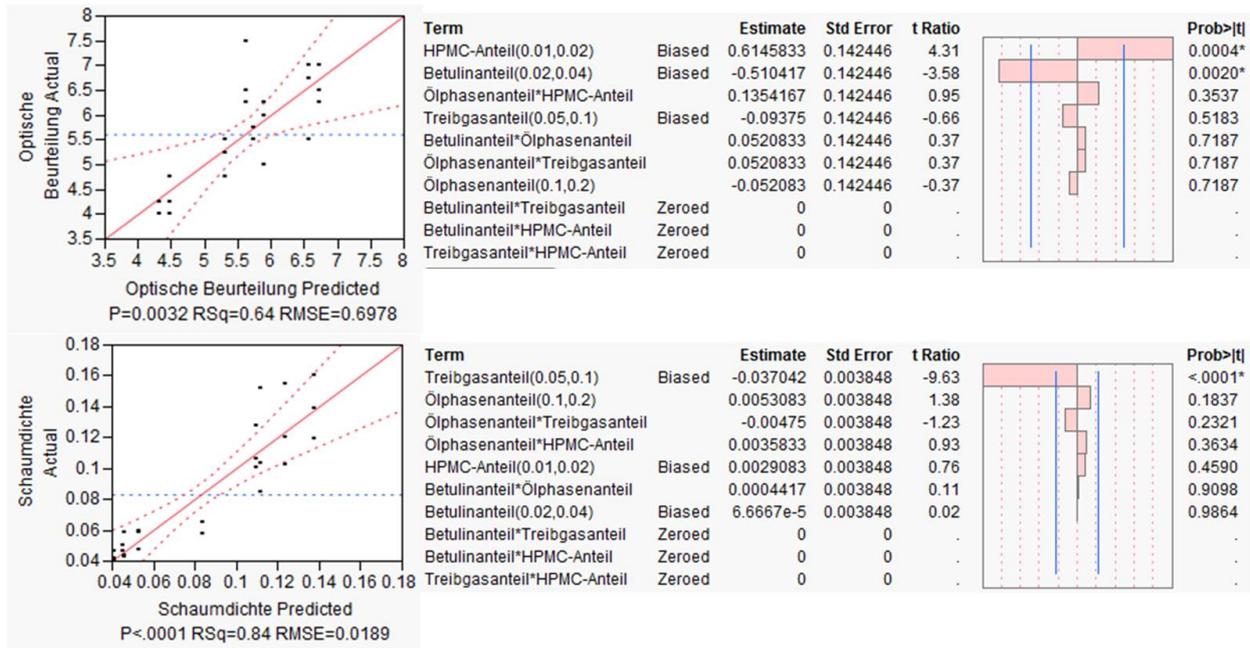


Abbildung 5.17: Darstellung der berechneten Haupteinflüsse auf die Parameter “Optische Beurteilung” und “Schaumdichte”. Graphik erstellt mit JMP.

und Schaumdichte. Weiterhin wird die Expansionszeit direkt vom Treibgasanteil beeinflusst. Der Paraffinanteil zeigt einen geringen erhöhenden Einfluss auf die Schaumdichte.

Beinahe orthogonal und damit unabhängig zu diesen Parametern zeigen sich die Einflüsse auf den Score der optischen Beurteilung. Hier ist der Betulinanteil zu erwähnen, der sich negativ auf den Score auswirkt, sowie der HPMC-Anteil, der einen positiven Einfluss hat. Die Feinporigkeit und Stabilität korrelieren relativ stark und werden sowohl vom Treibgas- und Betulinanteil in negativer, sowie vom HPMC-Anteil in positiver Richtung beeinflusst.

Abb. 5.19 & 5.20 fassen die Messdaten noch einmal graphisch zusammen. Abb. 5.19 zeigt einen "Surface Plot" der Schaumdichte (unten) und der optischen Beurteilung (oben) gegen den TE- und HPMC-Anteil. Diese Darstellung wurde gewählt, um den Zusammenhang gleich mehrerer Komponenten mit den Antwortparametern darzustellen.

Abb. 5.20 zeigt ein ähnliches Schaubild, aber hier gegen Treibgasanteil und Ölphasenanteil aufgetragen. Man erkennt bei Betrachtung der optischen Beurteilung ein Maximum

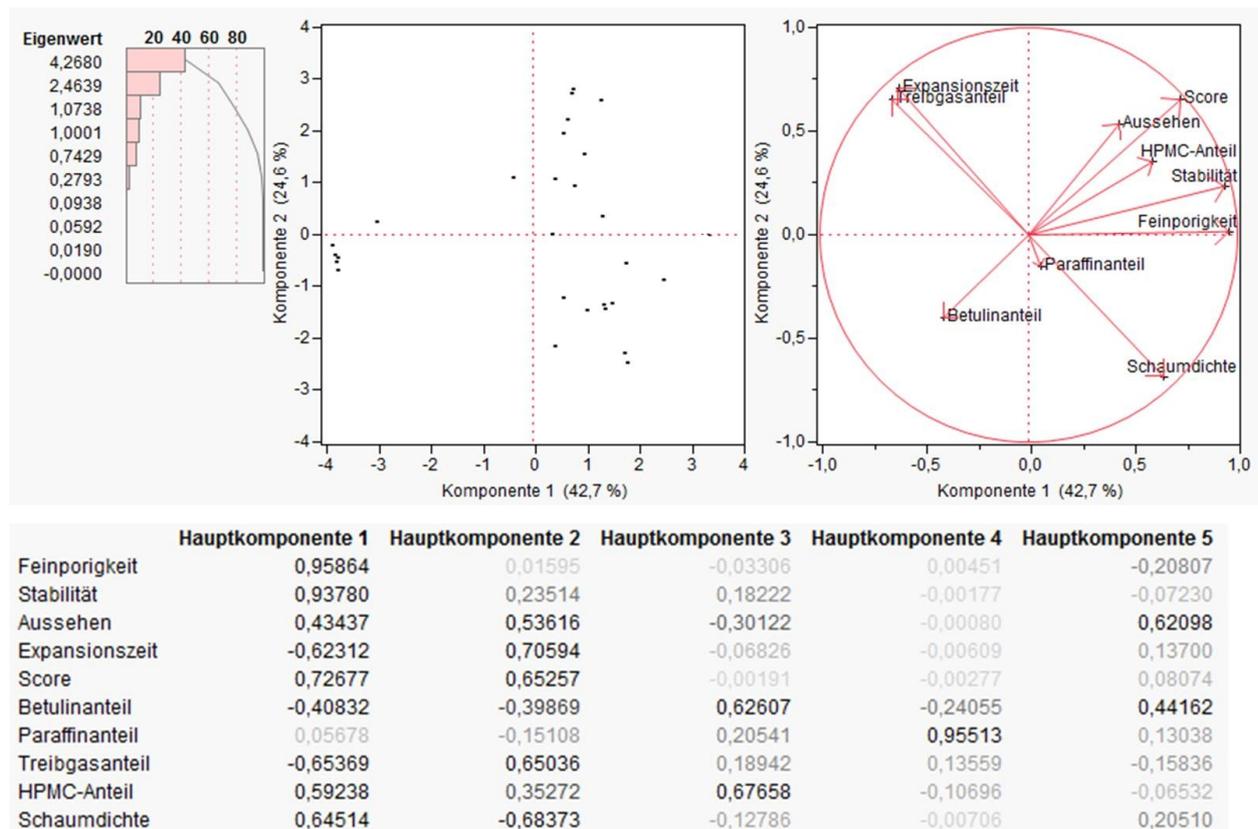


Abbildung 5.18: Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse in graphischer Darstellung. Abbildung generiert mit JMP.

im Zentralpunkt, was hierfür die optimale Schaumzusammensetzung darstellt. Für die Schaumdichte lässt sich kein sinnvolles Optimum bestimmen.

Die Zusammensetzung mit der besten optischen Beurteilung, die aus diesen Versuchen erhalten wurde, besteht also aus 3 % TE, 15 % Paraffin, 7,5 % Propan/Butan-Treibgasgemisch von 3,5 bar Sättigungsdampfdruck, 1,5 % HPMC und 73 % Wasser zusammen.

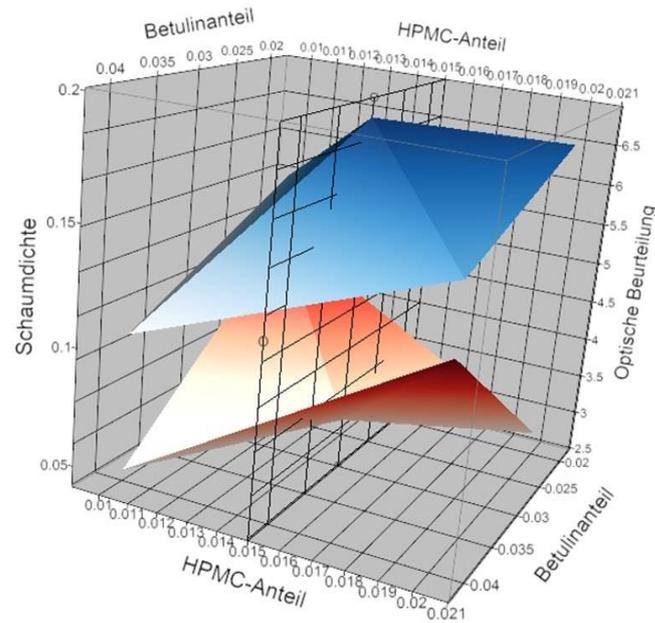


Abbildung 5.19: Surface Plot, der die Schaumdichte (unten, rot) und den Score der optischen Beurteilung (oben, blau) aufgetragen gegen Betulinanteil und HPMC-Anteil zeigt.

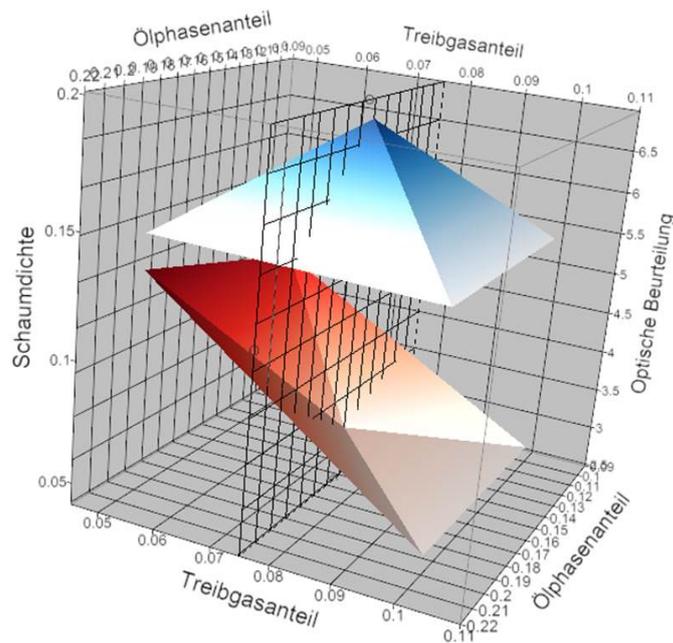


Abbildung 5.20: Surface Plot, der die Schaumdichte (unten, rot) und den Score der optischen Beurteilung (oben, blau) aufgetragen gegen Ölphasenanteil und Treibgasanteil zeigt.

5.6.2 Sonnenblumenöl als Ölphase

Während die Schäume mit Paraffin als Ölphase auf eine optimale Schaumqualität ausgerichtet waren, so zeigt dieses keinen positiven Einfluss auf die Wundheilung. Es wurde daher eine zweite Versuchsreihe mit Sonnenblumenöl als Ölphase durchgeführt, welches als Oleogel mit TE gute Wundheilungseigenschaften aufzeigt (EBELING ET AL., 2014). Mit dem Ziel die Hautverträglichkeit zu optimieren wurde für diese Versuchsreihe auch die Wasserphase durch isotonen NaCl-haltigen Phosphatpuffer, pH 7,4 ersetzt.

Die Bewertung der Antwortparameter wurde für diese Versuchsreihe verbessert und objektiviert, indem die Blasengrößenverteilung der Schäume mit Hilfe einer Stereolupe ausgezählt wurde (siehe 4.2.3) und dieser Vorgang nach 30 s wiederholt wurde, um eine Aussage über die Stabilität der Schäume treffen zu können.

Die initiale Aufschäumgeschwindigkeit, welche die Volumenzunahme des Schaums als Anstieg in der Messburette in den ersten 10 s (siehe Aufschäumbarkeit 4.2.3) in cm/s darstellt, wurde als weiterer Parameter mit aufgenommen. Weiterhin wurde der Ölphasenanteil mit 15 % konstant gehalten, da sich gezeigt hat, dass der Einfluss auf die Qualität des Schaums sehr gering ist.

Tab. 5.3 zeigt die Zusammensetzungen der untersuchten Zubereitungen.

Abb. 5.21 zeigt beispielhaft, wie sich die Schäume unter der Stereolupe darstellen. Abgebildet ist oben ein relativ stabiler TE-haltiger Schaum. Man erkennt wie sich die Blasen über 30 s vergrößern, der Schaum aber über diese Zeit noch nicht komplett zusammenfällt. Darunter ist der sehr stabile Rasierschaum abgebildet. Hier lässt sich über 30 s kein Unterschied in der Blasengröße feststellen.

Das deutlich instabilere Haarmousse zeigt nach 30 s schon eine gewisse Vergrößerung, im Vergleich. Als letztes ist ein Beispiel eines instabilen TE-Schaums aufgezeigt, der stark zusammen fällt und teilweise nur noch einen Flüssigkeitsfilm auf dem Objektträger zurücklässt. Die große Blase ist eingezeichnet und man erkennt, dass dort nur kleine Bläschen am Objektträger haften. Weil dieser Zerfall teilweise schwer auf dem vergö-

Tabelle 5.3: Zusammensetzung der Zubereitungen des Versuchsdesigns mit Sonnenblumenöl als Ölphase.

Nr.	TE- Anteil-	Sonnen- blumenöl- anteil	Treibgas- anteil	HPMC- Anteil	PBS- anteil
5, 16	0,02	0,15	0,05	0,01	0,77
15, 18	0,02	0,15	0,1	0,01	0,72
3, 7	0,02	0,15	0,05	0,02	0,76
2, 10	0,02	0,15	0,1	0,02	0,71
6, 13	0,04	0,15	0,05	0,01	0,75
1, 4	0,04	0,15	0,1	0,01	0,7
8, 14	0,04	0,15	0,05	0,02	0,74
12, 17	0,04	0,15	0,1	0,02	0,69
9, 11	0,03	0,15	0,075	0,015	0,73

Berten Bild zu erkennen ist, ist eine optische Kontrolle des Schaums nach der Messung unabdingbar.

Abb. 5.22 zeigt das Ergebnis der Blasengrößen als Spannweiten nach 0 und 30 s nach Aufschäumen. Man erkennt bei praktisch allen Proben eine Vergrößerung der größten Blasen nach 30 s. Das Verhältnis dieser Vergrößerung wurde als Stabilitätsfaktor "Coarsening" (Vergrößerung) verwendet. Die "Gleichmäßigkeit" der Schäume wurde auch als Parameter mit aufgenommen. Hierfür wurde das Verhältnis der größten zur kleinsten Blase zum Zeitpunkt 0 s (direkt nach dem Aufschäumen) der Stereolupenmessung verwendet.

Abb. 5.23 fasst das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse zusammen. Eine gemeinsame Pfeilrichtung bedeutet wieder direkte Korrelation, Pfeile entgegengesetzter Richtung bedeuten eine umgekehrte Korrelation, orthogonale Pfeile bedeuten keine Korrelation, während die Länge der Pfeile jeweils die Stärke des Einflusses darstellt.

