

Wirkstoffkristallisate und proliposomal verkapselte Wirkstoffe aus überkritischer Gasphase



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Lars Pichert
Kiel 2006

Referent : Prof. Dr. Dr. h.c. B.W, Müller
Korreferent : PD habil. Dr. H. Steckel
Mündliche Prüfungen : 26. Mai, 08. & 13. Juni
Zum Druck genehmigt : 14. Juni 2006
Prof. Dr. J. Grotemeyer
(Dekan)

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Brandes, H., Pichert, L., Rasenack, N., Müller, B. W. und Steckel, H. (2004). Particle Design to improve pulmonary delivery of powdered medications. *Respiratory Drug Delivery IX Vol. 2*: 429-432.

Steckel, H., Pichert, L. und Müller, B. W. (2004). Influence of process parameters in the ASES process on particle properties of budesonide for pulmonary delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57(3): 507-512.

Meiner Familie gewidmet

Nichts beflügelt die Wissenschaft so,
wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.

Arno Penzias
(amerikanischer Physiker, 1978 Nobelpreis für Physik)

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Zielsetzung	3
2	THEORETISCHER TEIL.....	4
2.1	Überkritische Gase	4
2.1.1	Grundlagen.....	4
2.1.1.1	<i>Der überkritische Zustand.....</i>	<i>4</i>
2.1.1.2	<i>Dichte und Dielektrizitätskonstante.....</i>	<i>5</i>
2.1.1.3	<i>Kohlendioxid als Extraktionsmittel</i>	<i>7</i>
2.1.2	Einsatz überkritischer Gase zur Partikelherstellung.....	10
2.1.2.1	<i>Einleitung.....</i>	<i>10</i>
2.1.2.2	<i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS).....</i>	<i>10</i>
2.1.2.3	<i>Gas Anti - Solvent Kristallisation (GAS).....</i>	<i>11</i>
2.1.2.4	<i>Aerosol Solvent Extraction System (ASES).....</i>	<i>13</i>
2.1.2.5	<i>Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS).....</i>	<i>14</i>
2.1.2.6	<i>Particles from Gas - Saturated Solutions (PGSS)</i>	<i>16</i>
2.1.2.7	<i>Zusammenfassung</i>	<i>18</i>
2.2	Inhalierbare Partikel.....	20
2.2.1	Einleitung	20
2.2.2	Respirationstrakt und Partikelabscheidung.....	20
2.2.3	Budesonid.....	22
2.2.4	Formoterol	24
2.3	Liposomen.....	26
2.3.1	Einleitung	26
2.3.2	Definition.....	26
2.3.3	LipidAuswahl	28
2.3.4	Herstellungsverfahren.....	29
2.3.5	Anwendungsgebiete	31

3	ANGEWANDTE METHODEN	35
3.1	Herstellung	35
3.2	Charakterisierung	35
3.2.1	Partikelgrößenverteilung	35
3.2.2	Partikelmorphologie	37
3.2.2.1	<i>Rasterelektronenmikroskop</i>	37
3.2.2.2	<i>Lichtmikroskop</i>	38
3.2.3	Röntgendiffraktometrie	38
3.2.4	Differential Scanning Calorimetry	39
3.2.5	Dynamische Wasserdampf Sorption	40
3.2.6	Inverse Gas Chromatographie	42
3.2.7	Kontaktwinkelmessung	44
3.2.8	Aerodynamische Eigenschaften	45
3.2.9	Einschlusseffizienz	47
3.2.10	Freisetzungsuntersuchungen	48
3.2.11	HPLC-Analytik	49
3.3	Statistische Versuchsplanung	52
4	PRAKTISCHER TEIL	54
4.1	Mikronisation von Budesonid	54
4.1.1	Einleitung	54
4.1.2	Versuchsaufbau und -durchführung	54
4.1.3	Ergebnisse	55
4.1.3.1	<i>Ausbeute</i>	55
4.1.3.2	<i>Partikelgrößenverteilung und Morphologie</i>	57
4.1.3.3	<i>Röntgenuntersuchungen</i>	61
4.1.3.4	<i>Oberflächenenergie</i>	63
4.1.3.5	<i>Kontaktwinkel</i>	65
4.1.3.6	<i>Aerodynamisches Verhalten</i>	66
4.1.4	Zusammenfassung	69

4.2	Mikronisation von Formoterol	70
4.2.1	Einleitung	70
4.2.2	Versuchsaufbau und -durchführung.....	70
4.2.3	Ergebnisse.....	71
4.2.3.1	<i>Ausbeute</i>	71
4.2.3.2	<i>Partikelgrößenverteilung und Morphologie</i>	74
4.2.3.3	<i>Röntgen- und DSC-Untersuchungen</i>	78
4.2.3.4	<i>Dynamische Wasserdampf Sorption</i>	83
4.2.3.5	<i>Aerodynamisches Verhalten</i>	88
4.2.4	Zusammenfassung	91
4.3	Herstellung proliposomaler Zubereitungen.....	92
4.3.1	Einleitung	92
4.3.2	Versuchsaufbau und -durchführung.....	93
4.3.3	Ergebnisse.....	95
4.3.3.1	<i>Vorversuche</i>	95
4.3.3.2	<i>Ausbeute</i>	96
4.3.3.3	<i>Partikelgrößenverteilung und Morphologie</i>	100
4.3.3.4	<i>Röntgenuntersuchungen</i>	118
4.3.3.5	<i>Einschlusseffizienz</i>	122
4.3.3.6	<i>Freisetzungsuntersuchungen</i>	127
4.3.3.7	<i>Stabilitätsuntersuchungen</i>	130
4.3.4	Zusammenfassung	132
5	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	134
6	ABSTRACT (ENGLISH VERSION).....	137
7	ANHANG	140
7.1	Abkürzungen und Symbole.....	140
8	LITERATURVERZEICHNIS	142

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 Einleitung

Durch die fortwährende Entwicklung von selektiven Arzneistoffen für die Therapie spezieller Erkrankungen ist es im Laufe der Zeit für den Pharmazeuten immer wichtiger geworden Strategien zu entwickeln, um diese Arzneistoffe direkt an deren Wirkort zu transportieren. Hierdurch besteht die Möglichkeit der gezielten Behandlung von Erkrankungen sowie der Minimierung von Nebenwirkungen, wodurch ein großer Vorteil gegenüber herkömmlichen Behandlungen resultiert. Allerdings ist dieses Ziel nicht immer einfach zu realisieren. So stellt zum Beispiel der gezielte Transport von Wirkstoffen in die Lunge eine große Herausforderung für die Forschung und Entwicklung dar (Ganderton, 1999). Dabei ist es zwingend erforderlich, dass der Wirkstoff einer bestimmten Partikelgrößenverteilung folgt, wobei ein „massenbezogener mittlerer aerodynamischer Durchmesser“ (MMAD) von 1 - 5 μm als ideal anzusehen ist (York, 1994). Um eine solche Partikelgrößenverteilung zu erreichen, hat sich die Mikronisation durch Mahlung von Arzneistoffen in der Industrie als Standardverfahren durchgesetzt, nicht zuletzt durch die Vielzahl an Mühlentypen, die heute für diesen Mikronisationsprozess zur Verfügung stehen. Allerdings sind diese Verfahren auch mit vielen Nachteilen verbunden, wie z.B. dem Risiko von Staubexplosionen, sowie dem hohen Energieeinsatz, der nur zu einem geringen Teil auch tatsächlich für den Mikronisationsprozess benötigt wird und somit diese Verfahren ineffektiv gestaltet (Parrott, 1990). Weiterhin zeigt sich bei diesen Verfahren oft eine sehr starke Beanspruchung der Arzneistoffe, wodurch es zu Veränderungen der Oberflächen bis hin zu Veränderungen der Kristallstruktur kommen kann (Ticehurst, 2000). Die damit verbundenen Auswirkungen auf die chemische und physikalische Stabilität eines Stoffes, machen diesen oft unbrauchbar für die weitere Anwendung.

Aus diesen Gründen sind in der Literatur zahlreiche alternative Mikronisierungsverfahren beschrieben, die versuchen diese Nachteile zu umgehen. Dabei spielt z.B. die Sprühtrocknung eine große Rolle (Chawla et al., 1994), die allerdings hauptsächlich für wasserlösliche Substanzen eingesetzt wird, da der große apparative Aufwand für die Verarbeitung von Lösungsmittelhaltigen Lösungen dieses Verfahren ebenfalls ineffektiv macht.

Ein Verfahren, das im Laufe der Zeit immer mehr Aufmerksamkeit erlangte, ist die Mikronisation mit Hilfe von überkritischem Kohlendioxid. Dabei ist dieses Verfahren durch zahlreiche Modifikationen des Apparateaufbaus sehr variabel einsetzbar, so dass die Möglichkeit besteht, eine Vielzahl von Stoffen verarbeiten zu können. Dies zeigt nicht zuletzt die große Anzahl an Patenten, die verschiedene Methoden aufzeigen, das überkritische Kohlendioxid zu diesem Zweck nutzbar zu machen (Jung und Perrut, 2001). In dieser Arbeit stand dabei das „Aerosol Solvent Extraction System“ (ASES) im Vordergrund, das 1989 von Müller und Fischer entwickelt wurde.

Doch nicht nur die reine Mikronisation von Arzneistoffen in Hinblick auf die inhalative Anwendung ist hier möglich, sondern auch die Verarbeitung von Arzneistoff-Hilfsstoff-Mischungen mit dem Ziel der Mikroverkapselung kann mit diesem Verfahren realisiert werden. So gibt es die verschiedensten Untersuchungen, in denen durch die Fällung im überkritischen Kohlendioxid Arzneistoffsysteme zum gezielten Wirkstofftransport entwickelt wurden. Ein Beispiel für ein solches System stellt die Herstellung von Liposomen mit überkritischem Kohlendioxid dar (Castor und Chu, 1998), wobei in diesem Fall die Standardverfahren ebenfalls mit vielen Nachteilen verbunden sind. So wird z.B. bei vielen der Standardverfahren eine große Menge an organischen Lösungsmitteln benötigt, auch wird zur späteren Stabilisierung der Liposomen oft eine Gefriertrocknung angeschlossen und somit ein großer Energieaufwand betrieben.

Diese Beispiele belegen das große Interesse an der Entwicklung von alternativen Herstellungsverfahren gegenüber den Standardverfahren, wobei die Fällung von Arzneistoffen und Arzneistoff-Hilfsstoff-Mischungen mit überkritischem Kohlendioxid im ASES-Prozess ein vielfältig einsetzbares, alternatives Verfahren darstellt.

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Untersuchung der Mikronisation von Budesonid und Formoterol mit überkritischem Kohlendioxid im ASES-Prozess. Zu diesem Zweck wurden diese Arzneistoffe unter Variation verschiedener Prozessparameter im überkritischen Kohlendioxid gefällt und die so gewonnenen Mikropartikel hinsichtlich ihrer physikochemischen und aerodynamischen Eigenschaften untersucht. Dabei standen die Bewertung und die Optimierung der Prozessparameter für eine ideale Mikropartikelgewinnung hinsichtlich der inhalativen Anwendung dieser Arzneistoffe im Vordergrund.

Zum anderen befasst sich diese Arbeit mit der Entwicklung proliposomaler Zubereitungen, die durch Fällung im überkritischen Kohlendioxid hergestellt werden sollten. Dabei wurden unterschiedliche Lecithine, sowie Cholesterol und Budesonid in verschiedenen Zusammensetzungen eingesetzt und verschiedene Prozessparameter für die Herstellung im ASES-Prozess angewendet. Die so entstandenen Pulver wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften untersucht und anschließend durch Solvatisierung zu Liposomen weiterverarbeitet, die zudem charakterisiert wurden. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf der Charakterisierung der Einschlusseffizienz und des Freigabeverhaltens des Arzneistoffes.

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 Überkritische Gase

2.1.1 Grundlagen

2.1.1.1 Der überkritische Zustand

Die Entdeckung des überkritischen Zustandes geht auf Baron Cagniard de la Tour (1822) zurück, der das Verschwinden einer gas-flüssig-Phasengrenze beim Überschreiten einer bestimmten Temperatur beobachtete.

Verdeutlichen lässt sich dieses Phänomen am besten anhand des Zustandsdiagrammes eines Stoffes. Dieses gibt Aufschluss darüber, bei welcher Kombination von Druck und Temperatur ein bestimmter Aggregatzustand des betreffenden Stoffes vorliegt. In Abb. 2.1 ist ein solches p-T-Zustandsdiagramm eines Einkomponentensystems schematisch dargestellt. Man erkennt die Sublimations-, Schmelzpunkt- und Dampfdruckkurve, die im Tripelpunkt (T_p) zusammentreffen. Die Dampfdruckkurve endet dann schließlich im kritischen Punkt (C_p), der durch den kritischen Druck (p_c) und die kritische Temperatur (T_c) definiert wird. Die entsprechende Dichte an diesem Punkt wird mit ρ_c bezeichnet.

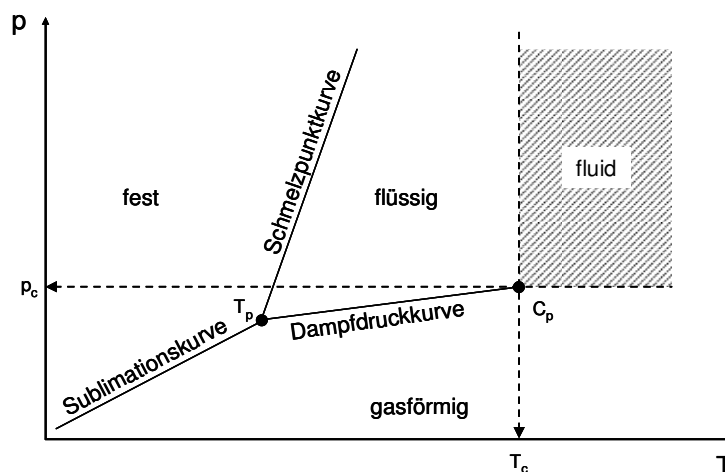


Abb. 2.1: p-T-Zustandsdiagramm eines Gases. C_p = kritischer Punkt, T_p = Tripelpunkt

Weiterhin wird in Abb. 2.1 deutlich, dass ab dem kritischen Punkt, oberhalb des kritischen Drucks, sowie der kritischen Temperatur, nicht mehr zwischen flüssiger und gasförmiger Phase unterschieden werden kann, der Phasenunterschied ist in dieser „überkritischen Phase“ aufgehoben, d.h. es kann durch eine Druckerhöhung nicht mehr zu einer Verflüssigung des Gases kommen. Weitere gebräuchliche Begriffe die häufig in der Literatur für diese Phase genutzt werden, sind unter anderem auch „fluide Phase“ oder „fluid“.

Um einen Eindruck davon zu gewinnen, in welchem Größenordnungsbereich der kritische Druck und die kritische Temperatur liegen können, sind in Tab. 2.1 die physikalischen Daten einiger Gase aufgeführt (Stahl, 1987).

Tab. 2.1: Physikalische Daten einiger für Extraktionszwecke verwendbarer Gase (modifiziert nach Stahl, 1987).

Gas	T_c (°C)	p_c (bar)	ρ_c (g/cm ³)
Ethylen	9,9	50,5	0,20
Trifluormethan	25,9	46,9	0,52
Kohlendioxid	31,0	72,9	0,47
Distickstoffmonoxid	36,5	71,1	0,46

2.1.1.2 Dichte und Dielektrizitätskonstante

Die Besonderheit einer solchen überkritischen Phase liegt unter anderem im Verhalten der Dichte und Dielektrizitätskonstante. Beide Parameter erfahren ab dem kritischen Punkt eine sprunghafte Steigerung. Gerade für den Einsatz von überkritischen Gasen als Extraktionsmittel, gegenüber herkömmlichen Lösungsmitteln, ist dieses Phänomen von sehr großer Bedeutung.

Zusätzlich zu dieser sprunghaften Änderung bleibt die Viskosität im Bereich der gasförmigen Phase, was für die Anwendung solcher überkritischen Gase eben-

falls einen großen Vorteil darstellt. Die Tab. 2.2 gibt eine Übersicht über die physikalischen Eigenschaften von Gasen, Flüssigkeiten und der überkritischen Phase (Eggers, 1984). Es wird deutlich, dass die überkritische Phase im Verhalten der Dichte mit einer Flüssigkeit verglichen werden kann.

Flüssigkeitsähnliche Dichten werden dabei bei Gasen schon wenig oberhalb ihrer kritischen Temperatur erhalten, wenn der Druck lediglich eine Reduktion von 1 - 2 (p/p_c) erfährt (Stahl, 1987). Liegt die Temperatur deutlich über dem kritischen Wert, müssen entsprechend höhere Drücke aufgewendet werden.

Tab. 2.2 Größenordnung einiger physikalischer Eigenschaften von Gasen, Flüssigkeiten und überkritischen Phasen (modifiziert nach Eggers, 1984).

Eigenschaft	Einheit	Gas	Flüssigkeit	überkritische Phase
Dichte	g/cm^3	ca. 10^{-3}	0,6 - 1,01	0,2 - 0,95
Diffusionskoeffizient	cm^2/s	ca. 10^{-1}	ca. 10^{-5}	10^{-4} - 10^{-3}
Viskosität	mPas	ca. 10^{-2}	1 - 200	ca. 10^{-1}

In Abb. 2.2 ist die Dichte von Kohlendioxid in Abhängigkeit von Druck und Temperatur dargestellt (Angus et al., 1976). Der oben beschriebene Zusammenhang wird hier deutlich: bei höheren Temperaturen müssen sehr viel höhere Drücke angewendet werden, um eine entsprechende Dichte zu erreichen.

Ähnlich der Dichte verhält sich auch die Dielektrizitätskonstante. Diese kann für die Beschreibung des Löslichkeitsverhaltens genutzt werden, da sie in einem engen Zusammenhang mit der Polarität steht. Die Dielektrizitätskonstante liegt bei Gasen im Normalzustand etwa drei Zehnerpotenzen unterhalb der von Flüssigkeiten und kann im überkritischen Zustand, ähnlich wie die Dichte, auf das Niveau von Flüssigkeiten gesteigert werden.

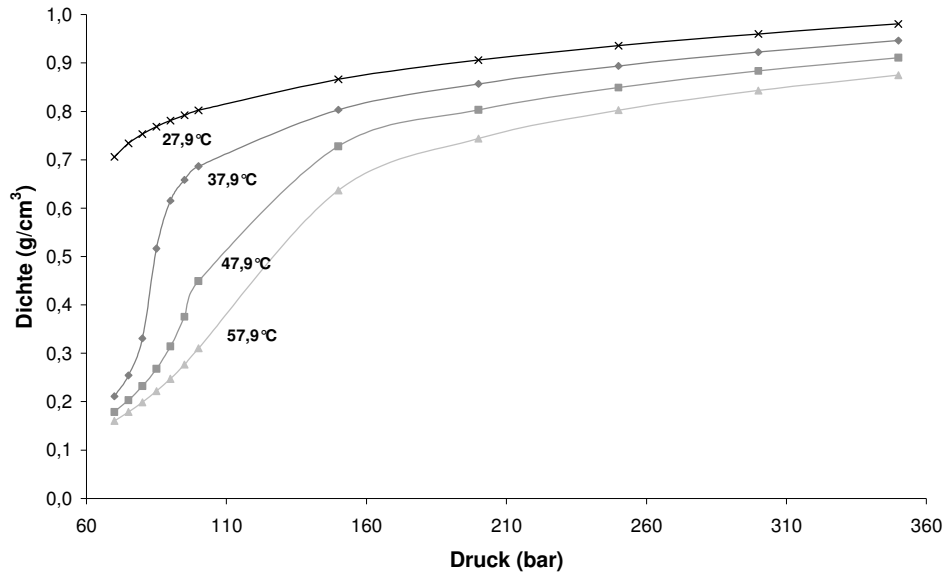


Abb. 2.2: Dichte von Kohlendioxid in Abhängigkeit von Druck und Temperatur (Angus et al., 1976).

2.1.1.3 Kohlendioxid als Extraktionsmittel

Von den in Tab. 2.1 prinzipiell zur Extraktion anwendbaren Gasen hat sich im praktischen Einsatz Kohlendioxid als das am häufigsten verwendete herausgestellt (Kaiser et al., 2001). So ist die Verwendung von Kohlendioxid mit folgenden Vorteilen verbunden:

- physiologische Unbedenklichkeit
- keimfrei und bakteriostatisch
- nicht brennbar oder explosiv
- es steht in großen Mengen zur Verfügung und ist kostengünstig

Weiterhin bietet Kohlendioxid den Vorteil, dass der kritische Druck und die kritische Temperatur (Tab. 2.1) in einem Bereich liegen, der sehr gut prozesstechnisch zu steuern und gleichzeitig auch für thermolabile Substanzen geeignet ist.

Stahl und Schilz (1976) stellten erstmals Faustregeln auf, die ein besseres Verständnis über das Löslichkeitsverhalten von organischen Naturstoffen in überkritischem Kohlendioxid geben sollten. Sie untersuchten dafür die Extrahierbarkeit vieler Substanzen verschiedenster Verbindungsklassen, wie z.B. Polyaromaten, Phenole, Anthrachinone und viele andere mehr und kamen zu folgenden Schlussfolgerungen:

- Kohlenwasserstoffe, sowie andere lipophile Verbindungen bis zu einer Molmasse von 300 – 400, mit relativ geringer Polarität, können leicht extrahiert werden (z.B. Ester, Ether, Lactone, u.a.).
- Die Einführung von polaren funktionellen Gruppen (z.B. Hydroxyl-, Carboxylgruppen) erschwert die Extrahierbarkeit oder macht sie sogar unmöglich.
- Polare Substanzen (z.B. Zucker, Aminosäuren, Lecithine) sind nicht extrahierbar.
- Fraktionierte Extraktionen sind möglich bei starken Unterschieden in Molmasse, Dampfdruck oder Polarität der Substanzen.
- Wasser ist schlecht in flüssigem Kohlendioxid, in überkritischem Kohlendioxid mit steigender Temperatur zunehmend besser löslich.

Eine weitere Untersuchung, die von Stahl und Glatz (1984) durchgeführt wurde, befasst sich mit der Löslichkeit von Steroiden in überkritischen Gasen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Polarität der Steroide die Löslichkeit in überkritischen Gasen abnimmt.

Kamihira et al. (1987) zeigten in ihren Untersuchungen eine weitere Verwendung von überkritischem Kohlendioxid auf. So konnte der Gehalt an leicht flüchtigen Lösungsmitteln, wie Aceton, Methanol oder 2-Propanol, in verschiedenen Antibiotika drastisch reduziert werden. Aus diesem Fall wird deutlich, dass überkritisches Kohlendioxid ein sehr effektives Extraktionsmittel für Lö-

sungsmittel darstellt, was somit auch den Weg hin in andere Anwendungsgebiete, wie z.B. der Herstellung von Mikropartikeln mittels Fällung im überkritischen Kohlendioxid durch Extraktion des Lösungsmittels eröffnet. In der Literatur sind sehr viele Beispiele für diese mittlerweile gängige Herstellungspraktik zu finden, die immer mehr Aufmerksamkeit in der pharmazeutischen Entwicklung bekommt. Dies zeigen nicht zuletzt die vielen Verfahren und Neuentwicklungen, die im Laufe der letzten Jahre veröffentlicht und patentiert wurden (Jung und Perrut, 2001).

2.1.2 Einsatz überkritischer Gase zur Partikelherstellung

2.1.2.1 Einleitung

Durch die in Kapitel 2.1.1.3 erläuterten Erkenntnisse in Bezug auf das überkritische Kohlendioxid haben sich neben vielen kleineren Anwendungsgebieten (Perrut, 2003) heute die Extraktion von Naturstoffen (Bertucco und Vetter, 2001) und die Herstellung von Mikro-, bzw. Nanopartikeln (York, 1999) in der Pharmazie etabliert.

Dieses Kapitel soll eine Übersicht über die verschiedenen Herstellungsverfahren geben, in denen überkritisches Kohlendioxid verwendet wird. Dabei erhebt diese Darstellung keinen Anspruch auf Vollständigkeit und Chronologie. Der Schwerpunkt dieser Übersicht liegt hauptsächlich auf der Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln, wobei allerdings nicht vergessen werden darf, dass einige der beschriebenen Verfahren ebenso für die Extraktion von Naturstoffen eingesetzt werden können.

2.1.2.2 Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS)

Mit der Verwendung des RESS-Verfahrens war es erstmalig möglich mit Hilfe von überkritischem Kohlendioxid Stoffe zu mikronisieren. Eines der ersten Patente für dieses Verfahren wurde 1979 von Best et al. vorgestellt, wobei es sich um die Herstellung sehr feiner Carotinoid-Kristalle handelte. Danach folgten weitere Patente (Smith, 1986; Sievers et al., 1993), die sich auf die Mikronisation von Arzneistoffen bezogen.

Das RESS-Verfahren beruht auf der Löslichkeit von Substanzen im überkritischen Kohlendioxid. In Abb. 2.3 ist das Verfahren schematisch dargestellt. Zur Mikronisation einer Substanz wird diese in der Extraktionseinheit im überkritischen Kohlendioxid gelöst und anschließend in die Expansionseinheit überführt, wo die Lösung schlagartig durch eine Düse in den unterkritischen Bereich entspannt wird. Durch diese spontane Entspannung

kristallisiert die Substanz in sehr kleinen Partikeln, resultierend aus der raschen Übersättigung der Lösung, wodurch entsprechend viele kleine Kristallisationskeime zur Verfügung stehen. So können Partikelgrößen mit einem durchschnittlichen Teilchengrößendurchmesser von 0,5 - 20 μm erreicht werden (Jung und Perrut, 2001).

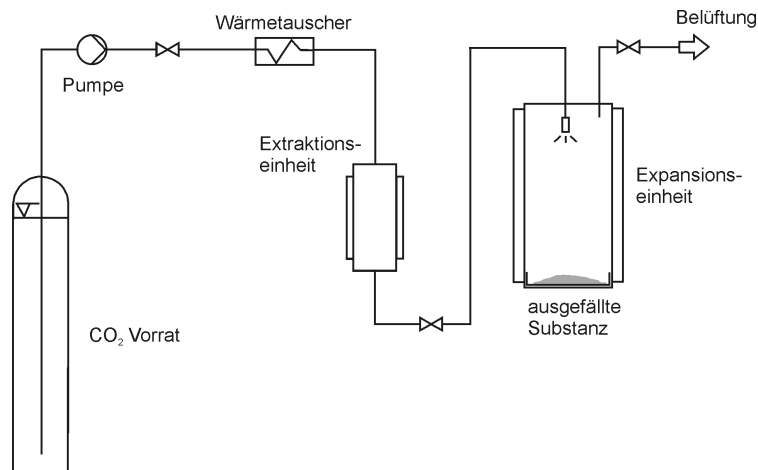


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des RESS-Verfahrens.

Nachteilig an diesem Verfahren ist die Limitierung auf Substanzen, die in überkritischem Kohlendioxid löslich sein müssen. Darüber hinaus ist dieses Verfahren sehr empfindlich gegenüber Änderungen der Prozessparameter und nicht geeignet für temperaturempfindliche Stoffe, da die Düse aufgrund der schnellen Entspannung beheizt werden muss ($T > 100^\circ\text{C}$), um eine Verflüssigung des Kohlendioxids bei adiabater Entspannung zu verhindern (Shaub, 1995).

2.1.2.3 Gas Anti - Solvent Kristallisation (GAS)

Die ersten Versuche mit diesem Verfahren gehen auf die fünfziger Jahre zurück, bis schließlich erste Patente in den neunziger Jahren entstanden (Debenedetti et al., 1993; Gallagher et al., 1989).

Bei diesem Verfahren (Abb. 2.4) wird die Substanz, gelöst in einem Lösungsmittel, das mit überkritischem Kohlendioxid mischbar sein muss, in der Extraktionseinheit vorgelegt. Anschließend wird die Extraktionseinheit mit überkritischem Kohlendioxid gefüllt, in welchem sich dann das Lösungsmittel der Substanz löst und dadurch abgeführt wird. Durch eine Übersättigung der Substanzlösung kommt es schließlich zu einer Fällung der Substanz, welche nicht im überkritischen Kohlendioxid löslich sein darf.

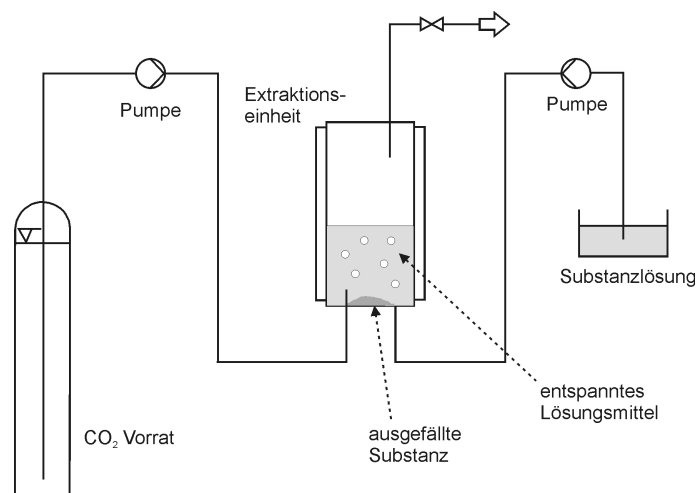


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des GAS-Verfahrens.

Die Steuerung der Partikelgröße erfolgt bei diesem Verfahren über die Zugabe des überkritischen Kohlendioxids. Dabei bestimmt die Geschwindigkeit der Zugabe die Größe der Partikel: bei einer langsamen Zugabe entstehen große Partikel durch die langsame Übersättigung der Lösung, kleine Partikel erhält man dagegen durch eine schnelle Zugabe des überkritischen Kohlendioxids. Daneben spielen auch Druck und Temperatur eine Rolle bei der Partikelbildung (Gallagher et al., 1989).

Ein großer Nachteil dieses Verfahren ergibt sich aus der Steuerung der Partikelgröße, denn die Geschwindigkeit mit der das überkritische Kohlendioxid maximal zugegeben werden kann, ist limitiert und damit auch die zu erzeugende

Partikelgröße. Man kann somit nur Partikelgrößen in einem bestimmten Größenbereich herstellen. Dies ist auch einer der Hauptgründe, warum das Verfahren nicht großtechnisch eingesetzt werden kann, da die Pumpe bei größeren Extraktionsbehältern nicht mehr in der Lage wäre entsprechend schnell zu fördern und damit kleinere Partikel zu erhalten.

2.1.2.4 Aerosol Solvent Extraction System (ASES)

Dieses Verfahren, von Müller und Fischer (1989) entwickelt, bildet die Grundlage dieser Arbeit. Es kann als eine Weiterentwicklung der GAS-Kristallisation angesehen werden und beruht ebenfalls auf der Extraktion des Lösungsmittels einer zu fällenden Substanz, die im überkritischen Kohlendioxid nicht löslich sein darf. Allerdings wird in diesem Fall die Substanzlösung nicht im Hochdruckbehälter vorgelegt (vgl. dazu Abb. 2.4), sondern direkt in die überkritische Gasphase eingebracht. Das ASES-Verfahren vereinigt somit die Vorteile des RESS-Verfahrens, bei dem sehr hohe Übersättigungsgrade der auszufällenden Substanz erreicht werden, mit den vielseitigen Einsatzmöglichkeiten der GAS-Kristallisation.

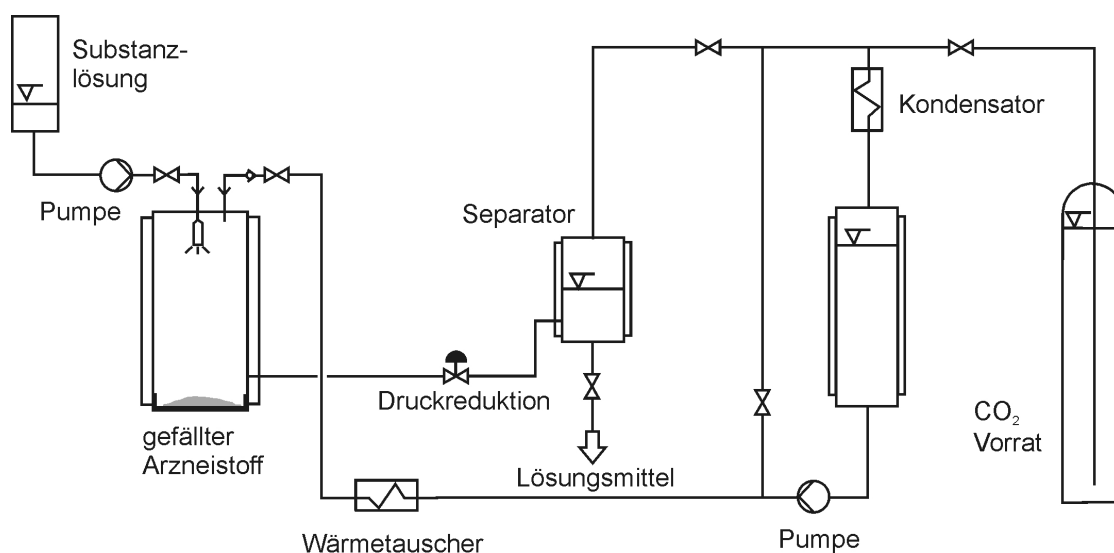


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des ASES-Verfahrens.

Die überkritische Gasphase wird in einer Hochdruckkolonne aufgebaut. In diese kann dann über eine Pumpe die Substanzlösung eingesprüht werden (Abb. 2.5). Aufgrund der Löslichkeit des Lösungsmittels im überkritischen Kohlendioxid wird dieses entfernt und es kommt zur Präzipitation der nicht im überkritischen Kohlendioxid löslichen Substanz.

Über eine Kreislaufführung wird das im überkritischen Kohlendioxid gelöste Lösungsmittel in einen Separator abgeführt, in dem durch eine Druck- und Temperaturreduktion das Kohlendioxid den unterkritischen Zustand annimmt. Das vorher noch gelöste Lösungsmittel fällt daraufhin aus und kann über den Separator abgetrennt und evtl. wieder verwendet werden. Dieses so aufgereinigte Kohlendioxid wird weiter im Kreislauf geführt und kann danach weiter verwendet werden, um die erhaltenen Partikel nachzutrocknen, d.h. diese von eventuell noch vorhandenem Lösungsmittel zu befreien.

Den Vorteil einer solchen Kreislaufführung konnten Ruchatz et al. (1997) zeigen. So trockneten sie die erhaltenen Mikropartikel, die aus einer Methylenchlorid-Lösung versprüht wurden, über 6 Stunden im überkritischen Kohlendioxid nach und untersuchten anschließend die Mikropartikel auf ihren Lösungsmittelrestgehalt. Festgestellt wurde dabei ein Methylenchlorid-Restgehalt von unter 100 ppm in den Mikropartikeln. Betrachtet man die Monographie „Organic Volatile Impurities“ der USP 29 (2006), bzw. die Monographie „5.4 Lösungsmittel-Rückstände“ des Ph. Eur. 5 (2005), in der ein Methylenchlorid-Restgehalt von maximal 600 ppm gefordert wird, so wird deutlich, dass dieser Wert im ASES-Verfahren deutlich unterschritten werden konnte.

2.1.2.5 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS)

Das erste Patent für das SEDS-Verfahren geht auf Hanna und York (1998) zurück. Es ähnelt stark dem ASES-Verfahren (Kap. 2.1.2.4) und unterscheidet sich von diesem lediglich durch den Einsatz einer speziellen Düse. Auch hier

werden Substanzlösungen versprüht, bei denen das Lösungsmittel vom überkritischen Kohlendioxid extrahiert wird, wodurch es zu einer Ausfällung der nicht im überkritischen Kohlendioxid löslichen Substanz kommt.

Die Düse ist dabei ähnlich einer Dreistoffdüse aufgebaut, durch deren innere Kapillare das Kohlendioxid und durch die beiden äußeren die Substanzlösung und ein weiteres Lösungsmittel versprüht werden können (Abb. 2.6). Dieser spezielle Düsenaufbau ist in sofern vorteilhaft, dass zum einen das Kohlendioxid als Sprühbeschleuniger genutzt werden kann und zum anderen eine Vormischung mit dem überkritischen Kohlendioxid stattfindet, die den Stoffaustausch beschleunigt, wodurch Kristallisationsvorgänge sehr viel schneller ablaufen können.

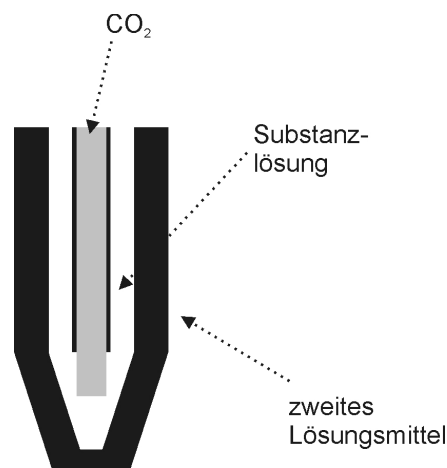


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Düse des SEDS-Verfahrens.

Hanna und York (2000) waren durch diesen speziellen Düsenaufbau sogar in der Lage, wasserhaltige Substanzlösungen zu versprühen. Da Wasser in überkritischem Kohlendioxid nicht löslich ist, wurde ein zweites Lösungsmittel, das in überkritischem Kohlendioxid löslich ist, durch eine der Kapillaren zudosiert und fungierte damit als Lösungsvermittler. Verschiedene Zucker (Laktose, Maltose, Trehalose) konnten so in kristalliner Form erhalten werden. Auch die Präzipitation von Proteinen (β -Laktamase) wird durch dieses

Verfahren möglich. Weiterhin konzentrierten sich Hanna und York (1998) dabei hauptsächlich auf die Verarbeitung von pulmonal einsetzbaren Substanzen und erreichten bei Salbutamol und Salmeterol-xinafoat (Tong et al., 2001) Partikelgrößen von unter 1 μm .

2.1.2.6 *Particles from Gas - Saturated Solutions (PGSS)*

Weidner et al. (1995) entwickelten ein Verfahren für die Herstellung von Pulvern, das auf der Tatsache beruht, dass die Löslichkeit von komprimierten Gasen in Flüssigkeiten und Feststoffen, wie z.B. in verschiedenen Polymeren, sehr viel höher ist als umgekehrt (eine Flüssigkeit enthält dann ca. 5 - 50 % (m/m) des Gases). Mittels dieses Prozesses kann eine Vielzahl von Substanzen verarbeitet werden, da diese dabei nicht unbedingt in überkritischem Kohlendioxid löslich sein müssen. Weiterhin muss auch das komprimierte Gas nicht zwingend überkritisch sein.

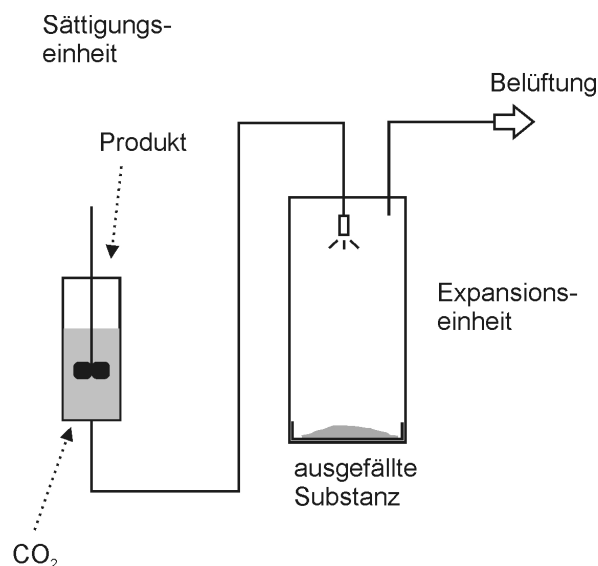


Abb. 2.7: Schematische Darstellung des PGSS-Verfahrens.

