

GALENISCHE ENTWICKLUNG EINES INSEKTENREPELLENTS MIT VERBESSERTER HAFTFESTIGKEIT

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Jörn Köhler
aus
Kirchen

Bonn Oktober 2001



**GALENISCHE ENTWICKLUNG EINES INSEKTENREPELLENTS MIT
VERBESSERTER HAFTFESTIGKEIT**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jörn Köhler

aus

Kirchen

Bonn Oktober 2001

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. R. Süverkrüp
2. Referent: Prof. Dr. K.-J. Steffens

Tag der Promotion: 26.10.2001

Meiner kleinen Familie

Inhalt

1.	Einführung	4
2.	Theoretischer Teil	14
2.1.	Repellents	14
2.1.1.	Sinnesphysiologie der Insekten	14
2.1.2.	Wirkmechanismen von Repellents	16
2.1.3.	Testmethoden	16
2.1.4.	Synthetische Repellents	19
2.1.5.	Natürliche Wirkstoffe und deren synthetische Abkömmlinge	27
2.1.6.	Repellents für die orale Applikation	32
2.1.7.	Raumschutz	32
2.1.8.	Wirksamkeitsvergleich	33
2.2.	Darreichungsformen	33
2.3.	Resorption von Arzneistoffen aus Dermatika und Haftfestigkeit	35
2.3.1.	Kriterien für die Resorption	36
2.3.2.	Methoden zur Beeinflussung der Resorption	37
2.4.	Einfluss der Vehikel auf Wirkstärke und Wirkdauer von Repellents	46
3.	Experimenteller Teil	49
3.1.	Faktorielle Versuchsplanung und Zubereitungen verschiedener Generationen	49
3.1.1.	Materialien	51
3.1.2.	Formulierungsansätze	51
3.1.3.	Einfluss der Hilfsstoffe auf die physikalische Stabilität	75
3.1.4.	Ergebnisse	78
3.2.	Abwaschtest	85
3.2.1.	Geräte und Materialien	85
3.2.2.	Methode	86

Inhalt

3.2.3.	Haftfestigkeit	90
3.3.	Ausgewählte Rezepturen für In-vitro- und Humanversuche	97
3.4.	Stabilitätsuntersuchungen	98
3.4.1.	Materialien	98
3.4.2.	Methode	98
3.4.3.	Ergebnisse	100
3.5.	Bestimmung der Phasenlage	105
3.5.1.	Geräte und Materialien	105
3.5.2.	Methoden	105
3.5.3.	Ergebnisse	107
3.6.	Viskositätsmessungen	112
3.6.1.	Geräte und Materialien	114
3.6.2.	Methode	116
3.6.3.	Ergebnisse	118
3.7.	In-vitro-Freisetzung	128
3.7.1.	Geräte und Materialien	128
3.7.2.	Methode	129
3.7.3.	Ergebnisse	131
3.8.	Bewegungsmesskammer	136
3.8.1.	Geräte und Materialien	138
3.8.2.	Methoden	140
3.8.3.	Ergebnisse	153
4.	Diskussion und Ausblick	165
5.	Zusammenfassung	167
6.	Anhang	169
6.1.	Symbole und Abkürzungen	169
6.2.	Rezepturen	171

Inhalt

6.3.	Beispiel-Macro für die Auswertung von Bewegungsexperimenten	174
7.	Literatur	176

1. Einführung

”Es ist eine Ironie des Schicksals, dass im Laufe der Evolution die Hauptfeinde des Menschen keine großen, wilden Tiere wie Löwen, Tiger oder Bären waren, sondern winzige Insekten, gelegentlich weniger als ein Millionstel so groß wie ihr Opfer.”

[Berenbaum, M.R., 1]

Insekten gehören zum Stamm der Gliederfüßer (Arthropoda). Neben der Ordnung Insecta beinhaltet er auch die Ordnung der Arachnida (Spinnentiere). (Abbildung 1-1).

Vertreter beider Ordnungen können den Menschen direkt schädigen. Jedoch wird die von Berenbaum aufgezeigte Ironie noch viel deutlicher, wenn man bedenkt, dass oftmals nicht diese Tiere selbst dem Menschen schaden, sondern von ihnen übertragene Krankheitserreger, die noch um ein Vielfaches kleiner sind.

Vergleicht man als Beispiel die Masse des Gelbfieberevirus von $1,13 \times 10^{-19}$ kg mit der eines Menschen von 75 kg, so ist der Unterschied noch um den Faktor 10^{14} größer als von Berenbaum beschrieben.

Den Stamm der Gliederfüßer zeichnet eine große Artenvielfalt aus. Mit rund 850000, umfaßt er fast 20 mal so viele Arten wie der Stamm der Chordatiere (Chordata), unter denen der Mensch (*Homo sapiens sapiens*) einzuordnen ist.[4].

Nur wenige Individuen der Arthropoda jedoch sind nennenswerte Feinde für den Menschen. Der überwiegende Teil nämlich existiert unbemerkt neben ihm auf der Erde. Einige Arten richten geringfügigen Schaden an der Gesundheit einzelner an, wobei sie als direkter Feind wirken.

Die in Mitteleuropa beheimatete Stechmücke (*Culex pipiens*) beispielsweise verursacht durch ihren Stich die Bildung von geröteten juckenden Quaddeln.

Auch der Menschenfloh (*Pulex irritans*) löst durch seinen Biss Juckreiz aus.

Die Milbenart *Sarcoptes scabiei* besiedelt die menschliche Haut und ruft die unangenehme Krätze (*Skabies*) hervor.

Einführung

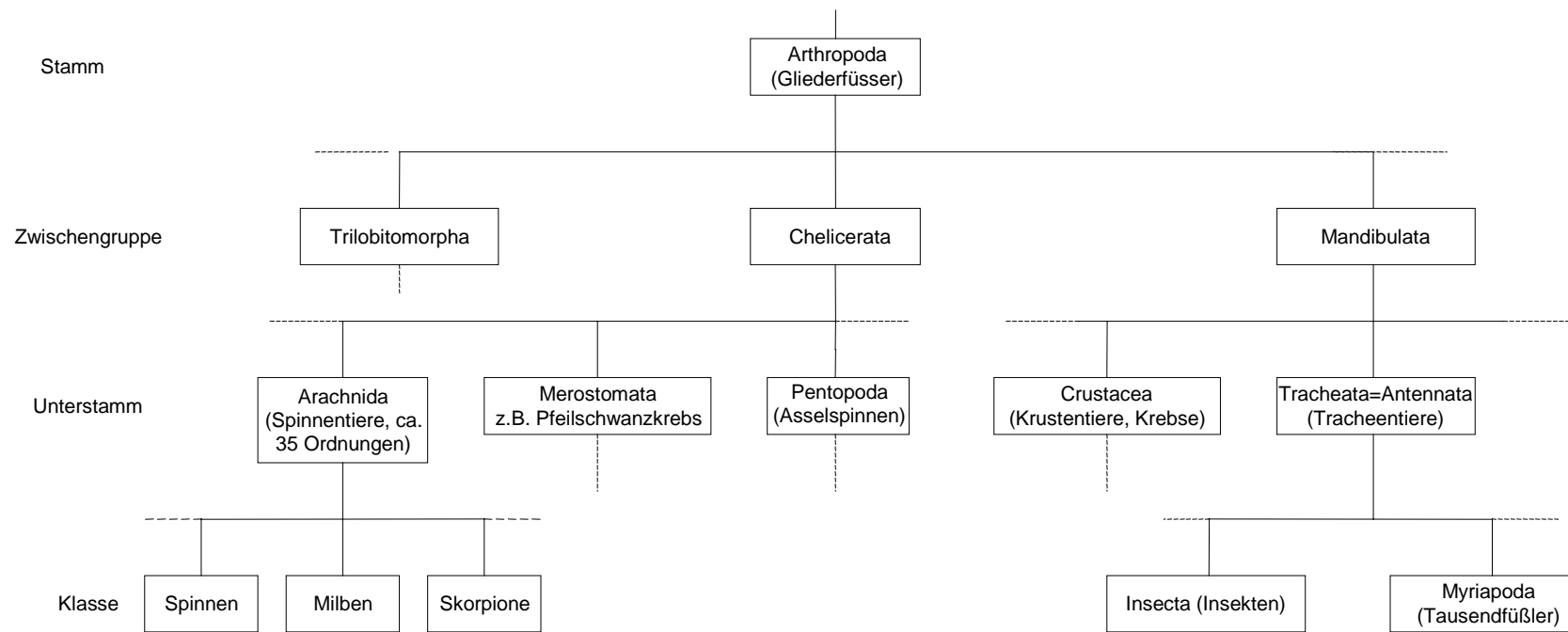


Abbildung 1-1: Systematik der Gliederfüßer nach [2, 3, 4] ¹

¹ Wenn die systematischen Kategorien (Taxa) nicht ausreichen, können Zwischenkategorien (z.B. Unterordnung, Unterfamilie) eingeschoben werden.

Einführung

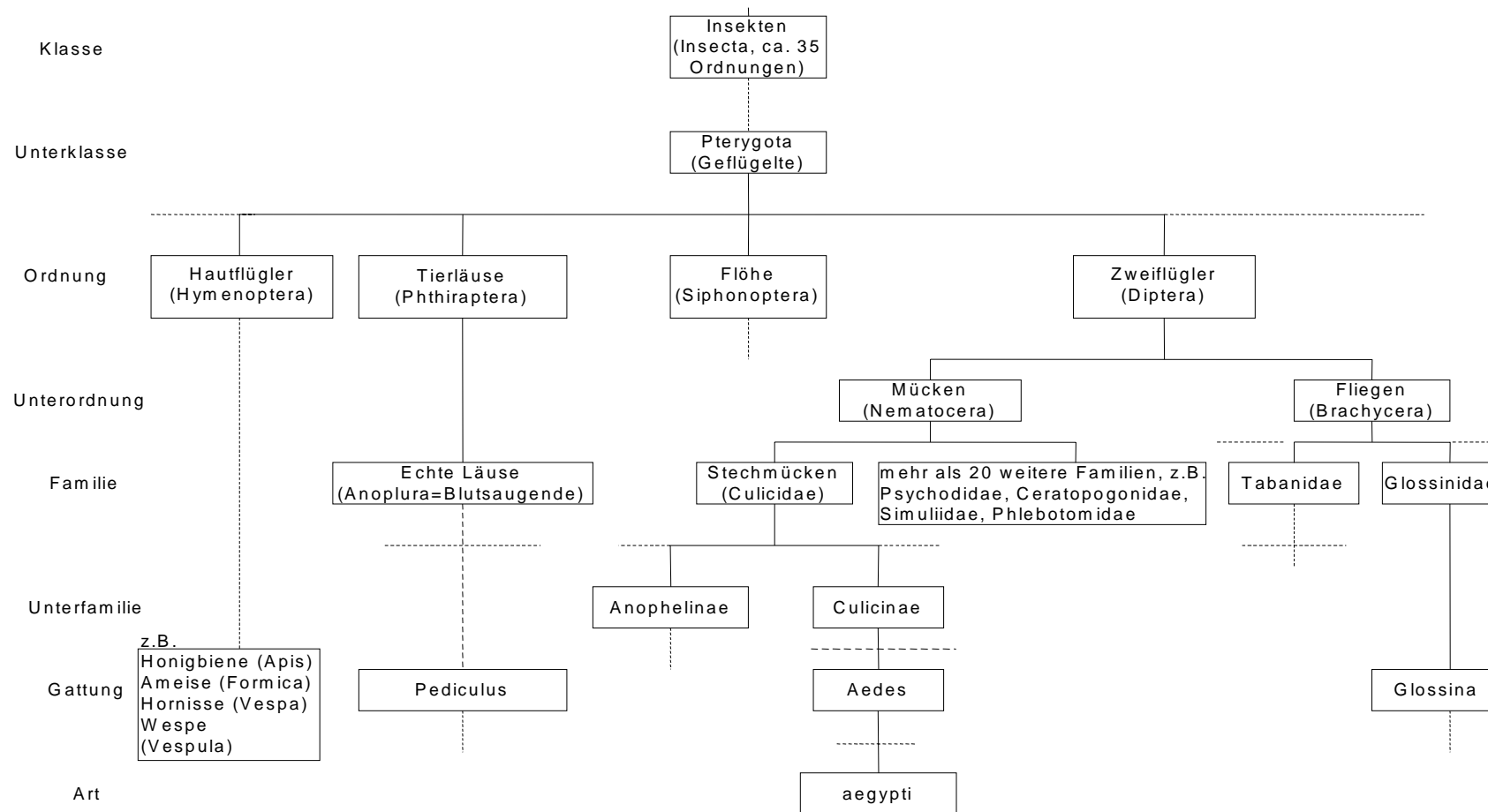


Abbildung 1-2: Systematik der Insekten nach [2, 3, 4] am Beispiel der Gelbfiebermücke (*Aedes aegypti*)²

² Wenn die systematischen Kategorien (Taxa) nicht ausreichen, können Zwischenkategorien (z.B. Unterordnung, Unterfamilie) eingeschoben werden.

Neben diesen, die während der Nahrungsaufnahme bei ihrem Wirt Mensch eine Reaktion hervorrufen, gibt es unter den Arthropoda auch solche direkten Feinde, die unter dem Gefühl der Bedrohung dem Feind Mensch ein Gift verabreichen und dadurch Schmerz und Schwellung hervorrufen, z. B. die Honigbiene (*Apis mellifica*), die Wespe (u.A. *Vespula*-Arten) oder die Hornisse (*Vespa crabro*) als Vertreter der *Insecta*, einige Skorpione (u. A. *Euscorpius*- Arten) oder Vogelspinnen (*Aviculariidae* u.a. Familien) unter den *Arachnida*.

Arthropoda können den Menschen aber nicht nur unmittelbar schädigen, als sog. Vektoren fungieren sie oftmals, wie schon erwähnt, als Überträger von Krankheitserregern.

Aufgrund schlechter hygienischer Verhältnisse ist es in vergangenen Jahrhunderten auf diesem Wege zu Epidemien gekommen.

Im Mittelalter fielen Millionen von Menschen der Pest zum Opfer. Der Erreger, *Yersinia pestis*, wird vom orientalischen Rattenfloh (*Xenopsylla cheopis*) auf den Menschen übertragen. Die blutsaugenden Flöhe nehmen die Erreger von einem erkrankten Nager auf. Sobald dieser an den Folgen der Krankheit stirbt, wechseln die Flöhe auf einen anderen Wirt, beispielsweise den Menschen. Die Bakterien verstopfen aufgrund rascher Vermehrung die Kaumägen der Flöhe, so dass diese keine Nahrung mehr aufnehmen können. Die hungernden Flöhe versuchen trotzdem Blutmahlung zu sich zu nehmen und erbrechen dabei ihren Mageninhalt in die Blutbahn des Wirtes [1].

Napoleon verlor seinen Russlandfeldzug laut Berenbaum nicht aufgrund einer schlechten militärischen Strategie sondern wegen des Ausbruchs von Fleckfieber (*Typhus exanthematicus*), durch das große Teile seiner Armee starben. Noch Anfang des 20. Jahrhunderts starben weltweit drei Millionen Menschen an der Krankheit. Die Mortalität liegt, je nach Patientenalter zwischen 10 und 100 %. Sie wird durch die Kleiderlaus (*Pediculus humanus humanus*) auf den Menschen übertragen. Die Erreger (*Rickettsia prowazeki*) werden entweder mit dem Kot einer Laus oder durch den Menschen, der eine Laus zerdrückt, freigesetzt und gelangen über eine

Einführung

Wunde, die möglicherweise von einem juckenden Läusebiss herrührt, in die Blutbahn[1].

Beide Krankheiten spielen aufgrund der besseren hygienischen und medizinischen Verhältnisse jedoch heute in den industrialisierten Ländern kaum noch eine Rolle.

In Europa ist der zu den Milben zählende gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*) ein ernst zu nehmender Ektoparasit dieser Zeit. Er sitzt auf Büschen, auf der Unterseite von Blättern, in hohem Gras oder auf Farnkraut und wartet dort oft monatelang auf einen Wirt, auf den er sich dann fallen lässt, um eine Blutmahlzeit einzunehmen. Dabei bohrt er seinen mit Widerhaken besetzten Stechrüssel in die Haut des Opfers und verweilt dort u.U tagelang, bis er mit Blut vollgesogen ist. Das Sekret, das er absondert, enthält nicht nur anästhesierende Substanzen, durch die er unentdeckt bleibt, sondern gegebenenfalls auch die Erreger der beiden folgenden Krankheiten [5].

Er ist Überträger der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME). Bei dieser Viruserkrankung kommt es 1-2 Wochen nach dem Biss zu grippalen Symptomen. Bei einem Teil der Erkrankten folgen nach einem kurzen beschwerdefreien Intervall Komplikationen am Gehirn mit starken Kopfschmerzen, Lähmungen, Verwirrtheit, Bewusstseinsverlust und Sehstörungen. Die Übertragung erfolgt in den Monaten März bis Oktober, die Hauptverbreitungsgebiete sind in Deutschland im südlichen Baden-Württemberg und in Bayern, sowie Teile von Österreich, der Schweiz, Skandinavien und Osteuropa. Das Risiko ist insgesamt gering, da selbst in den Hochrisikogebieten nur jede 50. bis 100. Zecke Virusträger ist, und es nur in einem Teil der Infektionsfälle tatsächlich zu einem Ausbruch der Krankheit kommt. Trotzdem ist sie ernst zu nehmen, da sie zu Todesfällen oder Dauerschäden führen kann [6].

Eine kausale Therapie ist nicht möglich, jedoch die prophylaktische Impfung, in Deutschland zugelassen für Erwachsene und Kinder ab 12 Jahren.

Eine zweite durch *Ixodes ricinus* übertragene Krankheit ist die (Lyme-) Borreliose, eine bakterielle Infektion durch *Borrelia burgdorferi*, deren Symptome u.a. quälende Schmerzen, Lähmung von Hirnnerven, Entzündung des Gehirns oder des Rückenmarks sind. Wenn die Erkrankung rechtzeitig erkannt wird, kann sie gut mit Antibiotika therapiert werden [10].

Einführung

Die immer populärer werdenden Fernreisen in tropische Länder jedoch stellen die in dieser Hinsicht bedrohlichste Gefahrenquelle der modernen Zeit dar. Besondere Aufmerksamkeit wird in dieser Arbeit deswegen den dort lebenden Insekten als Überträger von nicht selten tödlich endenden Krankheiten geschenkt.

Die Klasse der Insekten beinhaltet die Ordnung der Zweiflügler (Diptera). Sie umfasst insgesamt 90000 Arten, davon gehören 50000 Arten der Unterordnung Brachycera (Fliegen) und 35000 Arten der Unterordnung der Nematocera (Mücken) an (Tabelle 1-1) [4].

Ordnung:	Diptera (Zweiflügler) 90000 Arten
Unterordnung:	Nematocera (Mücken) 35000 Arten
Familie:	Psychodidae (Schmetterlingsmücken = Mottenmücken) Ceratopogonidae (Helidae, Gnitzen, Bartmücken) Simuliidae (Kriebelmücken, Melusinidae, schwarze Fliegen mit Stechrüssel) Culicidae (Stechmücken)
Einteilung der Stechmücken (Culicidae) in Unterfamilien:	Anophelinae (Gabelmücken) Culicinae (Culex pipiens = gemeine Stechmücke, Aedes = Wald- und Wiesenmücke)

Tabelle 1-1: Ordnung der Diptera mit möglichen Zwischenkategorien nach [4]

Die wohl bekannteste und am häufigsten vorkommende Tropenkrankheit ist die Malaria. Sie kommt besonders in den tropischen Regionen Afrikas, im südlichen Asien, im Südwestpazifik und Teilen von Zentral- und Südamerika vor [7].

Laut Schätzungen der WHO sterben jährlich weltweit 1 Millionen Menschen an Malaria.

Übertragen wird sie von Anopheles-Mücken, hervorgerufen durch unterschiedliche Plasmodien-Arten und tritt dementsprechend in unterschiedlichen Varianten auf.

Einführung

Malaria tertiana wird von Plasmodium vivax und ovale, Malaria quartana durch Plasmodium malariae hervorgerufen. Diese beiden Formen sind selten und nicht lebensbedrohlich.

Malaria tropica, die gefährlichste Form, wird durch Plasmodium falciparum hervorgerufen. Sie hat eine Inkubationszeit von 1-2 Wochen und kann schnell lebensbedrohlich werden.

Eine medikamentöse Prophylaxe kann mit Primaquin, Chloroquin, Mefloquin, Proguanil und Doxycyclin erfolgen, die den Ausbruch der Krankheit, nicht aber die Infektion verhindern. Zur Therapie dienen die gleichen Wirkstoffe; zusätzlich können Halofantrin, Chinin sowie eine Kombination aus Pyrimethamin und Sulfadoxin angewandt werden. Wegen der schnellen Resistenzentwicklung ist eine ausschließliche Einnahme von Medikamenten oft unzureichend und Maßnahmen zur Vorbeugung von Mückenstichen müssen ergriffen werden [5, 8].

Eine zweite weit verbreitete Tropenkrankheit ist das Gelbfieber. Es wird vom Gelbfiebvirus, *Charon evagatus*, verursacht.

Es kommt vor in West- und Zentralafrika, sowie in Zentral- und Mittelamerika [6]. WHO-Schätzungen zufolge sterben jährlich 30000 Menschen an Gelbfieber.

Die Erkrankung verläuft in 10 Prozent der Fälle tödlich. Überlebt ein Patient jedoch, behält er lebenslange Immunität. Eine Impfprophylaxe mit Gelbfiebvakzine ist möglich, eine Therapie hingegen nicht.

Übertragen wird diese Krankheit von der Gelbfiebertmücke, *Aedes aegypti*.

Sie gehört zur Unterfamilie der Culicinae. Mit bloßem Auge lassen sich diese durch ihre Körperhaltung von den Anophelinae unterscheiden. Während die Anophelinae mit ihrem Kopf dichter auf dem Untergrund sitzen als mit ihrem Hinterteil und dadurch einen schrägen Schatten auf die Wand werfen, sitzen die Culicinae parallel zur Wand und werfen einen geraden Schatten. Bei genauerem Hinsehen ist sie auch von ihren Gattungsgenossen durch ihre besondere Rückenzeichnung zu unterscheiden. Die Gelbfiebertmücke liebt feuchtwarmes Klima und lebt in Menschennähe. Für die Eiablage benötigt sie nur kleine Wasseransammlungen, in der Natur beispielsweise Blattachsen, Blüten, Baumhöhlen oder Kokosnussschalen, aber auch Glascherben, Konservenbüchsen oder Dachrinnen genügen. Auf Wasser gelegt, schlüpfen die Eier z. T. schon nach 2 Tagen, aber auch in der Trockene können sie eine ganze Zeit überdauern, um dann erst in der nächsten Regenzeit zu schlüpfen.

Einführung

Die Larven leben an der Wasseroberfläche oder hängen mit ihrem für *Aedes* typischen Atemrohr kurz darunter und ernähren sich vom mikroskopischen Aufwuchs an den Wänden des Behältnisses. Ihre Entwicklung braucht unter günstigen Lebensbedingungen 6 Tage. Die Puppe lebt ähnlich wie die Larve, jedoch ohne zu fressen. Ihre Entwicklung benötigt 2 Tage und mehr. Von den ausgewachsenen Mücken stehen nur die Weibchen und das unabhängig von der Tageszeit, wobei sie bei einer Temperatur von 25-28°C ihre höchste Aktivität haben [12].

Wegen ihrer anspruchslosen Lebensweise und ihrer schnellen Entwicklung diente die *Aedes*-Mücke als Versuchstier zum Test der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Repellent-Formulierungen.

Diese Mückenart überträgt unter anderen auch das Denguefieber, eine Infektion mit grippeähnlichen Symptomen, die nach einer Woche komplikationslos abheilt ("Siebentage-Fieber"). Bestimmte Varianten können gelegentlich einen schweren Verlauf mit Blutungsneigung und Schocksymptomen nehmen, wobei Kinder eher betroffen sind als Erwachsene [6].

Denguefieber gibt es in Westafrika, im Pazifik, in Süd- und Südostasien, in der Karibik, in Venezuela und in Kolumbien [5, 6, 10].

Im tropischen Afrika tritt zum Teil gehäuft die tödliche Schlafkrankheit auf. Sie wird ausgelöst durch *Trypanosoma brucei gambiense* und übertragen von der Tsetsefliege (Gattung *Glossina*).

Im Anfangsstadium kann mit Suramin therapiert werden, eine Impfung ist nicht möglich [9,10].

Weitere, jedoch äußerst selten vorkommende Tropenkrankheiten, die von Insekten übertragen werden, sind das Dreitagefieber (syn. Pappatasifieber), das durch Phleboviren ausgelöst und von der Sandfliege (*Phlebotomus pappatasi*, Psychodidae) übertragen wird, sowie die Filarieninfektion Onchozerkose (Flusskrankheit), die durch den Nematoden *Onchocera volvulus* hervorgerufen und von Kriebelmücken (Simuliidae, Melusinidae) der Gattung *Simulium* übertragen wird [10].

Die Gefahr, sich mit einer der beschriebenen Krankheiten zu infizieren, kann nicht sicher ausgeräumt werden, da die vollständige Ausrottung der Überträger, z.B. durch

Einführung

Zerstörung der Lebensbedingungen und Brutstätten oder das Ausbringen von Insektiziden wie DDT, nicht möglich ist.

Daher bleibt die wichtigste vorbeugende Maßnahme, den Kontakt des Insekts mit der Haut möglichst zu verhindern.

In den gefährdeten Gebieten sollten, vor allem in der Dämmerung, stehende Gewässer gemieden werden, Räume durch Insektizidverdampfer oder Sprays entwest werden, sowie Fliegengitter und Moskitonetze als Schutz benutzt werden. Möglichst große Hautareale sollten von Kleidung bedeckt sein und unbedeckte Stellen mit Repellents geschützt werden [5].

Repellents oder Repellentien (repellere = abweisen, vertreiben) sind Stoffe, die abstoßend wirken, ohne zu schädigen [11]. In der entomologischen Terminologie versteht man darunter Duftstoffe, die von Insekten ausgesandt werden, um Feinde zu vertreiben. Davon unterscheidet man die über Geschmacksorgane wirkenden Deterrentien, deren abschreckende Wirkung nur über sehr kurze Distanzen erzielt wird [12]. Im pharmazeutischen und medizinischen Sprachgebrauch definiert man Repellents (Insektenvertreibungsstoffe) als Einzelstoffe, Stoffgemische und Zubereitungen, die durch Auftragen auf die Haut oder Imprägnierung von Kleidung und anderen Materialien Insekten und Spinnentiere vertreiben oder deren Ortung von Zielen verhindern, um Menschen und Tiere zu schützen [13, 14].

Der zur Zeit gebräuchlichste Wirkstoff ist N,N-Diethyl-m-toluamid (DEET). Er wurde von Wissenschaftlern des U.S. Department of Agriculture entwickelt und von der U.S. Army 1946 [15] patentiert. Für die Zivilbevölkerung ist er seit 1957 verfügbar. Die U.S. Environmental Protection Agency (EPA) stellte fest, dass 1980 mehr als 38 % der U.S. Bevölkerung und weltweit mehr als 200 Millionen Menschen eine Formulierung auf DEET-Basis benutzten [15]. Die Dauer des Schutzes ist einerseits abhängig von der Wirkstoffkonzentration, andererseits von der Zusammensetzung der Formulierung. Eine von der Deutschen Bundeswehr eingesetzte Lösung (Insektenschutzmittel Bw) von DEET 30 % (m/m) in Isopropanol, mit einem Zusatz von Olivenöl 2,5 % (m/m) und Lavendelöl 0,2 % (m/m) hatte bei Einsätzen in Kambodscha und Somalia eine um etwa vier bis fünf Stunden verkürzte Schutzdauer im Gegensatz zur Anwendung in Mitteleuropa, wo der Schutz sechs Stunden betrug [16].

Als Gründe hierfür kamen in Frage:

Einführung

- mechanischer Abrieb des Repellents von der Haut durch Kleidung oder andere Objekte
- Penetration des Repellents in die Haut mit anschließender transdermaler Resorption
- Entfernung des Repellents von der Haut durch Schweiß, der sich aufgrund hoher Temperaturen und körperlicher Betätigung bildet sowie durch Regen [17, 18].

Angestrebt wird eine Schutzdauer von sechs bis acht Stunden, die in gemäßigten Klimazonen bei Verwendung alkoholischer DEET-Lösungen gewährleistet ist.

Zielsetzung dieser Arbeit war deshalb, eine Formulierung zu entwickeln, die auch bei tropischem Klima durch verbesserte Haftfestigkeit ausreichend lange Schutz bietet.

Die Formulierungsansätze wurden mit z.T. neu entwickelten Prüfverfahren in-vitro getestet.

2. Theoretischer Teil

2.1. Repellents

Die Wirkmechanismen der verschiedenen Repellents sind noch weitgehend ungeklärt [19]. Ansätze hierfür gibt es in den Mechanismen, mit denen Insekten ihre Wirte wahrnehmen. Sie orientieren sich an Gerüchen, am Geschmack, an der Temperatur, an Feuchtigkeit, an Licht, an Lauten und an mechanischen Reizen.

2.1.1. Sinnesphysiologie der Insekten

Die Geruchsorgane, Sensillen, liegen auf den Antennen, die bei männlichen und weiblichen Insekten morphologisch häufig sehr unterschiedlich sind. Die Sensillen bestehen aus Sinneshaaren, sie können aber auch stäbchen-, kegel- oder plattenförmig sein. Auf ihnen befinden sich G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die, durch Komplexe aus Duftstoffen und Bindeproteinen aktiviert, unter Beteiligung intrazellulärer Botenstoffe Ionenkanäle öffnen. Dadurch werden an den Zellen Aktionspotentiale ausgelöst. Den Männchen dienen die Geruchsorgane vor allem der Wahrnehmung weiblicher Sexuallockstoffe, den Weibchen hauptsächlich zur Ortung von Futterdüften. Die Geruchsintensität und -qualität ist von der molekularen Struktur der Duftstoffe abhängig. Welche funktionellen Molekülgruppen an der Reizentstehung beteiligt sind, ist noch weitgehend unerforscht, was die Synthese neuer Wirkstoffe, die als Repellent eingesetzt werden können, erschwert. Einzelstoffe, die auf Geruchsorgane wirken sind z.T. bekannt. Anziehend auf Stechinsekten wirken besonders Schweißbestandteile wie Aminosäuren, Steroide, Milchsäure, Ammoniak, Harnstoff und Kohlenwasserstoffe sowie abgeatmetes Kohlendioxid. [12, 14, 15, 20, 21, 22, 23] Die Zusammensetzung menschlichen Urins hat ebenfalls Einfluss auf die Ortung eines Wirtes. Wegen der Ausscheidung von Estrogenen in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus sollen Frauen bevorzugte Opfer von Stechmücken sein [14, 23]. Diese These ist jedoch nicht gesichert. Gilbert et al. [24] hingegen behaupten nämlich, Männer seien die beliebteren Wirtsorganismen.

Mit den Geschmacksorganen am Epipharynx und den Mundwerkzeugen wird die Nahrung ausgewählt, für die Ortung von Wirten sind sie jedoch bedeutungslos [12].

Die Thermorezeptoren, mit denen Insekten Temperaturdifferenzen und Wärmestrahlung wahrnehmen, sind über den gesamten Körper verteilt und können an

Theoretischer Teil

den Beinspitzen und auf den Antennen vermehrt auftreten. Für Stechinsekten ist der Temperatursinn ein wichtiges Instrument zur Wirtsortung. Bei weiblichen *Aedes aegypti* wurden Sensillen mit zwei Thermorezeptoren, einer Kalt- und einer Warmzelle gefunden. Zusätzlich geht von Wärmequellen ein durch Konvektionsströmung ausgelöster, mechanischer Reiz aus, der von Tasthaaren und -kegeln registriert wird [12, 14, 20, 21].

Mit Hilfe von Feuchterezeptoren können Insekten Feuchtigkeit, die von potentiellen Wirten ausgesandt wird, z.B. Schweiß oder Atem, registrieren. Grundsätzlich zieht Luftfeuchtigkeit Insekten an. *Aedes aegypti* meidet aber Wasserdampf, dessen Temperatur weniger als 13°C beträgt und *Anopheles atroparvus* relative Luftfeuchtigkeit von 90 - 100 % [12, 14, 20, 21].

Zwar können Dipteren Licht, Form, Farbe und Bewegung erkennen, die optische Wahrnehmung spielt dennoch bei der Nahrungssuche eine untergeordnete Rolle und hat nur unterstützende Funktion, beispielsweise bei der Verfolgung einer Beute. Dunkle Farben werden im allgemeinen bevorzugt [14, 21].

Der Hörsinn ist bei männlichen Stechmücken stärker ausgeprägt als bei weiblichen. Schwingungen des Antennenschaftes, die das Johnstonsche Organ reizen, welches sich auf dem zweiten Antennensegment befindet, werden als Laut wahrgenommen. Von Weibchen erzeugte Töne lösen bei den Männchen Begattungsreaktionen aus. Obwohl Weibchen schlechter hören als Männchen, attackieren sie bevorzugt Beute, die hohe Töne von sich gibt [12, 14, 20].

Tasthaare und -kegel sind über den ganzen Körper verteilt, befinden sich aber vermehrt an Antennen, Mundgliedmaßen, Beinspitzen, Flügeln, Schwanzborsten (Cerci) und äußeren Geschlechtsorganen. Damit nehmen Insekten Berührungen, Erschütterungen, Luftströmungen und Lage der eigenen Körper sowie ihrer Bewegungen wahr. Sie erhalten Informationen über Temperatur, Zucker- und ATP-Gehalt der Nahrung [12, 14, 21, 22].

2.1.2. Wirkmechanismen von Repellents

Die, für eine gezielte Repellentsynthese zu beachtende, dreidimensionale Rezeptorstruktur und der molekulare Wirkmechanismus von Repellents an dem Rezeptor wurden noch nicht detailliert aufgeklärt. Es gibt einige Strukturmerkmale bei den unterschiedlichen Wirkstoffen, die offensichtlich für die abstoßende Wirkung verantwortlich sind. Dazu zählen ein Carbonsäureamid, das ggf. durch einen Ester ersetzt werden kann, da der Carbonyl-Sauerstoff die wirksame Komponente ist, ein sp^3 hybridisiertes Sauerstoff-Atom in einer Hydroxyl- oder Ester-Gruppierung und ein lipophiler Rest, der die beiden funktionellen Gruppen trägt [25]. In Kapitel 2.1.4 werden Beispiele von Substanzen mit Strukturformeln aufgeführt. Für bestimmte Molekülgruppen existiert eine Rangliste abnehmender Wirkintensität: Amide > Imide > Alkohole > Phenole [26]. Repellents wirken in der Dampfphase [27], deshalb ist die Wirkung abhängig vom Dampfdruck bzw. Siedepunkt der Substanzen. Dieser liegt bei den synthetischen Wirkstoffen i.d.R. zwischen 100 und 300°C.

Nach Auswertung von Verhaltensstudien und elektrophysiologischen Experimenten (vgl. 2.1.3) gibt es nach Combemale [14], MC Iver [27] und Davies [28] verschiedene Angriffspunkte für Repellents auf neuronaler Ebene. Auf den Sensillen der Insekten befinden sich demnach fünf verschiedene Chemorezeptoren, woraus fünf mögliche Wirkmechanismen resultieren.

Durch Repellents können die Antworten sensibler Neuronen auf anziehende Signale verhindert werden (DEET, Ethylhexandiol). Anziehende Effekte, die von schwach erregten Neuronen ausgehen, können aufgrund starker Erregung in abstoßende Effekte umgewandelt werden, dem natürlichen Jagdtrieb entgegengesetzte Reflexe können ausgelöst werden, Schmerzrezeptoren können erregt werden, was Fluchtreaktionen auslöst (DEET) und anziehende Signale können durch eine Art Grundrauschen überlagert werden.

2.1.3. Testmethoden

In-vitro-Tests

Zur Zeit gibt es zwei Testverfahren, die sich etabliert haben. Das erste ist das Verfahren mit Hilfe der Y-Röhre (Y-tube), die aus drei gläsernen Ästen besteht, die Y-förmig angeordnet sind. Zwei Äste werden mit jeweils einem Luftstrom gleicher Strömungsgeschwindigkeit durchströmt. Ein Luftstrom enthält ein Repellent oder At-

tractant -dies sind Substanzen, die auf Insekten anziehend wirken- der andere Reinluft ohne zugesetzte Substanzen. Am Ende des dritten Astes befindet sich eine Kammer mit Versuchstieren. Zu Versuchsbeginn wird die Kammer geöffnet, und die Tiere verteilen sich je nach Vorliebe in den drei Ästen der Apparatur. Durch Auszählung kann die Verteilung der Tiere bestimmt werden [14, 25].

Eine zweite Möglichkeit ist die Messung elektrischer Potentiale auf den Insektenantennen oder sogar auf einzelnen Antennensegmenten (Elektroantennometrie). Dazu werden den lebenden Insekten die Antennen abgetrennt und mit jeweils einem Ende an Elektroden befestigt. Ein Luftstrom mit Einzelstoffen oder Substanzgemischen wird mit definierter Strömungsgeschwindigkeit über die Antenne geleitet. Wenn die Substanzmoleküle an membranständige Proteine binden, können sich diese Substanz-Protein-Komplexe an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren anlagern und durch Öffnung von Ionenkanälen Potentialdifferenzen auslösen, die bei genügender Intensität als elektrische Signale an den Elektroden gemessen und als Elektroantennogramme aufgezeichnet werden. Dabei korrelieren Wirk- und Signalstärke [25, 29, 30].

In-vivo-Tests

Das Versuchsdesign von in-vivo- oder Stechttests kann sehr vielseitig sein. Man unterscheidet Labor- und Freilandversuche. Wird ein neuer Wirkstoff entwickelt, werden die ersten Tests an Tieren, wie rasierten Hunden, Kaninchen, Meerschweinchen u.a., im Labor durchgeführt. Dabei wendet man die gleiche Methodik wie bei Menschen an.

Bei menschlichen Probanden wird eine definierte Substanzmenge auf die Unterarme aufgetragen, wobei auf dem einen Arm die Test-, auf dem anderen die Referenzsubstanz appliziert wird. Je nach Testverfahren wird der gesamte Arm mit Substanz eingerieben oder nur bestimmte Hautareale, wobei die restliche Haut durch eine Folie geschützt sein kann. Die Probanden halten ihre Arme in bestimmten Zeitabständen von i.d.R. 1 h für ca. 5 - 10 min in einen mit einer vorher festgelegten Insektenart gefüllten Käfig. Die Anzahl der Tiere, die aus sterilen Zuchten stammen und somit keine Vektoren für Krankheiten sind, variiert zwischen 15 - 400 Exemplaren. Der Versuch wird entweder abgebrochen, wenn ein Tier zum Stich oder Biss ansetzt, oder es wird ein Zeitpunkt bestimmt, nach dem die Stiche gezählt werden.

Theoretischer Teil

Als Ergebnis wird die Zeit des absoluten Schutzes oder des 90 %igen Schutzes im Vergleich zum Referenzpräparat angegeben.

Für die Berechnung der Richtzahl des prozentualen Schutzes kann folgende Formel angewendet werden:

Z_R : Anzahl der Stiche Referenzpräparat

Z_T : Anzahl der Stiche Testpräparat

$$\text{Richtzahl} = \frac{Z_R - Z_T}{Z_R} \cdot 100\%$$

Gleichung 2-1

Einige Autoren geben die mittlere Repellent-Dosis als die Dosis an, die notwendig ist, um 50 % der Insekten zu vertreiben bzw die bei 50 % der Probanden einen Stich verhindert (ED_{50}).

Eine weitere Möglichkeit ist, die minimale Effektivdosis anzugeben (MED), die notwendig ist, um einen Schutz von 99 % - 100 % über 30 min zu gewährleisten.

Bei Feldversuchen werden menschliche oder tierische Probanden im Freiland den dort natürlich vorkommenden Insekten ausgesetzt und die o.a. Kenngrößen bestimmt, oder man vergleicht die Anzahl der Stiche von behandelten mit unbehandelten Hautstellen. Die Anzahl der Stiche auf unbehandelten Hautarealen spiegelt die Aktivität der Insekten wieder. Die Schutzzeit ist bei diesem Versuchsdesign die Zeit, nach der ein erster Stich auf einer mit Repellent behandelten Hautstelle erfolgt. Der Zeitraum wird bestätigt durch zwei aufeinanderfolgende Stiche innerhalb von 15 min [14, 31].

Das Versuchsdesign der verschiedenen Experimente variiert stark hinsichtlich Insektenart, Umgebungsbedingungen, applizierter Repellent-Dosis, Applikationsort, Zusammensetzung des Probandenkollektivs und Auswertungsmethode. Manchmal fehlen einige der Angaben vollständig.

Auch wenn die Kontrolle der Umgebungsvariablen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) im Laborexperiment möglich ist, haben die Tests, im Vergleich zum Feldversuch, eine geringere Aussagekraft, da z.B. nur eine Insektenart getestet wird. Bei Feldversu-

chen können die Umgebungsbedingungen nicht standardisiert werden. Die Durchführung ist mit hohem Aufwand verbunden, dafür führen diese Tests aber zu Ergebnissen mit höherer Relevanz.

Ein objektiver Vergleich der Studien ist wegen der unterschiedlichen experimentellen Wege zur Bestimmung von Wirkung und Wirkdauer von Repellents, nicht möglich. Ebenso wenig ist es möglich, absolute Zahlen für die Schutzzeit bzw. Wirkdosis zu ermitteln. Deshalb kann eine vergleichende Bewertung der Ergebnisse nur innerhalb eines Experiments erfolgen.

2.1.4. Synthetische Repellents

Diethyltoluamid (DEET, N,N-Diethyl-m-toluamid, N,N-Diethyl-3-methylbenzamid)

DEET (Abbildung 2-1, $M = 191.28 \text{ g/mol}$) ist eine ölige, klare, farblos bis schwach gelbliche Flüssigkeit mit einem charakteristischen Geruch. Sie ist unlöslich in Wasser, Glycerol und Paraffin, aber mischbar mit Alkohol, Chloroform, Diethylether und Propylenglycol. Der Siedepunkt liegt bei 160°C , der Dampfdruck bei 20°C beträgt $7,5 \times 10^{-6} \text{ bar}$. Es zerstört viele Kunststoffe, wie Acrylate, PVC und Polystyrole, aber i.d.R. keine Kleidung [32, 33].

DEET ist wirksam gegen Stechmücken, Fliegen, Bremsen, Flöhe, Zecken und Milben. Die Wirkung gegen Bienen und Hummeln, Wespen und Hornissen sowie Läuse ist nur schwach oder kann nicht nachgewiesen werden [34].

Eine mittlere Schutzdauer von DEET kann nach Combemale [14] mit 4,2 h angegeben werden. Sie hängt aber, wie bei allen Repellents, sehr stark vom Versuchsdesign, der applizierten Dosis, der Formulierung und der Insektenart ab und variiert von 1 - 12 h. Sie nimmt mit steigender Dosis zu, kann jedoch ab einer bestimmten Menge nicht mehr deutlich verlängert werden. Sehr geringe Dosen können sogar anziehend auf Insekten wirken [35]. DEET ist als Lösung, Emulsion, Creme und Stift in Konzentrationen von 5 - 100 % im Handel, mit einem Optimum von 35 bis 50 %. Wird es auf der Kleidung angewendet, bietet es für 4 bis 6 Wochen Schutz [14, 15, 34, 36, 37].

DEET wird nach epikutaner Applikation zu weniger als 10 % resorbiert. Studien mit radioaktiv markiertem DEET zeigten, dass nach Auftragen von DEET-Reinsubstanz

Theoretischer Teil

5,6 % und nach Auftragen einer Lösung von 15 % DEET in Ethanol 8,3 % der applizierten Menge resorbiert werden. Die aufgetragenen DEET-Dosen betragen 0,625 und 0,5 mg/cm². Andere Studien ergaben resorbierte DEET-Mengen von 11 - 54 %, wobei die aufgetragenen Mengen zwischen 0,08 und 1,86 mg/cm² lagen [34].

DEET wird nach Resorption fast vollständig metabolisiert und über die Nieren ausgeschieden. Verabreicht man sehr hohe Mengen, wie bei einer Studie bei der 75 % der Hautoberfläche mit insgesamt 10,4 g DEET eingerieben wurden, können bis zu 14 % DEET unverändert ausgeschieden werden. Es wird in insgesamt sechs Metabolite biotransformiert, von denen N-Ethyl-3-carboxylbenzamid und N,N-Diethyl-3-carboxylbenzamid die größten Anteile darstellen [34, 41].

Die akute orale Toxizität bei männlichen und weiblichen Ratten beträgt 3,3 und 2,4 g/kg Körpergewicht, nach einer Gabe von 95 %igem DEET. Die LD50 liegt bei 1,95 g/kg Körpergewicht per os. Der LD50-Wert nach dermalen Verabreichung beträgt zwischen 4 und 5 g/kg Körpergewicht [14, 34].

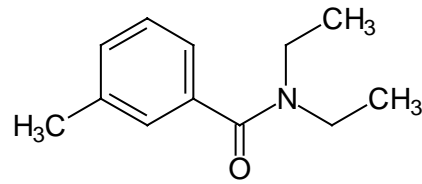
Nach versehentlicher oraler Aufnahme traten beim Menschen Symptome einer toxischen Encephalopathie, Atemnot, Reflexstörungen, Verwirrheitszustände, Gleichgewichtsstörungen, Ataxie, Konvulsion und Koma auf [14, 34, 38].

Bei bestimmungsgemäßem Gebrauch kann es zu Hautreizungen und Urticaria, besonders in Gelenkbeugen und Hautfalten, kommen. Konzentrationen, die über 30 % DEET lagen, haben in Einzelfällen Blasenbildung, Ulcerationen und Nekrosen hervorgerufen [34, 38].

Deshalb sollte DEET nicht in der Schwangerschaft und Stillzeit oder bei Säuglingen angewandt werden.

Im Tierexperiment konnten keine phototoxischen, mutagenen, teratogenen oder kanzerogenen Nebenwirkungen nachgewiesen werden [14, 38, 38, 39, 40, 41, 42].

DEET ist enthalten in Präparaten mit den Handelsnamen Autan®, Diethyltoluamide Topical Solution USP 23, Dusk®, Item®, Jungle Formula Insect Repellent®, Lozione Cruz Verde Zanzara®, Entom®, Jungle Formula Insect Repellent Plus U.V. Sunscreens®, Pellit®, Repel 100®, Micalin® u.v.a. [15, 38, 43, 44, 45].



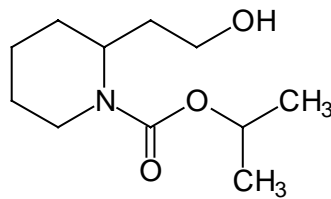
DEET

Abbildung 2-1

Bayrepel (KBR 3023, 2-(2-Hydroxyethyl) piperidin)

1996 wurde von der Fa. Bayer der neue Wirkstoff Bayrepel® (Abbildung 2-2, M = 229,3) entwickelt, der als Cremes, als Emulsion (Lotion, Milch) und als Stift in Konzentrationen von 10 - 20 % im Handel ist. Er wurde an rasierten Meerschweinchen und Probanden sowohl im Labor, als auch im Freiland gegen DEET getestet. Für die Labortests wurden u.a. *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* (Hausmücke) und *Stomoxys calcitrans* (Wadenstecher) verwendet. In Freilandtests wurde die Repellentwirkung gegen verschiedene Familien (Tabanidae, Culicidae) und Gattungen, u.a. *Simulium*, *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, der Dipteren untersucht. Die Schutzdauer betrug in Abhängigkeit von der aufgetragenen Menge und Tierart zwischen 1 und 11 h. Obwohl Bayrepel in 16 von 22 Stechtests DEET überlegen war, bot keine der beiden Substanzen einen deutlich längeren Schutz. 10- und 20 %ige DEET- und Bayrepel-Formulierungen der Fa. Bayer AG wurden betreffend ihrer Wirkdauer im Feldversuch gegen *Aedes albopictus* und *Culex quinquefasciatus* getestet, mit dem Ergebnis, dass weder morgens noch nachts ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Substanzen bestand.

Im Tierexperiment traten bei lokaler Applikation der Substanz vereinzelt Schleimhautreizungen auf. Die Penetration durch die Haut wurde als "geringfügig" angegeben. Bayrepel wurde nicht metabolisiert, sondern zu etwa 75 % unverändert über die Niere und zu 15 % über die Leber eliminiert. Die Toxizität nach oraler Einnahme wird als gering eingestuft [25 ,46, 47, 48, 49, 50].



Bayrepel

Abbildung 2-2

Dimethylphthalat (DMP), Diethylphthalat (Palatinol) und Dibutylphthalat

Dimethylphthalat (Abbildung 2-3, $M = 194,19 \text{ g/mol}$, Siedepunkt: $283,7 \text{ °C}$), eine farblose, ölige, in Wasser schwer lösliche Flüssigkeit, wurde 1929 erstmals erwähnt. Es ist mischbar mit Ethanol und anderen organischen Lösungsmitteln, muss vor Licht geschützt aufbewahrt werden und darf nicht mit Kunststoffen und Synthetikfasern in Berührung kommen [14]. Die mittlere Wirkdauer beträgt 90 min und reduziert sich aufgrund seiner Thermolabilität bei Temperaturen über 40°C um das 10-fache [51]. Es wird ausschließlich in Kombinationspräparaten eingesetzt, in einer als geeignet angesehenen Konzentration von 40 % [14]. Nach britischen Richtlinien sollten über einen längeren Zeitraum nicht mehr als 5 mg/m^3 , über einen kürzeren Zeitraum nicht mehr als 10 mg/m^3 appliziert werden.

