

Elektronenmikroskopischer Nachweis von Liposomen in einem Hautpflegegel

T. Müller, J. Röding, H. Lautenschläger

Einleitung

Liposome werden gegenwärtig in steigendem Maß in kosmetischen Formulierungen eingesetzt. Einen besonderen Stellenwert nehmen dabei die Hautpflegegele ein, da hier weniger mit Inkompatibilitäten der Formulierungsbestandteile untereinander zu rechnen ist als zum Beispiel bei Hautpflegecremes.

Werden Liposome aus pflanzlichen Rohstoffen (z. B. Soja-Phospholipide) für die Herstellung dieser Hautpflegegele verwendet, so ist es sinnvoll, auch weitere natürliche Formulierungsbestandteile und Hilfsstoffe, wie Gelbildner, zu verarbeiten. Ein in dieser Hinsicht sehr gut geeigneter Gelbildner ist das Xanthan (Xanthan gum), ein komplexes Polysaccharid, das aus Glucose-, Mannose-, Glucuronsäure- und Brenztraubensäureeinheiten zusammengesetzt ist (1). Xanthan ist für die Verwendung in Kosmetika, Pharmazeutika und Lebensmitteln zugelassen. Eine gute Ergänzung in Xanthan-Formulierungen können auf Grund ihrer chemischen Zusammensetzung Aloe-vera-Konzentrate (2) in flüssiger oder pulveriger Form sein.

Methoden zum Nachweis und zur Charakterisierung von Liposomen in rein wässriger Dispersion wurden bereits beschrieben (3, 4). Der analytische Aufwand für eine einwandfreie Qualitätskontrolle eines Liposomen-Gels als Endprodukt erhöht sich dadurch, daß je nach verwendeten Formulierungsbestandteilen ggf. eine neue Methodenentwicklung notwendig wird. Wir berichten im folgenden über ein Beispiel des elektronenmikroskopischen Nachweises von Liposomen in einem Hautpflegegel mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik. Zum Vergleich wurde eine wässrige Liposomendispersion in analoger Weise präpariert.

Zusammensetzung des liposomalen Hautpflegegels

Das Hautpflegegel wird aus handelsüblichen Rohstoffen hergestellt und hat die folgende Zusammensetzung:

1,0% Liposomengrundstoff (Trockensubstanz) auf der Basis von Soja-Phospholipiden in Form von Liposomen (10%iges Konzentrat), die speziell für diese Formulierung mit einem wasserlöslichen NMF-Faktor beladen werden (5),

1,0% Xanthan gum (6),

0,2% Aloe vera (Pulver) (7),

0,4% Konservierungsmittel,

0,08% natürliche Duftstoffe,

Wasser ad 100%.

Als Vergleich dient eine 1%ige rein wässrige Liposomendispersion (1% Liposomengrundstoff auf der Basis von Soja-Phospholipiden gleicher Zusammensetzung wie oben).

Material und Methoden

Vorbemerkung: Um die zu erwartende dreidimensionale Netzstruktur eines Gels abbilden zu können, müssen die entsprechenden Proben stabilisiert, aufgebrochen, entwäs-

sert und kontrastiert werden. Die Gefrierätzung (8, 9, 10) ermöglicht alle diese Präparationsschritte: Die Verwendung eines Cryo-Jets erlaubt die Gefrierfixation von bis zu 20 µm dicken Liposomen-Dispersionen (11) und ermöglicht in Kombination mit der Gefrierbruchtechnik eine naturgetreue Abbildung von wässrigen Gelen (12).

Präparation: Eine Probe des Hautpflegegels und die Vergleichsprobe wurden mittels eines als »Spacer« verwendeten Goldnetzchens (Durchmesser: 3 mm, Dicke: 20 µm) aufgenommen und zwischen zwei Kupferplättchen (Dicke: 0,1 mm) plaziert. Diese »Sandwiches« wurden im zweiseitigen Cryo-Jet (QFD 020, Balzers) durch Beschießen mit flüssigem Propan eingefroren, unter flüssigem Stickstoff in einen Doppelabdrucktisch eingeführt und in eine Gefrierätzanlage (BAF 400, Balzers) eingeschleust. Im Hochvakuum ($p < 10^{-5}$ mbar), bei einer Objekttemperatur von -105°C , wurden die Präparatsandwiches aufgebrochen und bei der gleichen Temperatur während 300 oder 30 Sekunden im Hochvakuum exponiert, um Objektwasser wegsublimieren zu lassen. Dabei wurden bei der Probe des Hautpflegegels zusätzlich zu den Bruchflächen der Phospholipid-Membranen auch die Filamente des Gels freigelegt. Die Kontrastierung erfolgte mittels der sogenannten Rotations-Portrait-Beschattung (13) unter einem Winkel von 45° . Dabei betrug die berechnete Schichtdicke der Platin-Kohle-Mischung 2 nm. Die so erhaltenen Abdrucke (Repliken) der Präparate wurden über Nacht auf einer 14%igen Natriumhypochlorid-Lösung gereinigt, mehrmals auf dest. Wasser übertragen und getrocknet. Dabei blieben die Repliken an den Goldnetzchen haften und wurden mit diesen in das Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) gebracht. Verwendet wurde das Gerät Zeiss EM 109 mit Antikontaminationseinrichtung (mit flüssigem Stickstoff gekühlt), Beschleunigungsspannung: 80 kV. Die Vergrößerung wurde mit Testpräparaten geeicht.