In Abb. 2.7 ist das PGSS-Verfahren schematisch dargestellt. Es enthält eine Sättigungseinheit, in der das komprimierte Gas in der geschmolzenen, oder in

einer Flüssigkeit suspendierten Substanz gelöst wird, was zu einer gasgesättigten Lösung, bzw. Suspension führt. Anschließend wird diese Lösung, bzw. Suspension in die Expansionseinheit überführt und dort durch eine Düse entspannt, wodurch es zur Ausbildung von feinen Tröpfchen, oder Partikeln kommt.

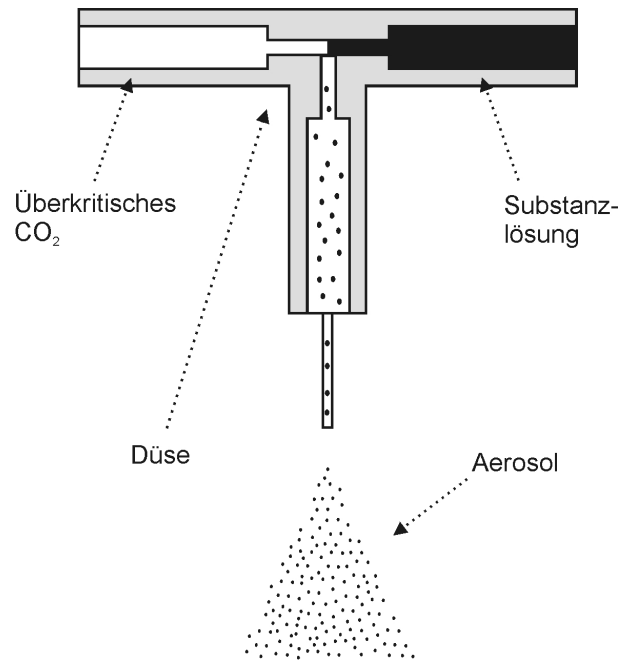


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des „mixing tee“ des CAN-BD-Verfahrens.

Einen ähnlichen Prozess beschreiben Sievers und Karst (1997). Hierbei werden in einem sog. „mixing tee“ (Abb. 2.8) eine Substanzlösung und das überkritische Kohlendioxid vereinigt. Die dabei entstehende Emulsion, bzw. Lösung wird mittels einer Düse entspannt, wobei es bei dieser spontanen Entspannung schließlich zur Bildung eines Aerosols, bestehend aus sehr feinen Tröpfchen ($< 3 \mu\text{m}$ im Durchmesser), kommt. In einer Kammer können diese anschließend getrocknet werden (Sievers et al., 1999). Dieser, als „CO₂-Assisted Nebulization Bubble-Dryer“ (CAN-BD) bezeichnete Prozess, kann auch noch weiter modifiziert werden. So kann dieses System auch transportabel eingesetzt werden, in dem man die Substanzlösung in einem kleinen Aluminiumcontainer

versiegelt und durch Aufstecken einer Kohlendioxidkartusche dieses zudosieren kann. Durch das Einsetzen einer Nadel, die in diesem Fall als Düse fungiert, kann anschließend das sehr feine Aerosol erzeugt werden. Dieses System dient somit als eine Art mobiler Vernebler.

Allerdings wird bei dem von Sievers und Karst (1997) vorgestellten Prozess bezweifelt, dass sich das Kohlendioxid wirklich in den Substanzlösungen löst. Es ist eher wahrscheinlich, dass dabei die Substanzlösung lediglich durch das Kohlendioxid zerstäubt wird.

2.1.2.7 Zusammenfassung

Es hat sich gezeigt, dass im Laufe der Zeit hinsichtlich der Mikronisation von Arzneistoffen zahlreiche Methoden entwickelt wurden, um überkritisches Kohlendioxid für diesen Anwendungsbereich nutzbar zu machen. Allerdings darf dabei nicht unerwähnt bleiben, dass es bis heute noch kein Verfahren geschafft hat, bezüglich der Mikronisation von Arzneistoffen, im großtechnischen Maßstab eingesetzt zu werden. Abgesehen davon ist das Interesse an solchen Herstellungsverfahren weiterhin sehr groß, da sie sich gegenüber den herkömmlichen Mikronisationstechniken durch diverse Vorteile auszeichnen. Abschließend sind alle hier vorgestellten Herstellungsverfahren in Tab. 2.3 zusammengefasst nochmals dargestellt.

Tab. 2.3: Zusammenfassung der einzelnen Herstellungsverfahren, die überkritisches Kohlendioxid nutzen.

Verfahren	Lösungsmittel	treibende Kraft der Fällung	Druck, p [bar]	Temperatur, T [°C]	Partikelgrößen [µm]	Vorteile	Nachteile
RESS	CO ₂	Druckabfall	200 - 300	37 - 130	0,2 - 3	Einfachheit	Löslichkeit der Substanzen in ük CO ₂ ; hohe p
GAS	org. Lösungsmittel	Antisolvent Effekt	60 - 100	25 - 60	0,1 - 100	polare Substanzen; niedrige p und T	Kein Scale up; org. LM; breite Partikelgrößenverteilung
ASES	org. Lösungsmittel	Antisolvent Effekt	70 - 150	25 - 60	0,2 - 10	polare Substanzen; niedrige p und T; steuerbare Partikelgrößen	org. LM
SEDS	org. Lösungsmittel	Antisolvent Effekt	100 - 300	35 - 90	0,05 - 10	polare Substanzen; niedrige p und T; kleine Partikelgrößen	org. LM; halb kontinuierlicher Prozess
PGSS	org. Lösungsmittel	Druckabfall	80 - 200	50 - 190	15 - 50	niedrige p; geringer LM Verbrauch	Breite Partikelgrößenverteilung; hohe T
CAN-BD	Wasser	Druckabfall	--	--	0,3 - 1	wasserlösliche Substanzen	Starker Temperaturabfall bei Druckentspannung

2.2 Inhalierbare Partikel

2.2.1 Einleitung

Die Häufigkeit von Atemwegserkrankungen, wobei das Asthma bronchiale die größte Rolle spielt, nimmt in der heutigen Gesellschaft drastisch zu. So leiden nach Schätzungen der World Health Organisation (WHO) weltweit zwischen 100 und 150 Millionen Menschen an einer solchen Erkrankung, in Deutschland sind es ca. 4 Millionen. Es zeigt sich, dass dabei mit steigendem Grad der Industrialisierung des jeweiligen Landes die Häufigkeit drastisch zunimmt. Das beste Beispiel stellen hierbei die USA dar, in denen die Anzahl der Atemwegserkrankten von 1980 bis 1994 um 75 % anstieg (WHO, 2000). Dieser drastische Verlauf unterstreicht daher die Bedeutung der Forschung in diesem Teilgebiet der Medizin, was nicht nur die Therapie, sondern auch die Entwicklung von Arzneimitteln sowie pulmonalen Arzneiformen betrifft.

2.2.2 Respirationstrakt und Partikelabscheidung

Die Lunge besteht aus zwei getrennten Lungenflügeln, die ihrerseits den Brustraum ausfüllen. Die Lungenflügel bilden jeweils ein System, was sich in die Tiefe der Lunge immer weiter verästelt. Dabei stellen die Stammbronchien den Anfang dar, in die sich der immer mehr und mehr verästelnde Bronchialbaum anschließt. Dieser verengt und spaltet sich immer weiter auf (Bronchioli), bis er letztendlich in die Alveolargänge (Ductus alveolaris) mündet. Die Alveolen (ca. 300 Millionen) stehen schließlich über ein dichtes Kapillarnetz mit venösem Blut in Kontakt und bewerkstelligen darüber den Austausch der Atemgase (Mutschler, 1997).

Das Einbringen eines Wirkstoffes zur lokalen oder systemischen Behandlung von Atemwegserkrankungen in die Lunge stellt dabei eine große Herausforderung dar, wobei eine Vielzahl von Faktoren zu beachten sind. So können beispielsweise die natürlichen Reinigungs- und Abwehrmechanismen

der Lunge dieses Ziel stark beeinträchtigen. Gerade der mukoziliäre Transport und die so genannte alveoläre Clearance sind in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung, da die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes hierdurch drastisch reduziert werden kann (Lansley, 1993).

Ein weiterer Faktor, der die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes in diesem Zusammenhang beeinflusst, ist die Ablagerungswahrscheinlichkeit (Deposition) der Wirkstoffpartikel selbst. Diese ist zum einen abhängig von den atemphysiologischen Bedingungen (Atemzugvolumen, Atemfrequenz, Atemfluss) des inhalierenden Patienten, zum anderen aber auch von den physikalischen Parametern (Größe, Dichte, Form) der Wirkstoffpartikel. In Abb. 2.9 sind die drei Mechanismen dargestellt, die für die Deposition von Partikeln unterschieden werden können.

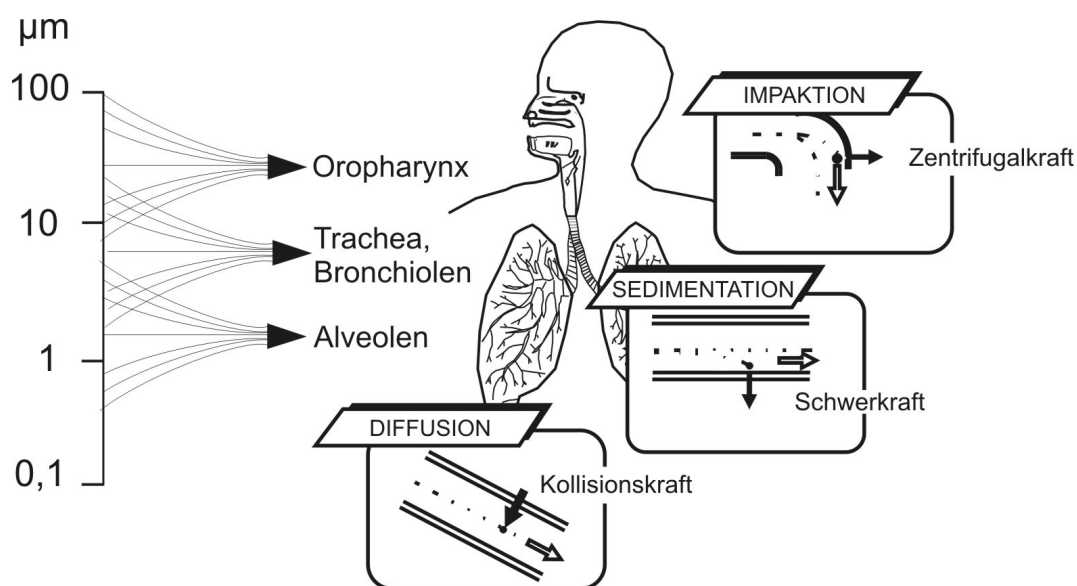


Abb. 2.9: Partikeldeposition im Respirationstrakt.

Dabei beschreibt die Impaktion oder auch Prallabscheidung die Tendenz eines Teilchens aufgrund seiner Massenträgheit geradeaus weiterzufliegen, wenn der Luftstrom eine Richtungsänderung erfährt. Dieser Mechanismus führt daher hauptsächlich bei Partikeln $> 10 \mu\text{m}$ zur Abscheidung im Mund-Rachenraum

sowie den Bronchien. Den zweiten Mechanismus stellt die Sedimentation dar, wobei nach dem Stokes-Cunningham-Gesetz die Sedimentationsgeschwindigkeit von Partikeln mit dem Quadrat des Teilchenradius verknüpft ist. Diese Abscheidung findet sich überwiegend bei Partikeln mit einer Größe von 1 - 5 μm und besitzt dabei für die pharmazeutische Anwendung die größte Relevanz. Allerdings ist dieser Mechanismus stark vom inhalierenden Patienten abhängig, da die Atemfrequenz und Atemhaltezeit hierbei eine große Rolle spielen. Dies wiederum unterstreicht die Wichtigkeit der Verständlichkeit des Applikationssystems durch den anwendenden Patienten, sowie die Beratung durch die Apotheke. Die Diffusion schließlich bildet den dritten grundlegenden Mechanismus, der hauptsächlich für Partikel $< 1 \mu\text{m}$ entscheidend ist, die bis in Alveolen vordringen können. Er ist therapeutisch allerdings von untergeordneter Bedeutung, da diese Teilchen zu einem großen Teil wieder ausgeatmet werden (Stahlhofen et al., 1980).

Ein weiterer Abscheidemechanismus, der allerdings eher von toxikologischem Interesse ist, ist die Interzeption. Dabei heften sich faserförmige Teilchen an die Oberfläche der Schleimhäute, wobei der Schwerpunkt des Teilchens im Zentrum des Luftstroms verbleibt. Die Entstehung mancher Lungenerkrankungen, wie z.B. die Asbestose, kann folglich mit diesem Mechanismus erklärt werden.

2.2.3 Budesonid

Als inhalierbares Glukokortikoid stellt Budesonid (Abb. 2.10), neben Beclomethason-17,21-dipropionat, Flunisolid und Fluticason-17-propionat einen wichtigen Arzneistoff zur Langzeitbehandlung des Asthma bronchiale dar. In den Empfehlungen zur Asthmatherapie bei Kindern und Erwachsenen (Wettengel et al., 1998) werden die Glukokortikoide im Stufenplan ab der Stufe 2 (leicht persistierendes Asthma) neben anderen Wirkstoffen für die Dauermedikation empfohlen.

Diese Glukokortikoide besitzen im Vergleich zu Hydrocortison eine hohe Rezeptoraffinität und zeichnen sich zudem durch eine hohe antiendzündliche gegenüber einer geringen mineralokortikoiden Wirkung aus. Einen weiteren Vorteil dieser Glukokortikoide stellt das weitestgehende Fehlen von systemischen Nebenwirkungen bei der lokalen Anwendung in der Lunge dar (Mutschler, 1997).

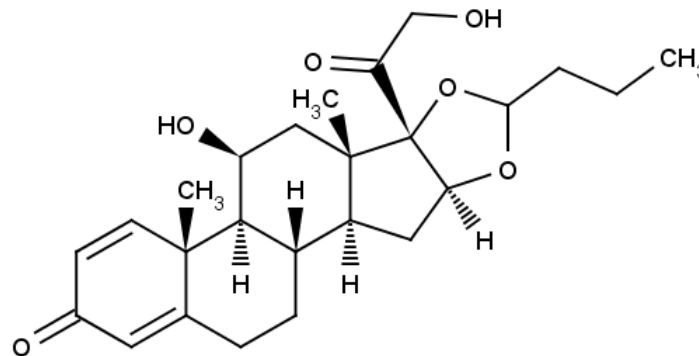


Abb. 2.10: Strukturformel Budesonid.

Die Durchführbarkeit der Mikronisation dieser Glukokortikoide mit überkritischem Kohlendioxid im ASES-Prozess wird bei Steckel, et al. (1997) beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass es nicht bei allen verwendeten Glukokortikoiden zu einer Partikelbildung kam. Ausschlaggebend schien hierfür der Verteilungskoeffizient zu sein, wobei eine Grenze bei einem $\log P$ von 4 festgesetzt wurde ($\log P$ entspricht dem dekadischen Logarithmus des Verteilungskoeffizienten). Oberhalb dieses $\log P$ -Wertes kam es unter den gewählten Versuchsbedingungen (80 bar und 38°C) zu keiner Fällung der jeweiligen Steroide im überkritischen Kohlendioxid. Das Budesonid mit einem $\log P$ -Wert von 3,1 ist somit bei den oben genannten Bedingungen für eine Fällung im überkritischen Kohlendioxid geeignet. Ähnliche Ergebnisse erzielten Martin, et al. (2002) die mit der „Precipitation with a compressed antisolvent“-

Technik (PCA) bei verschiedenen Druck- und Temperatur-Einstellungen Mikropartikel in einem Größenbereich von 1 - 2 μm erhielten. Eine weitere Studie von Velaga, et al. (2002), die auf der Mikronisation von Budesonid mit der „Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids“-Technik (SEDS) beruhte, konnte weiterhin zeigen, dass es dabei nicht möglich war, ein amorphes oder polymorphes Produkt zu erhalten. So wurde bei allen angewendeten Versuchsparametern immer Budesonid in seiner einzig bekannten Kristallform erhalten.

Dabei zeigen diese Ergebnisse, dass sich das Budesonid sehr gut für die Mikronisation im überkritischen Kohlendioxid eignet, wobei allerdings die Löslichkeit im überkritischen Kohlendioxid zu beachten ist.

2.2.4 Formoterol

Ähnlich wie die Glukokortikoide spielt auch das Formoterol (Abb. 2.11) als langwirksames Beta₂-Sympathomimetikum eine wichtige Rolle in der Therapie des Asthma bronchiale. Es wird im Stufenplan hauptsächlich für die Langzeittherapie bei Asthma bronchiale ab der Stufe 3 (mittelgradig persistierendes Asthma), in Kombination mit einem Glukokortikoid, eingesetzt. Dabei bietet es durch seine lange Wirkdauer (8 - 12 Stunden) und den raschen Wirkungseintritt Vorteile, insbesondere bei Patienten mit nächtlichem Asthma und/oder mehrfachen obstruktiven Ereignissen im Laufe des Tages.

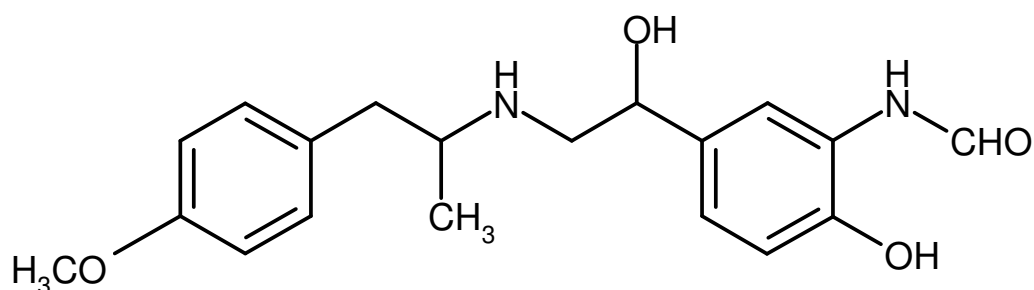


Abb. 2.11: Strukturformel Formoterol.

Über die Mikronisation von Formoterol im überkritischen Kohlendioxid ist bis jetzt noch keine Studie vorhanden, jedoch über andere Beta₂-Sympathomimetika, wie z.B. das Salmeterol-xinafoat und das Salbutamol-sulfat. Tong, et al. (2001, 2002) zeigten, dass bei der Mikronisation von Salmeterol-xinafoat mit der SEDS-Technik zwei verschiedene polymorphe Formen erhalten werden konnten. Hierbei wurde Salmeterol-xinafoat (SX) bei konstant 250 bar und zwei verschiedenen Temperaturen (40°C und 90°C) aus einer methanolischen Lösung im überkritischen Kohlendioxid präzipitiert, wobei bei 40°C das SX-I und bei 90°C das SX-II erzeugt werden konnte. Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei um Enantiotrope handelt, mit SX-I als der bei Raumtemperatur stabilen Modifikation. Ein amorphes Produkt konnte bei diesen Untersuchungen nicht beobachtet werden.

Die Mikronisation von Salbutamol-sulfat mit der „Supercritical-Anti-Solvent“-Technik (SAS) führte erst bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel zu einer Präzipitation im überkritischen Kohlendioxid (Reverchon et al., 2001). Dabei wurden verschiedene Druck- und Temperaturvariationen angewendet und auf diesem Wege Partikel erzeugt, die sich durch eine stäbchenförmige Morphologie, mit einer Länge von 1 - 3 µm und einem Durchmesser von 0,2 - 0,4 µm, auszeichneten.

Durch diese Resultate konnte gezeigt werden, dass sich Beta₂-Sympathomimetika in überkritischem Kohlendioxid fällen lassen und eine Partikelbildung möglich ist. Betrachtet man nun den log P-Wert des Formoterols mit 2,1 (vgl. Kapitel 2.2.3), dann lässt auch dieser den Schluss zu, dass das Formoterol für eine Fällung in überkritischem Kohlendioxid geeignet ist.

2.3 Liposomen

2.3.1 Einleitung

Um das Ziel zu erreichen gegen nahezu jede Krankheit einen Wirkstoff in der Hand halten zu können, sind im Laufe der Zeit hunderte sehr potenter Wirkstoffe entwickelt worden, die zumindest in vitro eine hohe Aktivität bezüglich einer Vielzahl von therapeutischen Zielen bieten. Allerdings zeigen viele dieser Wirkstoffe Probleme bei der in vivo Anwendung (Sharma et al., 1997).

Betrachtet man z.B. die große Anzahl an antineoplastischen Wirkstoffen, so zeigt sich, dass die Selektivität nicht nur auf Tumorzellen begrenzt ist, sondern auch „gesunde Zellen“ zerstört werden. Die geringe therapeutische Breite dieser Substanzen macht den Einsatz zum einen sehr schwierig und zum anderen sehr belastend für den jeweiligen Patienten.

Um diesen Umständen entgegen zu wirken, ist es das Ziel der Forschung entsprechende Transporter zu entwickeln, um solche Wirkstoffe direkt an ihren Wirkort zu transportieren. Dadurch kann zum einen die Toxizität der jeweiligen Substanzen und zum anderen die therapeutisch nötige Dosis verringert werden, da auf diese Weise ein gezielter Einsatz möglich wird. Ein Forschungsansatz dabei ist, auf so genannte Liposomen als Arzneistoffträger zurückzugreifen (Gregoriadis et al., 1993).

2.3.2 Definition

Unter dem Begriff Liposomen werden künstlich hergestellte Vesikel zusammengefasst, die einen Durchmesser von 0,05 - 5 µm besitzen und sich spontan bilden, wenn die entsprechenden Lipide in einem wässrigen Medium solvatisiert werden (Bangham und Horne, 1964). Bei der Beladung dieser Liposomen mit Wirkstoffen zeigen sich dabei deutliche Unterschiede je nach Art der eingesetzten Arzneistoffe. Während hydrophile Wirkstoffe zwischen den

einzelnen Lamellen, die mit wässrigem Medium gefüllt sind, sowie im Kern wieder finden, werden hydrophobe Wirkstoffe direkt in die Lipiddoppelmembran eingebaut (Abb. 2.12).

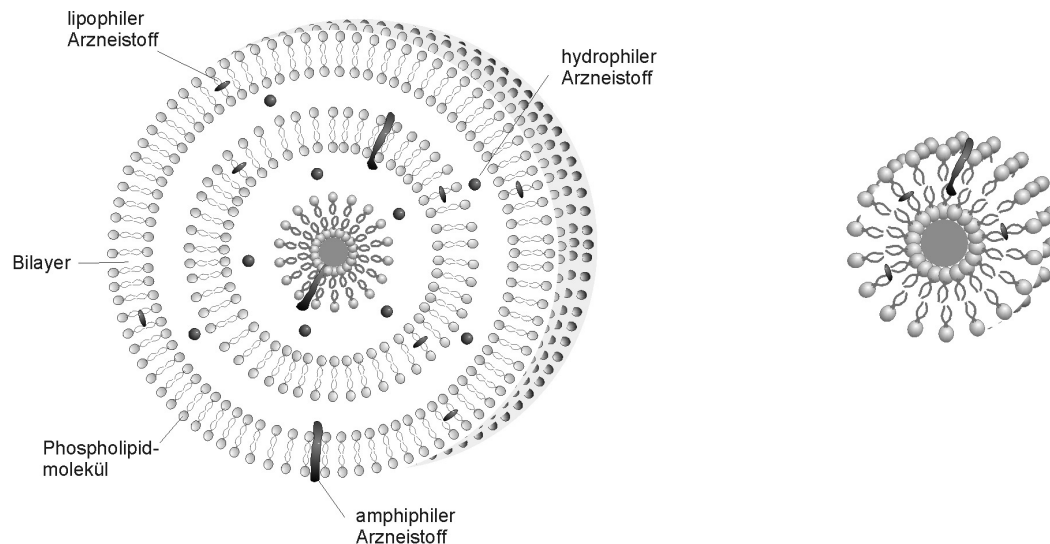


Abb. 2.12: Schematische Darstellung eines unilamellaren (rechts) und eines multilamellaren Liposoms (links).

Die Lipide, die bei der Herstellung der Liposomen zum Einsatz kommen, sind hauptsächlich Phospholipide, Glycolipide und Cholesterol. Dabei werden hauptsächlich drei verschiedene Grundtypen von Liposomen unterschieden, die sich durch Unterschiede in Größe und Lamellenzahl auszeichnen. Im Laufe der Zeit sind zu diesen drei Grundtypen noch weitere hinzugekommen, auf die hier allerdings nicht näher eingegangen werden soll:

SUV (small unilamellar vesicles) sind kleine unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser bis zu 50 nm. Sie zeigen im Gegensatz zu anderen Liposomen große Membrankurvaturen, wodurch hohe Membranspannungen entstehen. Das geringe Innenvolumen bedingt zwar eine geringe Einschlusseffizienz für hydrophile Substanzen, dafür liegt der Vorteil in ihrer geringen Größe. Große Liposomen reichern sich meist nach intravasaler Applikation in Leber und Milz an, die SUV dagegen zeigen eine bessere Organverteilung. Auch ist es ihnen

durch ihre geringe Größe besser möglich durch Lücken zwischen Endothelzellen der Kapillarwände aus dem Gefäßsystem in das periphere Gewebe einzudringen. LUV (large unilamellar vesicles) zeigen mit einem Durchmesser von > 50 nm eine gute Lagerstabilität durch nahezu spannungsfreie Membranen. Weiterhin zeigen sie ein günstiges Verhältnis von verkapselter Menge an hydrophiler Substanz zu eingesetztem Lipid.

MLV (multilamellar large vesicles) haben eine Größe von ca. 100 nm bis hin zu mehreren 1000 nm. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine große Anzahl von konzentrischen Bilayerschalen bilden können. Aufgrund der daraus resultierenden hohen Anzahl von Lamellen ist die Freisetzung von Substanzen aus ihnen verzögert, wodurch sie als Depotarzneiformen verwendet werden können. Ein großer Nachteil der MLV ist ihre bevorzugte Aufnahme in phagozytierende Zellen des Retikuloendothelialen Systems nach parenteraler Applikation, was den Transport des Wirkstoffes an den Wirkort erschwert.

2.3.3 Lipidauswahl

Zum Einsatz kommen meist Lipide auf Basis von Phosphatidylcholin, da dieses den wichtigsten Membranbaustein im menschlichen Körper darstellt. Das Phosphatidylcholin wird bevorzugt aus Soja, wegen der geringeren Kosten, oder aus Ei gewonnen und in einer Vielzahl von Variationen mit verschiedenen Fettsäureestern (C-Atome > 16) und unterschiedlichen Sättigungsgraden angeboten. Dabei werden die Phospholipide meist mit Ethanol aus dem Soja extrahiert und durch anschließende chromatographische Auftrennungen die einzelnen Variationen erhalten. Zusätzlich dazu kann im Anschluss an diese Auftrennung eine Hydrierung folgen, durch die möglichst gesättigte Phospholipide entstehen.

Normalerweise bilden die Produkte aus Ei und Soja bei Temperaturen zwischen 0°C und weit über Körpertemperatur fluide flüssigkristalline Membranen (L_{α} -Phase), wobei durch die Zugabe von Cholesterol diese Fluidität und damit die

Membranpermeabilität herabgesetzt werden kann. Die hydrierten Produkte dagegen liegen bei 50°C und darüber in einer Gelphase (L_{β} -Phase) vor, durch die die Membranpermeabilität stärker herabgesetzt ist, als bei den nicht hydrierten Produkten. Weiterhin sind die hydrierten Produkte schwieriger zu verarbeiten und können zu veränderten pharmakologischen Effekten führen. Dafür besitzen sie den Vorteil einer höheren Stabilität und Reinheit gegenüber den ungesättigten Produkten (Müller et al., 1998).

2.3.4 Herstellungsverfahren

Mittlerweile ist eine große Anzahl von Herstellungsverfahren bekannt. Da das Herstellungsverfahren ausschlaggebend für die Größe und Eigenschaften der Liposomen ist (Sharma et al., 1997), ist dieses meist auf die einzelnen Grundtypen der Liposomen zugeschnitten.

Die einfachste und meist verbreitete Methode, die zur Herstellung von MLV genutzt wird, ist die Filmmethode (Abb. 2.13).

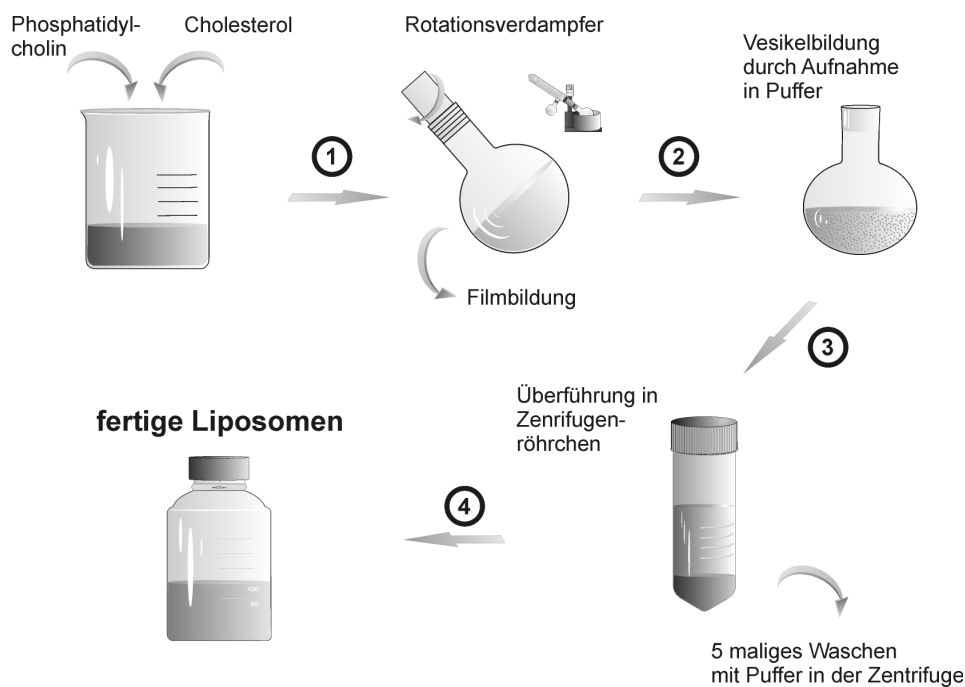


Abb. 2.13: Schematische Darstellung der Filmmethode, Erklärung siehe Text (modifiziert nach Moderne Arzneiformen, 1997).

Hierbei werden die Liposomen bildenden Substanzen in einem Lösungsmittel gelöst und durch das Abdampfen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer ein dünner Lipidfilm erzeugt. In einem nächsten Schritt findet dann die Liposomenbildung durch die Solvatisierung mit Puffermedium statt. Durch mehrmaliges Waschen werden die Liposomen von überschüssigem Wirkstoff befreit und gereinigt. Mit diesem letzten Schritt ist die Herstellung abgeschlossen. Je nachdem ob ein hydrophiler oder lipophiler Wirkstoff eingesetzt werden soll, wird dieser entweder im Puffermedium oder bei der Lipidzugabe im organischen Lösungsmittel gelöst. Eine große Rolle spielt bei diesem Verfahren auch die Phaseninversionstemperatur der eingesetzten Lipide. Um eine vollständige Solvatisierung zu gewährleisten, sollte die Temperatur des zugefügten Puffermediums kurz oberhalb der Phaseninversionstemperatur liegen.

Mit dieser Herstellungsmethode werden bevorzugt MLV hergestellt, die sehr heterogen sind. Um diesem Umstand zu begegnen, kann die Liposomensuspension anschließend mit Ultraschall behandelt oder durch Polycarbonatfilter extrudiert werden, um auf diese Weise eine einheitliche Liposomengröße zu erreichen (Lasic, 1993).

Andere Verfahren nutzen ebenfalls die spontane Vesikelbildung der Lipide, wobei das Hauptaugenmerk auf der mechanischen Weiterverarbeitung der entstandenen Vesikel liegt. So kommen hier auch Ultraschall oder Filter (Olson et al., 1979) zum Einsatz, um die Vesikel zu zerreißen, damit sich anschließend Liposomen aufbauen. Dabei können beispielsweise beim Einsatz von hohen Ultraschallenergien SUV erzeugt werden (Huang, 1969). Darüber hinaus können auch speziell entwickelte Geräte, wie die French Press (Hamilton et al., 1980) oder Microemulsifier (Mayhew et al., 1984) genutzt werden, um unilamellare Vesikel zu erzeugen.

Des Weiteren werden Methoden eingesetzt, die auf der Injektion von Lösungsmitteln (Kremer et al. 1977), Verwendung von Detergentien oder

speziellen Fusionstechniken beruhen. Auf diese Verfahren soll hier nicht weiter eingegangen werden, da sie in der weiterführenden Literatur ausführlich beschrieben sind (Lasic, 1993; Szoka, 1980).

Neben diesen eher konventionellen Methoden zur Herstellung von Liposomen, sind auch einige Verfahren beschrieben, die überkritisches Kohlendioxid nutzen. So zeigten Badens et al. (2001), dass sich verschiedene Soja-Lecithine mit der SAS-Technik zu Mikropartikeln mit einer Größe von 1 - 40 μm verarbeiten ließen. Castor und Chu (1998) beschreiben in ihrem Patent ein neuartiges Verfahren zur Herstellung von Liposomen mit überkritischem Kohlendioxid, die einen hydrophoben Wirkstoff enthalten. Dabei werden die Lipide, der hydrophobe Wirkstoff und Wasser zusammen mit überkritischem Kohlendioxid in einer Hochdruckkolonne gemischt und dann in weiteren Hochdruckkolonnen entspannt. Bei diesem Entspannungsschritt bilden sich dann die mit Wirkstoff beladenen Liposomen und können als fertige Suspension entnommen werden.

2.3.5 Anwendungsgebiete

Wie schon in der Einleitung erwähnt (Kapitel 2.3.1), kommen Liposomen sehr oft zum Einsatz, um die Verträglichkeit und/oder die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen zu erhöhen. Beispiele dafür stellen unter anderem Liposomenformulierungen des Amphotericin B (AmBisome[®]) und Paclitaxel dar. So konnte durch das Liposomenprodukt die Verträglichkeit des Amphotericin B deutlich gesteigert werden. Beim Paclitaxel zeigt sich dieser Effekt ebenfalls, allerdings wurde hier durch die Liposomenformulierung zusätzlich eine Steigerung der Bioverfügbarkeit erreicht (Sharma et al., 1997).

Wie ein solcher antineoplastischer Wirkstoff in einer Liposomenformulierung tatsächlich an seinen Wirkort gelangt, zeigt die Abb. 2.14. Das normale Endothel besteht aus einer geschlossenen Zellschicht, so dass hier die Liposomen nicht in das Gewebe eindringen können. Eine Besonderheit stellt das Endothel des Retikuloendothelialen Systems (RES) dar, welches fenestriert ist.

Diese Löcher haben eine Größe von bis zu 100 nm, durch die die Liposomen eindringen können, dann jedoch von Makrophagen des RES phagozytiert und somit zerstört werden. Das eigentliche Zielgewebe, das Tumor-Gefäßendothel, zeichnet sich dadurch aus, dass dort Lücken im Endothel durch das aggressive Vorgehen der Tumorzellen vorhanden sind. Diese Lücken (Größe bis 800 nm) dienen den Liposomen somit als Eindringort in den Tumor, wo der Wirkstoff dann seinen Wirkort erreicht hat.

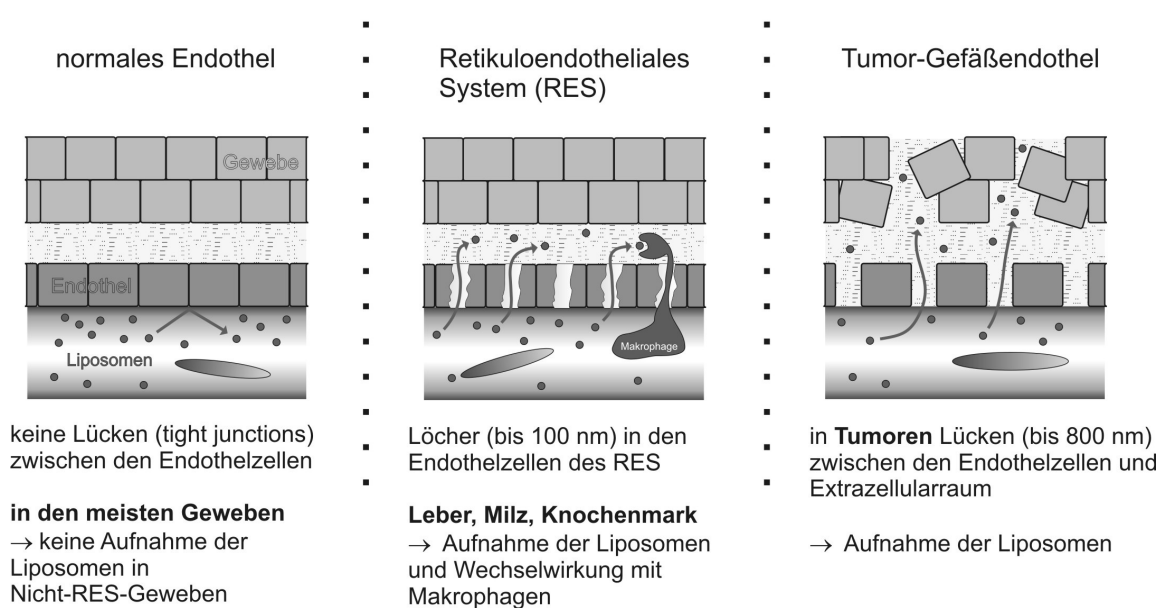


Abb. 2.14: Darstellung der Wirkungsweise und des gezielten Transports der Liposomen in das Zielgewebe.

Ein weitere Möglichkeit Liposomen einzusetzen, betrifft die Verlängerung der Wirkstofffreisetzung. So zeigten Liposomen, die mit neuartigen synthetischen Lipidanaloga auf Polyethylenglycol-Basis hergestellt wurden, eine verlängerte Wirkstofffreisetzung in Mäusen, da diese wesentlich schlechter in das RES aufgenommen werden konnten (Allen et al., 1991). Diese Art von Liposomen wird auch als „Stealth-Liposomen“ bezeichnet und kann mit einer Vielzahl von synthetischen Lipiden erzeugt werden (Cattel et al., 2004). Aufgrund der schlechteren Aufnahme der Liposomen durch die Makrophagen des RES kommt

es zu einer längeren Verweildauer der Liposomen im Blut und damit letztendlich zu einer Verzögerung der Wirkstofffreisetzung.

Neben der parenteral invasiven Applikation der Liposomen, ist auch ihre pulmonale Applikation seit langem Gegenstand der Forschung. Die große Oberfläche und die Nähe der Alveolen zu den Blutgefäßen machen damit die Lunge nicht nur für lokal, sondern auch für systemisch wirkende Substanzen sehr attraktiv. Ein weiterer großer Vorteil der Liposomen ist die chemische Verwandtheit der Phospholipide zum „Surfactant Factor“, der die Lunge überzieht. Es hat sich gezeigt, dass die Liposomen durch diese Zusammensetzung in den „Surfactant Factor“ aufgenommen werden können und auf diesem Wege mit diesem verschmelzen (Lasic, 1993). Dabei sind die Toxizität und die Aufnahme in Makrophagen abhängig von der Liposomenformulierung und können somit genau gesteuert werden (Gonzalez-Rothi et al., 1991).