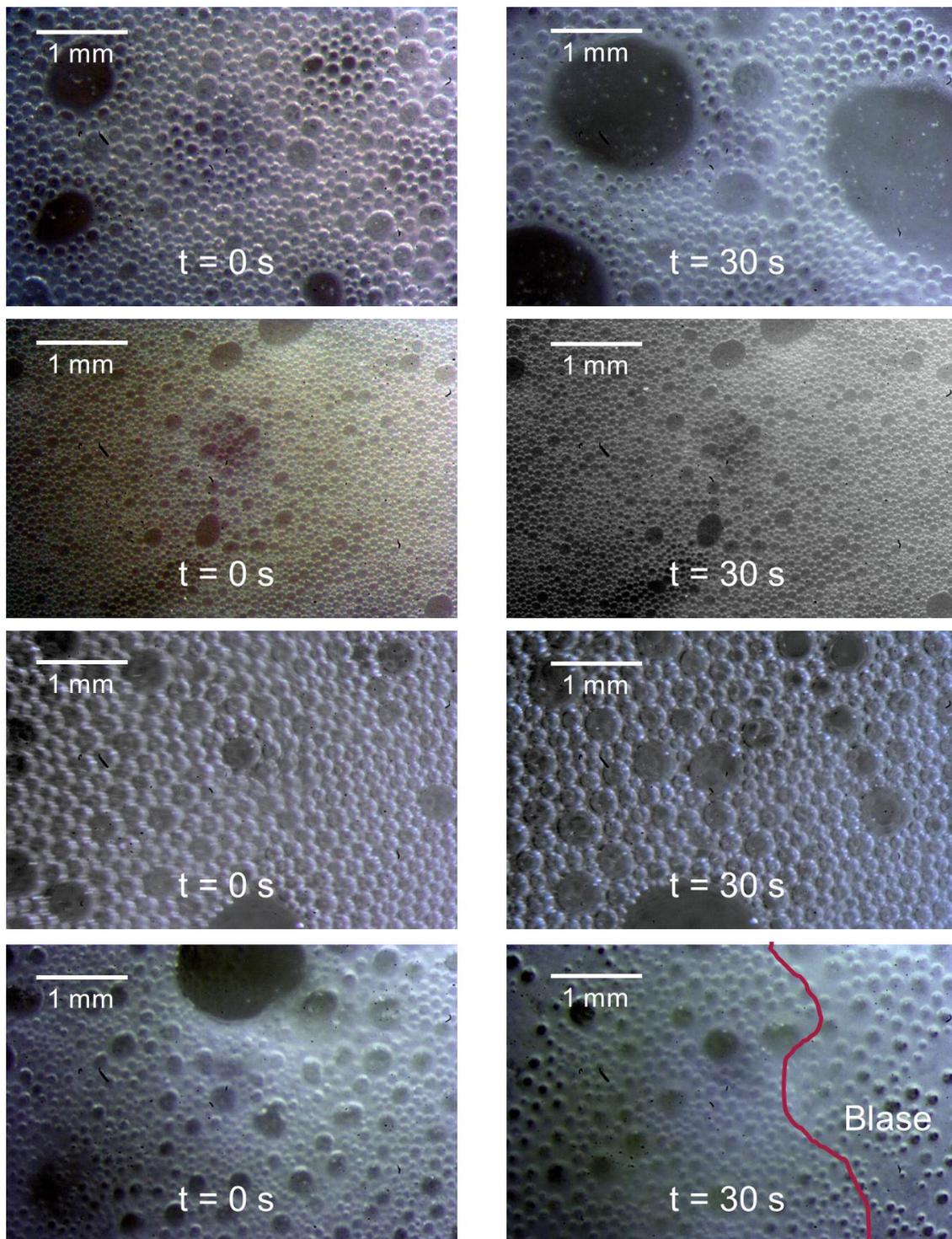


Abbildung 5.21: Schaumaufnahmen mit der Stereolupe zur Blasengrößenverteilung und Stabilität. Links immer zum Zeitpunkt 0 s, rechts nach 30 s. Von oben nach unten: stabiler TE-Schaum, Rasierschaum, Haarmousse, instabiler TE-Schaum.

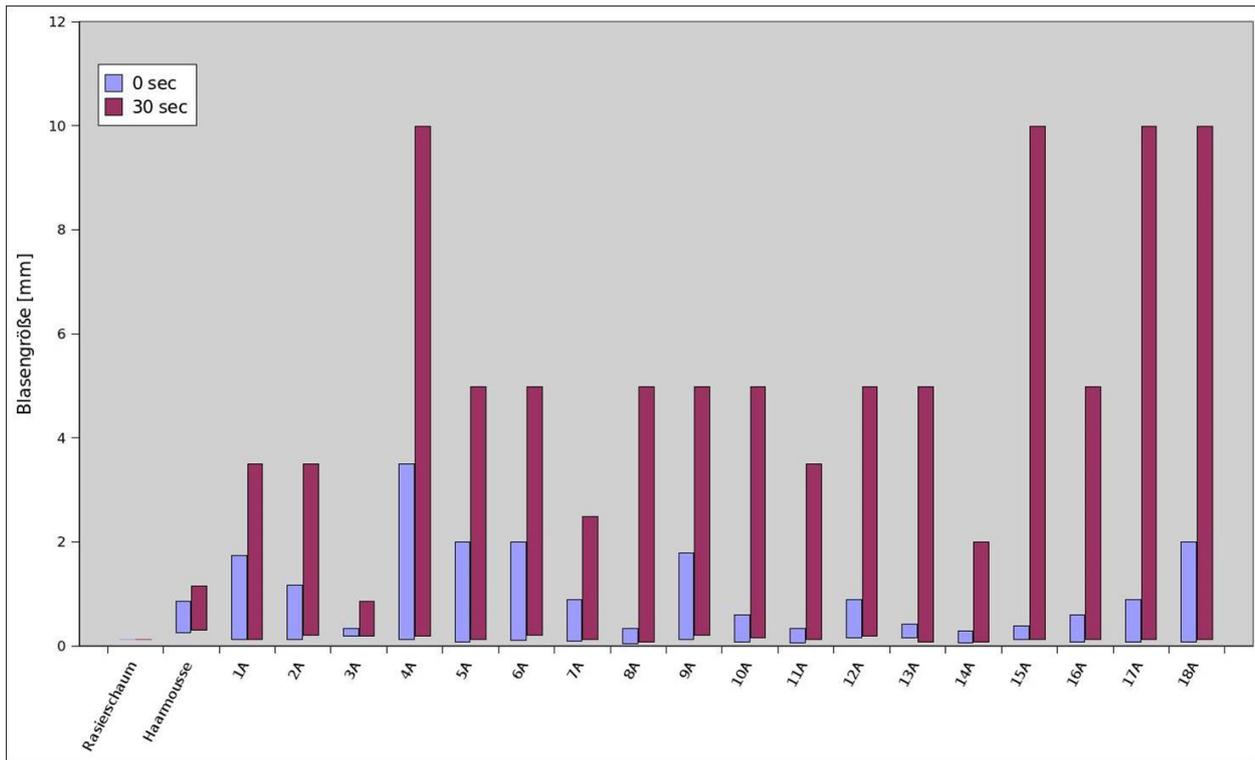


Abbildung 5.22: Die Spannweiten der Blasengrößen der untersuchten Schäume. Jeweils nach 0 s und 30 s nach dem Aufschäumen.

Die initiale Aufschäumgeschwindigkeit zeigt eine gute Korrelation mit dem HPMC-Anteil und eine leichte negative Korrelation mit dem TE-Anteil. Interessanterweise ist kein großer Zusammenhang mit dem Treibgasanteil zu erkennen, der schon wörtlich die treibende Kraft hinter dem Vorgang ist. Zu diesen Werten ist anzumerken, dass eventuell die Messung nach zehn Sekunden keine große Unterscheidung zwischen den Zubereitungen mehr zulässt und man in kürzeren Abständen, im besten Fall automatisiert, messen müsste, um deutliche Unterschiede zu erkennen. Was in dieser Messung nicht erfasst wird, ist die Schaumqualität innerhalb der Bürette. Hierfür wurde der Parameter "Coarsening" aufgenommen.

Das "Coarsening", d.h. die Vergrößerung der Blasen, wird nur leicht vom Pufferanteil in positiver Richtung und vom Treibgasanteil und TE-Anteil in negativer Richtung beeinflusst. Insgesamt ist der Einfluss aber als sehr gering zu bewerten.

Ähnlich verhält es sich mit der Schaumdichte, die etwas in negativer Richtung vom HPMC- und Treibgasanteil beeinflusst wird.

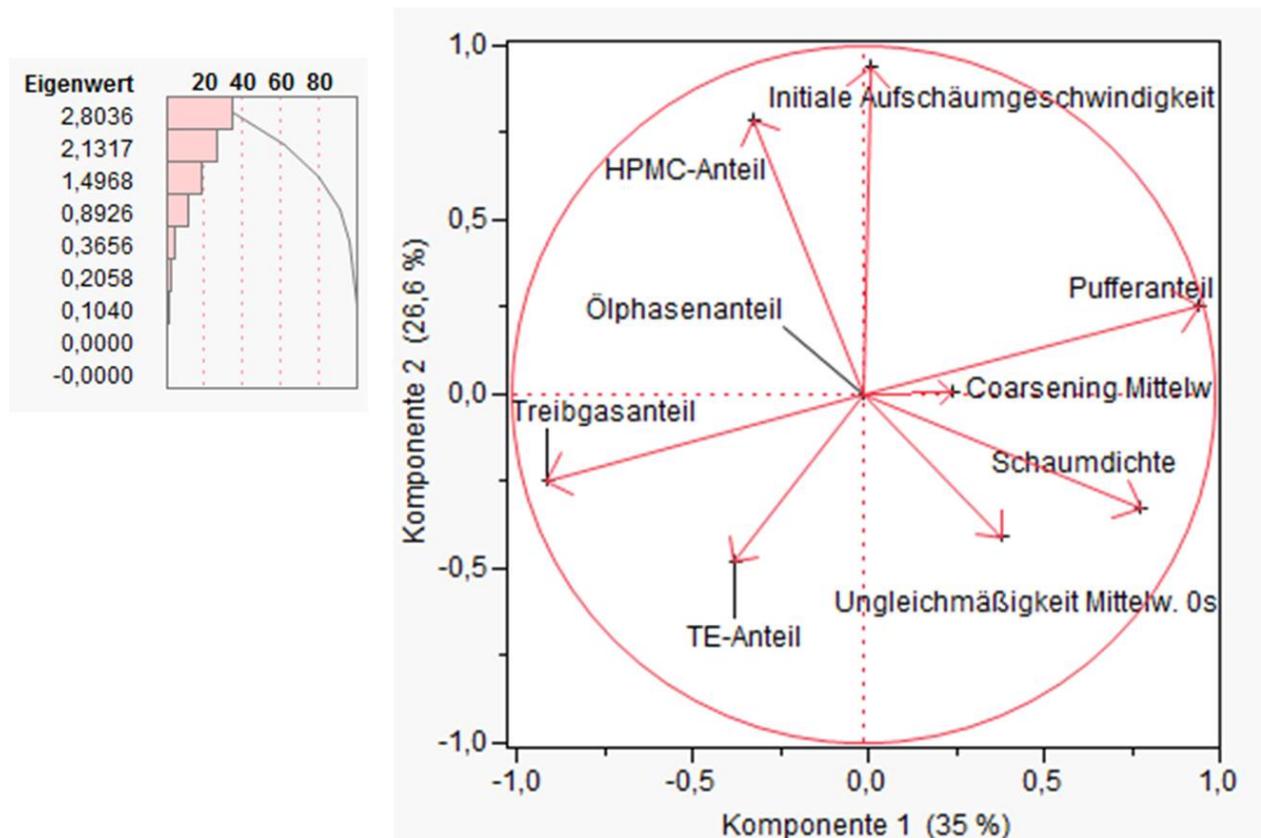


Abbildung 5.23: Darstellung der Korrelationen aus der Hauptkomponentenanalyse (61,6 % der Gesamtvarianz durch die Komponenten 1 und 2 abgedeckt).

Die Gleichmäßigkeit der Blasenverteilung zeigt nur eine positive Korrelation mit dem HPMC-Anteil, die anderen Einflüsse sind sehr gering. Ein höherer HPMC-Anteil sorgt für eine homogenere Blasenverteilung und ein gleichmäßigeres Aussehen der Schäume.

Abb. 5.24 stellt diese Zusammenhänge noch einmal zusammenfassend in tabellarischer Form dar.

	TE-Anteil	HPMC-Anteil	Treibgasanteil	PBS-Anteil
Schaumdichte	0	--	--	++
Gleichmäßigkeit	0	+++	+	-
Initiale Aufschäumgeschwindigkeit	--	+++	-	+
Zerfall der Blasen	-	--	---	+++

Abbildung 5.24: Übersicht der Einflüsse der Bestandteile der Schäume auf die untersuchten Parameter. 0 bedeutet kein Einfluss, - Einfluss in negativer Richtung, + Einfluss in positiver Richtung.

5.7 Zetapotentiale

Aufgrund des Anteils von Carbonsäuren im TE (Betulinsäure und Oleanansäure, vgl. 2.2.1 und 3.1.1) ist ein pH-abhängiges Benetzungs- und Dispersionsverhalten denkbar. Um dies zu untersuchen, wurden wässrige Suspensionen nach 4.2.2 hergestellt und mit dem Zetasizer Nano ZS vermessen. Der pH-Verlauf wurde von pH 9 bis pH 5 in pH-Schritten von 1 titriert. Abb. 5.25 zeigt die Ergebnisse der Messungen.

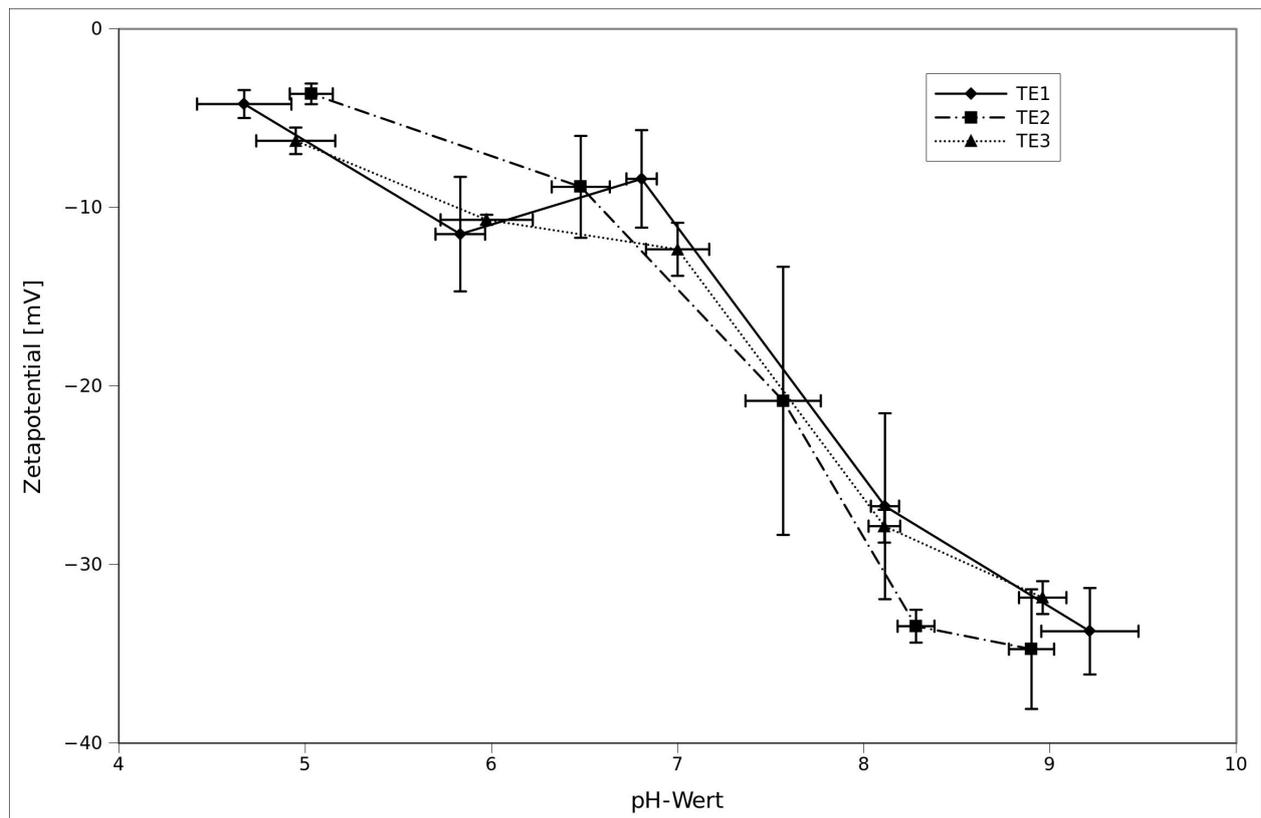


Abbildung 5.25: Zetapotentialkurven der Extraktchargen TE1, TE2 und TE3 über den pH-Wert.

Alle drei Extraktchargen (TE1, TE2 und TE3) zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Im basischen Bereich bei pH 9 liegen die Zetapotentiale bei -30 mV bis -40 mV und steigen im Laufe der Titration auf Werte um die -5 mV bei pH 5 an. Eine sprunghafte Änderung der S-förmigen Zetapotentialkurve lässt sich zwischen pH 7 und pH 8 erkennen, was auf den pKs-Wert des untersuchten Systems hinweist.

In wässrigen TE-Suspensionen ist also eine deutliche pH-Abhängigkeit des Zetapotentials festzustellen. Als Faustregel zur Flockungsstabilität von Suspensionen, kann man

von stabilen Suspensionen ab einem Betrag des Zetapotentials von 30 mV sprechen. Unter 20 mV sind sie beschränkt stabil und unter 5 mV tritt ausgeprägte Flockung auf (MÜLLER, 1996). Die TE-Suspensionen zeigen beim physiologischen Plasma-pH-Wert von 7,4 Zetapotentialwerte von ca. -15 mV, was auf eine beschränkte Stabilität schließen lässt. Unter der Annahme, dass eine ungepufferte Zubereitung den Haut-pH-Wert von 5,5 annimmt, wäre bei Zetapotentialen von -5 bis -7 mV mit Flockung zu rechnen. Dies ist allerdings hauptsächlich ein Problem der Lagerstabilität und eine Flockung nach Applikation spielt praktisch keine Rolle mehr, weshalb für die Formulierung pH 7,4 verwendet werden kann.