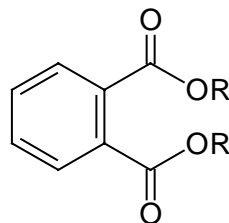
Die Letaldosis bei der Maus beträgt $8,570 \text{ mg/kg}$ Körpergewicht nach peroraler Gabe. Eine erhöhte Sterblichkeit bei Fetus oder Mutter konnte nicht festgestellt werden, und es beeinflusst die Fruchtbarkeit der Tiere nicht. Mutagene und cancerogene Nebenwirkungen wurden nicht festgestellt. Nach intraperitonealer Gabe wurden fetale Knochenmissbildungen beobachtet.

Beim Menschen traten Reizungen an Augen und Schleimhäuten auf, bei sachgemäßem Gebrauch ist aber nicht mit Hautirritationen zu rechnen. Nach Inhalation wurden Halsschmerzen, Husten und Schwindel beobachtet, nach oraler Einnahme zusätzlich zentralnervöse Störungen, Unterleibsschmerzen und Übelkeit.

DMP ist in den Handelspräparaten Kulan®, Mousticreme® und Pellit® enthalten [14, 27, 38, 51, 52].

Palatinol (M = 222,24 g/mol, Siedepunkt: 298,0°C) hat ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften wie DMP. Hinsichtlich der Toxizität unterscheiden sich beide Substanzen kaum. Palatinol wird in der Regel als Lösungsmittel für Kunststoffe eingesetzt und nicht als Repellent [25, 53, 54].

Dibutylphthalat (M = 278,3 g/mol) ist weniger flüchtig als DMP und Palatinol und wird vorwiegend zur Imprägnierung von Kleidung verwendet. Da es in der Technik als Weichmacher für Kunststoffe eingesetzt wird, sollte bei der Verwendung als Insektenschutzmittel darauf geachtet werden, dass es nicht mit solchen Materialien in Kontakt kommt, da es diese schädigen würde [38].



R= CH₃ DMP
R= C₂H₅ Palatinol

Abbildung 2-3

2-Ethyl-1,2-hexandiol (Ethylhexandiol, Rutgers 612)

Ethylhexandiol (Abbildung 2-4, M = 146,23 g/mol, Siedepunkt: 243°C) wurde 1935 entdeckt. Es ist eine ölige Flüssigkeit mit einem schwachen Geruch nach Hamamelis, wenig mischbar mit Wasser, löslich in Alkoholen und organischen Lösungsmitteln. Es schädigt Kleidung und Kunststoffe nicht, verändert aber die Farbe von Lacken [14, 53].

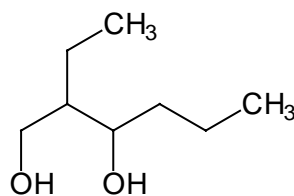
Die mittlere Schutzzeit gegen Stechmücken (*Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus* u.a.) beträgt weniger als acht Stunden und wird bei Temperaturen über 40°C auf 10 min herabgesetzt [14]. Unter Laborbedingungen variiert die Schutzdauer von 1 - 8,5 h [14, 18]. In trockenen Klimazonen mit einer relativen Luftfeuchte von weniger als 35 % ist sie gegenüber gemäßigten und feuchten Klimazonen herabgesetzt. Ethylhexandiol wird am geeignetsten in Konzentrationen von 30 -50 % eingesetzt [14]. Es wird mit DMP und Indalon kombiniert.

Theoretischer Teil

Ethylhexandiol wirkt 8 Tage bei trockenem Klima, wenn Kleider mit der Substanz imprägniert werden [14].

Die LD50 beim Kaninchen beträgt nach peroraler Gabe 2,45 und nach kutaner Gabe 9,4 mg/kg Körpergewicht. 12 % der Substanz werden perkutan resorbiert und zu 75 % nach 12 - 24 h über die Niere ausgeschieden. Es konnte keine mutagene oder karzinogene Wirkung festgestellt werden. Ethylhexandiol ist gut verträglich und nur in seltenen Fällen für Befindlichkeitsstörungen verantwortlich. Nach oraler Einnahme sind zentralnervöse Störungen aufgetreten. Angaben über Irritationen von Haut oder Schleimhäuten sind nicht bekannt [38].

Handelnamen sind Z.Stop® und Kulan® [14, 36, 38, 53].

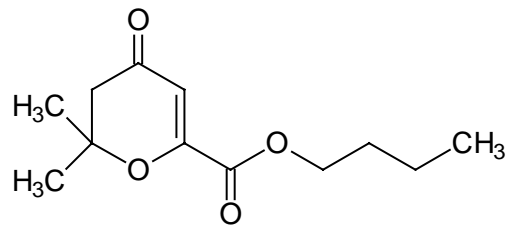


2-Ethylhexandiol

Abbildung 2-4

Indalon (Butyl 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-4-oxo-2H-pyran-6-carboxylat)

Indalon (Abbildung 2-5, M = 226,27 g/mol) war das erste synthetische Repellent mit einer doppelt so hohen Wirksamkeit wie Citronellöl [14]. Es wird vorwiegend als Zekenschutzmittel in Kombination mit DMP und Ethylhexandiol angewandt. Auf der Kleidung angewendet, bleicht es deren Farben aus und ruft bei dermalen Applikation Hautirritationen hervor. In den USA gibt es zur Zeit kein Produkt, das Indalon enthält [14, 38, 53, 55].



Indalon

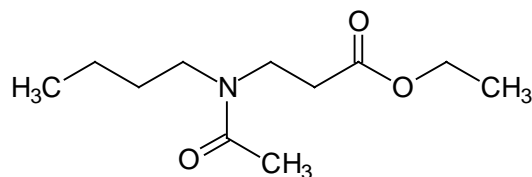
Abbildung 2-5

Insekt-Repellent 3535 (3-(N-n-butyl-N-acetylaminopropionsäure-ethylester, Merck 3535)

Merck 3535 (Abbildung 2-6, $M = 215,29$ g/mol, Siedepunkt: 292°C) wurde 1969 entwickelt und seit 1973 vorwiegend in Europa vermarktet. Die Wasserlöslichkeit beträgt 6%, die Löslichkeit in Paraffinöl 2 - 3 %, in ein- und zweiwertigen kurzkettigen Alkoholen ca. 50 % [14, 56]. Die für Zubereitungen geeignete Konzentration liegt bei 20 %. In Stechtests war die Wirkdauer mit der von DEET vergleichbar. Die Schutzzeiten betragen für *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens* und *Aedes aegypti* zwischen 2 und 7,5 h im Laborversuch und 6 h im Freilandversuch [14, 19].

Es schädigt Kunststoffe und Synthetikfasern [14].

Die LD₅₀ bei der Ratte beträgt 14 g/kg Körpergewicht nach oraler Gabe. Die Substanz reizt die Augen, ruft aber weder beim Meerschweinchen noch beim Menschen Sensibilisierungsreaktionen der Haut nach dermalen Applikation hervor. In Tierversuchen konnten keine phototoxischen oder teratogenen Wirkungen festgestellt werden [14, 19, 56].



Merck 3535

Abbildung 2-6

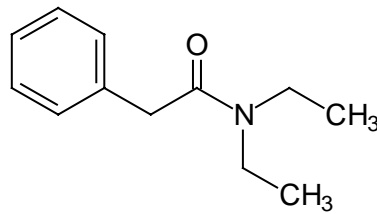
N,N-Diethyl-2-phenylacetamid (DEPA)

DEPA (Abbildung 2-7, $M = 191,27 \text{ g/mol}$, Siedepunkt: $169 - 171^\circ\text{C}$) wurde 1954 entwickelt und erstmals als Repellent gegen *Aedes aegypti* beschrieben. Es wurde in Indien als Ersatz für DEET benutzt, da eine Ausgangssubstanz für die DEET-Synthese, das 3-Methylbenzamid, nicht immer verfügbar war, und DEET-haltige Repellents somit sehr teuer waren.

Die Substanz ist wirksam gegen ein breites Spektrum von Arthropoden, dazu zählen Stechmücken verschiedener Arten, Kriebelmücken, Küchenschaben, Zecken, Blutegel, Rattenflöhe u.a. Eine Studie, bei der DMP, DEPA und DEET gegen *Culex quinquefasciatus* getestet wurden, mit einer jeweils applizierten Menge von $0,5 \text{ mg/cm}^2$ Haut, ergab Schutzzeiten von 3,0 h für DMP, 6,5 h für DEPA und 7,5 h für DEET. Die Dauer des Schutzes war in vielen Tests für DEPA um ca. 1 - 1,5 h kürzer als für DEET. Rao, S.S. und Rao, K.M. [57] stufen beide Substanzen aber als gleichwertig ein.

DEPA imprägnierte Kleidung bot 30 - 36 h Schutz gegen *Aedes aegypti* und *Culex quinquefasciatus* [14].

Die LD50 von DEPA nach oraler Gabe bei der Ratte beträgt 1 g/kg Körpergewicht. Nach Verschlucken großer Mengen, als Folge von Unfällen oder Selbstmordversuchen, hat es bei den betroffenen Personen Acidose und Leberentzündung hervorgerufen [57]. Die Substanz wurde in Tierversuchen (Meerschweinchen, Ratten, Mäuse) nach dermalen Gabe resorbiert und z.T. unverändert, z.T. in Form seiner Metaboliten N-Ethylphenylacetamid, Phenylacetamid und konjugierte Phenyllessigsäure mit dem Urin ausgeschieden. Sie wird als nicht-mutagen und nicht-reproduktionstoxisch eingestuft. In Kaninchentests zeigten sich keine Hautirritationen oder Phototoxizität nach topischer Anwendung [57, 58].

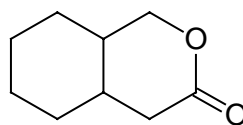


DEPA

Abbildung 2-7

(2-Hydroxymethylcyclohexyl)-essigsäurelacton (CIC-4, Octahydro-benzopyran-3-on))

CIC-4 (Abbildung 2-8, $M = 154,21 \text{ g/mol}$) hatte in Laborversuchen teilweise eine längere Wirkung gegen *Anopheles dirus* als DEET und im Feldversuch die gleiche. Dabei sank nach 2 h die Repellenteffektivität unter 95 %. Es wurden jeweils 25 %ige ethanolische Lösungen eingesetzt. Eine andere Studie, bei der $0,4 \text{ mg/cm}^2$ einer jeweils 12,5 %igen ethanolischen Lösung auf das Ohrläppchen aufgetragen wurden, hatte DEET eine signifikant längere Wirkdauer. Testobjekt war *Leptoconops americanus*, eine zur Familie der Ceratopogonidae zählenden Mückenart. In USA und Deutschland ist zur Zeit kein Repellent mit diesem Wirkstoff auf dem Markt. [55, 59, 60]



CIC-4

Abbildung 2-8

2.1.5. Natürliche Wirkstoffe und deren synthetische Abkömmlinge

Viele Repellents pflanzlichen Ursprungs sind derzeit im Handel. In diesem Abschnitt sollen nur einige davon vorgestellt werden.

Ätherische Öle

Citronellöl (Oleum Citronellae)

Citronellöl ist ein blaß- oder tiefgelbes, flüchtiges Öl von angenehm charakteristischem, zitronenartigem Geruch, erhalten durch Wasserdampfdestillation aus dem Kraut von *Cymbopogon nardus* oder *C. winterianus* (Graminaceae) oder Varietäten oder Hybriden dieser Spezies. Seine Hauptkomponenten sind Geraniol ($C_{10}H_{18}O$) und Citronellal ($C_{10}H_{18}O$). *Cymbopogon winterianus* enthält ca. 20 - 30 % Geraniol und 40 - 60 % Citronellal. Das Öl von *Cymbopogon nardus* enthält nur etwa die Hälfte beider Bestandteile oder sogar weniger. Es ist löslich in 4 Teilen Ethanol (80%) und ergibt eine klare oder schwach opaleszierende Lösung. Es ist kühl und vor Licht geschützt zu lagern.

Citronellöl wird als Parfüm oder Insektenschutzmittel genutzt. Die Wirkung ist niedriger und die Wirkdauer kürzer im Vergleich zu den synthetischen Repellents. In Labortests wurden Schutzzeiten von 15 min (*Anopheles quadrimaculatus*) bis zu 4 h (*Culex fatigans*) ermittelt. In Freilandversuchen variierte der Schutz zwischen 40 und 87 min.

Es wird typischerweise in Konzentrationen von 5 % (Buzz Away® Lotion, Pump Spray) bis 10 % (Natrapel® Lotion, Pump Spray) oder als reines Öl auf der Haut angewendet [15].

Das ätherische Öl ruft als wichtigste Nebenwirkung Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut, wie beispielsweise Kontaktekzem, hervor [14, 38 , 61].

Eucalyptusöl (Oleum Eucalypti, Eucalypti aetheroleum)

Eucalyptusöl ist ein farbloses oder hellgelbes, flüchtiges Öl mit einem charakteristischen, aromatisch campherartigen Geruch und scharfem, kühlendem Geschmack. Es wird durch Wasserdampfdestillation der Blätter oder frischen Zweigspitzen verschiedener Eucalyptusarten gewonnen (*E. globulus*, *E. fruticetorum*, *E. smithii*, Myrtaceae). Das Rohöl wird wegen der Atemweg-reizenden Aldehyde (Butyl-, Valeryl-, Caprylaldehyd) rektifiziert. Es enthält mindestens 70% 1,8-Cineol (Eucalyptol) und ist löslich in 5 Teilen Ethanol 70%. Es soll vor Licht geschützt gelagert werden.

Eukalyptusöl wird angewandt bei Erkältungskrankheiten und als Geschmackskorrigens. Ihm wird auch eine Wirkung als Insektenschutzmittel zugesprochen.

Über zentralnervöse Störungen, Übelkeit und Erbrechen nach peroraler Applikation wurde berichtet [38, 52].

Lavendelöl (Oleum Lavandulae, Lavandulae aetheroleum)

Lavendelöl ist ein farbloses oder blaßgelbes oder gelblich-grünes, flüchtiges Öl mit einem charakteristisch duftenden Geruch, gewonnen durch Destillation von *Lavandula officinalis* (= *L. spica* = *L. vera* = *L. angustifolia*) oder *L. intermedia* (Lamiaceae). Es enthält mind. 35% Ester, berechnet als Linalylacetat ($C_{12}H_{20}O_2$). Es ist löslich in 4 Teilen Ethanol 70% als leicht opaleszierende Lösung und sollte vor Licht geschützt gelagert werden.

Es wird genutzt als Geruchskorrigens, Parfüm, Karminativum und Insektenschutzmittel.

Lavendelöl kann Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Kontaktallergie verursachen. Über phototoxische Nebenwirkungen wurde berichtet [38, 52].

Zitronenöl (Aetheroleum Citri, Oleum Citri]

Zitronenöl ist ein blaßgelbes bis grüngelbes flüchtiges Öl von charakteristischem Geruch. Es wird gewonnenen von *Citrus limon* (Rutaceae) und enthält mindestens 2,2% (m/m) und höchstens 4,5% (m/m) Carbonylverbindungen, berechnet als Citral ($C_{10}H_{16}O$).

Zitronenöl wird genutzt als Geruchs- und Geschmackskorrigens sowie als Insektenschutzmittel [38, 52].

Pulegiumöl (Pennyroyal Öl)

Pulegiumöl wird durch Destillation aus *Mentha pulegium* (Labiatae) gewonnen. Es enthält Pulegon (1-Methyl-4-isopropyliden-cyclohexanon-(3)) ($C_{10}H_{16}O$).

Theoretischer Teil

Pulegiumöl wurde früher als menstruationsförderndes Mittel angewandt. Es gibt Berichte über die Anwendung als Insektenschutzmittel. Pulegon ist Bestandteil von Parfüms.

Bei der Anwendung als Abortivum traten ernsthafte Vergiftungserscheinungen mit Krämpfen, Lebertoxizität und Todesfolge auf [38, 62].

Andere ätherische Öle

Es werden zahlreiche andere ätherische Öle als Repellents eingesetzt z.B. die Öle aus Pfefferminze, Basilikum, Orangenblüten, Zimt, Palmrose, Geranien u.a.. Die verschiedenen Substanzgemische, bestehend aus Limonen, Dipentin, Aldehyden (Citral, Citronellal, Zimtaldehyd) und Phenolen (Eugenol, Thymol), haben alle ein relativ hohes Allergiepotalential und geringe repellierende Wirkung [14].

Die Wirkung der ätherischen Öle wird insgesamt als schwach und die Schutzdauer als kurz angesehen. Verglichen mit den synthetischen Substanzen spielen sie deshalb eine untergeordnete Rolle.

Folgende Handelspräparate enthalten ätherische Öle: Bambule Hautöl Roll-on®, Hesperos Mückenschutzlotion®, Spinnrad Mückenabwehrgel®, Zedan SP® u.a. [15, 63].

Inhaltsstoffe von Chrysanthemen und deren synthetische Abkömmlinge

Aus den Blättern von *Chrysanthemum cinerariifolium*, die vornehmlich in Dalmatien, Italien, Nordafrika und im Kaukasus beheimatet ist, wird nach Trocknung ein weißes, insektizides Pulver, das Pyrethrumpulver, gewonnen. Es enthält zwei Ester des Pyrethralons, die Pyrethrine 1 und 2, aus denen sich das synthetisch hergestellte Permethrin ableitet. Bei diesen Substanzen handelt es sich um schnell wirksame, für Insekten neurotoxische Kontaktinsektizide ohne repellierende Wirkung. Folglich wird das Insekt erst nach erfolgtem Stich getötet bzw. betäubt. Sie werden nicht auf der Haut angewendet, sondern dienen der Imprägnierung von Kleidung, Moskitonetzen, Zeltplanen u.a.. Der Schutz hält 2 Wochen an. Feldversuche in Alaska haben gezeigt, dass die Kombination einer topisch applizierten Zubereitung aus 35 % DEET in einer Polymergrundlage und mit Permethrin imprägnierter Kleidung den Probanden

Theoretischer Teil

99,9 %igen Schutz gegen Stechmücken, Fliegen, Zecken, Milben, Läuse u.a. über 8 h bot.

Pyrethroide werden für den Menschen als wenig toxisch eingestuft, da sie nur zu einem geringen Teil durch die Haut resorbiert werden können und sofort durch Esterhydrolyse inaktiviert werden.

Permethrin ist als 0,5%iges Aerosol oder Pumpspray unter den Handelsnamen Duranon®, Permethrin Tick Repellent®, Cutter Outdoorsman Gear Guard®, Repel Permanone® u.a. erhältlich. In der Bundesrepublik Deutschland sind folgende Präparate als Tierarzneimittel zugelassen: Wellcare Emulsion®, Stomoxin MO® und Auriplak®.

[15, 15, 64, 65]

Kokos-Vorlaufettsäuren

Kokos-Vorlaufettsäuren sind Fettsäuren, die bei der Aufarbeitung von Kokosöl anfallen. Es entsteht ein stechend riechendes Gemisch, das von der Fa. Henkel unter dem Namen Edenor V 85® vertrieben wird und aus 0,7 % C₆-, 55,7 % C₈-, 42,7 % C₁₀- und 0,7 % C₁₂-Säuren besteht. Zubereitungen, in denen Kokos-

Vorlaufettsäuren enthalten sind, wie z.B. Bio-Hautschutz® (Fa. Perycut Chemie AG, Dübendorf, Schweiz) und Zanzarin® (Fa. Engelhard GmbH & Co KG, Niederdorfelden), wurden auf ihre Wirksamkeit gegen Mücken, Bremsen, Kriebelmücken und Zecken in Labortests und im Freiland geprüft. Die Schutzdauer betrug zwischen 6 und 8 h, mit einer von den Prüfinstituten garantierten Dauer von 4 h [66, 67, 68,].

Labortests, in denen *Aedes aegypti* und *Anopheles gambiae* als Versuchstiere dienten, zeigten, dass Kokos-Vorlaufettsäuren-Zubereitungen die Insekten 4 h von den Probanden fernhielten und 7,5 - 8 h Schutz vor Stichen gewährten. In diesem Experiment des Schweizer Tropeninstituts wurde zwar gegen ein Referenzpräparat mit einem Gehalt von 28 % DEET getestet, ein abschließender Vergleich erfolgte jedoch nicht. Zubereitungen mit Kokos-Vorlaufettsäuren wurde zusätzlich zur repellierenden Wirkung eine abtötende Wirkung gegen Zecken (akarizide Wirkung) zugeschrieben [68, 69].

Verbraucherschutzorganisationen wie die Stiftung Warentest gaben diesen jedoch nur die Note "ausreichend", während die Bayrepel®-haltigen Formulierungen mit

”gut” und ”befriedigend” sowie DEET-haltige mit ”befriedigend” jeweils ein besseres Urteil hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bekamen [63].

Die LD50 bei der Ratte nach oraler Gabe von Bio-Hautschutz® beträgt 10 000 mg/kg Körpergewicht. In Tierversuchen wurden Haut- oder Schleimhautreizungen beobachtet.

[66, 68]

Produkte, die Neemöl (Niemöl, Azadirachta, Margosa) enthalten, werden ebenfalls Repellenteigenschaften zugeschrieben. Eine Zubereitung von 2g Neemöl und 100g Kokosöl wurde laut Hersteller [70] am Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn auf seine Wirkung untersucht. Das Testergebnis war positiv. Auch andere Autoren berichten von insektiziden und spermiziden Eigenschaften des Neemöls. Es traten jedoch ernsthafte Vergiftungen bei indischen Kindern auf, denen Neemöl als Heilmittel gegen Kindererkrankungen gegeben wurde. Die Stiftung Warentest beurteilte die Wirkung Neemöl-haltiger Repellents wie z.B Spinnrad Schnelles Niem-Repellent® als mangelhaft [63, 66, 71].

2.1.6. Repellents für die orale Applikation

Auch wenn einige Vitamin-Mischungen oder Einzelsubstanzen, wie Thiamin (Vitamin B₁), als Repellents angeboten werden, wurde bei diesen noch keine Wirkung nachgewiesen [14]. Die Dosierungsangaben schwanken zwischen 75 bis 300 mg/d .

2.1.7. Raumschutz

Zur Zeit befinden sich Elektroverdampfer, die durch das Verdampfen von Wirkstoffen ihre Repellentwirkung erzielen sollen, und Geräte, die Ultraschallwellen aussenden, im Handel. Die zuletzt genannten Geräte sind, wie in einem Laborversuch gezeigt wurde, gegenüber *Aedes aegypti* wirkungslos [72]. Die Elektroverdampfer Baygon Master Mückenschutz® und Paral Mücken-Mobil® enthalten als Wirkstoff Transfluthrin (3-(2,2-Dichloroethyl)-2,2-dimethyl-cyclopropancarboxylsäure (2,3,5,6-tetrafluorophenyl)methylester). Ihnen wird eine gute Wirksamkeit zugesprochen, während die Verdampfer ätherischer Öle als unwirksam eingestuft werden [63].

2.1.8. Wirksamkeitsvergleich

Combemale et al.[14] haben nach einer Literaturrecherche für einige Repellents eine Rangfolge erstellt, bei der die Wirkstoffe mit abnehmender Schutzzeit von links nach recht angeordnet sind:

Culex: DEET > Ethylhexandiol > DMP > natürliche Repellents

Aedes: DEET > Ethylhexandiol > DMP > natürliche Repellents

Anopheles: Ethylhexandiol > DEET = DMP

Blutegel: Citronellöl > DEET

Zecken: DMP > DEET

Repellents, die Combemales Vergleichsstudie nicht aufgeführt sind, waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht im Handel, z.B. Bayrepel®, oder es gab nicht genügend Informationsmaterial zu diesen Stoffen.

2.2. Darreichungsformen

Repellent-Präparate werden als Lösungen, Emulsionen, Cremes, Hydrogele, Sprays und Stifte angeboten.

Da alle Wirkstoffe schwer wasserlöslich sind, werden neben Wasser als Grundlage Ethanol, Isopropanol oder Glycerol als Cosolventien verwendet. In genügend hohen Konzentrationen wirken die Alkohole antimikrobiell, so dass auf Konservierungsmittel verzichtet werden kann. Ein französisches Präparat (Pipiol®) enthielt zur Konservierung in der Bundesrepublik Deutschland nicht zugelassene Formaldehydlösung. Den Lösungen werden häufig flüssige Polyoxyethylene mit einem Molekulargewicht von 400 g/mol zur Viskositätserhöhung und zur Verhinderung der Wirkstoffpenetration zugesetzt. Da die Alkohole die Haut austrocknen, können die Zubereitungen fette Öle zur Rückfettung enthalten. Neben den wässrigen Lösungen befinden sich ölige Lösungen auf Silikonölbasis (DP Mousse®, DP Liquide®) im Handel [15, 73].

Da die Wirkstoffe flüssig und unpolar sind, werden die Insektenschutzmittel von vielen Herstellern in Form von Öl-in-Wasser-Emulsionen vertrieben, bei denen der Wirkstoff die innere, disperse Phase und Wasser, als Dispersionsmittel, die äußere Phase bildet. Sie enthalten Emulgatoren, die sich als amphiphile Moleküle an den

Theoretischer Teil

Grenzflächen anlagern und die Emulsionen stabilisieren. In den verschiedenen Zubereitungen werden anionische Emulgatoren (Seifen) wie Natriumcetylstearylsulfat und nicht-ionische wie Polysorbate, Polyoxyethylen-Fettsäureester und -Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Glycerol-Fettsäureester, Fettalkohole u.v.a. eingesetzt. Zur Konservierung werden Benzylalkohol, Propylenglycol, p-Hydroxybenzoesäureester und andere für Dermatika typische Konservierungsmittel eingesetzt, wenn nicht andere Substanzen, wie die bei den Lösungen erwähnten Alkohole, eine ausreichende Konservierung gewährleisten [14, 73].

Die auf dem Markt erhältlichen Cremes sind ebenfalls Zubereitungen vom O/W-Typ und enthalten typischerweise die bereits bei den Emulsionen erwähnten Hilfsstoffe. Ihnen werden aber Stoffe zur Viskositätserhöhung zugefügt, zum einen feste oder flüssige, meist synthetische Wachse, zum anderen anorganische Hydrogelbildner (Bentonit) und organische Hydrogelbildner (Carbomere) [14, 15, 73]. Carbomere werden zur Ausbildung von Gelgerüsten mit alkalischen Substanzen wie Natriumhydroxidlösung oder Triethanolamin neutralisiert.

In Hydrogelen werden die bereits erwähnten Carbomere und Celluloseester zur Strukturbildung eingesetzt. Sie können zusätzlich Konservierungsmittel, Alkohole, Polyoxyethylene, Propylenglycol und andere wasserlösliche Hilfsstoffe enthalten. Pellit®-Gel enthält zusätzlich das Antihistaminikum Diphenhydramin, welches nach erfolgtem Stich juckreizstillend wirkt [45, 73].

Die handelsüblichen Stifte oder Roller enthalten die bereits beschriebenen Hilfsstoffe, wie Wachse (Isopropylmyristat), Polyoxyethylen, Natriumhydroxid, Propylenglycol, Isopropanol, Dibenzylidensorbitol und Stearinsäure [73].

Sprays kommen als Pumpsprays mit Zerstäubern oder als treibgasbetriebene Aerosole in den Handel. Als Treibgase werden Kohlendioxid und Butan eingesetzt. Für die Verwendung von Fluorchlorkohlenwasserstoffen und Hydrofluoralkanen wurden in der vorliegenden Literatur keine Beispiele gefunden. Die Wirkstoffe sind in geeigneten Lösungsmitteln, z.B. Ethanol, gelöst [14, 73].

2.3. Resorption von Arzneistoffen aus Dermatika und Haftfestigkeit

Repellents, die dermal appliziert werden, sollen durch Verdampfung in der Gasphase über der Haut wirken. Deshalb stellt sowohl die Resorption von Wirkstoffen durch die Haut, als auch die mechanische Entfernung der Wirkstoffe aufgrund ungenügender Haftfestigkeit ein Problem für die Dauer des Schutzes dar.

Die Haut (Abbildung 2-91) besteht von innen nach außen aus drei Schichten, der Epidermis, der Dermis oder dem Corium und der Subcutis. Hautanhangsgebilde, Talg- und Schweißdrüsen durchdringen diese Schichten [74].

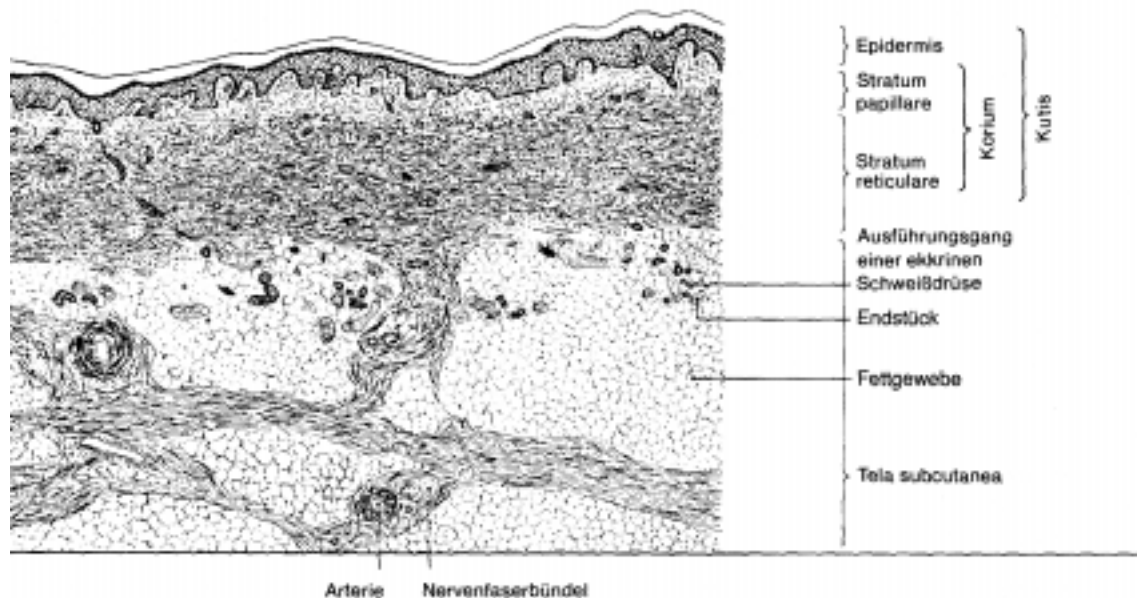


Abbildung 2-9: Menschliche Haut (Querschnitt) aus [75]

Die Epidermis setzt sich von außen nach innen aus Stratum corneum (Hornschicht), Stratum lucidum (Glanzsicht) von Hand- und Fußsohlen, Stratum granulosum (Körnerschicht), Stratum spinosum (Stachelzellenschicht), Stratum germinativum (Keimschicht) und Stratum basale (Basalschicht) zusammen, von denen die wichtigste Diffusionsbarriere für Arzneistoffe die aus abgestorbenen, keratinisierten Zellen bestehende lipophile Hornschicht darstellt. Sie ist ca. 10 bis 15 μm dick. Die Stärke kann je nach Körperregion nach oben oder unten noch variieren. Ihr Lipidgehalt schwankt von 2 bis 7 %. Die Lipidfraktion setzt sich aus polaren Phospholipiden, Cholesterinsulfat, neutralen Lipiden und Sphingolipiden zusammen. Die Hornzellen

werden in der Basalschicht gebildet und wandern an die Oberfläche. Dabei bildet sich in den Zellen ein Keratingerüst aus, das von einer festen Hülle, die aus der Plasmamembran entstanden ist, eingeschlossen wird. Zwischen den Hornzellen befindet sich eine Kittsubstanz aus Lipiden, nichtfibrillären Proteinen und Mucopolysacchariden, die in einem hochgeordneten Zustand vorliegen. Die als flüssig-kristalline Strukturen bezeichneten Lipiddoppelschichten der Membranen können sich gegeneinander verschieben und weisen eine hohe Beweglichkeit auf, wodurch eine gute Permeabilität gewährleistet ist. Die Hautlipide hingegen liegen in einem starren, echt-kristallinen Zustand vor. Der Zellinhalt besteht aus Lipiden, α -Protein, β -Protein und nichtfibrillären Proteinen, die Membran aus Lipiden und nichtfibrillären Proteinen. Die Zellen werden als Schuppen nach außen abgegeben. Auf der Haut befindet sich das in den Talgdrüsen gebildete Sebum. Es setzt sich zusammen aus Mono-, Di- und Triglyceriden, Cholesterol, Kohlenwasserstoffen (z.B. Squalen), Phospholipiden und α -Tocopherol, hat aber als 0,4 bis 10 μm dicke inkohärente Schicht keinen Einfluss auf die Arzneistoffresorption [76, 77].

2.3.1. Kriterien für die Resorption

Damit eine Substanz resorbiert werden kann, muss sie zunächst aus der Arzneiform freigesetzt werden (Liberation). Durch Diffusion erreicht die Substanz die Grenzfläche Vehikel/Haut, um anschließend in die Epidermis zu penetrieren. Nach dem Penetrationsschritt erfolgt die Permeation in die oberen Dermisabschnitte und die Aufnahme in die Blutbahn. Der letzte Schritt stellt den eigentlichen Resorptionsschritt dar.

Die Permeation erfolgt i.d.R. interzellulär oder transzellulär durch passive Diffusion. Andere Mechanismen, wie transglandulärer oder transfollikulärer Transport, spielen eine untergeordnete Rolle. Substanzen müssen auf ihrem Weg durch die Haut abwechselnd lipophile und hydrophile Schichten durchdringen, dabei ist der Konzentrationsgradient die treibende Kraft.

Der Durchgang durch die Haut ist abhängig von Wirkstoff- und Vehikeleigenschaften und von der allgemeinen Beschaffenheit der Haut.

Der Wirkstoff muss gelöst sein und einen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten haben, der viel größer als 1 ist, bevor er permeieren kann. Für die meisten Repel-

lent-Wirkstoffe ist dies der Fall. Hochmolekulare, hydrophile, geladene Wirkstoffe penetrieren hingegen nicht bzw. schlecht in die Haut.

Besitzt der Wirkstoff eine hohe Affinität zur Grundlage, wird er aufgrund des hohen Verteilungskoeffizienten Vehikel/Haut nur langsam freigesetzt.

Der Hauttyp ist ein weiteres Kriterium für die Resorption von Substanzen. Die Haut von Seborrhoikern ist schwitzend, fettig, schuppig und gut durchblutet. Im Gegensatz dazu haben Seborrhoeiker eine schlecht durchblutete, trockene Haut mit geringer Schweiß- und Talgproduktion. Transepidermale Transportvorgänge laufen deshalb bei Seborrhoikern bevorzugt ab [76, 78].

2.3.2. Methoden zur Beeinflussung der Resorption

Topisch applizierte Wirkstoffe haben unterschiedliche Zielorte. Beispielsweise sollen Aknemittel (Erythromycin, Isotretinoin) in Talgdrüsen, Mittel gegen Haarausfall (Antiandrogene) in Haarfollikel und Antihydrotische Mittel (Al^{3+} -Salze) in Schweißdrüsen eindringen.

Systemisch angewandt werden z.B. Mittel gegen Erkrankungen der Gefäße (Heparin), Hormone in der Postmenopause (Estradiol) und Herz-Kreislaufmittel (Glyceroltrinitrat).

Antibiotika (Tetrazyklin) sollen die Dermis erreichen und Antiphlogistika (Glucocorticoide) die lebende Epidermis.

Keratolytika (Salicylsäure) und hydratisierende Substanzen (Harnstoff) entfalten ihre Wirkung nach Penetration in das Stratum corneum.

Hautreinigungsmittel (ethanolhaltige Zubereitungen), Hautschutzmittel (Polymethylphenylsiloxane, Sonnenschutzcremes) sowie Repellents müssen, um zu wirken, auf der Hautoberfläche verweilen [79].

Penetrationsverbesserung

Die Penetration von Stoffen ist, außer bei den oberflächlich wirkenden Zubereitungen, grundsätzlich erwünscht. Durch Okklusion der Haut kann die Wasserverdunstung behindert werden, was dazu führt, dass sich das Wasser im Stratum corneum anreichert und die Quellung der Hornzellen und Aufweitung der Zellzwischenräume bewirkt. Dadurch wird die Penetration von Stoffen erleichtert.

Theoretischer Teil

Okklusion wird erreicht mittels fetter Öle, Mineralöle, Silikonöle und -im Falle transdermaler Therapeutischer Systeme- mittels Pflastern aus Naturkautschuck, Polyisobutylen und anderen Substanzen.

Enhancer sind Substanzen, die mit den Bestandteilen der Membranen reagieren und Wirkstoffe durch diese hindurchschleusen. Die Wirkstoffe können einerseits auf einem polaren, andererseits auf einem unpolaren Weg durch die Membranen transportiert werden. Einige Hilfsstoffe sind in der Lage, den Transport auf beiden Wegen zu beeinflussen.

Enhancer für den polaren Transport reagieren mit den hydrophilen Bestandteilen der Bilayer und erweitern deren Hydratationshülle. Damit erhöht sich das Wasservolumen in der Membran. Der Ordnungszustand der Membranen wird aufgelockert, und Substanzen können auf diesem polaren Weg besser Penetrieren. Zu dieser Art von Enhancern zählen Alkohole (Propylenglycol), Sulfoxide (Dimethylsulfoxid), Cholesterol- und Harnstoffderivate.

Andere lagern sich zwischen den Fettsäureketten der Membranen an, weiten die Strukturen auf und beeinflussen somit deren Ordnungszustand, was zur Folge hat, dass Wirkstoffe auf unpolarem Weg besser penetrieren können. Zusätzlich werden die polaren Köpfchen der Membranen auseinandergeschoben, so dass auch der Transport auf dem polaren Weg erleichtert wird. Einige Enhancer benötigen zum Eindringen in die Membranen Cosolventien. Die folgende Tabelle gibt einige Beispiele für diese Penetrationsvermittler an.

Theoretischer Teil

Substanzklasse	Beispiele	Cosolvens
Alkohole	Ethanol, Isopropanol	
Sulfoxidderivate	Dimethylsulfoxid, Decylmethylsulfoxid	
Dodecylazacycloheptanon-derivate	Azon	Propylenglycol
Alkyl-N,N-disubstituierte Ammonoacetate	Dodecyl-N,N-dimethylaminoacetat	
Terpene	D-Limonen, α -Pinen, Carveol	Ethanol, Isopropanol
Fettsäuren	Ölsäure, Laurinsäure	Propylenglycol
Ester	Isopropylpalmitat (C ₁₂), -myristat (C ₁₄)	
Cyclodextrine	α -, β -, γ -Cyclodextrin	
Cholesterolderivate	Cholesterol	
Pyrrolidone	N-Methyl-2-pyrrolidon	

Tabelle 2-1: Penetrationsverbesserer für den unpolaren Weg nach [79]

Für den transdermalen Transport wurden kugelförmige Vesikel aus einer (unilamellar) und mehreren (multilamellaren) Lipiddoppelschichten entwickelt, deren Grundbausteine Phospholipide sind, die Liposomen. Für Liposomen aus Eilecithin und Cholesterol konnte gezeigt werden, dass die Penetration von Triamcinolon gegenüber einer handelsüblichen Zubereitung gesteigert werden konnte [79]. Vor allem für Glucocorticoide erwiesen sich liposomale Zubereitungen als gute Vehikel für den Transport in die Epidermis und Dermis.

Mikroemulsionen sind stabile, kolloide Lösungen von Wasser, Öl, Tensid und Coten-sid, die sehr gute Lösungseigenschaften für schwer lösliche Substanzen haben. Öl- und Wasseranteil betragen etwa gleichermaßen 40 %. Gegenüber Cremes und Lotionen konnte für Mikroemulsionen ein Transport von Cetylalkohol und Octyldimethyl-p-aminobenzoessäure in tiefere Hautschichten nachgewiesen werden. Der Mechanismus wird auf die einzelnen Bestandteile der Mikroemulsionen zurückgeführt, wobei die Ölkomponente die Lipidstruktur der Haut in Richtung höherer Beweglichkeit

beeinflusst und das Wasser die Hydratisierung des Stratum corneum begünstigt [78, 79].

Behinderung von Penetration und Verbesserung der Haftfestigkeit von Dermatika

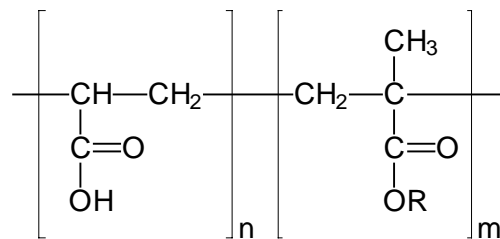
Viele Hilfsstoffe, die bei der Herstellung von Salbengrundlagen verwendet werden, sind langkettige, verzweigte oder unverzweigte Polymere, z.B. Celluloseether und andere Polysaccharide, Polyvinylpyrrolidone, Polyacrylate, Polyoxyethylene u.a., sowie Mineralöle (Paraffine), fette Öle und Siliconöle, die aufgrund ihrer Molekülgröße nicht in die Haut penetrieren. Ist ein Wirkstoff gut in einem dieser Stoffe löslich, so ist sein Verteilungskoeffizient Grundlage/Haut auf die Seite der Grundlage verschoben, und die Penetration ist hinsichtlich Vollständigkeit und Geschwindigkeit behindert [78]. In diesem Abschnitt werden einige dieser Polymere vorgestellt, die für die Formulierung von Repellents in Frage kommen.

Macrogole (Polyoxyethylene, Polyethylenglycole) sind unverzweigte Polykondensationsprodukte des Ethylenoxids, die wegen ihrer Ethergruppierungen Wasserstoffbrücken ausbilden können. Dadurch sind sie wasserlöslich und hygroskopisch. Sie werden u.a. in abwaschbaren Salben eingesetzt und behindern die Wasserabgabe der Haut nicht. Wegen ihrer Hygroskopizität entziehen sie der Haut Wasser, so dass der Fluss in Richtung Salbengrundlage erhöht ist und somit die Abgabe von Wirkstoffen an die Haut behindert sein kann. Je nach Polymerisationsgrad haben die Poxoxyethylene unterschiedliche Viskositäten. Niedermolekulare mit einer Molekülmasse von 200 bis 600 sind flüssig, von 800 bis 1500 vaselineartig und von 2000 bis 6000 wachsartig. Zur Identifizierung wird die mittlere Molekülmasse bei der Bezeichnung dieser Substanzen angegeben. In den Repellentzubereitungen Autan®-S Lotion, -Spray, -Stift wurde Macrogol 400 eingesetzt [73, 78].

Bei den Carbomeren (Polyacrylaten) zur topischen Anwendung handelt es sich um eine chemisch uneinheitliche Klasse von Polymeren. Sie sind Polymerisate der Acrylsäure und bilden nach Neutralisation mit alkalischen Substanzen, wie z.B. Natriumlauge, Trometamol (Tris), Methylglummin oder Triethanolamin, ab Konzentrationen

Theoretischer Teil

von 0,5 % in Wasser klare Gele. In höheren Konzentrationen bekommen die Zubereitungen salbenartige Konsistenz. Modifizierte Carbomere, beispielsweise Carbopol ETD2020®, Pemulen TR 1®-NF (Carbomer 1342) und TR 2®-NF (Carbomer 1342), sind Copolymerisate der Acrylsäure und Polymethacrylsäure, die mit Fettalkoholen (C₁₀₋₃₀) verestert und darüberhinaus mit Allylethern von Pentaerythritol oder Saccharose quervernetzt sind [80, 81, 82, 83].



R= langkettiger Alkylrest

Abbildung 2-10: Acrylat/C₁₀₋₃₀Alkyl-Acrylat-Crosspolymer (Pemulen TR 1®-NF und Pemulen TR 2®-NF)

Die modifizierten Polyacrylate dienen einerseits der Ausbildung von Gelgerüsten - Pemulen TR 1®-NF emulgiert bei einem pH-Wert zwischen 4 und 5,5 30 % (m/m) Mineralöl, Pemulen TR 2®-NF 60 - 80 % (m/m)- andererseits verhindern sie durch Filmbildung ein zu schnelles Abwaschen des Wirkstoffs und erhöhen die Haftfestigkeit auch auf feuchter Haut. Sie werden eingesetzt in Cremes, Gelen, Salben und anderen Zubereitung für die Anwendung auf der Haut und auf Schleimhäuten, z.B. rectal, buccal oder am Auge [84]. Sie sind außerdem typische Bestandteile wasserfester Sonnencremes [85]. In-vitro Tests zeigten, dass die Carbomere gut auf Schleimhäuten haften [86]. Dabei wurde auf einer Platte die Darmschleimhaut von Ratten fixiert und in einer Pufferlösung plaziert. Von oben wurde eine Scheibe, deren Unterseite mit Prüfsubstanz beschickt war, auf die Schleimhaut aufgelegt. An der Scheibenoberseite war ein Faden befestigt, der über eine Rolle geführt wurde und an dessen anderem Ende sich ein Gewicht befand, das Zug auf die beiden zusammenhaftenden Körper ausübte. Mit Hilfe einer Lichtschranke wurde die Zeit bestimmt, nach der sich die mit Prüfsubstanz beschickte Scheibe von der Mucosa löste. Bei einer aufgewendeten Kraft von 0,0846 N und einem pH-Wert von 6 hatte

Theoretischer Teil

Hydroxypropylmethylcellulose eine Haftzeit von 19,8 h, Pemulen TR 1® von 15,3 h, Natriumalginat von 1,82 h und Hydroxypropylcellulose von 0 h.

Zur Verbesserung der Haftfestigkeit topischer Zubereitungen können wegen ihrer schlechten Benetzbarkeit mit Wasser auch fette Öle, Mineralöle und Silikonöle verwendet werden. Silikonöle wie Dimeticon 350 (Abil 350®) [80, 87], ein Polymethylsiloxan, und Abil EM 90®, ein Polysiloxan-polyalkyl-polyether-copolymer [85], werden typischerweise in Hautschutzcremes und wasserfesten Sonnencremes eingesetzt. Ihre HLB-Werte liegen unter denen der anderen Öle. Abil EM 90® ist zudem schwach grenzflächenaktiv und wird als Antischaummittel sowie zur Verbesserung der Streichfähigkeit von halbfesten Zubereitungen als Emollients verwendet [88].

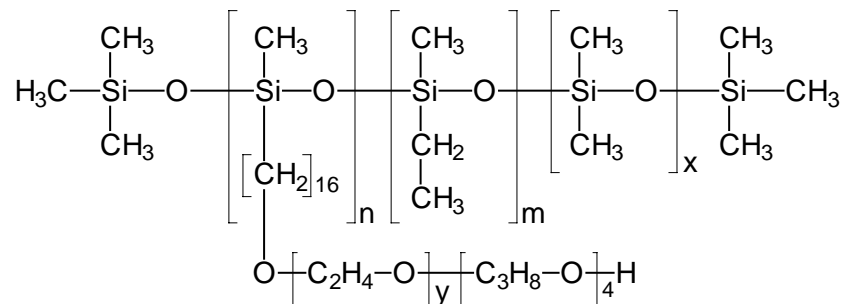


Abbildung 2-11: Cetyl-dimeticon-Copolyol (Abil EM 90®)

Bis-Diglyceryl-Polyacyladipat-2 (Softisan 649®) ist ein Ester aus Diglycerin mit natürlichen gehärteten Pflanzensäuren, der Isostearin- und der Adipinsäure. Die Reste der in Abbildung 2-12 gezeigten Formel sind ein Gemisch der Capryl-, Caprin-, Stearin-, Isostearin-, 12-Hydroxystearin- und der Adipinsäure oder Wasser. Es wird als Wollwachsersatz gehandelt und hat eine ähnliche Konsistenz wie dieses, ist ihm aber hinsichtlich der Fähigkeit zur Wasseraufnahme und der Haftfestigkeit auf der Haut überlegen. Es hat ein geringes allergenes Potential und wird in Turixin® Salbe, einer antibiotischen Augensalbe, eingesetzt. [89, 90, 91, 92, 93]

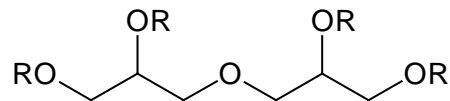


Abbildung 2-12: Bis -Diglyceryl-Polyacyladipat-2 (Softisan 649®), R = Fettsäure (Capryl-, Caprin-, Stearin-, Isostearin-, 12-Hydroxystearin-, Adipinsäure) oder Wasserstoff

Beeinflussung der Permeation von DEET

Ross, J.S. und Shah, J.C. [94] zeigten in einem in-vitro-Experiment, dass der Zusatz von Ethanol die Permeation von DEET durch menschliche Haut erhöhte und Propylenglycol und Macrogol 400 die Permeation erniedrigten. Für die Versuche wurde jeweils eine DEET-Dosis von $46,88 \text{ mg/cm}^2$ auf menschliche Haut aufgebracht, die in eine Franzzelle eingespannt war. Die hohe DEET-Dosis im Donor (infinite dose) bewirkte, dass die Wirkstoffmenge keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Transportes in das Akzeptormedium hatte.

Als Kontrolle diente reines DEET, in den getesteten Zubereitungen war DEET jeweils zu 10 % enthalten. Das Akzeptormedium war ein auf 37°C temperierter Phosphat-Puffer mit pH 7,4. Bei Vehikeln aus 90 % Propylenglycol und 10 % Wasser war die Diffusionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle um das 6-fache erniedrigt. DEET, das in Vehikel aus 90 % Macrogol 400 und 10 % Wasser eingearbeitet war, permeierte nicht.