Üblicherweise werden Liposomen als Suspensionen über Vernebler in die Lunge eingebracht. Diese haben den Vorteil, dass die Liposomensuspensionen direkt vernebelt und im Gegensatz zu den Metered Dose Inhalern (MDI) und Dry Powder Inhalern (DPI) relativ hohe Dosierungen appliziert werden können (Taylor et al., 1993). Ein großer Nachteil allerdings ist gerade bei den Suspensionen das Problem der Stabilität und des Wirkstoffverlustes in den Liposomen (Desai et al., 2003). Aus diesen Gründen wird immer mehr nach Alternativen gesucht, die Liposomen auch in Pulverform über die MDI oder DPI in die Lunge einzubringen, wobei dann der große Nachteil ihrer mangelnden Stabilität weitestgehend entfällt. Ergebnisse mit Budenosid-haltigen Liposomen, die über eine Gefriertrocknung der Liposomensuspension und anschließende Mahlung in die Pulverform überführt wurden, zeigen, dass auch auf diesem Wege eine verlängerte Wirkstofffreisetzung in Rattenlungen möglich war (Joshi et al., 2001). Gerade die Gefriertrocknung der Liposomensuspension wird

favorisiert und zeigt, dass sich aus den gemahlten Lyophilisaten bei Hydratisierung sehr schnell MLV bilden (Desai et al., 2003).

Somit sind Liposomenformulierungen, als Suspension oder als gefriergetrocknetes Produkt, ein viel versprechender Ansatz, um Arzneistoffe für eine lokale oder systemische Wirkung über die Lunge zu applizieren.

3 ANGEWANDTE METHODEN

3.1 Herstellung

Alle Versuche wurden mit dem Aerosol Solvent Extraction System (ASES), das in Kapitel 2.1.2.4 ausführlich beschrieben wird, hergestellt. Dabei wurde in allen Fällen Kohlendioxid (Kohlendioxid zum Schweißen, DIN EN 439, Gruppe C 1) der Firma Messer Griesheim (Sulzbach, Deutschland) mit einem Reinheitsgrad > 99,7 Vol. % verwendet.

Auf die genauen Herstellungsparameter soll in diesem Kapitel nicht weiter eingegangen, sondern auf die jeweiligen Kapitel verwiesen werden. Für die Berechnung der Ausbeuten wurde jeweils nur das im Auffangbehälter gesammelte Produkt herangezogen und auf die jeweilige Einsatzmenge bezogen. Produkt, das an den Kolonnenwänden und den Ein- und Auslassintern haftete, wurde verworfen und nicht mit in die Berechnung einbezogen.

3.2 Charakterisierung

3.2.1 Partikelgrößenverteilung

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung wurde ein HELOS[®] Laserdiffraktometer (Helium Neon Laser Optisches System, Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) verwendet. Die Messungen beruhen auf dem Beugungsverhalten eines Laserstrahles an Partikeln, wobei große Teilchen eine kleine und kleine Teilchen eine große Beugung des Lichtes bewirken (Abb. 3.1). Nach der Beugung des Laserstrahls an den Teilchen wird dieser in einer Fourier-Transformationslinse gesammelt und auf den Detektor weitergeleitet. Die Partikelgrößenverteilung wird anschließend nach der Fraunhofer-Theorie berechnet. Da die Fraunhofer-Theorie allerdings zur Berechnung volumengleiche Kugeln annimmt, ist diese Berechnung eigentlich nur für kugelförmige Partikel geeignet (International Standard ISO 13320, 1999).

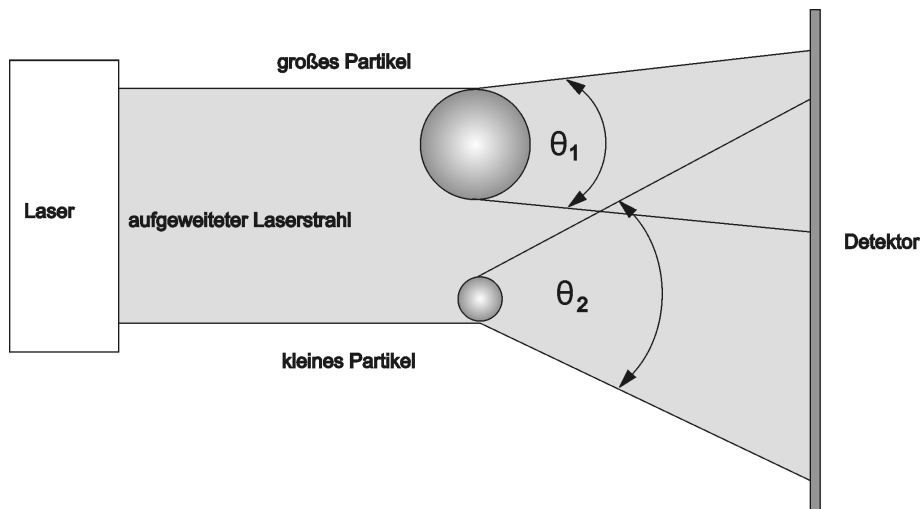


Abb. 3.1: Beispielhafte Darstellung der verschiedenen Beugungsverhalten eines Laserstrahles an großen und kleinen Partikeln.

Die Messungen wurden alle mit Hilfe des Systemmoduls CUVETTE[®] (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) in einer Quarzküvette mit einem Fassungsvermögen von 3 ml durchgeführt, wobei die Proben jeweils als Suspensionen vermessen werden konnten. Auf die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Suspensionen wird in den jeweiligen Kapiteln eingegangen. Zur Vermeidung der Vermessung von Agglomeraten kam es bei allen Proben zu einer Behandlung von 30 Sekunden im Ultraschallbad vor der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung. Anschließend wurden die so aufbereiteten Suspensionen in die Quarzküvette überführt und die jeweilige Brennweite der Linse nach den Partikelgrößenverteilungen der Proben ausgewählt und zur Vermessung genutzt. Die Messung erfolgte in einem Zeitraum von 10 Sekunden, bei einer Messbasis von 500 Millisekunden und zehnfacher Wiederholung. Dabei wurde die optische Konzentration in der CUVETTE[®] jeweils zwischen 10 % und 15 % eingestellt.

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit der systemeigenen Software Windox[®]. Dabei wird die Partikelgrößenverteilung grafisch dargestellt, indem der Mengenanteil auf der Ordinate und die Teilchengröße (x) auf der Abszisse

dargestellt werden. Aus dieser Darstellung lässt sich anschließend die Verteilungsdichtefunktion $q_r(x)$ ableiten, die für jede Teilchengröße (x) ihren Anteil an der Gesamtmenge angibt, wobei die Fläche unter der Kurve stets eins, entsprechend 100 % Gesamtmenge ausmacht. Zusätzlich dazu wird weiterhin die Verteilungssummenkurve $Q_r(x)$ angegeben. Diese gibt den Mengenanteil aller Teilchen mit Größen kleiner oder gleich x an. Um Vergleiche zwischen den einzelnen Proben ermitteln zu können, wurden immer die charakteristischen Verteilungskenngrößen X_{10} , X_{50} und X_{90} , in Mikrometer, angegeben. Diese Verteilungskenngrößen entsprechen dem Partikelgrößenanteil in Prozent des Gesamtvolumens. Eine bestimmte ermittelte Größe bei X_{90} bedeutet also, dass 90 % dieser Partikel kleiner oder gleich der ermittelten Größe sind.

Weiterhin fand jeweils die Berechnung der Spannweite statt, um die Breite der Partikelgrößenverteilung aufzuzeigen, wobei Formel 1 genutzt wurde.

Formel 1:

$$\text{Spannweite} = \frac{X_{90} - X_{10}}{X_{50}}$$

3.2.2 Partikelmorphologie

3.2.2.1 Rasterelektronenmikroskop

Um einen Eindruck von der Morphologie der hergestellten Partikel zu erhalten, wurden Aufnahmen dieser mit einem Rasterelektronenmikroskop angefertigt. Dazu wurde das Philips XL 20 (Philips, Eindhoven, Niederlande) verwendet. Die Proben wurden jeweils zur Vorbereitung auf Aluminiumprobenhalter mit Hilfe von selbstklebenden Carbon-Leit-Tabs (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) fixiert. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben mit dem Sputter Coater SCD 005 (Bal-Tec AG, Liechtenstein) mit der notwendigen

Goldschicht versehen. Diese Beschichtung wurde in einer Argon-Atmosphäre (0,5 bar) bei 50 mA 65 Sekunden lang durchgeführt. Die Aufnahmen wurden jeweils bei verschiedenen Vergrößerungen (siehe jeweiliges Kapitel) und angelegten Spannungen des Elektronenstrahls (12 - 20 kV) angefertigt.

3.2.2.2 Lichtmikroskop

Zur Charakterisierung der Liposomensuspensionen wurde ein Carl-Zeiss Mikroskop verwendet. Zur endgültigen Auswertung diente ein Tubuseinsatz, der mit einer digitalen Kamera (Breukhoven Microscope Systems, Niederlande) gekoppelt war. Dabei wurden die Suspensionen jeweils 1:1 verdünnt auf einen Objektträger gegeben und mit 60-facher Vergrößerung betrachtet. Um die Membranstrukturen der Liposomen besser begutachten zu können, wurde zusätzlich ein Polarisator verwendet, wodurch die für Liposomen typische Kleeblattstruktur aufgezeigt werden konnte.

3.2.3 Röntgendiffraktometrie

Das hier verwendete Gerät ist das Diffraktometer Stadi P (Stoe & Cie GmbH, Darmstadt, Deutschland). Es ist mit zwei Messplätzen und einer stationären Kupfer-Anode (40 kV, 30 mA, 1,2 kW, $\text{CuK}\alpha_1$ -Strahlung) ausgestattet. Die Röntgendiffraktometrie wurde in diesem Fall angewandt, um den kristallinen Aufbau der entstandenen Produkte zu begutachten und zu bewerten. Darüber hinaus können mit ihr polymorphe Formen oder Kristalldefekte einer Substanz identifiziert werden. Die Theorie beruht darauf, dass der durch eine Röntgenröhre emittierte $\text{CuK}\alpha_1$ Röntgenstrahl auf die Pulverprobe trifft, von dieser gebeugt und anschließend in einem Detektor aufgenommen wird. Der Monochromator, der die gewünschte Wellenlänge herausfiltert, sitzt dabei gebogen zwischen Röntgenröhre und Probenhalter. Der Detektor (Zählrohr) ist hinter dem Probenhalter angebracht und fährt auf einer festgelegten Kreisbahn um die Probe (ω -Kreis). Auf diese Weise sucht er die Winkel 2-Theta an denen

das Licht, aufgrund von Schwingungen der Atome im Probenmolekül, gebeugt wird. Schematisch ist dieser Vorgang in Abb. 3.2 dargestellt.

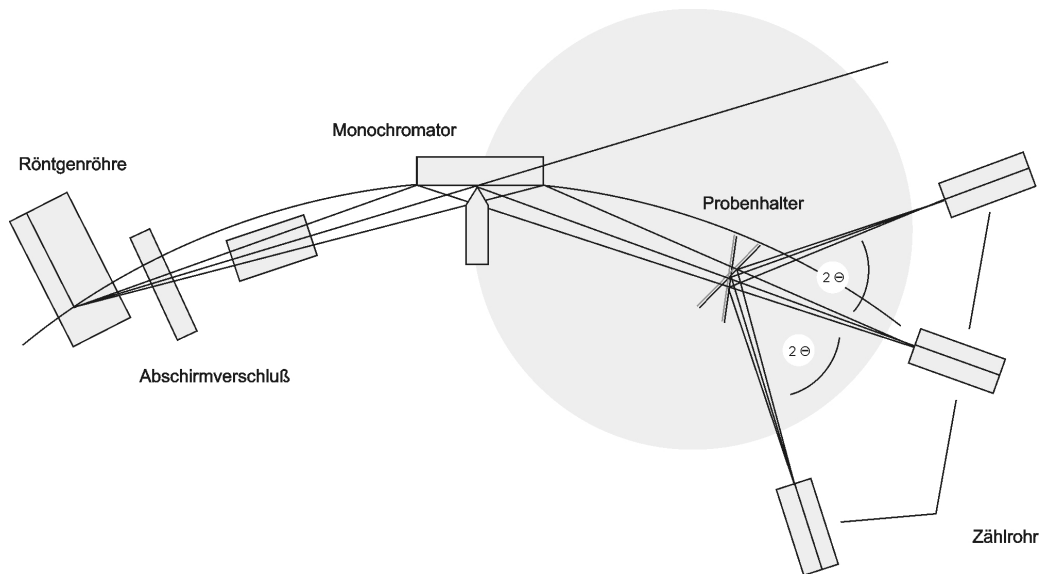


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau des Röntgendiffraktometers.

Der Messbereich aller auf diese Weise vermessenen Proben lag zwischen 5° und 45° 2-Theta. Mit Hilfe der Computersoftware WinXPOW (Stoe & Cie GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden die einzelnen Röntgendiffraktogramme qualitativ ausgewertet und miteinander verglichen.

3.2.4 Differential Scanning Calorimetry

Die Differential Scanning Calorimetry (DSC) wurde zur Bestimmung des Schmelzpunktes verwendet. Zu diesem Zweck stand die DSC7 (Perkin Elmer, Boston, USA) zur Verfügung. Es handelt sich dabei um eine leistungskompensierte DSC-Apparatur, bei der Referenz- und Probenmesszelle unabhängig voneinander von demselben Temperaturprogramm angesteuert werden. Um diese Unabhängigkeit zu gewährleisten besitzt jede der beiden Zellen ein eigenes Heizelement und wird jeweils darüber erhitzt. Mit dieser

Anordnung wird es möglich, die zum Aufheizen der Probe erforderliche Energie im Vergleich zur Referenzzelle zu bestimmen und dadurch thermische Ereignisse aufzuzeichnen. Die Steuerung und Auswertung erfolgte über die Software Pyris[®] von Perkin Elmer.

Die zu untersuchenden Proben wurde für die Vermessung jeweils in ein tariertes DSC-Pfännchen (40 µl, Perkin Elmer, Boston, USA) auf einer Analysenwaage (Mikrowaage MC5, Sartorius, Göttingen, Deutschland) genau eingewogen und mit einem Deckel verschlossen, wobei die Einwaagen zwischen ca. 1 - 3 mg variierten. Alle Messungen fanden mit geschlossenem Deckel (closed pan Verfahren) statt und wurden bei einer Heizrate von 10°C/min durchgeführt. Die Endtemperatur richtete sich dabei immer nach dem Schmelzpunkt der Substanz, der zuvor optisch auf einer Koflerbank ermittelt wurde. Bei der Auswertung stellen endotherme Ereignisse immer einen positiven Wärmefluss dar, was für die Betrachtung der DSC-Kurven bedeutet, dass die endothermen Ereignisse dort immer nach oben gerichtet sind.

3.2.5 Dynamische Wasserdampf Sorption

Um Kenntnis über Rekristallisationvorgänge der Formoterolproben bei verschiedenen Luftfeuchten zu erlangen, wurde die Dynamische Wasserdampf Sorption DVS1 (Surface Measurement Systems, London, Großbritannien) verwendet. Die Dynamische Wasserdampf Sorption (Abb. 3.3) ist dabei so aufgebaut, dass die gewünschten Luftfeuchten über das Mischen von zwei N₂ Gasströmen eingestellt werden. Ein Gasstrom durchläuft dabei ein Wasserdepot und wird auf diese Weise befeuchtet. Durch das Mischen mit dem trockenen Gasstrom wird dann die gewünschte Luftfeuchte eingestellt. Die Steuerung des Vorgangs erfolgt dabei über die Massenflusskontrolleinheit. Die eingestellte Luftfeuchte wird ständig über die Messfühler in Proben- und Referenzraum überwacht und somit sichergestellt. Das so angefeuchtete Trägergas umspült nun kontinuierlich Proben- und Referenzschale, wodurch ein optimaler Stoff-

transport zur Probe gewährleistet wird. Die eigentliche Messung findet dann als Differenzwägung zwischen Proben- und Referenzschale anhand einer Mikrowaage (Cahn D 200-Waage) statt. Dabei befindet sich die gesamte Messeinheit in einem temperaturkontrollierten Inkubator, was eine Messung unter isothermen Bedingungen ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) ermöglicht.

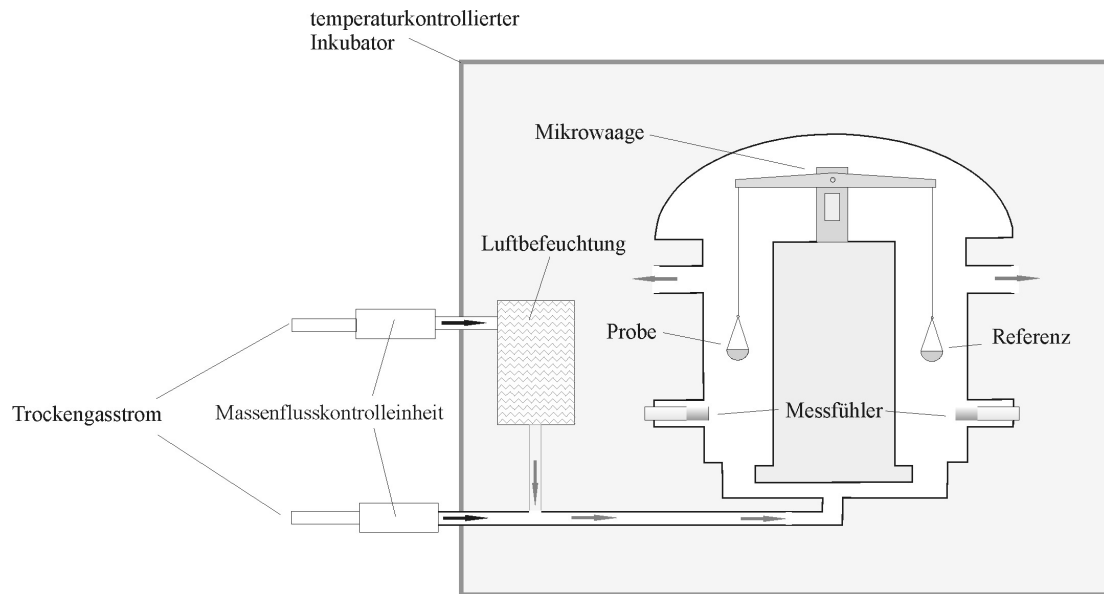


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Dynamischen Wasserdampf Sorption (Dynamic Vapor Sorption, DVS).

Zur Beurteilung von Rekristallisationsvorgängen wurden jeweils ca. 1,0 mg der entsprechenden Chargen in die Probenschale eingewogen. Die Mikrowaage, die das Gewicht der Probenschale ermittelt, machte es möglich solche kleinen Mengen zu verarbeiten. Für die jeweiligen Messungen wurden mehrere Luftfeuchteprogramme erstellt, die in Kapitel 4.2.3.4 näher erläutert werden. Eine Auswertung der erhaltenen Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel[®] und den dazugehörigen, von Surface Measurement Systems (London, Großbritannien) bereitgestellten, Makros durchgeführt.

3.2.6 Inverse Gas Chromatographie

Mit Hilfe der inversen Gas Chromatographie (iGC) kann über die Bestimmung der Retentionszeiten verschiedener Probenmoleküle eine Vielzahl physikalisch-chemischer Parameter ermittelt werden. Zu diesen Parametern zählen die Oberflächenenergie, Adsorptionswärme, Adsorptions-Isothermen, Phasenübergänge und Diffusionsmengen. In dieser Arbeit war davon lediglich die dispersive Oberflächenenergie von Interesse. Zum Einsatz kam zu diesen Messungen ein inverser Gas Chromatograph der Firma Surface Measurement Systems (SMS, London, Großbritannien).

Das Prinzip der iGC ist dabei als Umkehrung der herkömmlichen Gas Chromatographie zu verstehen. Eine zylinderförmige Säule wird gleichmäßig mit dem Probenmaterial gefüllt, wobei anschließend bei einem konstanten Trägergasfluss ein Puls oder eine Front konstanter Konzentration eines Analysegasen injiziert wird. Es befindet sich somit die zu untersuchende Probe in der Säule und wird mit dem Analysegas durchströmt (Abb. 3.4). Der iGC ist dabei so aufgebaut (Abb. 3.5), das im Analysegasofen das verwendete Lösungsmittel (Eluent) verdampft und mit dem Trägergas gemischt wird.

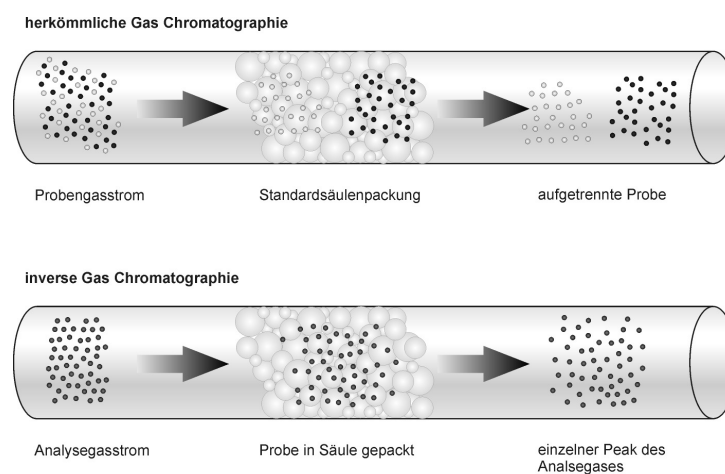


Abb. 3.4: Unterschiedliche Durchführung der herkömmlichen Gas Chromatographie gegenüber der inversen Gas Chromatographie (SMS, London, Großbritannien).

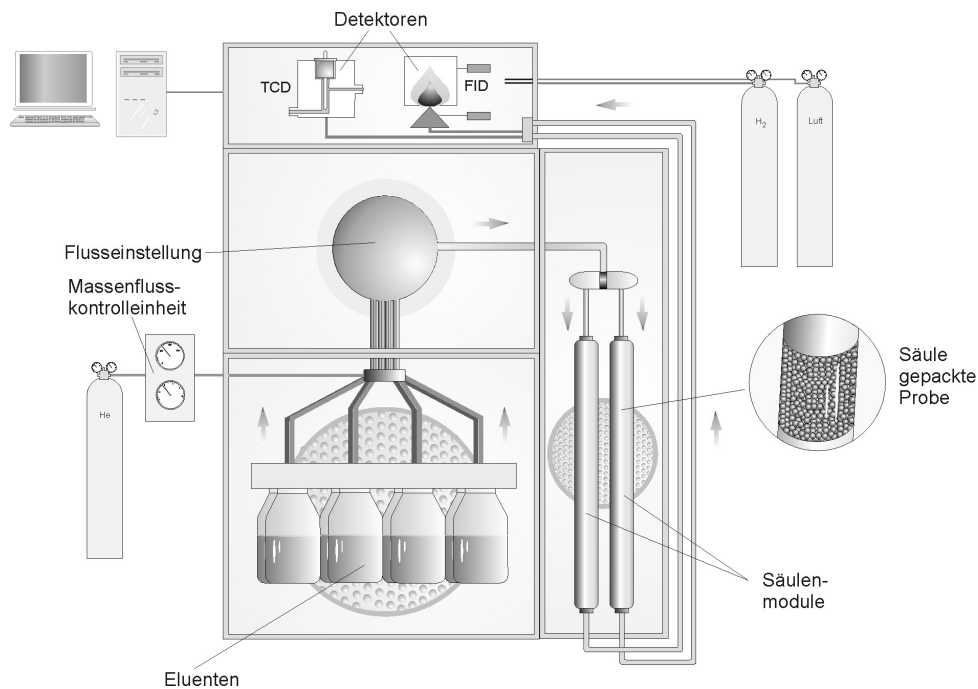


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau eines inversen Gas Chromatographen (SMS, London, Großbritannien).

Anschließend wird dieses Analysegas durch die mit Probe gepackte Säule geleitet und in einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) und einem Flammenionisationsdetektor (FID) ausgewertet. Die Verwendung dieser zwei hintereinander geschalteten Detektoren hat den Vorteil, dass eine Unterscheidung der Signale von Feuchte und organischem Lösungsmittel möglich wird. Für die Ermittlung der dispersiven Oberflächenenergie kamen jeweils Heptan, Oktan, Dekan und Undekan in GC- oder HPLC-Qualität (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) als Analysegas zur Anwendung. Dabei wurde ein spezielles Zeitprogramm für die Retentionszeiten der einzelnen Analysegas verwendet. Um eine gleichmäßige und reproduzierbare Packung der Säulen mit Probenmaterial zu gewährleisten, wurde ein speziell dafür entwickeltes Gerät, das einem Stampfvolumeter ähnelt, verwendet (Column Packer, Surface Measurement Systems, London, Großbritannien). Als

Probenmaterialmenge wurden jeweils ca. 100,0 mg eingesetzt. Die Versuche wurden im „infinite dilution“-Bereich durchgeführt, wobei zur detaillierten Beschreibung der Verfahrenstechnik auf den iGC User Guide v1.7 von Surface Measurement Systems (London, Großbritannien) verwiesen wird.

3.2.7 Kontaktwinkelmessung

Der Kontaktwinkel gibt Aufschluss über das Benetzungsverhalten einer Substanzoberfläche gegenüber einer Flüssigkeit, in diesem Fall Wasser. Dabei ist der Kontaktwinkel als der Winkel zu verstehen, den ein Flüssigkeitstropfen mit der Oberfläche des Feststoffes bildet (Leuenerberger, 2002). Einige Beispiele für verschiedene Arten von Kontaktwinkeln sind in Abb. 3.6 dargestellt.

Die Bestimmung des Benetzungswinkels wurde nach der Sessile Drop Technik durchgeführt (Ohm et al., 1985). Für diese Untersuchungen wurde das Erma Goniometer G 1 (Erma Optical Works, Tokio, Japan) verwendet. Dazu wurden zunächst ca. 100 mg der zu untersuchenden Substanz mit einer Kraft von 25 kN mit einer hydraulischen Presse zu einem Pressling geformt. Anschließend wurde mit einer Spritze über eine Kanüle ein Wassertropfen (ca. 25 μ l) auf die Oberfläche dieses Presslings gesetzt und der Kontaktwinkel mit Hilfe des optischen Systems durch Anlegen der Tangente an den Tropfen gemessen.

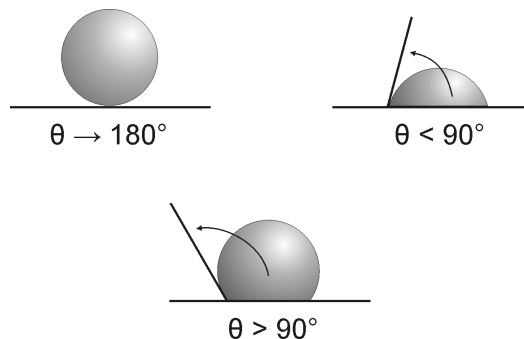


Abb. 3.6: Beispielhafte Darstellung verschiedener Benetzungsverhalten und der daraus resultierenden Kontaktwinkel (θ).

3.2.8 Aerodynamische Eigenschaften

Zur Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften der jeweiligen Pulverproben wurde ein mehrstufiger Flüssigkeitsimpaktor (Multi Stage Liquid Impinger, MSLI) der Firma Erweka GmbH (Offenbach, Deutschland) verwendet (Gerät C des Ph. Eur. 5, 2005), der in Abb. 3.7 schematisch dargestellt ist. Das Messprinzip beruht dabei auf der Partikelabscheidung aufgrund der Impaktion auf den einzelnen Stufen, die durch die Massenträgheit der einzelnen Partikel im Volumenstrom verursacht wird (siehe auch Kapitel 2.2.2). Eine genaue Beschreibung des Messprinzips findet sich bei Bolzen (2001).

Das Gerät ist in vier Stufen eingeteilt, die jeweils über einen Durchlass definierter Größe miteinander verbunden sind. Dabei werden auf jeder Stufe, abhängig vom angelegten Volumenstrom, Partikel eines bestimmten Durchmessers (Abscheidungsdurchmesser in μm) abgeschieden und anschließend bestimmt. Zusätzlich dazu werden auch die Abscheidung im Rachen (oberhalb Stufe 1) und im Auslassfilter (unterhalb Stufe 4), der als fünfte Stufe angesehen werden kann, ermittelt. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit dem MSLI wurden mit einem Volumenstrom durchgeführt, der auf der ersten Stufe einen Unterdruck von 4 kPa ergab. Mit Hilfe einer Pumpe (Erweka GmbH, Offenbach, Deutschland) konnte dieser erzeugt und durch eine so genannte Trigbox gesteuert werden. Um eine Reproduzierbarkeit des Unterdrucks zu gewährleisten, wurde dieser vor jeder Messung mit einem Differenzdruckmessgerät Digima[®] Junior dp 200 mbar (SI Special Instruments GmbH, Nördlingen, Deutschland) überprüft. Damit der Einfluss eines Inhalators auf die Ergebnisse der aerodynamischen Eigenschaften der zu untersuchenden Pulver ausgeschlossen werden konnte, wurde eine einfache Aufgabehilfe verwendet (Abb. 3.8). Bei dieser Aufgabehilfe handelte es sich um ein Edelstahlrohr, das mit einer Aufgabeschale versehen ist. Durch betätigen eines Hebels wird diese Schale in den Luftstrom gedreht und das zu untersuchende Pulver fällt direkt in den durch die Pumpe erzeugten

Volumenstrom. Der Volumenstrom, der mit dieser Aufgabehilfe bei dem verwendeten Druckabfall von 4 kPa erzeugt werden konnte, betrug ca. 80 l/min.

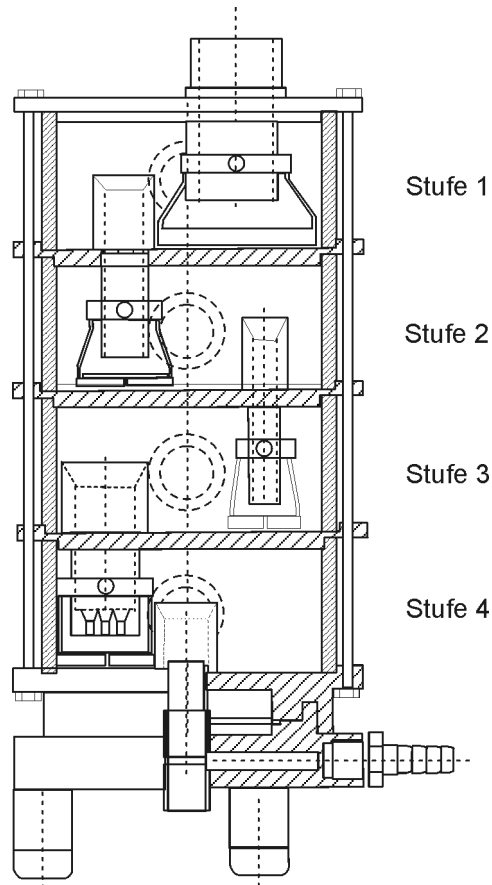


Abb. 3.7: Schematischer Aufbau des verwendeten Flüssigkeitsimpaktor (MSLI).

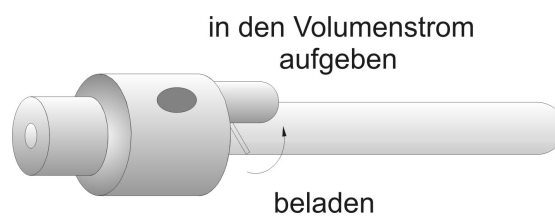


Abb. 3.8: Schematischer Aufbau der Aufgabehilfe.

Die einzelnen Stufen waren dabei jeweils mit 20 ml Methanol 75 % (m/m) befüllt. Nach Beendigung des jeweiligen Versuches wurde der Auslassfilter mit 10 ml und der Rachen mit 20 ml Methanol 75 % (m/m) gespült und gewartet bis sich die Wirkstoffmenge quantitativ gelöst hatte. Anschließend wurden alle Proben mit einer für den jeweiligen Wirkstoff geeigneten HPLC-Analytik bestimmt und ausgewertet. Die detaillierte Beschreibung der verschiedenen HPLC-Analytiken findet sich in Kapitel 3.2.11.

Die so erhaltenen Ergebnisse lassen sich auf verschiedene Art und Weise darstellen. Dabei wurden in dieser Arbeit zum einen die Ergebnisse als „Freigesetzte Dosis“ oder auch „Delivered Dose“ (DD) dargestellt. Dies bezeichnet den Anteil an Pulverpartikeln, der tatsächlich in den Impaktor gelangt ist. Dabei werden die Verluste an der Aufgabehilfe herausgerechnet. Weiterhin wird der „Anteil feiner Teilchen“, oder auch „Fine Particle Fraction“ (FPF), in der Auswertung angeführt. Die FPF bezeichnet den Anteil von Pulverpartikeln mit einer Partikelgröße kleiner als 5 μm bezogen auf die „Delivered Dose“ und wird üblicherweise in Prozent angegeben. Eine weitere Größe, die in dieser Arbeit angegeben wird, ist der „massenbezogene mittlere aerodynamische Durchmesser“ (MMAD). Dieser wurde rechnerisch mit einer speziellen Auswertesoftware ermittelt, wobei der MMAD dem Teilchendurchmesser einer volumengleichen Kugel mit der Dichte 1 g/cm^3 entspricht.

3.2.9 Einschlusseffizienz

Um einen Eindruck davon zu bekommen, wie hoch der Anteil an eingeschlossenem Arzneistoff, in diesem Fall Budesonid, in den einzelnen Liposomen war, wurde eine Methode entwickelt um diesen Anteil zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden die proliposomalen Lipidzubereitungen, die im ASES-Prozess hergestellt wurden, in physiologischer Pufferlösung pH 7,2 (Ph. Eur. 5, 2005) bei ca. 60°C hydratisiert. Die Temperatur richtete sich dabei nach

der Phaseninversionstemperatur der eingesetzten Phospholipide, die in diesem Fall bei 54°C lag. Durch die Solvatisierung oberhalb der Phaseninversionstemperatur sollte die Membranfluidität der Phospholipide erhöht werden, damit der Einschluss des Arzneistoffes erleichtert wird. Nach der Solvatisierung wurden die entstandenen Liposomensuspensionen in Zentrifugenröhren überführt und insgesamt fünfmal mit der physiologischen Pufferlösung pH 7,2 gewaschen. Die Zentrifugation fand jeweils für 20 Minuten bei 8000 U/min statt. Der Überstand wurde nach jeder Zentrifugation mit einer entsprechenden HPLC-Analytik auf den Wirkstoffgehalt untersucht, abgetrennt und mit frischer Pufferlösung wieder aufgefüllt.

Zur Ermittlung der eigentlichen Einschlusseffizienz wurden von den gewaschenen Liposomensuspensionen Proben entnommen, die in einer entsprechenden Menge Methanol (HPLC-Qualität, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gelöst wurden. Anschließend wurde auch hier mit einer entsprechenden HPLC-Analytik der eingeschlossene Wirkstoffgehalt ermittelt. Um dieses Ergebnis auf den Wirkstoffgehalt in der proliposomalen Lipidzubereitung beziehen zu können, wurden von dieser ebenfalls Proben gezogen, in Methanol (HPLC-Qualität, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gelöst und mit einer entsprechenden HPLC-Analytik bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Einschlusseffizienz wurden dann, bezogen auf den Ausgangsgehalt in den proliposomalen Lipidzubereitungen, in Prozent angegeben.

3.2.10 Freisetzungsuntersuchungen

Für die Freisetzung der Budesonid-haltigen proliposomalen Lipidzubereitungen wurde die Durchflusszellenapparatur Dissotest CE 6 (Sotax AG, Basel, Schweiz) verwendet. Dabei wurden pro Zelle ca. 150 mg der entsprechenden proliposomalen Lipidzubereitungen eingewogen. Die Freisetzungsdauer betrug dabei insgesamt 48 Stunden, wobei in diskontinuierlichen Zeitabständen jeweils

Proben von 8 ml Volumen entnommen wurden. Als Freisetzungsmittel wurde physiologische Pufferlösung pH 7,2 (Ph. Eur. 5, 2005) verwendet, die mit einer Flussrate von 8 ml/min durch die Zellen gepumpt wurde. Anschließend wurde die freigesetzte Budesonidmenge pro Zeit mit einer entsprechenden HPLC-Analytik (Kapitel 3.2.11) ermittelt.

3.2.11 HPLC-Analytik

Alle HPLC-Untersuchungen wurden an einem modular aufgebauten System durchgeführt. Das System bestand dabei aus der Pumpe Modell 300 B (Gynkotec GmbH, München, Deutschland), einem Autosampler Modell 360 (Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland), dem Detektor Modell SP-4 (Gynkotec GmbH, München, Deutschland) und der Integrationseinheit Modell 450 (Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland).

Die analytischen Parameter für die verwendeten Wirkstoffe Formoterol und Budesonid sind in Tab. 3.1 und Tab. 3.2 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 3.1: Parameter der HPLC-Analytik des Budesonid.

Parameter	
Vorsäule	LiChroChart [®] 4-4, gefüllt mit LiChrospher [®] 100 RP-18 (5µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Säule	LiChroChart [®] 125-4, gefüllt mit LiChrosorb [®] 100 RP-18 (5µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Probenvolumen	100 µl
Flussrate	1,0 ml/min

Parameter	
Retentionszeit	4,5 min
Wellenlänge	254 nm
Fließmittel	Acetonitril : Aqua bidest. (45:55 V/V) (HPLC-Qualität, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Tab. 3.2: Parameter der HPLC-Analytik des Formoterol.

Parameter	
Vorsäule	LiChroChart [®] 4-4, gefüllt mit LiChrospher [®] 60 RP-select B (5µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Säule	LiChroChart [®] 75-4, gefüllt mit LiChrospher [®] 60 RP-select B (5µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Probenvolumen	50 µl
Flussrate	1,0 ml/min
Retentionszeit	4 min

Parameter	
Wellenlänge	214 nm
Fließmittel	11,7 g Natriumoctansulfonsäure, 2250 ml Natriumdihydrogenphosphatpuffer pH 3,2, 750 ml Acetonitril, 2000 ml Methanol (HPLC-Qualität, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

3.3 Statistische Versuchsplanung

Statistische Verfahren beruhen darauf, dass man sich gegen Fehlentscheidungen absichert. Dabei werden zwei Versuchsergebnisse nur dann als unterschiedlich akzeptiert, wenn der beobachtete Unterschied so groß ist, dass die Wahrscheinlichkeit möglichst klein ist, dass dieser Unterschied zufällig auftritt. Darüber hinaus ist die Streuung des Mittelwertes eines Versuchsergebnisses umso kleiner, je größer der Versuchsumfang und damit die Anzahl der Einzelwerte ist (Kleppmann, 2003).

Diese Tatsache bedeutet, dass der Versuchsumfang entsprechend groß sein muss, möchte man statistisch signifikante Effekte beobachten und vor allem erkennen. Wird also nach dem Prinzip „one factor at a time“ gearbeitet, d.h. es wird für jeden Versuch immer nur ein Parameter verändert, der nun selbst wiederum auf verschiedenen Stufen einstellbar sein kann, ist das Ausmaß der Versuche meist gegenüber den Versuchsergebnissen nicht mehr wirtschaftlich. Aus diesem Grund ist es sinnvoll bei der Erstellung eines Versuchsdesigns und der Auswertung der Versuche auf statistische Methoden zurückzugreifen (Kleppmann, 2003).