5.8 pH-Abhängigkeit der Benetzungswinkel

Es wurden TE-Presslinge der Extraktchargen TE1, TE2 und TE3 hergestellt (Methode siehe 4.1.5) und Pufferlösungen der pH-Werte pH 5, pH 7 und pH 9 als Tropfen auf die Oberfläche aufgebracht (Ein Beispiel hierzu siehe Abb. 5.26). Aufgrund der abwei-

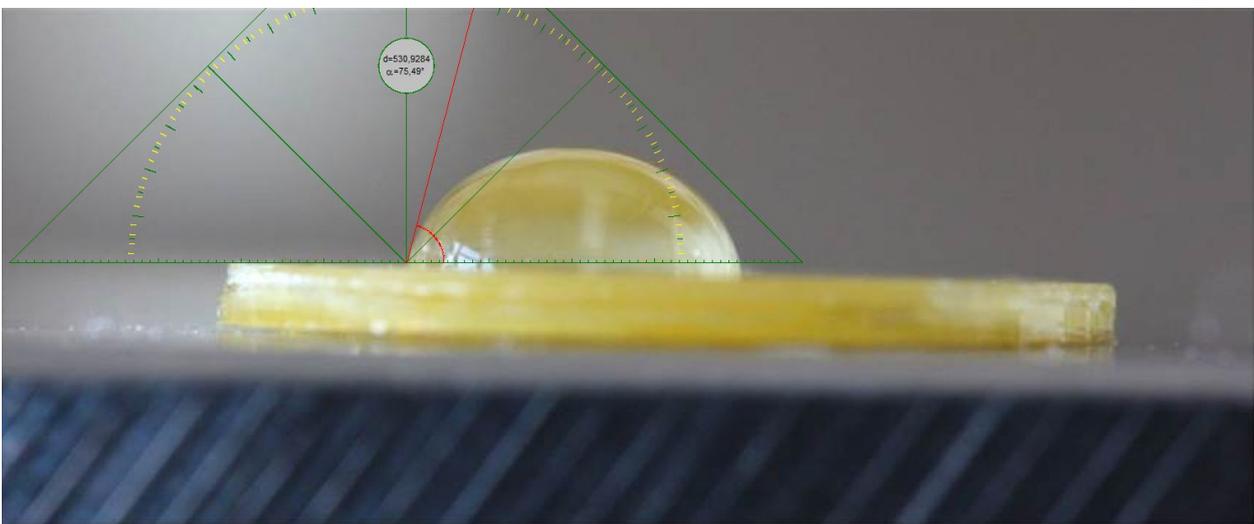


Abbildung 5.26: Beispielhafte Abbildung eines Puffertropfens auf einem TE-Pressling.

chenden Kompressionseigenschaften des TE3 konnten mit diesem Extrakt keine planen Presslinge hergestellt werden und die Messung wurde nicht durchgeführt. Bei den anderen Kombinationen wurden Vierfachmessungen durchgeführt.

Abb. 5.27 zeigt die erhaltenen relativen Benetzungswinkel. Zur klareren Darstellung der Fehlerbalken wurde die y-Achse bei 75° abgeschnitten. Man erkennt, dass sich die Ex-

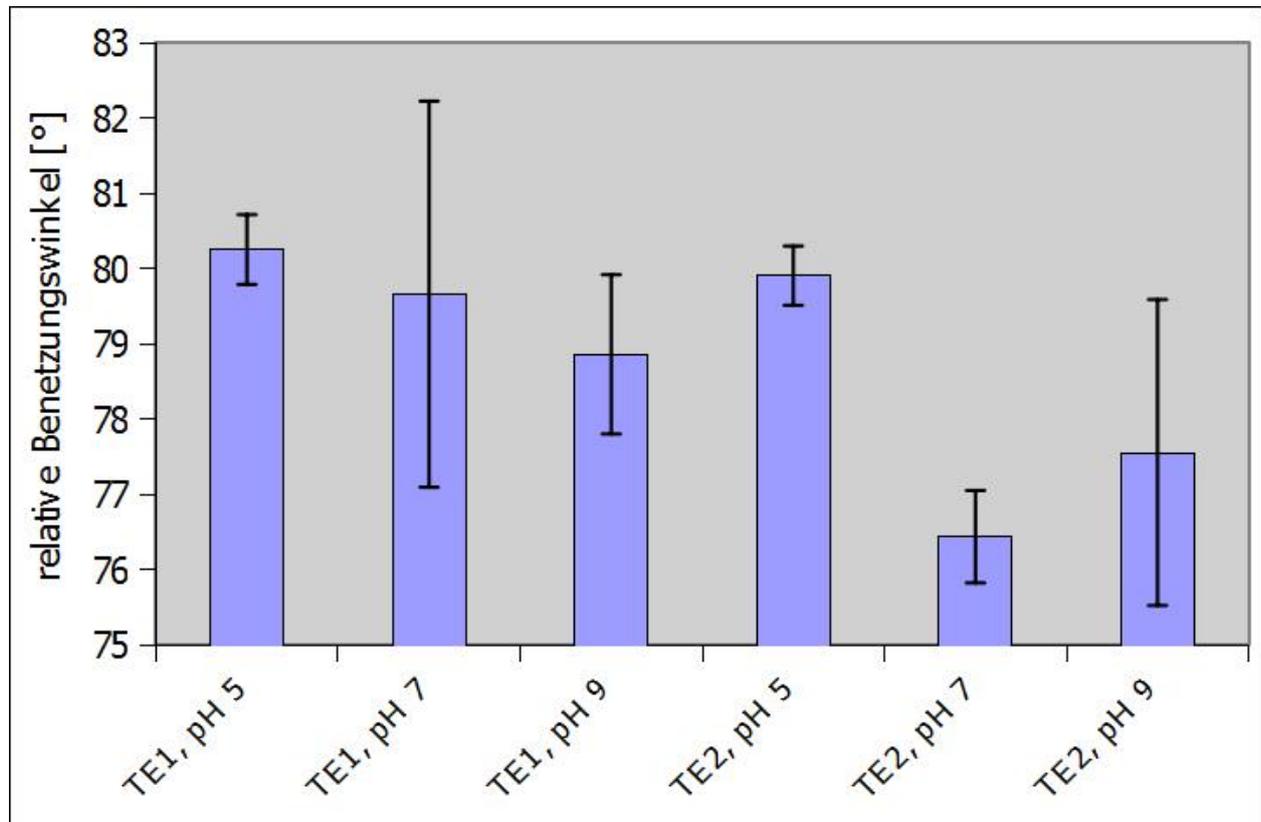


Abbildung 5.27: Erhaltene relative Benetzungswinkel bei unterschiedlichen pH-Werten auf Presslingen aus TE1 und TE2.

traktchargen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Ein Benetzungswinkel von unter 90°, wie er bei allen Proben auftritt, spricht für eine spontane Benetzung.

Ein klarer pH-Trend lässt sich aufgrund der großen Standardabweichungen ebenfalls nicht erkennen, wobei man zumindest bei TE2 einen signifikant höheren Benetzungswinkel bei pH 5 zu pH 7 feststellt.

Ein derartiger Einfluss lässt sich über die Zusammensetzung des TE erklären (siehe auch 3.1.1): Die enthaltenen Carbonsäuren Betulinsäure und Oleanolsäure liegen im sauren Bereich undissoziiert und damit unpolar vor, während sie bei pH 7 und pH 9 teilweise dissoziiert und geladen vorliegen.

Diese theoretischen Betrachtungen lassen sich aber in den praktischen Ergebnissen nicht

klar bestätigen und der Einfluss auf den Benetzungswinkel ist nicht groß genug, um von Bedeutung zu sein.

5.9 TE-haltige Submikronemulsionen

5.9.1 Lipidmatrix für Submikronemulsionen

Die Partikelgröße des TE stellt bei den unter 5.2, 5.4 und 5.6 beschriebenen Zubereitungen eines der Hauptprobleme dar, da sie sich nur schwer reduzieren lässt und zu Kratzen und stumpfem Hautgefühl führen kann. Deshalb wurde eine gänzlich andere Herangehensweise untersucht, die in einer Nano-, bzw. Submikronemulsion enden sollte. Hierzu wurde ein Verfahren gewählt, das sich an die Herstellung von "solid lipid nanoparticles" anlehnt (HUSSEIN & MÜLLER-GOYMAN, 2008; MÜLLER ET AL., 2000), bei dem aber eine bei Raumtemperatur flüssige Ölphase, statt des Hartfetts verwendet wurde (siehe 4.3.5). Diese Lipidmatrix kann anschließend mittels Hochdruckhomogenisierung zu einer Submikronemulsion verarbeitet werden.

Um herauszufinden, welchen Einfluss der TE auf den Stabilisierungsmechanismus hat, wurden die Lipidmatrices mittels Licht-, Fluoreszenz- und Raman-Mikroskopie untersucht. Weiterhin wurden Tropfenprofilanalysen mit verdünnten Lipidmatrices durchgeführt (siehe 5.9.4).

Abb. 5.28 zeigt eine typische lichtmikroskopische Aufnahme einer Lipidmatrix aus 70 % MCT, 25 % Phospholipon 80H und 5 % TE. Man erkennt eine inhomogene Masse, die teilweise sehr große Partikel von ca. 50 μm enthält. Eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (5.29) des gleichen Ausschnitts lässt erkennen, dass es sich bei den großen Partikeln um TE-Partikel handelt, welche fluoreszieren.

Etwas deutlicher wird die räumliche Verteilung bei Untersuchung der Matrices mit konfokaler Raman-Mikroskopie. Von MCT, TE und Phospholipid werden die Einzelspektren aufgenommen, jeweils einer Farbe zugeordnet und den Spektren der einzelnen Punkte

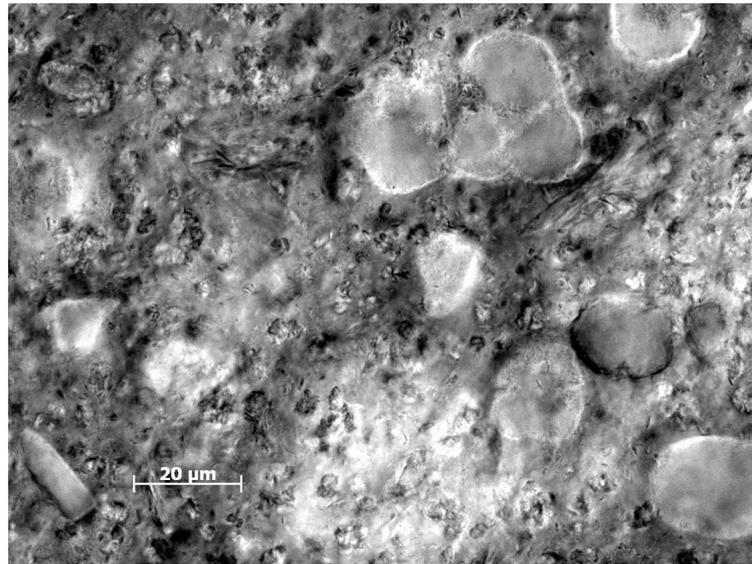


Abbildung 5.28: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Lipidmatrix aus MCT, 25 % Phospholipid und 5 % TE.

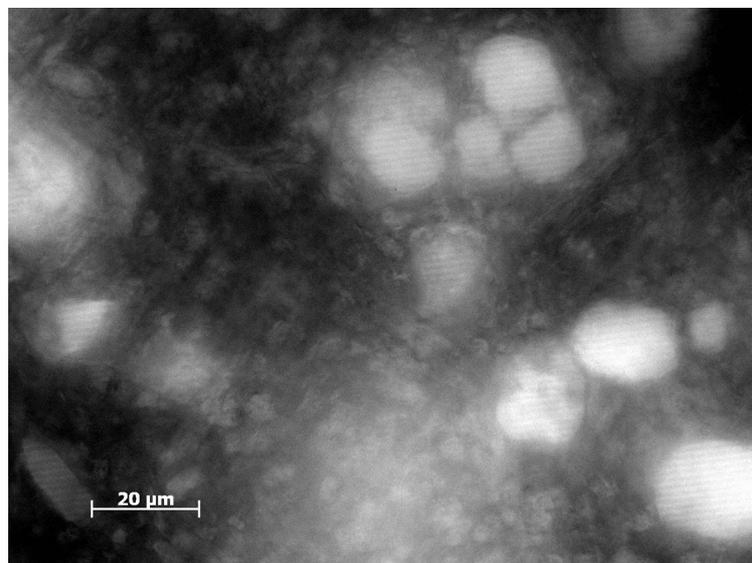


Abbildung 5.29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Lipidmatrix aus MCT, 25 % Phospholipid und 5 % TE.

der Matrixaufnahme zugeordnet. Es ergeben sich Darstellungen wie unter Abb. 5.30 gezeigt. Gezeigt sind verschiedene Lipidmatrices mit unterschiedlichen TE- und Phospholipon 80H-Anteilen. Die rechte Zahl der Bezeichnung steht jeweils für den prozentualen TE-Anteil, die linke Zahl für den prozentualen Phospholipidanteil. Der Rest wird von MCT gebildet.

Es lässt sich auf den Aufnahmen keine besondere Anordnungspräferenz des TE zum Phospholipid erkennen. Bereiche mit TE sind räumlich von Bereichen mit Phospholipid getrennt und bilden keine Schichten oder Durchmischungen. Weiterhin sind von beiden Anteilen noch gröbere Partikel bis ca. 5 μm Größe zu finden, was dafür spricht, dass entweder bei der Lipidmatrix-Herstellung keine Lösung stattfand (was bei TE-Partikeln sicherlich der Fall ist), oder die Phospholipid-Partikel beim Abkühlen wieder ausfallen.

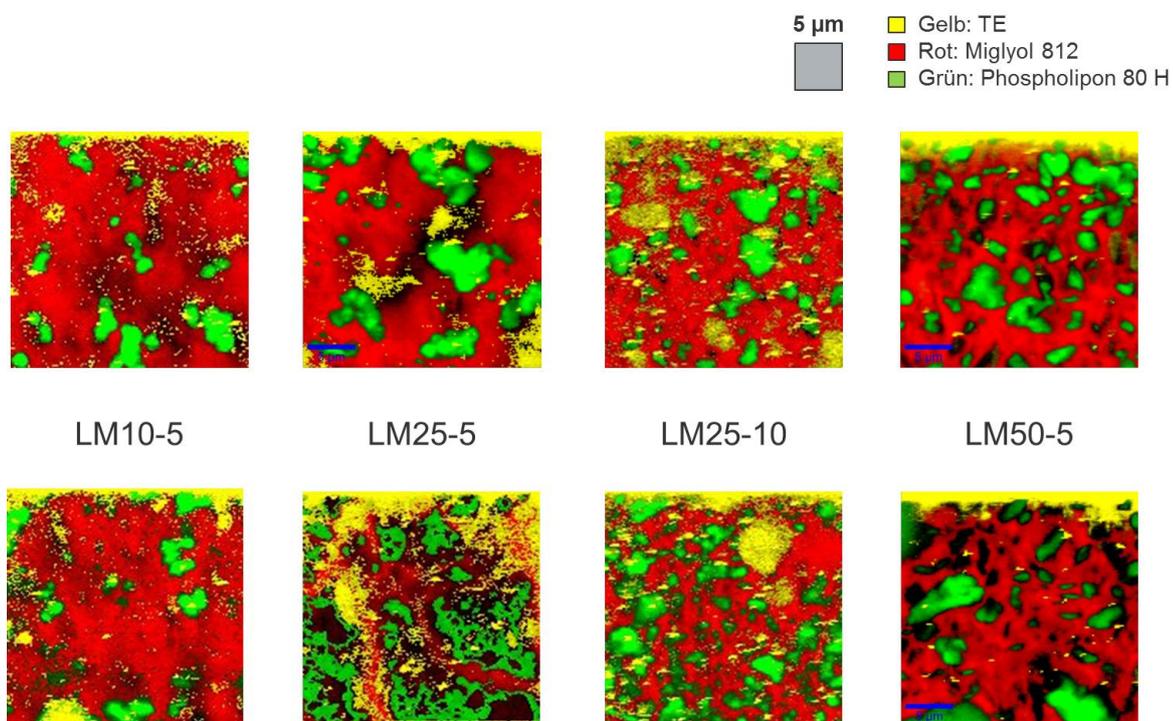


Abbildung 5.30: Raman-mikroskopische Falschfarbenaufnahmen verschiedener Lipidmatrices aus MCT, Phospholipid und TE. Jeweils zwei Ausschnitte (oben und unten) der gleichen Zubereitung.

5.9.3 Aufschäumbarkeit von TE-haltigen Submikronemulsionen

Die erhaltenen Submikronemulsionen wurden zur Untersuchung der Aufschäumbarkeit mit HPMC und Treibgas versetzt (siehe 4.3.3). Allerdings ließ sich mit keiner der Zubereitungen ein stabilisierter Schaum erhalten. Das Treibgas entweicht aus der dünnflüssigen Emulsion und die Schaumblasen können durch den Gelbildner nicht ausreichend stabilisiert werden, was in unmittelbarem Zerfallen des Schaums resultiert.