Wirkstofffreigabe aus Dermatika

Verteilung, Auflösung und Freigabe von Wirkstoffen setzen deren Diffusion voraus. Die folgenden Gleichungen gelten im Allgemeinen für Systeme, die viel einfacher aufgebaut sind als die Haut, aber man kann sich daran orientieren, um den Einfluss wichtiger Kenngrößen abzuschätzen. Der Flux J ist nach dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz gleich dem Differentialquotienten von Masse m und Zeit t pro Fläche A . Er ist proportional dem räumlichen Konzentrationsgradienten dc/dx , mit dem Diffusionskoeffizienten D als Proportionalitätskonstante (Gleichung 2-2: 1. Ficksches Diffusionsgesetz). Das Gesetz gilt unter der Annahme, dass in dem zu beschreibenden

Theoretischer Teil

System Druck und Temperatur konstant sind und dass ein Fließgleichgewicht zwischen zugeführter und abgeführter Stoffmenge herrscht³.

$$J = \frac{dm}{A \cdot dt} = -D \frac{dc}{dx}$$

Gleichung 2-2: 1. Ficksches Diffusionsgesetz

Durch Umformung von Gleichung 2-2: 1. Ficksches Diffusionsgesetz und unter Einbeziehung des Verteilungskoeffizienten K zwischen Donormedium D und Akzeptormedium A erhält man Gleichung 2-3. Der Differentialquotient dc/dt stellt hier einen Konzentrationsfluss dar, welcher der Differenz der Konzentration des Stoffes im Donor- c_D und der Konzentration im Akzeptormedium c_A proportional und der Dicke h einer Diffusionsbarriere umgekehrt proportional ist.

$$\frac{dm}{dt} = D \cdot A \cdot K \frac{(c_D - c_A)}{h}$$

Gleichung 2-3: 1. Ficksches Diffusionsgesetz nach [94]

Für ein nicht eingestelltes Fließgleichgewicht gilt das 2. Ficksche Diffusionsgesetz (Gleichung 2-4: 2. Ficksches Diffusionsgesetz).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial J}{\partial x} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

Gleichung 2-4: 2. Ficksches Diffusionsgesetz

Der Diffusionskoeffizient ist nach Gleichung 2-5: Diffusionskoeffizient nach Sutherland und Einstein abhängig von der Viskosität η der Grundlage, dem Radius r der gelösten Moleküle, unter der Annahme, dass diese rund seien, und der absoluten Temperatur. (R = Allgemeine Gaskonstante, N = Avogadrokonstante)

$$D = \frac{R \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N}$$

Gleichung 2-5: Diffusionskoeffizient nach Sutherland und Einstein

³ Anmerk.: Für kurze Zeiträume wird kein Fließgleichgewicht vorausgesetzt.

Die Diffusionsgeschwindigkeit hat entscheidenden Einfluss auf die Freigabekinetik von Substanzen. Liegen diese in ungelöster Form als Feststoffpartikel oder Emulsionströpfchen vor, müssen sie nach Auflösung von der Grenzfläche der ungelösten Substanz in das angrenzende Akzeptormedium diffundieren. Anschließend erfolgt der Transport mittels Diffusion durch biologische Membranen sowie, entscheidend z.B. für Repellents und Parfüms, die Abgabe an die Atmosphäre. Auch dieser Vorgang ist ein Diffusionsprozess. Die Geschwindigkeit ist abhängig vom Diffusionskoeffizienten D_{12} beim Stoffübergang von der Grundlage in die Luft, dem Sättigungsdampfdruck p_1 des in der Grundlage befindlichen Stoffes und dem Dampfdruck des Stoffes p_2 über der Grundlage (Gleichung 2-6: Flux in Abhängigkeit der Partialdampfdrücke)[95].

$$J = \frac{dm_2}{A \cdot dt} \approx D_{12}(p_1 - p_2)$$

Gleichung 2-6: Flux in Abhängigkeit der Partialdampfdrücke

Verfolgt man die Wirkstofffreigabe aus einer Salbenmatrix in ein Akzeptormedium, erhält man die nach der Zeit aus der Grundlage pro Flächeneinheit freigegebene Wirkstoffmenge Q nach dem Quadratwurzelgesetz von Higuchi [96]. Sie ist der Wurzel aus der Zeit proportional. Diffusionskoeffizient D , Gesamtwirkstoffmenge M in der Grundlage und die Löslichkeit des Wirkstoffs c_s im Auflösungsmedium lassen sich für ein bestehendes System zu einer Proportionalitätskonstanten zusammenfassen.

$$Q = \sqrt{D \cdot (2M - c_s) c_s \cdot t}$$

Gleichung 2-7: Wirkstofffreisetzung aus einer Matrix

Im Gegensatz dazu konnte durch die Einarbeitung von Arzneistoffen in flüssigkristalline Matrixsysteme (lamellar- und hexagonal-flüssigkristalline Zustände der Vehikel) eine Liberation erzielt werden, die einer Kinetik 0.-Ordnung folgt [79]. Von dieser Art sind zur Zeit antiphlogistisch wirkende Gele, z.B. Dolgit® Mikrogel (Ibuprofen, ku-

bisch kristallin), Trauma® Dolgit Gel (Ibuprofen, kubisch kristallin), Voltaren® Emulgel (Diethylamin-Diclofenac, multilamellar), im Handel.

Für die kontrollierte Freigabe von Arzneistoffen wurden Nanopartikel mit einem Durchmesser unter 1 µm und Mikropartikel mit einem Durchmesser über 1 µm in Zubereitungen zur topischen Anwendung eingearbeitet. Die Wirkstoffe können in Polymermatrices aus natürlichen oder synthetischen Trägermaterialien eingebettet oder daran adsorbiert sein. Wenn diese Zubereitungen verfestigte Mizellare Systeme oder verfestigte Mikroemulsionen sind oder wenn die Partikel feste Hüllen haben, bezeichnet man sie als Nano- bzw. Mikrokapseln [79]. Durch Penetrationsuntersuchungen an Humanhaut wurde gezeigt, dass die Penetration in das Stratum corneum entscheidend von der Partikelgröße abhängt. Partikel über 20 µm penetrierten nicht.

Für Dispersionen, in denen 10 % DEET in Mikropartikel aus festen, hydrierten, natürlichen Triglyceriden eingebettet war, konnte gezeigt werden, dass die Bioverfügbarkeit von DEET nach dermalen Applikation um das 3-fache niedriger war als bei einer Lösung von 10 % DEET in Ethanol. Die mittlere Partikelgröße betrug 15 µm. Die äußere Phase der Dispersionen bestand aus Phosphatpuffer pH 7,4, Lecithin als oberflächenaktiver Substanz und Konservierungsmitteln [97].

2.4. Einfluss der Vehikel auf Wirkstärke und Wirkdauer von Repellents

Reifenrath und Rutledge [98] untersuchten mehrere DEET- und Ethohexandiol-Formulierungen, deren Wirkung durch Zusatz verschiedener Acrylatpolymere in ethanolischer Lösung bzw. ethanolischer Silikonpolymersuspensionen durch Filmbildung verlängert werden sollte. Die Tests wurden an unbehaarten Hunden und weißen Mäusen durchgeführt. Trocknungszeit, Elastizität und Härte der Polyacrylatfilme wurden bestimmt. Die Dauer des Insektenschutzes kann zeitlich begrenzt sein, wenn der Wirkstoff durch Wasser, z.B. Regen oder Schweiß, von der Haut entfernt wird. Deshalb wurde die Abwaschbarkeit der Formulierungen getestet, mit dem Benetzungswinkel als Bezugsgröße.

Die Trocknungszeit der Filme nahm mit steigender Diethyltoluamidkonzentration zu, während Härte, Elastizität und Benetzbarkeit abnahmen. Bei niedermolekularen Polyacrylaten war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt.

Theoretischer Teil

Silikonfilme zeigten kleine Benetzungswinkel mit Wasser, wobei Formulierungen mit Diethyltoluamid und Ethohexadiol ähnliche physikalische Eigenschaften hatten. In einem Versuch an unbehaarten Hunden stellten Reifenrath und Rutledge fest, dass die Dauer des Schutzeffektes gegen *Aedes aegypti* bei einer Formulierung auf Acrylatbasis im Vergleich zu einer ethanolischen DEET-Lösung verlängert war. Die mittlere Schutzdauer der Polyacrylat-Formulierung betrug $10,6 \pm 1,1$ h, die Schutzdauer der Referenz $6,4 \pm 1,6$ h. Die ED50 war bei 5 von 15 DEET-Formulierungen auf Polyacrylat- bzw. Silikonölbasis signifikant erniedrigt. Filme, die 4 h nach dem Ausgießen getestet wurden, zeigten in 6 von 15 Fällen eine geringere ED50 als die Referenz [98, 99].

Für Laborexperimente wurden jeweils $2,5 \text{ mg/cm}^2$ DEET-Zubereitung auf die Unterarme von Probanden aufgetragen. Die von Domb et al. (1995) beschriebenen Zubereitungen von 10 % DEET, eingebettet in Mikropartikel aus natürlichen Triglyceriden mit einem mittleren Partikeldurchmesser von $15 \text{ }\mu\text{m}$, boten gegen *Aedes aegypti* mit 6,5 h und *Anopheles stephensi* mit 3,5 h längeren absoluten Schutz als eine Lösung von 10 % DEET in Ethanol mit 1,5 h [97]. Die Angaben beziehen sich auf die Zeit, nach welcher jeweils der erste von drei Probanden gestochen wurde.

In Versuchen an Kaninchen wurden von Rutledge et al. (1996) acht Polymer-Formulierungen und neun mikroverkapselte Zubereitungen von DEET gegen *Aedes aegypti* und *Anopheles albimanus* getestet. Die Testperioden variierten zwischen 4 und 24 h. Nach einer Testperiode wurden die Stiche ausgezählt. Im Vergleich zu ethanolischen DEET-Lösungen konnte ein signifikant erhöhter Schutz bei einer Zubereitung, in der hochmolekulare Fettsäuren verwendet worden waren, einer Zubereitung, die Dimeticon 350 enthielt, und drei mikroverkapselten Zubereitungen beobachtet werden. Die mikroverkapselten Formulierungen enthielten Wollwachs, arabisches Gummi, Gelatine, Gerbsäure, Stearinsäure, Propylenglycol, Wasser und andere nicht genauer bezeichnete Hilfsstoffe. Zubereitungen aus Polyacrylaten und Dimeticon 1000 waren der ethanolischen Lösung unterlegen [100].

In Labor- und Feldversuchen wurden 1989 35 %-ige und 44 %-ige DEET Zubereitungen der Firmen 3M und Biotek mit der 75 %-igen ethanolischen DEET Lösung der US-Army verglichen, mit dem Ergebnis eines 95 %-igen Schutzes gegen *Aedes tae-*

Theoretischer Teil

niorhynchus und *Anopheles quadrimaculatus* [101]. Eine neue Formulierung der US-Army mit der Bezeichnung Extended Duration Repellent Formulation (EDRF) mit einem Gehalt von 33,33 % DEET wurde 1991 im Vergleich zur 75 %-igen ethanolischen Lösung an männlichen Probanden gegen *Aedes albopictus* getestet. 2,5 ml EDRF und 1,1 ml ethanolische Lösung wurden auf Füße und Unterbeine aufgetragen, mit dem Ergebnis, dass kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Schutzdauer beider Formulierungen nachgewiesen werden konnte [102]. Eine Formulierung der US-Army (Extended Duration Topical Insect/Arthropod Repellent Formulation = EDTIAR) wurde mit Tarnfarbenzubereitungen versetzt und 1995 im Laborversuch gegen *Anopheles stephensi* getestet. Der Schutz betrug 95 % über 6 h [103]. In Feldversuchen in Nordostthailand wurden 1996 verschiedene Repellentformulierungen getestet, wobei Lösungen von 50 % DEET und 75 % DEET in Ethanol und EDRF 6 h lang nahezu 100 %-igen Schutz boten. EDRF ist ein Produkt von 3M Corp., St Paul, MN [104]. Über die Zusammensetzung ist nichts bekannt.

Bio-Hautschutz® ist eine Emulsion die aus Kokos-Vorlauftettsäuren, Triglyceriden der Capryl-, Caprin- und Laurinsäure, Kaliumlaurat, Jojoba- und Rapsöl, Polyoxyethylen-12- und Polyoxyethylen-20-cethylether und α -Tocopherol besteht. Laut Herstellerangaben wird durch die Zusammensetzung und die dadurch bedingte Wasserverdunstung die Hauttemperatur um 1,75°C gesenkt, was den Insekten die Ortung des Wirtes erschwert wird [68]. In einem Stechtest an jeweils zwei Probanden pro Mückenart wurde die Zubereitung gegen *Aedes aegypti* und *Anopheles gambiae* vom Schweizerischen Tropeninstitut in Basel (1998) getestet [105]. Von der Zubereitung wurden 2 ml auf jeweils einer Unterarmfläche von 250 cm² verteilt. Die Schutzdauer betrug 7,5 h für *Aedes aegypti* und 8 h für *Anopheles gambiae* (Mittelwerte, ohne Angabe der Standardabweichung).

3. Experimenteller Teil

3.1. Faktorielle Versuchsplanung und Zubereitungen verschiedener Generationen

Das Projekt kann in vier Phasen der Rezepturenentwicklung eingeteilt werden. Der chronologische Ablauf ist im folgenden Fließdiagramm dargestellt. Jede Entwicklungsphase repräsentiert eine Generation von Repellent-Zubereitungen, aus der sich, aufgrund positiver Prüfergebnisse, jeweils eine Zubereitung als überlegen zeigte. Die Zusammensetzung der überlegenen Rezeptur diente als Ausgangspunkt für die Entwicklung der Folgegeneration.

Die Zubereitungen wurden vor allem hinsichtlich ihrer Haftfestigkeit beurteilt. Dies wurde mit einem in-vitro-Testverfahren geprüft, das im Kapitel 3.2 als Abwaschtest beschrieben wird. Die 2. und 3. Generation wurden zum Test der physikalischen Kurzzeitstabilität bei Raumtemperatur sieben Monate lang eingelagert (Kapitel 3.1.3). Ausgewählte Rezepturen der vier Generationen wurden weiteren Untersuchungen (Bewegungsanalyse, in-vitro-Freisetzung, Viskositätsmessungen, Färbetest, Polarisationsmikroskopie, Stabilitätsprüfungen) unterzogen, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

Die Formulierungen wurden in zwei Parallelprojekten in-vitro bzw. in-vivo getestet. J. Saebel untersuchte die Zubereitungen mit Hilfe der Elektroantennometrie. Dr. M. Theisohn vom Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Köln, führte Probandenstudien durch, bei denen die Wirkdauer mittels Stechtest geprüft wurde.

Die Rezepturen 3.10 und 4.2 erzielten insgesamt die besten Testergebnisse und wurden deshalb in einem Scale-Up-Verfahren im Großmaßstab in der Apotheke des Bundeswehrzentralkrankenhauses in Koblenz hergestellt.

Experimenteller Teil

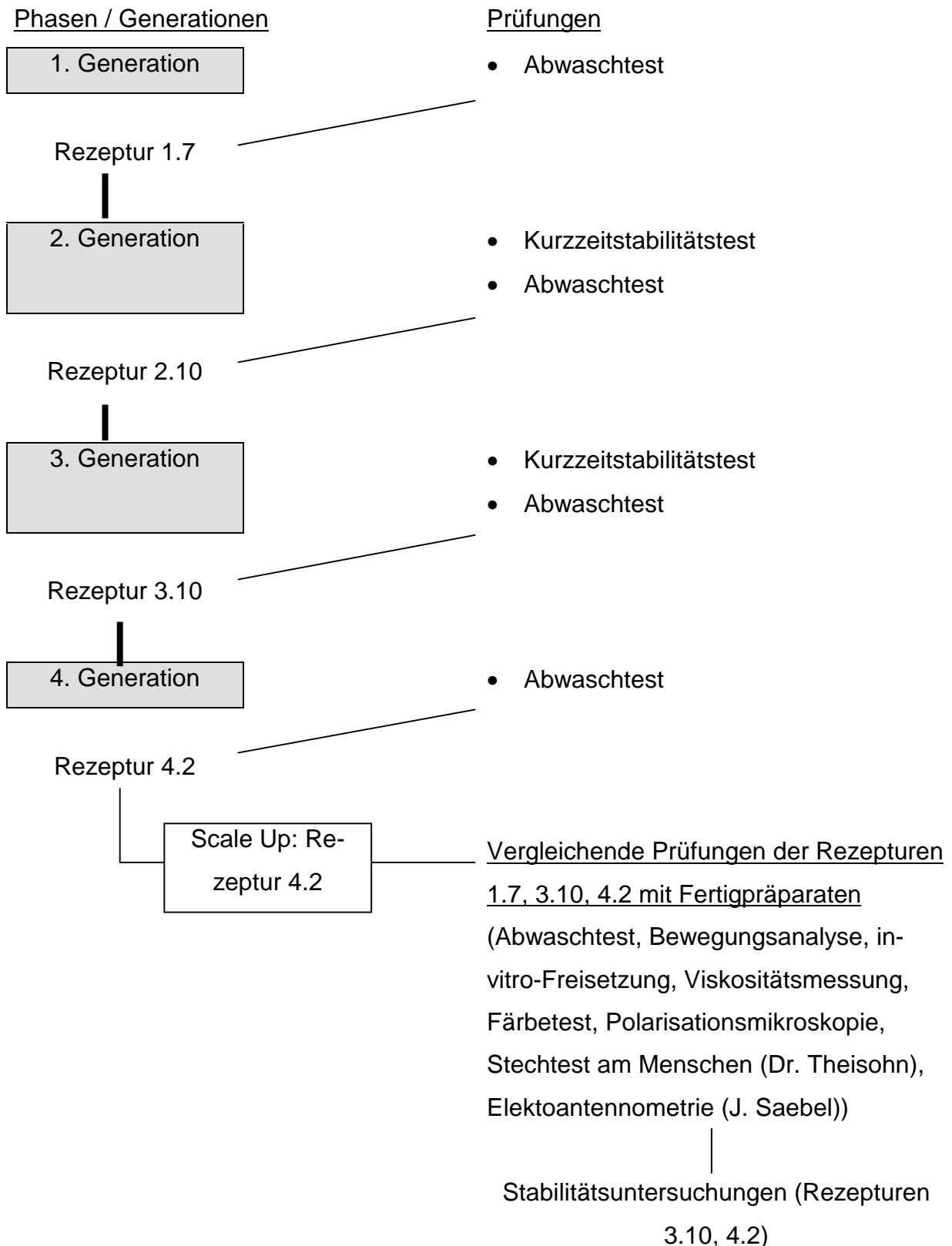


Abbildung 3-1: Chronologischer Ablauf der vier Phasen der Rezepturentwicklung

3.1.1. Materialien

- Benzylalkohol, Caelo GmbH, Hilden
- Bis-diglyceryl-polyacryl-adipat-2 (Softisan 649®), Condea, Witten
- Carbomere (Carbopol ETD 2050®, Carbopol Ultrez®), BFGoodrich, Brecksville (Ohio)
- Cetyl-dimeticon-copolyol (Abil EM 90®), TH. Goldschmidt AG, Essen
- Cetylpalmitat, Caelo GmbH, Hilden
- Cetylstearyl-schwefelsaures-Natrium (Lanette E®), Caelo GmbH, Hilden
- Citronellöl, Caelo GmbH, Hilden
- DEET, Merck, Darmstadt (Ch.-B. S18019742)
- Dimeticon (Abil 350®), TH. Goldschmidt AG, Essen
- Eucalyptusöl, Caelo GmbH, Hilden
- Glycerolmonostearat 40-50%, Caelo GmbH, Hilden
- Hochdisperses Siliciumdioxid (Aerosil 200®),
- Isopropanol 99 %
- Macrogol 400, BASF, Ludwigshafen
- Methylparaben, Caelo GmbH, Hilden
- Ölsäuredecylester (Cetiol V®), Henkel, Düsseldorf
- Polyethylenglycol-30-stearat (Myrj 51®), ICI, Everberg (Belgien)
- Propylenglycol, Aldrich, Seelze
- Propylparaben, Caelo GmbH, Hilden
- Quervernetzte C₁₀₋₃₀-Alkylacrylat-copolymere (Carbopol ETD 2020®, PemulenTR-1®, PemulenTR-2®, PemulenTR-1 NF®, PemulenTR-2 NF®), BFGoodrich, Brecksville (Ohio)
- Stearinsäure, Caelo GmbH, Hilden
- Wollwachs, Caelo GmbH, Hilden

Die Substanzen wurden so eingesetzt, wie sie angeliefert wurden. Substanzen mit Arzneibuchmonographien entsprachen laut Analysenzertifikat den Anforderungen.

3.1.2. Formulierungsansätze

Die Cremeformulierungen wurden zunächst im Rezepturmaßstab (100 g) mit entsprechenden Geräten wie Salbenschale und Wasserbad angefertigt.

In einer späteren Projektphase wurden die Rezepturen 1.7, 3.10 und 4.2 im Rahmen von Scale-Up-Versuchen im 3 kg-Maßstab in einem Universalmischer (Stephan UM 12) sowie im 120 kg-Maßstab in einer Zahnkolloidmühle (Fryma) hergestellt.

Die einzelnen Formulierungen wurden durch zwei Zahlen gekennzeichnet, die durch einen Punkt getrennt sind. Die Zahl vor dem Punkt gibt jeweils die Generation an, die Zahl nach dem Punkt identifiziert die einzelne Formulierung innerhalb ihrer Generation.

Erste Generation

In der ersten Generation entstanden acht Prototypen in Anlehnung an die Formulierungen wasserfester Sonnenschutzcremes [106, 107]. Die Formulierungen setzten sich folgendermaßen zusammen.

Experimenteller Teil

Rezepturen und Herstellungsverfahren

1.1

DEET	30,0
Isopropanol	29,0
Lanette E®	5,0
Cetiol V®	10,0
Aerosil®	10,0
Stearinsäure	5,0
Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2
Citronellöl	0,2
Eukalyptusöl	0,2
gereinigtes Wasser	ad 100,0

Lanette E®, Cetiol V®, Stearinsäure und Wasser wurden auf dem Wasserbad erwärmt (ca. 80° C) und kaltgerührt. DEET wurde in Isopropylalkohol gelöst und in die Dispersion eingearbeitet. Methylparaben und Propylparaben wurden unter leichtem Erwärmen in Benzylalkohol gelöst und zusammen mit Citronell- und Eukalyptusöl und mit dem bereits angefertigten Ansatz vereinigt (Ansatz A).

Aerosil 200® wurde danach portionsweise in Ansatz A eingearbeitet.

1.2

DEET	30,0
Isopropanol	38,0
Carbopol ETD 2050®	0,8
Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2
Citronellöl	0,2
Eukalyptusöl	0,2
gereinigtes Wasser	ad 100,0

Carbopol ETD 2050® wurde mit einer geringen Menge Isopropylalkohol angeteigt. Unter ständigem Rühren wurde der restliche Isopropylalkohol hinzugefügt, so dass eine gleichmäßige Dispersion entstand. DEET, eine Lösung von Methyl- und Propylparaben in Benzylalkohol sowie die ätherischen Öle wurden nacheinander dazugegeben. Zuletzt wurde Wasser vorsichtig untergerührt, ohne Luftblasen zu erzeugen.

Experimenteller Teil

1.3

DEET	30,0
Isopropanol	20,0
PEG 400	27,5
Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2
Citronellöl	0,2
Eukalyptusöl	0,2
gereinigtes Wasser	ad 100,0

DEET wurde in Isopropylalkohol gelöst. Anschließend wurden eine Lösung aus Methyl- und Propylparaben in Benzylalkohol sowie die restlichen Rezepturbestandteile nacheinander dazugegeben.

1.4

DEET	30,0
Isopropanol	38,0
PemulenTR 1®	0,8
Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2
Citronellöl	0,2
Eukalyptusöl	0,2
gereinigtes Wasser	ad 100,0

PemulenTR 1® wurde mit ca. 10 g Isopropylalkohol angeteigt und anschließend weiter verdünnt, so dass eine gleichmäßige Dispersion entstand. Unter ständigem Rühren wurden DEET, eine Lösung aus Methyl- und Propylparaben in Benzylalkohol, Citronell- und Eukalyptusöl nacheinander dazugegeben. Zum Schluss wurde, ohne dass Luftblasen entstanden, Wasser eingearbeitet.

Experimenteller Teil

1.5		1.6	
DEET	30,0	DEET	30,0
Isopropanol	38,0	Isopropanol	31,0
PemulenTR 2®	0,8	Carbopol Ultrez 10®	0,8
Benzylalkohol	1,0	Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4	Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2	Propylparaben	0,2
Citronellöl	0,2	Citronellöl	0,2
Eukalyptusöl	0,2	Eukalyptusöl	0,2
gereinigtes Wasser	ad 100,0	gereinigtes Wasser	ad 100,0

Pemulen TR 2® wurde in einer Fantaschale vorgelegt und mit einem Teil des DEET angerieben. Anschließend wurde diese Dispersion portionsweise mit dem restlichen Wirkstoff versetzt. Isopropylalkohol, eine Lösung von Methyl- und Propylparaben in Benzylalkohol sowie die ätherischen Öle wurden nacheinander dazugegeben. Nach Einrühren des Wassers erfolgte die Bildung eines klaren Gels.

Carbopol Ultrez 10® wurde in einer Fantaschale vorgelegt und mit einem Teil des DEET angerieben und anschließend portionsweise mit dem restlichen Wirkstoff versetzt. Isopropylalkohol, eine Lösung von Methyl- und Propylparaben in Benzylalkohol sowie die ätherischen Öle wurden dazugegeben. Nach Einrühren des Wassers entstand ein opakes Gel.

Experimenteller Teil

1.7		1.8	
DEET	30,0	DEET	30,0
Cetylpalmitat	3,0	Isopropanol	4,4
Cetylalkohol	2,0	Cetylstearylalkohol	0,4
PEG-30-stearat	1,0	PEG-30-stearat	3,6
Glycerolmonostearat	2,0	Abil 350®	1,0
Abil EM 90®	1,0	Carbopol ETD 2020®	0,4
Stearinsäure	6,0	Carbopol Ultrez 10®	0,3
Carbopol ETD 2050®	0,2	Triethanolamin	0,12
Carbopol ETD 2020®	2,0	Benzylalkohol	1,0
Triethanolamin	1,0	Methylparaben	0,4
Benzylalkohol	1,0	Propylparaben	0,2
Methylparaben	0,4	Citronellöl	0,2
Propylparaben	0,2	Eukalyptusöl	0,2
Citronellöl	0,2	gereinigtes Wasser	ad 100,0
Eukalyptusöl	0,2		
gereinigtes Wasser	ad 100,0		

Experimenteller Teil

DEET, Cetylpalmitat, Cetylalkohol, PEG-30-stearat, Glycerolmonostearat, Abil EM 90®, Stearinsäure und Carbopol ETD 2020® wurden auf dem Wasserbad bei ca. 80 °C geschmolzen und kaltgerührt.

Carbopol ETD 2050® wurde auf das Wasser aufgestreut und darin dispergiert. Nach Zugabe von Triethanolamin wurde die Suspension zu einem klaren Gel verarbeitet. Anschließend wurde die kaltgerührte Schmelze anteilsweise zu dem Gel gegeben. Eine Lösung von Methyl- und Propylparaben in Benzylalkohol, Citronellöl und Eukalyptusöl wurden zum Schluss hinzugefügt.

Zur Vermeidung von Luftblasenbildung wurde bei der Anfertigung im Universalmischer (Stephan UM 12) mit Unterdruck (ca. 0,4 - 0,6 bar) bei ständigem Rühren und Temperaturen von 70 - 80 °C gearbeitet. Der gesamte Ansatz wurde erst kaltgerührt, nachdem alle Zutaten verarbeitet worden waren.

DEET wurde als lipophiler Wirkstoff in die Fettphase der Zubereitungen eingearbeitet. Es eignete sich bei der Herstellung als Lösungsmittel für die Polyacrylate.

Die quervernetzten Polyacrylate dienten einerseits als Gelbildner und somit als Strukturverfestiger in den Cremeformulierungen, andererseits als Filmbildner auf der Haut, um die Haftfestigkeit der Cremes zu erhöhen. Zusätzlich behinderten sie die Penetration des Wirkstoffs.

Die Carbomere wurden ebenfalls zur Konsistenzverfestigung, zur Erniedrigung der Penetration von DEET und zur Erhöhung der Haftfestigkeit eingesetzt.

Macrogol 400 wurde als Cosolvens, als viskositätserhöhender Zusatz und als Mittel zur Herabsetzung der Penetration verwendet.

DEET, Cetylstearylalkohl, PEG-30-stearat, Abil 350® und Carbopol ETD 2020® wurden auf dem Wasserbad bei ca. 80 °C geschmolzen und anschließend kaltgerührt.

Carbopol Ultrez 10® wurde mit etwas Wasser angerieben und restliches Wasser dazugegeben. Die Dispersion wurde mit Isopropylalkohol verdünnt, mit Triethanolamin versetzt und zu einem klaren Gel verarbeitet. Zu diesem Gel wurde portionsweise die erkaltete Ölphase gegeben und abschließend eine Lösung der Parabene in Benzylalkohol sowie Citronell- und Eukalyptusöl hinzugefügt.

Experimenteller Teil

Die Silikonöle Dimeticon und Cetyl-dimeticon-copolyol wurden wegen ihrer wasserabweisenden Eigenschaften eingesetzt. Cetyl-dimeticon-copolyol hat zusätzlich aufgrund von Polyoxyethylen- und Polyoxypropylengruppen in den Seitenketten schwach oberflächenaktive Eigenschaften, wodurch die Spreitung auf der Haut und die Streichfähigkeit der Zubereitungen erhöht wurden.

Bis-diglyceryl-polyacyl-adipat-2 ist ein synthetisches Wollwachssubstitut zur Verbesserung der Haftfestigkeit.

Glycerolmonostearat 40-50% EuAB 1997 (HLB = 3,8) wurde als W/O- und Polyethylenglycol-30-stearat EuAB NT 1999 (HLB = 16) als O/W- Emulgator verwendet.

Weiterhin wurden eingesetzt Na-cetylstearylsulfat als O/W-Emulgator, Ölsäuredecylester, Stearinsäure und Cetylpalmitat als konsistenzbeeinflussende Bestandteile der Fettphase, hochdisperses Siliciumdioxid als anorganischer Gelbildner, Methyl-, Propylparaben und Benzylalkohol als Konservierungsmittel sowie Citronell- und Eucalyptusöl als Geruchskorrigentien.

Zweite Generation

Ausgehend von Rezeptur 1.7 wurde die Hilfsstoffzusammensetzung geändert. Die Zusammensetzung sollte vereinfacht werden, mit dem Ziel, für Stabilität und Haftfestigkeit unwichtige Bestandteile wegzulassen. Dies wurde mit Tests, die im Folgenden beschrieben werden, überprüft. Auf Isopropanol wurde wegen möglicher Explosionsgefahr bei der Großherstellung verzichtet.

Für die Rezepturentwicklung wurden 2^3 -Faktorenversuchspläne aufgestellt. Unter Beibehaltung der Wirkstoffmenge von jeweils 30 % DEET wurden im ersten Fall (Tabelle 3-1) die Menge und Zusammensetzung der Gelphase (Faktor A), der Siliconölanteil (Faktor B) und die Art der Konservierungsmittel (Faktor C) variiert. Die Zusammensetzung der übrigen Hilfsstoffe änderte sich nicht.

Experimenteller Teil

Faktoren	Code	Unteres Niveau = (-)	Oberes Niveau = (+)
Polyacrylate	A	C ₁₀₋₃₀ -Alkylacrylat-copolymer (Carbopol ETD 2020®) 2,0% Polyacrylsäure (Carbopol ETD 2050®) 0,2%	C ₁₀₋₃₀ -Alkylacrylat-copolymer (Carbopol ETD 2020®) 3,0 %
Siliconöl	B	Cetyl-dimeticon-copolyol (Abil EM 90®) 1,0%	Cetyl-dimeticon-copolyol (Abil EM 90®) 2,0%
Konservierungs- mittel	C	Benzylalkohol 1,0% PHB-Ester 0,6%	Propylenglycol 15,0%
Emulgator- mischung		Cetylpalmitat Cetylalkohol Glycerolmonostearat POE-30-stearat Stearinsäure	14,0%

Tabelle 3-1: Faktorenversuchsplan 1 für die Entwicklung der Zubereitungen der 2. Generation

Bei dem 2. Faktorenversuchsplan wurde auf PHB-Ester und Benzylalkohol verzichtet. Die Menge und Art der Polyacrylate (Faktor A) wurde wie im ersten Fall variiert, die Siliconölmenge (Faktor B) und die Zusammensetzung der Emulgator-Hilfsstoffmischung (Faktor C) wurden verändert. Propylenglycol diente als Cosolvens und Konservierungsmittlersatz (Tabelle 3-2). Mit Wasser als Dispersionsmittel wurde in beiden Fällen bis zu 100 % aufgefüllt. Es entstanden 16 Zubereitungen, deren Abwaschbarkeit innerhalb einer Woche und die Lagerstabilität über sieben Monate getestet wurden.

Experimenteller Teil

Faktoren	Code	Unteres Niveau = (-)	Oberes Niveau = (+)
Polyacrylate	A	C ₁₀₋₃₀ -Alkylacrylat-copolymer (Carbopol ETD 2050®) 2,0% Polyacrylsäure (Carbopol ETD 2050®) 0,2%	C ₁₀₋₃₀ -Alkylacrylat-copolymer (Carbopol ETD 2020®) 3,0%
Siliconöl	B		Cetyl-dimeticon-copolyol (Abil EM 90®) 1,0%
Emulgator- mischung	C	Glycerolmonostearat 2,0% POE-30-stearat 1,0%	Stearinsäure 6,0% Cetylpalmitat 3,0% Cetylalkohol 2,0% Glycerolmonostearat 2,0% POE-30-Glycerolmono- stearat 1,0%
Konservierungs- mittel		Propylenglycol	15 %

Tabelle 3-2: Faktorenversuchsplan 2 für die Entwicklung der Zubereitungen der 2. Generation

Nachfolgend sind die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Zubereitungen aufgeführt, die sich aufgrund der faktoriellen Versuchsplanung ergaben.

Die Rezepturen sind jeweils links oben sowie links unten durch Kombinationen von Zahlen bzw. Zahlen und Buchstaben gekennzeichnet. Die Zahlen über den Rezepturen identifizieren, wie bereits beschrieben, die Formulierungen innerhalb ihrer Generation, die Kombination von Zahlen und Buchstaben unter der Rezeptur gibt die Faktorenkombination an, die aus den Versuchsplänen resultiert. Die Zahl vor dem Punkt entspricht dem Faktorenversuchsplan innerhalb der Generation -"1" oder "2"-, der Buchstabe gibt an, welcher Faktor auf oberem Niveau ist. Steht "(1)" nach dem Punkt, befinden sich alle Faktoren auf niedrigem Niveau (vgl. Kapitel 3.1.3).

Experimenteller Teil

Rezepturen und Herstellungsverfahren

Die Zubereitung aller Formulierungen erfolgte nach dem selben Prinzip.

DEET wurde vorgelegt und auf 70 - 80°C erhitzt. Anschließend wurden die Carbomere darin gelöst. Wachse und Emulgatoren von halbfester oder fester Konsistenz sowie Öle wurden bei einer Temperatur von 70 - 80°C zu einer homogenen Mischung verarbeitet und dem zuvor hergestellten Ansatz unter Rühren hinzugefügt.

=> Ansatz A.

Die wasserlöslichen Bestandteile wurden gelöst, auf 70 - 80°C erhitzt und in Ansatz A eingerührt. Fehlendes Wasser wurde nach dem Abkühlen ergänzt.

Die Zubereitungen der 3. und 4. Generation wurden ebenfalls nach diesem Prinzip hergestellt.

2.1		2.2	
DEET	30,0	DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	2,0	Carbopol ETD 2020®	3,0
Carbopol ETD 2050®	0,2	Abil EM 90®	1,0
Abil EM 90®	1,0	Benzylalkohol	1,0
Benzylalkohol	1,0	Methylparaben	0,4
Methylparaben	0,4	Propylparaben	0,2
Propylparaben	0,2	Stearinsäure	6,0
Stearinsäure	6,0	Cetylpalmitat	3,0
Cetylpalmitat	3,0	Cetylalkohol	2,0
Cetylalkohol	2,0	PEG-30-stearat	1,0
PEG-30-stearat	1,0	Glycerolmonostearat	2,0
Glycerolmonostearat	2,0	Natriumhydroxidlösung 5 %	1,0
Natriumhydroxidlösung 5 %	1,0	gereinigtes Wasser	ad 100,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0		

1.(1)

1.a

Experimenteller Teil

2.3

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	2,0
Carbopol ETD 2050®	0,2
Abil EM 90®	2,0
Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5 %	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

1.b

2.4

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	2,0
Carbopol ETD 2050®	0,2
Abil EM 90®	1,0
Propylenglykol	15,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5 %	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

1.c

Experimenteller Teil

2.5

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	3,0
Abil EM 90®	2,0
Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

1.ab

2.6

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	2,0
Carbopol ETD 2050®	0,2
Abil EM 90®	2,0
Propylenglykol	15,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

1.bc

Experimenteller Teil

2.7

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	3,0
Abil EM 90®	1,0
Propylenglykol	15,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

1.ac

2.8

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	3,0
Abil EM 90®	2,0
Propylenglykol	15,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

1.abc

Experimenteller Teil

2.9

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	2,0
Carbopol ETD 2050®	0,2
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.(1)

2.11

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	2,0
Carbopol ETD 2050®	0,2
Abil EM 90®	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.b

2.10

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	3,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.a

2.12

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	2,0
Carbopol ETD 2050®	0,2
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.c

Experimenteller Teil

2.13

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	3,0
Abil EM 90®	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.14

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	2,0
Carbopol ETD 2050®	0,2
Abil EM 90®	1,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.ab

2.15

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	3,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.bc

2.16

DEET	30,0
Carbopol ETD 2020®	3,0
Abil EM 90	1,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.ac

2.abc

Dritte Generation

Bei der Versuchsplanung der 3. Generation wurden anstelle der Carbopole ETD 2020® und 2050®, die als Hilfsstoffe für Kosmetika zugelassen sind, die in Arzneibüchern beschriebenen Carbomere Pemulen TR 1 NF® und Pemulen TR 2 NF® verwendet. Im Gegensatz zur 1. und 2. Generation wurde jeweils nur eines dieser Polyacrylate eingesetzt (Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4). Die Abwaschbarkeit der 16 Formulierungen wurde innerhalb einer Woche und die Lagerstabilität sieben Monate lang geprüft.

Faktoren	Code	Unteres Niveau = (-)	Oberes Niveau = (+)
Polyacrylate	A	C ₁₀₋₃₀ -Alkylacrylat-copolymer (Pemulen TR 1 NF®) 3,0%	C ₁₀₋₃₀ -Alkylacrylat-copolymer (Pemulen TR 2 NF®) 3,0%
Siliconöl	B	Cetyl-dimeticon-copolyol 1,0%	Cetyl-dimeticon-copolyol 2,0%
Konservierungs- mittel	C	Benzylalkohol 1,0% PHB-Ester 0,6%	Propylenglycol 15,0%
Emulgator- mischung		Cetylpalmitat Cetylalkohol Glycerolmonostearat POE-30-stearat Stearinsäure	14,0%

Tabelle 3-3: Faktorenversuchsplan 1 für die Entwicklung der Zubereitungen der 3. Generation

Experimenteller Teil

Faktoren	Code	Unteres Niveau = (-)	Oberes Niveau = (+)
Polyacrylate	A	C ₁₀₋₃₀ -Alkylacrylat-copolymer (Pemulen TR 1 NF®) 3,0%	C ₁₀₋₃₀ -Alkylacrylat-copolymer (PemulenTR 2 NF®) 3,0%
Siliconöl	B		Cetyl-dimeticon-copolyol 1,0%
Emulgator- mischung	C	Glycerolmonostearat 2,0% POE-30-stearat 1,0%)	Stearinsäure 6,0% Cetylpalmitat 3,0% Cetylalkohol 2,0% Glycerolmonostearat 2,0% POE-30-Glycerolmonostearat 1,0%
Konservierungs- mittel		Propylenglycol	15 %

Tabelle 3-4: Faktorenversuchsplan 2 für die Entwicklung der Zubereitungen der 3. Generation

Experimenteller Teil

Rezepturen und Herstellungsverfahren

Aufgrund der faktoriellen Versuchsplanung ergaben sich folgende Zusammensetzungen der Zubereitungen. Die Herstellung erfolgte in gleicher Weise wie die Herstellung der Formulierungen der 2. Generation. Bei der Anfertigung der 3 kg- und 120 kg-Ansätze von Rezeptur 3.10 wurde jeweils bei Unterdruck, Temperaturen zwischen 70 und 80°C sowie unter ständigem Rühren gearbeitet.

3.1		3.2	
DEET	30,0	DEET	30,0
Pemulen TR 1 NF®	3,0	Pemulen TR 2 NF®	3,0
Abil EM 90®	1,0	Abil EM 90®	1,0
Benzylalkohol	1,0	Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4	Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2	Propylparaben	0,2
Stearinsäure	6,0	Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0	Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0	Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0	PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0	Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5 %	1,0	Natriumhydroxidlösung 5 %	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0	gereinigtes Wasser	ad 100,0
1.(1)		1.a	

Experimenteller Teil

3.3

DEET	30,0
Pemulen TR 1 NF®	3,0
Abil EM 90®	2,0
Benzylalkohol	1,0
Methylparaben	0,4
Propylparaben	0,2
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5 %	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

1.b

3.4

DEET	30,0
Pemulen TR 1 NF®	3,0
Abil EM 90®	1,0
Propylenglykol	15,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
Natriumhydroxidlösung 5 %	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

1.c

Experimenteller Teil

3.5

DEET	30,0	
Pemulen TR 2 NF®	3,0	
Abil EM 90®	2,0	
Benzylalkohol	1,0	
Methylparaben	0,4	
Propylparaben	0,2	
Stearinsäure	6,0	
Cetylpalmitat	3,0	
Cetylalkohol	2,0	
PEG-30-stearat	1,0	
Glycerolmonostearat	2,0	
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0	
gereinigtes Wasser		ad 100,0

1.ab

3.7

DEET	30,0	
Pemulen TR 2 NF®	3,0	
Abil EM 90®	1,0	
Propylenglykol	15,0	
Stearinsäure	6,0	
Cetylpalmitat	3,0	
Cetylalkohol	2,0	
PEG-30-stearat	1,0	
Glycerolmonostearat	2,0	
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0	
gereinigtes Wasser		ad 100,0

1.ac

3.6

DEET	30,0	
Pemulen TR 1 NF®	3,0	
Abil EM 90®	2,0	
Propylenglykol	15,0	
Stearinsäure	6,0	
Cetylpalmitat	3,0	
Cetylalkohol	2,0	
PEG-30-stearat	1,0	
Glycerolmonostearat	2,0	
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0	
gereinigtes Wasser		ad 100,0

1.bc

3.8

DEET	30,0	
Pemulen TR 2 NF®®	3,0	
Abil EM 90®	2,0	
Propylenglykol	15,0	
Stearinsäure	6,0	
Cetylpalmitat	3,0	
Cetylalkohol	2,0	
PEG-30-stearat	1,0	
Glycerolmonostearat	2,0	
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0	
gereinigtes Wasser		ad 100,0

1.abc

Experimenteller Teil

3.9

DEET	30,0
Pemulen TR 1 NF®	3,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.(1)

3.11

DEET	30,0
Pemulen TR 1 NF®	3,0
Abil EM 90®	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.b

3.10

DEET	30,0
Pemulen TR 2 NF®	3,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.a

3.12

DEET	30,0
Pemulen TR 1 NF®	3,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.c

Experimenteller Teil

3.13

DEET	30,0
Pemulen TR 2 NF®	3,0
Abil EM 90®	1,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.ab

3.15

DEET	30,0
Pemulen TR 2 NF®	3,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.ac

3.14

DEET	30,0
Pemulen TR 1 NF®	3,0
Abil EM 90®	1,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.bc

3.16

DEET	30,0
Pemulen TR 2 NF®	3,0
Abil EM 90	1,0
Stearinsäure	6,0
Cetylpalmitat	3,0
Cetylalkohol	2,0
Glycerolmonostearat	2,0
PEG-30-stearat	1,0
Propylenglykol	15,0
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

2.abc

Vierte Generation

Aufgrund guter physikalisch-chemischer Stabilität nach 7 Monaten wurde Rezeptur 3.10 als Ausgangsrezeptur für die Formulierungen der 4. Generation ausgewählt. Durch Variation der Emulgatorzusammensetzung wurde untersucht, ob sich die Haftfestigkeit der Rezepturen ändert. Der Zusatz von Bis-diglyceryl-polyacyladipat-2 (Softisan 649®) sollte die Abwaschbarkeit weiter herabsetzen. Entsprechende Mengen Propylenglycol und Softisan 649® wurden gegeneinander ausgetauscht. Es entstanden zehn Formulierungen, deren Haftfestigkeit geprüft wurde.

Rezepturen und Herstellungsverfahren

Die Zubereitungen wurden analog den Fertigungsmethoden der Rezepturen der 2. und 3. Generation hergestellt. Die 3 kg- und 120 kg-Ansätze von Rezeptur 4.2 wurden auf gleiche Weise wie Rezeptur 3.10 angefertigt.

Den Zubereitungen der 4. Generation lag folgende Basisrezeptur zugrunde:

DEET	30,0
Pemulen TR2®	3,0
Glycerolmonostearat	a
PEG-30-stearat	b
Propylenglycol	c
Softisan 649	d
Natriumhydroxidlösung 5%	1,0
gereinigtes Wasser	ad 100,0

Die Buchstaben a, b, c und d stellen variable Hilfsstoffanteile dar.

Experimenteller Teil

Rezeptur	Hilfsstoffanteil [%]			
	Glycerolmonostearat	POE-30-stearat	Propylenglycol	Softisan 649®
	= a	= b	= c	= d
4.1	2	1	14	1
4.2	2	1	13	2
4.3	2	1	12	3
4.4	2	1	11	4
4.5	2	1	10	5
4.6	1	2	14	1
4.7	1	2	13	2
4.8	1	2	12	3
4.9	1	2	11	4
4.10	1	2	10	5

Tabelle 3-5: Variationen in der 4. Generation

3.1.3. Einfluss der Hilfsstoffe auf die physikalische Stabilität

Die Cremes der 2. und 3. Generation wurden in Salbenkruken bei 22°C im Klimaschrank eingelagert, und es wurde wöchentlich visuell kontrolliert, ob eine Phasentrennung, d.h. Wasser- oder Fetttröpfchen mit einem Durchmesser von ca. 1 mm an der Oberfläche, vorlag. Nach 212 Tagen wurde der Versuch beendet und die Ergebnisse ausgewertet.

Auswertung von Faktorenversuchsplänen

Die faktorielle Versuchsplanung dient dazu, mehrere Einflussgrößen auf qualitätsbestimmende Merkmale zu untersuchen. Bei einem 2³ Faktorenversuchsplan werden drei qualitative oder quantitative Variable bzw. Faktoren (A, B, C) auf jeweils einem hohen und einem niedrigen Niveau eingestellt. Das niedrige Niveau wird mit einem Minuszeichen (-), das hohe mit einem Pluszeichen (+) gekennzeichnet. Daraus folgt die Zuordnung der Vorzeichen für die Berechnung der Effekte (vgl. Gleichungen 3-2 und Tabelle 3-6).

Experimenteller Teil

Man geht bei der faktoriellen Versuchsplanung von einem linearen Modell aus, das besagt, dass die einzelnen Faktoren sowie ihre Wechselwirkungen das Ergebnis beeinflussen.

$$Y = \mu + E_A \cdot A + E_B \cdot B + E_C \cdot C + E_{AB} \cdot AB + E_{AC} \cdot AC + E_{BC} \cdot BC + E_{ABC} \cdot ABC + \varepsilon$$

Gleichung 3-1

In Gleichung 3-1 ist Y das Versuchsergebnis, das sich zusammensetzt aus der Summe des Mittelwerts μ aller Versuchsergebnisse, der Effekte E_A , E_B und E_C der verschiedenen Einflussgrößen A, B, und C sowie deren zweifachen Wechselwirkungen E_{AB} , E_{AC} und E_{BC} und der dreifachen Wechselwirkung E_{ABC} untereinander. Hinzu kommt der Einfluss einer Versuchsstreuung ε . Mit Hilfe von Tabelle 1-1 können die Ergebnisse (Haltbarkeit in Tagen) ausgewertet und die Einflüsse der verschiedenen Faktoren beurteilt werden. Spalte 1 (Versuch) gibt an, um welchen Versuch, beispielsweise eine Hilfsstoffkombination, es sich handelt. Dabei bedeutet "(1)", dass alle Faktoren auf niedrigem Niveau sind, "a" bedeutet, Faktor A ist auf hohem Niveau und B und C auf niedrigem usw.. In der zweiten Spalte werden die Ergebnisse, z.B. Lagerstabilität in Tagen, eingetragen. In Spalte 3 werden alle Testergebnisse aufaddiert ("T") und durch 8 geteilt ("T/8"), um das arithmetische Mittel aller Ergebnisse als Schätzwert von μ zu bestimmen. Der Wert wird in der letzten Zeile eingetragen. In den folgenden Spalten multipliziert man das Ergebnis der entsprechende Zeile mit -1 oder +1, je nach Vorzeichenvorgabe in der jeweiligen Zelle, und addiert die Werte spaltenweise. Um die Effekte der Faktoren und Wechselwirkungen zu erhalten, dividiert man die jeweilige Spaltensumme durch 4. Dies entspricht der Berechnung von Effekten und Wechselwirkungen nach folgenden Formeln:

$$E_A = \frac{A + AB + AC + ABC}{4} - \frac{(1) + B + C + BC}{4}$$

$$E_B = \frac{B + AB + BC + ABC}{4} - \frac{(1) + A + C + AC}{4}$$

Experimenteller Teil

$$E_C = \frac{C + AC + BC + ABC}{4} - \frac{(1) + A + B + AB}{4}$$

$$E_{AB} = \frac{(1) + C + AB + ABC}{4} - \frac{A + B + AC + BC}{4}$$

$$E_{AC} = \frac{(1) + B + AC + ABC}{4} - \frac{A + C + AB + BC}{4}$$

$$E_{BC} = \frac{(1) + A + BC + ABC}{4} - \frac{B + C + AB + AC}{4}$$

$$E_{ABC} = \frac{A + B + C + ABC}{4} - \frac{(1) + AB + AC + BC}{4}$$

Gleichungen 3-2: Formeln zur Berechnung der Effekte und Wechselwirkungen

Das Ergebnis wird jeweils in der letzten Zeile eingetragen.