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit statistische Versuchspläne erstellt und ausgewertet. Dies hat den großen Vorteil, gegenüber dem Prinzip „one factor at a time“, dass weniger Einzelversuche von Nöten sind und dennoch mehr Informationen erhalten werden können, da durch die Ausgewogenheit des statistischen Versuchsplanes jedes Versuchsergebnis für die Berechnung von Effekten mehrfach genutzt werden kann. Als Ergebnis der Auswertung dieser statistischen Versuchspläne erhält man anschließend durch Regressionsanalyse ein empirisches Modell, das den Zusammenhang zwischen den untersuchten Faktoren und den Zielgrößen quantitativ beschreibt. Eine Bewertung der berechneten Effekte und Wechselwirkungen kann zusätzlich anhand einer

Varianzanalyse durchgeführt werden, wodurch Aussagen bezüglich der statistischen Signifikanz gemacht werden können.

Die Versuchspläne, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren einfache faktorielle Versuchspläne. Dabei wurden jeweils die Faktoren (n) und die Anzahl der jeweiligen Faktorstufen (m) den entsprechenden Versuchen angepasst, so dass m^n die Anzahl der durchzuführenden Versuche ergab. Die Auswertung erfolgte nach dem oben genannten Prinzip, wobei die Statistik Software STATISTICA 6.0 (StatSoft, Tulsa, USA) zur Berechnung verwendet wurde. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte dann entweder als Paretdiagramm (zur Bewertung der statistischen Signifikanz) oder in Form von Scatterplots (Bewertung der Korrelationen der einzelnen Ergebnisse).

4 PRAKTISCHER TEIL

4.1 Mikronisation von Budesonid

4.1.1 Einleitung

Beruhend auf den Ergebnissen von Steckel et al. (1997), die verschiedene Steroide, darunter auch das Budesonid, mit dem ASES-Prozess mikronisierten, wurden in dieser Arbeit weitere Untersuchungen bezüglich der Mikronisation von Budesonid im überkritischen Kohlendioxid durchgeführt. So wurden verschiedene Parameter (Kapitel 4.1.2) verändert und die auf diese Weise entstandenen Budesonid-Mikropartikel hinsichtlich ihrer physikochemischen und aerodynamischen Eigenschaften untersucht. Weiterhin stellen die Ergebnisse dieses Kapitels die Grundlage für die in Kapitel 4.3 beschriebene Herstellung von Budesonid-haltigen Liposomen dar.

4.1.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Der Versuchsaufbau entsprach einem 2^2 -statistischem Versuchsplan, bei dem als variable Parameter Produkt- und CO_2 -Flussrate gewählt wurden, wobei der Druck und die Temperatur konstant auf 85 bar und 40°C eingestellt wurden. Eine Variation dieser Parameter schien in diesem Fall nicht sinnvoll, da sich bei den Vorversuchen zeigte, dass das Budesonid bei höheren Drücken (> 85 bar) und Temperaturen ($> 40^\circ\text{C}$) einem Extraktionsprozess unterlag und somit keine nennenswerte Ausbeute in der Kolonne erhalten werden konnte. Die Löslichkeit des Budesonids im überkritischen Kohlendioxid musste somit bei der Auswahl der Versuchsbedingungen streng beachtet werden.

Zur Präzipitation im überkritischen Kohlendioxid wurde eine 1 %ige (m/m) Wirkstofflösung in Methylenchlorid verwendet. In Tab. 4.1 sind die einzelnen Versuche des Versuchsplans der Mikronisation von Budesonid dargestellt. Um einen Vergleich zu anderen Mikronisationsverfahren ziehen zu können, wurde

für die Auswertung weiterhin ein mit einer Jet-Mill gemahlenes Budesonid-Produkt herangezogen.

Tab. 4.1: Versuchsaufbau des 2²-statistischem Versuchsplans der Budesonid-Chargen.

Chargennummer	CO ₂ -Flussrate [kg/h]	Produkt-Flussrate [ml/min]
Bud_VP_01	5,0	3,0
Bud_VP_02	10,0	3,0
Bud_VP_03	5,0	7,0
Bud_VP_04	10,0	7,0
Bud_VP_05	7,5	5,0

4.1.3 Ergebnisse

4.1.3.1 Ausbeute

Ein Parameter, mit dem die Effektivität eines Verfahrens bewertet werden kann, ist die Ausbeute. Zur Auswertung der Ausbeute wurde jeweils nur der Teil der Budesonidmenge herangezogen, der tatsächlich im Auffangbehälter der ASES-Anlage anfiel. Budesonid, das sich an den Wandungen oder an den Auslassintern abschied, wurde hierbei vernachlässigt. Dabei resultierten für die einzelnen Chargen (Tab. 4.2) akzeptable Werte, die im Bereich von ca. 40 - 80 % lagen.

Um die Beeinflussung der Ausbeute durch die Faktoren Produkt- und CO₂-Flussrate zu ermitteln, wurden die erhaltenen Ergebnisse mit der Statistik-Software STATISTICA 6.0 ausgewertet, wobei diese für die Ermittlung von signifikanten Effekten so genannte Paretdiagramme mit einem Konfidenzintervall von 95 % erstellte. Wird dabei in diesen Diagrammen die Linie des Konfidenzintervalls überschritten, so kann hier von einem statistisch signifikanten Effekt gesprochen werden.

Tab. 4.2: Ausbeute [%] der untersuchten Budesonid-Chargen.

Chargennummer	CO ₂ -Flussrate [kg/h]	Produkt-Flussrate [ml/min]	Ausbeute [%]
Bud_VP_01	5,0	3,0	43,7
Bud_VP_02	10,0	3,0	56,4
Bud_VP_03	5,0	7,0	67,0
Bud_VP_04	10,0	7,0	53,5
Bud_VP_05	7,5	5,0	76,4

In Abb. 4.1 ist ein solches Paretdiagramm für die Effekte der einzelnen Faktoren auf die Ausbeute dargestellt. Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass die einzelnen Faktoren keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Ausbeute aufwiesen und somit hier lediglich von einem Trend gesprochen werden kann.

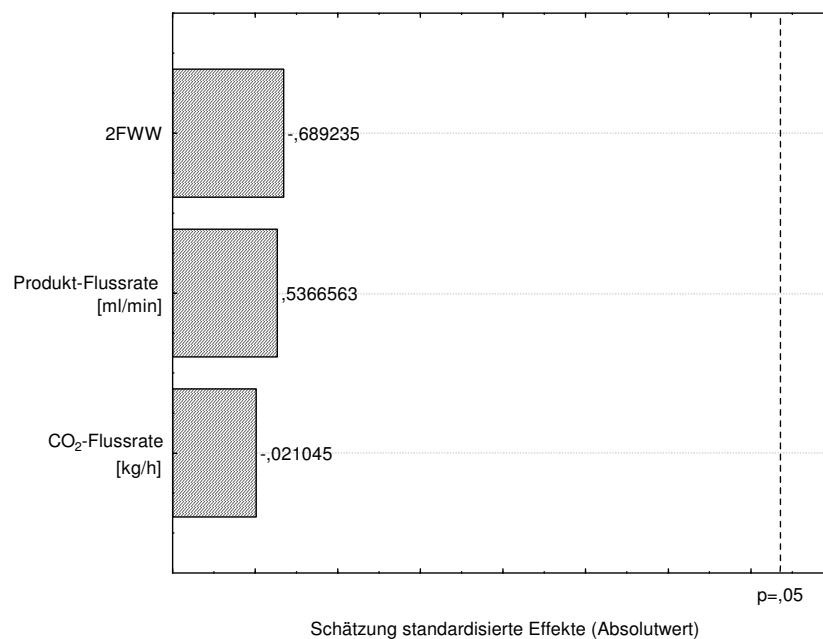


Abb. 4.1: Paretdiagramm der Effekte der Faktoren Produkt-Flussrate, CO₂-Flussrate und der Wechselwirkung der zwei Faktoren (2FWW) auf die Ausbeute, Konfidenzintervall 95 %.

Dieser Trend lässt sich in Abb. 4.2 sehr gut erkennen. Bei steigender Produkt-Flussrate ist ein leichter Anstieg der Ausbeute zu erkennen, wohingegen bei der

Änderung der CO₂-Flussrate kein Trend zur Veränderung der Ausbeute zu erkennen ist.

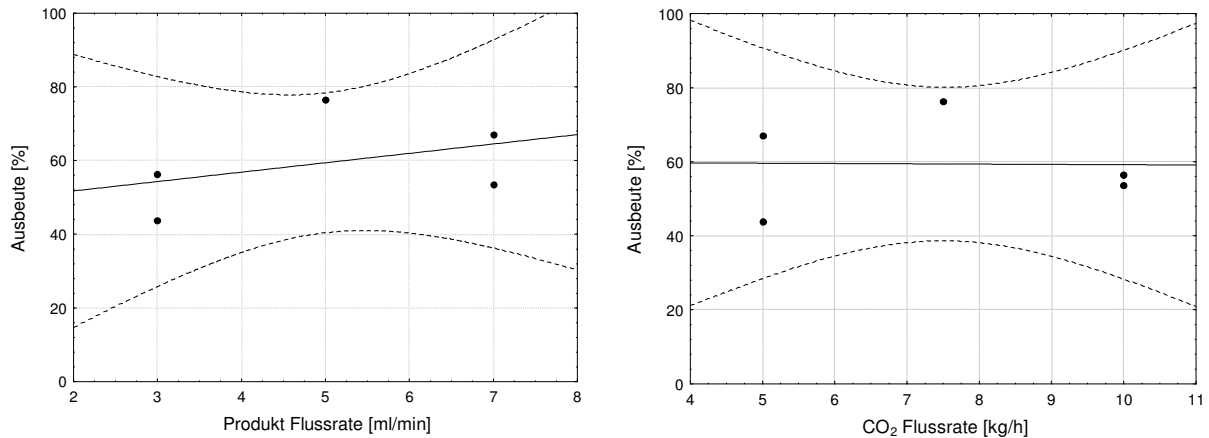


Abb. 4.2: Scatterplots der Ausbeute [%] gegen die Produkt-Flussrate [ml/min] (links) und die CO₂-Flussrate [kg/h] (rechts). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

4.1.3.2 Partikelgrößenverteilung und Morphologie

Die Proben wurden für die Ermittlung der Partikelgrößenverteilung mit dem Systemmodul CUVETTE[®] eines Laserdiffraktometers (Kapitel 3.2.1) vermessen. Dazu wurde eine gesättigte Budesonid-Lösung mit 0,5 % Tween 80 hergestellt, in der die zu vermessenden Budesonid-Mikropartikel dispergiert wurden. Eine anschließende Behandlung dieser Suspension im Ultraschallbad für 30 Sekunden sollte einer Agglomeration der Einzelpartikel entgegenwirken. Die bei dieser Untersuchung erhaltenen Partikelgrößenverteilungen, der mit überkritischem Kohlendioxid hergestellten Budesonid-Mikropartikel, zeigen lediglich geringe Unterschiede, wie aus Tab. 4.3 anhand der Betrachtung der einzelnen Verteilungskenngrößen X_{10} , X_{50} , X_{90} , sowie der Spannweite der Verteilung ersichtlich wird. Deutlich ist zu erkennen, dass das gemahlene Budesonid sehr viel kleinere Partikelgrößenverteilungen erreicht als die im ASES-Prozess hergestellten Mikropartikel. Ein statistisch signifikanter Effekt der Faktoren Produkt- und CO₂-Flussrate ist in diesem Fall ebenfalls nicht

erkennbar, so dass auch in diesem Fall lediglich von einem Trend gesprochen werden kann. Exemplarisch ist dies in der Abb. 4.3 dargestellt. Auf die Darstellung separater Paretodiagramme für die Verteilungskenngrößen X_{10} und X_{50} wird in diesem Fall verzichtet, da sie sich kaum von dem in Abb. 4.3 dargestellten unterscheiden.

Tab. 4.3: Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen mittels Laserdiffraktometrie.

Chargennummer	X_{10} [μm]	X_{50} [μm]	X_{90} [μm]	Spannweite
Jet-Mill Produkt	0,78	1,75	4,06	1,75
Bud_VP_01	1,82	7,57	15,84	1,85
Bud_VP_02	1,57	6,24	14,10	2,01
Bud_VP_03	1,68	6,17	13,73	1,90
Bud_VP_04	1,98	7,81	14,91	1,66
Bud_VP_05	1,91	7,41	14,36	1,68

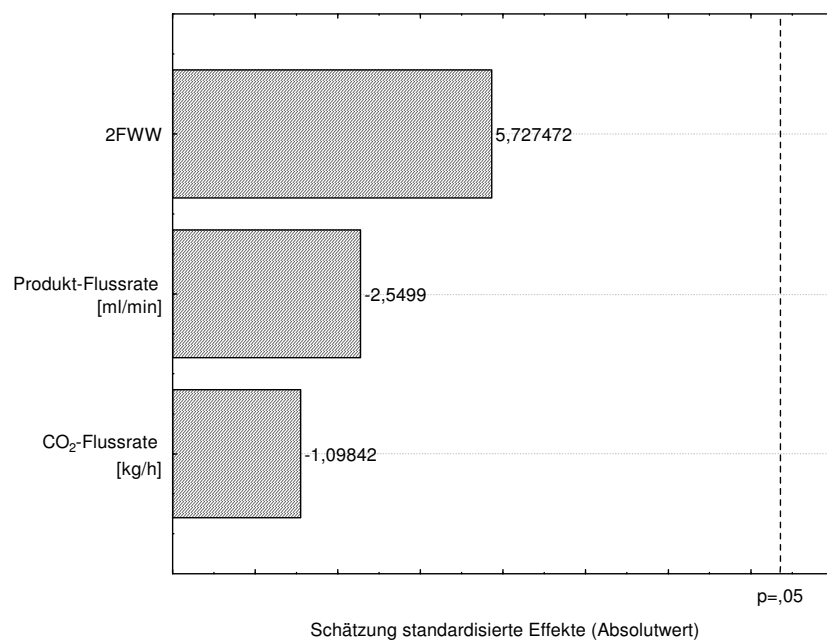


Abb. 4.3: Paretodiagramm der Effekte der Faktoren Produkt-Flussrate, CO₂-Flussrate und der Wechselwirkung der zwei Faktoren (2FWW) auf die Partikelgrößenverteilung X_{90} , Konfidenzintervall 95 %.

Betrachtet man dagegen die Tendenzen in der Abb. 4.4, so zeigen diese, dass eine Erhöhung der Produkt-Flussrate zu einer Erniedrigung des X_{90} -Wertes der Partikelgrößenverteilung führt. Dieser Effekt kann anhand des Einsatzes der hier verwendeten Einstoffdüse erklärt werden. Je höher in diesem Fall die Produkt-Flussrate gewählt wird, desto höher ist der Druck an der Düse, wodurch ein feinerer Sprühnebel entsteht, der zu kleineren Partikeln führt. Die große Streuung der Einzelwerte erschwert allerdings die Gewichtung dieser Tendenz. Betrachtet man dagegen die Änderung der Partikelgrößenverteilung durch Variation der CO_2 -Flussrate, so wird deutlich, dass die Tendenz hin zu kleineren Partikelgrößen in diesem Fall noch geringer ausgeprägt ist. Eine Veränderung der CO_2 -Flussrate bringt also keinen nennenswerten Effekt mit sich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier variierten Parameter den Prozess der Fällung nicht beeinflussen.

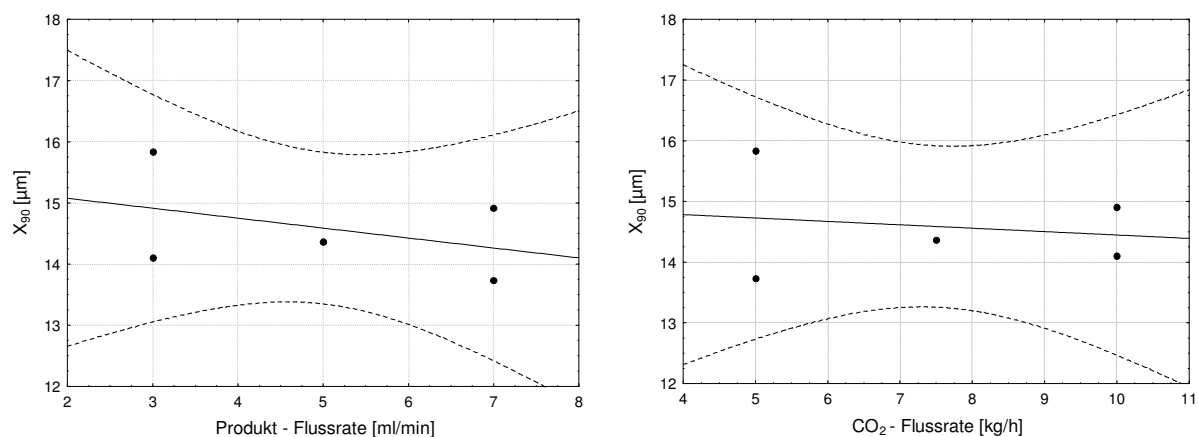


Abb. 4.4: Scatterplots der Partikelgrößenverteilung X_{90} gegen die Produkt-Flussrate [ml/min] (links) und die CO_2 -Flussrate [kg/h] (rechts). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Die Beurteilung der Partikelmorphologie wurde anhand von Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop bei 3000-facher Vergrößerung vorgenommen (Abb. 4.5). Die Aufnahmen bestätigen ebenfalls die Robustheit der Präzipitation gegenüber den variierten Prozessparametern. So besitzen alle aus dem ASES-

Prozess erhaltenen Produkte die gleiche Partikelmorphologie. Sie zeigen eine gleichmäßige Gestalt, teilweise sind runde Formen zu beobachten und alle Partikel scheinen eine glatte Oberfläche zu besitzen.

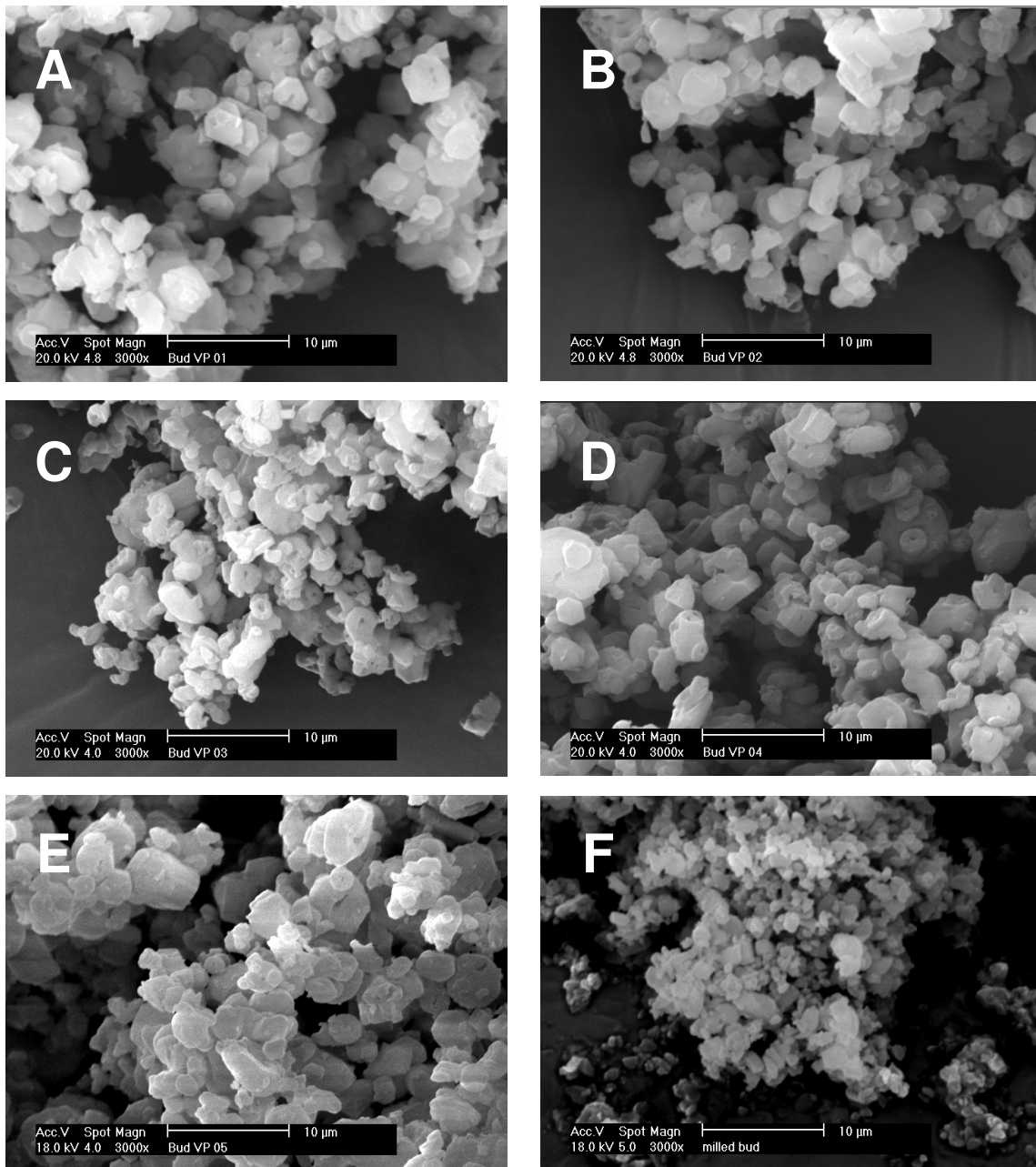


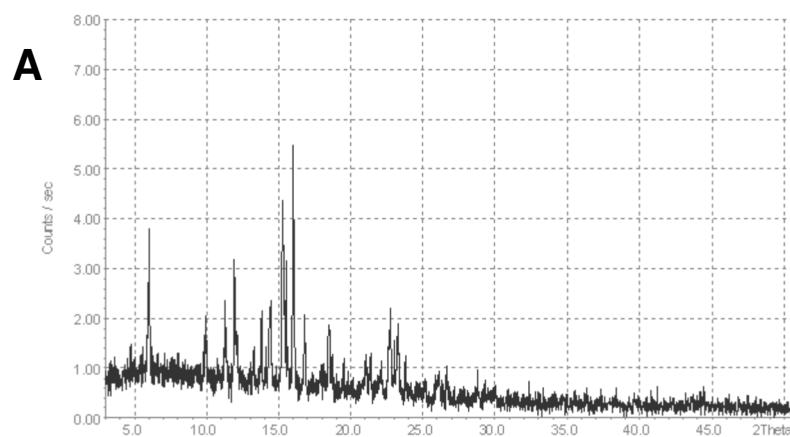
Abb. 4.5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Budesonid-Chargen bei 3000-facher Vergrößerung. A: Bud_VP_01; B: Bud_VP_02; C: Bud_VP_03; D: Bud_VP_04; E: Bud_VP_05; F: Jet-Mill Produkt.

Im Vergleich zeigt das Jet-Mill Produkt keine derart einheitliche Gestalt, sowie stark agglomerierte Partikel mit Unregelmäßigkeiten in der Partikeloberfläche. Diese starke Agglomeration macht sich auch bei optischer Betrachtung des Jet-Mill Produktes gegenüber den ASES-Produkten in einer verstärkten elektrostatischen Aufladung bemerkbar.

Die ASES-Produkte sind durch ein fast vollständiges Fehlen dieser elektrostatischen Aufladung für die Weiterverarbeitung besser geeignet, da z.B. das Anhaften an Oberflächen nicht so stark ausgeprägt ist, wie beim Jet-Mill Produkt. Dieses Charakteristikum zeigt sich allgemein bei sehr vielen in überkritischem Kohlendioxid hergestellten Mikropartikeln (Rehmann et al., 2004).

4.1.3.3 Röntgenuntersuchungen

Um einen Eindruck davon zu gewinnen, ob sich durch den Präzipitationsprozess im überkritischen Kohlendioxid Änderungen der Kristallmodifikation des Budesonids ergeben, wurden Röntgendiffraktogramme der einzelnen Budesonid-Chargen (siehe auch Kapitel 3.2.3) aufgenommen. Daneben wurden diese Aufnahmen mit der Ausgangsware und dem Jet-Mill Produkt verglichen.



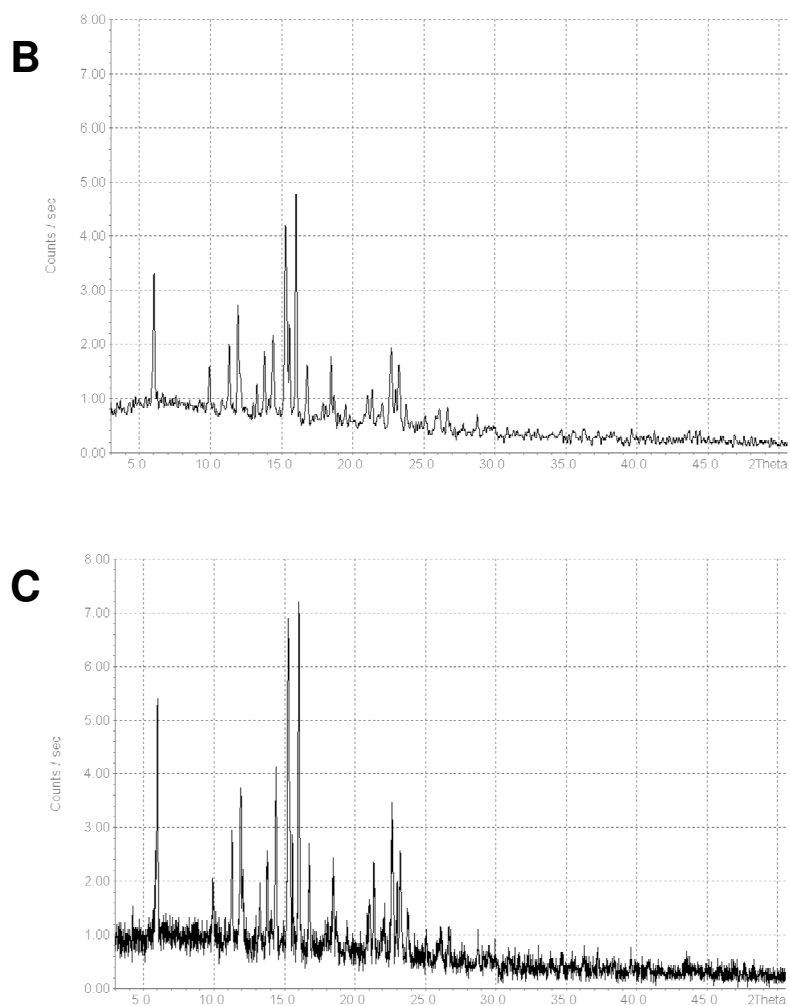


Abb. 4.6: Röntgendiffraktogramme: (A) Jet-Mill Produktes, (B) Budesonid-Rohware, (C) Bud_VP_04 (exemplarisch für die ASES-Produkte).

Die Röntgendiffraktogramme in Abb. 4.6 zeigen, dass Änderungen der Kristallmodifikation des Budesonids weder durch den ASES-Prozess, noch durch den Mahlprozess in der Jet-Mill entstanden sind. Das Budesonid zeigt somit auch durch die Fällung im ASES-Prozess keine Polymorphie, wie sie bis jetzt auch noch nicht vom Budesonid bekannt ist.

4.1.3.4 Oberflächenenergie

Zur Bestimmung der dispersiven Oberflächenenergie wurden die verschiedenen Chargen, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, vermessen. Die in Tab. 4.4 dargestellten Ergebnisse zeigen dabei, dass es durch die Mikronisation, zunächst unabhängig vom Verfahren betrachtet, zu einer Zunahme der dispersiven Oberflächenenergie im Vergleich zur Ausgangsware kam. Bei näherer Betrachtung fällt dabei auf, dass die Werte für die ASES-Produkte (zwischen $43,5 \text{ mJ/m}^2$ und $51,4 \text{ mJ/m}^2$) weit unter dem Wert des Jet-Mill Produkt ($60,6 \text{ mJ/m}^2$) und nah an dem der Budesonid-Rohware ($41,8 \text{ mJ/m}^2$) lagen.

Tab. 4.4: Dispersive Oberflächenenergie [mJ/m^2] der einzelnen Budesonid-Chargen.

Chargennummer	dispersive Oberflächenenergie [mJ/m^2]
Budesonid-Rohware	41,8 ($\pm 0,3$)
Jet-Mill Produkt	60,6 ($\pm 0,2$)
Bud_VP_01	46,4 ($\pm 2,0$)
Bud_VP_02	47,7 ($\pm 0,1$)
Bud_VP_03	51,4 ($\pm 1,2$)
Bud_VP_04	49,0 ($\pm 0,5$)
Bud_VP_05	43,5 (± 0)

Zu erklären sind diese Ergebnisse mit einer gleichmäßigeren Partikeloberfläche, die im Rasterelektronenmikroskop bei den ASES-Produkten gegenüber dem Jet-Mill Produkt beobachtet werden konnte (Abb. 4.5).

Die statistische Auswertung zeigte auch hier keinen statistisch signifikanten Effekt der variierten Prozessparameter auf die disperse Oberflächenenergie ($p = 0,05$, Paretdiagramm hier nicht dargestellt). Betrachtet man dagegen allerdings die Tendenzen (Abb. 4.7), so wird deutlich, dass hier mit einer Erhöhung der Produkt-Flussrate auch die disperse Oberfläche zunimmt. Diese Tendenz ergibt sich aus dem Verhalten der Partikelgrößenverteilung (Abb. 4.4),

da mit einer Erhöhung der Produkt-Flussrate auch eine Erniedrigung dieser einhergeht.

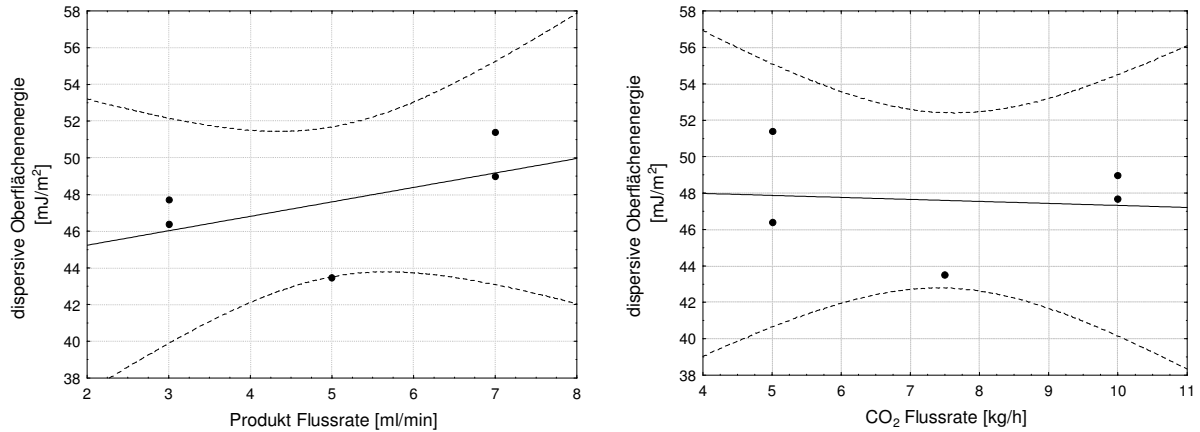


Abb. 4.7: Scatterplots der dispersiven Oberflächenenergie gegen die Produkt-Flussrate [ml/min] (links) und die CO₂-Flussrate [kg/h] (rechts). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

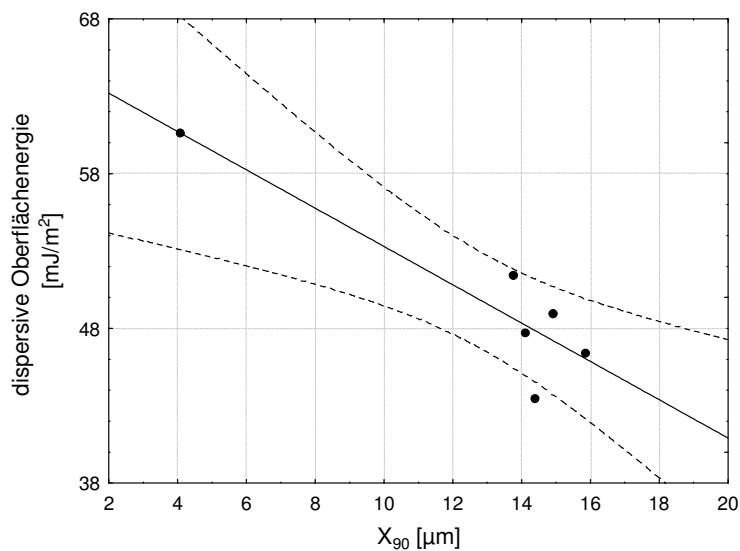


Abb. 4.8: Scatterplot der dispersiven Oberflächenenergie gegen den X₉₀-Wert [µm] der Partikelgrößenverteilung. Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Um diesen Effekt noch deutlicher zu zeigen, ist in Abb. 4.8 die dispersive Oberflächenenergie gegen den X₉₀-Wert der Partikelgrößenverteilung

dargestellt. Eine Korrelation von Partikelgröße zu dispersiver Oberflächenenergie ist in diesem Fall sehr gut erkennbar und zeigt, dass sich das Jet-Mill Produkt deutlich von den ASES-Produkten unterscheidet.

4.1.3.5 Kontaktwinkel

Da es sich beim Budesonid um eine lipophile Substanz ($\log P$ 3,1) mit einer geringen Wasserlöslichkeit handelt, ist die Veränderung des Benetzungsverhaltens durch eine Mikronisation von großem Interesse. Dazu wurde der Kontaktwinkel der verschiedenen Produkte, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, gegen Wasser gemessen.

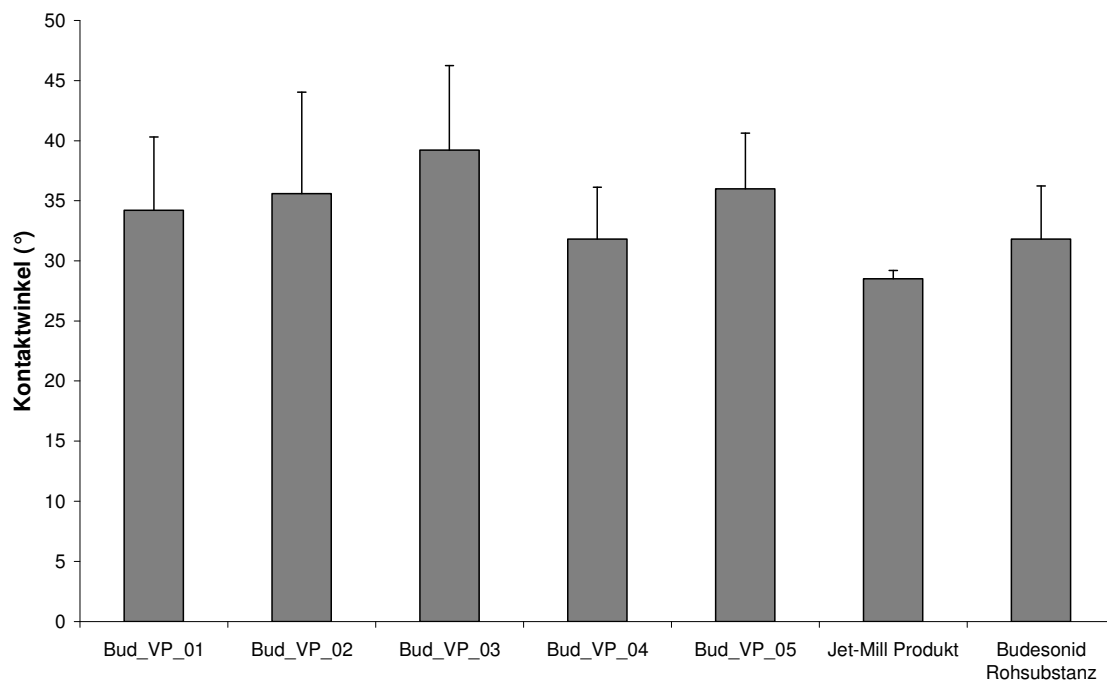


Abb. 4.9: Kontaktwinkel der einzelnen ASES-Produkte, sowie des Jet-Mill Produktes und der Rohware gegen Wasser.

Die Ergebnisse in Abb. 4.9 zeigen keine großen Unterschiede der ASES-Produkte gegenüber der Rohware. Lediglich das Jet-Mill Produkt, das eine wesentliche kleinere Partikelgröße als die ASES-Produkte aufweist (Tab. 4.3), zeigt im Allgemeinen einen kleineren Kontaktwinkel gegenüber den restlichen

Produkten. Dieses Verhalten zeigt sich auch an den REM-Bildern (Abb. 4.5), auf denen für das Jet-Mill Produkt eine wesentlich heterogenere Oberflächenbeschaffenheit, gegenüber den ASES-Produkten, beobachtet werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass durch den ASES-Prozess keine Veränderungen in der Oberflächenbeschaffenheit gegenüber der Rohware erzeugt wurden.

4.1.3.6 Aerodynamisches Verhalten

Die entsprechenden Budesonid-Mikropartikel inklusive des Jet-Mill Produktes wurden mit einem Multi-Stage-Liquid-Impinger, wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben, vermessen. Dabei wurde auf den Einsatz einer Pulvermischung verzichtet und lediglich das reine Pulver vermessen, um den Einfluss, den ein eventueller Träger, wie z.B. Laktose, auf die Dispergierbarkeit im Luftstrom ausübt, auszuschließen. Somit lassen die Ergebnisse einen direkten Schluss auf die aerodynamischen Eigenschaften der jeweiligen Mikropartikel zu.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 4.10 und Tab. 4.5 zusammenfassend dargestellt. Das Jet-Mill Produkt zeigt dabei eine Fine Particle Fraction (FPF) von 29 % und einen MMAD von 2,9 µm. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit den ASES-Produkten Bud_VP_01, _02 und _05 erreicht werden, wobei Bud_VP_05 (Mittelpunkt des statistischen Versuchsplans) mit 23,5 % die geringste FPF zeigt. Bei den Chargen Bud_VP_02 und _03 (37,6 % und 47,9 %) wurden die höchsten Werte in der FPF beobachtet und somit eine deutliche Verbesserung der FPF gegenüber dem Jet-Mill Produkt festgestellt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht allein die Partikelgröße für die FPF ausschlaggebend ist, sondern in diesem Fall auch die Oberflächeneigenschaften eine Rolle spielen. So zeigen die ASES-Produkte eine wesentlich kleinere dispersive Oberflächenenergie als das Jet-Mill Produkt (Tab. 4.4), was wiederum auf eine verringerte Kohäsion der Einzelpartikel schließen lässt und somit die Dispergierung im Luftstrom fördert.