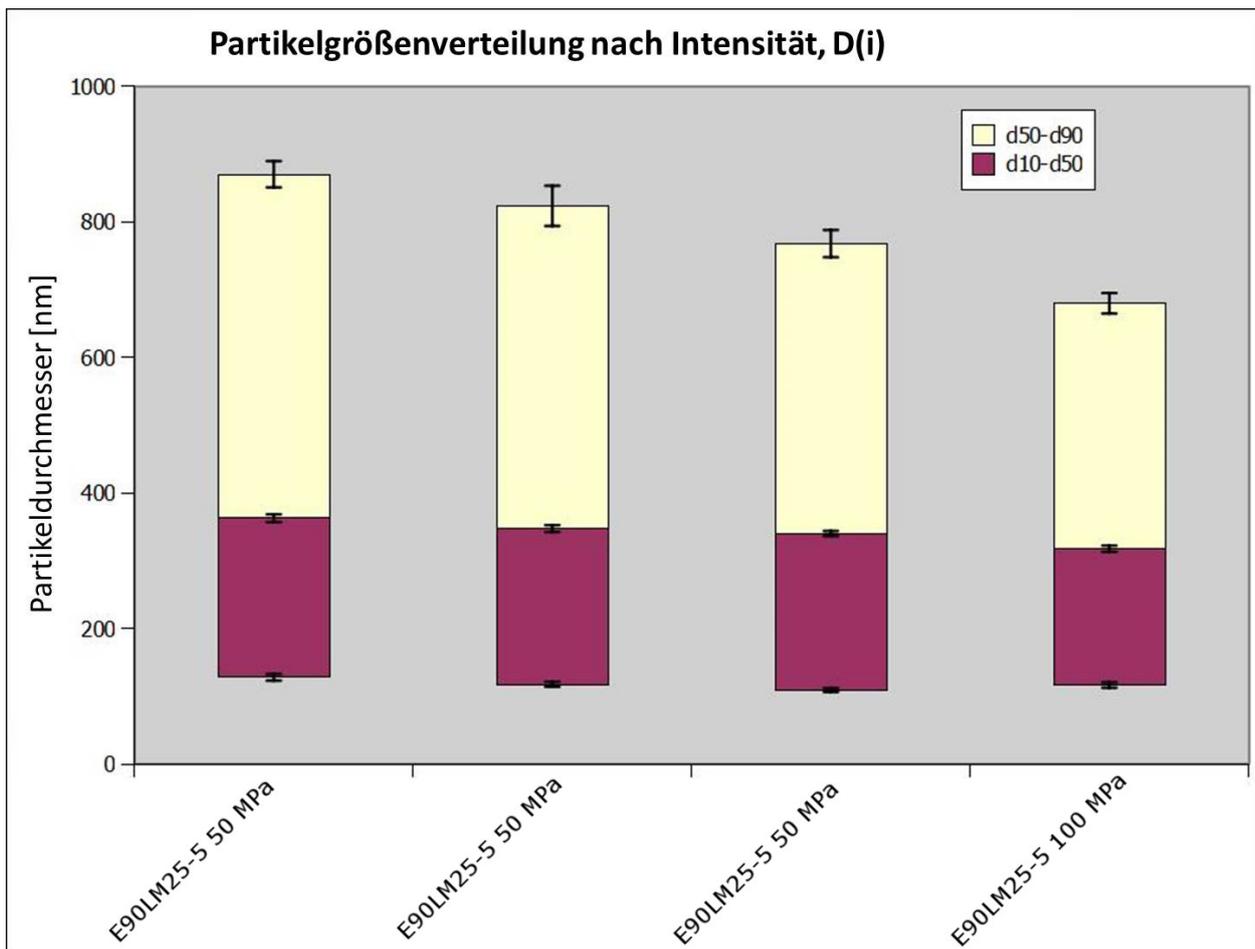


Abbildung 5.32: Partikelgrößenverteilungen der Submikronemulsionen bei unterschiedlichen Homogenisierungsdrücken und -zeiten.

Die ersten drei Datensätze zeigen ansteigende Homogenisierungsdauern von 1 min, 2 min und 5 min bei 50 MPa, als viertes ist ein Homogenisierungsdruck von 100 MPa und 5 min Dauer aufgetragen. Wie zu erwarten Verringert ein höherer Energieeintrag die Partikel- und Tröpfchengrößen, wodurch sich aber hauptsächlich die größeren Anteile

zerkleinern und damit der d90-Wert sinkt.

Insgesamt können durch diese Methode erstaunlich kleine Partikelgrößen erreicht werden, wenn man das Ergebnis mit der Hochdruckhomogenisation von TE-Suspensionen vergleicht (vgl. hierzu Abb. 5.8 auf Seite 49), wo durchschnittliche Partikelgrößen von ca. 5 μm erhalten werden. Als Erklärung für dieses Phänomen ist eine bessere Benetzung der TE-Partikel durch die Öl-Lipidmatrix wahrscheinlich, die eine bessere Energieübertragung durch die Kavitationskräfte der Homogenisierung ermöglicht. Bei der Zerkleinerung der Suspensionen sind die inneren Anteile der TE-Partikel wahrscheinlich unvollständig benetzt und beherbergen kleine Lufteinschlüsse, die diese Energieübertragung verhindern, da die eingeschlossene Luft den Druckunterschieden leicht nachkommen kann, ohne dass die Partikel zerteilt werden.

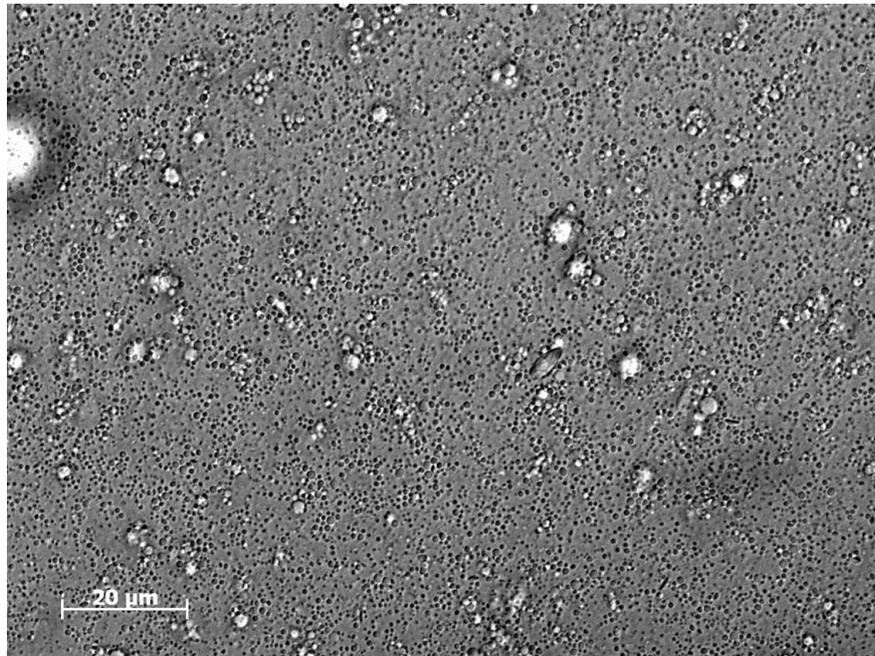


Abbildung 5.33: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Submikronemulsion.

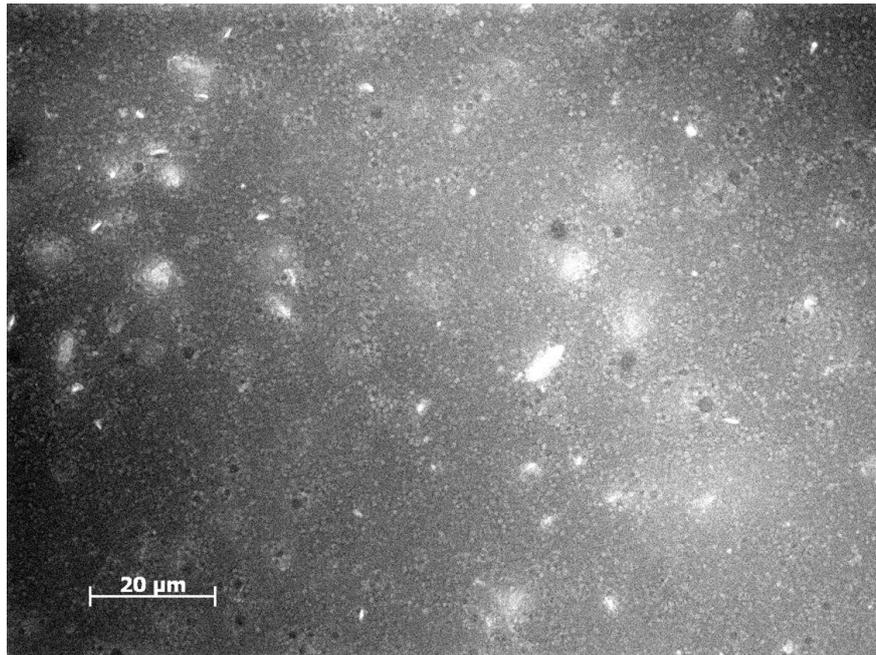


Abbildung 5.34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Submikronemulsion.

5.9.4 Grenzflächenrheologische Eigenschaften des TE in Kombination mit Phospholipiden

Die Grenzflächenaktivität von TE in Emulsionen ist experimentell nur über Umwege zugänglich, da Emulsionströpfchen typischerweise sehr klein und schwer zu erfassen sind und außerdem Einflüsse von Tensiden jeder Art überdeckt werden können. Als Methode zur Untersuchung wurde die Tropfenprofilanalyse gewählt, welche unter 4.1.7 beschrieben wird.

Ziel der Untersuchungen ist eine Aussage darüber, ob TE einen Einfluss auf die Stabilisierung der Emulsionen im Zusammenspiel mit Phospholipid (wie es bei den Submikronemulsionen verwendet wird) hat und ob es die Grenzfläche durch Viskositätsänderung beeinflusst.

Zum Einsatz kamen Phospholipon 90G (PL90G) in 0,1 %iger Konzentration und Phosal 53 MCT (MCT-Suspension) in 0,19 %iger Konzentration, damit in der Endzubereitung jeweils 0,1 % Phospholipid vorhanden war. PL90G ist ein Sojalecithin, welches zu mindestens 90 % aus Phosphatidylcholin besteht und als Granulat vorliegt. Phosal 53 MCT be-

steht zu 53 % aus Phosphatidylcholin, welches in MCT dispergiert vorliegt. Beide eignen sich gut zur Herstellung von Liposomen (KUMBHAR & POKHARKAR, 2013; SCHUBERT, 2003). In beiden Fällen liegt bei Raumtemperatur eine Dispersion von Phospholipid in der Ölphase vor.

Weiterhin wurde TE in zwei Konzentrationen von 0,01 % und 0,1 % zugesetzt. Als Ölphase wurden aufgereinigte MCT verwendet, die Wasserphase war frisch destilliertes Aqua bidestillata. Die Grenzflächenspannung zwischen aufgereinigten MCT und Aqua bidestillata wurde mit 13,97 mN/m und einer Standardabweichung von 0,305 mN/m bestimmt.

Abb. 5.35 zeigt die Ergebnisse der Grenzflächenelastizität und -viskosität der Zubereitungen bei jeweils gleicher Phospholipidkonzentration. Es fällt auf, dass die Grenzflächenviskosität sich über die Versuchsreihe nicht signifikant unterscheidet, egal ob und wieviel TE vorhanden ist. Weiterhin zeigen sich keine Unterschiede zwischen selbst suspendiertem Phospholipid (PL90G) und fertig suspendiert gekauftem Phospholipid (Phosal 53 MCT), außer in den Standardabweichungen, die bei Phosal etwas geringer ausfallen.

Bei Betrachtung der Grenzflächenelastizität unterscheidet sich TE in 0,01 %iger Konzentration nicht signifikant von 0 % TE, jedoch steigt die Grenzflächenelastizität bei der höheren TE-Konzentration von 0,1 % signifikant an. Das bedeutet, dass TE durchaus auch in Kombination mit Phospholipiden einen stabilisierenden Einfluss auf Emulsionströpfchen haben kann, indem es die Grenzfläche elastischer macht. Sie kann so stärker deformiert werden, bis der Grenzflächenfilm reißt und ist so stabiler gegenüber Koaleszenz (LANGEVIN, 2000; WILDE, 2000).

Abb. 5.36 zeigt die Ergebnisse noch einmal im Vergleich zu Zubereitungen ohne Phospholipidzusatz, die nur die höhere TE-Konzentration von 0,1 % enthalten. Sowohl die Grenzflächenelastizität als auch die -viskosität liegen erheblich höher. Verwendet man statt der gereinigten MCT ungereinigte MCT als Ölphase, zeigen sich noch höhere Werte. Das bedeutet, dass zur Vergrößerung der Grenzfläche mehr Energie benötigt wird, die Tröpfchen also nicht so leicht zerkleinert werden und durch die hohe Dilatationselastizität auch ein höheres Bestreben da ist, die Grenzfläche wieder zu minimieren (KÖHLER & SCHUCHMANN, 2012).

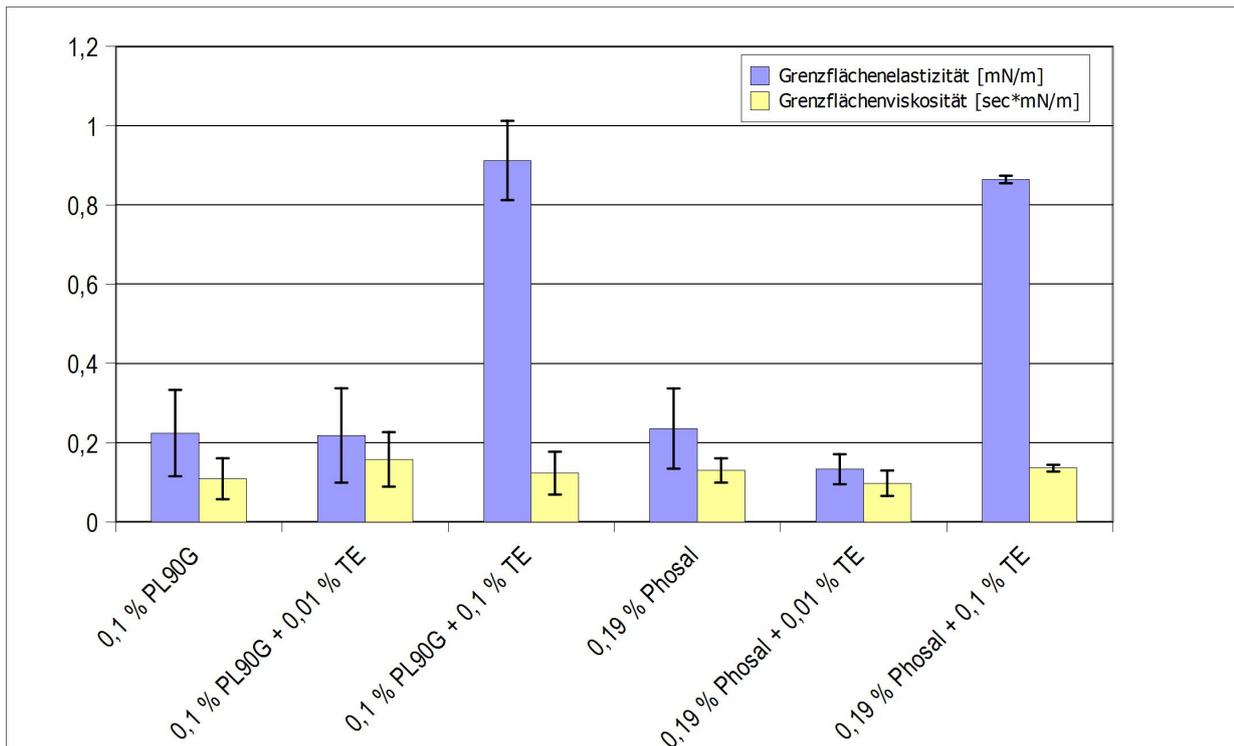


Abbildung 5.35: Ergebnisse der grenzflächenrheologischen Messungen. $n = 5$.

Die Aussagen beziehen sich natürlich nur auf die untersuchte Messfrequenz von 0,159 Hz, die von der tatsächlichen Grenzflächendilatation bei der Emulsionsherstellung weit entfernt ist. Für höherfrequente Messungen könnte als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen ein Kapillardrucktensiometer eingesetzt werden, was die schnellen Vorgänge bei der Emulsionsherstellung im Hochdruckhomogenisator besser simulieren kann.

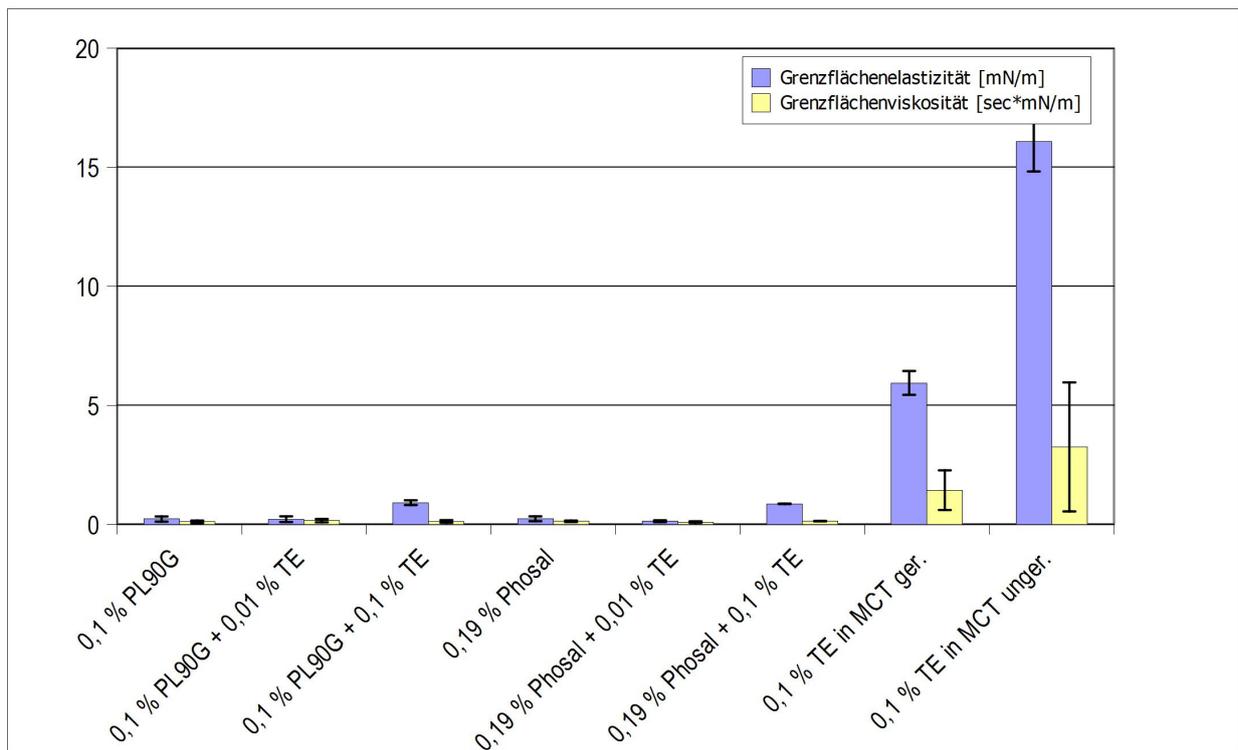


Abbildung 5.36: Grenzflächenrheologische Ergebnisse mit Vergleich zu phospholipidfreien Zubereitungen. n = 5.