Je größer der Zahlenwert des Ergebnisses der letzten Zeile, desto größer ist der Effekt des entsprechenden Faktors bzw. der Faktorenkombination. Ein negativer Wert der Summe und damit des Effekts bzw. der Wechselwirkung bedeutet, dass der Wert der Zielgröße abnimmt, wenn man vom unteren Niveau des Faktors zum oberen übergeht.

Ginge man rein pragmatisch vor, wäre die Faktorenkombination, die zum besten Ergebnis (Spalte 2) führt, die beste. Durch einen Vergleich der Spaltensummen kann aber die relative Größe der Einflüsse von Faktoren und Faktorenkombinationen beurteilt werden.

Die Faktoren werden unterteilt in quantitative Einflussgrößen, z.B. Hilfsstoffmengen, und qualitative Einflussgrößen, z.B. Art der Hilfsstoffe.

Experimenteller Teil

Versuch	Ergebnis	T	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
(1)		+	-	-	-	+	+	+	-
a		+	+	-	-	-	-	+	+
b		+	-	+	-	-	+	-	+
c		+	-	-	+	+	-	-	+
ab		+	+	+	-	+	-	-	-
ac		+	+	-	+	-	+	-	-
bc		+	-	+	+	-	-	+	-
abc		+	+	+	+	+	+	+	+
	Summe:	T =	A =	B =	C =	AB =	AC =	BC =	ABC =
		Effekt:							

Tabelle 3-6: Faktorenversuchsplan

3.1.4. Ergebnisse

Von den Zubereitungen der 2. und 3. Generation waren nach Abschluss der Einlagerung folgende ausreichend physikalisch stabil: 2.2, 2.10, 2.12, 3.1, 3.3, 3.7, 3.8, 3.10, 3.12, 3.15 und 3.16.

Zweite Generation

1. Faktorenversuchsplan:

Die längste Haltbarkeit von den ersten acht Formulierungen der 2. Generation hatte die Creme, bei der der Faktor A auf hohem Niveau (Carbopol ETD 2020® 3,0 %) und die Faktoren B (Abil EM 90® 1,0 %) und C (Benzylalkohol 1,0 %, PHB-Ester 0,6 %) auf niedrigem Niveau waren.

Der positive Effekt des Faktors A auf die Haltbarkeit, d.h. die Erhöhung des Carbopol ETD 2020® -Anteils von 2 auf 3,0 % und das Weglassen von Carbopol ETD 2050® war zahlenmäßig genau so groß wie die Wechselwirkung der Faktoren B und C sowie die Wechselwirkung von A, B und C (Tabelle 3-7).

Die Lagerstabilität der Zubereitungen mit jeweils B (Abil EM 90® 2,0 %) und C (Propylenglycol 15 %) auf hohem Niveau war mit 63 und 7 Tagen aber sehr kurz. In bei-

Experimenteller Teil

den Fällen war der Effekt mit dem Wert (-19,8) negativ. Das Vorzeichen der Wechselwirkung zwischen B und C bedeutet aber, dass sich die Stabilität der Salben verbesserte, wenn statt 2 % Silikonöl nur 1 % eingesetzt wurde und statt 15 % Propylenglycol eine Lösung von Benzylalkohol und PHB-Estern als antimikrobieller Zusatz verwendet wurde. Der Effekt der zweifachen Wechselwirkung zwischen B und C ergab eine positive Zahl, da sich die negativen Vorzeichen $((-1) \times (-1) = 1)$ durch Multiplikation umkehren. Die gleiche Interpretation lässt auch der Effekt der Wechselwirkungen zwischen A, B und C zu, mit Faktor A auf hohem Niveau und den Faktoren B und C auf niedrigem Niveau $((+1) \times (-1) \times (-1) = +1)$.

Daraus folgt, dass sich 3,0 % Carbopol ETD 2020® und die Konservierungsmittelmischung aus Parabenen und Benzylalkohol positiv auf die physikalische Stabilität der Zubereitungen auswirkten, diese durch Abil EM 90® aber negativ beeinflusst wurde.

2. Faktorenversuchsplan:

Wegen der allergenen Wirkung, die den PHB-Estern zugesprochen wird ("Paragruppenallergie") [108], wurden diese in einer zweiten Versuchsreihe durch 15 % Propylenglycol als antimikrobieller Zusatz und Cosolvens für DEET ersetzt. Außerdem wurde geprüft, wie sich eine Vereinfachung der Emulgatormischung und konsistenzgebenden Bestandteile durch Reduzierung auf 2,0 % Glycerolmonostearat und 1 % POE-30-stearat auf die Stabilität auswirkte. Da sich ein niedriger Silikonölanteil positiv auf die Haltbarkeit ausgewirkt hatte, wurde untersucht, welchen Einfluss ein vollständiger Verzicht haben könnte. Die Polyacrylat-Anteile wurden gegenüber dem vorherigen Versuchsplan nicht geändert. Tabelle 3-8 zeigt die Ergebnisse.

Der Mittelwert (T/8) gegenüber der 1. Serie hatte sich um das 1,6-fache verbessert. Anstelle von einer Rezeptur waren insgesamt zwei Rezepturen über den gesamten Zeitraum stabil.

Die Zubereitungen mit den Faktoren A auf hohem Niveau (Carbopol ETD 2020® 3,0 %) sowie A und C (Carbopol ETD 2020® 3,0 % und Stearinsäure 6,0%, Cetylpalmitat 3,0%, Cetylalkohol 2,0%, Glycerolmonostearat 2,0%, POE-30-Glycerolmonostearat 1,0%) auf hohem Niveau waren 212 Tage haltbar, gefolgt von der Zubereitung mit Faktor B (Abil EM 90® 1,0 %) auf hohem Niveau.

Experimenteller Teil

Die Emulgatormischung aus Stearinsäure 6,0%, Cetylpalmitat 3,0%, Cetylalkohol 2,0%, Glycerolmonostearat 2,0 % und POE-30-Glycerolmono-stearat 1,0% (Faktor C auf oberem Niveau) hatte den größten negativen Einfluß auf die Haltbarkeit der Cremes. Dies erkennt man an der Summe der sechsten Spalte mit dem Wert -406 (Effekt = -101,5).

Die Summe der vierten Spalte ist 284 (Effekt = 71,0), was bedeutet, dass die Haltbarkeit positiv beeinflusst wurde durch Carbopol ETD 2020®, die reduzierte Emulgatormischung aus Glycerolmonostearat 2,0 % und POE-30-stearat 1,0 % sowie das Weglassen von Silikonöl (Effekt von Faktor B auf hohem Niveau = -43,0). Faktor A auf hohem Niveau hatte den zweitgrößten Effekt auf die Stabilität (Effekt = 71,0).

Die Wechselwirkung zwischen den Faktoren A und C hatte ebenfalls einen hohen Wert. Da dieser positiv ist, kann dies nur niedriges Niveau für beide Faktoren bedeuten, denn der negative Effekt von C (-101,5) war vom Betrag 1,4 mal größer als der Effekt von A (71,0). Dies bedeutet, dass Stearinsäure 6,0%, Cetylpalmitat 3,0% und Cetylalkohol 2,0% die Stabilität am stärksten negativ beeinflussten. Dieser negative Einfluss konnte aber durch Carbopol ETD 2020® kompensiert werden (vgl. Haltbarkeit von Rezeptur 2.14 = 212 Tage, Faktoren A und C auf oberem Niveau)).

Daraus folgt, dass sich die auf Glycerolmonostearat 2,0% und POE-30-stearat 1,0 % reduzierte Emulgatormischung positiv auf die Zubereitungen auswirkte und für die Stabilität die größte Bedeutung hatte. Carbopol ETD 2020® 3,0 % trug ebenfalls zur Stabilisierung der Rezepturen bei sowie der Verzicht auf Silikonöl.

Experimenteller Teil

Versuch (Rezeptur)	Ergebnis [Tage]	T	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
(-1) (2.1)	63	+	-	-	-	+	+	+	-
a (2.2)	212	+	+	-	-	-	-	+	+
b (2.3)	63	+	-	+	-	-	+	-	+
c (2.4)	7	+	-	-	+	+	-	-	+
ab (2.5)	7	+	+	+	-	+	-	-	-
ac (2.6)	63	+	+	-	+	-	+	-	-
bc (2.7)	7	+	-	+	+	-	-	+	-
abc (2.8)	189	+	+	+	+	+	+	+	+
		T=	A=	B=	C=	AB=	AC=	BC=	ABC=
Summe:		611	331	-79	-79	-16	145	331	331
Effekt:		76,4	82,8	-19,8	-19,8	-4,0	36,3	82,8	82,8

Tabelle 3-7: Faktorenversuchsplan der Rezepturen 2.1 bis 2.8, Zielgröße: Physikalische Stabilität

Versuch (Rezeptur)	Ergebnis [Tage]	T	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
(-1) (2.9)	147	+	-	-	-	+	+	+	-
a (2.10)	212	+	+	-	-	-	-	+	+
b (2.11)	189	+	-	+	-	-	+	-	+
c (2.12)	7	+	-	-	+	+	-	-	+
ab (2.13)	147	+	+	+	-	+	-	-	-
ac (2.14)	212	+	+	-	+	-	+	-	-
bc (2.15)	7	+	-	+	+	-	-	+	-
abc (2.16)	63	+	+	+	+	+	+	+	+
		T/8=	A=	B=	C=	AB=	AC=	BC=	ABC=
Summe:		984	284	-172	-406	-44	238	-126	-42
Effekt:		123,0	71,0	-43,0	-101,5	-11,0	59,5	-31,5	-10,5

Tabelle 3-8: Faktorenversuchsplan der Rezepturen 2.9 bis 2.16, Zielgröße: Physikalische Stabilität

Dritte Generation

Die mittlere Haltbarkeit (T/8) nimmt gegenüber der 1. Serie / Versuchsplanung 2. Generation um das 2,1-fache und gegenüber der 2. Serie / Versuchsplanung 2. Generation um das 1,3-fache zu.

Es zeigte sich, dass sich die Verwendung von Pemulen TR 1 NF® und Pemulen TR 2 NF® positiv auf die Ergebnisse auswirkte.

1. Faktorenversuchsplan:

Die Rezepturen 3.1, 3.3, 3.7 und 3.8 blieben während des Untersuchungszeitraums stabil.

Faktor B auf hohem Niveau sowie die Wechselwirkung zwischen den Faktoren B und C erzielten mit 74,5 den größten Effekt. Dies bedeutet, dass sich Abil EM 90® 2,0 % sowie die Kombination von Abil EM 90® 1,0 % mit der Konservierungsmittelmischung aus PHB-Estern 0,6 % und Benzylalkohol 1,0 % stabilisierend auf die Zubereitungen auswirkten.

Wie zuvor waren Zubereitungen, die durch Propylenglycol 15 % gegen mikrobiellen Befall geschützt waren, im Mittel weniger haltbar als solche, die mit Benzylalkohol und PHB-Estern konserviert worden waren (Effekt von Faktor C auf niedrigem Niveau = -42). Dieser negative Effekt wurde aber durch die positive Wechselwirkung der Faktoren "Erhöhung des Silikonölzusatzes" und "Übergang von konventionellen Konservierungsmitteln zu Propylenglycol" weit überkompensiert.

Pemulen TR 1 NF® 3 % war bei diesen Formulierungen Pemulen TR 2 NF® 3 % vorzuziehen. (Tabelle 3-9).

2. Faktorenversuchsplan:

In der zweiten Serie wurden die quantitativen und qualitativen Einflussgrößen analog zur 2. Serie / 2. Generation variiert. In Tabelle 3-10 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die mittlere Haltbarkeit (T/8) hatte sich im Vergleich zur 1. Serie / 3. Generation kaum verbessert (ca. 9 %).

Die Rezepturen 3.10, 3.12, 3.15 und 3.16 blieben während der 212 Tage stabil. Die Spaltensummen zeigen, dass die Faktoren A (Pemulen TR 2 NF®) und C (Emulgatormischung aus Stearinsäure 6,0%, Cetylpalmitat 3,0%, Cetylalkohol 2,0%, Glycerolmonostearat 2,0 und POE-30-Glycerolmono-stearat 1,0%) die Versuchsergebnisse am stärksten positiv beeinflussten.

Auch die Wechselwirkung beider Faktoren war groß. Da die Spaltensumme ein negatives Vorzeichen hat, musste einer der Faktoren auf hohem Niveau, der andere auf niedrigem sein, um das Ergebnis entsprechend zu beeinflussen. Das Experiment zeigt, dass die Kombination von 3 % Pemulen Tr 2 NF® und der vereinfachten Emulgatormischung aus Glycerolmonostearat 2,0 % und POE-30-stearat 1,0 % (Rezeptur 3.10) die Stabilität positiv beeinflussten (Haltbarkeit = 212 Tage), wogegen die Rezeptur 3.14 mit Pemulen Tr 2 NF® und der Emulgatormischung aus Stearinsäure 6,0%, Cetylpalmitat 3,0%, Cetylalkohol 2,0%, Glycerolmonostearat 2,0 und POE-30-Glycerolmono-stearat 1,0% nur 189 Tage haltbar war.

Abil EM 90® erhöhte ebenfalls die Stabilität, wobei sich die Kombination mit der Emulgatormischung aus Stearinsäure 6,0%, Cetylpalmitat 3,0%, Cetylalkohol 2,0%, Glycerolmonostearat 2,0 und POE-30-Glycerolmonostearat 1,0% besser eignete als die Kombination mit der vereinfachten Emulgatormischung. Diese wiederum beeinflusste die Stabilität positiv, wenn auf Silikonöl verzichtet wurde.

Experimenteller Teil

Versuch (Rezeptur)	Ergebnis [Tage]	T	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
-1 (3.1)	212	+	-	-	-	+	+	+	-
a (3.2)	147	+	+	-	-	-	-	+	+
b (3.3)	212	+	-	+	-	-	+	-	+
c (3.4)	63	+	-	-	+	+	-	-	+
ab (3.5)	147	+	+	+	-	+	-	-	-
ac (3.6)	63	+	+	-	+	-	+	-	-
bc (3.7)	212	+	-	+	+	-	-	+	-
abc (3.8)	212	+	+	+	+	+	+	+	+
		T/8 =	A =	B =	C =	AB =	AC =	BC =	ABC =
Summe:		1268	-130	298	-168	63	130	298	0
Effekt:		158,5	-32,5	74,5	-42,0	15,8	32,5	74,5	0,0

Tabelle 3-9: Faktorenversuchsplan der Rezepturen 3.1 bis 3.8, Zielgröße: Physikalische Stabilität

Versuch (Rezeptur)	Ergebnis [Tage]	T	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
-1 (3.9)	7	+	-	-	-	+	+	+	-
a (3.10)	212	+	+	-	-	-	-	+	+
b (3.11)	147	+	-	+	-	-	+	-	+
c (3.12)	212	+	-	-	+	+	-	-	+
ab (3.13)	189	+	+	+	-	+	-	-	-
ac (3.14)	189	+	+	-	+	-	+	-	-
bc (3.15)	212	+	-	+	+	-	-	+	-
abc (3.16)	212	+	+	+	+	+	+	+	+
		T/8 =	A =	B =	C =	AB =	AC =	BC =	ABC =
Summe:		1380	224	140	270	49	-270	-94	186
Effekt:		172,5	56,0	35,0	67,5	12,3	-67,5	-23,5	46,5

Tabelle 3-10: Faktorenversuchsplan der Rezepturen 3.9 bis 3.16, Zielgröße: Physikalische Stabilität

3.2. Abwaschtest

Die Haftfestigkeit von DEET-haltigen Formulierungen auf der Haut wurde mit Hilfe eines in-vitro-Tests unter konstanten Bedingungen bestimmt.

3.2.1. Geräte und Materialien

- In Lauge gebrühte Schweinehaut aus dem Kopf- und Halsbereich stammte vom Schlachthof in Brühl.
- Diethyltoluamid (DEET), Fa. Merck, Darmstadt (Ch.-B. S18019742)
- Die Herstellung von Repellent-Formulierungen verschiedener Generationen und deren Zusammensetzung wurde in Kapitel 3.1.2 näher beschrieben.
- Insektenschutzmittel der Bundeswehr (Zusammensetzung siehe Anhang)
- Insektenschutzmittel der US-Army (Zusammensetzung nicht bekannt)
- Das Handelspräparat Vivisun® (Zusammensetzung siehe Anhang)
- Zur Herstellung der Acetonitril-Wasser-Mischungen und der Elutionsmittel wurde Acetonitril zur HPLC (Fa. J.T. Baker) und einfach destilliertes, entgastes Wasser verwendet.
- Die Tests wurden in einem Klimaschrank (Fa. Weiss, Typ SB11/160/40) durchgeführt. An der Klimaschranktür waren zwei Eingriffsöffnungen mit Isolatorhandschuhen angebracht worden, so dass im Innenraum gearbeitet werden konnte, ohne die Tür zu öffnen. Durch die Isolortechnik wurden die Bedingungen im Inneren konstant gehalten.

Quantitative Bestimmung von DEET durch HPLC im Waschwasser:

Gerät:	HPLC Pumpe, Fa. Bischoff, Modell 2200
Trennsäule:	Nucleosil -100- C18 - 5µm
Elutionsmittel:	Acetonitril-Wasser (1:1)
Probensammler	Midas, Version 1.0, Modell 830

3.2.2. Methode

Durchführung

Ca. 80 mg Insektenschutzmittel wurden auf ein 10 cm² großes Stück gebrühte Schweinehaut gleichmäßig mit einem Metallspatel aufgetragen und die genaue Masse durch Differenzwägung bestimmt. Die Haut wurde auf ein Stativ im Winkel von 45° aufgespannt und in einem Klimaschrank bei 35 °C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit mit 0,9 %iger Kochsalzlösung besprüht. Dadurch sollten Abwaschverhalten und Schweiß imitiert werden. Eine Stunde lang wurden alle 5 min. 2 Sprühstöße mit einem durchschnittlichen Sprühvolumen von ca. 0,15 ml pro Sprühstoß aufgebracht. Die abtropfende Flüssigkeit wurde in einer Petrischale aufgefangen, 3 x mit 5 ml Isoopropanol und anschließend 3 x mit 5 ml einer Mischung von Acetonitril und Wasser (1:1) in einen 100 ml Messkolben überführt. Danach wurde mit Acetonitril-Wasser-Mischung (1:1) bis zu der Eichmarke aufgefüllt.

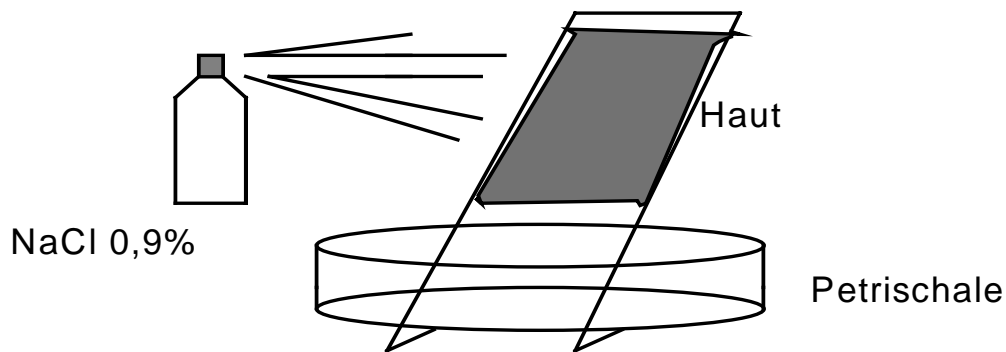


Abbildung 3-2: Versuchsaufbau Abwaschtest

Von jeder Verdünnung wurden nach Filtration durch einen Papierfilter 3 x 1 ml zur Gehaltsbestimmung in HPLC-Fläschchen gefüllt.

Referenzlösung:

Ca. 84 mg DEET, genau gewogen, wurden in Acetonitril-Wasser (1:1) zu 100,0 ml gelöst. Von dieser Lösung wurden 10,0 ml in einem Messkolben mit dem gleichen Lösungsmittel zu 100,0 ml verdünnt und ca. 1 ml dieser Verdünnung in HPLC-Vials abgefüllt. Dreimal bevor eine neue Rezeptur getestet wurde und einmal nach jeder

Experimenteller Teil

Probe wurde der Gehalt der Referenzlösung nach einer Prüfvorschrift der Bundeswehr bestimmt [109].

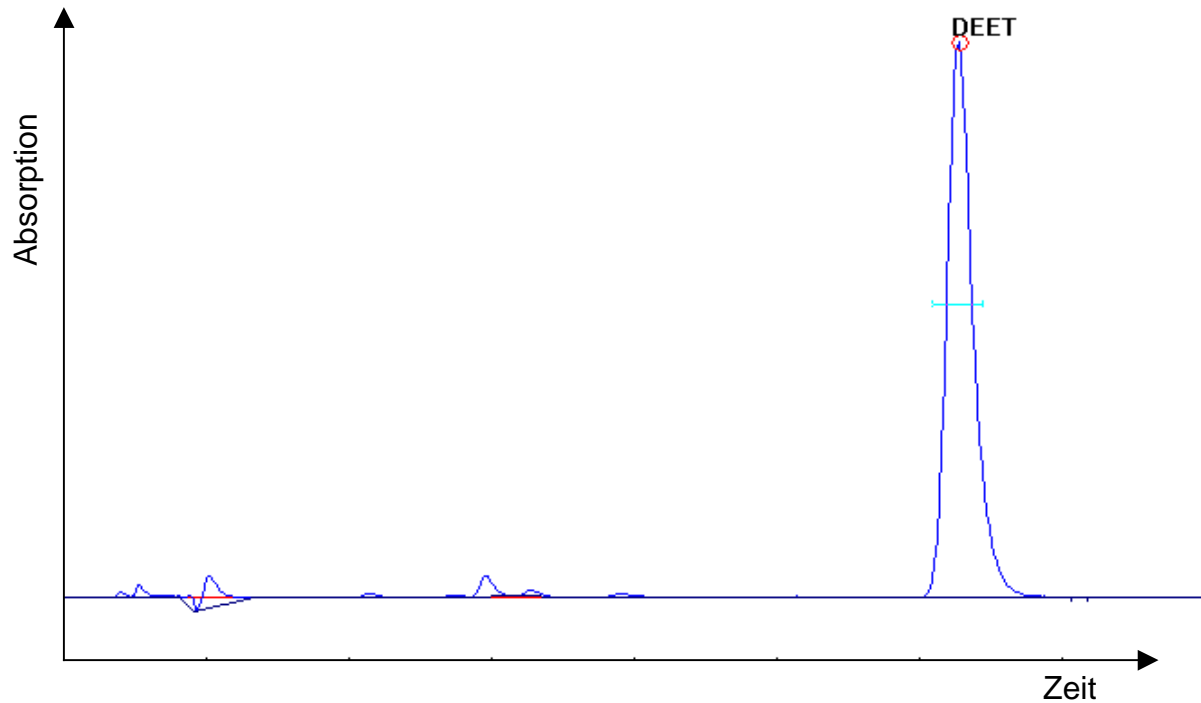


Abbildung 3-3: Beispielchromatogramm einer 30 %-igen DEET Zubereitung (Rezeptur 4.2) mit DEET-Peak zwischen 6,10 und 6,45 min, Peakfläche = 1097.262, Retentionszeit = 6,266 min

Experimenteller Teil

Chromatographische Bedingungen:

Mobile Phase:	Acetonitril-Wasser-Mischung (1:1), isokratisch
Fluss:	1,2 ml/min
Analysenzeit:	10 min
Einspritzvolumen:	20 µl
UV-Detektor:	Shimadzu SPD-6A UV Spectrophotometric Detector
Messwellenlänge:	230 nm
Integrationssoftware:	Peak Simple, Version 1.50, 1997
Minimale Peakfläche:	10000

Die Masse m_T des abgetropften DEET [mg] wurde wie folgt berechnet:

$$m_T = \frac{m_R \cdot Fl_T}{Fl_R \cdot 10}$$

Gleichung 3-3

Der Faktor 1/10 ist ein Verdünnungsfaktor, der sich aufgrund der unterschiedlichen Aufbereitung von Probe- und Referenzlösung ergab.

Der abgespülte Anteil F_T in % der aufgetragenen DEET-Menge ist dann:

$$F_T = \frac{m_T \cdot 100\%}{m_Z \cdot G_Z}$$

Gleichung 3-4

m_R :	Masse DEET (Einwaage) in der Referenzlösung [mg]
Fl_R :	Fläche unter dem DEET-Peak der Referenz
Fl_T :	Fläche unter dem DEET-Peak nach Injektion der Probe (verdünnte, abgetropfte Lösung)
m_Z :	Masse [mg] der auf die Haut aufgetragenen Zubereitung
G_Z :	DEET-Gehalt der Zubereitung in % (m/m)

Statistische Auswertung

Der Vergleich der durchschnittlich abgewaschenen DEET-Anteile mehrerer unabhängiger Stichproben wurde mittels H-Test nach Kruskal und Wallis ausgewertet [110, 111]. Es handelt sich hierbei um einen nicht-parametrischen statistischen Test, der anstelle einer einfachen Varianzanalyse durchgeführt werden kann, wenn die Voraussetzungen für letztere, nämlich Gleichheit der Varianzen und Normalverteilung der Messwerte, nicht vorliegen.

Den einzelnen Messwerten ($y_{i,j}$) von insgesamt k Stichproben bzw. Gruppen der Umfänge n_i wurde ein Rang ($R_{i,j}$) zugeordnet. Der kleinste Messwert wurde mit dem Rang 1, der darauf folgende mit dem Rang 2 usw. versehen. Gleiche Messwerte (engl. ties) bekamen einen gleichen mittleren Rang.

Die Ränge der Messwerte einer Stichprobe wurden addiert ($\sum_{j=1}^{n_i} R_{i,j} = R_i$) und die Summe anschließend quadriert (R_i^2).

Die Prüfgröße H wurde nach folgender Formel berechnet:

$$H = \frac{12}{n_{ges} \cdot (n_{ges} + 1)} \cdot \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - \frac{3}{n_{ges} + 1}, \text{ mit } n_{ges} = n_1 + n_2 + \dots + n_k$$

Gleichung 3-5

H ist die Varianz der Stichproben-Rangsummen (R_i^2). Wenn $n_i \geq 5$ und $k \geq 3$ ist, sind die H -Werte χ^2 verteilt. Für die Nullhypothese (H_0) gilt: Ist der berechnete Wert H kleiner als der auf dem 5 %-Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$) tabellierte χ^2 -Wert für $k-1$ Freiheitsgrade, unterscheiden sich die Messwerte der verschiedenen Gruppen nicht signifikant.

Um statistisch signifikante Unterschiede der Abwaschbarkeit einzelner Zubereitungen innerhalb einer Messreihe zu überprüfen, wurden paarweise Vergleiche der Mittelwerte mit Hilfe des auf dem Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben basierenden Rangtests von Mann und Whitney (U-Tests) durchgeführt [110, 112].

Da die Voraussetzung auf Normalverteilung für die Durchführung eines t-Tests nicht gegeben war, konnte der nicht-parametrische U-Test als verteilungsunabhängige Prüfung durchgeführt werden.

Experimenteller Teil

Die Nullhypothese (H_0) für den U-Test lautet: Die Mittelwerte zweier Stichproben A und B sind gleich ($H_0: \mu_A = \mu_B$). Für die Alternativhypothese gilt die einseitige Fragestellung, dass ein Mittelwert größer sei ($H_A: \mu_A > \mu_B$).

Zur Berechnung der Prüfgröße U wurden alle Stichprobenwerte ($m + n$) aufsteigend sortiert. Jedem Wert wurde ein Rang zugeordnet, wobei gleich große Werte einen mittleren Rang bekamen. Anschließend wurden die Rangzahlen addiert, die auf die erste Stichprobe entfielen (R_1) sowie die Rangzahlen, die auf die zweite Stichprobe entfielen (R_2). Die Prüfgröße wurde wie folgt berechnet, dabei war der kleinere von zwei Werten (U_1 und U_2) die gesuchte Größe.

$$U_1 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R_1$$

Gleichung 3-6

$$U_2 = mn + \frac{n(n+1)}{2} - R_2$$

Gleichung 3-7

Die Rechnung wurde folgendermaßen überprüft:

$$U_1 + U_2 = m \cdot n$$

Gleichung 3-8

Die Nullhypothese (H_0) wurde verworfen, wenn der berechnete Wert ($U_{(ber)}$) kleiner oder gleich dem tabellierten Wert $U_{(m, n; \alpha)}$ war.

3.2.3. Haftfestigkeit

Erste Generation

Die Haftfestigkeit jeder Rezeptur der 1. Generation (Abbildung 3-4) wurde in sechs unabhängigen Versuchen geprüft.

Der Test nach Kruskal und Wallis zeigt, dass sich die Mittelwerte der acht Formulierungen auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ unterscheiden, mit $H = 29,93 > \chi_{(7; 0,05)} = 14,07$.

Experimenteller Teil

Die Mittelwerte von Formulierung 1.1 ($14,1 \pm 12,0$) und 1.7 ($1,3 \pm 2,0$), deren abgewaschener Anteil am niedrigsten war, wurden mittels U-Test verglichen. Dabei wurden folgende Werte berechnet: $U_{1,1} = 8$ und $U_{1,7} = 28$. Ein Unterschied lässt sich auf dem 5 %-Niveau mit $U_{(ber)} = 8 > U_{(6, 6; 0,05)} = 7$ nicht sichern. Auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,1$ mit $U_{(6, 6, 0,1)} = 9$ für die einseitige Alternative unterscheiden sich beide Rezepturen.

Die Carbomer- und Silikonöl-haltige Formulierung (1.7) besitzt demnach die längste Haftfestigkeit.

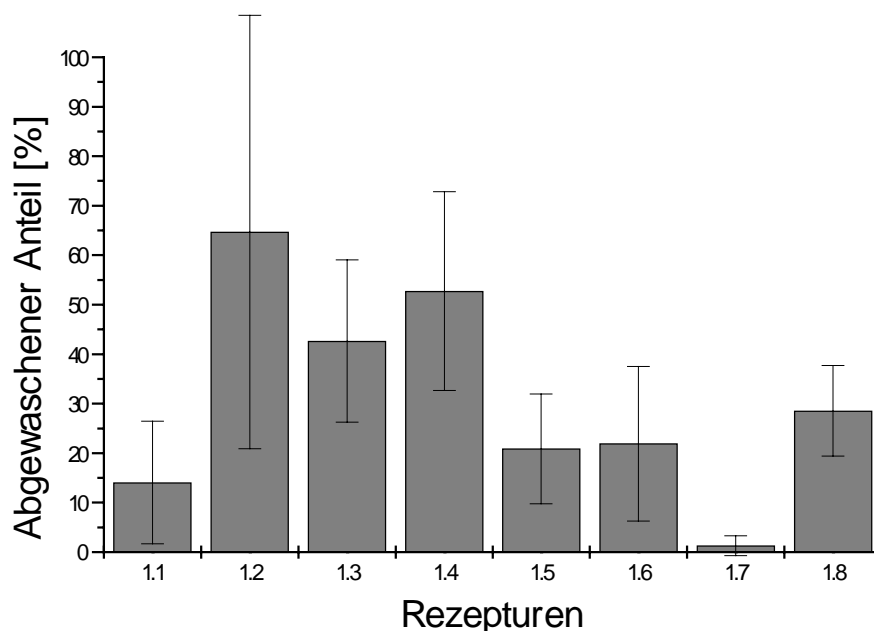


Abbildung 3-4: Ergebnisse der Abwaschtests der 1. Generation (Arithmetisches Mittel des abgewaschenen DEET-Anteils in % von der aufgetragenen DEET-Menge, Fehlerbalken = Standardabweichung, $n = 6$)

Zweite Generation

Wegen ungenügender physikalischer Stabilität der Rezepturen 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.12, 2.15 und 2.16 wurde nur die Haftfestigkeit der in Abbildung 3-5 dargestellten Zubereitungen getestet.

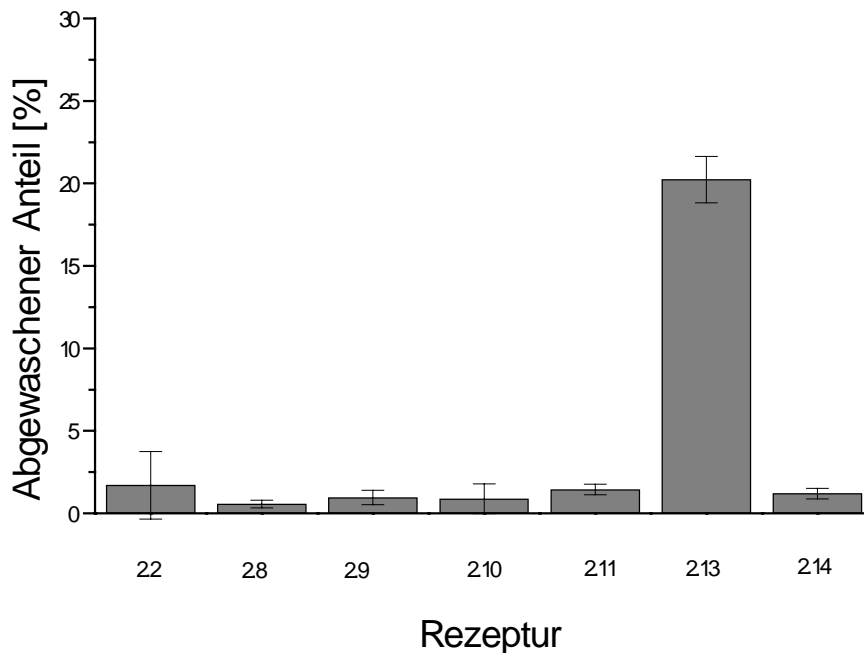


Abbildung 3-5: Ergebnisse der Abwaschtests der 2. Generation (Arithmetisches Mittel des abgewaschenen DEET-Anteils in % von der aufgetragenen DEET-Menge, Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 6)

Die Haftfestigkeit von Rezeptur 2.13 ist mit einem abgewaschen DEET-Anteil von 20,2 % ($\pm 1,4$) deutlich schlechter als bei den übrigen Rezepturen, deren abgewaschener Anteil zwischen 0,6 und 1,7 % lag. Für diese Rezepturen wurde der H-Test durchgeführt, der zeigte, dass sich die Mittelwerte der jeweils abgewaschenen DEET-Mengen auf dem 5 %-Niveau, mit $H = 9,44 < \chi_{(5; 0,05)} = 11,07$ nicht unterscheiden.

Die Haftfestigkeit der stabilen Zubereitungen konnte durch Polyacrylate und Cetyl-dimeticon-copolyol, mit Ausnahme von Rezeptur 2.13, gegenüber der 1. Generation deutlich verbessert werden. Innerhalb dieser Generation ließ sich das Abwaschverhalten durch Variation der Hilfsstoffmengen bei den sechs überlegenen Zubereitungen jedoch nicht deutlich verändern.

Dritte Generation

Von 16 Formulierungen der 3. Generation (Abbildung 3-6) wurden sieben Zubereitungen mit physikalischer Stabilität über 212 Tage hinsichtlich ihrer Haftfestigkeit untersucht. Rezeptur 3.1 zeigte zwar auch nach 212 Tagen keinen Austritt von Wasser- oder Öltröpfchen, wurde aber aufgrund schlechter Spreitung auf der Haut und

Experimenteller Teil

ihres inhomogenen Aussehens (Agglomeratbildung) nicht in die Untersuchung mit einbezogen. Die Auswertung mittels Kruskal und Wallis-Test zeigte, dass sich die Zubereitungen auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ mit $H = 23,43 > \chi_{(6; 0,05)} = 12,59$ unterschieden.

Die beiden Rezepturen mit der geringsten Abwaschbarkeit wurden mittels U-Test geprüft. Der mittlere abgewaschene Anteil von Rezeptur 3.7 war $0,3 \pm 0,2$, von 3.10 $0,7 \pm 0,8$. Daraus ergaben sich folgende U-Werte: $U_{3.7} = 19,5$ und $U_{3.10} = 16,5$. Ein signifikanter Unterschied auf dem Niveau $\alpha = 0,05$ bestand nicht. ($U_{(ber)} = 16,5 > U_{(6, 6; 0,05)} = 7$).

Rezeptur 3.7 und 3.10 waren aufgrund dieses Tests bezüglich ihres Abwaschverhaltens gleich gut.

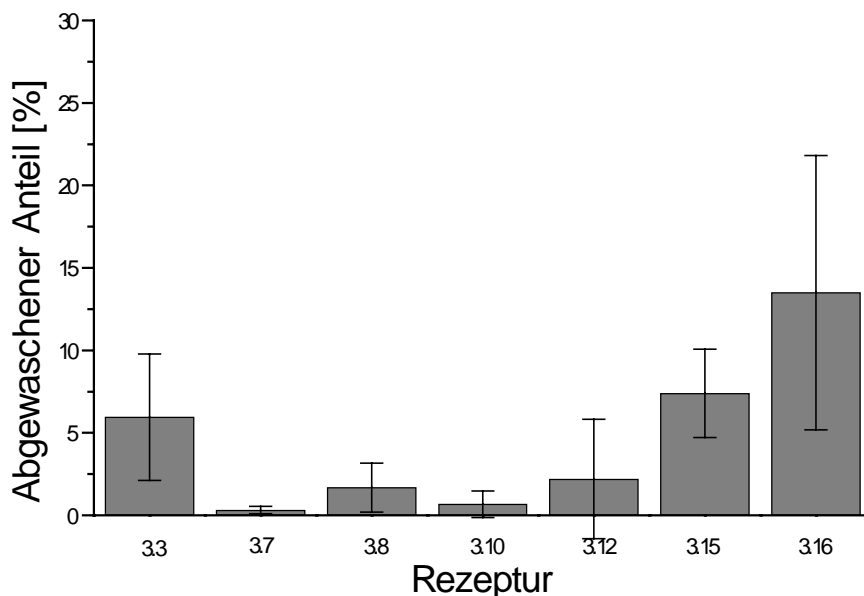


Abbildung 3-6: Ergebnisse der Abwaschtests der 3. Generation (Arithmetisches Mittel des abgewaschenen DEET-Anteils in % von der aufgetragenen DEET-Menge, Fehlerbalken = Standardabweichung, $n = 6$)

Vierte Generation

Bei der 4. Generation (Abbildung 3-7) konnte der abgewaschene Wirkstoffanteil unter 5,1 % gesenkt werden. Der Test nach Kruskal und Wallis ergab, dass auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ kein Unterschied zwischen den Rezepturen bestand ($H = 13,32 > \chi_{(9; 0,05)} = 16,92$). Der abgewaschene Anteil der Rezepturen 4.1, 4.2, 4.6, 4.8 und 4.9 lag unter 1,0 %, wobei der abgewaschene Wirkstoffanteil von Rezeptur 4.2 mit 0,37 % ($\pm 0,44\%$) am niedrigsten war.

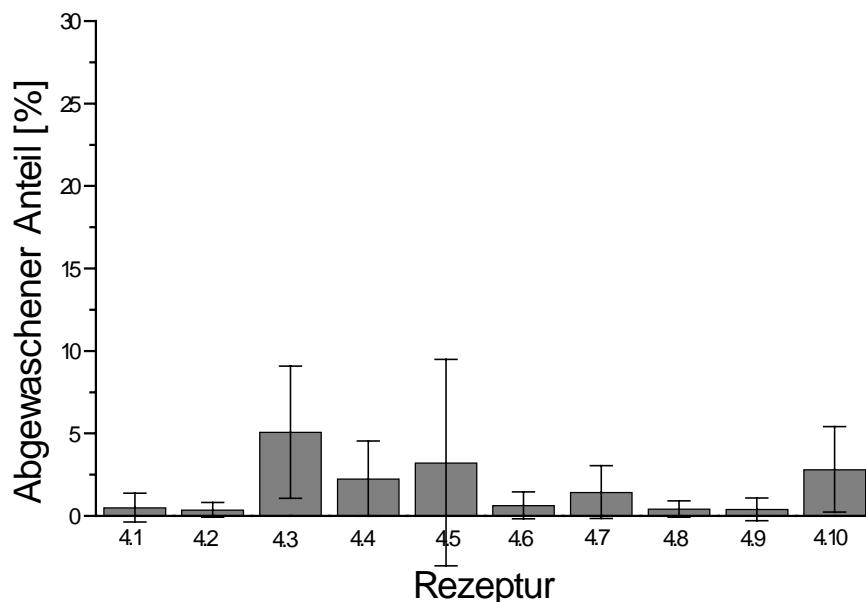


Abbildung 3-7: Ergebnisse der Abwaschtests der 4. Generation (Arithmetisches Mittel des abgewaschenen DEET-Anteils in % von der aufgetragenen DEET-Menge, Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 6)

Vergleich ausgewählter Rezepturen

Die Stichprobenumfänge einiger Rezepturen wurden aus Gründen der statistischen Sicherheit erhöht (Tabelle 3-11). Der Test nach Kruskal und Wallis zeigte, dass sich die Rezepturen auf dem 5 % Niveau statistisch signifikant unterscheiden, mit $H = 29,92 > \chi_{(6; 0,05)} = 12,59$. Die Formulierung der Bundeswehr und das Handelspräparat Vivisun® besaßen eine deutlich schlechtere Haftfestigkeit als die anderen Formulierungen.

Experimenteller Teil

rungen (Abbildung 3-8: Ergebnisse der Abwaschtests ausgewählter Formulierungen (Arithmetisches Mittel des abgewaschenen DEET-Anteils in % von der aufgetragenen DEET-Menge, Fehlerbalken = Standardabweichung, Stichprobenumfang der Zubereitungen 2.10, US-Army, Vivisun: n = 6, Stichprobenumfang der Zubereitungen 3.10, 4.2, BW:n = 12, Stichprobenumfang von Zubereitung 1.7: n = 24)).

Beim Vergleich der berechneten U-Werte (Tabelle 3-11) zeigte sich eine statistisch signifikante Überlegenheit von Rezeptur 4.2 gegenüber dem Insektenschutzmittel Bw und dem Repellent der US Army. Ein signifikanter Unterschied zu den Rezepturen 1.7, 2.10 und 3.10 ließ sich nicht erkennen.

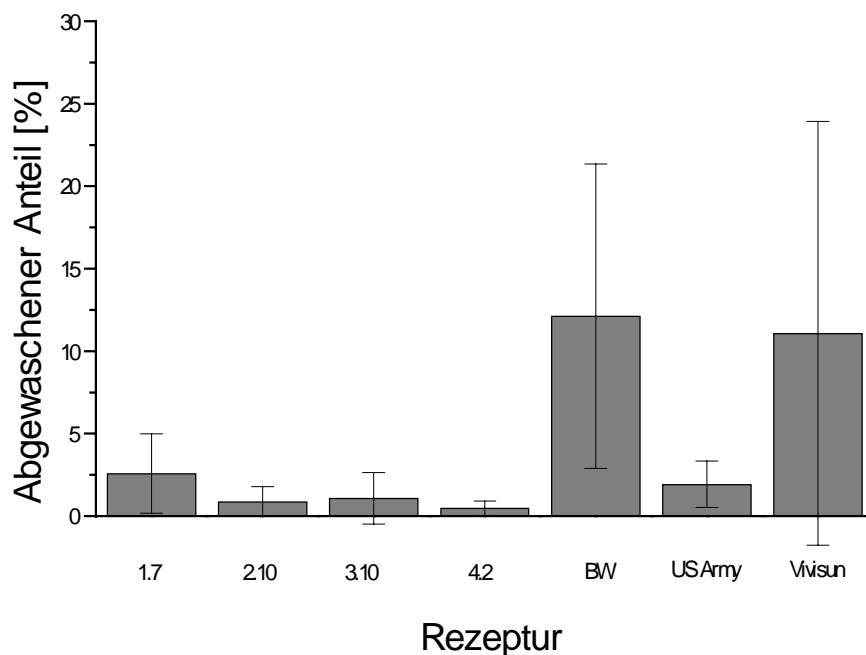


Abbildung 3-8: Ergebnisse der Abwaschtests ausgewählter Formulierungen (Arithmetisches Mittel des abgewaschenen DEET-Anteils in % von der aufgetragenen DEET-Menge, Fehlerbalken = Standardabweichung, Stichprobenumfang der Zubereitungen 2.10, US-Army, Vivisun: n = 6, Stichprobenumfang der Zubereitungen 3.10, 4.2, BW:n = 12, Stichprobenumfang von Zubereitung 1.7: n = 24)

Experimenteller Teil

Rezeptur	n	U _(tab)	U _(ber)
		$\alpha = 0,05$	
BW / 4.2	12 / 12	42	10,5 / 133,5
1.7 / 4.2	24 / 12	94	94,5 / 193,5
2.10 / 4.2	6 / 12	17	29,0 / 43,0
3.10 / 4.2	12 / 12	42	65,0 / 79,0
US Army / 4.2	6 / 12	17	3,0 / 69,0

Tabelle 3-11: Paarweiser Vergleich ausgewählter Rezepturen

Ersatz von Softisan 649®

Um zu überprüfen, ob Softisan 649® die Haftfestigkeit von Cremezubereitungen gegenüber Wollwachs erhöht, wurde es in Rezeptur 4.2 gegen Wollwachs ausgetauscht. Der Abwaschtest zeigte, dass sich die Haftfestigkeit verschlechterte. Der abgewaschene Anteil beträgt hier 12,8 % mit einer Standardabweichung von 14,5 % (n = 6).

3.3. Ausgewählte Rezepturen für In-vitro- und Humanversuche

Die Rezepturen der verschiedenen Generationen wurden aufgrund unterschiedlicher Kriterien ausgewählt. Oberste Priorität hatte dabei die gute Haftfestigkeit der jeweiligen Zubereitung auf der Haut, gefolgt von guter Lagerstabilität über 7 Monate. Wichtig für die Beurteilung waren auch die Ergebnisse der Bewegungsanalyse (vgl. Kapitel "Bewegungsmesskammer"), als Hinweis für die Wirkung der Substanzen sowie eine möglichst langsame Freisetzung des Wirkstoffs aus der Salbengrundlage in ein wässriges Akzeptormedium. Für die Praxis wurde aus jeder Generation jeweils eine Rezeptur ausgewählt. In einer Probandenstudie sollten die Rezepturen 1.7, 3.10, und 4.2 auf ihre Wirkdauer gegen das Insektenschutzmittel Bw getestet werden.

3.4. Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsprüfungen wurden 27 Wochen lang unter kontrollierten Lagerbedingungen durchgeführt.

3.4.1. Materialien

- Für die Stabilitätsprüfungen wurden die Rezepturen 3.10 und 4.2 in einem Stephan Universalmischer UM12 Nr.: 458930 bei maximaler Drehzahl hergestellt.
- Die Zubereitungen wurden in drei unterschiedlichen Tubentypen eingelagert:
 - a) in Aluminiumtuben mit einem Innenschutzlack aus Epoxyphenolharz,
 - b) in Coextrudat-Tuben, die aus drei Schichten bestanden, von außen nach innen: LDPE (Polyethylen niedriger Dichte = Hochdruckpolyethylen) - Haftvermittler (Bynel®) - EVOH (Ethylenvinylalkohol) - Haftvermittler (Bynel®) - LDPE und
 - c) in Tuben aus LDPE.
- Die Muster wurden unter kontrollierten Bedingungen in einem Klimaschrank (Weiss, Typ SB11/160/40), einem Trockenschrank (WTB Binder, Typ 3305309900310) und einem Kühlschrank (Kirsch, Bosch Kältemaschine) eingelagert.

3.4.2. Methode

Der Gehalt der beiden Rezepturen wurde zu Versuchsbeginn mittels HPLC (Bestimmungsmethode vgl. 3.2.2) bestimmt und die Lagerstabilität jeweils unter zwei unterschiedlichen Bedingungen untersucht, zum einen bei 35°C und 80 % rF, zum anderen bei 35°C und 4°C im Wechsel. Der Wechsel erfolgte jeweils freitags von 35°C auf 4°C und am folgenden Montag wieder auf 35°C. Von jeder Probe wurden für jeweils eine Tubenart vier Muster eingelagert. Drei Muster, von denen wöchentlich die Masse bestimmt wurde, blieben während des gesamten Zeitraums der Prüfung verschlossen und wurden erst am Versuchsende für eine erneute Gehaltsbestimmung geöffnet. Ein Muster wurde wöchentlich visuell auf homogenes Aussehen untersucht.