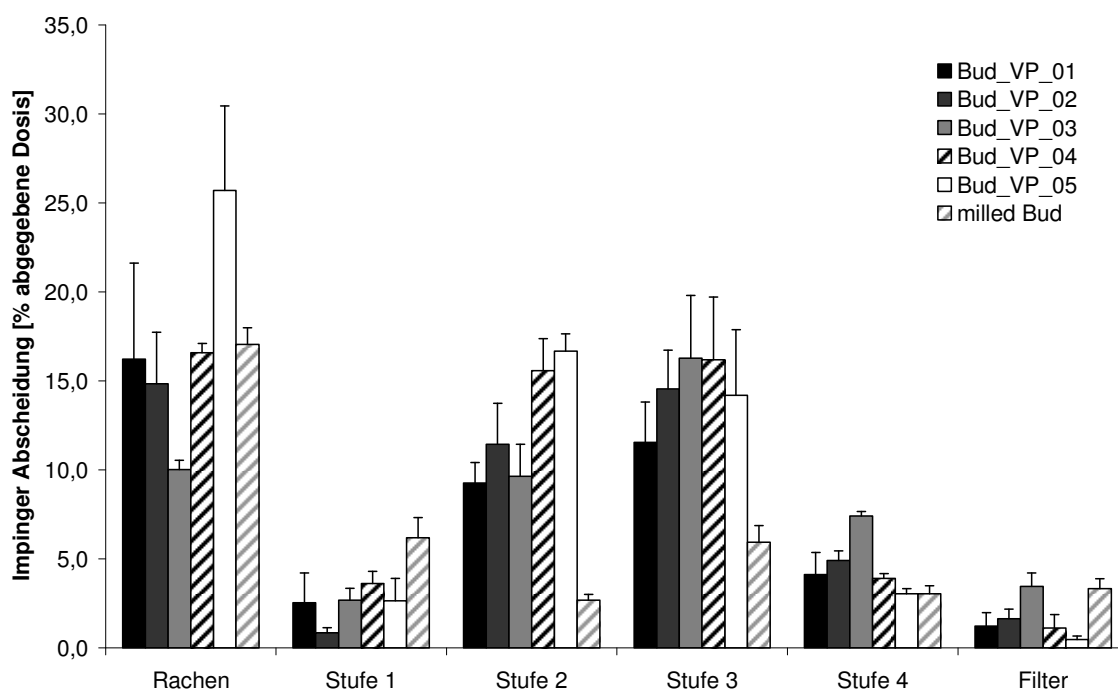


Abb. 4.10: Impinger Abscheidung [% abgegebene Dosis] der einzelnen Mikropartikel-Chargen.

Tab. 4.5: Übersicht der Fine Particle Fraction (FPF) [%] und des MMAD [μm] der einzelnen Mikropartikel-Chargen. (SD in Klammern).

Chargennummer	Partikel < 5 μm (FPF) [%]	MMAD [μm]
Jet-Mill Produkt	29,0 ($\pm 2,0$)	2,9 ($\pm 0,2$)
Bud_VP_01	32,3 ($\pm 3,2$)	4,6 ($\pm 0,3$)
Bud_VP_02	37,6 ($\pm 2,1$)	4,6 ($\pm 0,2$)
Bud_VP_03	47,9 ($\pm 0,9$)	3,8 ($\pm 0,2$)
Bud_VP_04	31,3 ($\pm 0,3$)	5,3 ($\pm 0,1$)
Bud_VP_05	23,5 ($\pm 3,0$)	5,8 ($\pm 0,5$)

In Bezug auf die Prozessparameter zeigen die Ergebnisse, dass diese keine signifikanten Einflüsse ausüben (Abb. 4.11). Auffällig sind in diesem Fall jedoch die großen Unterschiede in der FPF der verschiedenen ASES-Produkte (47,9 % gegenüber 23,5 %), woraufhin eine Prüfung auf Signifikanz ($p = 0,05$)

der einzelnen Werte untereinander, einen signifikanten Unterschied für Bud_VP_02 und _03 zeigen konnte. Allerdings scheint dieser signifikante Unterschied in der Gesamtauswertung der Ergebnisse unterzugehen, was auf eine Interaktion der Prozessparameter untereinander hindeutet. Deutlich wird dieses auch, betrachtet man die Prozessparameter, bei denen diese beiden Chargen hergestellt wurden, so sind es jeweils die Kombinationen der Extremwerte (hohe CO₂-Flussrate / niedrige Produkt-Flussrate und umgekehrt).

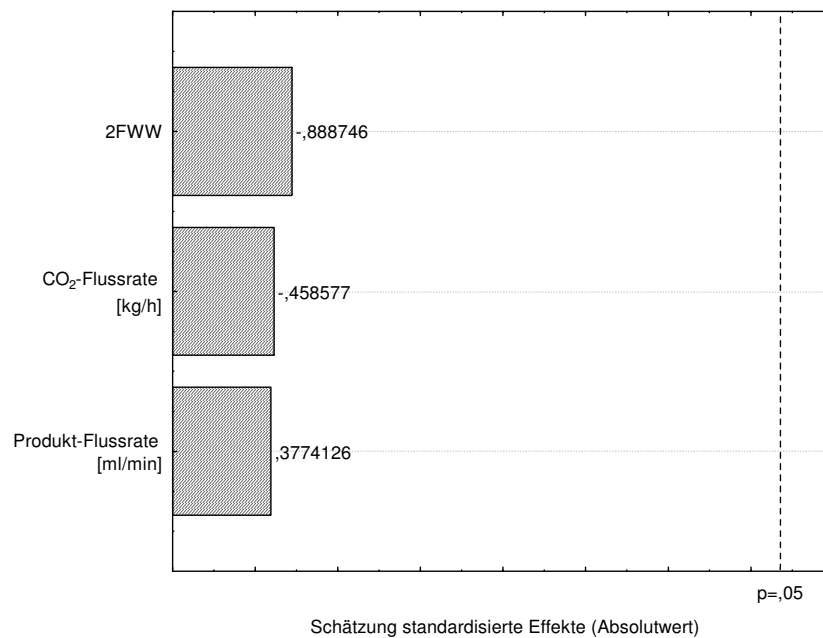


Abb. 4.11: Pareto diagramm der Effekte der Faktoren Produkt-Flussrate, CO₂-Flussrate und der Wechselwirkung der zwei Faktoren (2FWW) auf den aerodynamischen Durchmesser <math>< 5 \mu\text{m}</math> (FPF), Konfidenzintervall 95 %.

4.1.4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mikronisation von Budesonid im ASES-Prozess einen sehr robusten Prozess darstellt. Dabei zeigen die Prozessparameter CO₂- und Produkt-Flussrate kaum signifikante Einflüsse auf die entstandenen Budesonid-Mikropartikel. Lediglich bei der Auswertung der aerodynamischen Eigenschaften, zeigen sich zwei Proben, die signifikant von den übrigen abweichen.

Der Vergleich zum Jet-Mill Produkt hat gezeigt, dass obwohl mit diesem Prozess wesentlich kleinere Partikel erzeugt werden konnten, die ASES-Produkte in Bezug auf die aerodynamischen Eigenschaften diesen deutlich überlegen sind. So übt nicht nur die Partikelgröße einen Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften aus, sondern auch die Oberflächenenergie und Oberflächenbeschaffenheit spielen dabei eine große Rolle. Die geringen Oberflächenenergien, die bei den Budesonid-Mikropartikeln im Vergleich zu der Rohware erzielt werden konnten, machen deutlich wie schonend der Prozess der Präzipitation im ASES-Prozess gegenüber einem Mahlprozess mit der Jet-Mill abläuft.

4.2 Mikronisation von Formoterol

4.2.1 Einleitung

Wie bereits in Kapitel 2.2.4 beschrieben, gibt es bis heute noch keine Untersuchungen über das Präzipitationsverhalten von Formoterol-fumarat im überkritischen Kohlendioxid. Legt man die Grenze für eine Machbarkeit der Mikronisation im ASES-Prozess allerdings auf einen log P-Wert von über 4 (Steckel 1997), dann sollte die Fällung des Formoterol-fumarat (log P 2,1) aus überkritischem Kohlendioxid möglich sein.

Die Versuchsbedingungen für die Herstellung und Charakterisierung der Mikropartikel sind in Kapitel 4.2.2 näher erläutert. Die hergestellten Produkte wurden nach der Mikronisation hinsichtlich ihrer physikochemischen und aerodynamischen Eigenschaften untersucht. Da in den folgenden Untersuchungen ausschließlich das Formoterol-fumarat Dihydrat zur Verwendung gekommen ist, wird dieses weiterhin nur noch als Formoterol bezeichnet.

4.2.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Die Versuchsanordnung erfolgte in diesem Fall nicht mit einem statistischen Versuchsplan. Um die Machbarkeit der Präzipitation zu überprüfen, wurden alle Versuche bei unterschiedlichen Drücken und Produkt-Flussraten, isotherm bei 40°C, durchgeführt. Die CO₂-Flussrate betrug bei allen Versuchen konstant 6 kg/h, da sich bei der Mikronisation des Budesonids (Kapitel 4.1) zeigte, dass diese kaum einen Einfluss auf die Herstellung ausübte. Als Lösungsmittel für das Formoterol wurden sowohl Methanol (MeOH), als auch Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt, wobei jeweils eine 10%ige (m/V) Lösung versprüht wurde. Darüber hinaus wurde versucht mit 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) einen Stabilisator für das Formoterol einzufügen. Die eingesetzte Menge an DPPC betrug dabei 10 % (m/m) bezogen auf das eingesetzte Formoterol. Die

einzelnen Prozessparameter der jeweiligen Versuche sind in Tab. 4.6 nochmals zusammengefasst dargestellt.

Tab. 4.6: Prozessparameter für die Präzipitation von Formoterol im ASES-Prozess.

Chargennummer	Druck [bar]	Temperatur [°C]	CO ₂ -Flussrate [kg/h]	Produkt-Flussrate [ml/min]	Lösungsmittel
Form_01	85	40	6	6	MeOH
Form_09	85	40	6	3	MeOH
Form_08	90	40	6	6	MeOH
Form_04	90	40	6	3	MeOH
Form_02	100	40	6	6	MeOH
Form_05	100	40	6	3	MeOH
Form_06	120	40	6	6	MeOH
Form_07	120	40	6	3	MeOH
Form_10	150	40	6	6	MeOH
Form_11	150	40	6	3	MeOH
Form_14	150	40	6	6	DMSO
Form_15	150	40	6	3	DMSO
Form_16	100	40	6	6	MeOH/DPPC
Form_17	100	40	6	3	MeOH/DPPC

4.2.3 Ergebnisse

4.2.3.1 Ausbeute

Auch in diesem Fall wurde die Effektivität des Verfahrens gegenüber der Mikronisation des Formoterols anhand der Ausbeute bewertet. Für die Berechnung der Ausbeute war der Formoterol-Anteil ausschlaggebend, der im Auffangbehälter der Hochdruckkolonne gesammelt werden konnte. Formoterol, das sich an der Kolonnenwand, sowie an den Auslassintern abschied, wurde für die Berechnung der Ausbeute nicht mit herangezogen. Die erhaltenen

Ergebnisse sind in Tab. 4.7 mit den jeweiligen Prozessparametern zusammengefasst dargestellt.

Tab. 4.7: Ausbeute in [%] der untersuchten Formoterol-Chargen; Temperatur 40°C, CO₂-Flussrate 6 kg/h.

Chargennummer	Druck [bar]	Produkt-Flussrate [ml/min]	Lösungsmittel	Ausbeute [%]
Form_01	85	6	MeOH	36,0
Form_09	85	3	MeOH	51,5
Form_08	90	6	MeOH	53,8
Form_04	90	3	MeOH	32,5
Form_02	100	6	MeOH	64,0
Form_05	100	3	MeOH	39,7
Form_06	120	6	MeOH	43,9
Form_07	120	3	MeOH	48,7
Form_10	150	6	MeOH	28,1
Form_11	150	3	MeOH	35,8
Form_14	150	6	DMSO	31,1
Form_15	150	3	DMSO	53,7
Form_16	100	6	MeOH/DPPC	23,1
Form_17	100	3	MeOH/DPPC	17,5

Betrachtet man die Ergebnisse, die mit MeOH als Lösungsmittel erzielt wurden (Abb. 4.12), so ist tendenziell zu erkennen, dass mit niedrigeren Drücken höhere Ausbeuten erzielt werden konnten. So wurde bei 150 bar und einer Produkt-Flussrate von 6 ml/min lediglich eine Ausbeute von 28,1 % erreicht, wohingegen ein Druck von 85 bar und eine Produkt-Flussrate von 3 ml/min zu einer Ausbeute von 51,5 % führte. Die Erhöhung des Druckes und das damit verbundene Ansteigen von Dichte und Dielektrizitätskonstante des überkritischen Kohlendioxides lässt es nicht ausschließen, dass das Formoterol teilweise vom überkritischen Kohlendioxid gelöst und somit aus der

Hochdruckkolonne extrahiert wurde. Dieses bestätigten auch die teilweise beobachteten Pulverablagerungen im Separator.

Dagegen zeigte sich bei der Bewertung der Produkt-Flussrate auf den Prozess keine wirkliche Tendenz in Bezug auf die Ausbeute. Zwar ist zu erkennen (Abb. 4.12), dass mit Erhöhung der Produkt-Flussrate auch eine leichte Erhöhung der Ausbeute einhergeht, allerdings ist die Streuung der Werte bei einer Produkt-Flussrate von 6 ml/min wesentlich höher, als bei einer Rate von 3 ml/min und dadurch der Effekt letztendlich nicht so stark ausgeprägt.

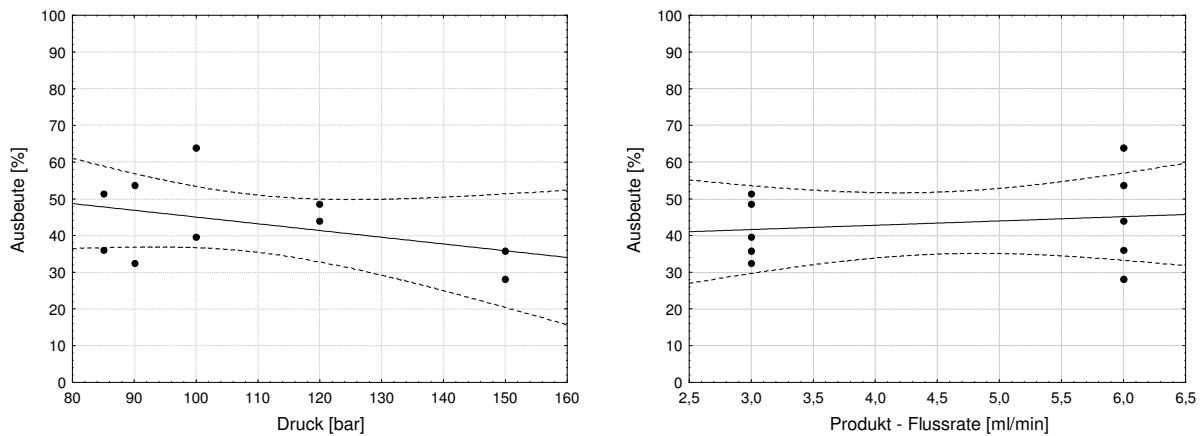


Abb. 4.12: Scatterplots der Ausbeute [%] gegen den Druck [bar] (links) und die Produkt-Flussrate [ml/min] (rechts) der mit MeOH versprühten Chargen. Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Die Ergebnisse der aus DMSO versprühten Proben bestätigen die mit der Verwendung von MeOH als Lösungsmittel beobachtete Tendenz dagegen nicht. So zeigt die Charge Form_14 zwar nur eine Ausbeute von 31,1 %, allerdings wurde bei Reduzierung der Produkt-Flussrate eine Ausbeute von 53,7 % erreicht. Das Lösungsmittel scheint somit ebenfalls einen Einfluss auf die Ausbeute auszuüben. Die eventuell langsamere Präzipitation aus dem viskoserem DMSO, kombiniert mit der langsameren Produkt-Flussrate von 3 ml/min ist ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Resultat.

Die Formoterol / DPPC-Mischungen zeigen unter den gewählten Bedingungen die schlechteste Ausbeute mit 23,1 % und 17,5 %, womit ein solcher Zusatz nicht sinnvoll erscheint. Bei optischer Betrachtung der Kolonne nach Prozessende zeigte sich ein feiner Belag auf der Kolonnenwandung, der auch als Film bezeichnet werden könnte. Somit wurden die Partikel eher als Film an die Kolonnenwand gebunden und waren damit nicht mehr aus der Kolonne entnehmbar.

4.2.3.2 Partikelgrößenverteilung und Morphologie

Die Vermessung der einzelnen Chargen erfolgte mit Hilfe der Laserdiffraktometrie (siehe Kapitel 3.2.1). Dazu wurden die Formoterolpartikel in Mygliol 812 suspendiert und insgesamt 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Diese lange Ultraschallbehandlung war zwingend notwendig, da die Voruntersuchungen zeigten, dass die jeweiligen Chargen stark zur Agglomeration neigten. Erst nach 10 Minuten im Ultraschallbad konnten zufrieden stellende und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Die Menge an Formoterol wurde so bemessen, dass sich in der Küvette eine optische Dichte zwischen 15 % und 20 % ergab.

Tab. 4.8: Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen mit der Laserdiffraktometrie (SD in Klammern).

Chargennummer	X ₁₀ [µm]	X ₅₀ [µm]	X ₉₀ [µm]	Spannweite
Form_01	0,57 (±0,01)	1,52 (±0,03)	3,71 (±0,27)	2,07
Form_09	0,50 (±0,01)	1,20 (±0,02)	3,49 (±0,74)	2,49
Form_08	0,43 (±0,01)	1,29 (±0,06)	10,16 (±2,82)	4,88
Form_04	0,42 (±0,03)	1,38 (±0,12)	3,65 (±0,59)	2,34
Form_02	0,39 (±0,01)	0,85 (±0,05)	1,47 (±0,08)	1,27

Chargennummer	X_{10} [μm]	X_{50} [μm]	X_{90} [μm]	Spannweite
Form_05	0,50 ($\pm 0,01$)	1,73 ($\pm 0,07$)	4,85 ($\pm 0,40$)	2,51
Form_06	0,36 ($\pm 0,01$)	1,03 ($\pm 0,04$)	2,51 ($\pm 0,26$)	2,09
Form_07	0,31 ($\pm 2,53$)	1,07 ($\pm 0,11$)	3,01 ($\pm 1,68$)	2,53
Form_10	0,29 ($\pm 0,02$)	0,90 ($\pm 0,06$)	7,86 ($\pm 5,09$)	8,45
Form_11	0,34 ($\pm 0,01$)	1,02 ($\pm 0,05$)	3,91 ($\pm 2,79$)	4,48
Form_14	0,83 ($\pm 0,26$)	3,74 ($\pm 0,53$)	21,55 ($\pm 4,18$)	5,54
Form_15	0,56 ($\pm 0,01$)	1,90 ($\pm 0,03$)	5,83 ($\pm 0,29$)	2,77
Form_16	0,47 ($\pm 0,02$)	1,46 ($\pm 0,18$)	17,18 ($\pm 1,72$)	11,49
Form_17	0,51 ($\pm 0,01$)	1,42 ($\pm 0,01$)	3,90 ($\pm 0,07$)	2,39

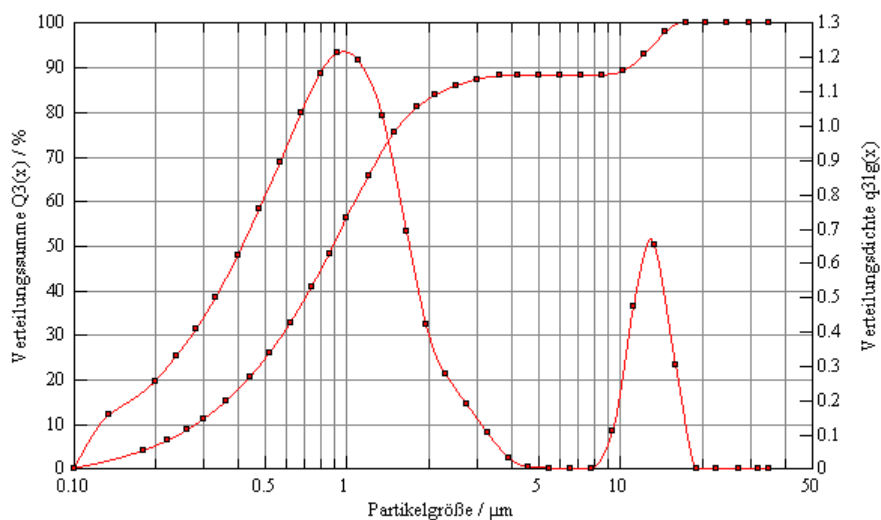


Abb. 4.13: Beispielhafte Darstellung der Verteilungssummenkurve der Partikelgrößen für Form_10.

Die in Tab. 4.8 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich Partikelgrößen mit einem X_{50} -Wert zwischen $0,85 \mu\text{m}$ und $1,73 \mu\text{m}$ für diejenigen Chargen ergaben, die aus einer methanolischen Lösung versprüht wurden. Auffällig ist,

dass bei einigen Proben der X_{90} -Wert im Verhältnis zum X_{50} -Wert, und damit auch die Spannweite, sehr hoch ausfielen (Beispiel: Form_10). Dieser Sachverhalt ist darauf zurückzuführen, dass bei diesen Proben die Agglomerationstendenz selbst durch die 10-minütige Ultraschallbehandlung nicht vollständig vermieden werden konnte und sich somit bimodale Verteilungskurven ergaben. Beispielhaft ist dies in Abb. 4.13 dargestellt.

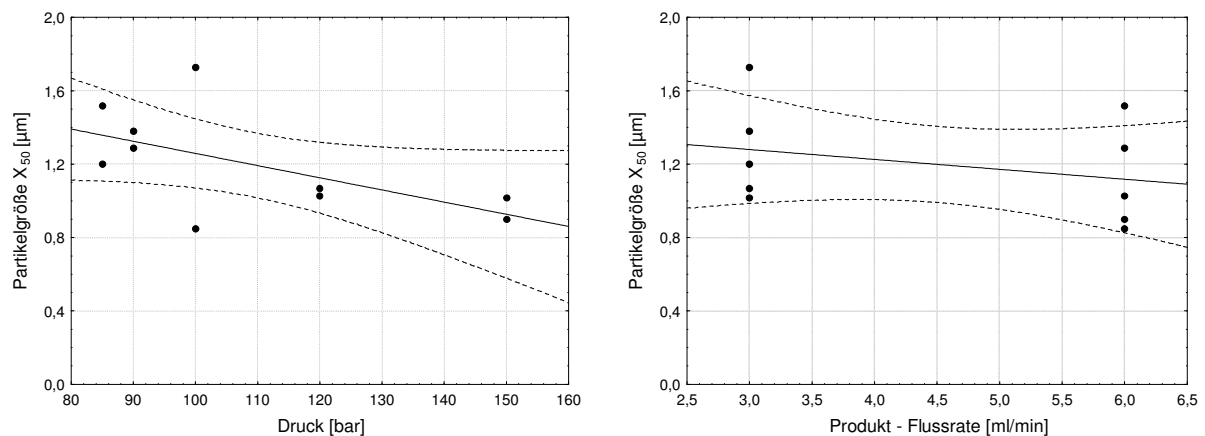


Abb. 4.14: Scatterplots der X_{50} -Werte [µm] der Partikelgrößenverteilung gegen den Druck [bar] (links) und die Produkt-Flussrate [ml/min] (rechts) der mit MeOH versprühten Chargen. Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Betrachtet man die Scatterplots der X_{50} -Werte in Abb. 4.14, so wird deutlich, dass auch in diesem Fall durch den Druck der größte Effekt ausgeübt wird. Die mit der Erhöhung des Druckes ansteigende Polarität des überkritischen Kohlendioxids scheint zu einer besseren Löslichkeit des MeOH und damit zu einer schnelleren Fällung des Formoterols zu führen, was sich letztendlich in einer kleineren Partikelgröße widerspiegelt. Bei der Variation der Produkt-Flussrate ist dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt. Auch hier liegt wieder eine große Streuung der Einzelwerte vor, die eine Bewertung dieses Effektes erschwert. Bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel und auch bei den Formoterol / DPPC-Mischungen ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier

sticht jeweils eine Probe mit einem hohen X_{90} -Wert und einer daraus resultierenden hohen Spannweite deutlich hervor.

Allgemein konnte beobachtet werden, dass bei der Fällung von Formoterol aus überkritischem Kohlendioxid im Vergleich zum Budesonid insgesamt sehr kleine Partikel hervorgingen. Dies zeigt, dass die resultierende Partikelgröße nicht allein von den Prozessparametern, sondern auch von der verwendeten Substanz abhängig ist.

Bei der Bewertung der Partikelmorphologie ist zu erkennen, dass bei den Chargen, die aus MeOH versprüht wurden (Abb. 4.15; A und B), Partikel mit sehr gleichmäßiger, runder Gestalt, sowie glatten Oberflächen resultierten. Das äußere Erscheinungsbild dieser Chargen erinnert dabei stark an das von sprühgetrockneten Produkten. Bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel (Abb. 4.15; C und D) wird aus den REM-Aufnahmen deutlich, dass es zum Verkleben der Einzelpartikel gekommen ist. Einzelne runde Formen sind noch erkennbar, während der Hauptanteil der Partikel über Brücken zu einem größeren Netzwerk verklebt ist. Eine Hauptursache dieses Erscheinungsbildes scheint die höhere Viskosität des DMSO gegenüber MeOH zu sein. Die Präzipitation erfolgt langsamer, bzw. die Tropfen aus der Düse reißen nicht so schnell ab, so dass es zur Ausbildung solcher Netzwerke kommt.

Die REM-Aufnahmen der Formoterol / DPPC-Mischungen (Abb. 4.15; E und F) zeigen ein ähnliches Bild wie bei den reinen Formoterol Proben. Auch in diesem Fall resultierten nach der Fällung kugelige Partikel mit einer glatten Oberfläche, wobei vereinzelt Brücken zwischen den Einzelpartikeln zu erkennen sind. Der Zusatz von DPPC scheint somit teilweise zur Verklebung von mehreren Einzelpartikeln zu führen. Allerdings ist dieser Effekt hier nicht so stark ausgeprägt wie bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel.

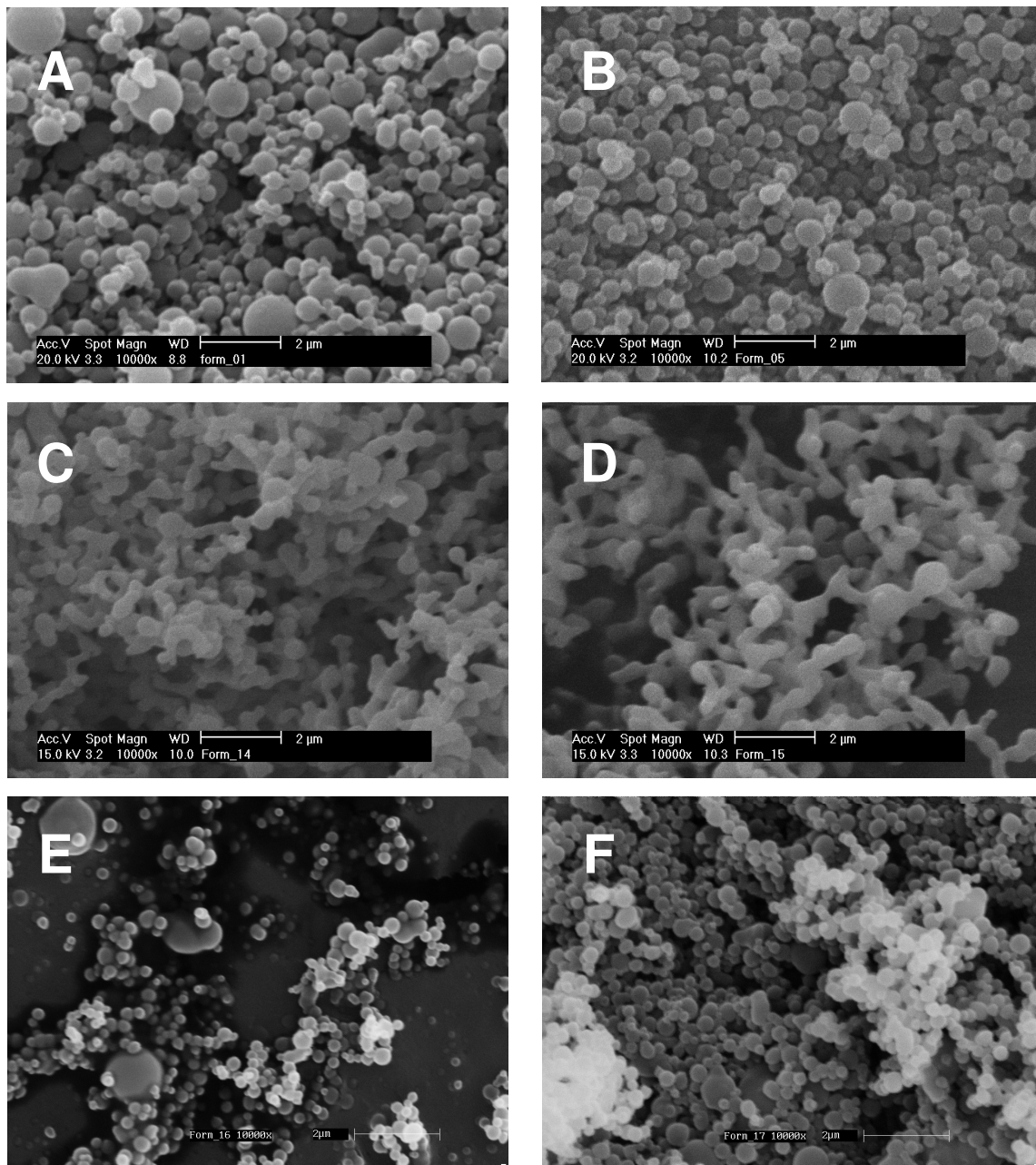


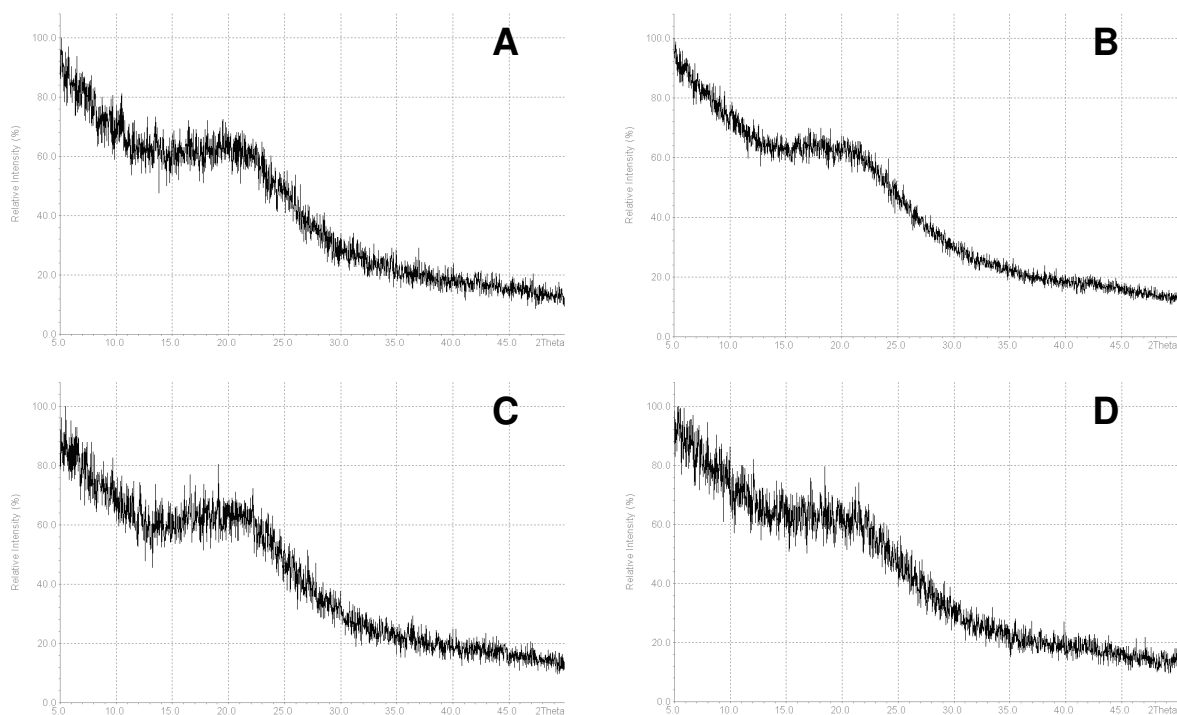
Abb. 4.15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen exemplarisch für einige Formoterol Chargen bei 10000facher Vergrößerung. A: Form_01; B: Form_05; C: Form_14; D: Form_15; E: Form_16; F: Form_17.

4.2.3.3 Röntgen- und DSC-Untersuchungen

In Abb. 4.16 sind jeweils die Röntgendiffraktogramme der aus dem ASES-Prozess erhaltenen Formoterol-Proben dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass in

jedem Fall ein amorphes Produkt aus der Fällung im überkritischen Kohlendioxid resultierte. Diese Ergebnisse zeigen, dass in Bezug auf die Prozessparameter weder durch die Variation des Druckes, des Lösungsmittels, noch durch den Zusatz von DPPC eine Kristallisation des Formoterols in überkritischem Kohlendioxid erreicht werden konnte.

Ein ähnliches Phänomen beschreibt bereits Timmermann (2004) für die Fällung von Salmeterol-xinafoat in überkritischem Kohlendioxid, wobei in diesem Fall die Fällung des Salmeterol-xinafoats nur schwer möglich war und zu teilweise amorphen, sowie auch polymorphen Produkten führte. Die Tendenz der Beta₂-Sympathomimetika im ASES-Prozess jeweils im amorphen Zustand auszufallen, scheint somit sehr ausgeprägt zu sein. Dagegen zeigten Tong et al. (2001), dass bei der Fällung des Salmeterol-xinafoats aus überkritischem Kohlendioxid im SEDS-Prozess jeweils kristalline Produkte erhalten werden konnten. Dabei zeigte sich in diesen Untersuchungen ein Polymorphismus des Salmeterol-xinafoats, der so im ASES-Prozess nicht nachvollziehbar war (Timmermann, 2004).



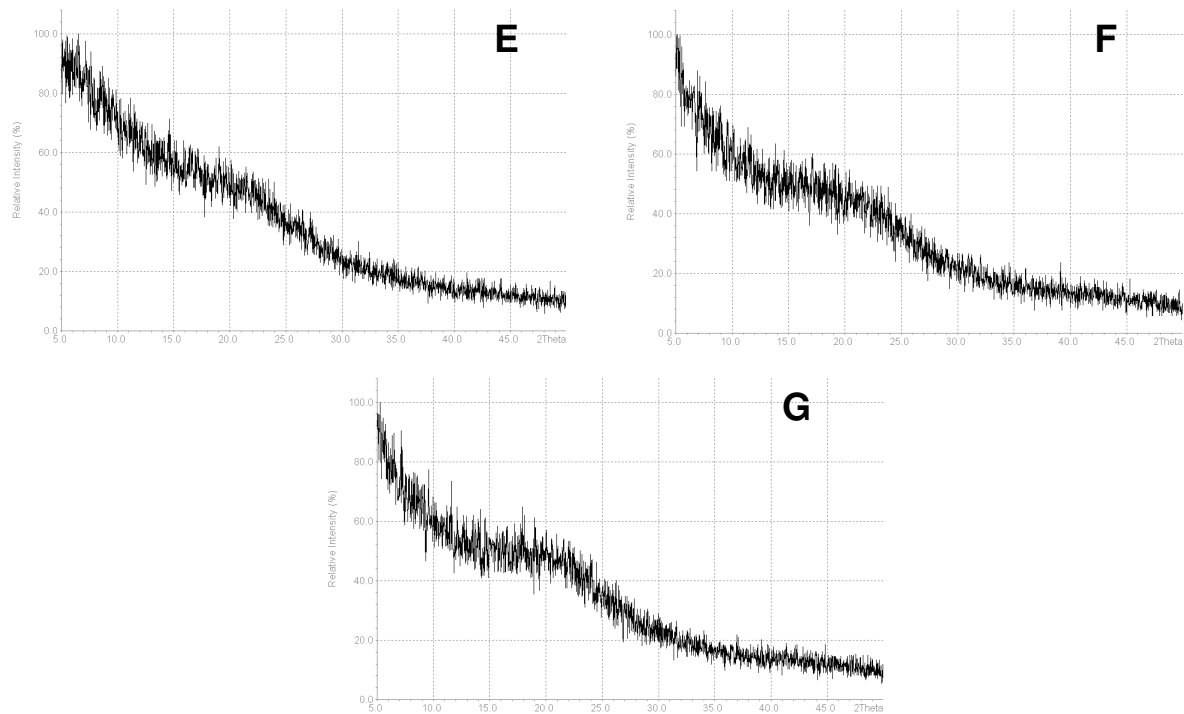


Abb. 4.16: Röntgendiffraktogramme: (A) Form_01, (B) Form_02, (C) Form_04, (D) Form_06, (E) Form_10, (F) Form_14, (G) Form_16.

Um einen Eindruck darüber zu erlangen, ob und wie diese amorphen Produkte rekristallisieren, wurden beispielhaft die Proben Form_01 und _02 für 7 Tage bei 75 % relativer Feuchte und 40°C in einer Hygrostatenkammer gelagert. Dabei zeigte sich, auch anhand von thermogravimetrischen Untersuchungen (hier nicht dargestellt), dass diese Proben jeweils wieder in das Formoterol-Dihydrat, welches auch als Ausgangssubstanz diente, rekristallisierten. In Abb. 4.17 sind die Röntgendiffraktogramme der Proben From_01 und _02 dargestellt, sowie das der Formoterol Rohware zum Vergleich. Zwar zeigt sich, dass diese Diffraktogramme nicht vollkommen identisch sind, jedoch kann anhand der DSC-Kurven in Abb. 4.18 ausgeschlossen werden, dass es sich um polymorphe Formen der Ausgangsware handelt. Vielmehr scheint die Rekristallisation noch nicht vollständig abgeschlossen zu sein, was die geringen Unterschiede in den Röntgendiffraktogrammen erklären könnte.

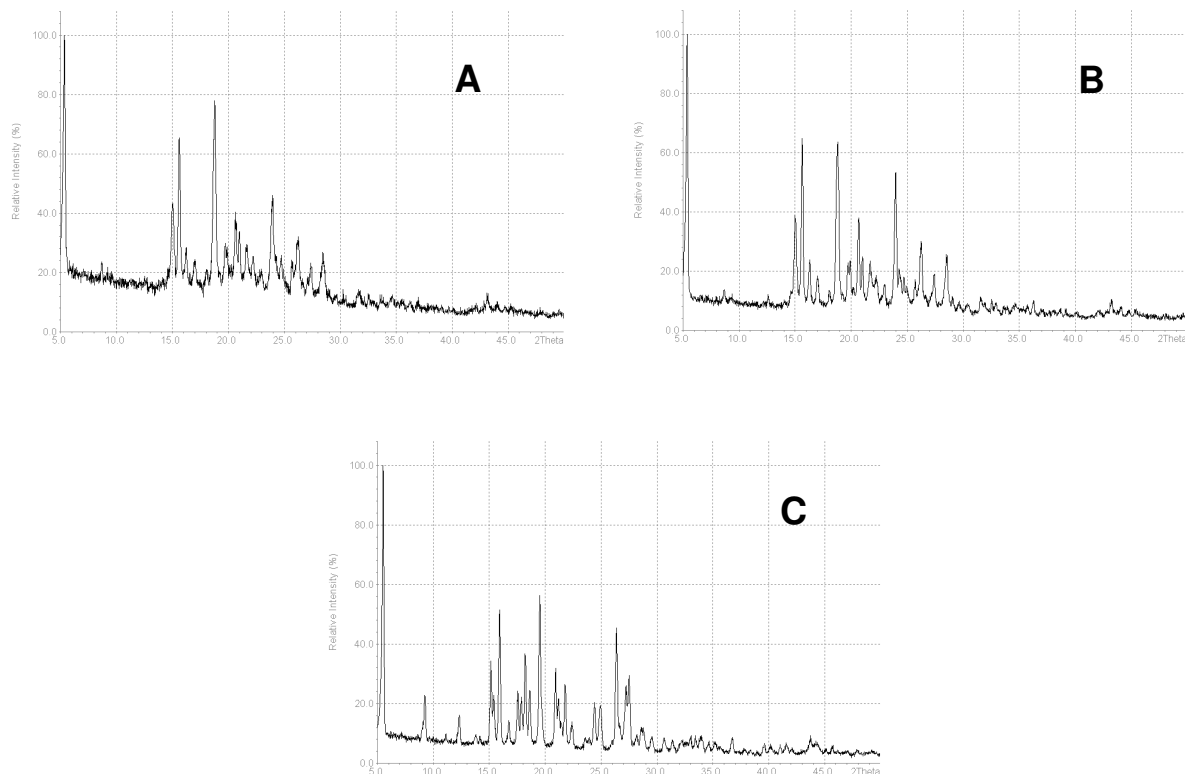


Abb. 4.17: Röntgendiffraktogramme: (A) Form_01 nach Rekristallisation, (B) Form_02 nach Rekristallisation, (C) Formoterol Rohware.