5.10 Freisetzungsuntersuchungen mit Franz-Diffusionszellen

5.10.1 Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten und Auswahl der Akzeptormedien

Die Freisetzung von Zubereitungen in Diffusionszellen nach Franz erfordert mehrere Voraussetzungen. Es müssen beispielsweise geeignete Membranen verwendet werden, die das Donorkompartiment vom Akzeptormedium trennen, aber die Diffusion nicht behindern. Hierzu kamen bei den Untersuchungen PTFE-Filtermembranen mit 5 μm Porengröße zum Einsatz. Weiterhin muss das Akzeptormedium eine möglichst hohe Löslichkeit für den freizusetzenden Stoff aufweisen, damit es diesen auch aufnehmen kann und möglichst über den gesamten Freisetzezeitraum unter sink-Bedingungen gearbeitet werden kann.

Abb. 5.37 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit des TE (berechnet als Betulin) in verschiedenen Medien bei 25° C, die zur Auswahl des Akzeptormediums dienen.

Obwohl reines 2-Propanol sich gut für die Lösung des TE eignet, bringen Mischungen von bis zu 20 % in Wasser keine ausreichende Löslichkeitsverbesserung mit sich. Ethanol-Wasser-Gemische zeigen teilweise bessere Löslichkeiten, aber auch sehr große Schwankungen, was in der problematischen Abtrennung des TE aus dem Überstand begründet liegt. Zentrifugation wurde zur Abtrennung bevorzugt, da eine Filtration dieser geringen TE-Konzentrationen oft die Triterpene am Filtermaterial adsorbieren lässt, oder gar keine Abtrennung ermöglicht. Dies war an massiven Schwankungen der Messwerte zu erkennen und machte die Filtration als Methode vollkommen ungeeignet.

Bei reinem Wasser zeigt sich auch eine erhebliche Streuung, bei Wasser-PEG-Mischungen werden Sättigungskonzentrationen erreicht, die bedingt geeignet sind, aber wenig Reserven für längere Freisetzungen lässt. Bei Verwendung von Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin

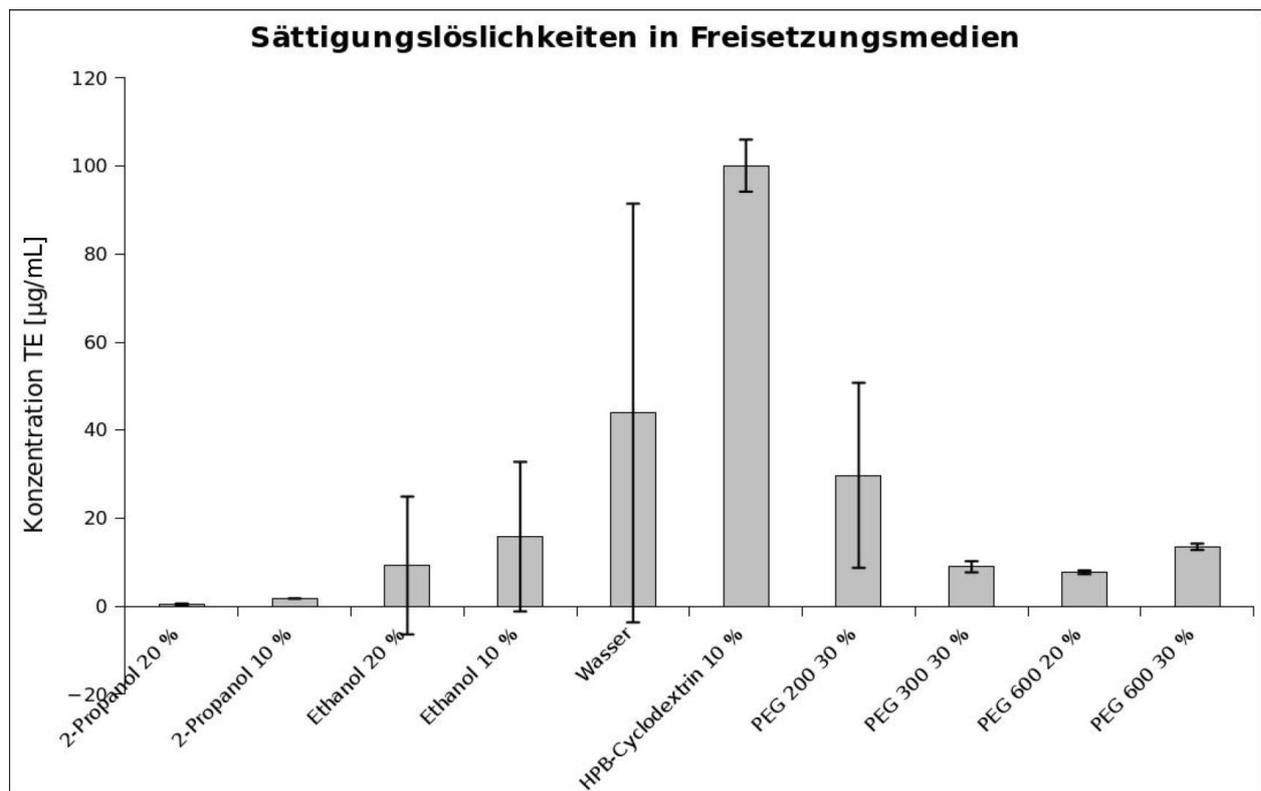


Abbildung 5.37: Ergebnisse der Sättigungslöslichkeiten der Akzeptormedien, bestimmt über HPLC-Analytik. $n = 3$

in 10 %iger Konzentration lässt sich eine hohe Löslichkeit erreichen, die außerdem eine geringe Streuung aufweist.

Auch im Hinblick auf die Praktikabilität der Durchführung der späteren Freisetzungsanalytik konnte von den untersuchten Akzeptormedien nicht jedes verwendet werden. Aufgrund der relativ hohen Löslichkeit, sowie der verhältnismäßig guten Reproduzierbarkeit der Messwerte wurde 10 % HPB-Cyclodextrin in NaCl-haltigem Puffer pH 7,4 als Akzeptormedium für die Freisetzunguntersuchungen verwendet.

Tab. 5.4 stellt zur Orientierung Literaturwerte der Triterpenlöslichkeiten in den verwendeten Ölphasen und Wasser dar.

Tabelle 5.4: Sättigungslöslichkeiten der Triterpenbestandteile in verschiedenen Ölphasen und Wasser. Quellen: LASZCZYK (2007); GRYSKO (2011)

	Sonnenblumenöl	MCT	Paraffin	Wasser
	[$\mu\text{g/mL}$]	[$\mu\text{g/mL}$]	[$\mu\text{g/mL}$]	[$\mu\text{g/mL}$]
Lupeol	1.926,44	163.772,54	<LOQ	0,04
Betulin	2.836	5.147,92	189,56	0,079
Betulinsäure	<LOQ	98,69	<LOQ	0,044
Betulinsäure- methylester	225,74	<LOQ	<LOQ	<LOD
Erythrodiol	2.836	<LOQ	<LOQ	0,039
Oleanolsäure	LOQ	37.556,83	<LOQ	0,051
Summe	7.824,18	206.575,98	189,56	0,253

5.10.2 Freisetzungen

Um Aussagen über die Freisetzungunterschiede der verschiedenen Zubereitungen zu treffen, wurden Franz-Diffusionszellen im "infinite dose"-Modell verwendet. Die Durchführung findet sich unter 4.1.2. Untersucht wurden TE-Oleogele, HPMC-Schäume, wie unter

5.6 beschrieben, sowie Lipidmatrices nach 5.9.1 und daraus hergestellte Submikronemulsionen.

Abb. 5.38 zeigt die Freisetzung aus TE-Oleogelen, mit Sonnenblumenöl, Paraffin und MCT als Ölphase. In allen Oleogelen ist die Sättigungskonzentration durch den hohen TE-Anteil erreicht, der als Depot ungelöst vorliegt. Zur Verifikation wurde ein Versuch mit Sonnenblumenöl in 10 % und 4 %iger Konzentration durchgeführt. Erwartungsgemäß lässt sich an den Ergebnissen erkennen, dass die beiden Konzentrationen sich in der Freisetzung nicht signifikant voneinander unterscheiden. Auch die Betulin-Freisetzung des Paraffin-Oleogels liegt auf dem gleichen Niveau. Einzig die Freisetzung aus dem MCT-Oleogel verhält sich etwas anders, indem zuerst bei höheren Werten gestartet wird, die Freisetzung sich danach aber langsamer steigert, als bei den anderen Gelen und nach 16 h dann die geringste Menge freigesetzt hat. Eine mögliche Erklärung hierzu ist die höhere Betulin-Löslichkeit in MCT, wodurch anfangs mehr Betulin an das Freisetzungsmedium abgegeben werden kann. Die niedrigere freigesetzte Betulinmenge nach 16 Stunden könnte in der höheren Viskosität begründet sein, welche eine weitere Diffusion aus dem TE-Depot verlangsamt.

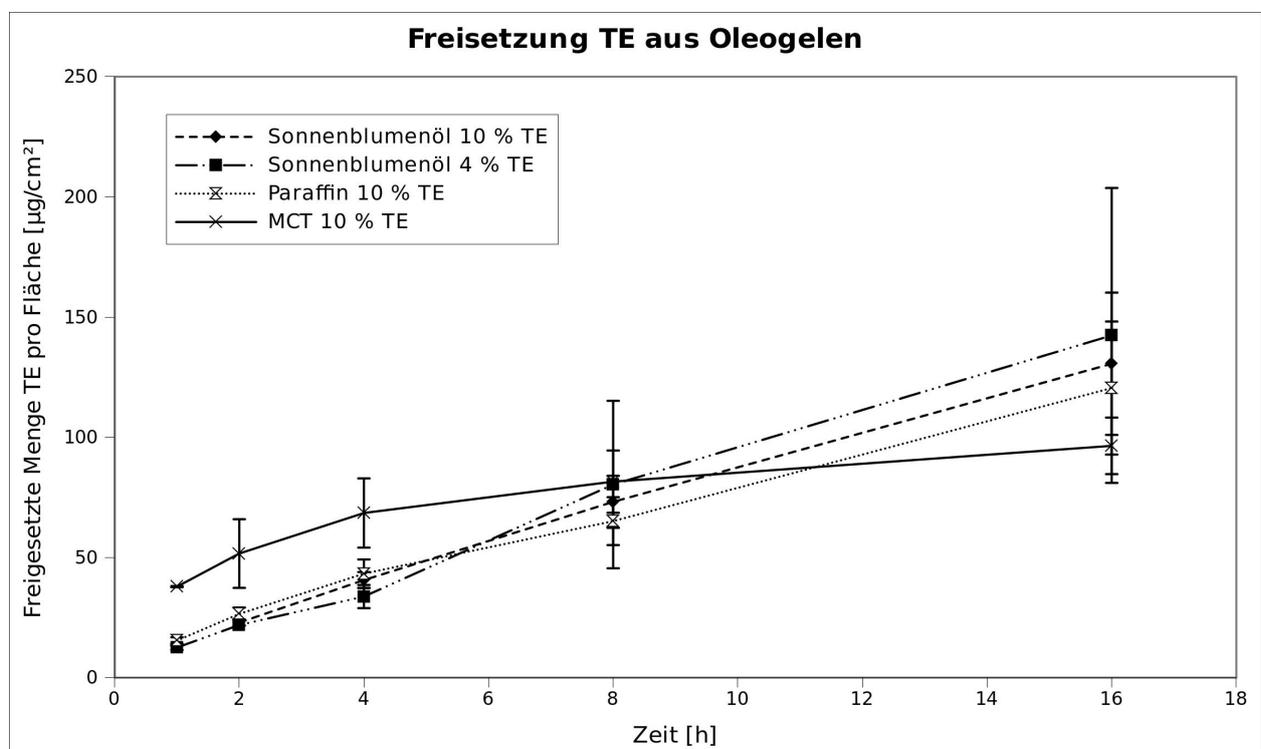


Abbildung 5.38: Freisetzung aus TE-Oleogelzubereitungen. n = 3.

Abb. 5.39 zeigt die Freisetzung aus Lipidmatrices, einmal mit Sonnenblumenöl, einmal mit MCT als Ölphase. Der Phospholipidgehalt beträgt 20 %, der TE-Gehalt 5 %. Zum Vergleich und zur Einordnung sind die 10 %igen Oleogele wieder mit aufgeführt. Die Lipidmatrices unterscheiden sich hierbei in der Freisetzung je nach Ölphase, liegen aber im selben Bereich der Oleogele. Die Sonnenblumenöl-Lipidmatrix setzt anfangs langsam frei, steigert sich aber bis 16 h bis auf das Niveau der Sonnenblumenöloleogele.

Die MCT-Lipidmatrix setzt insgesamt am meisten TE frei und endet bei 16 h auf dem höchsten kumulativen Wert von $126 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Bei Untersuchung der Submikronemulsionen, hergestellt aus den Lipidmatrices, konnte keine Freisetzung nachgewiesen werden. Die lipophilen PTFE-Filtermembranen bilden hier eine Barriere, da die Poren von den dünnflüssigen Emulsionen nicht ausreichend benetzt werden können, was im Gegenzug bei den lipophilen Zubereitungen kein Problem darstellt.

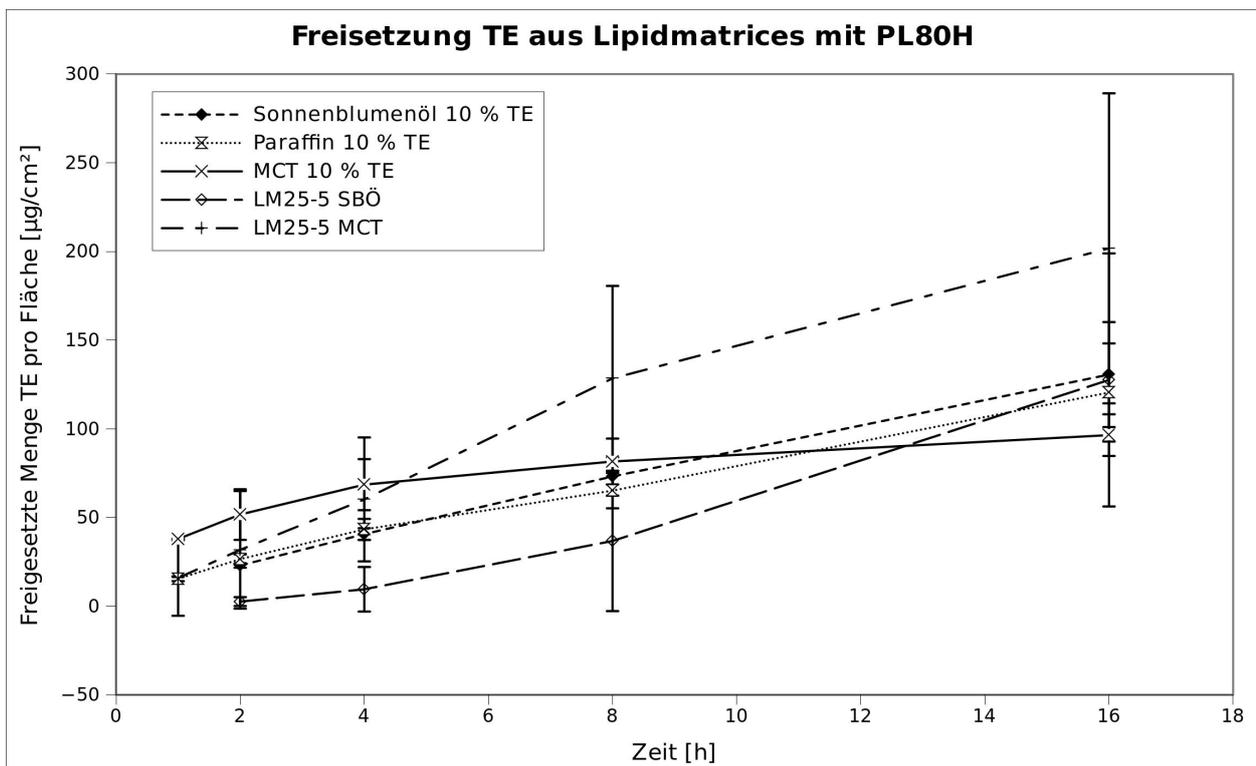


Abbildung 5.39: Freisetzung aus TE-Lipidmatrices. $n = 3$.

In Abb. 5.40 sind die Freisetzungen aus HPMC-haltigen TE-Schäumen (siehe 5.6) ge-

zeigt. Zur Vergleichbarkeit sind wieder die Freisetzungen der 10 %igen Oleogele mit aufgetragen. Man erkennt, dass die freigesetzte Menge unterhalb derer der Oleogele liegt. Bei Vergleich der beiden Ölphasen der Schäume setzt tendenziell der Schaum mit Sonnenblumenöl-Anteil etwas mehr frei, jedoch ohne Signifikanz.