Resultate

a) Hautpflegegel nach 300 s Sublimationszeit (Abb. 1; Positivkontrast: Das Bedampfungsmaterial erscheint dunkel):

Die Liposome liegen statistisch verteilt, individuell aber eng eingebettet im dreidimensionalen Netzwerk des Gels. Die filamentöse Gelstruktur ist durch die Wegsublimation des Wassers freigelegt; der Verlauf der Bruchfläche im Gel ist an aufrecht stehenden, abgerissenen Filamenten erkennbar (Pfeile in Abb. 1). An diesen Stellen erscheint der Filamentdurchmesser in natürlicher Größe (heller Punkt, umhüllt von dunkel erscheinendem Bedampfungsmaterial) und beträgt ca. 3 nm. Das Netzwerk ist durch das Schockgefrieren gut erhalten, die feinsten Maschen weisen eine Weite von ca. 10 nm auf.

b) Wässrige Liposomendispersion (Vergleich) nach 30 s Sublimationszeit (Abb. 2; Positivkontrast: Das Bedampfungsmaterial erscheint dunkel):

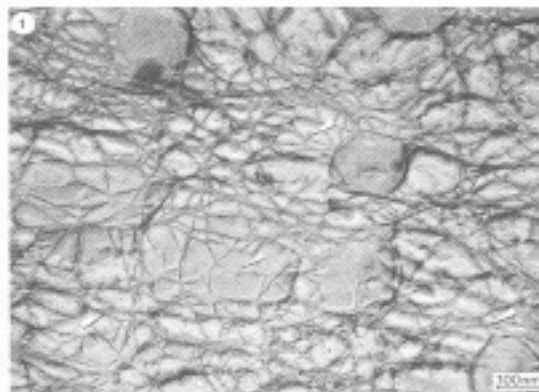


Abb. 1 Liposomales Hautpflegegel nach Gefrierbruch-Präparation und 300 s Sublimationszeit

Die Liposome erscheinen statistisch verteilt. Es handelt sich hauptsächlich um unilamellare Liposome, welche an der einzigen Bruchstelle der Phospholipidmembran erkennbar sind (Pfeile in Abb. 2). Die Bruchstelle ist sichtbar, weil die Oberfläche der die Liposome umgebenden Eismasse durch die Sublimation etwas abgesenkt wurde. Gelegentlich treten von der Kugelform abweichende oder multilamellare Liposome auf.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist ein Beispiel für die Qualitätskontrolle eines liposomalen Hautpflegegels und zeigt die Kompatibilität von Liposomen auf der Basis von Soja-Phospholipiden mit einem Gelbildner vom Typ des Xanthans. Die beschriebene Analytik ermöglicht die Abbildung von Liposomen in ihrer Umgebung und beweist, daß das Präparat formulierungstechnisch in Ordnung ist.

Anschriften der Verfasser:

Dr. T. Müller, Balzers-Union AG,
Pf. 75, Fl-9496 Balzers/Liechtenstein,
Dr. J. Röding, Dr. H. Lautenschläger,
Nattermann-Phospholipid GmbH,
Nattermannallee 1, D-5000 Köln 30



Abb. 2 Wäßrige Liposomendispersion (Vergleich) nach Gefrierbruch-Präparation und 30 s Sublimationszeit

Literatur

- (1) G. A. Nowak, Die kosmetischen Präparate, Band 2, Verlag für chem. Industrie H. Ziolkowsky KG, Augsburg 1984, Seite 392
- (2) E. Thomascheck, SÖFW 112 (1), 6 (1986)
- (3) H. Lautenschläger, J. Röding und M. Ghyzy, SÖFW 114 (14), 531 (1988)
- (4) E. Zellmann und J. Röding, Zeiss Anwendungsblatt EM 902 (1989)
- (5) Produkt der Nattermann Phospholipid GmbH
- (6) Rhodigel 200 (Rhône-Poulenc)
- (7) UP 200 (Worlée)
- (8) R. L. Steere, J. Biophys. Biochim. Cytol. 3, 45 (1957)
- (9) H. Moor, K. Mühlethaler, H. Waldner und A. Frey-Wyssling, J. Biophys. Biochim. Cytol. 10, 1 (1961)
- (10) A. W. Robards und U. B. Sleytr, Low temperature methods in biological electron microscopy in: A. M. Glauret, Practical methods in electron microscopy, Elsevier Press 1985
- (11) M. Müller, N. Meiser und H. Moor, Mikroskopie (Wien) 36, 129 (1980)
- (12) T. Müller, H. Hakert und Th. Eckert, Colloid and Polymer Science, in press
- (13) T. Müller, Proceedings 4th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy, Bangkok, pp 361-366 (1988)