Die in Abb. 4.18 dargestellten DSC-Kurven zeigen Schmelzpunkte für die rekristallisierten Proben Form_01 und _02 von 144,5°C, sowie 143,9°C. Bei der Formoterol-Rohware ist der Schmelzpunkt bei 137,4°C zu erkennen, sowie ein endothermes Ereignis bei 110°C. Bei diesem Ereignis wird es sich um das Verdampfen des Hydratwassers des Formoterol-Dihydrat handeln. Da dieses endotherme Ereignis bei den Proben Form_01 und _02 jedoch fehlt, wird davon ausgegangen, dass die Lagerung über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 75 % relativer Feuchte noch nicht ausgereicht hat, um das aufgenommene Wasser vollständig in das Kristallgitter einzubauen und daher dieser endotherme Peak bei diesen Proben fehlt.

Dadurch, dass die verschiedenen Schmelzpunkte jedoch sehr nahe beieinander liegen, wird nicht davon ausgegangen, dass es sich bei den rekristallisierten

Proben um eine neue Kristallmodifikation handelt. Somit zeigt das Formoterol in diesem Fall keine Polymorphie.

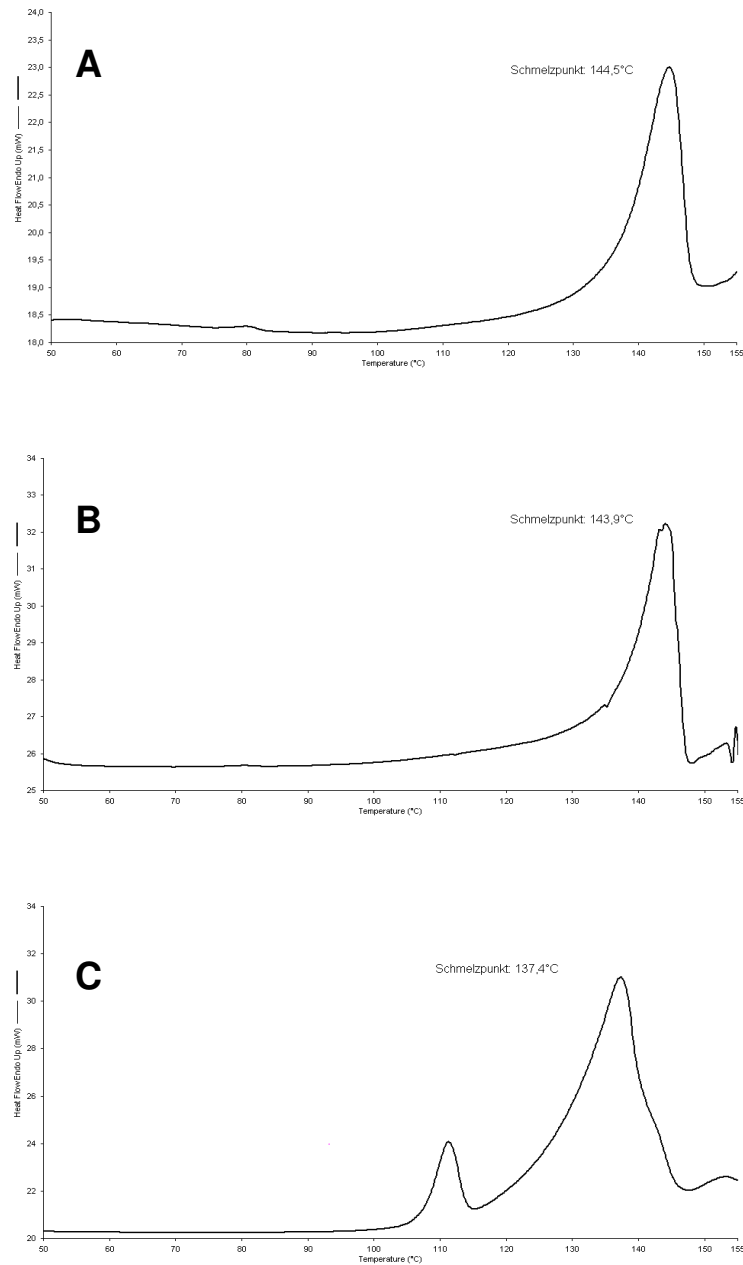


Abb. 4.18: DSC-Kurven der rekristallisierten Proben (A) Form_01 und (B) Form_02, sowie der Formoterol-Rohware (C).

4.2.3.4 Dynamische Wasserdampf Sorption

Um die Rekristallisation der amorphen Produkte in Abhängigkeit von der Luftfeuchte genauer beschreiben zu können, standen weitere Untersuchungen mit der Dynamischen Wasserdampf Sorption (Kapitel 3.2.5) im Vordergrund. In Abb. 4.19 und Abb. 4.20 sind die Ergebnisse der Formoterol-Rohware dargestellt. Dabei wurde die Probe einer Luftfeuchterampe in Stufen von 0 % bis 90 % relativer Feuchte jeweils für 50 Minuten ausgesetzt und die Massenänderung in Prozent für jede Stufe über eine Mikrowaage aufgezeichnet.

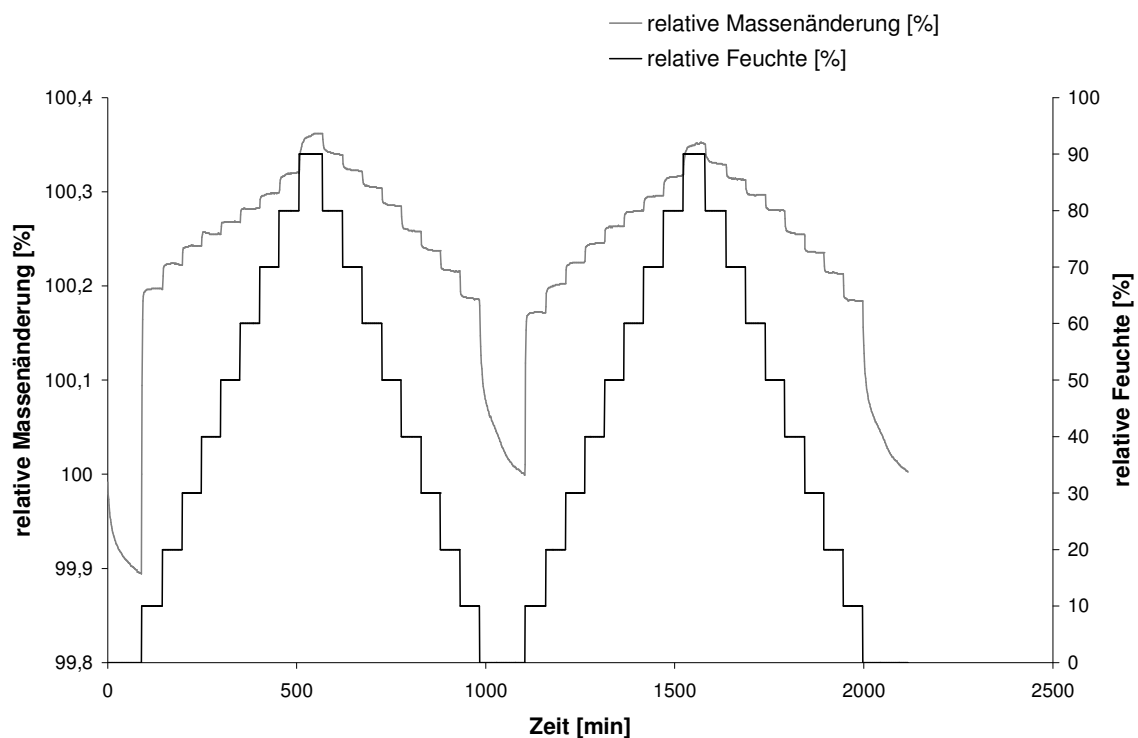


Abb. 4.19: Massenänderung [%] gegenüber der relativen Luftfeuchte der Formoterol-Rohware.

Die Abbildungen zeigen, dass die Probe nur einen sehr geringen Teil der angebotenen Feuchtigkeit aufgenommen hat und diese bei der Trocknung auch nahezu wieder vollständig abgegeben wird. Besonders deutlich ist dies in Abb. 4.20 anhand der Sorptions- und Desorptionskurve zu erkennen. Die Hysterese-

flächen in diesem Diagramm fallen so gering aus, dass die Formoterol-Rohware nahezu unempfindlich auf Luftfeuchteänderungen zu reagieren scheint.

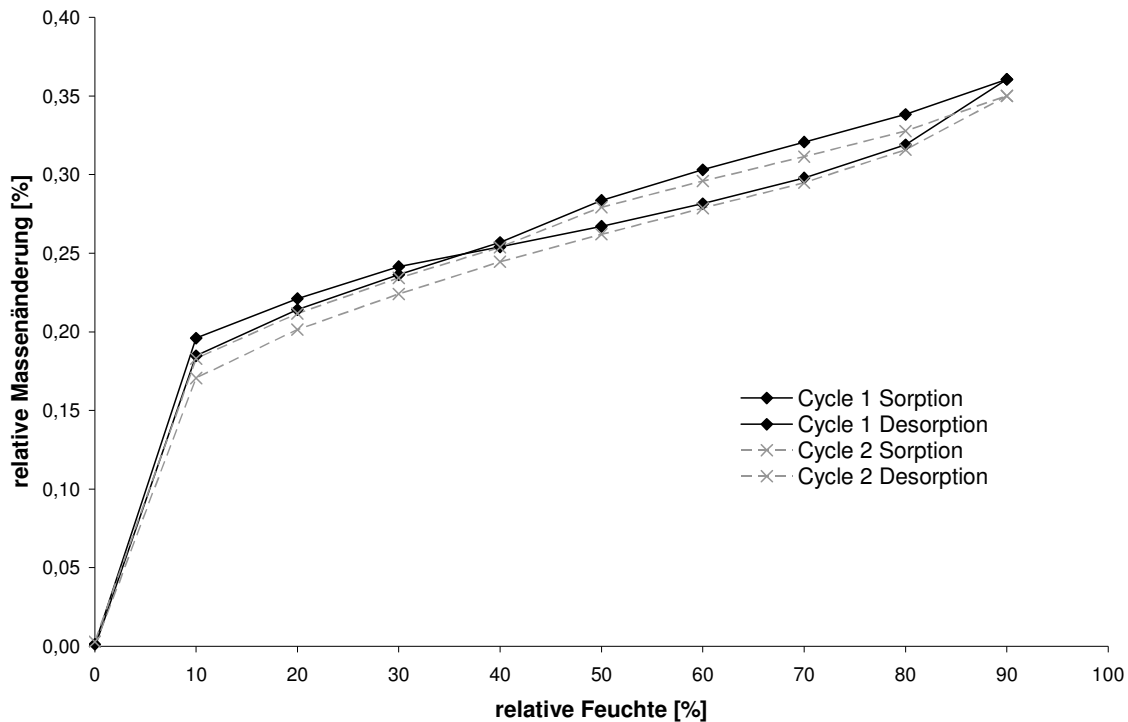


Abb. 4.20: Sorptions- Desorptionskurve der Formoterol-Rohware.

Im Weiteren wurden die amorphen Formoterol-Proben unter Verwendung der oben genannten Luftfeuchterampe untersucht. Die Probe Form_01 (Abb. 4.21) zeigt dabei einen sprunghaften Anstieg in der Feuchtigkeitsaufnahme ab ca. 50 % relativer Feuchte. Dies führt soweit, dass sich die relative Massenänderung auf ca. 17 % beläuft (Sorptionskurve Cycle 1), bis dann schließlich eine relative Luftfeuchte von 90 % erreicht ist. Bei der anschließenden Trocknung fällt dabei die Masse nicht auf den ursprünglichen Wert zurück, sondern es ergibt sich eine Massenänderung von ca. 4 % (Desorptionskurve Cycle 1), was stöchiometrisch zwei Molekülen Wasser, bezogen auf das Formoterol, entspricht. In einem zweiten Zyklus zeigte sich anschließend, dass sich für das Formoterol ab ca. 60 % relativer Feuchte wieder eine sprunghafte Massenänderung ergab, die allerdings nicht so stark ausfiel wie

im ersten Zyklus. Auch hier wurde bei der anschließenden Trocknung ein Wert von 104 % Massenänderung, bezogen auf die Ausgangsmasse, erreicht.

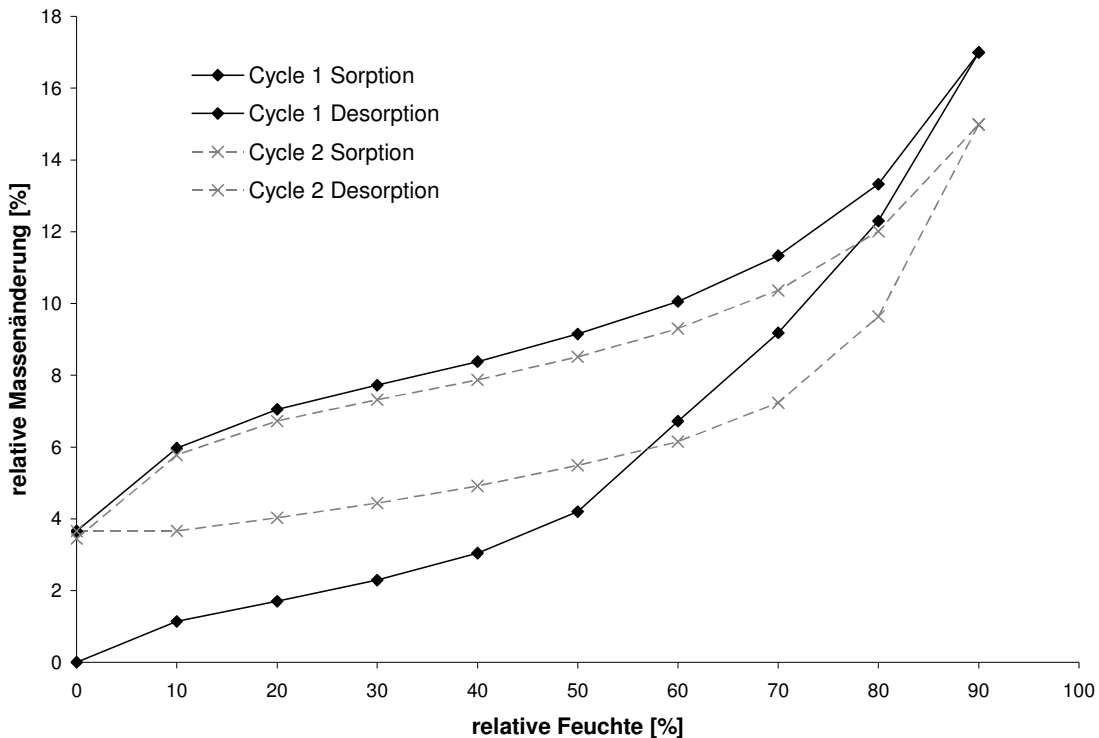


Abb. 4.21: Sorptions- Desorptionskurve der Probe Form_01.

Es wird somit deutlich, dass sich ab einer relativen Luftfeuchte von ca. 50 % das Formoterol-Dihydrat zu bilden beginnt. Dieser Vorgang zeigt sich bei allen amorphen Formoterol-Proben, so dass auf die Darstellung dieser Diagramme verzichtet wird. Dabei scheint dieser Vorgang unter den genannten Versuchsbedingungen noch nicht komplett abgeschlossen zu sein, betrachtet man im Vergleich die Formoterol-Rohware (Abb. 4.20). Die Hysterese fläche der Probe Form_01 zeigt, dass selbst im zweiten Zyklus noch sehr viel Feuchtigkeit aus dem Probenraum aufgenommen wird. Diese Tatsache bestätigt auch die in Kapitel 4.2.3.3 beschriebenen Ergebnisse und ist möglicherweise der Grund für die Unterschiede, die sich in den Röntgendiffraktogrammen zeigen.

Um einen genauen Rekristallisationspunkt aufzeigen zu können, wurde eine weitere Luftfeuchterampe zur Untersuchung herangezogen. Diese bestand aus

einer stufenweisen Erhöhung der relativen Luftfeuchte von 0 % bis 90 %, wobei die jeweilige Zeit sich auf den Ausgleich der Massenänderung pro Stufe bezog, allerdings nach einer maximalen Zeit von 1000 Minuten auf die nächste Stufe weitergeschaltet wurde.

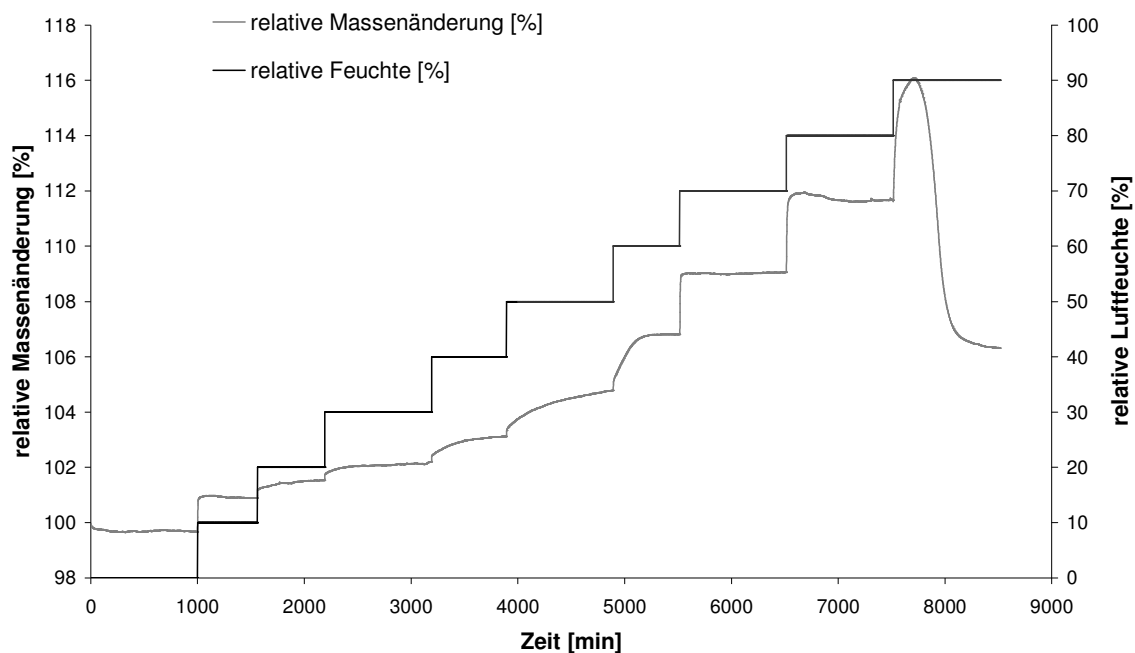


Abb. 4.22: Massenänderung [%] gegenüber der relativen Luftfeuchte der Probe Form_05.

Auch hier (Abb. 4.22) zeigt sich, dass die Aufnahme der Feuchtigkeit aus dem Probenraum ab ca. 50 % relativer Luftfeuchte beginnt. Zwischen 70 % und 90 % relativer Luftfeuchte ist außerdem zu erkennen, dass zu Anfang der jeweiligen Stufen direkt die gesamte vorhandene Feuchtigkeit bis zu einem bestimmten Grad aufgenommen wird, bis dann schließlich die Rekristallisation bei 90 % relativer Luftfeuchte nach ca. 200 Minuten (Zeitpunkt bezogen auf die Stufe) einsetzt. Anschließend fällt die Gesamtmasse auf 106 % zurück. Dies zeigt, dass nach der Bildung des Dihydrates noch wesentlich mehr Feuchtigkeit vom Molekül gehalten wird (ca. 2 %), als für die Bildung notwendig. Der Prozess scheint somit bei dieser Stufe noch nicht vollständig abgeschlossen zu sein.

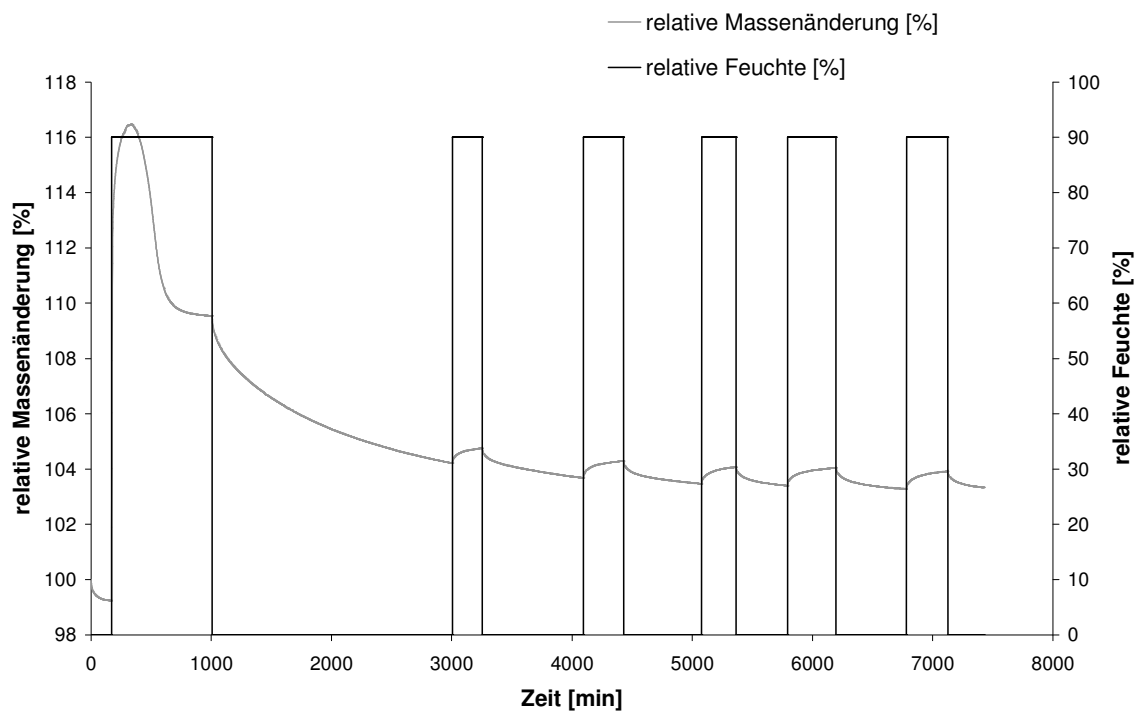


Abb. 4.23: Massenänderung [%] gegenüber einer relativen Luftfeuchte von 90 % der Probe Form_01.

In Abb. 4.23 zeigt sich letztendlich, dass nach der Rekristallisation bei 90 % relativer Feuchte und anschließender Trocknung das Formoterol-Dihydrat erhalten werden kann. Dabei pendelt sich die relative Massenänderung nach mehrmaliger Erhöhung der relativen Feuchte auf 90 % und anschließender Trocknung bei 0 % relativer Feuchte auf einen Wert um ca. 0,4 % ein. Dies entspricht ungefähr dem Wert, der auch bei der Formoterol-Rohware ermittelt werden konnte (Abb. 4.20). Untersuchungen mit den Proben, die mit DMSO als Lösungsmittel und mit dem Zusatz von DPPC als Stabilisator gefällt wurden (Diagramme hier nicht dargestellt), zeigten dieselben Ergebnisse. Auch in diesen Fällen erfolgte eine Rekristallisation zum Dihydrat.

Die amorphen Produkte zeigen demnach erst nach einer längeren Lagerung bei 90 % relativer Feuchte eine vollständige Umwandlung in das Formoterol-Dihydrat. Unterhalb von 50 % relativer Feuchte findet nur eine geringfügige

Feuchtigkeitsaufnahme statt, was für eine Lagerung der amorphen Produkte unterhalb dieser relativen Feuchte spricht.

4.2.3.5 Aerodynamisches Verhalten

Wie auch das Budesonid wurden die entstandenen Formoterol-Mikropartikel hinsichtlich ihrer aerodynamischen Eigenschaften untersucht und beurteilt. Die Angaben zur genauen Beschreibung der Methode finden sich in Kapitel 3.2.8. Der Einfluss des Lösungsmittels bei der Fällung im überkritischen Kohlendioxid (MeOH und DMSO), sowie der Zusatz von DPPC standen dabei im Vordergrund dieser Untersuchungen. In einem ersten Schritt wurden dabei die ausgewählten Proben ohne den Zusatz eines Trägerstoffes vermessen, um die Dispergierbarkeit der Formoterol-Mikropartikel im Luftstrom nicht durch einen solchen Zusatz zu beeinflussen.

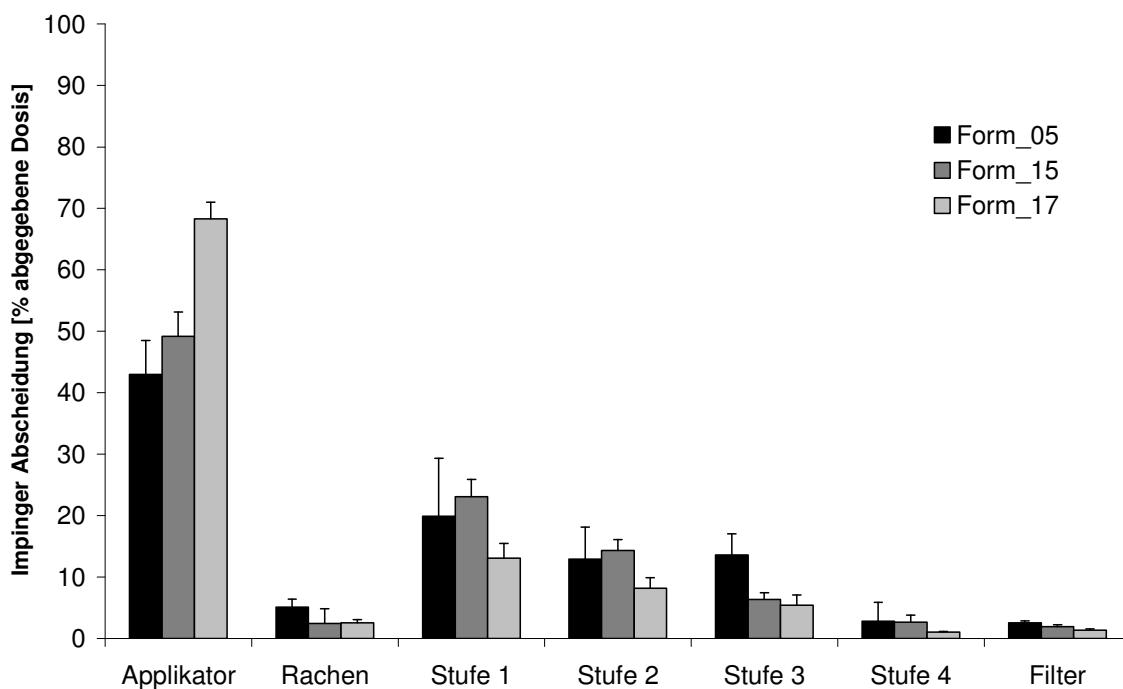


Abb. 4.24: Impinger Abscheidung [% abgegebene Dosis] der einzelnen Mikropartikel-Chargen.

Die Ergebnisse in Abb. 4.24 und Tab. 4.9 zeigen, dass mit Form_05, welches aus MeOH gefällt wurde, das beste Ergebnis mit einer FPF von 29,4 % erreicht werden konnte. Auffällig sind bei allen vermessenen Proben die hohen Standardabweichungen, die auf eine schlechte Dispergierbarkeit im Luftstrom hindeuten. Die Partikel scheinen aufgrund der geringen Größe eine sehr starke Kohäsion wie auch Adhäsion zu zeigen. Dies wird besonders deutlich, betrachtet man die Probe Form_17, bei der sich ca. 68 % der abgegebenen Dosis schon im Applikator abschieden. Die reinen Pulverproben sind durch diese Eigenschaften nur bedingt für eine Applikation geeignet, so dass eine Möglichkeit gesucht wurde, zumindest die Kohäsion der Einzelpartikel zu unterdrücken, um höhere FPF-Werte zu erreichen.

Tab. 4.9: Übersicht der Fine Particle Fraction (FPF) [%] und des MMAD [μm] der einzelnen Mikropartikel-Chargen (SD in Klammern).

Chargennummer	Partikel < 5 μm (FPF) [%]	MMAD [μm]
Form_05	29,4 ($\pm 11,6$)	5,6 ($\pm 2,1$)
Form_15	19,2 ($\pm 4,5$)	7,2 ($\pm 1,0$)
Form_17	21,9 ($\pm 5,9$)	6,7 ($\pm 1,9$)

Aus diesem Grund wurden in einem zweiten Schritt Mischungen der Formoterol-Mikropartikel mit Respitose[®] SV 003 (DMV International bv, Veghel, Niederlande) hergestellt, wobei es sich bei der Respitose[®] SV 003 um eine für die Anwendung in Dry Powder Inhalern entwickelte Laktose handelt. Die Mischungen enthielten dabei einen Anteil von 0,25 % (m/m) Formoterol, so dass pro Inhalation insgesamt eine Dosis von 12 μg Formoterol zur Verfügung stand. Aufgrund der geringen Mengen, die an Formoterol zur Verfügung standen, wurde für das Mischen eine Art Mikromischer entwickelt, in dem die Laktose und das Formoterol mechanisch über einen Rührer gemischt werden konnten. Damit die Gleichförmigkeit des Gehaltes der einzelnen Mischungen

vernachlässigt werden konnte, wurde jeweils für eine Mischung nur soviel Material verwendet, wie später auch in den MSLI eingebracht wurde.

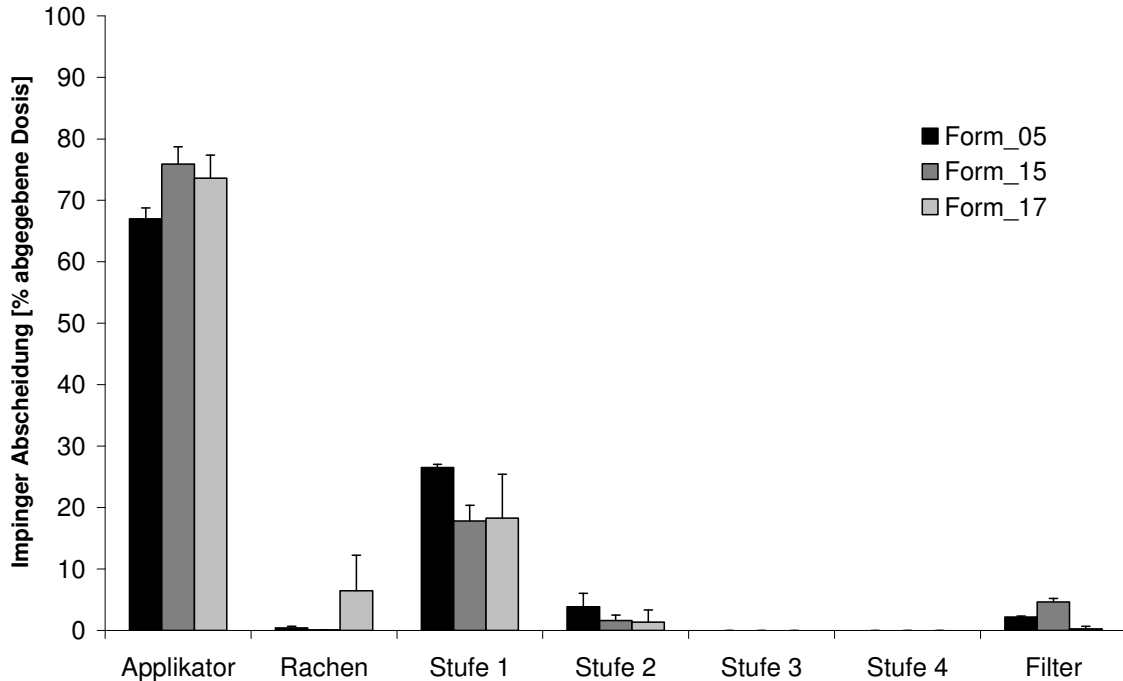


Abb. 4.25: Impinger Abscheidung [% abgegebene Dosis] der einzelnen Formoterol-Laktose-Mischungen.

Tab. 4.10: Übersicht der Fine Particle Fraction (FPF) [%] und des MMAD [μm] der einzelnen Formoterol-Laktose Mischungen (SD in Klammern).

Chargennummer	Partikel < 5 μm (FPF) [%]	MMAD [μm]
Form_05	6,7 ($\pm 0,7$)	k. A.
Form_15	19,4 ($\pm 4,7$)	k. A.
Form_17	1,0 ($\pm 1,4$)	k. A.

Die Ergebnisse in Abb. 4.25 und Tab. 4.10 zeigen, dass die FPF-Werte deutlich schlechter ausfielen als bei den Vermessungen ohne Laktose als Trägerstoff. So konnte lediglich mit der Probe Form_15 eine FPF von 19,4 % erreicht werden, wohingegen die Proben Form_05 und _17 mit 6,7 % und 1,0 % die schlechtesten Ergebnisse lieferten. Der MMAD war bei allen Proben rechnerisch

nicht mehr auswertbar. Die Proben zeigen also auch hier eine unverändert starke Adhäsion sowohl an den Applikator, als auch an die Laktose. Insgesamt wurden zwischen 67 % und 76 % der gesamt applizierten Dosis der einzelnen Proben schon im Applikator abgeschieden, so dass der Luftstrom von 81 l/min nicht ausreichte diese ausreichend zu dispergieren, um die Proben tiefer in den MSLI einzubringen.

4.2.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass eine Fällung von Formoterol im überkritischen Kohlendioxid möglich ist. Dabei beeinflussen die Prozessparameter Druck und Produkt-Flussrate die Herstellung kaum. Lediglich bei der Variation des Druckes konnten Effekte in Hinblick auf die Ausbeute und Partikelgröße ermittelt werden. Auch die Veränderung des Lösungsmittels, aus dem die Lösung im überkritischen Kohlendioxid gefällt wurde, sowie ein Zusatz von DPPC brachten keine ausgeprägten Veränderungen der Ergebnisse. Die entstanden Produkte zeigen eine sehr geringe Partikelgröße, was die inhalative Anwendung allerdings nicht zwingend erleichtert. Im Gegenteil, durch die starken Ko- und Adhäsionskräfte war es nicht mehr möglich zufrieden stellende Ergebnisse mit Formoterol-Laktose Mischungen zu erhalten, was mit den reinen Pulverproben noch gelang.

Alle Produkte wiesen eine ausgeprägte Amorphie auf, ließen sich aber in das Formoterol-Dihydrat kristallisieren. Dabei zeigte sich, dass die amorphen Produkte unter bestimmten Luftfeuchtebedingungen durchaus als stabil anzusehen sind. So konnte bei einer zweijährigen Lagerung über einem Trocknungsmittel keine Rekristallisation beobachtet werden.

4.3 Herstellung proliposomaler Zubereitungen

4.3.1 Einleitung

Für die Herstellung von Liposomen stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung, die sich im Laufe der Zeit etabliert haben (siehe auch Kapitel 2.3.4). Dabei stehen den Vorteilen dieser Herstellungsmethoden allerdings auch sehr viele Nachteile entgegen. So ist der Einsatz von großen Mengen an organischen Lösungsmitteln meist unverzichtbar. Ein weiteres Problem stellt die oft ungenügende Stabilität der hergestellten Liposomen über einen längeren Zeitraum dar, wodurch sich aufwendige Verfahren, wie z.B. die Gefriertrocknung der Liposomen, an die eigentliche Herstellung anschließen.

Im folgenden Kapitel wird die Herstellung so genannter proliposomaler Zubereitungen mit dem ASES-Prozess diskutiert. Dass die Liposomenherstellung mit überkritischem Kohlendioxid prinzipiell möglich ist, zeigt ein Patent von Castor und Chu (1998). Allerdings wurden in diesen Untersuchungen hauptsächlich Liposomen in ihrer eigentlichen Form, also als Suspension hergestellt (siehe auch Kapitel 2.3.4). Der Ansatz, der hier diskutiert werden soll, beschäftigt sich dagegen mit der Herstellung von Pulvern im ASES-Prozess, die in einer anschließenden Solvatisierung Liposomen bilden. Damit werden aus dem ASES-Prozess die hier als proliposomalen Zubereitungen bezeichneten Pulver erhalten und zu Liposomensuspensionen weiterverarbeitet. Zum einen wird dadurch der Einsatz großer Mengen an organischen Lösungsmitteln verringert und zum anderen ein stabiles Pulver erhalten, das jederzeit in eine fertige Liposomensuspension umgewandelt werden kann. Aufwendige Trocknungsverfahren, wie z.B. die Gefriertrocknung fertiger Liposomensuspensionen werden damit überflüssig.

4.3.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Für die einzelnen Versuche wurden verschiedene statistische Versuchspläne (2^2 -faktorielle und 3^{3-1} -faktorielle Versuchspläne) erstellt. Dabei standen die Variation von Druck und Temperatur, sowie die Zusammensetzung der Komponenten für die proliposomalen Zubereitungen im Vordergrund. Als Materialien wurden nur solche Phospholipide ausgewählt, die eine Phaseninversionstemperatur über der kritischen Temperatur des Kohlendioxids besitzen, um stabile Pulver als Produkte zu erhalten (Tab. 4.11).

Tab. 4.11: Phaseninversionstemperatur der verwendeten Phospholipide.

Phospholipid	Phaseninversionstemperatur [°C]
Phospholipon (PL) 80H	45
Phospholipon (PL) 90H	54
Phospholipon (PL) 100H	54

Bei den in Tab. 4.11 genannten Phospholipiden handelt es sich um hydrierte Phosphatidylcholine (Phospholipon 80H min. 60 %, Phospholipon 90H min. 90 %, Phospholipon 100H min. 95 %), deren Fettsäuregruppen zu 85 % aus Stearin- und zu 15 % aus Palmitinsäure zusammengesetzt sind. Zusätzlich zu den Phospholipiden wurde Cholesterol in verschiedenen Konzentrationen hinzugesetzt und Budesonid als Modellarzneistoff verwendet. Die Zusammensetzungen der einzelnen Chargen sind in Tab. 4.12 zusammengefasst, wobei diese jeweils in einer Ansatzgröße von 5 g hergestellt und als 10 %ige Lösung (0,2 Methanol : 0,8 Methylenchlorid) in das überkritische Kohlendioxid mit einer Flussrate von 6 ml/min eingesprüht wurden. Die CO_2 -Flussrate betrug jeweils 6 kg/h. Die Variation der Prozessparameter Druck und Temperatur findet sich in Tab. 4.13. Dabei ist anzumerken, dass die Prozessparameter für jede Zusammensetzung (Tab. 4.12) und jedes Phosphatidylcholin jeweils als

einzelner Block variiert wurden. Die einzelnen Blöcke wurden anschließend mit der Statistik Software STATISTICA 6.0 ausgewertet.