Statistische Auswertung

Der Vergleich der durchschnittlichen Wirkstoffgehalte mehrerer Stichproben wurde mittels einfacher Varianzanalyse ausgewertet [110, 112]. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten mit unbekannter aber

Experimenteller Teil

gleicher Varianz stammen. Die Nullhypothese (H_0): $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k = \mu$ wird abgelehnt, wenn $F_{(ber)} > F_{(k-1;n-k;\alpha)}$ ist. In diesem Fall unterscheiden sich mindestens zwei Mittelwerte voneinander, und somit wird die Alternativhypothese (H_A): $\mu_i \neq \mu$ angenommen.

Man geht bei der Einweg-Varianzanalyse von folgendem linearen Modell aus:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + \varepsilon_{ij}$$

Gleichung 3-9

Y_{ij} ist der j-te Messwert der i-ten Gruppe, der sich ergibt aus dem Gesamtmittel μ der Grundgesamtheit, der Abweichung des Mittelwertes der i-ten Gruppe vom Gesamtmittel β_i (Stichprobenstreuung) und einem Zufallsfehler ε_{ij} (Versuchsstreuung).

Die Testgröße $F_{(ber)}$ ergibt sich aus dem Quotienten der mittleren Abweichungsquadrate zwischen den Stichproben (Stichprobenstreuung) und innerhalb der Stichproben (Versuchsstreuung). Sie wird nach Gleichung 3-10 berechnet.

$$F_{(ber)} = \frac{\frac{1}{k-1} \left[\sum n_i (\bar{x}_i - \bar{x}) \right]}{\frac{1}{n-k} \sum_{i,j} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}$$

Gleichung 3-10

Um statistisch signifikante Unterschiede der Gehalte zwischen jeweils einer eingelagerten und der frischen Zubereitung zu überprüfen, wurden paarweise Vergleiche der Mittelwerte mit Hilfe des t-Tests [112] durchgeführt.

Zunächst wurde mit einem F-Test auf Homogenität der Varianzen geprüft, um die Testverfahren für entsprechende Fälle anzupassen. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten stammen. Die Nullhypothese (H_0): $\sigma_1 = \sigma_2$ wird zugunsten der Alternativhypothese (H_A): $\sigma_1 \neq \sigma_2$ abgelehnt, wenn $F_{(ber)} > F_{(n1-1;n2-1;\alpha)}$ ist.

Experimenteller Teil

Die Testgröße berechnet sich wie folgt:

$$F_{(ber)} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Gleichung 3-11

Die Testgrößen für den t-Test wurden nach den folgenden Gleichungen berechnet:

1. Fall: $\sigma_1 = \sigma_2$ und $n_1 = n_2 = n$

$$t_{(ber)} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n}}}, \text{ mit } FG = 2n - 2$$

Gleichung 3-12

2. Fall: $\sigma_1 \neq \sigma_2$ und $n_1 = n_2 = n$

$$t_{(ber)} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n}}}, \text{ mit } FG = n - 1 + \frac{2n - 2}{\frac{s_1^2}{s_2^2} + \frac{s_2^2}{s_1^2}}$$

Gleichung 3-13

3.4.3. Ergebnisse

Bereits vor Ablauf der Lagerfrist traten bei Rezeptur 3.10 unter beiden Lagerungsbedingungen Flüssigkeitströpfchen von mehr als 1 mm Durchmesser aus. Aufgrund der offensichtlichen Phasentrennung wurde auf eine Gehaltsbestimmung verzichtet.

Im Gegensatz dazu war das Aussehen von Rezeptur 4.2 nach Beendigung der Lagerfrist homogen. Die frische Zubereitung hatte, bevor sie eingelagert wurde, einen Gehalt von 29,60 % DEET ($\pm 0,95$, $n = 3$). In Tabelle 3-12 ist jeweils der mittlere Gehalt der Rezeptur nach sechsmonatiger Lagerung sowie die Standardabweichung von drei Messungen dargestellt. Die Abkürzungen vor dem Bindestrich kennzeichnen

Experimenteller Teil

das Verpackungsmaterial, die Buchstaben nach dem Bindestrich die Lagerungsbedingung. "Alu" steht für Aluminium-Tuben mit einer Innenschutzlackierung, "Coex" für Polyethylen-Coextrudat-Tuben, die aus drei Schichten Hochdruck-Polyethylen mit einem Haftvermittler zwischen den Schichten bestehen, und "PE" für einfache Tuben aus Hochdruck-Polyethylen. Das nachgestellte "K" bedeutet Lagerung bei 35°C und 80 % rF und "S" Lagerung für jeweils fünf Tage bei 35°C im Wechsel mit jeweils zwei Tagen bei 4°C (Schaukeltest).

Lagerbedingung	Alu-K	Coex-K	PE-K	Alu-S	Coex-S	PE-S
Gehalt [%]	30,82	31,26	30,53	30,44	31,21	29,89
Std.abw.	0,31	0,42	0,34	0,22	0,34	0,54
Anteil des deklarierten Gehalts [%]	102,73	104,21	101,76	101,46	104,03	99,61

Tabelle 3-12: Mittlerer DEET-Gehalt von Rezeptur 4.2 nach sechsmonatiger Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen (n = 3)

Nach Durchführung einer Varianzanalyse wurde die Nullhypothese (H_0), der mittlere Gehalt unterscheide sich nach Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen nicht, mit $F_{(ber)} = 4,57 > F_{(6; 14; 0,05)} = 2,85$ abgelehnt. Der paarweise Vergleich mittels t-Test zeigte, dass die Nullhypothese (H_0) für Gleichheit der Mittelwerte für drei Lagerungsbedingungen abgelehnt werden musste. Der mittlere Gehalt der Rezeptur 4.2 nach sechsmonatiger Lagerung bei 35°C und 80 % rF in Aluminium-Tuben und Tuben aus Coextrudat sowie Lagerung im Schaukelverfahren in Tuben aus Coextrudat unterschied sich auf dem 5 %-Niveau signifikant vom Gehalt der frischen Zubereitung (Tabelle 3-13). Vor Durchführung des t-Tests, wurde auf Gleichheit der Varianzen geprüft, um die entsprechende Rechentechnik auszuwählen.

Experimenteller Teil

Lager- bedingung	n (FG = n-1)	F _(tab) $\alpha = 0,05$	F _(ber)	FG (be- rechnet für den T- Test)	t _(tab) $\alpha = 0,05$	t _(ber)
Alu-K	3	19,00	9,46	4	2,056	2,12
Coex-K	3	19,00	5,18	4	2,056	2,79
PE-K	3	19,00	7,94	4	2,056	1,60
Alu-S	3	19,00	19,46	2	2,447	1,50
Coex-S	3	19,00	7,86	4	2,056	2,78
PE-S	3	19,00	3,10	4	2,056	0,46

Tabelle 3-13: Paarweiser Vergleich der eingelagerten Rezepturen mit der frisch angefertigten bzgl. des mittleren Gehalts

Der deklarierte DEET-Gehalt des Insektenschutzmittels Bw ist 30,0 % und muss gemäß der Spezifikation [109] 95,0 bis 105,0 % der Deklaration betragen. Der Gehalt von Rezeptur 4.2 lag für alle Lagerbedingungen jeweils innerhalb des angegebenen Bereichs und somit auch in dem für die Lagerstabilität geforderten Intervall von 90 bis 110 % [113].

Während der Lagerung konnte eine Abnahme der Masse bei allen Lagerungsbedingungen beobachtet werden. Die Masse der Zubereitung während der Lagerzeit von 27 Wochen im Klimaschrank bei 35°C und 80 % rF nahm bei den Aluminium-Tuben um 0,13 % ($\pm 0,07$), bei den Coextrudat-Tuben um 0,80 % ($\pm 0,23$) und bei den Polyethylen-Tuben um 1,39 % ($\pm 0,16$) ab. Die Massenabnahme im Schaukeltest betrug bei den Aluminium-Tuben 0,22 % ($\pm 0,15$), bei den Coextrudat-Tuben 0,98 % ($\pm 0,01$) und bei den Polyethylen-Tuben 1,32 % ($\pm 0,21$). In Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10 ist die Abnahme der Massen während der Lagerzeit dargestellt.

Experimenteller Teil

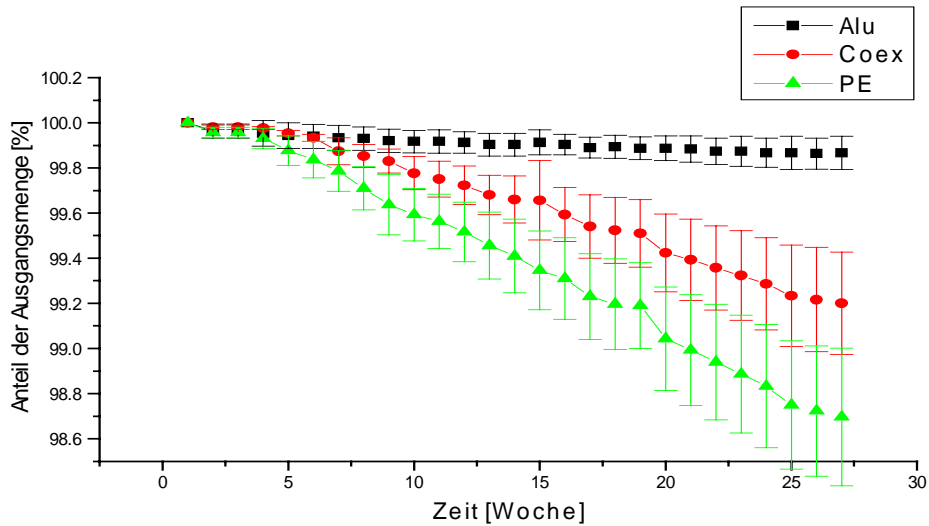


Abbildung 3-9: Anteil der Ausgangsmenge [%] über die Zeit nach Einlagerung bei 35°C und 80 rF, Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3

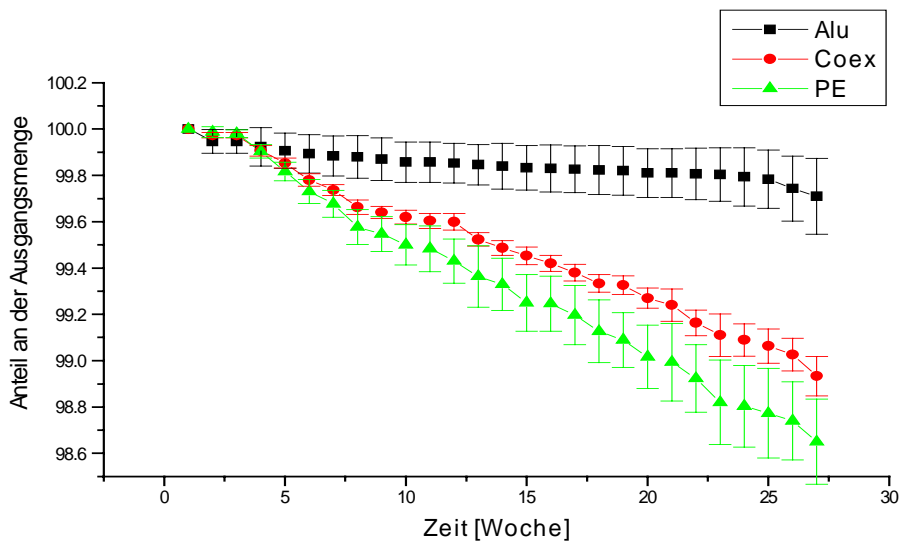


Abbildung 3-10: Anteil der Ausgangsmenge [%] über die Zeit nach Einlagerung bei 35°C und 4°C im Wechsel, Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3

Unter der Annahme, dass die Gewichtsabnahme einem linearen Trend folgte, wurde mittels linearer Regression die Zeit [Jahre] berechnet, nach der der Tubeninhalt noch 90 % betrug. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-14 dargestellt.

Experimenteller Teil

Lager- bedingung	Geraden- steigung	Achsen- abschnitt	Korrelati- onskoeffi- zient (R)	t [Jahre]
Alu-K	-0,004	100,0	0,967	44,4
Coex-K	-0,033	100,1	0,995	5,8
PE-K	-0,056	100,0	0,988	3,5
Alu-S	-0,008	100,0	0,955	25,3
Coex-S	-0,037	100,0	0,997	5,2
PE-S	-0,047	100,0	0,996	4,1

Tabelle 3-14

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Aluminiumtuben mit Innenschutzlackierung für die DEET Zubereitungen am besten geeignet waren. Da DEET, Propylenglycol und Wasser die höchste Flüchtigkeit und geringste Molekülgröße in den Zubereitungen hatten, kamen nur sie für eine Penetration durch das Tubenmaterial aus PE und Coextrudat in Frage.

3.5. Bestimmung der Phasenlage

Von den Rezepturen 1.7, 3.10 und 4.2 wurden verschiedene Tests zur Bestimmung der Phasenlage durchgeführt. Außerdem wurde mit dem Polarisationsmikroskop untersucht, ob sich die Zubereitungen abhängig von der Zusammensetzung, dem Herstellungsverfahren und von den Lagerbedingungen unterscheiden.

3.5.1. Geräte und Materialien

- Für den Färbetest wurden zwei Farbstofflösungen verwendet:
 - a) 2 % Methylenblau (Methylthioniumchlorid) in Wasser und
 - b) 2 % Sudanrot (1-(4-Phenylazophenylazo)-2-naphthol) in mittelkettigen Triglyceriden (Miglyol 812).
- Die Leitwerte wurden konduktometrisch mit einem Leitfähigkeitsmessgerät (LF 39 WTW, Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim, Nr.47AC17, Elektrodenabstand = 1 cm) bestimmt.
- Für die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Stereomikroskop, Fa. Leitz, DMRX mit Polarisator und λ -Platte verwendet. Die Bilder wurden mit einer Panasonic Digital Colour CCTV-Kamera, Modell WV-CP 410/G aufgenommen und mit der Image Pro Pplus 4.0 Software PC-gestützt verarbeitet. Zur Erstellung der Markierungsbalken diente eine Objektmikrometerskala.
- Die unter 3.3 aufgelisteten Zubereitungen wurden unter dem Mikroskop untersucht.

3.5.2. Methoden

Cremes vom O/W-Typ lassen sich mit wässriger Methylenblau-Lösung anfärben, Cremes vom W/O-Typ mit Sudanrot-Lösung. Auf einem Objektträger wurden jeweils zwei Tropfen Farbstofflösung und zwei Tropfen Probe (ca. 100mg) nebeneinander aufgetragen, so dass sich ihre Oberflächen berührten. Wenn die Substanzen nicht nach 15 min ineinander diffundierten, wurden sie mit einem Glasstab vermischt.

Experimenteller Teil

Die HLB-Werte der Emulgatormischungen wurden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$x + y + \dots + z = 1,$$

x, y, ...z = Anteile x bis z der jeweiligen Emulgatoren an der Emulgatormischung

Gleichung 3-14

$$x \cdot HLB(1) + y \cdot HLB(2) + \dots + z \cdot HLB(n) = HLB(ges),$$

HLB(1), ...HLB(n) = HLB-Werte der Komponenten 1 bis n,

HLB(ges) = HLB-Wert der Emulgatormischung

Gleichung 3-15: Mischungsformel

$$HLB = 20 \cdot \left(1 - \frac{M_0}{M} \right),$$

M_0 = Molekulargewicht des lipophilen Emulgatoranteils, M = Molekulargewicht des Emulgators

Gleichung 3-16: Berechnung des HLB-Wertes nach Griffin

Im Gegensatz zu W/O-Systemen leiten Cremes vom O/W-Typ und amphiphile Cremes den elektrischen Strom. Zur Feststellung der Phasenlage wurde deshalb der Leitwert der Zubereitungen als Mittelwert von drei Messungen bestimmt.

$$G = 1/R,$$

mit G = Leitwert [μS], R = elektrischer Widerstand [$\text{k}\Omega$]

$$\kappa = (1/R) \cdot (l/A),$$

mit κ [$\mu\text{S}/\text{cm}$], l = Länge des Leiters [cm], A = Querschnitt des Leiters [cm^2]

Gleichungen 3-17 und 3-18

Für die polarisationsmikroskopische Untersuchung wurde ein Tropfen Substanz mit einem Glasstab auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen ausgestrichen. Das Präparat wurde unter dem Polarisationsmikroskop betrachtet. Es wurde geprüft, inwiefern sich die inneren Strukturen der Präparate unterschieden und ob sie sich während der Lagerung verändert hatten.

3.5.3. Ergebnisse

Alle Rezepturen ließen sich mit Methylenblau-Lösung etwas besser anfärben als mit Sudanrot-Lösung, wobei die Methylenblau-Lösung erst nach 5 min den Rand des Salbentropfens benetzte. Nach drei Tagen wurde Rezeptur 3.10 von einem dünnen Film Sudanrot-Lösung überzogen. Durch Mischen mit einem Glasstab wurden alle drei Zubereitungen nach 5 s von den beiden Prüflösungen gefärbt.

Nachfolgend werden die berechneten HLB-Werte der Emulgatormischungen sowie lipophile und hydrophile Anteile der Zubereitungen aufgeführt. Propylenglycol wurde mit einem berechneten HLB-Wert von 9 keiner Phase zugeordnet.

Rezeptur	HLB-Wert	Hydrophiler Anteil [%]	Lipophiler Anteil [%]	Anteil Propylenglycol [%]	Leitwert [μS]
1.7	6	55	45	-	$3 \cdot 10^2$
3.10	8	53	32	15	$5 \cdot 10^2$
4.2	8	53	34	13	$4 \cdot 10^2$

Tabelle 3-15: Hydrophile / Lipophile Charakterisierung

Rezeptur 1.7 (Abbildung 3-11) hatte einen hohen Anteil anisotroper Strukturelemente, die im polarisationsmikroskopischen Bild als gelbe und blaue Bestandteile zu erkennen waren. Dabei traten polygonale Tröpfchen unterschiedlicher Größe auf. Die Inhomogenität äußerte sich in einer schlechten Streichfähigkeit beim Auftragen auf die Haut.

Auch bei Rezeptur 3.10 (Abbildung 3-12) waren kristalline Strukturen zu erkennen, aber keine Tröpfchen. Abbildung 3-13 zeigt die Aufnahme von Rezeptur 3.10, die in der Zahnkolloidmühle angefertigt wurde, mit polygonalen Strukturen bis etwa 13 μm Durchmesser, ohne Anisotropie. Die Strukturelemente unterschieden sich bei visueller Betrachtung kaum hinsichtlich Form und Größe. Sie erschienen im Bild als netzartiger Verbund.

Abbildung 3-14 zeigt eine Aufnahme von Rezeptur 4.2 nach manueller Herstellung, die eine für Cremes typische isotrope Struktur hatte [114]. Die Rezepturen 4.2 nach Herstellung im Stephan Mischer (Abbildung 3-15) und nach Herstellung in der Zahn-

Experimenteller Teil

kolloidmühle (Abbildung 3-16) zeigten keine anisotropen Strukturelemente und bestanden wie auch die zuvor beschriebenen Zubereitungen aus polygonalen Tröpfchen, die wie bei der in der Zahnkolloidmühle hergestellten Rezeptur 3.10, netzartig miteinander verknüpft waren. In Abbildung 3-17 und Abbildung 3-18 sind die Aufnahmen von Rezeptur 4.2 nach sechsmonatiger Einlagerung zu sehen. Nach der Einlagerung waren anisotrope Strukturelemente auskristallisierter Bestandteile zu erkennen [115].

Aus den vorliegenden Ergebnissen konnte eine Phasenlage nicht eindeutig bestimmt werden. Die Färbetests, die polarisationsmikroskopischen Aufnahmen (vor allem Abbildung 3-12, Abbildung 3-14, Abbildung 3-17, Abbildung 3-18), die HLB-Werte und das Verhältnis von hydrophilen und lipophilen Anteilen weisen darauf hin, dass Cremes mit amphiphilem Charakter vorliegen. Aufgrund der hohen Leitwerte konnte es sich nicht um W/O-Emulsionen handeln, deren Leitfähigkeit nahe $0 \mu\text{S}/\text{cm}$ ist. Die von Nürnberg et al. [115] ermittelten Leitfähigkeiten von W/O-Cremes lagen zwischen $0,2$ und $0,3 \mu\text{S}/\text{cm}$, von amphiphilen Cremes zwischen ca. 2 und $84 \mu\text{S}/\text{cm}$ und von O/W-Cremes zwischen ca. 84 und $130 \mu\text{S}/\text{cm}$. Die Zubereitungen enthielten keine Elektrolytzusätze. Die Leitwerte der Rezepturen 1.7, 3.10, und 4.2 lagen aber sehr hoch, was einerseits in dem hohen Elektrolytgehalt begründet war, andererseits darauf hindeutete, dass es sich hier um amphiphile Cremes oder O/W-Systeme handelte.

Das Insektenschutzmittel der US-Army (Abbildung 3-19) hatte die gleichen netzartigen Strukturen und eine ähnlich isotrope Struktur wie die Rezepturen 3.10 und 4.2, die in der Zahnkolloidmühle hergestellt worden waren. Sie färbte sich mit Methylenblau-Lösung und war somit eine Creme vom O/W-Typ.

Vivisun® Creme ließ sich ebenfalls mit Methylenblau-Lösung anfärben. Unter dem Mikroskop war die für Emulsionen charakteristische Struktur aus einer dispersen Phase mit runden Öltröpfchen unterschiedlicher Größe erkennbar (Abbildung 3-20). Anisotrope Strukturelemente konnten nicht gefunden werden.

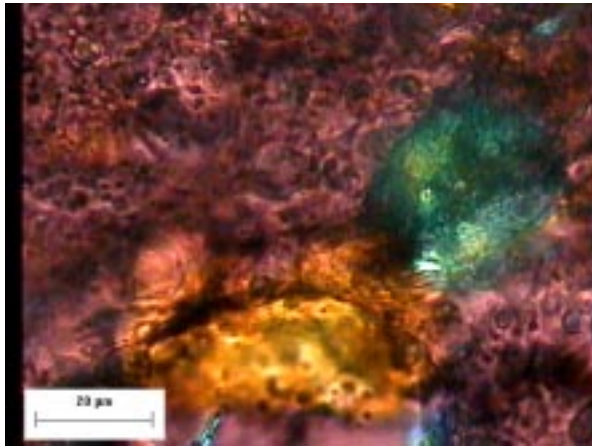


Abbildung 3-11: Rezeptur 1.7 (Herstellung im Stephan Mischer)

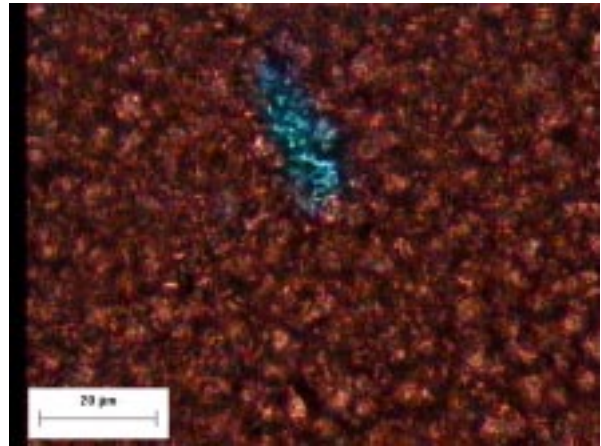


Abbildung 3-12: Rezeptur 3.10 (Herstellung im Stephan Mischer)

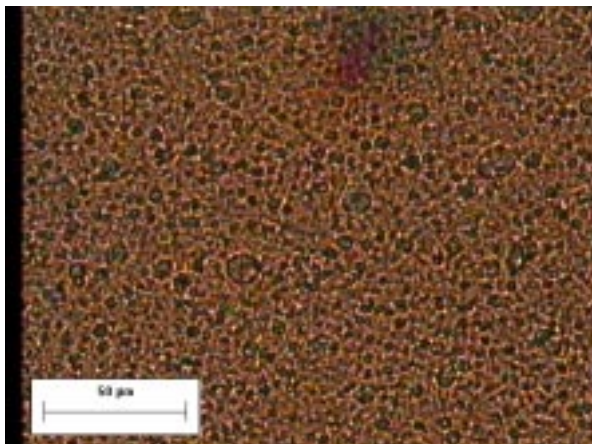


Abbildung 3-13: Rezeptur 3.10 Bw (Herstellung in der Zahnkolloidmühle)

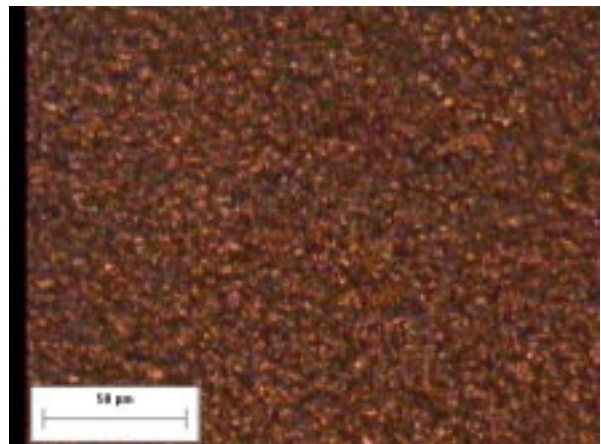


Abbildung 3-14: Rezeptur 4.2 (Herstellung in der Salbenschale)

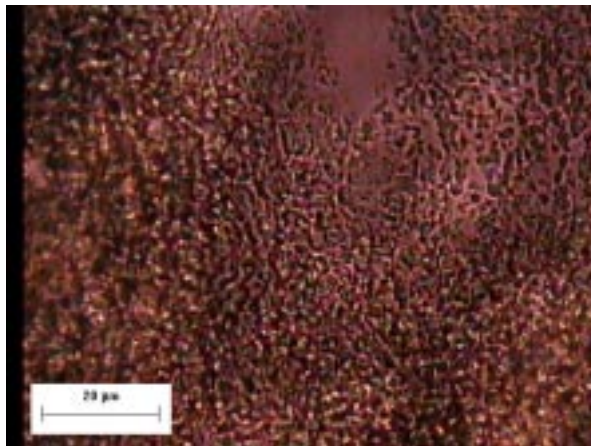


Abbildung 3-15: Rezeptur 4.2 (Herstellung im Stephan Mischer)

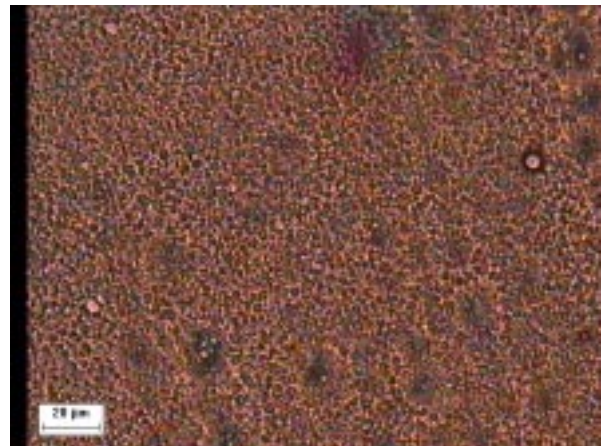


Abbildung 3-16: Rezeptur 4.2 Bw (Herstellung in der Zahnkolloidmühle)

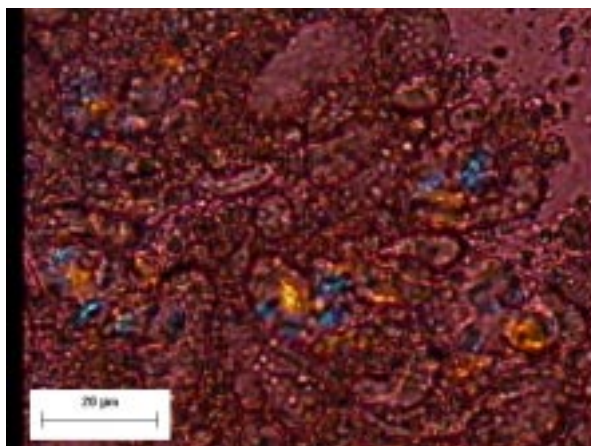


Abbildung 3-17: Rezeptur 4.2 nach sechsmonatiger Einlagerung bei 35°C und 80 % rF (Herstellung im Stephan Mischer)

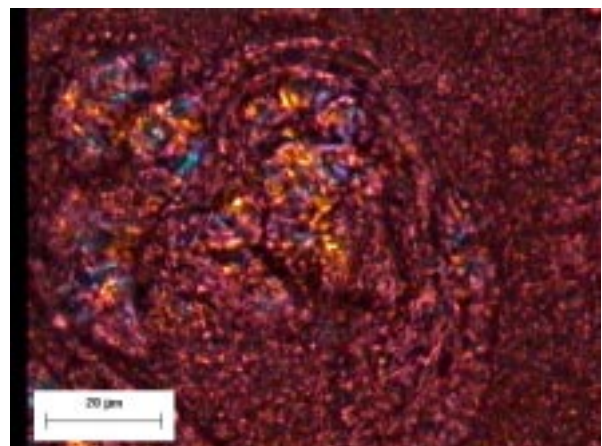


Abbildung 3-18: Rezeptur 4.2 nach sechsmonatiger Einlagerung bei 35°C und 80 % rF und 4°C im Wechsel (Herstellung im Stephan Mischer)

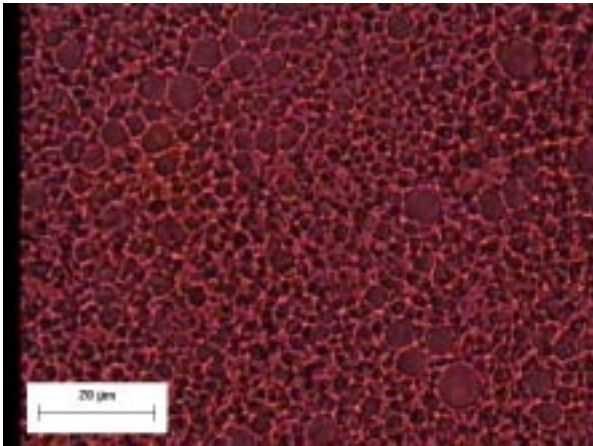


Abbildung 3-19: Insektenschutzmittel der US-Army

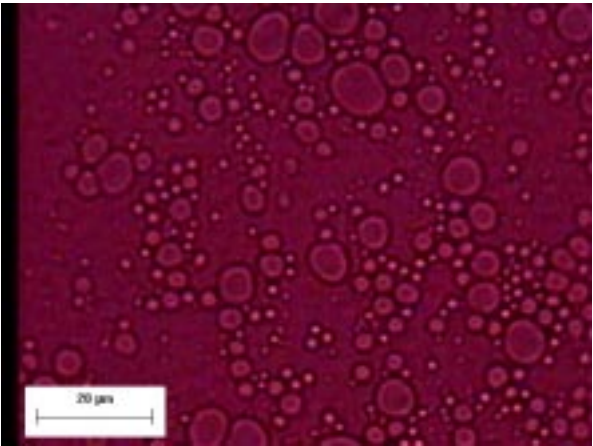


Abbildung 3-20: Vivisun® Creme

3.6. Viskositätsmessungen

Wegen möglicher Korrelation von Fließverhalten und Freisetzungsprofil wurde mit Hilfe von Viskositätsmessungen das Fließverhalten verschiedener Zubereitungen charakterisiert.

Nachfolgend werden einige wichtige Begriffe dazu erläutert:

Man unterscheidet das Fließverhalten von idealviskosen und strukturviskosen Substanzen. Unter Viskosität (η) versteht man die Zähigkeit von Substanzen. Idealviskosität oder Newtonsches Fließen bedeutet, dass die Zähigkeit einer Substanz mit zunehmender Scherkraft bzw. Schubspannung (τ) linear abnimmt und in gleichem Maß bei Verringerung der einwirkenden Scherkraft wieder zunimmt. Die Schubspannung und das Geschwindigkeitsgefälle (Schergefälle, Deformationsgeschwindigkeit) D , mit dem sich die einzelnen Schichten, aus denen sich eine Substanz zusammensetzt, gegeneinander verschieben, sind zueinander proportional.

Strukturviskosität ist abhängig vom inneren Aufbau der Substanzen, bei denen sich die Viskosität mit zunehmender Schubspannung verringert.

Substanzen mit plastischem Fließverhalten beginnen erst dann zu fließen, wenn eine bestimmte auf die Substanz einwirkende Kraft überschritten wird. Man spricht in diesem Fall von einer Fließgrenze [116]. Danach nimmt die Viskosität mit zunehmender Krafteinwirkung ab. Dies geschieht nicht notwendigerweise linear.

Besitzen die Substanzen keine Fließgrenze, werden sie als pseudoplastische Substanzen bezeichnet.

Im Unterschied dazu ist dilatantes Fließverhalten durch Viskositätszunahme bei zunehmender Scherkrafteinwirkung charakterisiert. Bei plastisch fließenden Gelen kommt es häufig vor, dass bei abnehmender Scherbeanspruchung der Wiederaufbau der inneren Struktur langsamer ist als ihre Zerstörung durch einwirkende Scherkräfte. Damit nimmt die Zähigkeit der Substanz zeitverzögert zu, und man spricht von Thixotropie. Tritt ein zeitverzögerter struktureller Wiederaufbau bei dilatanten Substanzen auf, so bezeichnet man dieses Phänomen als Rheopexie [117].

Zusätzlich können hohe Scherkräfte die innere Struktur von Substanzen völlig zerstören, z.B. bei Joghurt, so dass ein Wiederaufbau nicht mehr möglich ist. Einige Substanzen zeigen auch zusammengesetztes Fließverhalten, bei dem sich plastisches und dilatantes Fließen abwechseln. Die folgenden Graphiken verdeutlichen,

Experimenteller Teil

wie sich die Schubspannung mit dem Schergefälle bei unterschiedlichem Fließverhalten verändert.

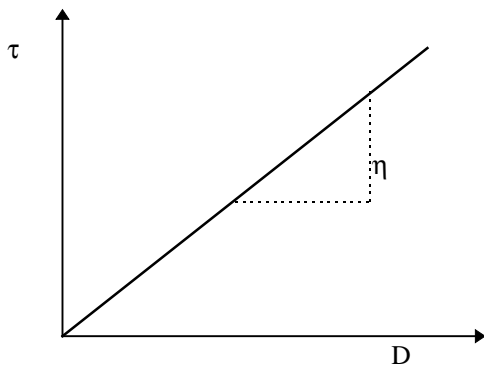


Abbildung 3-21: Idealviskosität (Newton-sches Fließverhalten)

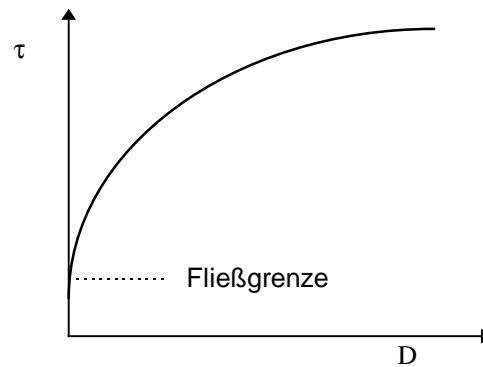


Abbildung 3-22: Plastisches Fließverhalten

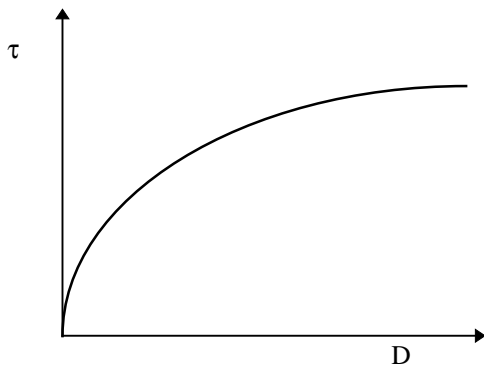


Abbildung 3-23: Pseudoplastisches Fließverhalten

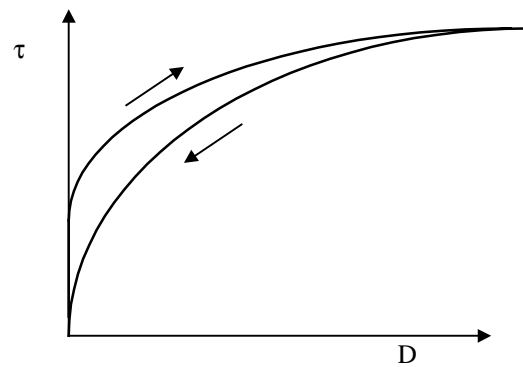


Abbildung 3-24: Thixotropie (\rightarrow Scher-verflüssigung, \leftarrow zeitverzögerte Scher-verfestigung)

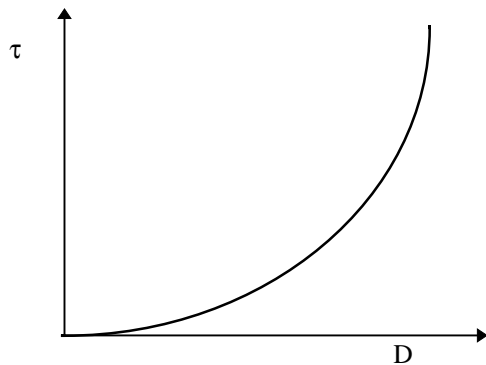


Abbildung 3-25: Dilatanz

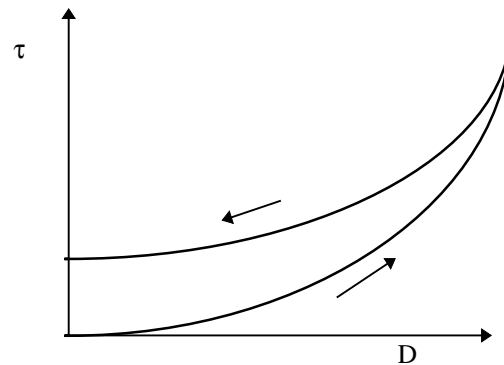


Abbildung 3-26: Rheopexie (\rightarrow Scherverfestigung, \leftarrow zeitverzögerte Scherverflüssigung)

3.6.1. Geräte und Materialien

- Für die Viskositätsmessungen wurde ein Rotationsviskosimeter der Fa. Haake, Viscotester® VT550, mit Zylinder-Becher-Messeinrichtungen und Temperiergefäß verwendet. Für niedrig viskose newtonsche Flüssigkeiten mit einer dynamischen Viskosität von 1 mPa·s bis 20000 mPa·s eignet sich die Messeinrichtung NV (Abbildung 3-27) mit dem Drehkörper NV 807-0713 und Messbecher NV 807-0702, für Cremes mit Viskositäten von 10 mPa X s bis $8 \cdot 10^6$ mPa·s die Messeinrichtung SV-DIN 53019/ISO 3219 (Abbildung 1-2).

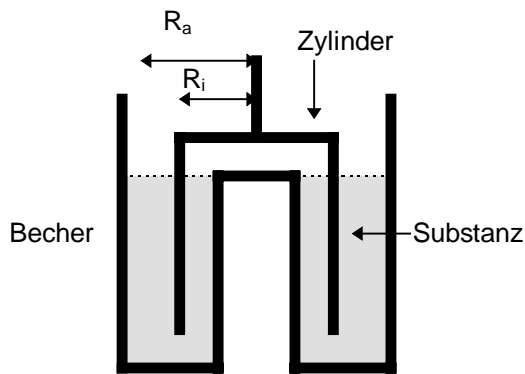


Abbildung 3-27: Messeinrichtung NV

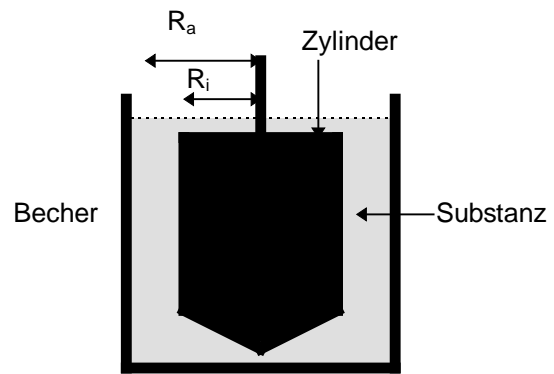


Abbildung 3-28: Messeinrichtung SV-DIN

In Tabelle 3-16 sind charakteristische Größen der Messeinrichtungen aufgelistet.

Messeinrichtung	NV	SV-DIN
Messkörper:		
Radius (innen) R_i [mm]	20,10	10,56
Höhe l [mm]	60,00	31,45
Messbecher:		
Radius (außen) R_a [mm]	20,50	11,55
Radienverhältnis R_a/R_i	1,02	1,0847
Spaltweite [mm]	0,35	0,9
Füllvolumen [cm ³]	9,0	14,0
Systemfaktoren:		
f [Pa/N·cm]	36,3	369,4
M [min/s]	5,41	1,29

Tabelle 3-16: Abmessungen der Messeinrichtungen

- Die Messungen wurden mit Hilfe der RheoWin Pro 26 Software ausgewertet.
- Untersucht wurden die Rezepturen 1.7, 3.10, 4.2, das Insektenschutzmittel Bw, Autan® Lösung, das Insektenschutzmittel der US-Army und Vivisun® Creme. Rezeptur 4.2 wurde durch unterschiedliche Verfahren hergestellt:
 - a) im 100 g-Maßstab in der Fantaschale
 - b) wie auch die Rezepturen 1.7 und 3.10 im 3 kg-Maßstab in einem Stephan Universalmischer UM12 Nr.: 458930 bei maximaler Drehzahl und

Experimenteller Teil

c) in einem 120 kg-Ansatz mit einer Zahnkolloidmühle, Fryma, Fabr.-Nr. M13628, Bj. 1989. Die in der Stephan-Mühle hergestellte Rezeptur 4.2 wurde nach sechsmonatiger Lagerung bei 35°C und 80 % rF sowie bei 35°C und 4°C im Wechsel nochmals getestet.

3.6.2. Methode

Die Substanzen wurden so in die Messbecher eingefüllt, dass jeweils der gesamte Zylindermantel von der Zubereitung benetzt war. Die Messung wurde mittels PC gestartet, wodurch der Drehkörper mit einer vorgegebenen, dem Geschwindigkeitsgefälle proportionalen Drehzahl angetrieben wurde. Nach dem Funktionsprinzip für dieses Rotationsviskosimeter wird der Drehbewegung aufgrund der Zähigkeit der Substanz ein Widerstand entgegengesetzt, der als Drehmoment (T) an einer Messwelle erfasst wird. Ein eingebauter Rechner berechnet aus Drehzahl, Drehmoment und Geometrie der Messeinrichtungen die Werte für die dynamische Viskosität (η) in mPa·s, Schubspannung (τ) in Pa und Geschwindigkeitsgefälle (D) in s⁻¹.

Dabei bestehen folgende Beziehungen [118]:

$$\eta = \frac{\tau}{D}$$

Gleichung 3-19

Ausgehend von der Messung des Drehmoments und unter Berücksichtigung der Geräteabmessungen und -konstanten gilt:

$$\tau = f \cdot T$$

Gleichung 3-20

Experimenteller Teil

und

$$D = M \cdot n$$

Gleichung 3-21

Durch Einsetzen in Gleichung 3-19 erhält man:

$$\eta = \frac{f \cdot T}{M \cdot n}$$

Gleichung 3-22

Aufgrund der Gerätesymmetrie berechnen sich f und M folgendermaßen:

$$f = \frac{0,01}{2\pi \cdot L \cdot R_i^3}$$

Gleichung 3-23

$$M = \frac{\pi \cdot R_a^2}{15 \cdot (R_a^2 - R_i^2)}$$

Gleichung 3-24

η :	dynamische Viskosität [mPa·s]
τ :	Schubspannung [Pa]
D:	Geschwindigkeits- oder Schergefälle [1/s]
R_i :	Radius des Rotors (Innenzylinder [m]
R_a :	Radius des Messbechers (Außenzylinder) [m]
L:	Länge des Rotors [m]
n:	Drehzahl des Rotors [1/min]
T:	Drehmoment [N·cm]
M:	Systemfaktor [min/s]
f:	Systemfaktor [Pa/Ncm]

Mit Hilfe der Temperiervorrichtung wurde die Temperatur auf $20^{\circ}\text{C}\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ eingestellt und mit einem eingebauten Temperaturfühler kontrolliert. Die Lösungen wurden mit der Messeinrichtung NV bis zu einem maximalen Geschwindigkeitsgefälle von 600 s^{-1} vermessen, mit 100 Messpunkten in 243,3 s (2,4 s/Messpunkt). Für die halbfesten Zubereitungen eignete sich die Messeinrichtung SV-DIN. Zur Erstellung einer Aufwärtskurve bis zu einem Geschwindigkeitsgefälle von 400 s^{-1} wurde für die Aufnahme von 100 Messpunkten ein Zeitsegment von 2,4 s/Messpunkt eingestellt. Im Umkehrpunkt wurde 60 s lang bei konstanter Drehzahl rotiert und anschließend zur Aufnahme der Abwärtskurve das Geschwindigkeitsgefälle bis 0 s^{-1} erniedrigt, mit einem Zeitsegment von 2,4 s/Messpunkt und 100 Messpunkten insgesamt. Bestimmt wurden die dynamische Viskosität und die Schubspannung der Substanzen, die in Diagrammen über das Geschwindigkeitsgefälle aufgetragen wurden.

Wie in der USP 24/NF 19 für Carbomergele vorgeschrieben ist, wurde die Viskosität in $\text{mPa}\cdot\text{s}$, dies entspricht der vorgeschriebenen Einheit cPoise, zusätzlich bei 20 Umdrehungen pro Minute (UpM) bestimmt.

3.6.3. Ergebnisse

Die Viskosität von Rezeptur 1.7 von $33550\text{ mPa}\cdot\text{s}$ nahm mit zunehmender Deformationsgeschwindigkeit ab (Abbildung 3-30), wobei sich bei Erniedrigung der Deformationsgeschwindigkeit eine Hysterese durch einen zeitverzögerten Wiederaufbau der inneren Struktur erkennen ließ. Abbildung 3-30 zeigt, dass zunächst eine Fließgrenze bei 200 bis 250 Pa überschritten werden musste, bis die Zubereitung zu fließen begann. Die Substanz zeigte plastisches Fließverhalten mit Thixotropie. Die Viskosität bei 20 UpM wurde mit $9534\text{ mPa}\cdot\text{s}$ bestimmt. Der Kurvenverlauf in Abbildung 3-30 ist wegen Schwankungen aufeinanderfolgender Messwerte unregelmäßig.

Abbildung 3-31 zeigt die Viskositätskurve von Rezeptur 3.10 mit einer hohen Anfangsviskosität von $17700\text{ mPa}\cdot\text{s}$. In Abbildung 3-32 erkennt man plastisches Fließverhalten mit Thixotropie. Die Viskosität bei 20 UpM lag bei $6485\text{ mPa}\cdot\text{s}$.

Die Anfangsviskosität von Rezeptur 3.10 Bw war mit $27850\text{ mPa}\cdot\text{s}$ höher als bei Rezeptur 3.10 und zeigte ebenso wie diese plastisches Fließverhalten mit zeitverzögertem Wiederaufbau der inneren Struktur (Abbildung 3-33 und Abbildung 3-34). Die

Experimenteller Teil

Schubspannung bei dem jeweiligen Schergefälle war insgesamt höher als bei Rezeptur 3.10. Bei 20 UpM hatte sie eine Viskosität von 8162 mPa·s.

Die in einer Salbenschale hergestellte Rezeptur 4.2 hatte zu Beginn der Messung eine Viskosität von 62170 mPa·s, die insgesamt mit zunehmender Deformationsgeschwindigkeit abnahm, aber bei 100 s^{-1} kurzzeitig eine Viskositätserhöhung erfuhr (Abbildung 3-35). Die Fließkurve in Abbildung 3-36 zeigt, dass die Schubspannungswerte bei zunehmender Deformationsgeschwindigkeit stark schwankten. Ab 200 s^{-1} blieb die Schubspannung nahezu konstant und änderte sich auch bei abnehmender Deformationsgeschwindigkeit kaum. Bei 20 UpM wurde eine Viskosität von 16782 mPa·s bestimmt, die bis zum Wendepunkt auf 455 mPa·s sank.

Rezeptur 4.2, im Stephan Mischer hergestellt, hatte zu Beginn der Messung eine Viskosität von 3598 mPa·s, die damit um das 17-fache niedriger war als nach Herstellung in der Salbenschale. Sie zeigte pseudoplastisches Fließverhalten, hatte also keine Fließgrenze, aber ebenso eine zeitlich verzögerte Zunahme der Viskosität bei abnehmender Deformationsgeschwindigkeit (Abbildung 3-37 und Abbildung 3-38). Die Viskosität bei 20 UpM wurde mit 1828 mPa·s bestimmt und war somit 9 mal niedriger als bei der manuell hergestellten Zubereitung.

Die gleiche Rezeptur, angefertigt in der Zahnkolloidmühle (4.2 Bw), hatte anfangs eine Viskosität von 8196 mPa·s und eine Fließgrenze sowie eine zeitverzögerte Viskositätsabnahme bei abnehmender Deformationsgeschwindigkeit (Abbildung 3-39 und Abbildung 3-40). Die Viskosität bei 20 UpM betrug 1756 mPa·s.

Die eingelagerten Zubereitungen waren auch im Stephan Mischer hergestellt worden und hatten gleich wie die frisch angefertigte Formulierung keine Fließgrenze (Abbildung 3-42 und Abbildung 3-44). Bei beiden verlief der Wiederaufbau der inneren Struktur zeitverzögert.