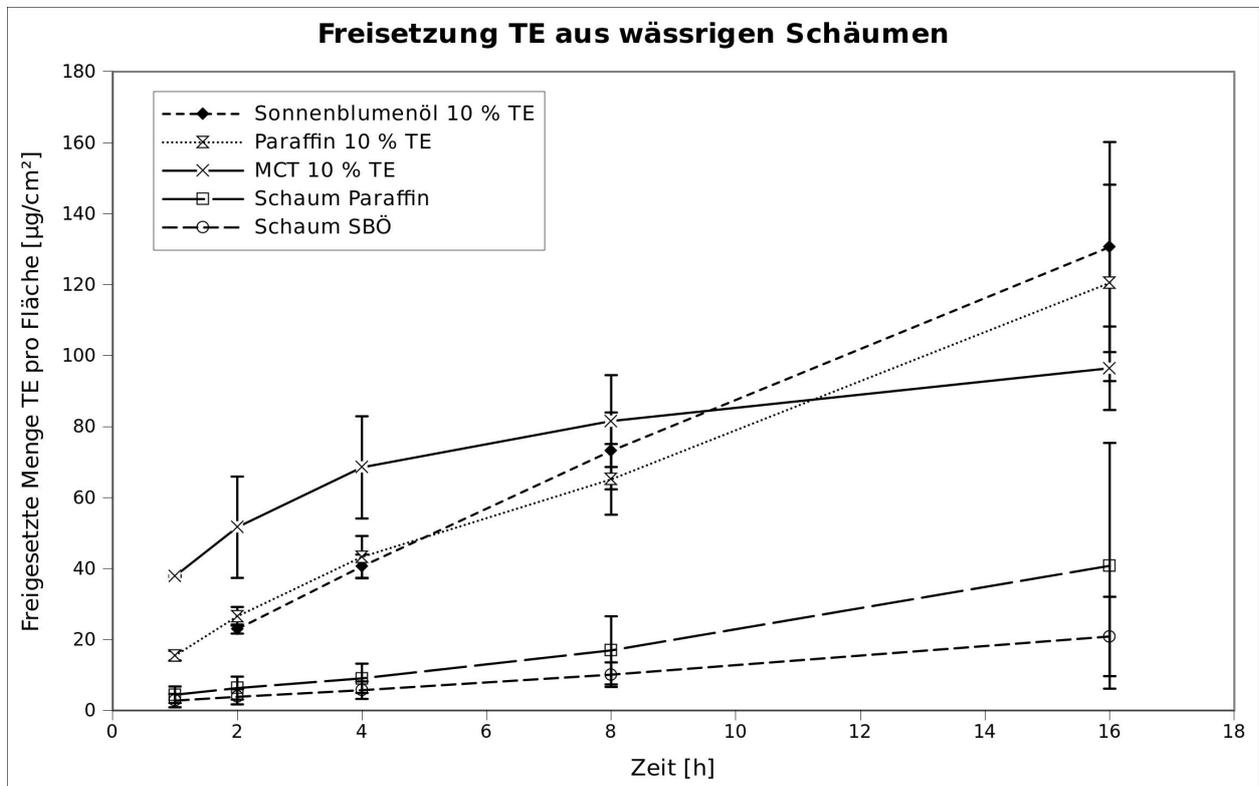


Abbildung 5.40: Freisetzung aus TE-Schäumen. n = 3.

6 Abschlussdiskussion

6.1 Eigenschaften wässriger TE-Dispersionen

6.1.1 Vorbereitung des TE

Die aufwändige Vorbereitung des TE zur weiteren Verarbeitung, stellt ein Hauptproblem in der Entwicklung geeigneter Formulierungen dar und resultiert bei ungenügender Zerkleinerung und Benetzung in Instabilitäten wie Flotation, Agglomeration und Koaleszenz der Zubereitungen. Dies lässt sich durch die richtige Herstellungsmethode und vollständige Benetzung des Extraktes (LAZGHAB ET AL., 2005) erheblich verbessern.

6.1.2 Trockene Vermahlung

Der pulverförmige TE besitzt eine starke Neigung zur plastischen Verformung, wenn man ihn mechanischen Belastungen aussetzt. So lassen sich bereits durch so geringe Druckausübung, wie sie beim manuellen Verreiben mit einem Pistill in der Reibschale auftreten, Kompaktate und Agglomerate bilden, die sich schwer zerteilen lassen. Das gleiche Phänomen tritt bei Vermahlung in der Fliehkraft-Kugelmühle auf und zeigt sich auch darin, dass man bei hohem Pressdruck sogar einen glasartig-durchscheinenden Pressling erhalten kann (siehe 4.1.5).

Zur Erreichung kleinerer Partikelgrößen kommt also die Trockenvermahlung nur zweitrangig in Betracht. Eine Möglichkeit doch zu einem guten Mahlergebnis zu kommen, bietet

eventuell eine Kryogenvermahlung, wobei unter starker Kühlung des Mahlguts (üblicherweise mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C) das Material bei mechanischer Belastung spröde bricht und nur weniger plastisch verformt wird.

6.1.3 Benetzungseigenschaften des TE

Zerkleinert man den TE in wässriger Suspension, so wird man vor weitere Herausforderungen gestellt. Zuerst muss eine ausreichende Benetzung gewährleistet werden, da ansonsten TE auf der Oberfläche aufschwimmt, oder sich an den Gefäßwänden anlagert. Außerdem ist zur Energieübertragung beim Mahlverfahren durch Scherkräfte eine Benetzung nötig (BONACCURSO ET AL., 2003), weil sonst Lufteinschlüsse die Zerteilung verhindern (RICHEFEU ET AL., 2006).

Untersuchungen zum Kontaktwinkel (siehe 5.8) ergeben für verschiedene TE einen Benetzungswinkel unter 90 °C . Dies deutet auf eine spontane Benetzung hin, was auch durch frühere Ergebnisse bestätigt wird (ROTT, 2009). Die spontane Benetzung aufgrund der Kapillarkräfte des Wassers läuft jedoch sehr langsam ab (WASHBURN, 1921; ADAMSON ET AL., 1967), weshalb z.B. auf die Wasseroberfläche aufgestreuter TE auch nach Wochen noch aufschwimmt und unbenetzt bleibt. Dieses Verhalten zeigt sich unabhängig vom pH-Wert der verwendeten Pufferlösungen (siehe 5.8), obwohl TE seine Oberflächenladung ausgeprägt über den pH-Wert verändert, was über Zetapotentialmessungen belegt wurde (siehe 5.7). Die Carbonsäureanteile (Betulinsäure und Oleanansäure) deprotonieren im basischen pH-Bereich und erzeugen eine Oberflächenladung. Dies sollte theoretisch zu einer besseren Benetzung führen ((HURWITZ ET AL., 2010)), konnte aber experimentell nicht bestätigt werden. Vermutlich ist der Anteil der Carbonsäuren an der Gesamtzusammensetzung des TE zu gering um einen deutlichen Effekt auf die Benetzung messbar zu machen.

Aus technologischer Sicht liegt es nahe, die Benetzung durch Verwendung eines Tensids zu verbessern. Dies bewirkt zwar einerseits eine bessere Einarbeitung flotierender TE-Anteile, andererseits werden keine kleineren Partikelgrößen erreicht, wie experimentell gezeigt werden konnte (siehe 5.2).

6.1.4 Eignung verschiedener Mahlverfahren zur TE-Suspensionsherstellung

Eine Zerkleinerung der TE-Partikel durch Vermahlung in Suspension lässt sich durch Scher-, Prall- und Schlagkräfte erreichen. Anfangs überwiegt immer eine Agglomeration, danach ist mehr Energie notwendig, um eine weitere Zerkleinerung zu erreichen.

Bei Betrachtung der erhaltenen Partikelgrößenverteilungen verschiedener Mahlverfahren (siehe 5.2) werden die Unterschiede ersichtlich. Ein Vergleich von Zahnkolloidmühle, Hochdruckhomogenisator, Ultra-Turrax, Ultraschallsonotrode und Kugelmühle zeigt die kleinsten Partikelgrößen und engsten Verteilungen bei Zubereitung, die mithilfe der Hochdruckhomogenisation erhalten wurden, gefolgt von Ultraschallsonotrode und Zahnkolloidmühle. Noch kleinere Partikel wären besonders im Hinblick auf eine beschleunigte Freisetzung wünschenswert (HINTZ & JOHNSON, 1989), lassen sich aber mit den verwendeten Methoden nicht erreichen.

Die unerwartet großen Partikel, trotz Hochdruckhomogenisation legen einen Zusammenhang mit den mechanischen Eigenschaften des TE nahe. OLES (1992) beschreibt ein ähnliches Phänomen in Latex-Suspensionen, wo sich je nach Scherrate ein Gleichgewicht zwischen Zerkleinerung und anwachsender Korngröße einstellt. Dieses Verhalten könnte auch hier vorliegen, zumal ein Abbau der porösen TE-Struktur zu kompakteren Partikeln denkbar ist, welche sich anschließend deutlich schlechter zerkleinern lassen. Weiterhin ist es möglich, dass durch die langsame Benetzung des TE noch kein Dispersionsmittel in die inneren Kapillaren der Partikel eindringen konnten und so die zur Zerkleinerung notwendige Energieübertragung nicht ausreicht.

Um zu gewährleisten, dass das gesamte Pulver beim Zerkleinerungsprozess erfasst und suspendiert werden kann, ist besonders die Durchmischung der Flüssigkeitsoberfläche von entscheidender Bedeutung, da Teile des TE hier oft flotieren und deutlich schwerer einzuarbeiten und zu vermahlen sind als bereits untergetauchte (KRALCHEVSKY & NAGAYAMA, 1994; KARICKHOFF & MORRIS, 1985). Ein Zusatz von Tensid kann zwar die Flotation bei der Vermahlung verringern, wirkt sich jedoch wie unter 5.2 gezeigt, nicht positiv auf die Zerkleinerung in den gewählten Systemen aus und wurde deshalb im Hinblick

auf die Hautverträglichkeit der Zubereitungen nicht weiter verfolgt.

Bei Verwendung der Ultraschallsonotrode lässt sich die Einarbeitung der flotierenden Anteile durch Variation der Eintauchtiefe beeinflussen, da die Spitze der Sonotrode die größte Auslenkung erfährt und damit die Flüssigkeitsoberfläche aufwirbeln und durchmischen kann. Auch bei Zerkleinerung mithilfe des Ultra-Turrax lässt sich die Umwälzung der Flüssigkeitsoberfläche durch die Eintauchtiefe und den Eintauchwinkel einstellen, jedoch mit nicht reproduzierbarem Erfolg.

Bei der Zahnkolloidmühle lässt sich die Flotation der Partikel am leichtesten umgehen, wenn ein geeigneter Füllpegel und Zirkulation gewählt wird, was zu einer ständigen Umwälzung der Oberfläche führt. Auch die Hochdruckhomogenisation wurde im Zyklus durchgeführt, jedoch mit viel geringeren Flüssigkeitsströmen als bei der Zahnkolloidmühle, die nicht für eine Umwälzung der Oberfläche ausreichen. Weiterhin erfolgt der Flüssigkeitsstrom aufgrund der Kolbenhübe in Pulsen, was eine gleichmäßige Umwälzung weiter erschwert. Aus diesen Gründen musste für die Hochdruckhomogenisation immer mit einer Vorsuspension aus der Zahnkolloidmühle gearbeitet werden.

Die verwendete Fliehkraft-Kugelmühle erreicht keine Suspendierung der TE-Partikel, sondern zeigt stets einen großen TE-Anteil, der an der Gefäßwand und den Kugeln anhaftet. Dies kommt wieder durch die plastische Verformbarkeit des TE zustande - auf den Mahlkugeln bildet sich eine anwachsende TE-Schicht mit hydrophoben Eigenschaften, anstatt der gewünschten Zerkleinerung. Vermutlich bildet die raue Keramik-Oberfläche der Mahlkammer und -kugeln eine gute Angriffsfläche für den hydrophoben TE, während die Schlag- und Scherkräfte der Mahlkörper die Partikel weiter anpressen und keine Einarbeitung ermöglichen.

Interessanterweise tritt dieses Problem bei der (öiligen) Vermahlung von TE-Oleogelen (GRYSKO, 2011) in der Kugelmühle nicht auf. Die TE-Partikel werden hier ausreichend benetzt und ordnen sich in einem lockeren Netzwerk an, im Vergleich zu den wässrigen Suspensionen, in denen sie das Bestreben zeigen möglichst wenig Kontaktfläche zum Wasser einzunehmen.

6.2 Untersuchung TE-haltiger Emulsionen und Schäume

6.2.1 Stabilisatoren für TE-haltige Emulsionen und Schäume

Die Zugabe eines weiteren Hilfsstoffs zur Gewährleistung einer ausreichenden Schaumqualität ist unerlässlich. Zwar kann man mit TE-Emulsionen, die nur aus Wasser, TE und Paraffinöl bestehen, unter Zusatz von Treibgas einen Schaum erhalten, welcher allerdings schlecht aufschäumt, sehr instabil ist und zudem im Aerosolgefäß nach wenigen Tagen bricht. Das Prinzip der Pickering-Emulsionen (mechanische Grenzflächenstabilisierung) lässt sich mit TE-Partikeln also nur ungenügend zur Schaumstabilisierung nutzen.

Als Stabilisatoren eignen sich besonders Gelbildner, da Tenside aus Gründen der Hautverträglichkeit vermieden werden sollten. Eine Erhöhung der Viskosität der Außenphase stabilisiert sowohl die suspendierten Feststoffpartikel und Öltröpfchen, als auch die Treibgasblasen des späteren Schaums (DICKINSON, 2003; SCHULZ & DANIELS, 2000; ZHAO ET AL., 2009).

Der Stabilisierungsmechanismus lässt sich hier je nach eingesetztem Polymer differenzieren, unter anderem dahin gehend, ob eine gleichzeitige Grenzflächenaktivität des Gelbildners vorliegt oder nicht.

Ist der Gelbildner gleichzeitig grenzflächenaktiv, wie es beispielsweise bei HPMC der Fall ist (GOODWIN, 2009), können allgemein niedrigere Viskositäten gewählt werden, da die Stabilisierung nicht allein auf eine Immobilisierung zurückzuführen ist. Zubereitungen mit HPMC lieferten die geringsten Tröpfchengrößen im Vergleich zu den weiteren untersuchten Polymeren, außerdem fein verteilte TE-Partikel und die besten resultierenden Schäume.

Bei Verwendung mancher makromolekularer Stabilisatoren wandern die TE-Partikel bei nahe quantitativ in die Ölphase ab und bilden große Oleogel-Tropfen, die deformiert in der viskosen Außenphase vorliegen. Dies ist beispielsweise bei Alginat-, Xanthangummi- und Carmellosegelen der Fall. Das Phänomen tritt bei zu starker Scherung auch bei HPMC-stabilisierten Zubereitungen auf und kann eine irreversible Phaseninversion der Emul-

sionen hervorrufen (BINKS & LUMSDON, 2000a; BINKS & MURAKAMI, 2006). Dies zeigt sich im plötzlichen Brechen der Emulsion in ein Oleogel, welches dann in der wässrigen, geklärten Phase schwimmt. BINKS & LUMSDON (2000a) und AVEYARD ET AL. (2003) beschreiben für das Phänomen eine direkte Abhängigkeit der Phaseninversion vom Ölphasenanteil und der Polarität der eingesetzten Ölphase. Zeigt der zur Stabilisierung eingesetzte Feststoff eine starke Lipophilie, wie es bei TE der Fall ist, dann kann auch eine metastabile O/W-Emulsion durch starke Scherung zur Inversion gebracht werden. Vermutlich spielen beide Vorgänge bei TE-Emulsionen eine Rolle.

6.2.2 Geeignete Ölphasen für TE-haltige Schäume

Die Ölphase hat auf die resultierenden Schaumeigenschaften (Aufschäumverhalten, Blasengröße, Zerfallsgeschwindigkeit) einen bedeutenden Einfluss. Besonders die Polarität der Ölphase ist hierbei entscheidend. Wie bislang gezeigt, lassen sich aus TE-Suspensionen aus der Zahnkolloidmühle, sowie unter Verwendung von HPMC als Stabilisator stabile Schaumzubereitungen herstellen. Während Paraffin (siehe 5.5) als unpolarste verwendete Lipidphase die stabilsten Schäume bildet, nimmt die Qualität in der Reihe der Polarität ab – über Sonnenblumenöl zu Miglyol. Dies zeigt eine Korrelation zur ausgebildeten TE-Oleogelstärke bei Verwendung des entsprechenden Öls (STEINBRENNER, 2011; GRYSKO, 2011; GRYSKO & DANIELS, 2013).

6.2.3 Einflüsse auf Schaumqualität

Die Einflüsse auf die paraffinhaltiger Schaumqualität wurde anhand eines Versuchsdesigns evaluiert (siehe 5.6). Hierbei ließen sich besonders zwei wichtige Einflüsse feststellen: der HPMC-Anteil, der sich positiv auf Stabilität und allgemeine Qualität auswirkt, sowie der TE-Anteil, der einen negativen Einfluss auf diese Eigenschaften aufweist. Überraschenderweise spielt der Paraffinanteil im untersuchten Bereich von 10 % (m/m) bis 20 % (m/m) keine Rolle. Das spricht gegen eine Abwanderung des TE in die Ölphase, zumindest bei Anwesenheit von HPMC. Die Schaumstabilität und -güte werden haupt-

sächlich durch den Anteil der HPMC gesteuert. Der TE-Anteil wirkt sich eher störend aus und zeigt keinen Vorteil im Sinne einer Feststoffstabilisierung in diesem System.