Tab. 4.12: Zusammensetzungen der einzelnen Zubereitungen, wobei jede Zusammensetzung jeweils mit Phospholipon 90H und 100H durchgeführt wurde.

Zusammensetzung	Phosphatidylcholin	Cholesterol	Budesonid
10 : 0	0,9	0	0,1
9 : 1	0,81	0,09	0,1
8 : 2	0,72	0,18	0,1
7 : 3	0,63	0,27	0,1

Tab. 4.13: Prozessparameter der einzelnen 2²-faktoriellen Versuchspläne, durchgeführt mit Phospholipon 90H, 100H.

Zusammensetzung	Druck [bar]	Temperatur [°C]
10:0; 9:1; 8:2; 7:3	80	45
10:0; 9:1; 8:2; 7:3	90	45
10:0; 9:1; 8:2; 7:3	90	35
10:0; 9:1; 8:2; 7:3	80	35
10:0; 9:1; 8:2; 7:3	85	40

Damit neben dem Einfluss des Druckes und der Temperatur auch der Einfluss der Zusammensetzung auf die entstandenen proliposomalen Zubereitungen bewertet werden konnte, wurde abschließend ein 3³⁻¹-faktorieller Versuchsplan entworfen. Dieser Versuchsplan stellt die Basis für die statistischen Auswertungen dar, die im Folgenden erläutert werden sollen. In Tab. 4.14 sind die einzelnen Parameter jeweils für PL 90H und PL 100H zusammengefasst dargestellt.

Tab. 4.14: Prozessparameter des 3^{3-1} -faktoriellen Versuchsplans, durchgeführt mit Phospholipon 90H, 100H.

PL 90H [Chargenr.]	PL 100H [Chargenr.]	Druck [bar]	Temperatur [°C]	Zusammen- setzung
Lip_44	Lip_40	85	45	10 : 0
Lip_45	Lip_41	90	40	10 : 0
Lip_46	Lip_42	80	40	8 : 2
Lip_17	Lip_28	80	35	10 : 0
Lip_18	Lip_30	80	45	9 : 1
Lip_24	Lip_36	90	45	8 : 2
Lip_47	Lip_43	85	35	8 : 2
Lip_22	Lip_34	85	40	9 : 1
Lip_20	Lip_32	90	35	9 : 1

4.3.3 Ergebnisse

4.3.3.1 Vorversuche

Anhand von Vorversuchen mit Phospholipon 80H zeigte sich, dass eine Herstellung von proliposomalen Zubereitungen im ASES-Prozess bei den genannten Prozessparametern unmöglich war. Bei allen Versuchen bildete sich ein Film auf der Kolonnenwand, der nicht mehr aus der Hochdruckkolonne entnehmbar war. Die Phaseninversionstemperatur von 45°C ist für eine Verarbeitung im ASES-Prozess somit zu niedrig, so dass sich bei den jeweiligen Prozessparametern das Phospholipon 80H in den flüssigkristallinen Zustand umwandelte und es somit zu einer Filmbildung kam. Auf den weiteren Einsatz von Phospholipon 80H wurde aus diesem Grund verzichtet.

Weiterhin war in jedem Fall eine Verarbeitung der Zusammensetzung 7:3 problematisch. Es konnten keine nennenswerten Ausbeuten erzielt werden, so dass auch hier auf den Einsatz eines solchen Verhältnisses verzichtet wurde. Den Grund dafür zeigte die optische Begutachtung des Separators nach der

Herstellung, die zeigte, dass das Cholesterol in diesen überführt wurde. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die Löslichkeit des Cholesterols im überkritischen Kohlendioxid bei dieser hohen Einsatzkonzentration stark zugenommen hat und aus diesem Grund das Cholesterol nicht mehr in der Hochdruckkolonne ausgefallen ist.

4.3.3.2 Ausbeute

In Abb. 4.26 und Abb. 4.27 sind die einzelnen Werte für die Ausbeuten der 2²-faktoriellen Versuchspläne mit PL 90H und PL 100H grafisch dargestellt. Dabei konnten für die Zusammensetzungen auf Basis von PL 90H Werte zwischen ca. 18 % und 79 % erreicht werden. Für die Versuche mit PL 100H ergaben sich Ausbeuten zwischen ca. 25 % und 82 %. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine Präzipitation in überkritischem Kohlendioxid in jedem Fall möglich ist.

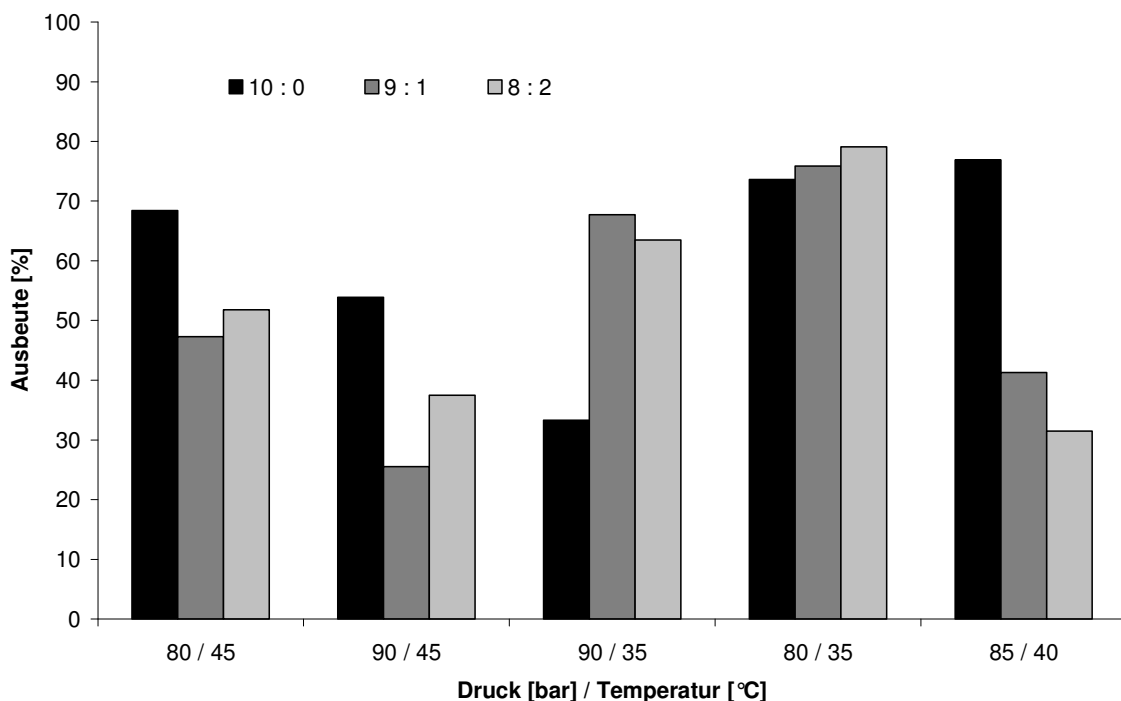


Abb. 4.26: Ausbeuten [%] der einzelnen Phospholipon 90H Zubereitungen.

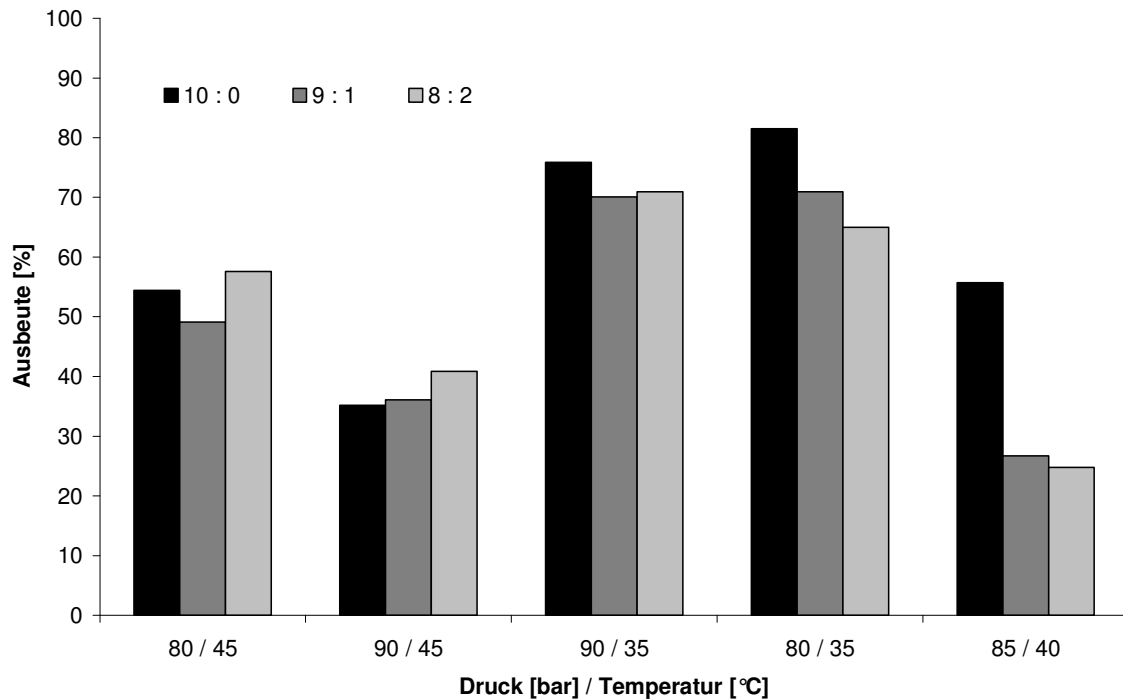


Abb. 4.27: Ausbeuten [%] der einzelnen Phospholipon 100H Zubereitungen.

Die statistische Auswertung zeigte weder bei den PL 90H, noch bei den PL 100H Zusammensetzungen einen signifikanten Effekt der einzelnen Faktoren auf die Ausbeute ($p=0,05$, Paretdiagramme hier nicht dargestellt). Um trotzdem einen Aufschluss darüber zu erlangen, inwiefern die einzelnen Faktoren den Prozess in Hinblick auf die Ausbeute beeinflussen, wurden die Ergebnisse in Form von Scatterplots dargestellt.

In Abb. 4.28 sind die Ergebnisse für die Chargen mit PL 90H als Hauptbestandteil zusammengestellt, wobei erkennbar ist, dass die Temperatur und die Zusammensetzung der Proben eine gewisse Tendenz auf die Ausbeute zeigen. So wurden gerade durch die Erniedrigung der Temperatur, sowie bei der Verwendung der Zusammensetzung 10:0 (kein Cholesterol in der Rezeptur) die besten Ergebnisse bei der Ausbeute erhalten. Bei der Betrachtung des Druckes ist zwar eine Tendenz erkennbar, allerdings erschwert die große Streuung der Werte in diesem Fall eine konkrete Aussage.

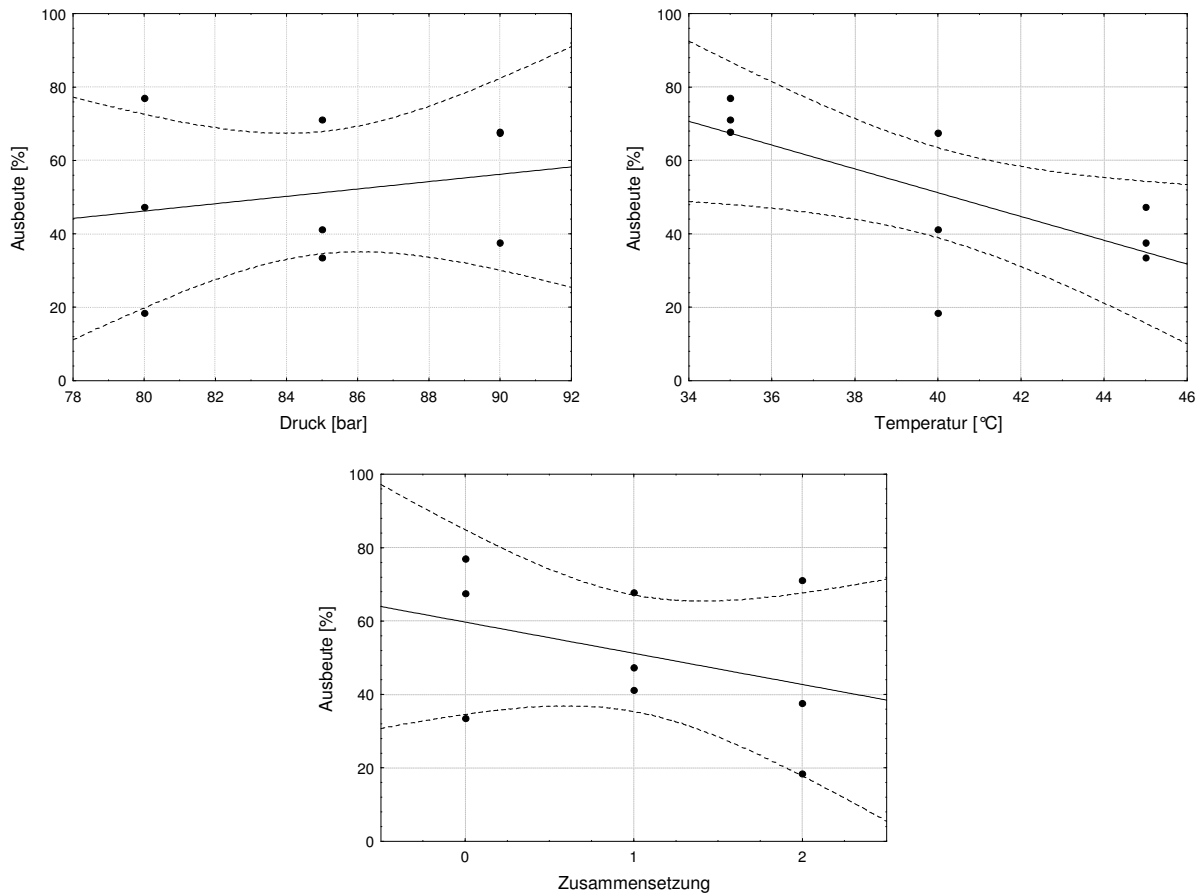


Abb. 4.28: Scatterplots der Ausbeute [%] der PL 90H Zubereitungen gegen den Druck [bar] (links oben), die Temperatur [°C] (rechts oben) und die Zusammensetzung [0 = 10:0; 1 = 9:1; 2 = 8:2] (mitte unten). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Ähnliche Ergebnisse zeigen die Scatterplots für die mit PL 100H als Hauptbestandteil hergestellten Chargen (Abb. 4.29). Den größten Effekt zeigt hierbei die Erniedrigung der Temperatur, die mit einer deutlichen Erhöhung der Ausbeute einhergeht. Die Auswertung der Effekte von Druck und Zusammensetzung der Zubereitungen wird auch hier durch die große Streuung der Einzelwerte erschwert, es zeigt sich tendenziell allerdings in Bezug auf die Zusammensetzung der Zubereitungen ein ähnliches Ergebnis wie beim PL 90H

in Abb. 4.28, d.h. eine Verringerung des Cholesterol-Anteils führte jeweils zu höheren Ausbeuten.

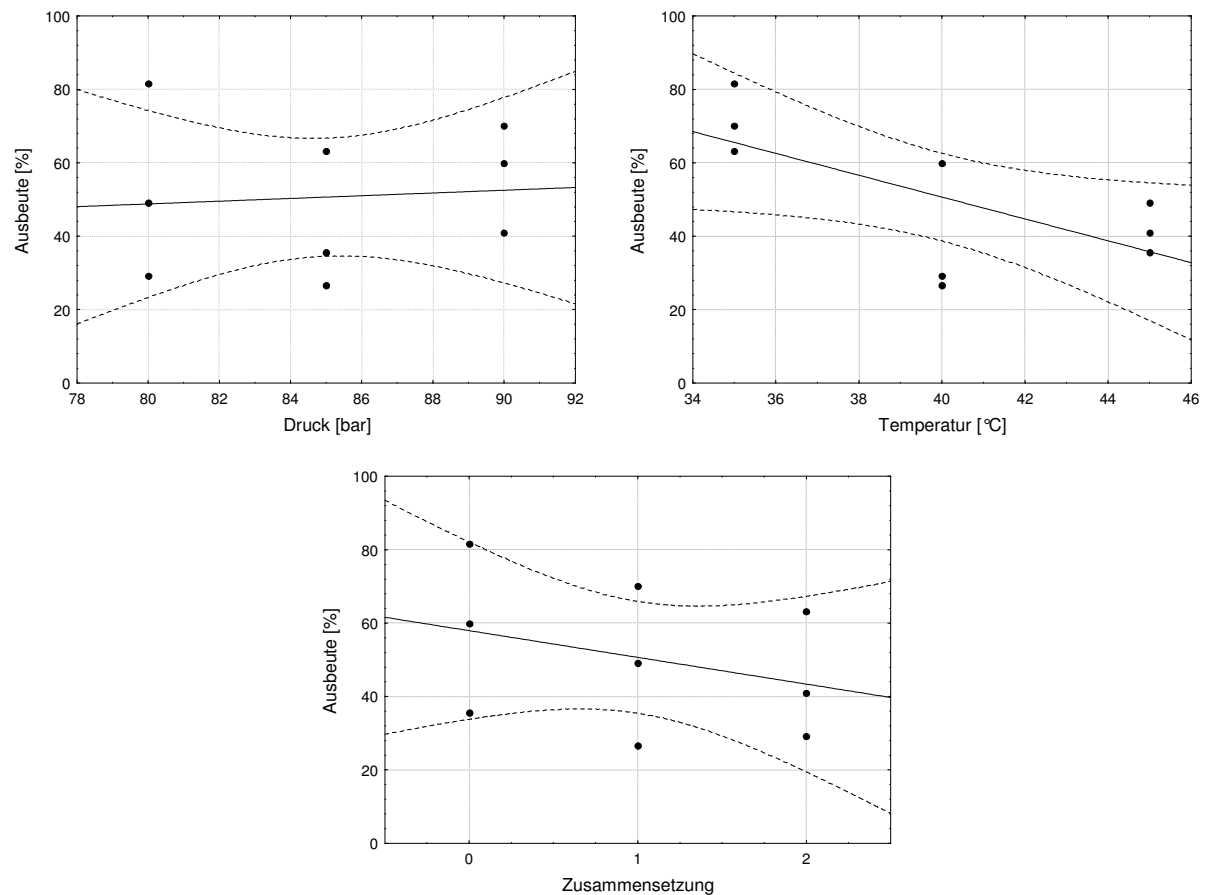


Abb. 4.29: Scatterplots der Ausbeute [%] der PL 100H Zubereitungen gegen den Druck [bar] (links oben), die Temperatur [°C] (rechts oben) und die Zusammensetzung [0 = 10:0; 1 = 9:1; 2 = 8:2] (mitte unten). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Allgemein wird deutlich, dass durch die Verwendung niedrigerer Temperaturen in jedem Fall höhere Ausbeuten erreicht werden konnten. Dies ist zurückzuführen auf die Phaseninversionstemperatur der verwendeten Phosphatidylcholine, die in diesem Fall bei 54°C liegt. Oberhalb dieser Temperatur kommt es zur Umwandlung der verwendeten Phosphatidylcholine

von der Gel- in die flüssigkristalline-Phase. Es zeigte sich bereits bei der Verwendung von PL 80H (siehe auch Kapitel 4.3.3.1), dass bei Erreichen dieser Temperatur, bzw. ab einer Temperatur, die im Bereich der Phaseninversionstemperatur liegt, das PL 80H zur Filmbildung neigt und somit nicht mehr aus der Hochdruckkolonne entnommen werden konnte. Dieser Effekt war hier in abgeschwächter Form ebenfalls zu beobachten. Das in verschiedenen Konzentrationen eingesetzte Cholesterol sollte diesem Effekt zwar entgegenwirken, allerdings ist die Löslichkeit des Cholesterols im überkritischen Kohlendioxid ab einer höheren Einsatzkonzentration zu beachten. Auch dieser Effekt konnte schon in den Vorversuchen (Kapitel 4.3.3.1) gezeigt werden und wirkt einer Temperaturerhöhung entgegen. So lässt sich abschließend zusammenfassen, dass eine Herstellung bei Temperaturen wenig oberhalb der kritischen Temperatur des Kohlendioxids für PL 90H und PL 100H zu bevorzugen ist (Kunastitchai et al., 2005). Ebenso sollte die Einsatzkonzentration von Cholesterol so gering wie möglich gehalten, bzw. ganz darauf verzichtet werden.

4.3.3.3 Partikelgrößenverteilung und Morphologie

Die Messung der Partikelgrößenverteilung fand nach der Solvatisierung der proliposomalen Zubereitungen statt. Dazu wurden die Zubereitungen mit physiologischer Pufferlösung pH 7,2 (Ph. Eur. 5, 2005), zum einen bei einer Temperatur von 60°C (oberhalb der Phaseninversionstemperatur) und zum anderen bei 37°C (unterhalb der Phaseninversionstemperatur), im Wasserbad solvatisiert. Daran schloss sich für jede Probe eine Behandlung für 30 Sekunden im Ultraschallbad, um eventuellen Agglomerationen der solvatisierten Partikel entgegenzuwirken. Die eigentliche Vermessung fand im Systemmodul CUVETTE[®] im Laserdiffraktometer (Kapitel 3.2.1) bei einer optischen Konzentration von 15 % - 20 % statt, wobei die jeweilige Optik den Partikelgrößen angepasst wurde.

Durch die unterschiedlichen Temperaturen bei der Solvatisierung sollte zum einen die Partikelgröße nach einer optimalen Liposomenbildung oberhalb der Phaseninversionstemperatur der Phosphatidylcholine (60°C) und zum anderen bei Körpertemperatur (37°C) ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden, getrennt nach der jeweils verwendeten Temperatur, beschrieben. Dabei wurden die Ergebnisse mit dem 3³⁻¹-faktoriellen Versuchsplan (Tab. 4.14) statistisch ausgewertet.

4.3.3.3.1 Partikelgrößenverteilung nach der Solvatisierung bei 60°C

Die Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen für die Zubereitungen mit PL 90H als Hauptbestandteil sind in Tab. 4.15 dargestellt. Die Werte für die einzelnen Chargen zeigen gerade für den X₅₀-Wert der Partikelgrößenverteilung sehr große Streuungen, was sich auch in der Spannweite widerspiegelt.

Tab. 4.15: Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen mit der Laserdiffraktometrie für den 3³⁻¹-faktoriellen Versuchsplan der PL 90H Zubereitungen (SD in Klammern).

Chargennummer	X ₁₀ [µm]	X ₅₀ [µm]	X ₉₀ [µm]	Spannweite
Lip_44	5,10 (±0,15)	27,20 (±0,53)	53,66 (±1,34)	1,79
Lip_45	3,16 (±0,08)	24,95 (±0,71)	48,84 (±0,85)	1,83
Lip_46	2,46 (±0,03)	7,81 (±0,22)	23,34 (±1,20)	2,67
Lip_17	2,84 (±0,01)	7,28 (±0,27)	40,76 (±2,29)	5,21
Lip_18	3,39 (±0,13)	10,83 (±0,45)	51,04 (±7,58)	4,40
Lip_24	2,75 (±0,01)	7,48 (±0,05)	17,76 (±1,06)	2,01
Lip_47	2,20 (±0,01)	5,45 (±0,06)	16,11 (±0,59)	2,55
Lip_22	3,64 (±0,04)	12,98 (±0,31)	35,43 (±1,02)	2,45
Lip_20	3,59 (±0,05)	14,47 (±0,45)	39,53 (±1,48)	2,48

So wurden Werte zwischen 5,45 µm (Lip_47) und 27,20 µm (Lip_44) erhalten. Dies lässt darauf schließen, dass zum einen selbst durch die einheitliche Behandlung mit Ultraschall die Agglomeratbildung bei einigen Proben nicht unterdrückt werden konnte und zum anderen die Solvatisierung zu einheitlichen Liposomen noch nicht vollständig abgeschlossen war.

Betrachtet man die X_{50} -Werte der Partikelgrößenmessung für die Zubereitungen mit PL 100H (Tab. 4.16), so zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den PL 90H Zubereitungen in Tab. 4.15. Auch hier ist eine Streuung der Werte von 5,54 µm (Lip_40) bis 20,72 µm (Lip_36) zu erkennen, die allerdings etwas geringer ausfällt als bei den Ergebnissen mit PL 90H in den Zubereitungen.

Tab. 4.16: Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen mit der Laserdiffraktometrie für den 3^{3-1} -faktoriellen Versuchsplan der PL 100H Zubereitungen (SD in Klammern).

Chargennummer	X_{10} [µm]	X_{50} [µm]	X_{90} [µm]	Spannweite
Lip_40	2,49 (±0,01)	5,54 (±0,13)	22,13 (±2,21)	3,55
Lip_41	2,96 (±0,01)	9,07 (±0,21)	37,90 (±0,76)	3,85
Lip_42	2,73 (±0,02)	7,04 (±0,19)	16,77 (±0,72)	1,99
Lip_28	2,69 (±0,01)	5,87 (±0,08)	26,34 (±1,29)	4,03
Lip_30	3,34 (±0,10)	9,24 (±0,20)	28,66 (±0,87)	2,74
Lip_36	4,39 (±0,08)	20,72 (±1,01)	67,06 (±3,09)	3,02
Lip_43	2,67 (±0,01)	6,86 (±0,08)	26,24 (±1,01)	3,44
Lip_34	3,14 (±0,03)	11,90 (±0,22)	28,93 (±0,50)	2,17
Lip_32	3,19 (±0,04)	11,62 (±0,35)	32,51 (±1,06)	2,52

Bei der statistischen Auswertung zeigte sich, dass keiner der verschiedenen Faktoren (Druck, Temperatur, Zusammensetzung der Rezeptur im ASES-Prozess) einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Partikelgrößen für die

Zubereitungen mit PL 90H und PL 100H ausübt ($p=0,05$, Pareto diagramme hier nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden auch in diesem Fall für die Begutachtung der Tendenzen die einzelnen Werte mittels der Scatterplots ausgewertet.

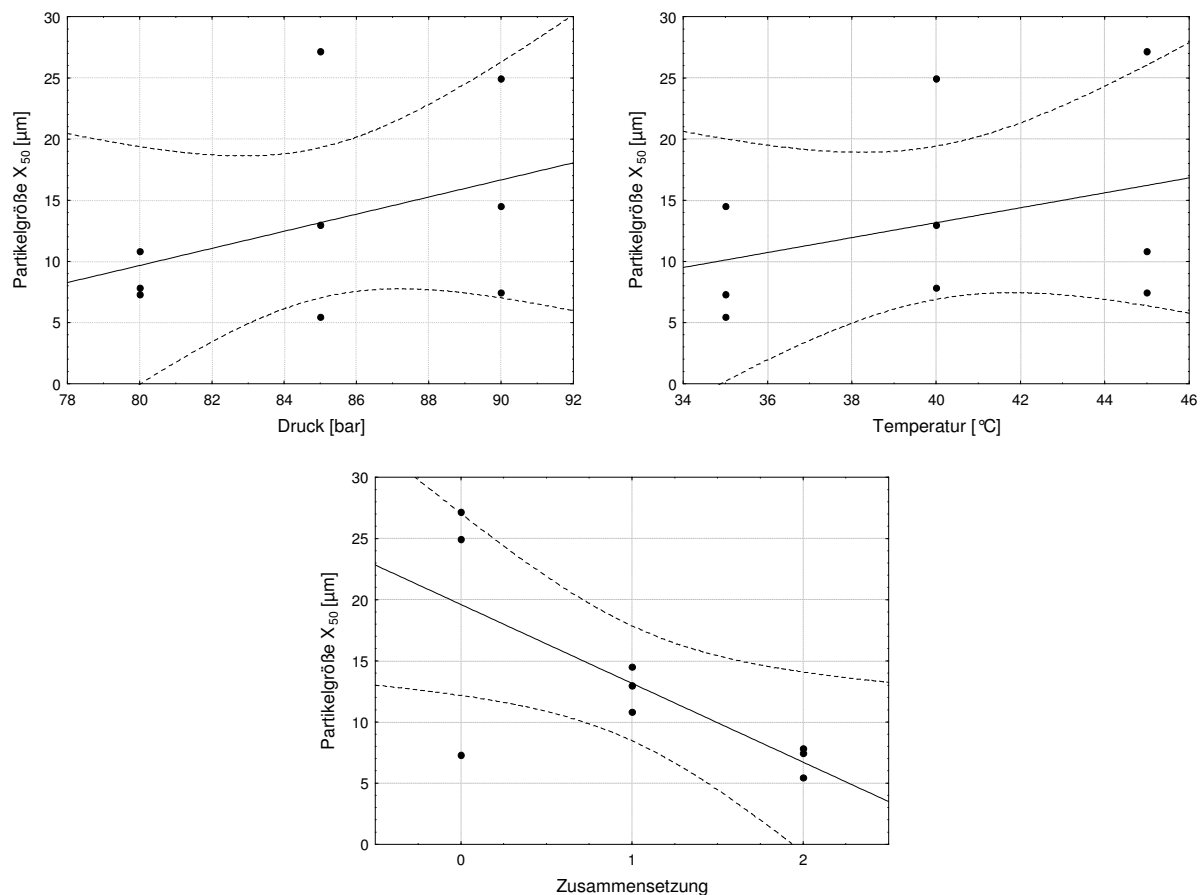


Abb. 4.30: Scatterplots der X_{50} -Werte der Partikelgrößenverteilung der PL 90H Zubereitungen gegen den Druck [bar] (links oben), die Temperatur [°C] (rechts oben) und die Zusammensetzung [0 = 10:0; 1 = 9:1; 2 = 8:2] (mitte unten). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Die Abb. 4.30 zeigt die Ergebnisse der X_{50} -Werte der Partikelgrößenverteilung für die PL 90H Proben. Dabei ist die große Streuung der Einzelwerte sehr gut erkennbar, die die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Die deutlichste Tendenz zeigt sich bei der Betrachtung des Faktors Zusammensetzung. Durch

eine Erhöhung des Cholesterol-Anteils in den Rezepturen wurden kleinere X_{50} -Werte erhalten. Bei den Parametern Druck und Temperatur zur Herstellung der proliposomalen Zubereitungen im ASES-Prozess zeigte sich, dass jeweils durch niedrigere Einstellungen kleinere X_{50} -Werte erhalten werden konnten. Allerdings wird hier davon ausgegangen, dass gerade diese Parameter zu vernachlässigen sind, da sie bei der Solvatisierung keinen direkten Einfluss auf die Liposomenbildung und damit auf die Partikelgröße ausüben. Dies zeigt sich sehr deutlich in Kapitel 4.3.3.3.2.

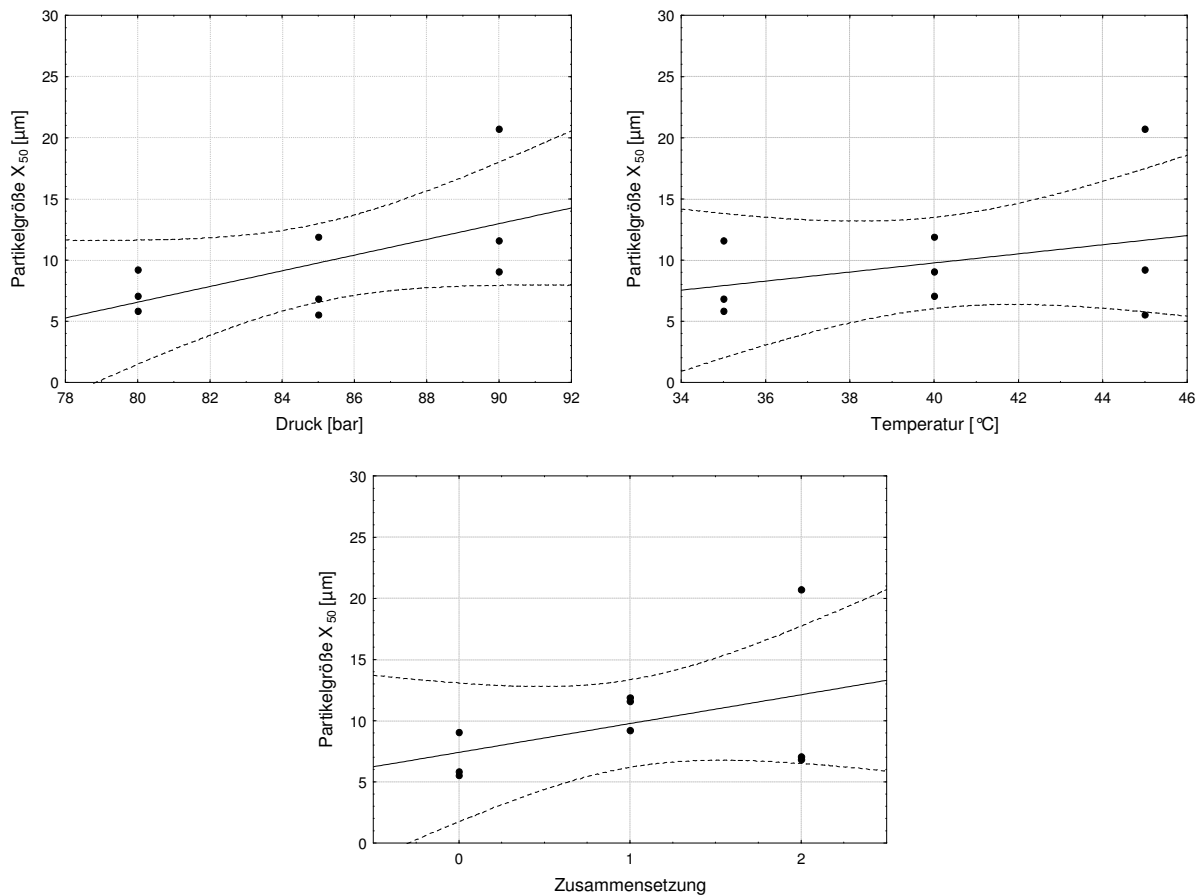


Abb. 4.31: Scatterplots der X_{50} -Werte der Partikelgrößenverteilung der PL 100H Zubereitungen gegen den Druck [bar] (links oben), die Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] (rechts oben) und die Zusammensetzung [0 = 10:0; 1 = 9:1; 2 = 8:2] (mitte unten). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Die Auswertung der Einflüsse der einzelnen Faktoren für die X_{50} -Werte der PL 100H Proben sind in Abb. 4.31 dargestellt. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass die Streuung der Einzelwerte bei diesen Proben nicht geringer ausfällt als noch bei den PL 90H Proben. Auch wird deutlich, dass insgesamt kleinere Partikelgrößen für den X_{50} -Wert resultierten. Betrachtet man den Einfluss der Zusammensetzung der proliposomalen Zubereitungen, so zeigte sich, dass bei der Verwendung von PL 100H kleinere Partikelgrößen bei einer Erniedrigung des Cholesterol-Anteils erhalten wurden.

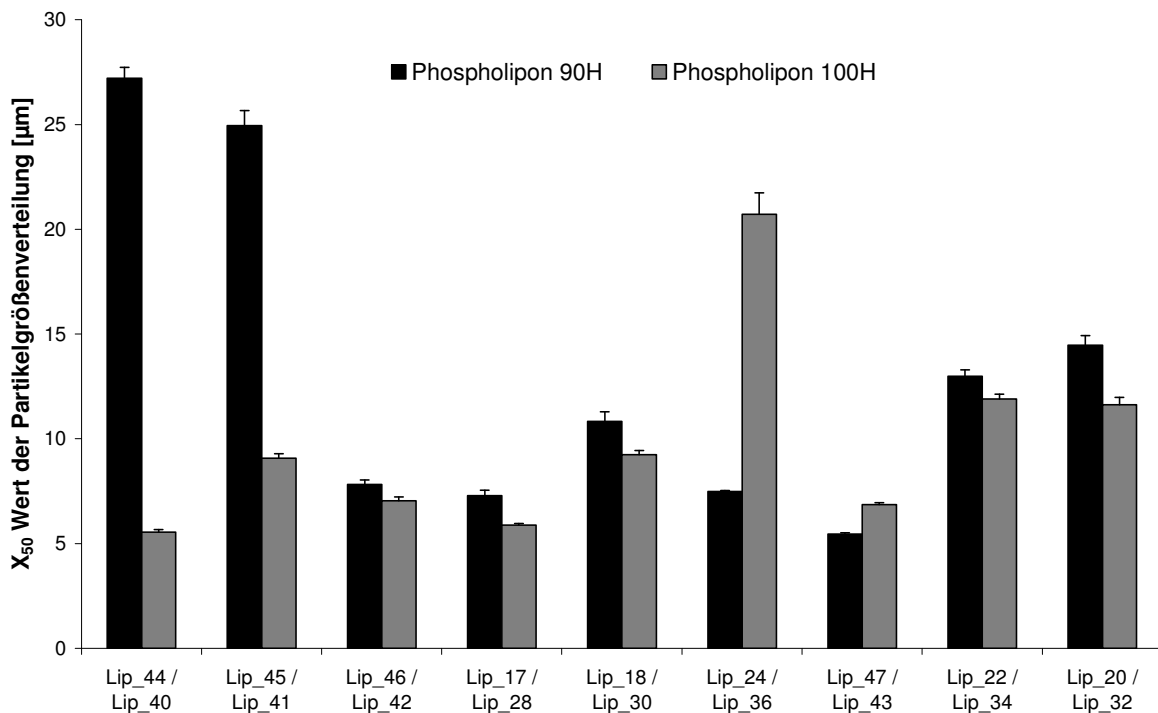


Abb. 4.32: Vergleich der X_{50} -Werte [µm] der PL 90H und PL 100H Zubereitungen.

Allgemein konnten mit der Solvatisierung bei 60°C akzeptable Werte für den X_{50} -Wert der Partikelgrößenverteilung erreicht werden, bedenkt man, dass die Proben noch keinem weiteren Zerkleinerungsschritt, wie z.B. der Extrusion, ausgesetzt wurden. Es lässt sich allerdings auch erkennen (Abb. 4.32), dass einige proliposomale Zubereitungen durch ihren hohen X_{50} -Wert nach der Solvatisierung weniger geeignet für eine Weiterverarbeitung scheinen.

Weiterhin zeigte sich, dass bei den Zubereitungen auf Basis des PL 100H bessere Ergebnisse in Hinblick auf die Partikelgröße erzielt werden konnten. Es entstanden in diesem Fall Liposomen, die eine geringere Streuung der Partikelgrößen aufwiesen, womit die Verarbeitung des PL 100H für die Herstellung von proliposomalen Zubereitungen im ASES-Prozess besser geeignet scheint.

4.3.3.3.2 Partikelgrößenverteilung nach der Solvatisierung bei 37°C

Die Ergebnisse der Partikelgrößenmessung der Zubereitungen mit PL 90H als Hauptbestandteil nach der Solvatisierung bei Körpertemperatur (37°C) sind in Tab. 4.17 dargestellt. Dabei wiesen die ermittelten X_{50} -Werte zum einen eine ähnlich starke Streuung wie nach der Solvatisierung bei 60°C auf, zum anderen resultierten im Durchschnitt größere X_{50} -Werte (Abb. 4.33).

Tab. 4.17: Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen mit der Laserdiffraktometrie für den 3^{3-1} -faktoriellen Versuchsplan der PL 90H Zubereitungen (SD in Klammern).