Die Rezeptur, die bei 35°C und 80 % rF eingelagert worden war, hatte zu Beginn der Messung eine Viskosität von 1799 mPa·s (Abbildung 3-41) und von 998 mPa·s bei 20 UpM. Nach Einlagerung im Schaukelverfahren waren die Anfangsviskosität mit 2932 mPa·s (Abbildung 3-43) und die Viskosität bei 20 UpM mit 1465 mPa·s höher.

Experimenteller Teil

Die Formulierung der US-Army hatte eine Viskosität von 18662 mPa·s (Abbildung 3-45), die zunächst niedriger wurde, aber im Verlauf der Messung zunahm und nach dem Umkehrpunkt bei 400 s^{-1} bei abnehmendem Geschwindigkeitsgefälle über der Viskosität der Aufwärtskurve lag (Abbildung 3-47). Aus der Aufwärtskurve des Fließdiagramms (Abbildung 3-46) erkennt man, dass die Schubspannung bei einer Deformationsgeschwindigkeit von ca. 40 s^{-1} ein Minimum durchlief und anschließend anstieg, wobei Scherverfestigung eintrat, so dass die Abwärtskurve bei abnehmender Deformationsgeschwindigkeit im Bereich von 400 bis ca. 220 s^{-1} über der Aufwärtskurve lag. Die Viskosität bei 20 UpM wurde mit 5452 mPa·s bestimmt.

Vivisun® Creme zeigte plastisches Fließverhalten mit Thixotropie (Abbildung 3-49) und eine Anfangsviskosität von 13660 mPa·s. Bei 20 UpM betrug die Viskosität 3444 mPa·s.

Autan®-S Lotion zeigte aufgrund gleichbleibender Viskosität newtonsches Fließverhalten (Abbildung 3-50 und Abbildung 3-51), aus der Ausgleichsgeraden konnte eine Viskosität von 12 mPa·s berechnet werden ($R = 0,998$).

Das Insektenschutzmittel Bw hatte mit 4 mPa·s eine 3-fach niedrigere Viskosität als Autan®-S Lotion. Wie aus Abbildung 3-52 und Abbildung 3-53 hervorgeht, lag auch hier newtonsches Fließverhalten vor ($R = 0,993$).

Experimenteller Teil

Zubereitung	Viskosität bei 20 UpM [mPa·s]	Fließverhalten
1.7	9534	plastisch-thixotrop
3.10	6485	plastisch-thixotrop
3.10 Bw	8162	plastisch-thixotrop
4.2 (Salbenschale)	16782	-
4.2	1828	pseudoplastisch-thixotrop
4.2 Bw	1756	plastisch-thixotrop
4.2 K	998	pseudoplastisch-thixotrop
4.2 S	1465	pseudoplastisch-thixotrop
Insektenschutzmittel der US-Army	5452	-
Vivisun® Creme	3444	plastisch-thixotrop
Autan®-S Lotion	12	idealviskos
Insektenschutzmittel Bw	4	idealviskos

Tabelle 3-17: Viskosität bei 20 UpM und Fließverhalten

Experimenteller Teil

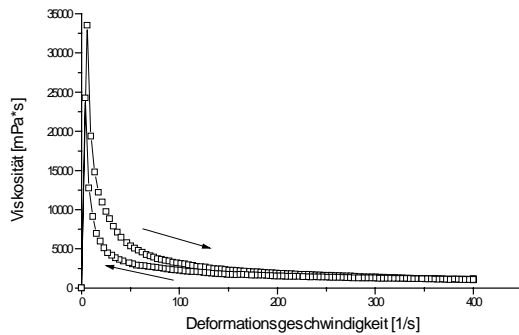


Abbildung 3-29: Viskosität von Rezeptur 1.7 (Herstellung im Stephan Mischer)

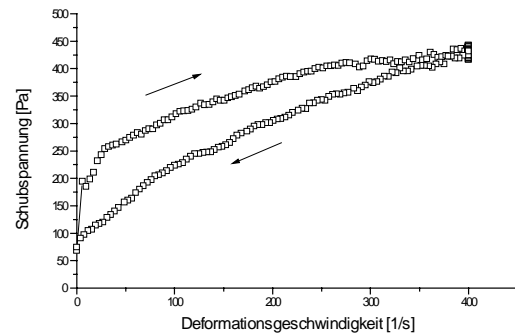


Abbildung 3-30: Fließverhalten von Rezeptur 1.7 (Herstellung im Stephan Mischer)

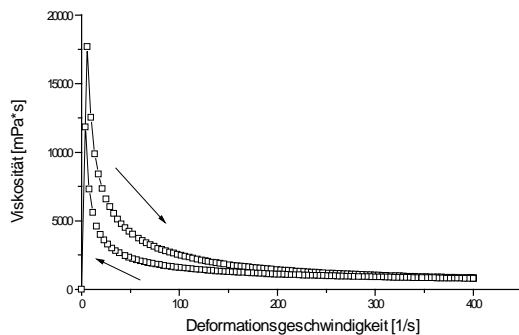


Abbildung 3-31: Viskosität von Rezeptur 3.10 (Herstellung im Stephan Mischer)

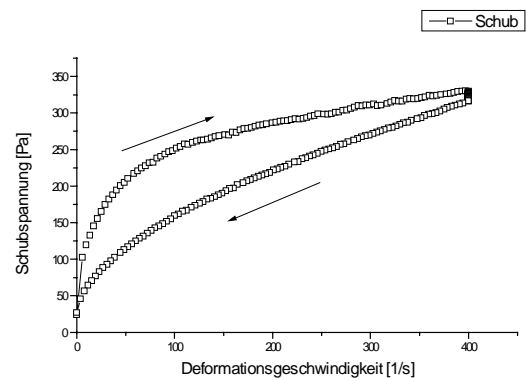


Abbildung 3-32: Fließverhalten von Rezeptur 3.10 (Herstellung im Stephan Mischer)

Experimenteller Teil

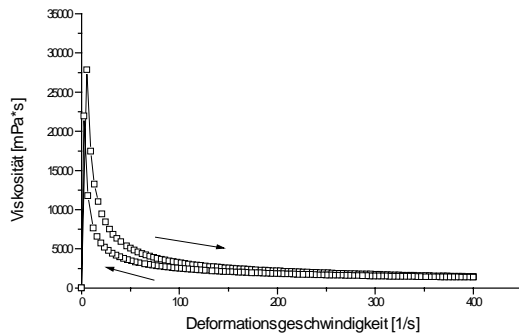


Abbildung 3-33: Viskosität von Rezeptur 3.10 Bw (Herstellung in der Zahnkolloidmühle)

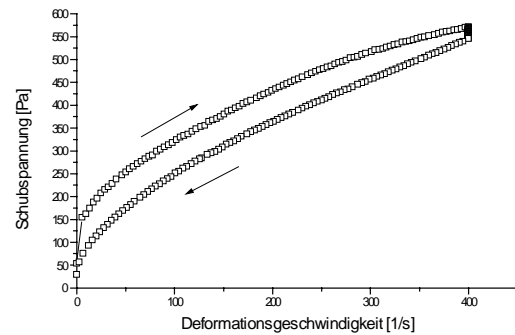


Abbildung 3-34: Fließverhalten von Rezeptur 3.10 Bw (Herstellung in der Zahnkolloidmühle)

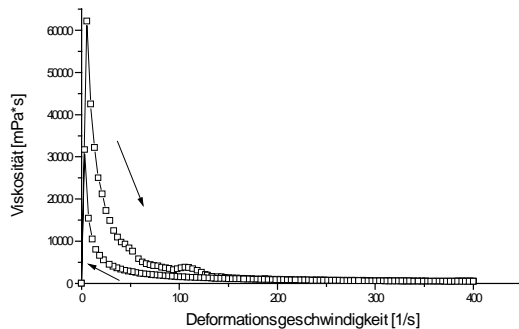


Abbildung 3-35: Viskosität von Rezeptur 4.2 (Herstellung in der Salbenschale)

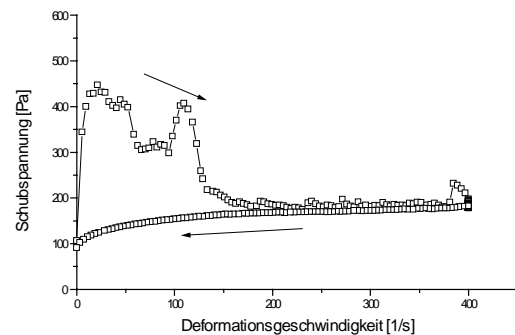


Abbildung 3-36: Fließverhalten von Rezeptur 4.2 (Herstellung in der Salbenschale)

Experimenteller Teil

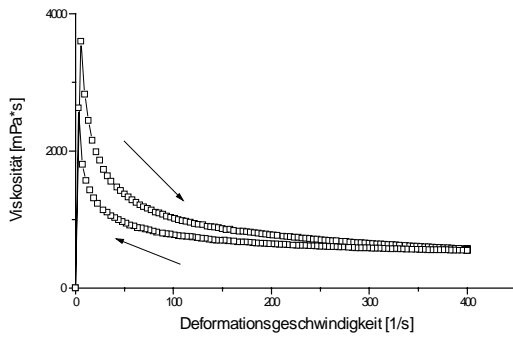


Abbildung 3-37: Viskosität von Rezeptur 4.2 (Herstellung im Stephan Mischer)

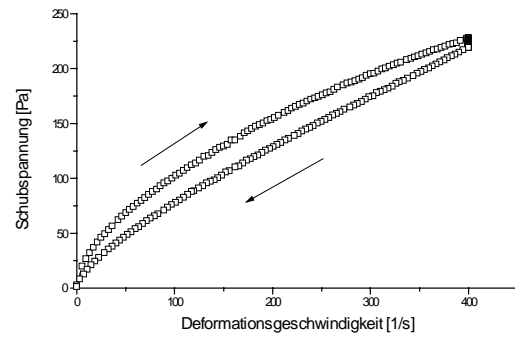


Abbildung 3-38: Fließverhalten von Rezeptur 4.2 (Herstellung im Stephan Mischer)

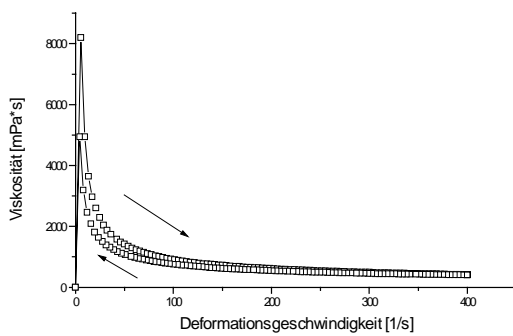


Abbildung 3-39: Viskosität von Rezeptur 4.2 Bw (Herstellung in der Zahnkolloidmühle)

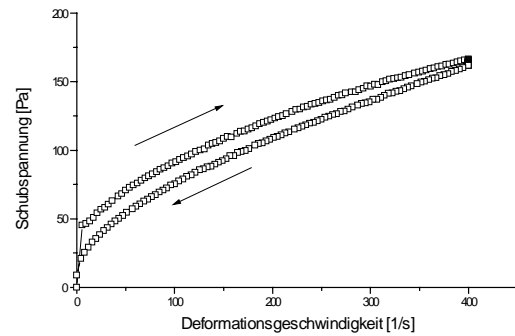


Abbildung 3-40: Fließverhalten von Rezeptur 4.2 Bw (Herstellung in der Zahnkolloidmühle)

Experimenteller Teil

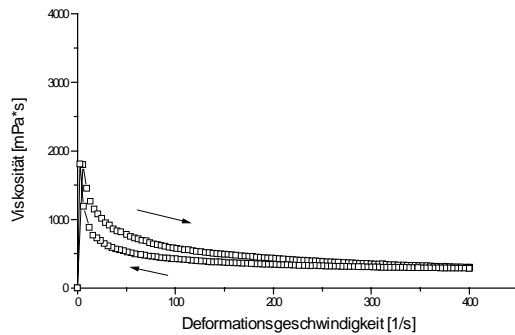


Abbildung 3-41: Viskosität von Rezeptur 4.2 K nach sechsmonatiger Lagerung bei 35°C und 80 % rF (Herstellung im Stephan Mischer)

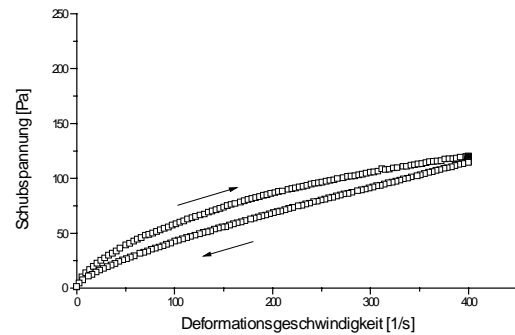


Abbildung 3-42: Fließverhalten von Rezeptur 4.2 K nach sechsmonatiger Lagerung bei 35°C und 80 % rF (Herstellung im Stephan Mischer)

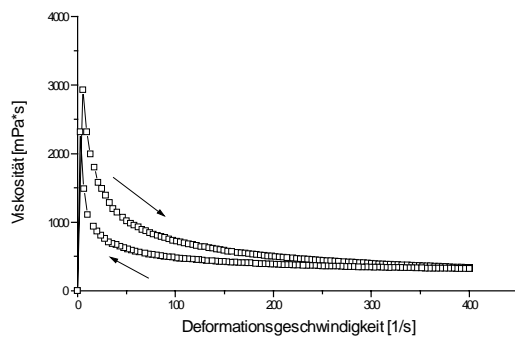


Abbildung 3-43: Viskosität von Rezeptur 4.2 S nach sechsmonatiger Lagerung im Schaukeltest (Herstellung im Stephan Mischer)

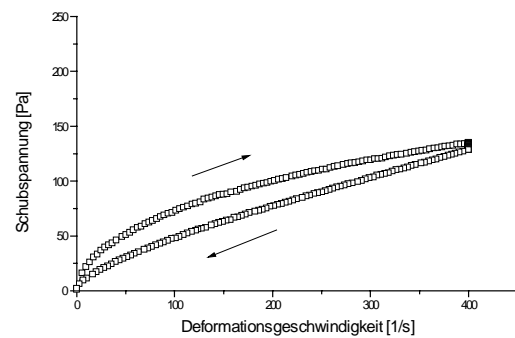


Abbildung 3-44: Fließverhalten von Rezeptur 4.2 S nach sechsmonatiger Lagerung im Schaukeltest (Herstellung im Stephan Mischer)

Experimenteller Teil

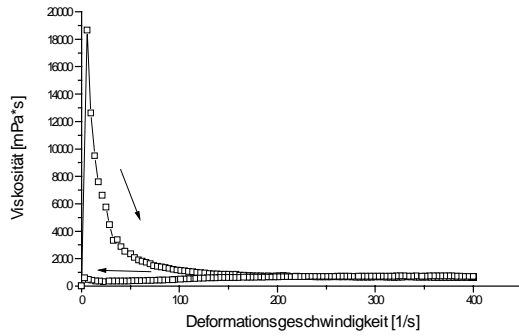


Abbildung 3-45: Viskosität des Insektenschutzmittels der US-Army

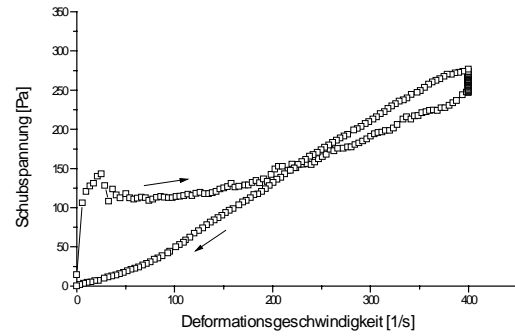


Abbildung 3-46: Fließverhalten des Insektenschutzmittels der US-Army

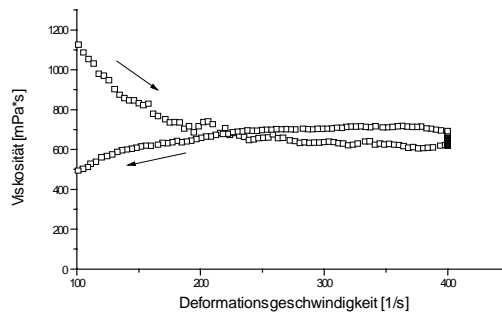


Abbildung 3-47: Viskosität des Insektenschutzmittels der US-Army bei Deformationsgeschwindigkeiten zwischen 100 und 400 s⁻¹

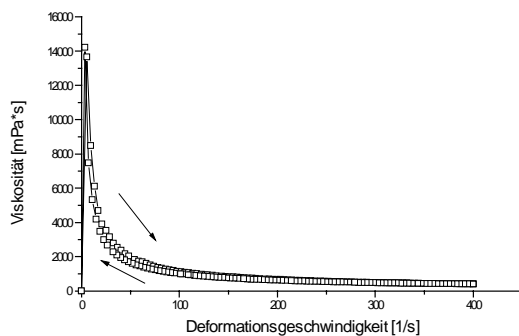


Abbildung 3-48: Viskosität von Vivisun® Creme

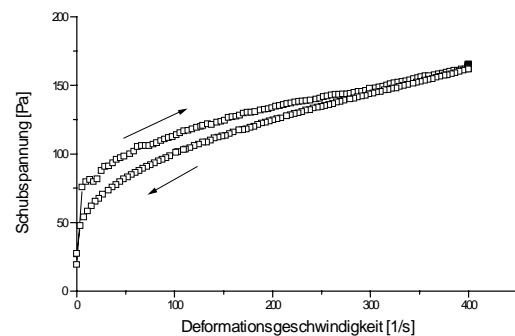


Abbildung 3-49: Fließverhalten von Vivisun® Creme

Experimenteller Teil

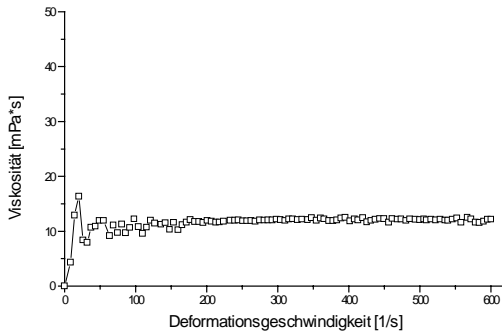


Abbildung 3-50: Viskosität von Autan®-S Lotion

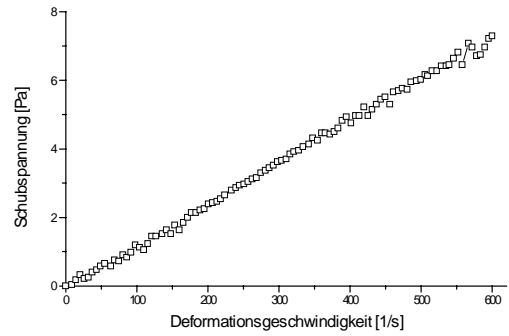


Abbildung 3-51: Fließverhalten von Autan®-S Lotion

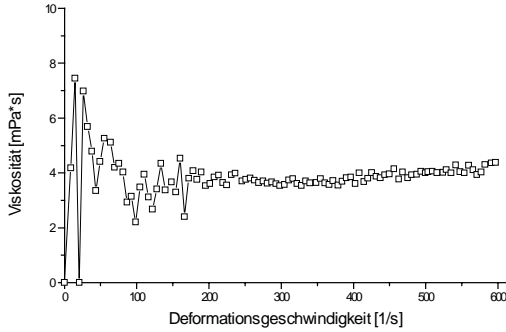


Abbildung 3-52: Viskosität des Insektenschutzmittels Bw

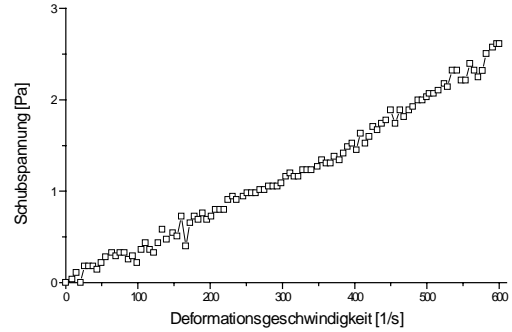


Abbildung 3-53: Fließverhalten des Insektenschutzmittels Bw

3.7. In-vitro-Freisetzung

Die Freisetzungskinetik von Wirkstoffen aus Arzneizubereitungen spielt eine wichtige Rolle für Wirksamkeit und Wirkdauer von Arzneimitteln. Deshalb wurde die Geschwindigkeit der Freisetzung von DEET aus verschiedenen Zubereitungen mit der Franz-Zelle (Diffusionszelle) getestet.

3.7.1. Geräte und Materialien

- Die Freisetzungsuntersuchungen erfolgten mit den Rezepturen 1.7, 3.10 und 4.2. Die Formulierungen wurden im 3 kg-Maßstab in einem Stephan Universalmischer UM12 bei maximaler Drehzahl hergestellt. Rezeptur 4.2 wurde zusätzlich in einem 120 kg-Ansatz mit einer Zahnkolloidmühle, Fryma, Fabr.-Nr. M13628, Bj. 1989 in der Apotheke des Zentralkrankenhauses der Bundeswehr in Koblenz hergestellt. Zum Vergleich wurde die Freisetzung aus dem Insektenschutzmittel Bw, dem Insektenschutzmittel der US-Army und der beiden Handelspräparate Autan®-Lösung und Vivisun®-Creme getestet.
- Die Franz-Zelle (Abbildung 3-54) besteht aus zwei Teilen: einer Abgabeeinheit, in der die zu prüfende Zubereitung auf eine Membran aufgetragen wird (Donorphase), und einer Akzeptoreinheit, in der sich die Akzeptorlösung für den Wirkstoff befindet. Zur Temperierung ist die Zelle von einem mit Wasser gefüllten Heizmantel umgeben. Durch ein Probenentnahmeröhrchen können aus der Mitte der Akzeptorlösung Proben entnommen werden. Das Volumen der Franz-Zelle beträgt 34 ml, der Durchmesser der Abgabeöffnung 2,7 cm.

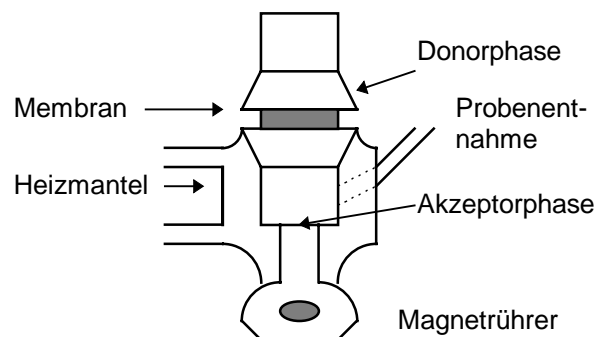


Abbildung 3-54. Schematischer Aufbau der Diffusionszelle

- Als Membran wurde ein aufgeschnittener Dialyseschlauch aus Cellulose, Zellu Trans, Roth, ArtNr. E6581, Ch.B. 7254 mit einer Wandstärke von 28 µm verwendet.
- Temperiert wurde mit einem Lauda-Thermostat, Typ K2.
- Die Proben wurden mit einer 500 µl-Eppendorfpipette entnommen.
- Weitere Substanzen:
Dimeticon 350, Th.Goldschmidt, Diethylether, Hydroxypropyl-β-cyclodextrin, Acros Organics, Acetonitril, Fa. J.T. Baker, CH.-B. 0023410002, frisch hergestellter Sörensen Phosphat-Puffer pH 5,5 aus Na₂HPO₄ (1,4508 g) x 2H₂O und KH₂PO₄ (21,8147 g) zu 1000 ml in Wasser gelöst, einfach destilliertes Wasser

3.7.2. Methode

Zunächst wurde die Membran ca. 24 h in Wasser eingelegt, um sie vorquellen zu lassen. Damit kein Wasser von der Akzeptorphase in die Donorphase gelangen konnte, wurde die Membran in eine 2 %-ige Lösung von Dimeticon 350 in Diethylether getaucht und anschließend zum Abdampfen des Ethers eine halbe Stunde liegen gelassen. So konnte sich ein Silikonfilm mit der durchschnittlichen Masse von 9,5 mg auf der Membran bilden. Ca. 1,0 g Creme bzw. 0,5 g Lösung, dies entsprach einer "infinite dose", wurden auf die im Oberteil befestigte Membran eingewogen und gleichmäßig mit einem Metallspatel verteilt.

Die "infinite dose" hat den Vorteil, dass der Wirkstoff in einem Überschuss im Donor vorliegt und die Freigabe nur von der Beschaffenheit der Grundlage abhängt. Die Ergebnisse sind besser reproduzierbar [119] als bei einer "finite dose", die einer therapeutisch applizierten Dosis entspricht. Um das Abdampfen von Substanz aus dem Donor zu verhindern, wurde dieser mit Aluminiumfolie abgedeckt. Das Akzeptormedium bestand aus Sörensen-Phosphat-Puffer, pH 5,5, dem zur Löslichkeitsverbesserung von DEET 2 % Hydroxypropyl-β-cyclodextrin zugesetzt wurde. Dadurch konnten im Akzeptormedium annähernd "sink-Bedingungen" erreicht werden [120]. Die Löslichkeit von DEET im Akzeptormedium wurde zu 1,2 (± 0,1) g/100 ml bestimmt (n = 3). Ein Einfluss auf die Gehaltsbestimmung von DEET war nicht zu befürchten [120]. Das Wasserbad wurde auf 32°C temperiert. In vorher festgelegten Zeitabständen wurden mit der Eppendorfpipette jeweils 500 µl Probe aus der Mitte der Lösung ent-

Experimenteller Teil

nommen und durch frisches Akzeptormedium ersetzt. Die Proben wurden in einen 50 ml Messzylinder mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (1:1) im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Lösungen wurden in HPLC-Fläschchen abgefüllt und vermessen.

Die zum Zeitpunkt t freigesetzte Masse wurde folgendermaßen berechnet:

$$m_t = \frac{m_{Std} \cdot Fl_P}{Fl_{Std}} \cdot 3,4 + \frac{m_{t-1} \cdot V_P}{V_{Akz}}$$

Der Faktor 3,4 ergab sich aus dem Volumen des Akzeptormediums (34 ml) und einem Verdünnungsfaktor von 0,1 aufgrund der unterschiedlichen Aufbereitung der HPLC-Probe- und Referenzlösung.

Gleichung 3-25

Daraus ergab sich die pro cm² freigesetzte Wirkstoffmenge nach:

$$m_t/A = \frac{m_t \cdot 1000}{d^2 \cdot \pi/4}$$

Gleichung 3-26

m_t :	freigesetzte Masse zum Zeitpunkt t [mg]
m_{t-1} :	freigesetzte Masse zum Zeitpunkt t-1 [mg]
m_{Std} :	Masse (Einwaage) des Standards [mg]
Fl_P :	Peakfläche der Probe
Fl_{Std} :	Peakfläche des Standards
V_{Akz} :	Volumen des Akzeptormediums (= 34 ml)
V_P :	entnommenes Probenvolumen
m_t/A :	pro Fläche freigesetzte Masse zum Zeitpunkt t [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
A:	Membranfläche [cm^2]
d:	Membrandurchmesser [cm^2]

Die Gehaltsbestimmung durch HPLC erfolgte nach der Vorschrift in Kapitel 3.2.2.

3.7.3. Ergebnisse

Nach 1 h setzte Rezeptur 1.7 $2,3 \pm 1,0$ mg/cm² DEET frei (Abbildung 3-55). Die pro Fläche kumulativ freigesetzte DEET-Menge stieg anschließend annähernd linear mit einer mittleren Geschwindigkeit von $17 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ an ($R = 0,985$). Nach 7 h waren $8,4 \pm 1,3$ mg/cm² freigesetzt.

Im Gegensatz dazu hatte Rezeptur 3.10 nach 1 h noch keinen Wirkstoff freigesetzt (Abbildung 3-56). Erst nach 2 h konnte eine DEET-Menge von $0,7 \pm 0,2$ mg/cm² gemessen werden. Danach stieg die freigegebene Menge mit durchschnittlich $16 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ ($R = 0,993$) bis auf $5,7 \pm 0,8$ mg/cm² an. Die Lag-Zeit betrug 59 min.

Rezeptur 4.2 zeigte nach 1 h eine freigesetzte Wirkstoffmenge von $0,4 \pm 0,4$ mg/cm² und nach 6 h von $4,6 \pm 0,7$ mg/cm², die nach 7 h auf $4,7 \pm 0,6$ mg/cm² anstieg (Abbildung 3-57). Durch lineare Regression wurde aus der Freisetzungskurve eine Freisetzungsgeschwindigkeit von $13 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ berechnet ($R = 0,980$). Danach ergab sich eine Lag-Zeit von 25 min.

Wie aus Abbildung 3-58 zu erkennen ist, setzte Rezeptur 4.2 Bw den Wirkstoff zunächst sehr langsam frei. Sowohl nach 1 h als auch nach 2 h war die gemessene Menge mit $0,1 \pm 0,2$ mg/cm² konstant. Danach stieg sie mit $10 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ linear ($R = 0,997$) bis auf $3,1 \pm 0,5$ mg/cm² an. Aus der Regressionsgeraden zwischen 2 und 7 h berechnete sich eine Lag-Zeit von 93 min.

Die bei 35°C und 80 % rF eingelagerte Rezeptur 4.2 K setzte nach 1 h $0,2 \pm 0,4$ mg/cm² und nach 7 h $4,5 \pm 0,5$ mg/cm² DEET frei. Aus der linearen Regression ergab sich eine durchschnittliche Freisetzungsgeschwindigkeit von $11 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ ($R = 0,982$) und eine Lag-Zeit von 51 min (Abbildung 3-59).

Die im Schaukelverfahren bei 35°C und 4°C im Wechsel eingelagerte Rezeptur 4.2 S setzte nach 1 h bereits $1,7 \pm 0,3$ mg/cm² DEET frei, weshalb sich keine Lag-Zeit bestimmen ließ. Danach wurden durchschnittlich $14 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ bis zu $7,1 \pm 2,2$ mg/cm² freigegeben (Abbildung 3-60).

Experimenteller Teil

Das Insektenschutzmittel der US-Army hatte während des Experiments zwei zeitlich unterschiedliche Verläufe der Wirkstofffreisetzung (Abbildung 3-61). Zwischen 1 h und 4 h wurden im Mittel $6 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ ($R = 0,992$), nach 4 h $41 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ ($R = 0,983$) freigesetzt. Die freigesetzte Menge lag nach 1 h bei $1,2 \pm 1,5 \text{ mg}/\text{cm}^2$, nach 4 h bei $2,4 \pm 1,5 \text{ mg}/\text{cm}^2$ und nach 7 h bei $10,1 \pm 1,0 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Aus dem zweiten Teil der Graphik ergab sich eine Lag-Zeit von 187 min.

Vivisun® Creme zeigte eine Freisetzung von durchschnittlich $15 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ ($R = 0,987$). Aus dem Verlauf des Graphen ließ sich keine Lag-Zeit bestimmen (Abbildung 3-62). Die anfangs freigesetzte DEET-Menge lag nach 1 h bei $1,0 \pm 0,9 \text{ mg}/\text{cm}^2$, nach 7 h bei $6,4 \pm 1,0 \text{ mg}/\text{cm}^2$.

Autan®-S Lotion (Abbildung 3-63) gab zwischen 1 h und 4 h im Durchschnitt $63 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ ($R = 0,968$) frei mit einer berechneten Lag-Zeit von 20 min. Danach flachte die Freisetzungskurve ab. Die freigesetzten DEET-Mengen betragen nach 1 h $1,3 \pm 2,3 \text{ mg}/\text{cm}^2$, nach 3 h $10,6 \pm 0,6 \text{ mg}/\text{cm}^2$, nach 4 h $13,1 \pm 0,8 \text{ mg}/\text{cm}^2$ und nach 7 h $15,9 \pm 1,7 \text{ mg}/\text{cm}^2$, was 80 % der eingesetzten DEET-Menge entsprach.

Die Freisetzungsgeschwindigkeit des Insektenschutzmittels Bw lag zwischen 1 und 3 h mit $145 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{min})$ ($R = 0,998$) höher als bei den anderen Zubereitungen. Für die Freisetzung wurde aus der Regressionsgeraden eine Lag-Zeit von 56 min berechnet. Die Wirkstoffmengen betragen nach 1 h $0,9 \pm 0,1 \text{ mg}/\text{cm}^2$, nach 3 h $18 \pm 0,4 \text{ mg}/\text{cm}^2$ und nach 7 h $22 \pm 0,3 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Bei Versuchsende waren insgesamt 73 % der eingesetzten DEET-Menge freigesetzt worden. Nach 3 h flachte auch hier die Freisetzungskurve ab (Abbildung 3-64).

Experimenteller Teil

Die folgenden Abbildungen zeigen die DEET-Freisetzung aus verschiedenen Zubereitungen (Fehlerbalken = Standardabweichung):

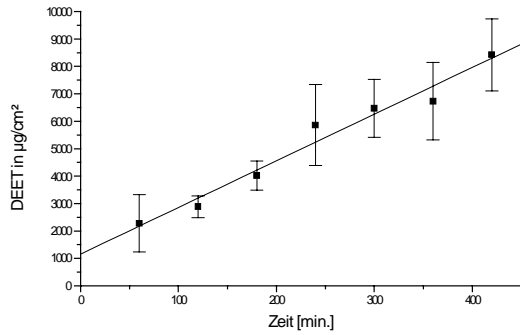


Abbildung 3-55: Rezeptur 1.7, n = 3

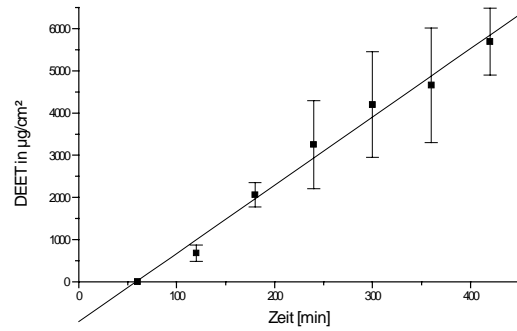


Abbildung 3-56: Rezeptur 3.10, n = 3

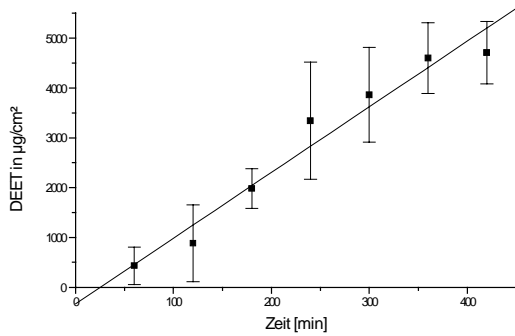


Abbildung 3-57: Rezeptur 4.2, n = 3

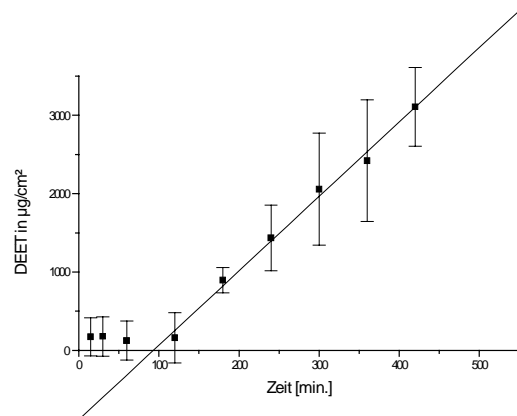


Abbildung 3-58: Rezeptur 4.2 Bw, n = 3

Experimenteller Teil

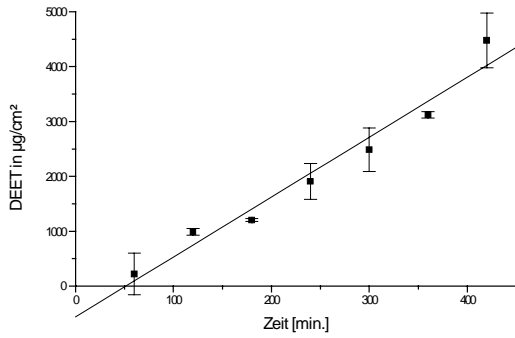


Abbildung 3-59: Rezeptur 4.2 K, n = 3

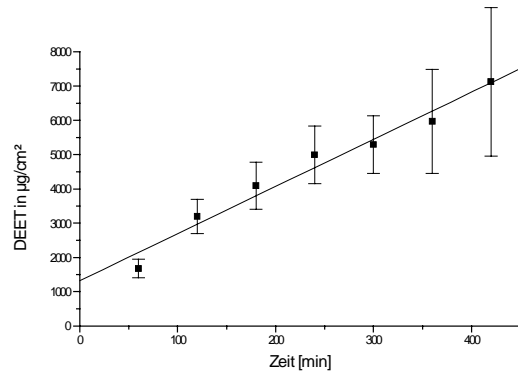


Abbildung 3-60: Rezeptur 4.2 S, n = 2

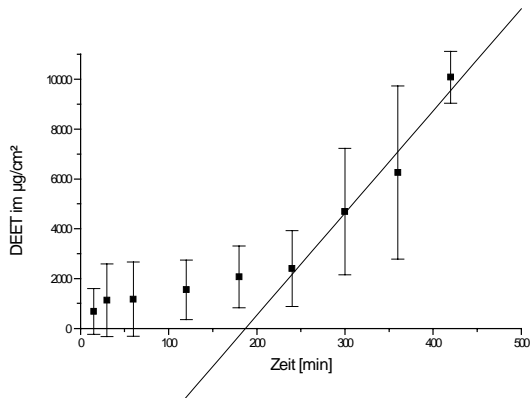


Abbildung 3-61: Insektenschutzmittel der US-Army, n = 3

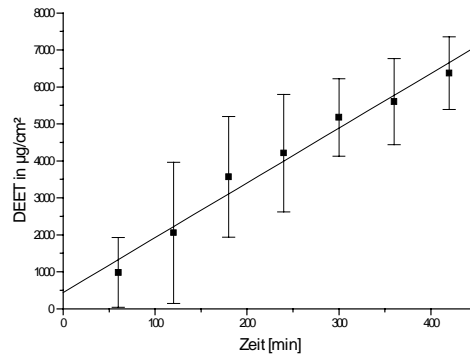


Abbildung 3-62: Vivisun® Creme, n = 3

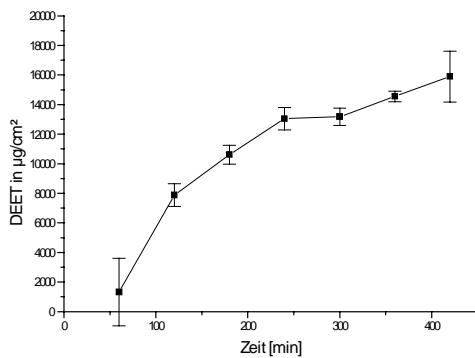


Abbildung 3-63: Autan®-Lotion, n = 3

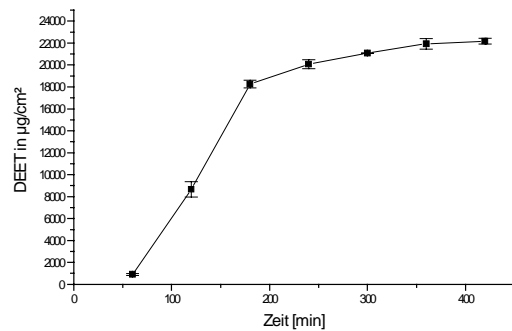


Abbildung 3-64: Insektenschutzmittel Bw, n = 2

Experimenteller Teil

Die Freisetzungsgeschwindigkeiten unterschieden sich, mit Ausnahme des Insektenschutzmittels der US-Army, kaum voneinander (Tabelle 3-18).

Rezeptur 1.7 hatte von den im Rahmen dieses Projektes entwickelten Zubereitungen die höchste Freisetzungsgeschwindigkeit und eine negative Lag-Zeit, die auf eine spontane Wirkstofffreisetzung zu Versuchsbeginn schließen lässt. Die DEET-Freisetzung von Rezeptur 4.2 Bw verlief dagegen am langsamsten und war mit einer Lag-Zeit von 93 min verzögert. Die Freisetzungsgeschwindigkeiten der eingelagerten Rezepturen 4.2 K und 4.2 S unterschied sich nicht deutlich von 4.2. Bei Rezeptur 4.2 S lag aber ebenso wie bei 1.7 und Vivisun® Creme die Lag-Zeit im negativen Bereich.

Die niedrig-viskosen Lösungen Autan®-S Lotion und das Insektenschutzmittel Bw setzten den Wirkstoff deutlich schneller frei als die Cremes.

Zubereitung	Steigung [$\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$]	Lag-Zeit [min]
1.7	17	-
3.10	16	59
4.2	13	25
4.2 Bw	10	93
4.2 K	11	51
4.2 S	14	-
Insektenschutzmittel der US-Army	41	187
Vivisun® Creme	15	-
Autan®-S Lotion	63	20
	145	56

Tabelle 3-18: Freisetzungsgeschwindigkeit (Steigung) und Lag-Zeit der verschiedenen Zubereitungen

3.8. Bewegungsmesskammer

Um den Aufenthalt von *Aedes aegypti* in Abhängigkeit von Repellent- bzw. Attractantquellen zu testen, wurde eine Bewegungsmesskammer aus Glas, Holz und Metall mit 500 mm Länge, 370 mm Breite und 40 mm Höhe gebaut, deren Boden und Seitenteile mit einem Netz aus Polyester (Polyethylenterephthalat) der Maschenweite 200 μm ausgekleidet wurden.

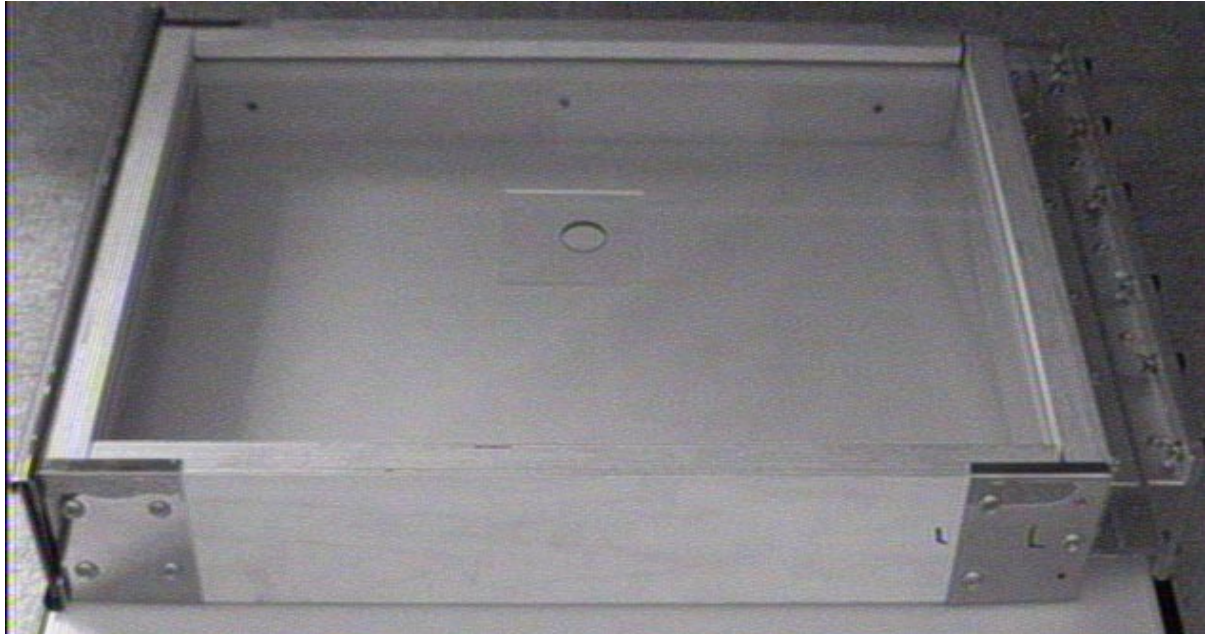


Abbildung 3-65: Bewegungsmesskammer

Ihrem Konzept lag die Vorstellung zugrunde, dass sich die Insekten bei ihren Bewegungen an Konzentrationsgradienten von Stoffen orientieren, die sie mit den Antennen wahrnehmen. Auf einer Schmalseite wurde mit Hilfe einer Haltevorrichtung ein 95 mm x 415 mm großer Filterpapierstreifen eingeführt (in Abbildung 3-65 links), der mit der Lösung eines Repellents oder Attractants getränkt oder mit einem Prüfpräparat beschichtet war. Von dieser Quelle breitete sich der Wirkstoff durch Diffusion im Gasraum der Kammer aus. Strömungen im Prüfraum mussten dabei vermieden werden. Auf der der Quelle gegenüberliegenden Schmalseite wurde die Konzentration des Wirkstoffs in der Gasphase abgesenkt, indem Raumluft mit konstanter Geschwindigkeit (10 l/h) durch einen in ganzer Breite davor liegenden Kanal mit quadratischem Querschnitt gesaugt wurde, der von der Messkammer durch Filterpapier getrennt war. Dadurch wurde ein Gasaustausch durch Diffusion gewährleistet, der Übertritt von Luftwirbeln und Konvektionsströmungen wurde jedoch durch die feinporeöse Barriere verhindert. Nach dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz (Gleichung 3-27)

Experimenteller Teil

stellte sich in der Messkammer innerhalb eines bestimmten Zeitraums ein Fließgleichgewicht zwischen Wirkstoffabgabe aus dem Quellkompartiment und Abgabe an das Senkenkompartiment ein. Dadurch entstand im Prüfraum ein linearer Konzentrationsgradient.

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dc}{dx}$$

Gleichung 3-27

Der Zustand nach Gleichgewichtseinstellung wird als "Steady State" bezeichnet. Die Verzögerungszeit, mit der sich das Gleichgewicht einstellt, wird "Lag-Time" genannt. Die höchste Wirkstoffkonzentration im Gasraum herrscht unmittelbar an der Quelle und wird durch das Verteilungsgleichgewicht zwischen Zubereitung und Gasphase bestimmt. Vor der Diffusionsbarriere der Senke ist die Wirkstoffkonzentration im "Steady State" nahe Null (Abbildung 3-66 und Abbildung 3-67).

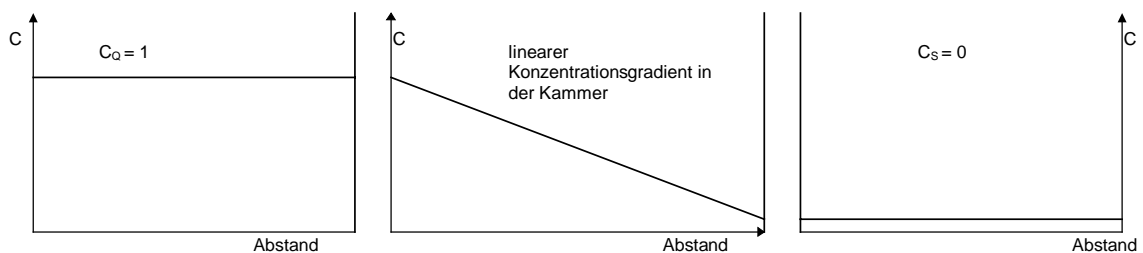


Abbildung 3-66: Schichtenmodell der Diffusion und Verteilung von Substanzen im Steady State, links: Substanzquelle mit $C_Q = 1$, Mitte: Messkammer mit linearem Konzentrationsabfall, rechts: Substanzsenke mit $C_S = 0$

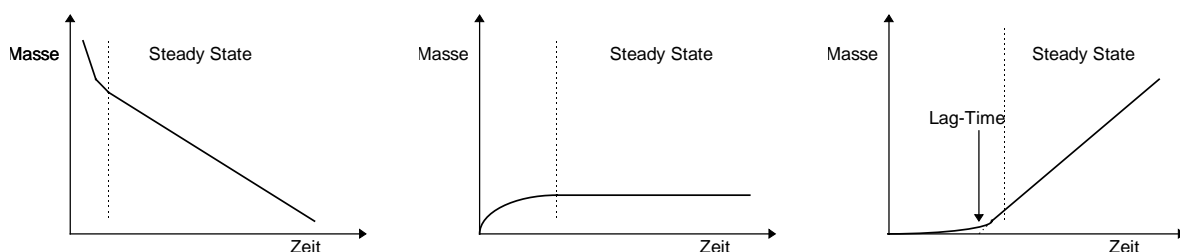


Abbildung 3-67: Änderung der Masse in der Quelle, der Kammer und der Senke vor und nach Erreichen des Fließgleichgewichts

Nach der Ausgangsüberlegung sollten die Insekten ihren Aufenthaltsort in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration in der Gasphase an unterschiedlichen Stellen der Kammer auswählen oder ihr Bewegungsmuster abhängig vom Konzentrationsgradienten in der Kammer ändern.

Die Aufenthaltsorte der Insekten wurden zeitabhängig mit Hilfe von PC-gestützten Bildauswertungsverfahren bestimmt.