Die Einflussparameter bei Schäumen mit Sonnenblumenöl als Ölphase, stellen sich durch die höhere Polarität der Lipidkomponente etwas anders dar (siehe 5.6.2). Es zeigt sich jedoch auch hier eine Korrelation der Schaumgüte mit dem HPMC-Anteil und ein negativer Einfluss des TE-Anteils, wenn dieser auch schwächer ausgeprägt ist. Das könnte in der Tatsache begründet sein, dass der TE hier eine höhere Affinität zur Ölphase aufweist, teilweise in diese einwandert und so nicht mehr frei vorliegt. Dies zeigt sich auch hier in der höheren Gelstärke von Sonnenblumenöl-Oleogelen im Vergleich zu Paraffin-Oleogelen (GRYSKO, 2011).

Noch stärker wird dieses Phänomen bei Schäumen mit mittelkettigen Triglyceriden als Ölphase sichtbar. Hier ist die Viskosität vergleichbarer Oleogele noch höher und die erhaltenen Schäume sind am instabilsten (siehe 5.5).

Weiterhin zeigt der Treibgasdruck einen deutlichen Einfluss auf sowohl die Schaumdichte, als auch auf die Schaumqualität im Allgemeinen (5.5). Wie zu erwarten, ist die Schaumdichte bei hohem Druck geringer, da bei gleichem Treibgasanteil ein größeres Volumen beim Aufschäumen entsteht. Diese stärkere und schnellere Aufschäumung sorgt gleichzeitig für eine bessere Schaumqualität.

6.2.4 TE-haltige Submikronemulsionen mit Phospholipidanteil

Zur Umgehung des Problems der TE-Partikelgröße wurden als weitere Formulierungsoption Submikronemulsionen mit Phospholipiden als Emulgatoren im Hochdruckhomogenisator hergestellt. Es zeigt sich, dass sich so Tröpfchen und Partikel unterhalb eines Mikrometers Größe erhalten lassen – deutlich kleiner als die Partikel, die über Nassvermahlungsprozesse erhalten werden konnten.

Ob TE einen Einfluss auf die Stabilisierung der phospholididhaltigen Submikronemulsionen hat, wurde über Tropfenprofilanalyse-Messungen untersucht (siehe 5.9.4). Eine

Variation der TE-Konzentration bewirkt dabei keine Änderung der Grenzflächenviskosität, jedoch steigt die Grenzflächenelastizität bei höheren TE-Konzentrationen signifikant an. Dies spricht für eine Stabilisierung, indem der Grenzflächenfilm erst bei größerer Deformation reißt und somit resistenter gegen eine Koaleszenz ist. Leider sind mit dem Modell nur Konzentrationsbereiche, Deformationsgeschwindigkeiten und Temperaturen möglich, die relativ weit von den tatsächlichen Bedingungen während der Hochdruckhomogenisation entfernt liegen, was lediglich eine vorsichtige qualitative Bewertung der Daten sinnvoll erscheinen lässt.

Die Versuche zeigen aber, dass TE nicht nur im Sinne einer Pickering-Emulsion Öltröpfchen stabilisieren kann, sondern die löslichen Anteile auch die Grenzfläche direkt beeinflussen können. Der Effekt ist allerdings nicht sehr ausgeprägt und nur in Verbindung mit sehr geringen Phospholipid-Konzentrationen experimentell sichtbar.

Trotz der widersprüchlichen Freisetzungsergebnisse (siehe 6.3) sind die TE-haltigen Submikronemulsionen interessante Zubereitungen, für die weiterführende Untersuchungen sinnvoll erscheinen.

Durch Zusatz von HPMC und Treibgas, entsprechend der beschriebenen TE-Schäume, ließ sich mit den Submikronemulsionen kein stabiler Schaum erzeugen. Allerdings besteht für diese dünnflüssigen Emulsionen die Möglichkeit sie fein mit einem Sprühkopf zu zerstäuben und sie damit als sprühbare Emulsionen anzuwenden.

6.3 Betulin-Freisetzung aus den Zubereitungen

In Freisetzungsversuchen mit Franz-Diffusionszellen wurden TE-Zubereitungen über die Bestimmung des freigesetzten Betulins untersucht (5.10). Als Zubereitungen wurden TE-Oleogele mit den Schaumzubereitungen verglichen. Es wird von allen Schäumen deutlich weniger Betulin freigesetzt, als bei den korrespondierenden Oleogelen. Bei beiden Systemen kann man von einem TE-Depot ausgehen, welches als Feststoff vorliegt, während ein Teil des Betulins in der Ölphase und in der Wasserphase der Zubereitung gelöst vor-

liegt und von dort durch Diffusion freigesetzt werden kann. Der TE-Feststoffanteil liegt bei allen untersuchten Zubereitungen deutlich über der Sättigungslöslichkeit, sodass man von keiner Konzentrationsabhängigkeit ausgehen kann. Zur Verifizierung wurde Sonnenblumenöleogel in 10 % und 4 %iger Konzentration untersucht, wobei sich kein Unterschied ergab.

Berechnet man die theoretisch vorliegenden gelösten Betulinmengen, indem man die Literaturwerte der Sättigungslöslichkeiten aus Tab. 5.4 zugrunde legt und vergleicht sie mit den freigesetzten Mengen nach 16 h, ergibt sich ein Bild wie in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tabelle 6.1: Gelöster Betulinanteil (BE) in μg in 1 g der unterschiedlichen Zubereitungen.

	Sonnen- blumenöl Schaum	Paraffin Schaum	Sonnen- blumenöl Oleogel	Paraffin Oleogel
anfänglich gelöstes BE in Ölphase	317	19	2376	146
anfänglich gelöstes BE in Wasserphase	0,0067	0,0067	-	-
nach 16 h gelöstes BE in Akzeptormedium	42	82	31	243
Gesamtes BE in Dosis	26055	26055	86850	86850

Bei den Zubereitungen mit Sonnenblumenöl ist am Ende der Freisetzung weniger Betulin im Akzeptormedium enthalten als schon in gelöster Form in der Ölphase vorliegt. Die Freisetzung kann also theoretisch allein durch Diffusion der gelösten Betulinanteile aus den Öltröpfen erfolgen, ohne dass sich neues Betulin aus dem Feststoffanteil nachlösen muss. Die Diffusion des freien, gelösten Betulins ist ein schnellerer Vorgang als die Nachlösung aus den suspendierten TE-Partikeln. Für eine schnelle Freisetzung ist es daher sinnvoll, möglichst viel gelöstes Betulin in der Ölphase verfügbar zu haben, während eine

langanhaltende Freisetzung durch den Nachlöseprozess gewährleistet wird. Die praktische Anwendung setzt der theoretischen Langzeitfreisetzung allerdings Grenzen, da die Zubereitung nicht unendlich lange auf der Haut verbleibt, sondern durch normale Bewegung, Wasserkontakt, etc. abgetragen wird.

Bei Paraffinzubereitungen ergibt sich ein anderes Bild. Hier liegt die tatsächlich freigesetzte Betulinmenge nach 16 h höher als die anfangs gelöst vorliegende Menge. Es muss sich also im Laufe der Freisetzung weiteres Betulin nachgelöst haben. Die anfänglich gelöste Betulinmenge ist bei dem Paraffinschaum nach ca. 7 h, beim Paraffinoleogel nach ca. 12 h freigesetzt. Knicke sind in den Kurven keine erkennbar, was nicht für eine plötzliche eintretende langsamere Nachlösung spricht. In der Realität wird dieser Vorgang, getrieben vom Konzentrationsgefälle, von Anfang an statt finden.

Außerdem ist es denkbar, dass der Diffusionskoeffizient durch die geringere Oleogelgerüststärke des Paraffins höher ist und so eine beschleunigte Freisetzung durch Nachlösung im Vergleich zu Sonnenblumenöl auftritt. Diese Hypothese würde erklären, warum die Freisetzungsgeschwindigkeiten aus Paraffinzubereitungen ein ähnlich hohes Niveau, wie die Sonnenblumenölzubereitungen aufweisen (siehe Abb. 5.38)

Die kleinen Tröpfchen der Submikronemulsionen in Verbindung mit Phospholipid als Emulgator ließen auf eine schnelle Betulin-Freisetzung durch die große Tröpfchenoberfläche hoffen. Leider konnte im verwendeten Modell keine Betulin-Freisetzung aus den Submikronemulsionen beobachtet werden. Als Ansatzpunkt für zukünftige Experimente müsste das Freisetzungsmodell noch einmal überarbeitet werden, um einen Einfluss der Membran hierauf auszuschließen.

Setzt man statt der Emulsion die Lipidmatrices ein, so ergeben sich Freisetzungen, die auf dem gleichen Niveau der Oleogele liegen. Dies lässt wiederum darauf schließen, dass die verwendete PTFE-Membran im Fall der Submikronemulsionen eine Barriere darstellt und keine freie Diffusion ermöglicht. Eine weitere denkbare Erklärung ist der Einschluss des TE in Liposomen und die dadurch nicht messbare Freisetzung von Betulin (FREISE ET AL., 1979).

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung und Charakterisierung betulinhaltiger Zubereitungen zur berührungsarmen Applikation bei empfindlicher oder geschädigter Haut.

In Studien zur Wundheilung wurden positive Ergebnisse mit betulinhaltigen Oleogel-Zubereitungen erzielt, die Anwendung dieser Oleogele gestaltet sich jedoch unkomfortabel. Die Anwendungseigenschaften lassen sich verbessern, wenn man Systeme mit wässriger Außenphase, wie O/W-Emulsionen und Schaumcremes einsetzt, die sich praktisch berührungsfrei auftragen lassen und dadurch Hautreizungen durch mechanische Belastungen auf ein Minimum reduzieren. Die Herstellung und Untersuchung solcher Zubereitungen ist Thema dieser Arbeit.

Außerdem erfordert dieses Anwendungsgebiet den Einsatz möglichst weniger und gut verträglicher Hilfsstoffe, zumal bei TE-Oleogelen nur Öl und TE zum Einsatz kommen und durch Wassereinarbeitung ohne weitere Hilfsstoffe eine stabile W/O-Emulsion erhalten werden können. Die Formulierung von betulinhaltigen Systemen mit wässriger Außenphase benötigt jedoch zwangsläufig weitere Hilfsstoffe zur Stabilisierung.

Als Wirkstoff wurde mit einem Triterpen-Trockenextrakt (TE) aus dem weißen Kork der Birkenrinde gearbeitet, der zu ca. 85 % aus dem Triterpen Betulin besteht.

Es wurden Herstellmethoden und -prozesse entwickelt, mit dem Ziel möglichst kleine TE-Partikelgrößenverteilungen in Suspension erzeugen zu können, was sich durch die physikalischen Eigenschaften (plastische Verformbarkeit, geringe Löslichkeit in Wasser und Öl, schlechte Benetzung) des Triterpenextraktes herausfordernd gestaltet.

Suspensionen mit möglichst kleinen Partikelgrößen stellten die Basis für die Herstellung von Emulsionen dar. Als Hilfsstoff kamen hierbei hydrokolloide Gelbildner zum Einsatz, da sich der Einsatz von klassischen Emulgatoren aufgrund des irritativen Potentials verbietet.

Die Auswahl von Hydroxypropylmethylcellulose als Gelbildner erfolgte nach experimentellem Vergleich mit weiteren Gelbildnern (Na-Alginat, Na-Carboxymethylcellulose, Polyacrylsäure und Xanthangummi), die alle durch ihre gute Hautverträglichkeit auch in Hydrokolloidverbänden Einsatz finden. Hiermit wurden Emulsionen und Schäume mit Propan/Butan-Treibgas hergestellt und die Einflüsse auf die Schaumqualität systematisch untersucht. Hierbei zeigte sich ein Einfluss der Zusammensetzung (HPMC-Anteil, Ölphasenanteil, TE-Anteil, Treibgasdruck und -anteil) auf Schaumdichte, Blasengröße, Zerfallsgeschwindigkeit, Aufschäumgeschwindigkeit und Stabilität.

Als Haupteinflussfaktoren auf die Schaumqualität konnten der HPMC-Anteil in positiver und der TE-Anteil in negativer Richtung festgehalten werden. Für das Aufschäumverhalten zeigten sich Treibgasanteil, sowie -druck als entscheidende Faktoren. Außerdem konnten aus dem Versuchsdesign, neben den Einflüssen, optimierte Formulierungen ermittelt werden.

Schließlich wurden in-vitro Freisetzungsuntersuchungen mit Franz-Diffusionszellen durchgeführt, um die Freisetzung von Betulin aus Schaumzubereitungen mit der aus Oleogelen zu vergleichen. Hierbei wurde aus den Schäumen eine geringere Freisetzung als aus vergleichbaren Oleogelen festgestellt.

Ein weiterer Formulierungsansatz wurde mit Submikronemulsionen verfolgt. Hierbei konnten Emulsionen erhalten werden, deren Tröpfchen und Partikel deutlich unterhalb von einem Mikrometer Größe lagen - ein Aufschäumen der Emulsionen war allerdings nicht möglich. Zur Aufklärung eines Einflusses der TE-Partikel auf die Stabilisierung in diesen Systemen wurden Tropfenprofilanlysemessungen durchgeführt, wobei ein stabilisierender Einfluss des TE durch eine ausgeprägtere Elastizität der Grenzfläche festgestellt werden konnte.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer Aufbau der Haut. Gemeinfreie Abbildung modifiziert nach Gray (GRAY, 1918).	4
2.2	Strukturformeln der Triterpenbestandteile des TE.	7
2.3	Darstellung der benetzungswinkelabhängigen Stabilisierung von Pickering-Emulsionen.	10
2.4	Schematische Darstellung des Aufschäumvorgangs in O/W-Emulsionen .	11
2.5	Skizze der Kapillare und des Tropfens für eine Messung nach “buoyant drop”-Methode.	13
2.6	Vergleich zwischen “best fit”-Regression nach Pearson (PEARSON, 1901) und klassischer linearer Regression (QNIEMIEC, 2010).	14
3.1	Graphische Darstellung der Triterpenverteilung, wie in Tabelle 3.1 aufgeführt.	17
4.1	HPLC-Kalibriergerade mit in 2-Propanol gelöstem TE. Ausgewertet wurde der Betulinpeak. n = 3.	26
4.2	Screenshot der Sinterface-PAT-Software des Fitting-Prozesses.	30
4.3	Screenshot der Sinterface-PAT-Software der Fourier Transformation.	30
4.4	Schematische Darstellung des Messaufbaus zur pH-abhängigen Zetapotentialmessung.	32
4.5	Messburette nach Ph. Eur. 7.8 (COUNCEL OF EUROPE, 2013) zur Bestimmung der Aufschäumbarkeit.	33
4.6	Schematische Darstellung des Messaufbaus der Blasengrößenbestimmung. Modifiziert nach ZEISS (2013)	35

4.7	Links: Schematische Querschnittszeichnung der Zahnkolloidmühle, mit ein- gezeichneter Füllhöhe (modifiziert nach BERNER). Rechts: Fotoaufnahme der Zahnkolloidmühle im verwendeten Aufbau.	38
5.1	Schematische Darstellung des Herstellprozesses von TE-Zubereitungen .	43
5.2	Partikelgrößenverteilung einer TE-Suspension aus der Zahnkolloidmühle .	44
5.3	Lichtmikroskopische Aufnahmen einer TE-Suspension aus der Zahnkol- loidmühle	45
5.4	Lichtmikroskopische Aufnahmen einer TE-Suspension aus der Zahnkol- loidmühle mit 0,1 % Polysorbat 80-Zusatz	45
5.5	Veränderung der Partikelgrößenverteilungen von TE-Suspension mit zu- nehmender Mahldauer in der Zahnkolloidmühle. Vergleich von Suspensio- nen ohne (links) und mit (rechts) 0,1-%igem Tween 80-Zusatz	46
5.6	Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von TE-Suspensionen, mit Zahn- kolloidmühle und mit Ultra-Turrax hergestellt.	47
5.7	Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von TE-Suspension, die mit der Zahnkolloidmühle und mit dem Hochdruckhomogenisator hergestellt wur- den	48
5.8	Veränderung der Partikelgrößenverteilungen von TE-Suspension aus dem Hochdruckhomogenisator bei unterschiedlichen Betriebsdrücken von 100, 150 und 200 MPa (von oben nach unten)	49
5.9	Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von wässrigen TE-Suspensionen, nach unterschiedlicher Herstellungsmethode.	50
5.10	Vergleich der Schaumdichtebestimmung nach Ph. Eur. und nach der mo- difizierten Ph.Eur. Methode (Bürettenmethode). n = 5.	51
5.11	Lichtmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % neutralisierter Polyacrylsäu- re stabilisierten Emulsion.	52
5.12	Lichtmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % Na-Alginat stabilisierten Emul- sion.	53
5.13	Lichtmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % Xanthangummi stabilisierten Emulsion.	53