3.8.1. Geräte und Materialien

- Für die Untersuchungen an Insekten wurde ein Prototyp der Bewegungsmesskammer aus Acrylglas angefertigt. Das Polyacrylat wurde jedoch an einigen Stellen durch DEET zerstört, so dass eine zweite Kammer aus Glas gebaut wurde, deren Boden und Seitenteile mit einem Netz aus Polyester (Polyethylen-terephthalat) ausgekleidet waren.
- Die für die Aufzucht von Gelbfiebermücken (*Aedes aegypti*) benötigten Eigelege wurden von Herrn Prof. Meier, Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn, zur Verfügung gestellt. Die Zucht erfolgte in einem Klimaschrank (Fa. Weiss) bei 26°C und künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus. Die Larven wurden mit Tetramin® Fischfutter, die Adulten mit 10 %iger Glucose-Lösung gefüttert.
- Digitale Videokamera, DMK 3002/C, Fa. DMK / DBS:
 - Effektive Pixel 752 x 582
 - Pixelgröße 8,6 x 8,3 µm
 - monochrom
- Filterpapier zur Vermeidung von Turbulenzen innerhalb der Kammer, Teefilter Cilia®, Fa. Melitta, Minden
- Filterpapierstreifen (95 mm x 415 mm), ohne Angaben
- PC (400 MHz, 128 MB), Bildauswertungssoftware Image-Pro Plus 4.0, Media Cybernetics, L.P.
- Quecksilberthermometer (Messbereich 5 - 42°C), ohne Firmenangabe, Haar-Hygrometer (Messbereich 0 - 100 % rF), ohne Firmenangabe
- Schwebekörper-Volumenstrommessgerät, Platon, Nr. 61 BHS
- UV-Photospektrometer, Shimadzu, UV-260, Serien-Nr. 1231575
- Vakuumpumpe, Fa. Vacuubrand, Wertheim, Ser. Nr. 17990919 94

Experimenteller Teil

- Ammoniak-Lösung 25 %, M_r : 17,03, Merck, Darmstadt
- Ammoniumchlorid, M_r : 53,49, Merck, Darmstadt
- Edenor V85[®], Mischung aus Vorlaufettsäuren, Henkel, Düsseldorf
- Milchsäure 90 %, M_r : 90,08, Merck, Darmstadt
- Natriumlactat-Lösung 50 %, M_r : 112,1, Merck, Darmstadt

Versuchsbedingungen:

- Beleuchtung:
 - Die Bewegungsmesskammer wurde mit zwei 18 W Leuchtstoffröhren von der Unterseite (Gegenlicht) ausgeleuchtet. Über den Röhren war eine weiß-opake Kunststoffabdeckung angebracht, um diffuses Streulicht zu erzeugen, so dass die Kammer möglichst gleichmäßig ausgeleuchtet war.
- Die Temperatur in der Kammer betrug während der Versuche 26 - 29°C, der Luftdruck 995-1021 mbar und die relative Luftfeuchte 62 -83 %.
- Die Mücken wurden mit Hilfe eines Gerätes in die Kammer eingebracht, das aus einem 32,5 cm langen Acrylglas-Zylinder mit 3,0 cm Außen- und 2,6 cm Innendurchmesser und einem darin beweglichen Acrylglas-Kolben bestand, dessen Fläche (Außendurchmesser: 2,5 cm) ein für Mücken undurchlässiges Netz bildete. Dadurch wurde verhindert, dass beim Einbringen der Insekten Luft aus dem Zylinder in die Kammer gedrückt und der DEET-Gradient gestört wurde.

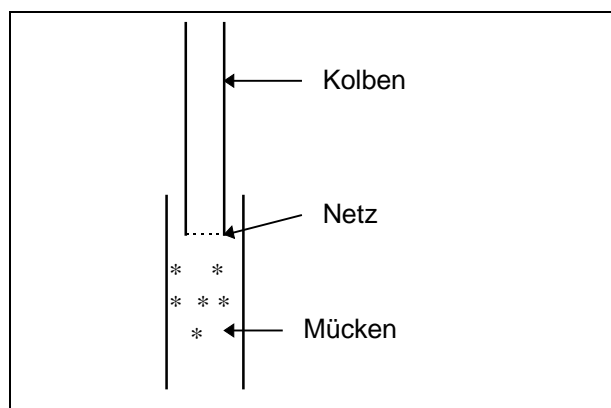


Abbildung 3-68: Gerät zum Einbringen der Mücken in die Kammer (schematisch)

3.8.2. Methoden

Der Abluftkanal, in Abbildung 3-69 auf der rechten Seite der Messkammer dargestellt, war mit einem PVC-Schlauch verbunden, der zu einem Volumenstrommesser führte, mit dem ein konstanter Luftstrom (10 l/h) eingestellt wurde. Von dem Volumenstrommesser wurde die Luft über einen weiteren Druckschlauch in die Auffangflüssigkeit einer Waschflasche, die mit einer Vakuumpumpe verbunden war, geleitet. Oberhalb der Messkammer war im Abstand von ca. 50 cm eine Digitalkamera angebracht, mit der in bestimmten Zeitabständen Bilder aufgenommen und computergestützt ausgewertet werden konnten.

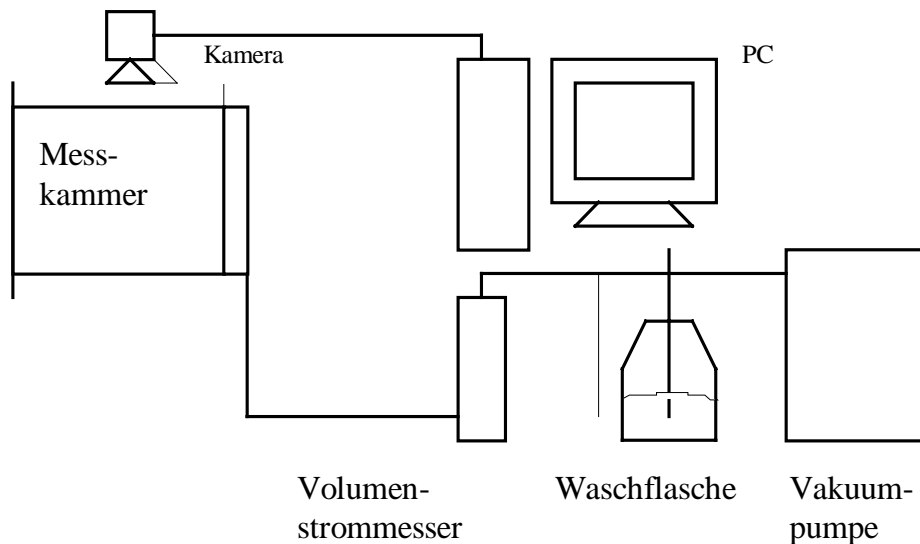


Abbildung 3-70: Systemaufbau, schematisch

Bestimmung des Zeitpunkts der Einstellung eines Fließgleichgewichts

Ein 95 x 415 mm großer Filterpapierstreifen wurde mit reinem DEET oder Formulierungen getränkt bzw. beschickt (10 g \pm 3 g), auf einem Probenhalter aus Weißblech befestigt und an der dem Abluftkanal gegenüberliegenden Schmalseite der Kammer angebracht. Er diene als Quelle.

Experimenteller Teil

Die zur Einstellung des "Steady State" erforderliche Zeit wurde bestimmt, indem der Luftstrom durch eine mit 100 ml Propylenglycol gefüllte Waschflasche geleitet und die DEET-Konzentration in der Waschflüssigkeit spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 230$ nm bestimmt wurde. Der Volumenstrom wurde auf 10 l Luft pro Stunde eingestellt. Die Temperatur in der Kammer lag zwischen 26°C und 28°C. Die Probenentnahmen erfolgten stündlich.

Zunächst wurde das Experiment ohne das Filter durchgeführt, das dazu diente auf der Schmalseite des Senkenkompartiments Luftverwirbelungen zu verhindern. Der Abluftkanal war nur durch ein Polyesternetz von der Kammer getrennt. Die abgedampfte DEET-Menge wurde in Sammelintervallen von 1 h in Propylenglycol aufgefangen und UV-photometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass die DEET-Menge bereits nach 1 h linear zunahm (Abbildung 3-71), was darauf hindeutete, dass der Steady State erreicht war. Die Korrelation der Messpunkte mit der Regressionsgeraden war dabei mit $R = 0,999$ sehr gut. Aus der Geradensteigung wurde eine Verdampfungsgeschwindigkeit von 0,27 mg/h ermittelt. Jedoch ließ sich bei diesem Versuch keine Lag-Zeit bestimmen, die den Zeitpunkt der Einstellung des Fließgleichgewichts angezeigt hätte, da die Ausgleichsgerade die Ordinate bei 0,1 mg schnitt. Wegen seines geringen Dampfdrucks (0,75 Pa bei 20°C) verdampft DEET sehr langsam [121].

Die Sammelintervalle konnten nicht kleiner gewählt werden, da in entsprechend kleinen Zeitabschnitten die DEET-Mengen so gering gewesen wären, dass ihre Absorption nicht mehr im linearen Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes gelegen hätte. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Werte kleiner Sammelintervalle stark streuten (Variationskoeffizienten z.T. über 50 %). Da die Zunahme der DEET-Menge während des gesamten Versuchsablaufs linear anstieg, konnte davon ausgegangen werden, dass sich bereits ein Fließgleichgewicht eingestellt hatte und dass auch nach 8 h die Wirkstoffquelle noch nicht erschöpft war.

Das gleiche Experiment wurde mit einem Filter vor der Substanzsenke wiederholt. Die Konzentration nahm pro Stunde um 0,1 mg zu, auch hier lag der Ordinatenabschnitt mit 0,02 mg über dem Ursprung des Koordinatensystems, so dass keine Lag-Zeit bestimmt werden konnte (Abbildung 3-72).

Experimenteller Teil

Das Experiment zeigte, dass die Geschwindigkeit, mit der DEET in die Auffangflüssigkeit diffundiert, durch das Filter herabgesetzt wurde, woraus demzufolge ein kleinerer Konzentrationsgradient in der Kammer resultierte. Das Filter stellte somit eine Diffusionsbarriere für DEET dar. Die größere Streuung der Werte in dem Versuch ohne Filter ließ auf die Bildung von Luftwirbeln in der Kammer schließen, die durch das Absaugen der Luft hervorgerufen wurden und zur Störung des Fließgleichgewichts führten.

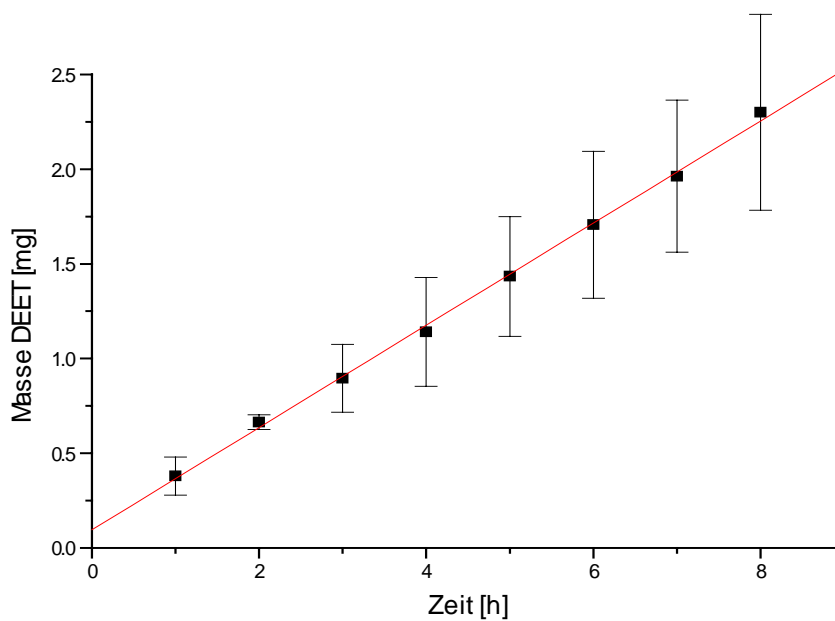


Abbildung 3-71: Kumulativ aufgetragene Menge DEET [mg], die in 100 ml Propylenglycol aufgefangen wurde, $n = 3$, Fehlerbalken = Standardabweichung, $R = 0,999$, Steigung = $0,27$ [mg/h], ohne Diffusionsbarriere

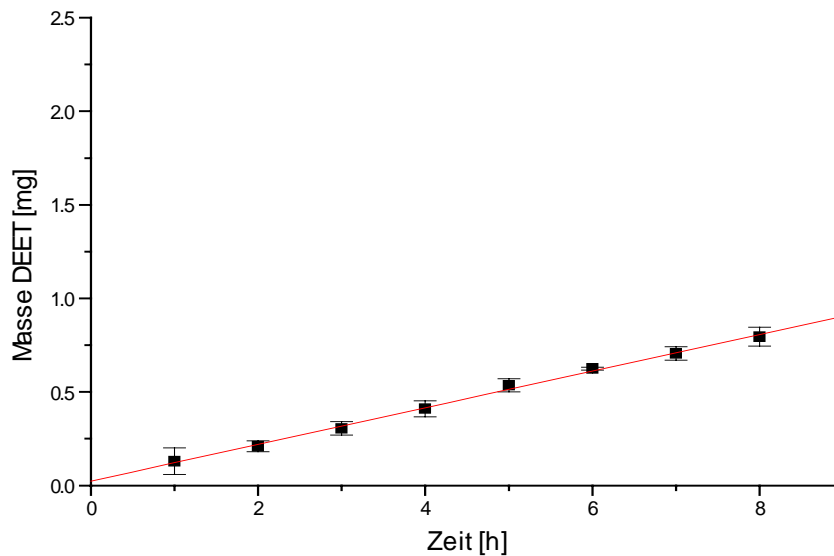


Abbildung 3-72: Kumulativ aufgetragene Menge DEET [mg], die in 100 ml Propylenglycol aufgefangen wurde, $n = 3$, Fehlerbalken = Standardabweichung, $R = 0,999$, Steigung = $0,10$ [mg/h], mit Filterpapier als Diffusionsbarriere

Bewegungsanalyse

Innerhalb des Zeitintervalls von ca. 1 h bis 7 h nach Einbringen der Wirkstoffquelle, d.h. nach der Einstellung des Steady State und bevor die Wirkstoffquelle erschöpft war, wurden Bewegungsexperimente mit Insekten durchgeführt. Pro Experiment wurden 7-50 Stechmücken mit Hilfe des Acrylglaskolbens in die Mitte der Kammer eingebracht. Dabei wurde durch vorsichtige Handhabung darauf geachtet, dass eine Störung des ruhenden Gasvolumens weitgehend vermieden wurde. Mit Hilfe einer Digitalkamera wurden einzelne Bilder aufgenommen, die computergestützt ausgewertet werden konnten.

Die Versuchsdauer betrug 30 min, dabei wurde innerhalb von 3 min jeweils 1 Bild aufgenommen.

Bildanalyse

Jedes der digitalisierten Bilder bestand aus einem Beobachtungsfeld von 640 x 480 Pixeln. Ein Pixel entsprach der Fläche eines Quadrates mit einer Kantenlänge von ca. 0,8 mm. Da es sich um Schwarz-Weiß-Bilder handelte, wurde jedem Pixel ein durch 8 Bits definierter Grauwert zugeordnet. Image-Pro Plus 4.0® verwendet eine Skala von 256 Graustufen, wobei ein Pixelwert von 0 schwarz und ein Wert von 255 weiß bedeutet [122].

Bevor Mücken in die Messkammer eingebracht wurden, wurde zunächst ein Hintergrundbild der leeren Kammer erstellt.

Von den Aufnahmen der Versuchsreihen wurde dieses Hintergrundbild subtrahiert, um einzelne Bestandteile der Kammer im Bild zu entfernen, da sie bei der Auswertung störten. Anschließend wurde der Bildausschnitt (AOI = Area of interest) festgelegt, in dem die Mücken gezählt und deren Aufenthaltskoordinaten bestimmt werden sollten. Bildflächen (Area) von ca. 1-40 Pixel mit Graustufen von 0- ca. 120 wurden als Mücken definiert.

Jedoch wurden bei jedem Versuch die Pixel- und Graustufenwerte korrigiert, da die Messkammer nach Reinigung leicht verschoben war und die an einem stufenlos verstellbarem Stativ befestigte Kamera neu eingestellt werden musste.

Die folgenden Abbildungen repräsentieren den typischen Ablauf einer Bildanalyse. Die Wirkstoffquelle befindet sich am linken, die -senke am rechten Bildrand. Als Testsubstanz wurde in diesem Beispiel Rezeptur 4.2 verwendet.

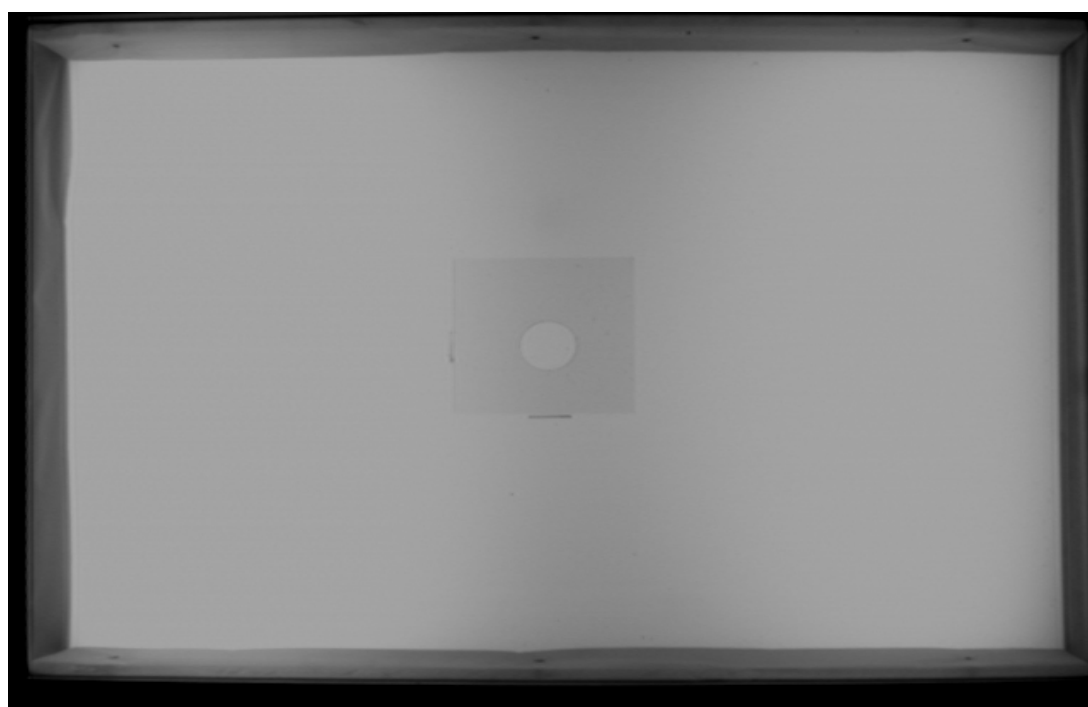


Abbildung 3-73: Hintergrundbild

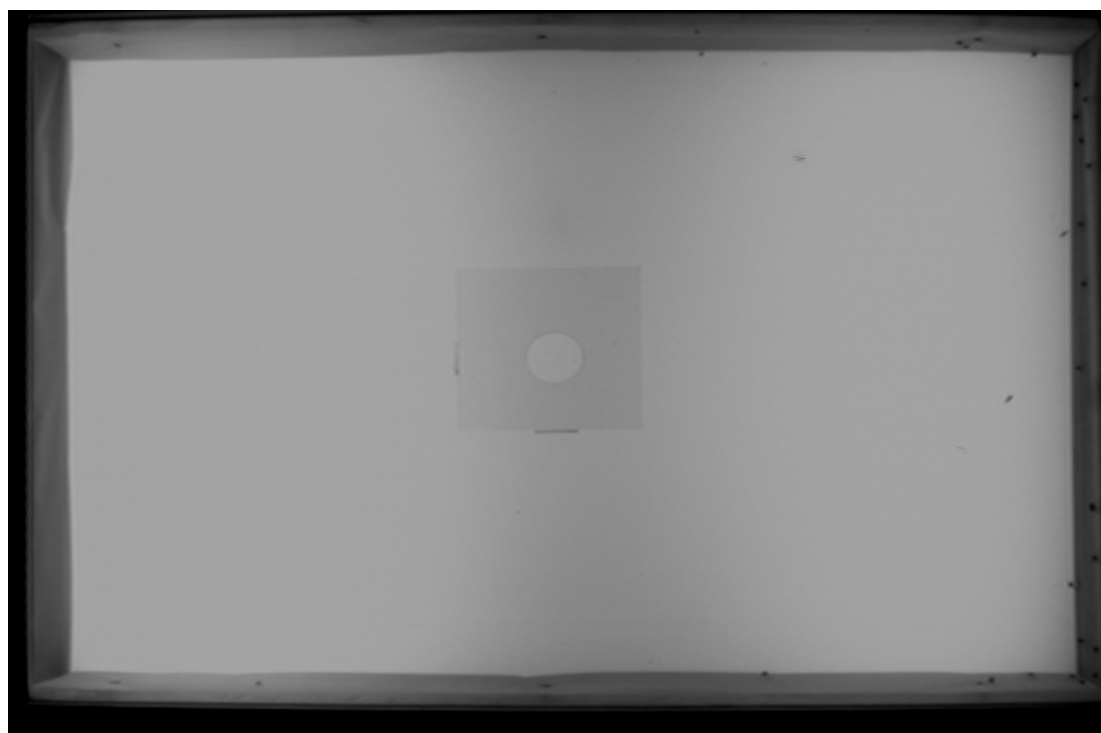


Abbildung 3-74: Messkammer mit Mücken



Abbildung 3-75: Bild nach Hintergrundkorrektur

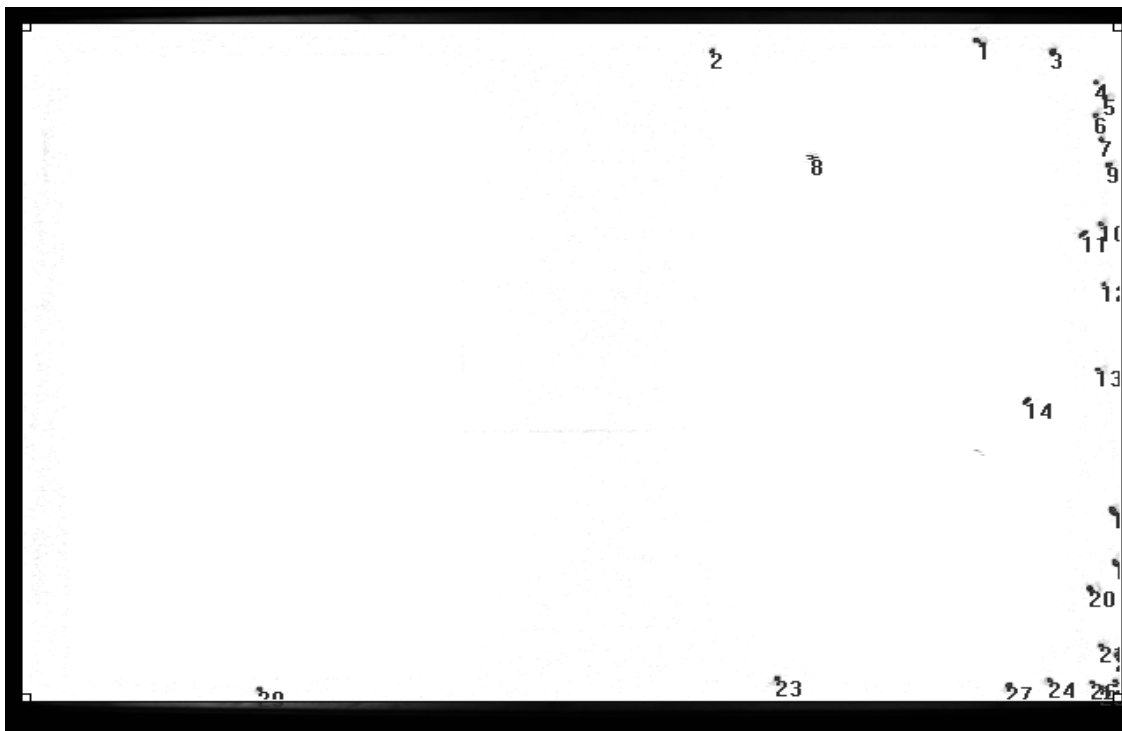


Abbildung 3-76: Mücken zählung nach vollständiger Bildbearbeitung und Festlegung der notwendigen Einstellungen (z.B. AOI mit Bildursprungs koordinaten: $x = 10$, $y = 10$ und Endkoordinaten : $x = 635$, $y = 450$; Graustufen: 0-125)

Anmerk.: Im Anhang wurde ein Beispiel-Macro zu diesem Versuch eingefügt.

Experimenteller Teil

Aufenthalt von Aedes aegypti

Unter der Annahme, dass sich die Insekten bei Abwesenheit von Substanzquellen weder auf der Seite des Quellkompartiments noch auf der gegenüberliegenden Seite bevorzugt aufhalten, wurde zunächst auf Gleichverteilung der Mücken geprüft. In Vorversuchen wurde beobachtet, dass sich die Insekten vorwiegend an senkrechten Oberflächen der Kammer absetzten und sich nicht, wie zunächst vermutet, in Schwärmen bewegten oder alternativ dazu gleichmäßig im gesamten Innenraum verteilten. Der Probenhalter wurde dazu mit dem reinen Lösungsmittel Propylenglycol beschickt.

Die Insekten wurden in die Mitte der Kammer eingebracht, und es wurde gezählt, wieviele sich

a) auf den beiden Seiten der Kammer von jeweils 250 mm Breite parallel zur Quelle ("Quellhälfte") und Senke ("Senkenhälfte") hin (Abbildung 3-77)

sowie

b) an senkrechten beziehungsweise waagerechten Flächen (Abbildung 3-78) aufhielten.

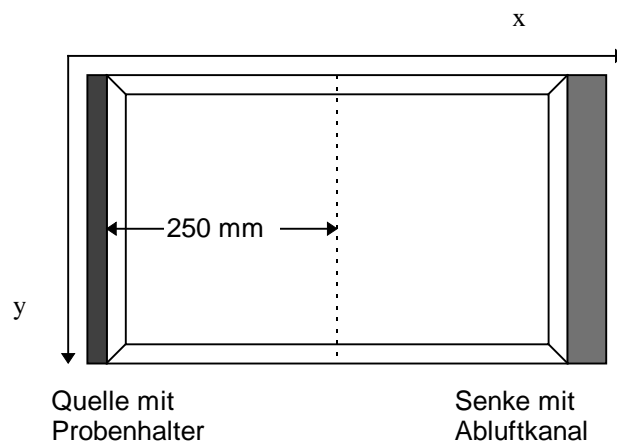


Abbildung 3-77: Skizze der Bewegungsmesskammer in Aufsicht

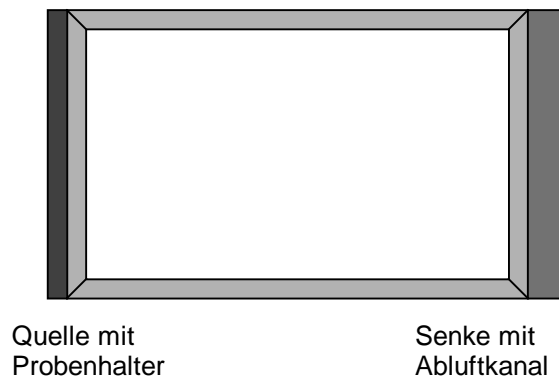


Abbildung 3-78: Skizze der Bewegungsmesskammer in Aufsicht, senkrechte Flächen: hellgrau, waagerechte Flächen: weiss

Eine genauere Bestimmung der Entfernung der Mücken in x-Richtung von der jeweiligen Substanzquelle schien nicht sinnvoll zu sein, da sie sich in Gegenwart von Stoffen bevorzugt an einer Schmalseite der Kammer aufhielten (vgl. Abbildung 3-76).

Attractants

Geier [123] zeigte mit der konventionellen Versuchsanordnung, dem Y-Rohr, dass eine wässrige Lösung von 89 mmol/l Milchsäure und 80 mmol/l Ammoniumchlorid, aufgrund eines Synergismus von Milchsäure und Ammoniak, anziehend auf *Aedes aegypti* wirkt. Bei der Versuchsanordnung, die Geier benutzte, befindet sich an einem der drei Enden eine Freisetzungskammer mit Mücken, an einem anderen Ende die zu testende Substanz und am dritten Natriumchlorid-Lösung (10 mmol/l), Milchsäure- / Natriumlactat-Lösung (9 mmol/l bzw. 80 mmol/l) oder Ammoniaklösung (ohne Konz.-Angabe) als Referenzsubstanz. Bei seinem Experiment zeigte sich, dass 83,5 % der Mücken die Freisetzungskammer verließen, 44 % der Versuchstiere das Attractant und 1 % die Kontrollkammer mit Milchsäure- / Lactat-Pufferlösung anfliegen. Anhand von drei wässrigen Lösungen (Tabelle 3-19) wurde in der Bewegungskammer die anziehende Wirkung einzelner Substanzen, die typischerweise im menschlichen Schweiß enthalten sind, untersucht. Zur Dampfdruckerniedrigung enthielten die Lösungen 30 % Propylenglycol, der bei Vorversuchen (s. 3.8.3) keinen Eigeneffekt auf das Verhalten der Mücken gehabt hatte.

Experimenteller Teil

Substanzen	Attractant 1	Attractant 2	Attractant 3
Ammoniumchlorid	103,0 mmol/l	100,0 mmol/l	1,0 mol/l
Ammoniak	-	74,0 mmol/l	0,7 mol/l
Milchsäure	100,7 mmol /l	100,0 mmol/l	1,0 mol/l
Natriumlactat	-	50,0 mmol/l	0,5 mol/l

Tabelle 3-19: Zusammensetzung der Attractant-Lösungen

Repellents

Um einen Zusammenhang zwischen der aufgetragenen DEET-Menge und der Repellent-Wirkung zu untersuchen, wurde der Probenhalter mit DEET-Lösungen in Propylenglycol in Konzentrationen von 0,001 % bis 100 % DEET beschickt. Tabelle 3-20 gibt an, wieviel DEET pro Fläche Filterpapier jeweils aufgetragen wurde. Die DEET-Dosis auf der Haut beträgt bei Stechtests 20 - 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [31, 98].

Für die Versuche wurde ein minimaler Stichprobenumfang von 10 Mücken pro Versuch angesetzt, mit jeweils drei Wiederholungen für eine DEET-Konzentration, so dass ein Gesamtstichprobenumfang von 30 Mücken pro Konzentration erhalten wurde. Zum Teil reichte die Anzahl der herangezuchteten Mücken jedoch nicht aus, um die minimalen Stichprobenumfänge zu erzielen. Deshalb wurde aus Gründen der statistischen Sicherheit die Zahl der Versuche bei DEET-Konzentrationen von 100 % und 1 % erhöht.

Da die jeweils aufgetragene DEET-Menge bei Versuchen mit 0,1 %igen DEET-Lösungen nur noch 1/100 bis 1/20 der für die Anwendungspraxis relevanten DEET-Menge betrug, wurde die Anzahl der Versuche erhöht.

Die Hintergrundbearbeitung eines Versuchs mit 0,001 %iger DEET-Lösung schlug fehl. Da der Gesamtstichprobenumfang von zwei Experimenten aber über 30 Mücken lag, wurde der Versuch nicht wiederholt.

Experimenteller Teil

DEET-Konzentration	0,001 %	0,01 %	0.1 %	1 %	10 %	100 %
Aufgetragene Menge [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	0,18	1,71	28,74	185,42	1988,59	16918,20
	0,20	1,99	19,91	180,85	2077,36	16639,19
		2,39	20,70	197,84	2353,84	15573,87
			23,36	217,88		17831,33
				204,95		

Tabelle 3-20: DEET-Konzentrationen und die dazu aufgetragenen DEET-Mengen pro Fläche

Ausgewählte Rezepturen

Rezepturen, die hinsichtlich ihrer Haftfestigkeit (Kapitel 3.2) und Lagerstabilität (Kapitel 3.1.3) anderen überlegen waren, wurden mit Hilfe der Bewegungsanalyse untersucht.

Tabelle 3-21 zeigt die DEET-Mengen, die pro cm^2 Filterpapier aufgetragen wurden. In einem zusätzlichen Experiment wurde getestet, ob Edenor V 85®, ein Gemisch aus Kokosnuss-Vorlaufettsäuren, repellierende Wirkung zeigt.

Rezepturen	1.7	3.10	4.2
DEET-Gehalt [%] der Rezepturen	34,9	29,4	30,7
Aufgetragene Menge [mg/cm^2]	7,21	6,50	7,17
	5,38	6,74	6,21
	6,25	5,80	5,62

Tabelle 3-21: Pro Versuch aufgetragene Menge DEET

Experimenteller Teil

Langzeitversuche

In je einem abschließenden Versuch wurde getestet, ob nach dem Auftragen praxisrelevanter Mengen (Tabelle 3-22) eine zeitliche Begrenzung der Repellentwirkung zu erkennen ist. Die gesamte Versuchsdauer wurde auf neun Stunden erhöht, wobei unmittelbar nach Einbringen der Mücken sowie zu jeder vollen Stunde ein Bild aufgenommen wurde.

Wegen der unterschiedlichen Substanzeigenschaften wie Viskosität und Spreitungsverhalten auf dem Filterpapierstreifen variierten die aufgetragenen Mengen der Zubereitungen stark (Tabelle 3-22).

Rezeptur	1.7	3.10	4.2	BW	US-Army	Autan
Aufgetragene Menge [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	2425,5	507,1	950,0	458,3	1752,5	385,0
DEET-Gehalt [%]	34,9	29,4	30,7	31,7	38,6	22,0

Tabelle 3-22: Pro Versuch aufgetragene Menge DEET

Im Vergleich zu den DEET-Zubereitungen wurde das Handelspräparat Bio-Hautschutz® getestet, das als wirksamen Bestandteil eine Vorlauf-Fettsäuremischung enthält. Insgesamt wurde davon eine Menge von 4,64 mg Zubereitung pro cm^2 Filterpapier aufgetragen.

Statistische Auswertung

Zeitunabhängige Auswertung

Die Mücken auf der Quell- und der Senkenhälfte wurden gezählt. Pro Versuchsreihe von 10 Bildern wurde durch Bildung des arithmetischen Mittels der Anzahl Mücken auf jeweils einer Kammerhälfte, unter Vernachlässigung möglicher zeitlicher Einflüsse auf das Verhalten der Mücken, ein mittlerer Aufenthalt angegeben. Da Mittelwerte ($\overline{x_1}, \overline{x_2}, \overline{x_3}, \dots, \overline{x_k}$) unterschiedlich großer Stichprobenumfänge ($n_1, n_2, n_3, \dots, n_k$) mehrerer Messreihen (k) zusammengeführt werden sollten, wurde der durchschnittliche Aufenthalt der Insekten mit Hilfe des gewogenen arithmetischen Mittelwertes berechnet [110].

$$\bar{x}_{\text{gew}} = \frac{n_1 \cdot \bar{x}_1 + n_2 \cdot \bar{x}_2 + \dots + n_k \cdot \bar{x}_k}{n}$$

Gleichung 3-28

Die Standardabweichung (s) der Mittelwerte vom gewogenen Mittel wurde folgendermaßen berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1) + \dots + s_k^2(n_k - 1)}{n - k}}$$

Gleichung 3-29

Dabei waren $s_1^2, s_2^2, \dots, s_k^2$ die Varianzen der verschiedenen Messreihen.

Um zu prüfen, ob sich

- a) in der Quell- oder Senkenhälfte bzw.
- b) auf senkrechten oder waagerechten Flächen gleich viele Mücken aufhielten (Prüfung auf Gleichverteilung), wurde der nicht-parametrische χ^2 -Test durchgeführt.

Er eignet sich für Datensätze von diskreten Häufigkeitsverteilungen, deren Daten aus der Menge der natürlichen Zahlen sind, wie es bei der Mückenzählung der Fall war, und die Anzahl der Stichproben größer oder gleich zwei ist ($k \geq 2$). Die Nullhypothese (H_0) lautet: Die ermittelten Werte (f_i) unterscheiden sich nicht statistisch signifikant von einem Erwartungswert (e_i). H_0 wird angenommen, wenn die Prüfgröße χ^2 kleiner ist als der tabellierte Wert $\chi^2_{v;\alpha}$ mit v Freiheitsgraden und der Irrtumswahrscheinlichkeit α [110, 112]. Die Testgröße wurde nach Gleichung 3-30 berechnet:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(f_i - e_i)^2}{e_i}, \text{ mit FG} = v = k-1 \text{ und } e_i = \frac{n_i}{2}$$

Gleichung 3-30

Dabei war n_i der Stichprobenumfang und f_i die Anzahl der Mücken auf der Quellhälfte (für die Prüfung von a)) bzw. die Anzahl der Mücken auf den senkrechten Flächen (für die Prüfung von b)).

Experimenteller Teil

Für den Erwartungswert e_i galt, dass sich sowohl in der Quell-, als auch in der Senkenhälfte bzw. sowohl auf den waagerechten, als auch auf den senkrechten Flächen jeweils die Hälfte der Mücken aufhielten.

Da sich χ^2 -Werte additiv verhalten, ließ sich eine Gesamtprüfgröße aus der Summe der einzelnen Prüfgrößen bestimmen [110].

$$\chi_{ges}^2 = \chi_1^2 + \chi_2^2 + \chi_3^2 + \dots + \chi_l^2, \text{ mit } FG = \nu_{ges} = \nu_1 + \nu_2 + \nu_3 + \dots + \nu_l$$

Gleichung 3-31

Zeitabhängige Auswertung

Mit Hilfe des gewogenen arithmetischen Mittels wurden die relativen Häufigkeiten des Aufenthalts von Insekten in der Kammer berechnet und in Diagrammen über die Zeit aufgetragen. Dadurch sollte ermittelt werden, ob sie sich zeitabhängig in der Kammer verteilen.

3.8.3. Ergebnisse

Aufenthalt von *Aedes aegypti*

Bei Vorversuchen fiel auf, dass sich die Mücken in der Messkammer nur selten bewegten, stattdessen auf den Moskitonetzen auf den Seitenteilen der Kammer absetzten und zumeist in Ruhe dort verharren, Tabelle 3-23 zeigt das Ergebnis von 4 Versuchen, bei denen jeweils 10 Bilder mit einem mittleren Stichprobenumfang von $n = 38,8$ Mücken ausgewertet wurden.

Experimenteller Teil

	Versuch Nr.	Anzahl der Mücken = n	Anzahl der Mücken auf		Anteil [%] der Mücken auf	
			senk- rechten Flächen	waage- rechten Flächen	senk- rechten Flächen	waage- rechten Flächen
	1	36	30 (2,6)	6 (2,9)	83,3 (7,2)	16,7 (8,1)
	2	35	30 (2,7)	5 (1,6)	85,7 (7,7)	14,3 (4,6)
	3	36	29 (3,6)	7 (3,5)	80,6 (10,0)	19,4 (9,7)
	4	48	39 (5,5)	9 (4,2)	81,3 (11,5)	18,7 (8,8)
Summe gew. arithmet. Mittel		155	128 32,4 (4,0)	27 7,1 (3,3)	 82,0 (10,1)	 18,0 (8,4)

Tabelle 3-23: Aufenthalt von *Ades aegypti* auf den Seitenflächen und auf dem Boden der Bewegungsmesskammer, in Klammern: Standardabweichung bzw. Variationskoeffizient [%]

Die Nullhypothese (H_0) für den χ^2 -Test, alle Mücken verteilen sich auf senkrechten wie auf waagerechten Flächen gleich, muss mit $\chi^2_{(ber)} = 335 > \chi^2_{(0,05, 36)} = 51,00$ deshalb abgelehnt werden. Die Fläche der Seitenteile beträgt 6,96 dm², die des Bodens 18,50 dm². Dies bedeutet, dass sich pro dm² Seitenfläche 4,7 und pro dm² Grundfläche 0,4 Mücken aufhielten.

Verhalten gegenüber Attractants

Zunächst wurde untersucht, ob Propylenglycol einen Einfluss auf den Aufenthalt der Insekten ausübt. Tabelle 3-24 verdeutlicht, dass sie sich gegenüber dem Lösungsmittel indifferent verhielten und weder die der Probenquelle noch die der Probensenke zugewandte Seite bevorzugten.⁴

⁴ In den Überschriften der Tabellenspalten werden die Quelhälfte mit "QH", die Senkenhälfte mit "SH" und das gewogene arithmetische Mittel mit "*arithm.MW_{gew}*" abgekürzt.

Experimenteller Teil

Rezeptur	Anzahl Versuche (Gesamtstichpro- benumfang n_{ges})	Anzahl Mücken (QH), arithm.MW _{gew} (StdAbw)	Anzahl Mücken (SH), arithm.MW _{gew} (StdAbw)
Propylenglycol	7 (183)	13,1 (2,1)	13,9 (2,4)
Attractant 1	3 (90)	12,1 (4,0)	16,5 (3,9)
Attractant 2	3 (79)	13,4 (1,8)	12,0 (2,1)
Attractant 3	3 (81)	12,1 (1,8)	16,0 (1,8)

Tabelle 3-24: Aufenthalt von *Aedes aegypti* in Gegenwart von Propylenglycol als indifferentem Lösungsmittel und Attractant-Mischungen

Der χ^2 -Test stützt die Nullhypothese (H_0) auf dem 5 %-Niveau, dass sich in Gegenwart des Lösungsmittels gleich viele Mücken auf der Quell- bzw. Senkenhälfte aufhalten mit $\chi^2_{(ber)} = 34,7 < \chi^2_{(0,05, 63)} = 82,53$. Es wurden 7 Versuche durchgeführt und im Abstand von 3 min jeweils 10 Bilder aufgenommen und ausgewertet, mit einem mittleren Stichprobenumfang von $n = 26,1$ Mücken.

Die Nullhypothese muss für Attractant 1 mit einem mittleren Stichprobenumfang $n = 29,9$ abgelehnt werden, da $\chi^2_{(ber)} = 63,8 > \chi^2_{(0,05, 27)} = 40,11$. Dies bedeutet, dass sich in der Hälfte des Senkenkompartiments mehr Insekten aufhielten als in der gegenüberliegenden Hälfte. Für die Attractant-Lösungen 2 und 3 ist H_0 nicht abzulehnen mit $\chi^2_{(ber)}$ für Attractant 2 = 31,6 und $\chi^2_{(ber)}$ für Attractant 3 = 12,3. Die mittleren Stichprobenumfänge betragen für Attractant 2 = $n = 26,6$ und für Attractant 3 = $n = 26,9$. Die Versuche wurden dreimal wiederholt.

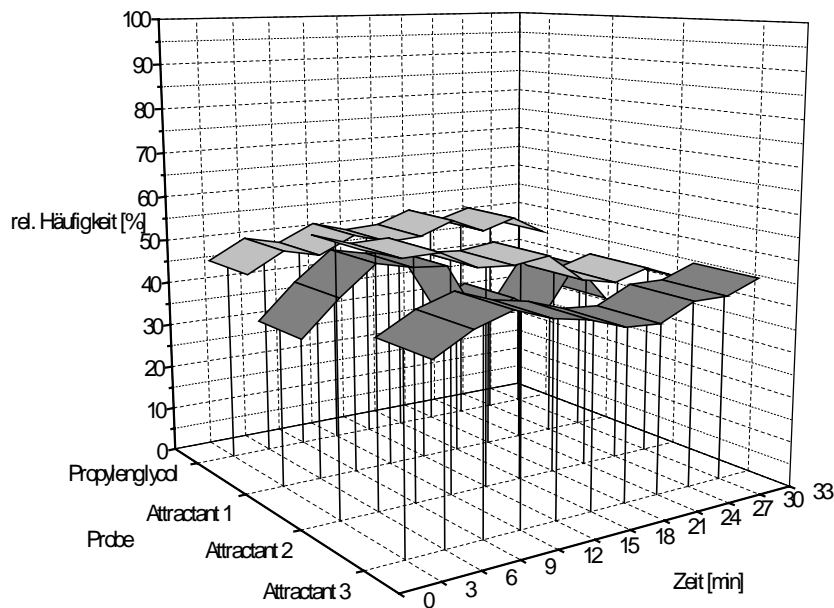


Abbildung 3-79: Relative Häufigkeit [%] des Aufenthalts von *Aedes aegypti* in der der Quelle zugewandten Seite der Kammer

Betrachtet man die relative Häufigkeit, mit der sich die Mücken in der der Senke zugewandten Hälfte aufhielten, entdeckt man zwischen den Versuchen mit reinem Lösungsmittel und den Attractants 2 und 3 keinen Unterschied. Auch während der gesamten Versuchsdauer konnte keine Tendenz zur Richtungsänderung erkannt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Geier zeigten die drei Attractant-Mischungen hier keine anziehende Wirkung auf die Insekten (Abbildung 3-79).

Verhalten gegenüber Repellents

Die Mittelwerte in Tabelle 3-25 verdeutlichen, dass Lösungen vom 0,01 % DEET in Propylenglycol bis 100 % DEET eine deutliche Fluchtreaktion der Insekten auslösen. Bei einer Konzentration von 0,001 % DEET in Propylenglycol, dies entspricht einer aufgetragenen DEET-Menge von ca. $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf dem Filterpapier, lässt sich keine Repellent-Wirkung mehr feststellen.

Experimenteller Teil

Rezeptur	Anzahl Versuche (Gesamtstichprobenumfang n_{ges})	Anzahl Mücken (QH), arithm.MW _{gew} (StdAbw)	Anzahl Mücken (SH), arithm.MW _{gew} (StdAbw)
0,001 % DEET	2 (48)	16,7 (2,9)	10,4 (2,6)
0,01 % DEET	3 (36)	2,3 (1,4)	9,5 (3,3)
0, 1 % DEET	4 (188)	13,2 (2,8)	34,1 (3,8)
1 % DEET	5 (63)	2,2 (1,4)	13,2 (1,5)
10 % DEET	3 (35)	2,0 (1,4)	7,1 (1,4)
100 % DEET	4 (53)	2,0 (1,4)	15,2 (1,7)

Tabelle 3-25: Aufenthalt von *Aedes aegypti* in Gegenwart verschiedener Lösungen von DEET in Propylenglycol

Für die Lösung von 0,001 % DEET liegt der $\chi^2_{(ber)}$ -Wert unter dem tabellierten Wert, was bedeutet, dass die Nullhypothese H_0 , die Mücken halten sich auf beiden Hälften der Kammer gleich häufig auf, angenommen werden kann. Bei allen anderen DEET-Lösungen wird sie abgelehnt. In Tabelle 3-26 sind die berechneten und tabellierten χ^2 -Werte mit den entsprechenden Freiheitsgraden aufgelistet.

Rezeptur	$\chi^2_{(ber)}$	$\chi^2_{(tab)}$ für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$	Anzahl der Freiheitsgrade
0,001 % DEET	15,6	28,87	18
0,01 % DEET	85,3	40,11	27
0, 1 % DEET	214,0	51,00	36
1 % DEET	175,8	61,66	45
10 % DEET	69,6	51,00	36
100 % DEET	145,5	61,66	45

Tabelle 3-26: χ^2 -Werte für Versuche mit verschiedenen Lösungen von DEET in Propylenglycol

Aus Abbildung 3-80: Relative Häufigkeit [%] des Aufenthalts von *Aedes aegypti* in der der Quelle zugewandten Hälfte der Kammer erkennt man, dass die Insekten bei 0,001 % DEET-Lösung während der gesamten Versuchsdauer gleichmäßig auf beiden Hälften der Kammer verteilt waren. Auch bei den anderen Experimenten war

Experimenteller Teil

keine zeitabhängige Änderung der Aufenthaltsorte zu bemerken. Die relative Häufigkeit, mit der sich die Mücken in der Quellhälfte aufhielten, unterschied sich bei DEET-Konzentrationen von 0,01 % bis 100 % kaum.

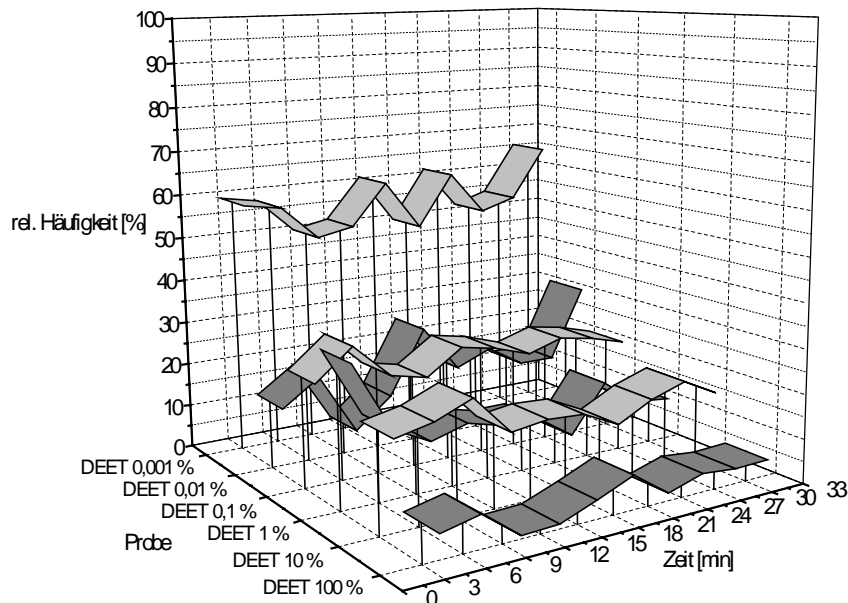


Abbildung 3-80: Relative Häufigkeit [%] des Aufenthalts von *Aedes aegypti* in der der Quelle zugewandten Hälfte der Kammer

Die DEET-Konzentration für einen repellierenden Effekt wurde bei diesen in-vitro-Versuchen für Bereiche nachgewiesen, die größer als 0,01 % DEET in Propylenglycol waren, was einer aufgetragenen DEET-Menge von ca. $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ entsprach. Daraus folgt, dass die wirksame Dosis zwischen ca. $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0,001 % DEET in Propylenglycol) und $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0,01 % DEET in Propylenglycol) lag.

Verhalten gegenüber ausgewählten Rezepturen und Vorlaufettsäuren

Die Rezepturen 1.7, 3.10, 4.2, das Insektenschutzmittel Bw und die Vorlaufettsäuremischungen sind im in-vitro-Experiment wirksam (Tabelle 3-27 und Abbildung 3-81). Eine Tendenz zur Änderung des Aufenthaltsorts während der Versuchsdauer ist aus den Ergebnissen nicht zu erkennen.

Experimenteller Teil

Rezeptur	Anzahl Versuche (Gesamtstichprobenumfang n_{ges})	Anzahl Mücken (QH), arithm. MW_{gew} (StdAbw)	Anzahl Mücken (SH), arithm. MW_{gew} (StdAbw)
Edenor V 85®	1 (15)	3,9 (3,2)	11,4 (1,8)
BW	2 (39)	4,9 (3,5)	13,3 (2,7)
1.7	2 (36)	1,7 (1,2)	16,4 (2,1)
3.10	2 (60)	3,8 (1,5)	26,2 (2,5)
4.2	2 (64)	2,5 (1,4)	31,3 (3,6)

Tabelle 3-27: Aufenthalt von *Aedes aegypti* in Gegenwart von Repellent-Formulierungen und Vorlauffettsäuren über 30 min

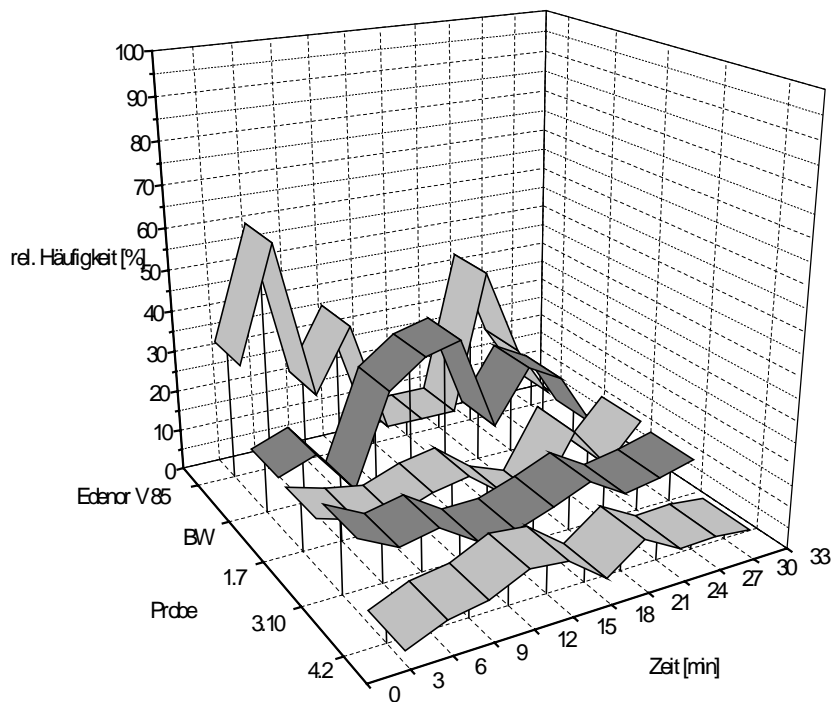


Abbildung 3-81: Relative Häufigkeit [%] des Aufenthalts von *Aedes aegypti* in der der Quelle zugewandten Hälfte der Kammer

Experimenteller Teil

Berechnet man die χ^2 -Werte für die verschiedenen Zubereitungen (Tabelle 3-28), muß die Nullhypothese H_0 : Alle Mücken halten sich in beiden Hälften der Kammer gleich häufig auf, zu gunsten der Alternativhypothese abgelehnt werden. Alle Zubereitungen hatten einen repellierenden Effekt, der jedoch nach Vergleich der χ^2 -Werte, bei der Kokosnuss-Vorlaufettsäuremischung (Edenor V 85®) am schwächsten und bei Rezeptur 4.2 am stärksten ausgeprägt war.

Rezeptur	$\chi^2_{(ber)}$	$\chi^2_{(tab)}$ für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$	Anzahl der Freiheitsgrade
Edenor V 85®	27,4	16,9	9
BW	79,8	28,87	18
1.7	123,4	28,87	18
3.10	174,7	28,87	18
4.2	236,8	28,87	18

Tabelle 3-28: χ^2 -Werte für Versuche mit verschiedenen DEET-Zubereitungen, Beobachtungszeitraum: 30 min

Langzeitversuche

Um einen Eindruck von zeitabhängigen Reaktionen der Insekten auf Repellent-Formulierungen zu bekommen, wurden Einzelversuche über 9 h durchgeführt. Aus Tabelle 3-29 ist zu erkennen, dass der Anteil der Mücken in der Quellhälfte bei fast allen Formulierungen im Mittel kleiner war als der Anteil auf der der Wirkstoffsenke zugewandten Hälfte. Ausnahme ist das Insektenschutzmittel der US-Army, bei dem sich die Insekten durchschnittlich mehr in der Quellhälfte aufhielten.

Betrachtet man die zeitabhängige Änderung der Aufenthaltsorte bei Rezeptur 1.7 (Abbildung 3-82), zeigten die Mücken bereits wenige Sekunden, nachdem sie in die Mitte der Kammer eingebracht worden waren, eine Fluchtreaktion. Nur 15 % der Tiere befanden sich auf der der Quelle zugewandten Seite.

Bei den Rezepturen 4.2 und 3.10 befanden sich zu Versuchsbeginn noch ca. 25 % der Mücken in der Nähe des Quellkompartiments. In Gegenwart von Rezeptur 3.10 (Abbildung 3-83) stieg der prozentuale Anteil der Mücken auf der der Quelle zugewandten Seite der Kammer nach 5 h auf über 50 % an, so dass keine Repellentwir-

Experimenteller Teil

kung mehr festgestellt werden konnte. Bei Rezeptur 4.2 (Abbildung 3-84) erreichte dieser Anteil erst nach 8 h die 50 %-Marke. Die Wirkstärke von Rezeptur 3.10 war bei dieser Untersuchung geringer als die der Rezepturen 1.7 und 4.2.

Das Präparat Bio-Hautschutz® (Abbildung 3-86) bewirkte, dass sich während der gesamten Zeit ca. 25 - 40 % der Mücken in der Nähe der Wirkstoffquelle aufhielten, bei dem Insektenschutzmittel BW (Abbildung 3-88) waren es 30 - 40 %. Beide Zubereitungen hatten demzufolge eine geringere Wirkstärke als die Rezepturen 1.7, 4.2 und Autan®-S Lotion (Abbildung 3-85).

<i>Rezeptur</i>	<i>Anzahl Versuche (Gesamtstichpro- benumfang n_{ges})</i>	<i>Anzahl Mücken (QH), arithm.MW_{gew} (StdAbw)</i>	<i>Anzahl Mücken (SH), arithm.MW_{gew} (StdAbw)</i>
1.7	1 (13)	1,7 (1,0)	11,5 (1,7)
3.10	1 (11)	5,0 (1,6)	6,1 (2,1)
4.2	1 (12)	2,6 (2,4)	9,4 (2,6)
Autan®-S Lotion	1 (17)	4,2 (2,8)	12,7 (2,9)
Bio Haut- schutz®	1 (17)	6,0 (1,6)	11,4 (1,2)
US-Army	1 (19)	12,2 (3,8)	6,9 (3,5)
BW	1 (15)	5,7 (1,3)	9,1 (2,0)

Tabelle 3-29: Aufenthalt von *Aedes aegypti* in Gegenwart von Repellent-Formulierungen über die Dauer von 9 h

Experimenteller Teil

In den folgenden Graphiken ist der Aufenthalt von *Aedes aegypti* als relative Häufigkeit [%] bei einer Versuchsdauer von 9 h dargestellt.

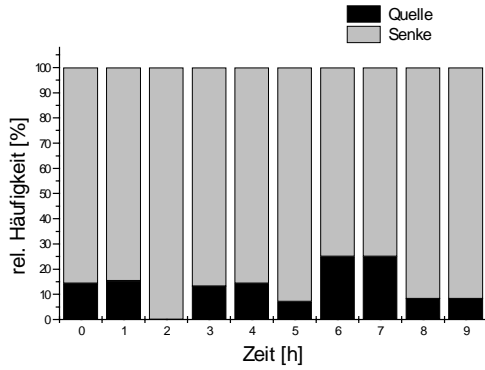


Abbildung 3-82: Rezeptur 1.7, n = 13

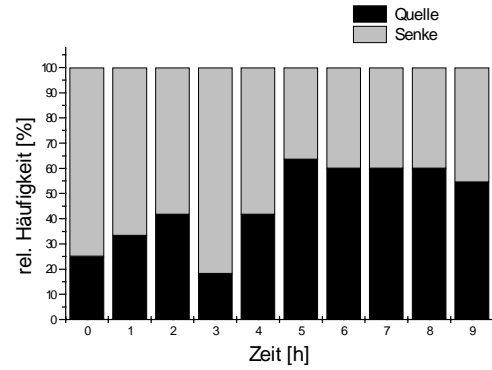


Abbildung 3-83: Rezeptur 3.10, n = 11

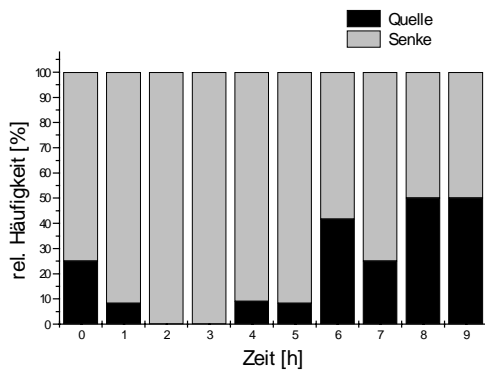


Abbildung 3-84: Rezeptur 4.2, n = 12

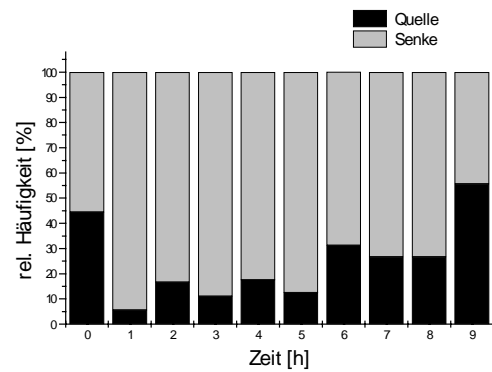


Abbildung 3-85: Autan®-S Lotion, n = 17

Experimenteller Teil

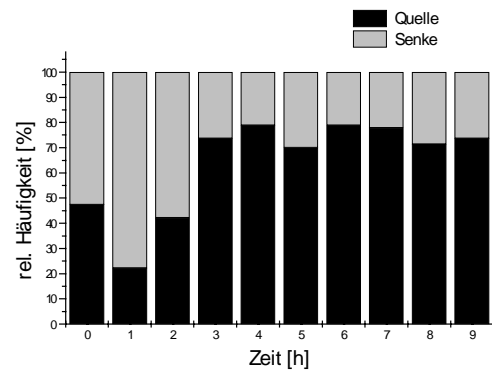
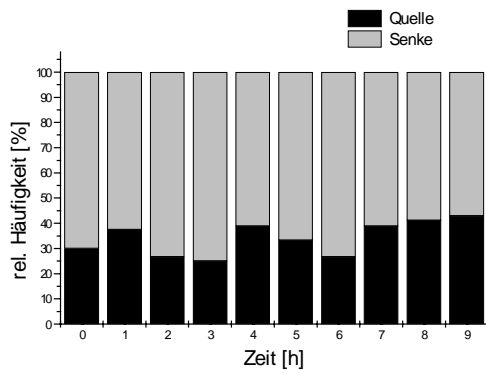


Abbildung 3-86: Bio-Hautschutz®, n = 17 Abbildung 3-87: Insektenschutzmittel der US-Army, n = 19

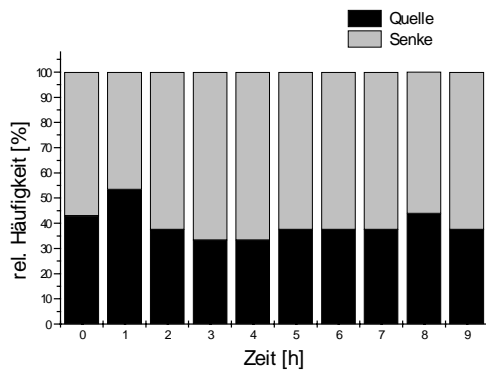


Abbildung 3-88: Insektenschutzmittel der Bundeswehr, n = 15

Experimenteller Teil

Ein χ^2 -Test zeigt, dass sich die Mücken während der gesamten Versuchsdauer in Gegenwart der Zubereitungen 3.10, Bio Hautschutz® und dem Insektenschutzmittel BW in keiner der beiden Kammerhälften bevorzugt aufhielten.

Das Insektenschutzmittel der US-Army hatte unter diesen Versuchsbedingungen sogar leicht anziehende Wirkung auf die Tiere. Es hielten sich in der Quellhälfte signifikant mehr Insekten auf als in der Senkenhälfte ($\chi^2_{(ber)} = 20 > \chi^2_{(0,05; 9)} = 16,9$).

Rezeptur	$\chi^2_{(ber)}$	$\chi^2_{(tab)}$ für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$	Anzahl der Freiheitsgrade
1.7	37,8	16,9	9
3.10	5,8	16,9	9
4.2	27,7	16,9	9
Autan®-S Lotion	29,2	16,9	9
Bio Hautschutz®	9,7	16,9	9
US-Army	20,0	16,9	9
BW	4,4	16,9	9

Tabelle 3-30: χ^2 -Werte für Versuche mit verschiedenen DEET-Zubereitungen über 9 h

4. Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden in-vitro-Untersuchungen und Laborversuche an Mücken zur Entwicklung eines Insektenrepellents mit verbesserter Wirkdauer durchgeführt. In einem Parallelprojekt unter der Leitung von Dr. M. Theisohn (Inst. für Pharmakologie der Universität Köln) wurde in den Jahren 1998 und 1999 im ZInstSanBw Koblenz (LabAbt I / LabGr Med. Zoologie, Dr. Faulde) die Wirksamkeit von Zubereitungen in Humanexperimenten unter Laborbedingungen gegen *Aedes aegypti* geprüft [31]. Die Studien wurden mit den Rezepturen 1.7, 3.10 und einer Zubereitung, deren Grundlage auf Rezeptur 3.10 basierte, in die als zusätzlich wirksamer Bestandteil eine Kokosöl-Vorlauftettsäuremischung (Edenor V 85®) eingearbeitet worden war, getestet. Aus galenischer Sicht war die zuletzt genannte Zubereitung jedoch mangelhaft, da sie zu Phasentrennung mit Agglomeratbildung neigte und sich deshalb nur schwer auf die Haut auftragen ließ.

Als Referenz diente das Insektenschutzmittel BW. Dabei wurde jedem Probanden sowohl das Test- als auch das Referenzpräparat auf einer vorher festgelegten Fläche der Unterarme verabreicht. Die unbehandelten Hautareale wurden mit Hilfe von OP-Folie vor den Angriffen der Insekten geschützt. In einer ersten Versuchsreihe wurde von Rezeptur 1.7 und dem Insektenschutzmittel BW eine DEET-Menge von jeweils $490 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf die Unterarme der Probanden aufgetragen. Beide Zubereitungen boten mehr als 11 Stunden Schutz, und ein signifikanter Unterschied bzgl. der Wirkdauer konnte nicht festgestellt werden. Daraufhin wurde die applizierte Dosis bei den Folgeversuchen halbiert. Die Schutzdauer der Rezepturen 1.7 und 3.10 waren mit ca. 6 Stunden signifikant länger als die Schutzdauer des Insektenschutzmittels BW mit ca. 4 Stunden.

Der Vergleich von Rezeptur 3.10 und der Kokos-Vorlauftettsäure-haltigen Zubereitung zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Schutzzeit (ca. 6 h), aber das Stechverhalten der Mücken änderte sich. Die Mücken vermieden bei der Anwendung der Kokos-Vorlauftettsäuremischung den Fußkontakt mit der behandelten Haut und setzten sich auf der angrenzenden OP-Folie ab, um zu stechen.

Ein Stechtest mit Rezeptur 4.10 unter Einbeziehung anderer Vektoren, z.B der Gattungen *Anopheles* oder *Culex*, und die Erprobung der Zubereitungen im Feldversuch, die vorzugsweise als kontrollierte Untersuchungen unter Verwendung einer

Diskussion und Ausblick

bereits eingeführten Zubereitung als Referenz durchgeführt werden sollten, wären logische nächste Schritte.

Bisher wurde die Wirksamkeit ausschließlich an Mücken der Spezies *Aedes aegypti* untersucht, der Nachweis der Repellent-Wirkung auf andere krankheitsübertragende Arthropoden steht noch aus.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde der neue Wirkstoff Bayrepel® als Insekten-Repellent eingeführt, der in diesem Zusammenhang auch in Betracht zu ziehen wäre.

Die für die Stabilitätsprüfung verfügbare Zeitspanne war mit 6 Monaten relativ kurz. Die Ergebnisse legen zwar nahe, dass die neu entwickelte Zubereitung mit der Bezeichnung Rezeptur 4.2 die erforderliche Haltbarkeit von fünf Jahren besitzt, ein vollständiger Nachweis kann aber nur durch Lagerversuche erbracht werden, die sich über die gesamte vorgesehene Haltbarkeitsfrist erstrecken.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Creme-Formulierungen entwickelt, deren Haftfestigkeit bei gleichem DEET-Gehalt deutlich größer ist als bei alkoholischen Lösungen. Sie wurde bei der Formulierung mit der Bezeichnung 4.2 um das 30-fache im Vergleich zu dem Insektenschutzmittel BW erhöht. Wesentlich für die Verbesserung ist der Einsatz von Carbomeren (Pemulen® Tr 1 NF) und Bis-diglycerylpolyacyladipat (Softisan 649®), das bereits als Hilfsstoff in einem zugelassenen Arzneimittel verwendet wird.

Durch quantitative Auswertung des Bewegungsmusters von *Aedes aegypti* wurde gezeigt, dass die neuen Zubereitungen hinsichtlich der initialen Repellent-Wirkung den alkoholischen Lösungen mindestens gleichwertig sind.

In in-vitro-Freisetzungsuntersuchungen (Franzzelle) wurden die neuen Formulierungen gegenüber alkoholischen Repellentzubereitungen verglichen. Es stellte sich heraus, dass das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Permeation des Wirkstoffs aus der Grundlage durch den Einsatz von hochmolekularen Hilfsstoffen und Viskositätserhöhung der äußeren Phase deutlich verringert werden konnte.

Viskositätsmessungen und polarisationsmikroskopische Untersuchungen ließen durch das Herstellungsverfahren und die Lagerung bedingte Unterschiede bei den Formulierungen erkennen.

Durch die Herstellung von Zubereitungen im Großansatz mit einer Zahnkolloidmühle konnte der Dispersitätsgrad gegenüber der Herstellung in Salbenschale und Stephanmischer erhöht und eine optisch gleichmässige Tröpfchengrösse erreicht werden. Einige Formulierungen zeigten nach Herstellung in der Salbenschale anisotrope Strukturen, die auf Auskristallisierung von Emulgatorbestandteilen schließen ließen, und unregelmäßige Abwärtsverläufe von Fließkurven, was auf Inhomogenität dieser Formulierungen hindeutete. Ansonsten war das Fließverhalten aller neu entwickelten Zubereitungen plastisch- oder pseudoplastisch-thixotrop.

Nach sechsmonatiger Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen konnten Viskositätsabnahme, das Auftreten anisotroper Strukturen und eine geringe Zunahme des Wirkstoffgehalts innerhalb der für Arzneimittel festgelegten Grenzen beobachtet werden.

Zusammenfassung

Rezeptur 4.2 war nach sechsmonatiger Lagerung im Schaukeltest sowie unter tropischen Bedingungen optisch stabil. Sie war den anderen getesteten Zubereitungen hinsichtlich Haftfestigkeit, Repellentwirkung und Wirkstofffreisetzung in den in-vitro-Experimenten überlegen oder gleichwertig.

Ob mit diesen Untersuchungen das Ziel einer Verlängerung der Wirkdauer in tropischen Klimazonen erreicht wurde, kann im Labormodell nicht gezeigt werden. Hierzu sind Feldversuche erforderlich, die über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

6. Anhang

6.1. Symbole und Abkürzungen

Statistische Größen:

χ^2	Testgröße für χ^2 -Test
e	Erwartungswert bei einem χ^2 -Test
f	ermittelter Wert bei einem χ^2 -Test
F	Testgröße für den F-Test und Varianzanalyse
FG, v	Freiheitsgrade
H	Testgröße für den H-Test
H ₀	Nullhypothese
H _A	Alternativhypothese
k, l	Anzahl der Versuche oder Messreihen
n _i	Stichprobenumfang der i-ten Gruppe
μ	Mittelwert der Grundgesamtheit
R	Rang
s	Standardabweichung einer Stichprobe
s ²	Varianz einer Stichprobe
σ	Standardabweichung der Grundgesamtheit
σ^2	Varianz der Grundgesamtheit
t	Testgröße für den t-Test
U ₁ , U ₂	Testgrößen für den U-Test für die 1. bzw. 2. Stichprobe
x _{ij}	j-ter Messwert der i-ten Gruppe
\bar{x}_i	Mittelwert der i-ten Gruppe
\bar{x}	Mittelwert einer Stichprobe

Physikalische Größen

A	Fläche
c	Konzentration
c_A	Konzentration im Akzeptor
c_D	Konzentration im Donor
D	Diffusionskoeffizient
D	Schergefälle
η	dynamische Viskosität
J	Flux
m	Masse
M	Gesamtwirkstoffmenge
N	Avogadrokonstante
p	Druck
Q	pro Flächeneinheit freigegebene Wirkstoffmenge
R	allgemeine Gaskonstante
T	absolute Temperatur
T	Drehmoment
τ	Schubspannung
UpM	Umdrehungen pro Minute
x	Weg

6.2. Rezepturen

Insektenschutzmittel Bundeswehr

Chargen A015202 und E518801

Vers.-Nr. 6840-12-192-5468

Inhaltsstoffe:

N,N-Diethyl-m-toluamid	30,0
Olivenöl	-ohne Angabe-
Lavendelöl	-ohne Angabe-
2-Propanol	-ohne Angabe-

Insektenschutzmittel der US-Army

6840-01-284-3982

EPA Est. No. 50678-NJ-001

Inhaltsstoffe:

N,N-Diethyl-m-toluamid	31,58
Andere Isomere	1,75
Inerte Hilfsstoffe	66,67

Anhang

Vivisun® Anti-Mücken-Loto

PZN 7408833

Charge T 507/1

EDV-Nr. 77180

Inhaltsstoffe:

Wasser

-ohne Angabe der Mengen--

N,N-Diethyl-m-toluamid

Glycerylstearat

PEG-100-stearat

Glycerol

Pentylenglycol

Octyloctanoat

Wasser

Aloe barbadensis

Zitronensäure

Ascorbinsäure

Cetylstearylalkohol

Parfüm

Acrylat/C₁₀₋₃₀ Alkylacrylat-crosspolymer

Carbomer 980

Natriumhydroxid

Diethylphthalat

Ethanol

Anhang

Autan®-S Lotion

Art. 601

Inhaltsstoffe:

N,N-Diethyl-m-toluamid	20,0
Macrogol 400	-ohne Angabe-
2-Propanol	-ohne Angabe-
gereinigtes Wasser	-ohne Angabe-
Aroma	-ohne Angabe-

Insektenschutzcreme Bw 3.1 = Rezeptur 3.10

Charge A 029001 (vgl. Kapitel "Formulierungsansätze")

Insektenschutzcreme Bw 4.2 = Rezeptur 4.2

Charge A 028701 (vgl. Kapitel "Formulierungsansätze")

6.3. Beispiel-Macro für die Auswertung von Bewegungsexperimenten

Mückenzählung in 4 Bereichen der Kammer

Sub count_reiheRp 421()

ipRect.left = 10

ipRect.top = 10

ipRect.right = 635

ipRect.bottom = 450

- *Festlegen des Ursprungs der zu betrachtenden Bildfläche (10,10 / 635,450), Angabe in Pixel*

ret = IpAoiCreateBox(ipRect)

ret = IpOpBkgndSubtract(0, 0)

- *Hintergrundkorrektur*

ret = IpSCalSetOrigin(10.0, 10.0)

ret = IpSCalSetName("reihe42")

ret = IpSegSetAttr(SETCURSEL, 0)

ret = IpSegSetAttr(CHANNEL, 0)

ret = IpSegPreview(CURRENT_C_T)

ret = IpSegSetRange(0, 0, 125)

- *Festlegen der Graustufen*

ret = IpSegPreview(CURRENT_C_T)

ret = IpBlbSetRange(0, 125)

ret = IpBlbSetFilterRange(BLBM_AREA, 3.0, 50.0)

- *Festlegen der Fläche, die als Mücken erkannt werden sollten*

ret = IpBlbSetFilterRange(BLBM_CENTRX, 10.0, 635.0)

ret = IpBlbSetFilterRange(BLBM_CENTRY, 10.0, 450.0)

ret = IpBlbCount()

ret = IpBlbUpdate(0)

ipBins(0) = 0.0

ipBins(1) = 156.25

ipBins(2) = 312.5

ipBins(3) = 468.75

ipBins(4) = 625.0

- *Einteilung des Bildes in 4 gleich große Flächen in x-Richtung (parallel zur Wirkstoffquelle bzw. -senke)*

ret = IpBlbShowSingleClass(4, ipBins(0), 4, 1)

ret = IpBlbSaveClasses("", S_LEGEND+S_DDE)

- *Festlegen der Skalierung in x- und y-Richtung*

Anhang

```
ret = IpBibShowSingleClass(0, ipBins(0), 0, 0)
```

```
ret = IpBibShow(0)
```

```
End Sub
```

7. Literatur

- [1] Berenbaum, M.R., Parasiten Und Wirte, Blutsauger, Staatsgründer, Seidenfabri-
kanten, Spektrum-Verlag, (1997), 339-382
- [2] Renner, M., Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum, Gustav-Fischer-
Verlag, 1998
- [3] Remane, Storch, Welsch, Kurzes Lehrbuch der Zoologie, Gustav-Fischer-Verlag
6. Auflage, (1989)
- [4] Meyers Taschenlexikon Biologie, 2., überarbeitete und ergänzte Auflage, B.I.-
Taschenbuchverlag, Mannheim-Wien-Zürich, (1998)
- [5] Röder, K., Gesundheitsvorsorge mit Repellents, Pharmazeutische Zeitung (Beila-
ge: Dermopharmazie), 22, 140. Jahrgang, (1995), 4-10
- [6] www.travelmed.de
- [7] Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Lindenmann J., Medizinische Mikrobiologie, 8.
neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, (1993)
- [8] Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., Taschenatlas der Pharmakologie, 3. überar-
beitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York,
(1996)
- [9] Service, M.W., A Guide to Medical Entomologie, Macmillan Tropical and Sub-
Tropical Medical Texts
- [10] Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, Walter de Gruyter Verlag,
Berlin-New York, (1990)
- [11] Duden Fremdwörterbuch 1990
- [12] Dettner, K., Peters, W., Lehrbuch der Entomologie, Gustav Fischer Verlag Stutt-
gart/Jena/Lübeck/Ulm, 1. Auflage, 1999
- [13] Pschyrembel & Hunnius, Walter de Gruyter GmbH & Co, CD-Rom, 1998
- [14] Combemale, P.; Deruaz, D.; Villanova, D.; Guillaumont, Ph.; Les Insectifuges ou
les Repellents, Ann. Dermatol. venerol., 1992, 119: 411-434
- [15] Fradin, M. S., MD, Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide,
Annal of Internal Medicine, Vol. 128, 11, (1998), 931-940
- [16] Süverkrüp, R., Angebot für ein Sachverständigengutachten, Pharm. Inst. der Uni
Bonn, Pharm. Technologie, 16.06.1996

- [17] Büscher, M.D., Rutledge, L.C., Wirtz, R.A., Glackin, K.B., Moussa, M.A., Laboratory Tests of Repellents Against *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), *J. Med. Entomol.*, 19, (1982), 176-180
- [18] Maibach, H.I., Khan, A.A., Use of Insect Repellents for Maximum Efficiency, *Arch. Dermatol.*, 109, (1974), 32-35
- [19] Marchio, F., Insect Repellent 3535, A New Alternative to DEET, *SOFW-Journal*, 122 Jahrgang, 7, (1996)
- [20] Wigglesworth, Temperatur und Feuchtigkeit, *Physiologie der Insekten*, Birkhäuser Verlag Basel, 1955, S.285-325
- [21] Webel, H., *Grundriss der Insektenkunde*, Gustav-Fischer-Verlag, 4. Auflage, 91-374
- [22] Clements, A.N., *The Physiology of Mosquitoes*, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1963
- [23] Roessler, P., The Attraction of Female Mosquito (*Aedes aegypti*) to Olfactory Stimuli, *Verlag XI Kongr. entomol. (Wien)*, 3, 1962, 155-156
- [24] Gilbert, I.H., Gouck, H.K., Smith, N., Attractiveness of Men and Women to *Aedes aegypti* and Relative Protection Time Obtained with DEET, *Florida Entomologist.*, 49, (1966), 53-66
- [25] Boeckh, J., Breer, H., Geier, M., Hoever, F.P., Krüger, B.W., Nentwig, G., Sass, H., Acylated 1,3-Aminopropanols as Repellents against bloodsucking Arthropods, *Pestic. Sci.*, 48, (1996), 359-373
- [26] Garson, L.R., Winnicke, M.E., Relationship Between Insect Repellency and Chemical and Physical Parameters, a Review, *J. of Med. Entomol.*, 5, (1968), 339-352
- [27] Mc Iver, S.B., A Model for the Mechanism of Action of the Repellent DEET on *Aedes Aegypti* (Diptera; Culicidae), *J. Med. Entomol.* Vol. 18, No. 5, , (1981), 357-361
- [28] Davies, E.E, *Neurophysiological Study of Vector Responses to Repellents*, SRI International, Menlo Park, California, Final Report of U.S. Army Med. R a Com. Contract. DAMD, 1980, 17-78-8022

- [29] Schneider, D., Block, B.C.; Boeckh, J.; Priesner, E., Die Reaktion der Männlichen Seidenspinner auf Bombykol und seine Isomeren: Elektroantennogramm und Verhalten, Zeitschrift für vergleichende Physiologie 54, (1967),192-209
- [30] Schneider, D., Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne Des Seidenspinners Bombyx Mori L., Zeitschrift für vergleichende Physiologie, Bd. 40, (1957), 8-41
- [31] Theisohn, M., Joseph, G.,Verhoeven, A., Kaschel, S., Klaus, W., Süverkrüp, R., Köhler, J., Saebel,, J., Faulde, M., Scheidt, P., Staudt, R., Performing a Clinical Trial to Evaluate Efficacy and Tolarability of DEET Containing Repellents, 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Pharmakologie und Therapie e.V., 26.-27.11.1999
- [32] Merck, Chemikalien und Reagenzien Katalog, Fa. Merck KGaA Darmstadt, 1999
- [33] Little, A.D., SRC PhysProp Database, <http://esc.syrres.com>, 1982
- [34] Bundesanzeiger-Nr.: 07181, Kommission B 7, Insektizide und Repellent, Diethyltoluamid, ATC-Code: P03BX01, (23.07.1994), 1-3
- [35] Mehr, Z.A., Rutledge, L.C., Buescher, M.D., Gupta, R.K., Zakaria, M.M., Attraction of Mosquitoes to Diethylmethylbenzamide and Ethylhexanediol, J. Am. Mosq. Control Assoc., 6, (1990), 469-476
- [36] Maibach, H.I., Khan, A.A., Use of Insect Repellents for Maximum Efficiacy, Arch. Dermatol, 109, (1974), 32-35
- [37] Rutledge, L.C., Wirtz, R.A., Büscher, M.D., Mehr, Z.A., Mathematical Models of the Effectivness and Persistence of Mosquito Repellents, Journal of the American Mosquito Control Association, 1, (1985), 56-61
- [38] Martindale - The Extra Pharmacopoeia 28th ed., Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London 1987
- [39] Smallwood, Anthony W., DeBord, Karl E.; Lowry, Larry K., N,N-Diethyl-m-Toluamide (M-Det): Analysis of an Insect Repellent in Human Urin and Serum by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Analytical toxicology, Vol. 16, January/February 1992
- [40] Schoening, G.P., Summary of the DEET (N,N-Diethyl-m-toluamid) Toxicology Programm, TRS Toxicology/Regulatory Services, 1992

- [41] Qiu, H., Won Jun, H., McCall, J.W., Pharmacokinetics, Formulation and Safety of Insect Repellent N,N-Diethyl-3-methylbenzamide (DEET): A Review, Journal of the American Mosquito Control Association, 14,1 ,(1998), 12-27
- [42] Qiu, H., Won Jun, H., Tao,J., Pharmacokinetics of Insect Repellent N,N-Diethyl-mtoluamid in Beagle Dogs Following Intravenous and Topical Routes of Administration, Journal of Pharmaceutical Sciences, 86, 4, (1997), 514-515
- [43] Index Nominum (1994-1996), Vol 87
- [44] Lauer-Datenbank, ABDA-Fertigarzneimittelinformation
- [45] Hamacher, H., Bornkessel, B., Selbstmedikation - Arzneimittelinformation und Beratung in der Apotheke, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1999
- [46] Morck, H., Vom Computerbildschirm in den Insektenfühler, Pharm. Ztg, Supplement, 18, 145. Jahrgang, (2000)
- [47] Morck, H., Ziemlich reizlos, Pharm. Ztg, Supplement, 18, 145. Jahrgang, (2000)
- [48] Yap, H.H., Jahangir, K., Chong, A.S.C., Adanan, C.R., Chong, N.L., Malik, Y.A., Rohaizat, B., Field Efficiency of a New Repellent, KBR 3023, Against *Aedes albopictus* (SKUISE) and *Culex quinquefasciatus* (SAY) in Tropical Environment, Journal of Vector Ecology, 23, 1, (1998), 62-68
- [49] Bayer-Produktinformation, Die Marke Autan®, Internet-Information, <http://www.autan.com>, (21.11.2000)
- [50] Research, Das Bayer-Forschungsmagazin, 12, (2000),22-27
- [51] Khan, A. A.; Maibach, H. I., A Study of Insect Repellents. 1. Effect on the Flight and Approach by *Aedes Aegypti*, Journal of Economic Entomology, Vol. 65, No. 5, 1318-1321
- [52] Miller, J.D., Anaphylaxis Associated with Insect Repellent. N. Engl. J. Med., 307, (1982), 1341-1342
- [53] Chemfinder, <http://chemfinder.camsoft.com>, 2001
- [54] National Toxicology Programm (NTP), <http://ntp-server.niehs.nih.gov>, 2001
- [55] USEPA/OPP Chemical Information, <http://www.cdpr.ca.gov>, 2001
- [56] Merck, Chemikalien und Reagenzien Katalog, <http://www.merck.de/english/services/chemdat/german/katalog/index.htm>, Fa. Merck KGaA Darmstadt, 2001
- [57] Rao, S. S.; Rao, K. M., Insect Repellent N,N-Diethylphenylacetamide: An Update, Journal of Medical Entomology, Vol. 28, No. 3, 303-306

- [58] SRC PhysProp Database, N,N-Diethyl-benzenacetamide ,<http://esc.syrres.com>, 2001
- [59] Perich, M. J., D. Strickman, R. A. Wirtz, S. A. Stockwell, J. I. Glick, R. Burge, G. Hunt, and P. G. Lawyer, Field Evaluation of four Repellents Against *Leptocnops americanus* (Diptera: Ceratopogonidae) Biting midges. Journal of Medical Entomology, 32, 3, (1995), 306-309
- [60] Frances, S.P., Klein, T.A., Hildebrandt, D.W., Burge, R., Noigamol, C, Eikarat, N., Sripongsai, B., Wirtz, R.A., (Department of Entomology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand), Laboratory and Field Evaluation of DEET, CIC-4 and AI3-37220 Against *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in Thailand, Journal of Medical Entomology, 33, 4, (1996), 511-515
- [61] Miller, J.D., Anaphylaxis Associated with Insect Repellent. N. Engl. J. Med., 307, (1982), 1341-1342
- [62] Hunnius - Pharmazeutisches Wörterbuch, de Gruyter Verlag, Berlin-New York, 6. Auflage, 1986
- [63] Stiftung Warentest, Untersuchung der Woche - test, <http://www.warentest.de>, Internet-Service (2001)
- [64] U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine, Focus, 10, 1997
- [65] Gambel, J.M., Brundage, J.F., Burge, R.J., De Fraités, R.F., Smoak, B.L., Wirtz, R.A., Survey of US Army Soldiers Knowledge, Attitudes and Practices Regarding Personal Protection Measures to Prevent Arthropod-Related Diseases and Nuisance Bites, Military Medicine, 163, 10, (1998), 695-701
- [66] Sharma, S.K., Dua, V.K., Sharma, V.P., Field Studies on the Mosquito Repellent Action of Neem Oil, Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 199, (1995), 180-182
- [67] Zanzarin®-Informationsbroschüre, Fa. Karl Engelhard, Fabrik pharm. Präparate GmbH & Co. KG, ohne Jahresangabe
- [68] Perycut Chemie AG, Dokumentation Bio-Hautschutz, Produktinformation und Wirksamkeitsstudie, 1993
- [69] Rudin, W., Versuchsbericht über die Wirksamkeit von Repellentien, Schweizerisches Tropeninstitut, 1998

- [70] WDR-Hobbythek, <http://www.wdr.de/hobbythek/archiv>, 1998
- [71] Dua, V.K., Nagpal, B.N., Sharma, V.P., Repellent Action of Neem Cream against Mosquitoes, *Indian Journal of Malariology*, 32: 2, (1995), 47-53
- [72] Foster, W:A., Test of Ultrasonic Emission on Mosquito Attraction to Host on a Flight Chamber, *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1, (1985), 199-202
- [73] Rote Liste, ECV Editio Cantor Aulendorf/Württ., 1998
- [74] Lippold, B.C., Wirkstoffresorption aus Dermatika, *Deutsche Apothekerzeitung*, 121, (1981), 2585
- [75] Mutschler, E., *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie* -, 6. Auflage, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, (1991)
- [76] Ziegenmeyer, J., Haut-Vehikel-Pharmakon, die entscheidenden Kriterien für die percutane Absorption, *Pharmazie in unserer Zeit*, 5, (1986), 129-143
- [77] Hadgraft, J., *The Skin as a Barrier*, The Welsh School of Pharmacy, University of Wales, Cardiff, UK, 1985
- [78] Bauer, K.H., Frömmling, K.H., Führer, C., *Pharmazeutische Technologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 4. Auflage, 1986
- [79] Neubert, R.H.H., Schmalfuß, U., Huschka, C., Wohlrab, W.A., Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der dermalen Wirkstoffapplikation, *Pharm.Ind.*, 60, 2, (1998)
- [80] USP 24, NF 19, United States Pharmacopeial Convention, 2000
- [81] Carbopol ETD 2020®, Produktinformation und Analysenzertifikat, Fa. BFGoodrich, Brecksville, 1994
- [82] Pemulen TR-1 NF®, Produktinformation und Analysenzertifikat, Fa. BFGoodrich, Brüssel, 1997
- [83] Pemulen TR-2 NF®, Produktinformation und Analysenzertifikat, Fa. BFGoodrich, Brüssel, 1997
- [84] Wade, A., Weller, P.J., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2. Edition, (1994)
- [85] *Hilfsstoffe in der Kosmetik*, Kosmetikjahrbuch 1992, Verlag für chemische Industrie, H. Ziolkowsky KG, Augsburg
- [86] Alireza Mortazavi, S., Smart, J.D., An In-Vitro Method for Assessing the Duration of Mucoadhesion, *Journal of Controlled Release*, 31, (1994), 207-212

- [87] DAB 1996, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag Frankfurt am Main/Eschborn
- [88] Lochhead, R.Y, Fron, W.R., Encyclopedia of Polymers and Thickeners for Cosmetics, Department of Polymer Science, University of Southern Mississippi, Allured Publishing Corp., Vol. 108, 1993
- [89] Fiedler, H.P., Lexikon der Hilfsstoffe, 1996, 1406
- [90] Gelbe Liste Online, MediMedia GmbH, www.gelbe-liste.de, 1997-2000
- [91] Hülsmann, H.L., Ein neues Wollwachssubstitut von der Dynamit Nobel AG, Fette, Seifen, Anstrichmittel, 84. Jahrg., 4, (1982), 162-164
- [92] Nippo, Y., The Japanese Cosmetic Ingredients Index, 1993, 218
- [93] Väänänen, A., Hannuksela, M., Softisan - A New Vehicle for Patch Testing, Contact Dermatitis, 14, (1986), 215-216
- [94] Ross, J. S., Shah, J. C., Reduction in skin permeation of N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET) by Altering the Skin/Vehicle Partition Coefficient, Journal of Controlled Release, 67, (2000), 211-221
- [95] Stricker, H., Physikalische Pharmazie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 3. Auflage, 1987
- [96] Higuchi, W.I., Diffusional Models Useful in Biopharmaceutics, Journal of Pharmaceutical Sciences, 56, 3, (1967), 315-324
- [97] Domb, Abraham; Marlinsky, Alexander; Maniar, Manoj; Teomin, Limor, Insect Repellent Formulations of N,N-Diethyl-m-Toluamide (DEET) in a Liposphere System: Efficiency and Skin Uptake, Journal of the American Mosquito Control Association, 11(1), (1995), 29-34
- [98] Reifenrath, W.G., Rutledge, L.C., Evaluation of Mosquito Repellent Formulations, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 72, No. 2, (1983), 169-173
- [99] Rutledge, L.C., Gupta, R.K., Wirtz, R.A., Buescher, M.D., Evaluation Of The Laboratory Mouse Model For Screening Topical Mosquito Repellents, Journal of the American Mosquito Control Association, 10, 4, (1994), 565-571
- [100] Rutledge, L.C., Gupta, R.K., Mehr, Z.A., Buescher, M.D., Reifenrath, W.G., Evaluation Of Controlled-Release Mosquito Repellent Formulations, J. of the American Mosquito Control Association, 12(1), (1996), 39-44
- [101] Schreck, C.E.; Kline, D.L., Repellency of two Controlled-Release Formulations of Deet against Anopheles Quadrimaculatus and Aedes Taeniorhynchus

- Mosquitoes, Journal of the American Mosquito Control Association, 5, 1, (1989)
- [102] Annis, Barry, Comparison of the Effectiveness of two Deet Formulations against *Aedes Albopictus* in te Philippines, Journal of the American Mosquito Control Association, Vol. 7, No. 4, (1991), 543-546
- [103] Hoch, A.L., Gupta, R.K., Weyandt, T.B., Laboratory Evaluation of a New Camouflage Face Paint, Journal of the American Mosquito Control Association, Jun 11, (1995), 172-175
- [104] Frances, S. P.; Eamsila, Chirapa; Pilakasiri, Chaiyaphruk; Linthicum, K. J., Effectiveness of Repellent Formulations Containing DEET against Mosquitoes in Northeastern Thailand, Journal of the American Mosquito Control Association, 12(2), (1996), 311-333
- [105] Versuchsbericht über die Wirksamkeit von Repellentien, Repellent-Lotion (Perricut Chemie AG), Schweizerisches Tropeninstitut Basel, 1998
- [106] Hilfsstoffe in der Kosmetik, Kosmetikjahrbuch 1992, Verlag für chemische Industrie, H. Ziolkowsky KG, Augsburg
- [107] Kosmetik Modell-Rezepturen (1979), Henkel-Dehydag, Düsseldorf
- [108] Mutschler, E., Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie -, 7. Auflage, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, (1996)
- [109] Vorschrift E. 2.2.1 Prüfung auf Gehalt von N,N-Diethyl-m-toluamid im Fertigprodukt, Antragsunterlagen der Bundeswehr vom 15.06.1993, Bearb.-Nr. 0050506/15902
- [110] Sachs, L.: Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo, 6. Auflage, 1984
- [111] Sokal, R.R., Rohlf, F.J., Biometry - The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Company New York, 3d Edition, 1995
- [112] Süverkrüp, R., Statistik - Vorkurs zum Praktikum Arzneiformenlehre II, WS 1999/2000
- [113] APV-Richtlinie mit Kommentar, Haltbarkeits- und Stabilitätsprüfungen, Pharmazeutische Industrie, 47, (1985), 627-632
- [114] Nürnberg, E., Pohler, W., Dreikomponentensysteme aus Tensid/Wasser/Paraffin, DAZ, 123. Jahrgang, 42, (1983), 1993-1996

- [115] Nürnberg, E., Muckenschnabel, R., Hydrophile und ambiphile Cremesysteme, DAZ, 122. Jahrgang, 41, (1982), 2093-2106
- [116] DIN 13342, Nicht-newtonsche Flüssigkeiten, 1976
- [117] DIN 53900 - ISO/R 862-1972, Tenside, 1972
- [118] Haake, Betriebsanleitung für das Rotationsviskosimeter VT 550
- [119] Keyhani-Morrison, E., Nadkarni, S., Sakr, A., Optimization of an in vitro Method for Evaluating the Release of a novel Retinoid from Topical Gels, Pharmazeutische Industrie, 57, 5, (1995), 414-419
- [120] Schepper, K., Optimierung und Charakterisierung von topischen Formulierungen mit Insektenrepellents, Dissertation, TU Braunschweig, 1999
- [121] Environmental Science Center Database, <http://esc.syrres.com>, 2001 (Little, A.D., (1982))
- [122] Image-Pro Plus 4.0 Benutzerhandbuch, Media Cybernetics, Silver Spring, USA, 1998
- [123] Geier, M., Bosch, O.J., Boeckh, J. (1999), Ammonia as an Attractive Component of host Odour for the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*, Chemical Senses 24: 647-653

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von
Herrn Professor Dr. R. Süverkrüp

am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn angefertigt.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. R. Süverkrüp, danke ich herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Auswahl des interessanten Themas. Seine zahlreichen Anregungen und die stets freundliche Unterstützung waren sehr wertvoll für die Durchführung und den Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. K.-J. Steffens danke ich sehr für die Übernahme des Korreferates.

Ich danke Herrn Professor Dr. P. Nickel für die Abnahme der Prüfung im Nebenfach Chemie.

Herrn Professor Dr. W.A. Maier vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Bonn danke ich für die Überlassung der *Aedes aegypti*-Gelege.

Herrn Oberfeldapotheker K. Schad danke ich für die Vergabe des Forschungsauftrages seitens des Bundesministeriums für Verteidigung und des Sanitätsamtes der Bundeswehr sowie den Damen und Herren des Zentralen Institutes des Sanitätsdienstes der Bundeswehr und der Apotheke des Zentralkrankenhauses der Bundeswehr in Koblenz für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Großer Dank gebührt Herrn G. Feldkeller für seine Anregungen in der Planungsphase des Projektes und für die Anfertigung der Bewegungsmesskammer sowie Herrn H. Cremer für Tips und Tricks.

E. Krämer, M. Marquis, U. Paschertz, K. Piskorz und K. Schüler danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Abwaschtests und der Aufbereitung der HPLC-Proben.

Den Herren Dr. U. Caspar, Dr. M. Pander und Dr. G. Paulini danke ich für die mentale Unterstützung seitens der Fa. Hoffmann-La Roche in der Endphase der Arbeit.

Allen Mitarbeitern und Kollegen der Pharmazeutischen Technologie Bonn danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, ganz besonders meinen beiden Labor-Spezies Andreas Grummel und Peter Heimann aus Zimmer 402.

Wiebke und Uli Kuhl sowie Linda und Nils Wnendt danke ich für die Hilfe, die nur dicke Freunde einem Doktoranden bei der Anfertigung seiner Dissertation gewähren können.

Der "Feedback-Heavy Boys Band" danke ich für 17 Jahre lautstarke musikalische Begleitung.

Für die liebevolle Unterstützung während meines beruflichen Werdeganges bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Großmutter sowie bei den Familien Leyßner und Wagner für die entspannenden Ruhephasen an der Ostsee.

Meiner lieben Frau Keke danke ich herzlich für die Durchsicht der Arbeit, ihre konstruktive Kritik und ständige Diskussionsbereitschaft.

Der größte Dank gilt aber Keke und unserer Tochter Louisa für die Sonnentage in meinem Leben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jörn Köhler
Geburtsdatum: 09.02.1967
Geburtsort: Kirchen / Sieg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet mit Keke Köhler, geb. Leyßner
Kind: Louisa Köhler

Schulbildung

1973 - 1977 Grundschule Niederfischbach
1977 - 1986 Gymnasium Betzdorf
1988 – 1990 PTA-Schule Siegen

Wehrdienst

1986 - 1987 Grundwehrdienst

Studium

10/ 1990 – 05/ 1995 Pharmaziestudium an der Universität Bonn
02.09.1993 1. Staatsexamen
16.05.1995 2. Staatsexamen

Praktikum

06/ 1995 – 10/ 1995 Apotheke Betzdorf
11/ 1995 – 04/ 1996 Fa. Rhône-Poulenc Rorer GmbH Köln
05/ 1996 Apotheke Betzdorf
03.07.1996 3. Staatsexamen
02.08.1996 Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit

06/ 1996	Beginn der Promotion im Fach "Pharmazeutische Technologie" bei Prof. Süverkrüp in Bonn
06/ 1996 – 10/ 1997	Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn, Abt. Pharm. Technologie
09/ 1997 – 03/ 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn, Abt. Pharm. Technologie
Seit 04/ 2001	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel

Freiburg, im Oktober 2001