5.14	Lichmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % Natriumcarboxymethylcellulose stabilisierten Emulsion.	54
5.15	Lichmikroskopische Aufnahmen einer mit 1 % HPMC stabilisierten Emulsion.	54
5.16	Zusammenfassung der Ergebnisse des Treibgasdrucks auf die optische Beurteilung und die Schaumdichte.	56
5.17	Darstellung der berechneten Haupteinflüsse auf die Parameter "Optische Beurteilung" und "Schaumdichte". Graphik erstellt mit JMP.	60
5.18	Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse in graphischer Darstellung. Abbildung generiert mit JMP.	61
5.19	Surface Plot, der die Schaumdichte (unten, rot) und den Score der optischen Beurteilung (oben, blau) aufgetragen gegen Betulinanteil und HPMC-Anteil zeigt.	62
5.20	Surface Plot, der die Schaumdichte (unten, rot) und den Score der optischen Beurteilung (oben, blau) aufgetragen gegen Ölphasenanteil und Treibgasanteil zeigt.	62
5.21	Schaumaufnahmen mit der Stereolupe zur Blasengrößenverteilung und Stabilität. Links immer zum Zeitpunkt 0 s, rechts nach 30 s. Von oben nach unten: stabiler TE-Schaum, Rasierschaum, Haarmousse, instabiler TE-Schaum.	65
5.22	Die Spannweiten der Blasengrößen der untersuchten Schäume. Jeweils nach 0 s und 30 s nach dem Aufschäumen.	66
5.23	Darstellung der Korrelationen aus der Hauptkomponentenanalyse (61,6 % der Gesamtvarianz durch die Komponenten 1 und 2 abgedeckt).	67
5.24	Übersicht der Einflüsse der Bestandteile der Schäume auf die untersuchten Parameter. 0 bedeutet kein Einfluss, - Einfluss in negativer Richtung, + Einfluss in positiver Richtung.	68
5.25	Zetapotentialkurven der Extraktchargen TE1, TE2 und TE3 über den pH-Wert.	69
5.26	Beispielhafte Abbildung eines Puffertropfens auf einem TE-Pressling. . . .	70
5.27	Erhaltene relative Benetzungswinkel bei unterschiedlichen pH-Werten auf Presslingen aus TE1 und TE2.	71

5.28 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Lipidmatrix aus MCT, 25 % Phospholipid und 5 % TE.	73
5.29 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Lipidmatrix aus MCT, 25 % Phospholipid und 5 % TE.	73
5.30 Raman-mikroskopische Falschfarbenaufnahmen verschiedener Lipidmatrices aus MCT, Phospholipid und TE. Jeweils zwei Ausschnitte (oben und unten) der gleichen Zubereitung.	74
5.31 Raman-mikroskopische Falschfarbenaufnahmen von Submikronemulsionen.	75
5.32 Partikelgrößenverteilungen der Submikronemulsionen bei unterschiedlichen Homogenisierungsdrücken und -zeiten.	76
5.33 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Submikronemulsion.	77
5.34 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Submikronemulsion.	78
5.35 Ergebnisse der grenzflächenrheologischen Messungen. n = 5.	80
5.36 Grenzflächenrheologische Ergebnisse mit Vergleich zu phospholipidfreien Zubereitungen. n = 5.	81
5.37 Ergebnisse der Sättigungslöslichkeiten der Akzeptormedien, bestimmt über HPLC-Analytik. n = 3	83
5.38 Freisetzung aus TE-Oleogelzubereitungen. n = 3.	85
5.39 Freisetzung aus TE-Lipidmatrices. n = 3.	86
5.40 Freisetzung aus TE-Schäumen. n = 3.	87

Tabellenverzeichnis

3.1 Zusammensetzung der unterschiedlichen Triterpenextrakte laut Gaschromatographischer Analyse der Birken AG.	17
3.2 Verwendete Chemikalien	18
3.3 Weitere verwendete Chemikalien und Substanzen	19
3.4 Verbrauchsmaterial	20
3.5 Verwendete Geräte und Instrumente	21
3.6 Weitere verwendete Geräte und Instrumente	22
3.7 Weitere verwendete Geräte und Instrumente	23
5.1 Zusammensetzung der Zubereitungen des Versuchsdesigns. Die Nummer gibt die randomisierte Herstellreihenfolge an.	57
5.2 Ergebnisse der optischen Beurteilung im Einzelnen. Der Score ergibt sich als Mittelwert von "Feinporigkeit", "Stabilität", "Aussehen" und "Expansionszeit", die jeweils auf einer arbiträren Skala von 1 bis 10 (10 als ideales Ergebnis), mit Referenzschäumen als Vergleich beurteilt wurden.	58
5.3 Zusammensetzung der Zubereitungen des Versuchsdesigns mit Sonnenblumenöl als Ölphase.	64
5.4 Sättigungslöslichkeiten der Triterpenbestandteile in verschiedenen Ölphasen und Wasser. Quellen: LASZCZYK (2007); GRYSKO (2011)	84
6.1 Gelöster Betulinanteil (BE) in μg in 1 g der unterschiedlichen Zubereitungen.	96

Literaturverzeichnis

Adamson, A. W.; Gast, A. P.; Others, A., *Physical chemistry of surfaces*. Interscience publishers New York (1967).

Anton, H., *Elementary Linear Algebra*. John Wiley & Sons (2014), ISBN 978-1118677452.

Aveyard, R.; Binks, B. P.; Clint, J. H., Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100-102: 503–546 (2003).

Berner, C., [http://www.christianberner.se/\\$-1/file/fg-mz-2005.jpg](http://www.christianberner.se/$-1/file/fg-mz-2005.jpg), zugegriffen am 29.11.2014 (2014).

Binks, B. P., Particles as surfactants - similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7: 21–41 (2002).

Binks, B. P.; Lumsdon, S. O., Catastrophic Phase Inversion of Water-in-Oil Emulsions Stabilized by Hydrophobic Silica. *Langmuir*, 16: 2539–2547 (2000a).

Binks, B. P.; Lumsdon, S. O., Influence of Particle Wettability on the Type and Stability of Surfactant-Free Emulsions. *Langmuir*, 16 (23): 8622–8631 (2000b).

Binks, B. P.; Murakami, R., Phase inversion of particle-stabilized materials from foams to dry water. *Nature materials*, 5 (11): 865–9 (2006).

Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M., Wound Healing

Dressings and Drug Delivery Systems : A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (8): 2892–2923 (2008).

Bonaccorso, E.; Butt, H.-J.; Craig, V. S., Surface Roughness and Hydrodynamic Boundary Slip of a Newtonian Fluid in a Completely Wetting System. *Physical Review Letters*, 90 (14): 144501 (2003).

Brandner, J.; Houdek, P.; Quitschau, T.; Siemann-Harms, U.; Ohnemus, U.; Willhardt, I.; Moll, I., An ex-vivo model to evaluate dressings & drugs for wound healing. *EWMA*, 6 (2): 11–15 (2006).

Council of Europe, *European Pharmacopoeia 7th Edition*. The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg (2013).

Dickinson, E., Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17 (1): 25–39 (2003).

Distelrath, A.; Scheffler, B.; Laszczyk, M., Pilot-Erfahrungen zur Therapie und Prophylaxe von Hautveränderungen unter Chemo- bzw. Radiochemotherapie mit Betulin-Emulsionen. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 31 (04): 179–184 (2010).

Ebeling, S.; Naumann, K.; Pollok, S.; Wardecki, T.; Vidal-Y-Sy, S.; Nascimento, J. M.; Boerries, M.; Schmidt, G.; Brandner, J. M.; Merfort, I., From a traditional medicinal plant to a rational drug: understanding the clinically proven wound healing efficacy of birch bark extract. *PloS one*, 9 (1): e86147 (2014).

Effendy, I.; Maibach, H. I., Detergent and skin irritation. *Clinics in dermatology*, 14 (1): 15–21 (1996).

Ekman, R., The Suberin Monomers and Triterpenoids from the Outer Bark of *Betula verrucosa* Ehrh. *Holzforschung*, 37 (4): 205–211 (1983).

Epstein, W. L.; Maibach, H. I., Cell renewal in human epidermis. *Archives of dermatology*, 92 (4): 462 (1965).

- Everett, D. H.**, Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units. Appendix II: Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry. Part 1.13. Selected definitions, terminology and symbols for rheological properties. *Pure and Applied Chemistry*, 31 (4): 577–638 (1972).
- Faller, A.; Schünke, M.**, *Der Körper des Menschen* (2008).
- Forrest, R. D.**, Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 75 (3): 198–205 (1982).
- Freise, J.; Magenstedt, P.; Schmidt, F. W.**, Die in vitro und vivo Stabilität des Einschusses von Methotrexat in negativ geladenen Liposomen nach Sterilfiltration. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 34: 114—119 (1979).
- Garti, N.**, HYDROCOLLOIDS AS EMULSIFYING AGENTS FOR OIL-IN-WATER EMULSIONS. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20 (1-2): 327–355 (1999).
- Gillitzer, R.; Goebeler, M.**, Chemokines in cutaneous wound healing. 69 (April) (2001).
- Gonzenbach, U. T.; Studart, A. R.; Tervoort, E.; Gauckler, L. J.**, Ultrastable particle-stabilized foams. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 45 (21): 3526–30 (2006).
- Goodwin, J.**, *Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers*. John Wiley & Sons (2009), ISBN 9780470518809.
- Gray, H.**, *Anatomy of the Human Body*. Lea & Febiger (1918).
- Grysko, M.**, *Herstellung und Charakterisierung von halbfesten Systemen auf der Basis von Triterpentrockenextrakt aus Birkenkork*. Dissertation (2011).
- Grysko, M.; Daniels, R.**, Evaluation of the mechanism of gelation of an oleogel based on a triterpene extract from the outer bark of birch. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68 (7): 572—577 (2013).

- Guo, S.; Dipietro, L. a.**, Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89 (3): 219–29 (2010).
- Habiyaremye, I.; Stevanovic-Janezic, T.; Riedl, B.; Garneau, F.-X.; Jean, F.-I.**, PENTACYCLIC TRITERPENE CONSTITUENTS OF YELLOW BIRCH BARK FROM QUEBEC*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 22 (2-3): 83–91 (2002).
- Hintz, R.; Johnson, K.**, The effect of particle size distribution on dissolution rate and oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 51 (1): 9–17 (1989).
- Housman, T. S.; Mellen, B. G.; Rapp, S. R.; Fleischer, A. B.; Feldman, S. R.**, Patients with psoriasis prefer solution and foam vehicles: a quantitative assessment of vehicle preference. *Cutis*, 70 (6): 327–32 (2002).
- Hurwitz, G.; Guillen, G. R.; Hoek, E. M. V.**, Probing polyamide membrane surface charge , zeta potential , wettability , and hydrophilicity with contact angle measurements. *Journal of Membrane Science*, 349 (1-2): 349–357 (2010).
- Hussein, R.; Müller-Goymann, C. C.**, Variation der Formulierung von festen Lipidnanopartikeln mit Phospholipon 90 H. In *DPhG* (2008).
- Huyke, C.; Reuter, J.; Rödiger, M.; Kersten, A.; Laszczyk, M.; Scheffler, A.; Nashan, D.; Schempp, C.**, Treatment of actinic keratoses with a novel betulin-based oleogel. A prospective, randomized, comparative pilot study. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 7 (2): 128–33 (2009).
- Huyke, C. M.; Schempp, C.**, Behandlung von Verbrennungen 2. Grades mit Birkencreme. *Merkurstab*, 5: 402 (2005).
- Israelachvili, J.**, The science and applications of emulsions - an overview. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91: 1–8 (1994).
- Karickhoff, S. W.; Morris, K. R.**, Sorption dynamics of hydrophobic pollutants in sediment suspensions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4 (4): 469–479 (1985).

- Köhler, K.; Schuchmann, I. H. P.**, *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*. Behrs Verlag DE (2012).
- Kralchevsky, P. A.; Nagayama, K.**, Capillary forces between colloidal particles. *Langmuir*, 10 (1): 23–36 (1994).
- Krasutsky, P. a.**, Birch bark research and development. *Natural product reports*, 23 (6): 919–42 (2006).
- Kumbhar, D. D.; Pokharkar, V. B.**, Engineering of a nanostructured lipid carrier for the poorly water-soluble drug, bicalutamide: Physicochemical investigations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 416: 32–42 (2013).
- Kutz, G.; Daniels, R.; Trommer, H.**, *Emulsionen*. Editio Cantor (2010), ISBN 978-3871933981.
- Langevin, D.**, Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 88 (1-2): 209–222 (2000).
- Laszczyk, M.**, *Triterpentrockenextrakt aus Birkenkork (Betula alba cortex)*. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau (2007).
- Laszczyk, M.; Jäger, S.; Simon-Haarhaus, B.; Scheffler, A.; Schempp, C. M.**, Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (betulae cortex). *Planta medica*, 72 (15): 1389–95 (2006).
- Laszczyk, M.; Reitenbach-Blindt, I.; Gehring, W.**, Regenerative und anti-entzündliche Effekte von Betulin-Emulsionen bei gestörter epidermaler Barrierefunktion. *Aktuelle Dermatologie*, 36 (01/02): 24–28 (2009).
- Lazghab, M.; Saleh, K.; Pezron, I.; Guigon, P.; Komunjer, L.**, Wettability assessment of finely divided solids. *Powder Technology*, 157 (1-3): 79–91 (2005).
- Madison, K. C.**, Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être“ of the Epidermis. *The*

Journal of Investigative Dermatology, 121 (2): 231–241 (2003).

Majno, G., *The healing hand: man and wound in the ancient world*. Harvard University Press (1991).

Makievski, A. V.; Fainerman, V. B.; Miller, R.; Bree, M.; Liggieri, L.; Ravera, F., Determination of equilibrium surface tension values by extrapolation via long time approximations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 122 (1): 269–273 (1997).

Martin, P., Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276 (5309): 75–81 (1997).

Metelmann, H.-R.; Podmelle, F.; Waite, P. D., Long-Term Cosmetic Benefit of Wound Healing by Betuline. *American Journal of Cosmetic Surgery*, 29 (1): 19–24 (2012).

Müller, R. H., *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1996), ISBN 978-3-8047-1465-6.

Müller, R. H.; Mäder, K.; Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 50 (1): 161–77 (2000).

Müller-Debus, C. F., *Die Wirkung einer Betulin-Emulsion auf die Reepithelialisierung der Haut in der Plastisch-ästhetischen Chirurgie*. Dissertation (2011).

O’Connell, M. M.; Bentley, M. D.; Campbell, C. S.; Cole, B. J., Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches. *Phytochemistry*, 27 (7): 2175–2176 (1988).

Oles, V., Shear-induced aggregation and breakup of polystyrene latex particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 154 (2): 351–358 (1992).

Pearson, K., On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, S. 559–572 (1901).

- Pickering, S. U.**, Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 91: 2001–2021 (1907).
- Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J.-M.**, The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17 (12): 1063–1072 (2008).
- Qniemiec**, Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Regression{_}lines.png (2010).
- Richefeu, V.; El Youssoufi, M.; Radjaï, F.**, Shear strength properties of wet granular materials. *Physical Review E*, 73 (5): 051304 (2006).
- Rimpler, H.; Kuhn, H.; Leuckert, C.**, Die Triterpene von *Betula pendula* Roth und *Betula pubescens* Ehrh. Eine vergleichende Untersuchung der Rinden. *Archiv der Pharmazie*, 299 (5): 422–428 (1966).
- Rott, C.**, *Herstellung und Charakterisierung wasserbasierter Dispersionen, Emulsionen und Schaumcremes mit Betulin*. Master's thesis, Eberhard Karls Universität Tübingen (2009).
- Schubert, M.**, Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55 (1): 125–131 (2003).
- Schulz, M. B.; Daniels, R.**, Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for sub-micron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49 (3): 231–236 (2000).
- Singer, A. J.; Clark, R. A. F.**, Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*, 341 (10): 738–746 (1999).
- Stadelmann, W. K.; Digenis, a. G.; Tobin, G. R.**, Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *American journal of surgery*, 176 (2A Suppl): 26S–38S (1998).

- Steinbrenner, I.**, Diplomarbeit: Wirkstofffreisetzung und Permeation aus einer Birkenkork-Trockenextrakt- Wirkstoffformulierung (2011).
- Steinbrenner, I.; Houdek, P.; Pollok, S.; Brandner, J. M.; Daniels, R.**, Influence of the oil phase and topical formulation on the wound healing ability of a birch bark dry extract. *Forthcoming: PloS one* (2016).
- Walther, A.; Müller, A. H. E.**, Janus Particles. *Soft Matter*, 4: 663–668 (2008).
- Washburn, E. W.**, The Dynamics of capillary flow. *Physical Review*, 17 (3): 273–283 (1921).
- Weckesser, S.; Laszczyk, M. N.; Müller, M. L.; Schempp, C. M.; Schumann, H.**, Topical treatment of necrotising herpes zoster with betulin from birch bark. *Forschende Komplementärmedizin (2006)*, 17 (5): 271–273 (2010).
- Wilde, P.**, Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5 (3-4): 176–181 (2000).
- Wilhelm, K.-P.; Freitag, G.; Wolff, H. H.**, Surfactant-induced skin irritation and skin repair. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30 (6): 944–949 (1994).
- Willenborg, S.; Eming, S. a.**, Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 12 (3): 214–21, 214–23 (2014).
- Young, T.**, An Essay on the Cohesion of Fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 95: 65–87 (1805).
- Zeiss**, Wikimedia commons. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ZEISS_Stemi_2000_\(10943154625\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ZEISS_Stemi_2000_(10943154625).jpg) (2013).
- Zhao, Q.; Zhao, M.; Li, J.; Yang, B.; Su, G.; Cui, C.; Jiang, Y.**, Effect of hydroxypropyl methylcellulose on the textural and whipping properties of whipped cream. *Food Hydrocolloids*, 23 (8): 2168–2173 (2009).