Chargennummer	X_{10} [μm]	X_{50} [μm]	X_{90} [μm]	Spannweite
Lip_44	4,51 ($\pm 0,17$)	26,31 ($\pm 0,84$)	50,23 ($\pm 1,12$)	1,74
Lip_45	2,87 ($\pm 0,05$)	23,78 ($\pm 0,96$)	49,14 ($\pm 0,97$)	1,95
Lip_46	2,30 ($\pm 0,02$)	6,65 ($\pm 0,10$)	22,61 ($\pm 1,01$)	3,05
Lip_17	3,30 ($\pm 0,09$)	21,75 ($\pm 1,03$)	48,18 ($\pm 1,49$)	2,06
Lip_18	3,04 ($\pm 0,06$)	16,51 ($\pm 1,44$)	52,12 ($\pm 3,08$)	2,97
Lip_24	2,85 ($\pm 0,02$)	10,54 ($\pm 0,21$)	37,30 ($\pm 3,12$)	3,27
Lip_47	2,24 ($\pm 0,02$)	7,81 ($\pm 0,27$)	30,02 ($\pm 2,71$)	3,56
Lip_22	6,32 ($\pm 0,24$)	31,70 ($\pm 0,49$)	51,90 ($\pm 0,93$)	1,44
Lip_20	2,90 ($\pm 0,02$)	15,37 ($\pm 0,55$)	39,00 ($\pm 1,33$)	2,35

Der Vergleich mit den bei 60°C solvatisierten PL 90H Proben in Abb. 4.33 zeigt sehr deutlich, dass die Solvatisierungstemperatur einen großen Einfluss auf die Partikelgröße ausübt. Die Einflussgrößen Druck und Temperatur zur Herstellung der proliposomalen Zubereitungen im ASES-Prozess sind damit zu vernachlässigen, denn wie bereits in Kapitel 4.3.3.3.1 beschrieben, üben diese Parameter keinen direkten Einfluss mehr auf die Liposomenbildung aus.

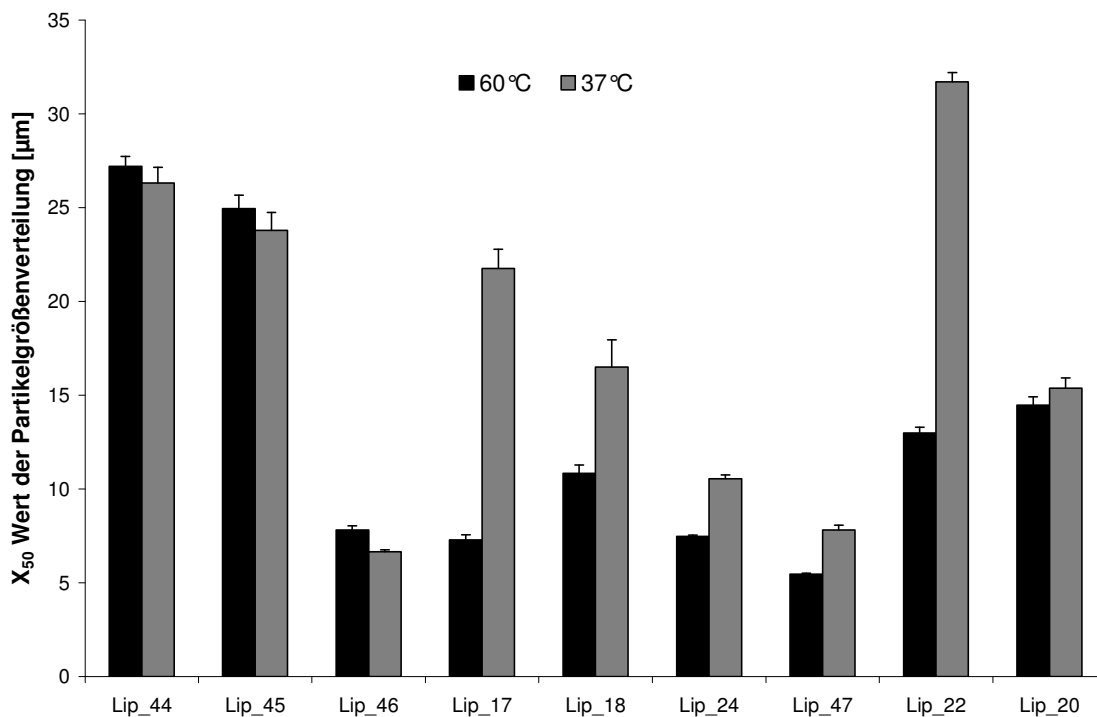


Abb. 4.33: Vergleich der X_{50} -Werte [µm] der PL 90H Zubereitungen nach der Solvatisierung bei 60°C und 37°C.

In Abb. 4.34 wird dieser Zusammenhang nochmals deutlich gemacht. Auffällig dabei ist, dass durch die Zusammensetzung der proliposomalen Zubereitungen der X_{50} -Wert der Partikelgrößenverteilung beeinflusst werden konnte. In diesem Fall resultierten durch den zunehmenden Cholesterol-Anteil in den Zubereitungen kleinere X_{50} -Werte, wobei dieser Effekt auch schon im Fall der Solvatisierung bei 60°C für die Zubereitungen mit PL 90H (Abb. 4.30) beobachtet werden konnte. Dieser Effekt scheint dadurch zu Stande zu kommen,

dass das Cholesterol zu einer verstärkten Stabilisierung der Lipid-doppelschichten bei höherer Einsatzkonzentration führt. Durch diese verstärkte Stabilisierung kommt es schließlich zur Bildung von kleineren Liposomen im Gegensatz zu den Zubereitungen mit verringertem Cholesterol-Anteil, wodurch die kleinsten Partikelgrößen für den X_{50} -Wert bei der Zusammensetzung 8:2 resultierten.

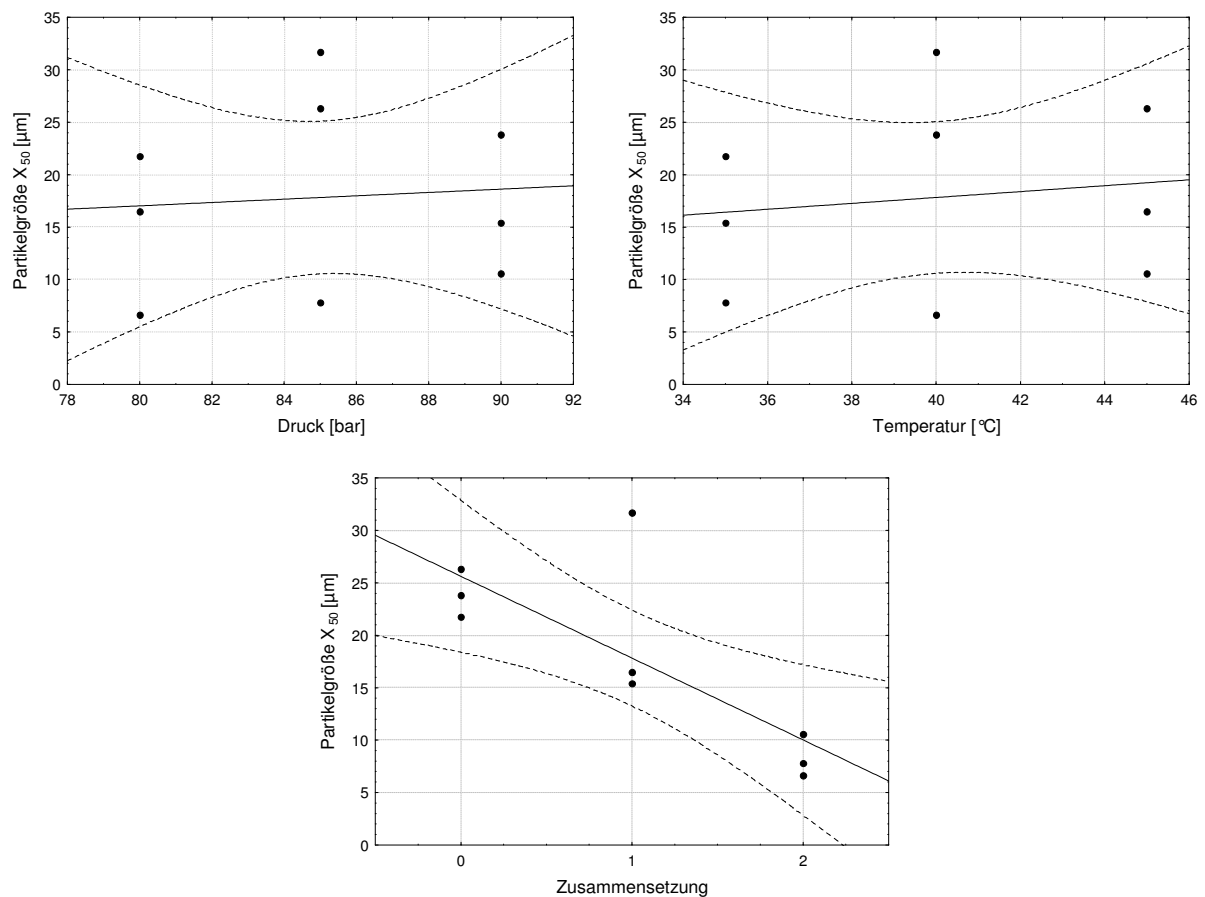


Abb. 4.34: Scatterplots der X_{50} -Werte der Partikelgrößenverteilung der PL 90H Zubereitungen gegen den Druck [bar] (links oben), die Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] (rechts oben) und die Zusammensetzung [0 = 10:0; 1 = 9:1; 2 = 8:2] (mitte unten). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Tab. 4.18: Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen mit der Laserdiffraktometrie für den 3^{3-1} -faktoriellen Versuchsplan der PL 100H Zubereitungen (SD in Klammern).

Chargennummer	X ₁₀ [μm]	X ₅₀ [μm]	X ₉₀ [μm]	Spannweite
Lip_40	3,88 (±0,07)	21,21 (±0,48)	45,41 (±1,02)	1,96
Lip_41	3,45 (±0,06)	20,87 (±0,32)	44,54 (±1,16)	1,97
Lip_42	2,52 (±0,01)	7,47 (±0,03)	23,59 (±0,27)	2,82
Lip_28	3,74 (±0,10)	22,60 (±0,89)	50,14 (±1,59)	2,05
Lip_30	3,40 (±0,03)	27,51 (±0,52)	61,88 (±1,46)	2,13
Lip_36	3,51 (±0,07)	13,79 (±0,45)	41,65 (±2,63)	2,77
Lip_43	2,36 (±0,01)	6,49 (±0,05)	21,02 (±0,36)	2,88
Lip_34	6,06 (±0,26)	30,96 (±0,60)	50,99 (±1,07)	1,45
Lip_32	3,65 (±0,05)	23,10 (±0,39)	43,42 (±0,67)	1,72

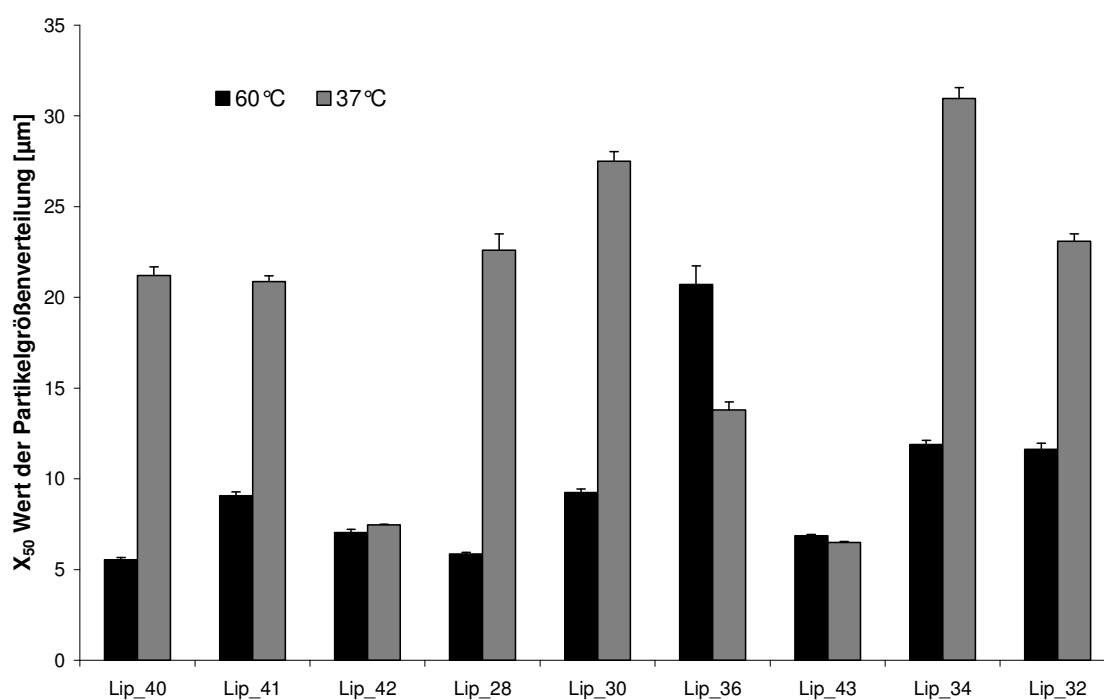


Abb. 4.35: Vergleich der X₅₀-Werte [μm] der PL 100H Zubereitungen nach der Solvatisierung bei 60°C und 37°C.

Die Ergebnisse der Partikelgrößenmessung nach der Solvatisierung bei 37°C für die Zubereitungen auf Basis des PL 100H sind in Tab. 4.18 dargestellt. Auch in diesem Fall wird eine Zunahme der X_{50} -Werte deutlich, wobei die Streuung der Einzelwerte ähnlich denen der Zubereitungen mit PL 90H ist. Der Vergleich zu den bei 60°C solvatisierten Proben ist in Abb. 4.35 dargestellt und zeigt, dass auch hier die Zusammensetzung der einzelnen Proben einen großen Einfluss auf den X_{50} -Wert der Partikelgrößenverteilung ausübte. Gerade die Proben Lip_42, _36 und _43 mit dem höchsten Cholesterol-Anteil zeigten X_{50} -Werte die nahezu identisch, bzw. kleiner waren, als die nach der Solvatisierung bei 60°C.

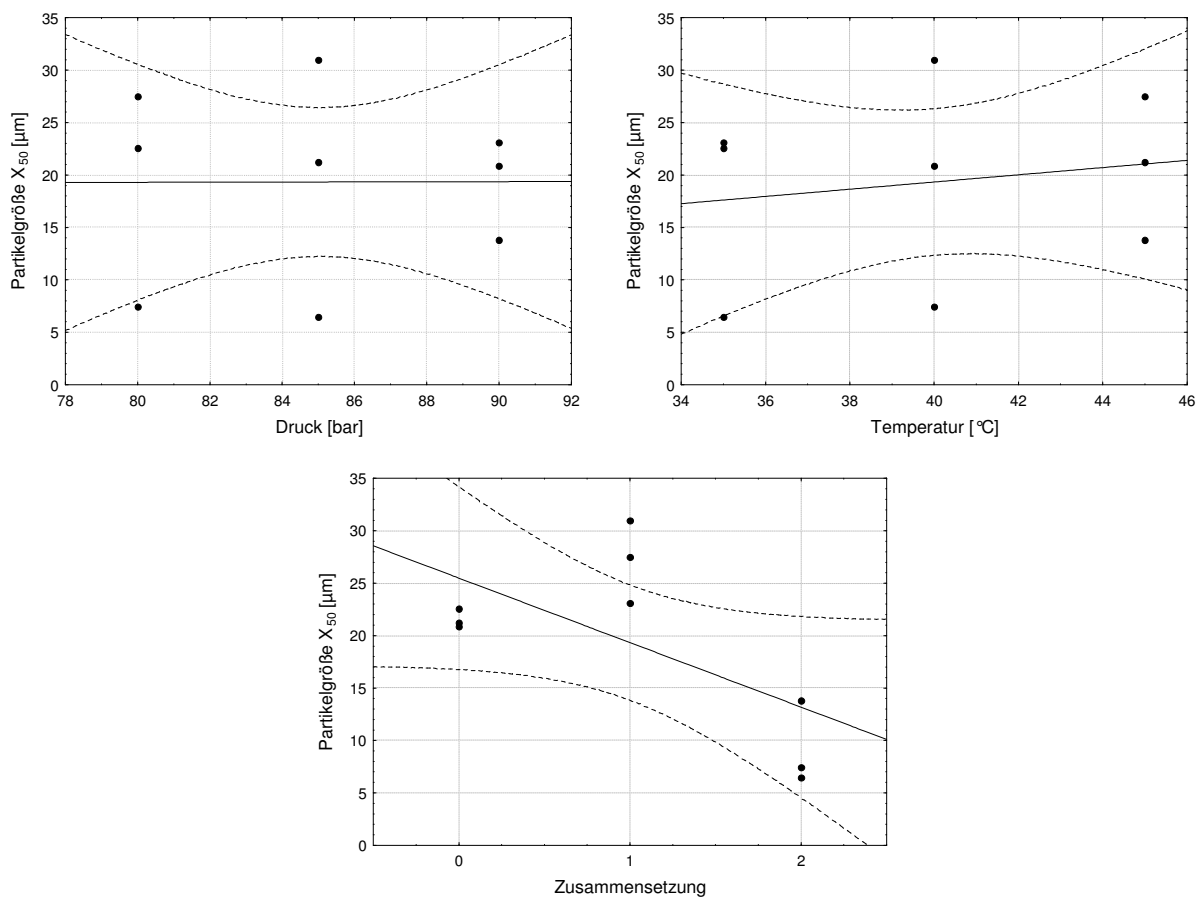


Abb. 4.36: Scatterplots der X_{50} -Werte der Partikelgrößenmessung der PL 100H Zubereitungen gegen den Druck [bar] (links oben), die Temperatur [°C] (rechts oben) und die Zusammensetzung [0 = 10:0; 1 = 9:1; 2 = 8:2] (mitte unten). Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Bei der statistischen Auswertung (Abb. 4.36) zeigt sich der gleiche Effekt wie schon in Abb. 4.34 beschrieben. Die Parameter Druck und Temperatur für die Herstellung der proliposomalen Zubereitungen im ASES-Prozess üben keinen direkten Effekt auf die Partikelgröße aus, wohingegen durch die Erhöhung des Cholesterol-Anteils in den Rezepturen kleinere X_{50} -Werte bei der Partikelgrößenverteilung erreicht werden konnten.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der X_{50} -Werte der Partikelgrößenverteilung nach einer Solvatisierung bei 37°C für die Zubereitungen mit PL 90H und PL 100H ist in Abb. 4.37 dargestellt. Die Unterschiede der X_{50} -Werte sind in diesem Fall nicht so deutlich ausgeprägt, wie sie noch bei der Solvatisierung bei 60°C zu erkennen waren (Abb. 4.32). Ein eindeutiger Trend, dass mit einem der zwei verwendeten Phosphatidylcholone kleinere Partikelgrößen erreicht werden konnten, ist hier nicht zu erkennen.

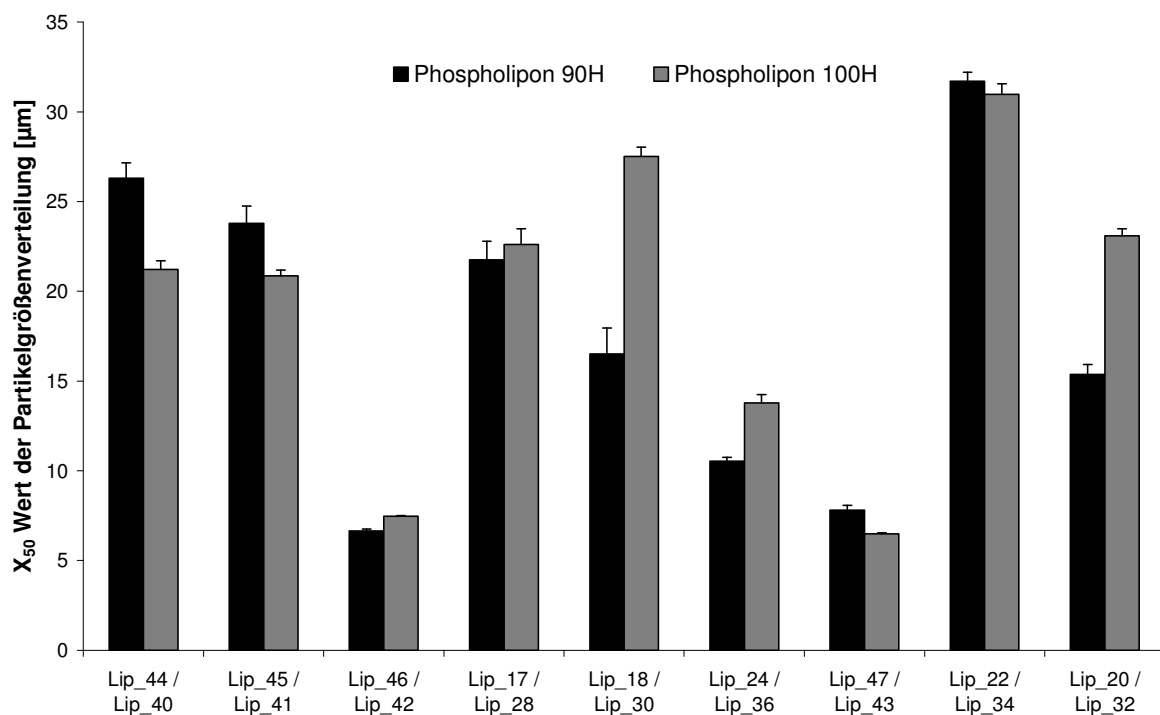
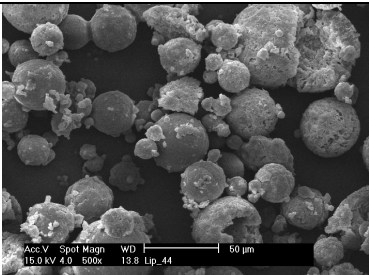
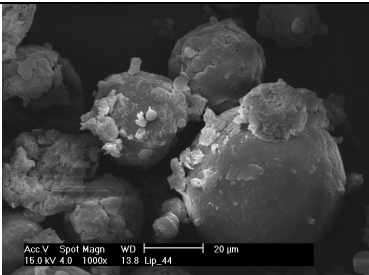
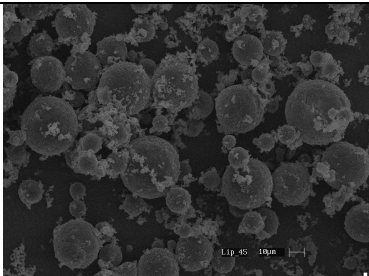
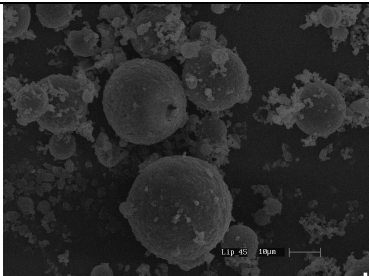
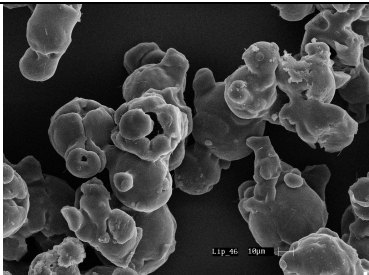
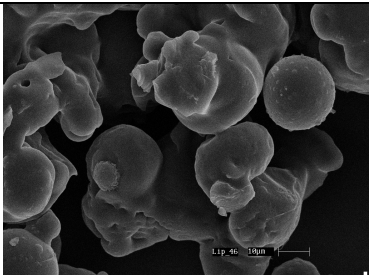
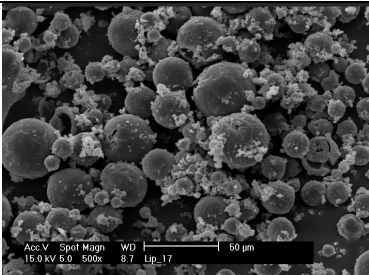
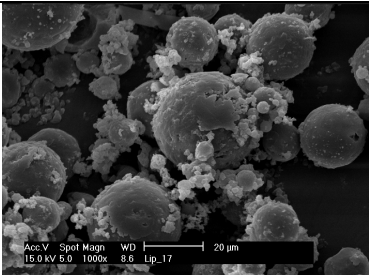


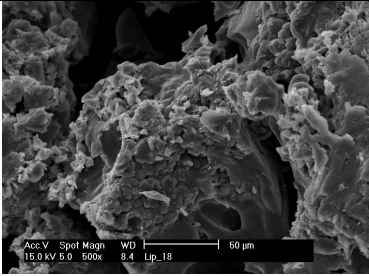
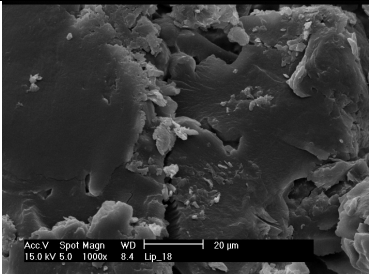
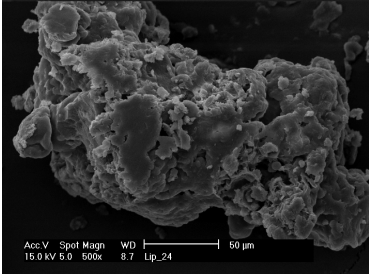
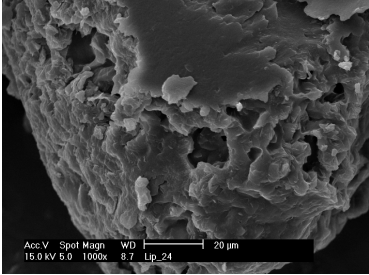
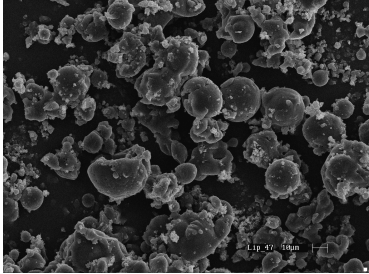
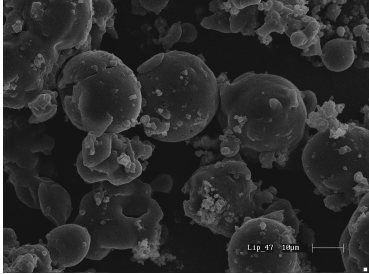
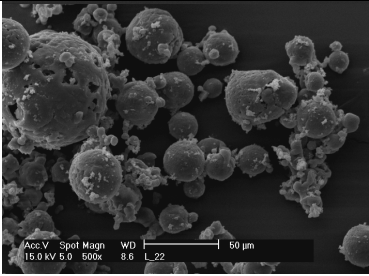
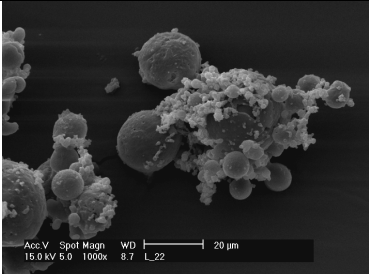
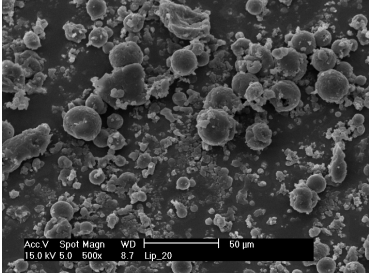
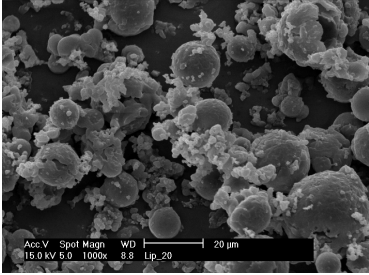
Abb. 4.37: Vergleich der X_{50} -Werte [µm] der PL 90H und PL 100H Zubereitungen.

4.3.3.3 Partikelmorphologie

In Tab. 4.19 und Tab. 4.20 sind die REM-Aufnahmen der proliposomalen Zubereitungen für das PL 90H und PL 100H dargestellt. Bei der Verwendung von PL 90H als Hauptbestandteil (Tab. 4.19) wird deutlich, dass im ASES-Prozess bei einer Prozesstemperatur bis zu 40°C Partikel von ähnlicher Gestalt erhalten wurden.

Tab. 4.19: REM-Aufnahmen der PL 90H Zubereitungen bei 500-facher und 1000-facher Vergrößerung.

Chargennr. [Parameter]	500-fache Vergrößerung	1000-fache Vergrößerung
Lip_44 [85 bar, 45°C, 10:0]		
Lip_45 [90 bar, 40°C, 10:0]		
Lip_46 [80 bar, 40°C, 8:2]		
Lip_17 [80 bar, 35°C, 10:0]		

Chargennr. [Parameter]	500-fache Vergrößerung	1000-fache Vergrößerung
Lip_18 [80 bar, 45°C, 9:1]		
Lip_24 [90 bar, 45°C, 8:2]		
Lip_47 [85 bar, 35°C, 8:2]		
Lip_22 [85 bar, 40°C, 9:1]		
Lip_20 [90 bar, 35°C, 9:1]		

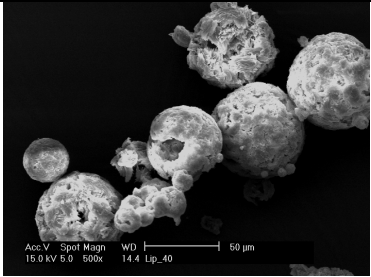
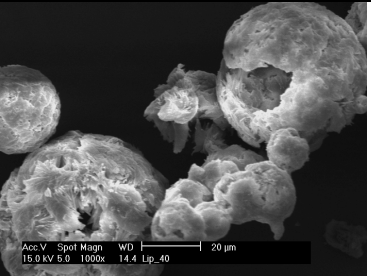
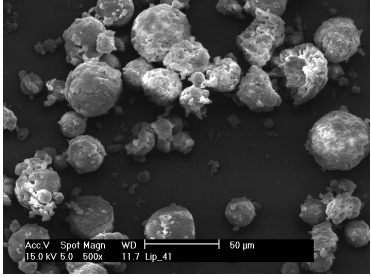
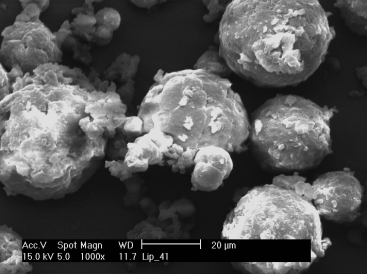
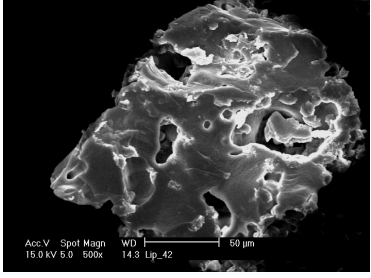
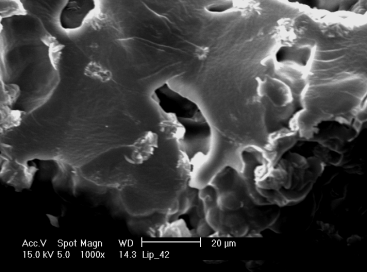
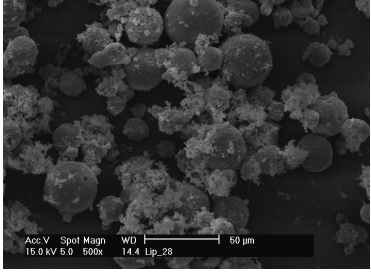
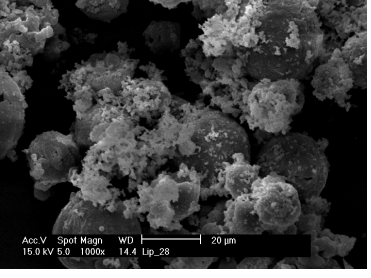
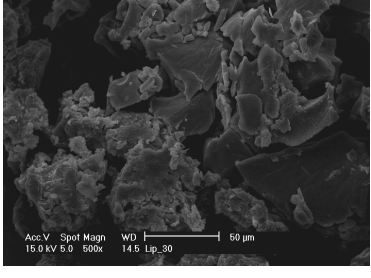
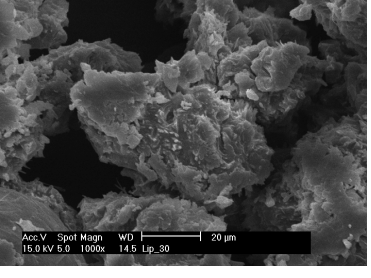
Diese zeigen eine kugelige Form mit mehr oder weniger ausgeprägten glatten Oberflächen. Teilweise erscheinen die Oberflächen löchrig, was darauf schließen lässt, dass diese Partikel eine gewisse Porosität besitzen. Eine


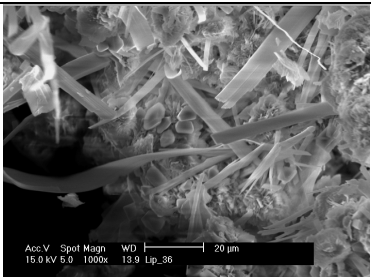
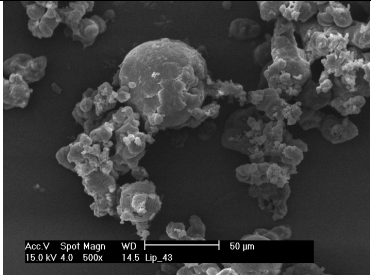
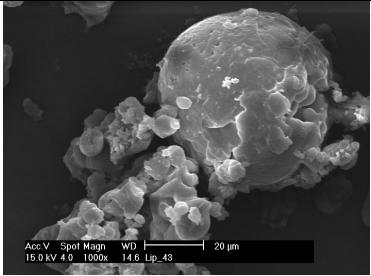
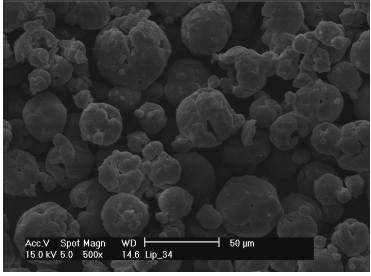
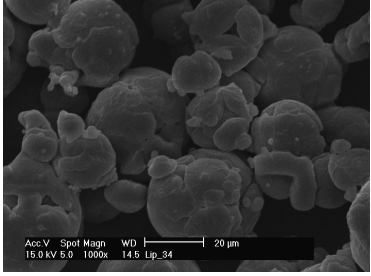
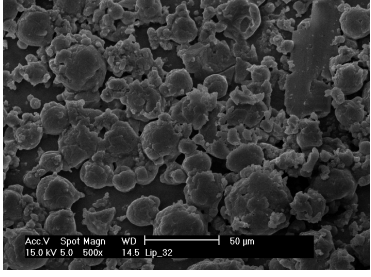
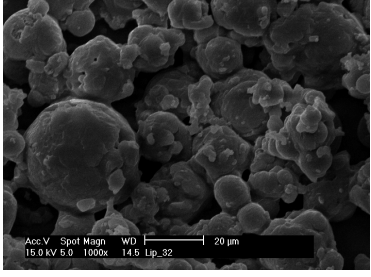
Ausnahme für die Begrenzung dieses Aussehens auf den Einfluss der Prozesstemperatur stellt die Probe Lip_44 dar, die bei 45°C hergestellt wurde und ebenfalls die oben beschriebene Morphologie aufweist. Bei Lip_18 und _24 (Herstellung bei 45°C) allerdings ist die kugelige Form der Partikel nicht mehr zu erkennen. Diese Partikel können eher als größere Bruchstücke beschrieben werden, die einen schuppenartigen Aufbau besitzen. Auffällig gegenüber Lip_44, die nicht diese Morphologie zeigt, ist, dass bei Lip_18 und _24 Cholesterol in den Zusammensetzungen enthalten ist. Die Kombination aus hoher Temperatur und Cholesterol in der Zusammensetzung der proliposomalen Zubereitung führt somit zu einem deutlichen Unterschied der Morphologie im Gegensatz zu den restlichen Partikeln. In diesem Fall scheinen die Aufnahmen eine beginnende Filmbildung zu zeigen, was ebenfalls durch die geringe Ausbeute dieser Proben bestätigt wird, wie schon in Kapitel 4.3.3.2 diskutiert.

Die REM-Aufnahmen der proliposomalen Zubereitungen mit PL 100H (Tab. 4.20) zeigen ein ähnliches Bild. Auch hier wurden Partikel beobachtet, die von kugelige Gestalt mit einer rissigen, löchrigen, aber ansonsten glatten Oberfläche sind. Ebenfalls zeigen die Proben Lip_30 und _36 (Herstellungstemperatur: 45°C, Zusammensetzung: 9:1, 8:2) die oben beschriebenen Bruchstücke. Zusätzlich dazu sind bei Lip_36 stäbchenförmige Kristalle zu erkennen, was auf ein übermäßiges Kristallwachstum während der Herstellung schließen lässt. Die Probe Lip_40 dagegen (Herstellungstemperatur: 45°C, Zusammensetzung: 10:0), in der kein Cholesterol enthalten ist, zeigt die typisch kugelige Gestalt der Partikel. Eine Ausnahme in der Partikelmorphologie bildet hier das Lip_42 (Herstellungstemperatur: 40°C, Zusammensetzung: 8:2), bei der schon bei 40°C eine Art verklebte Plättchenstruktur zu erkennen ist. Diese Strukturen deuten auch hier, wie schon bei den proliposomalen Zubereitungen mit PL 90H beschrieben, auf eine beginnende Filmbildung hin, die durch die Kombination der erhöhten Prozesstemperatur und des höheren Cholesterol-Anteils in der Rezeptur scheinbar gefördert wird. Diese Parameter führen somit

sowohl bei der Verwendung von PL 90H, als auch PL 100H zu einer negativen Beeinflussung des Herstellungsprozesses.

Tab. 4.20: REM-Aufnahmen der PL 100H Zubereitungen bei 500-facher und 1000-facher Vergrößerung.

Chargennr.	500-fache Vergrößerung	1000-fache Vergrößerung
Lip_40 [85 bar, 45°C, 10:0]		
Lip_41 [90 bar, 40°C, 10:0]		
Lip_42 [80 bar, 40°C, 8:2]		
Lip_28 [80 bar, 35°C, 10:0]		
Lip_30 [80 bar, 45°C, 9:1]		

Chargennr.	500-fache Vergrößerung	1000-fache Vergrößerung
Lip_36 [90 bar, 45°C, 8:2]		
Lip_43 [85 bar, 35°C, 8:2]		
Lip_34 [85 bar, 40°C, 9:1]		
Lip_32 [90 bar, 35°C, 9:1]		

Zusätzlich zu den REM-Aufnahmen der proliposomalen Zubereitungen, also der Pulverproben, wurden Lichtmikroskop-Aufnahmen der solvatisierten Zubereitungen aufgenommen. In Abb. 4.38 sind Aufnahmen von Lip_32 (PL 100H) und Lip_20 (PL 90H) gezeigt, wobei diese Proben jeweils bei 60°C im Puffermedium solvatisiert wurden. Auf den Bildern sind die entstandenen Liposomen (Pfeile), anhand ihrer Membran gut zu erkennen. Noch deutlicher wird das Bild durch den Einsatz von polarisiertem Licht, wodurch die

Membranen im Gegensatz zum übrigen Bild heller erscheinen und die für Liposomen typische Kleeblattstruktur beobachtet werden konnte.

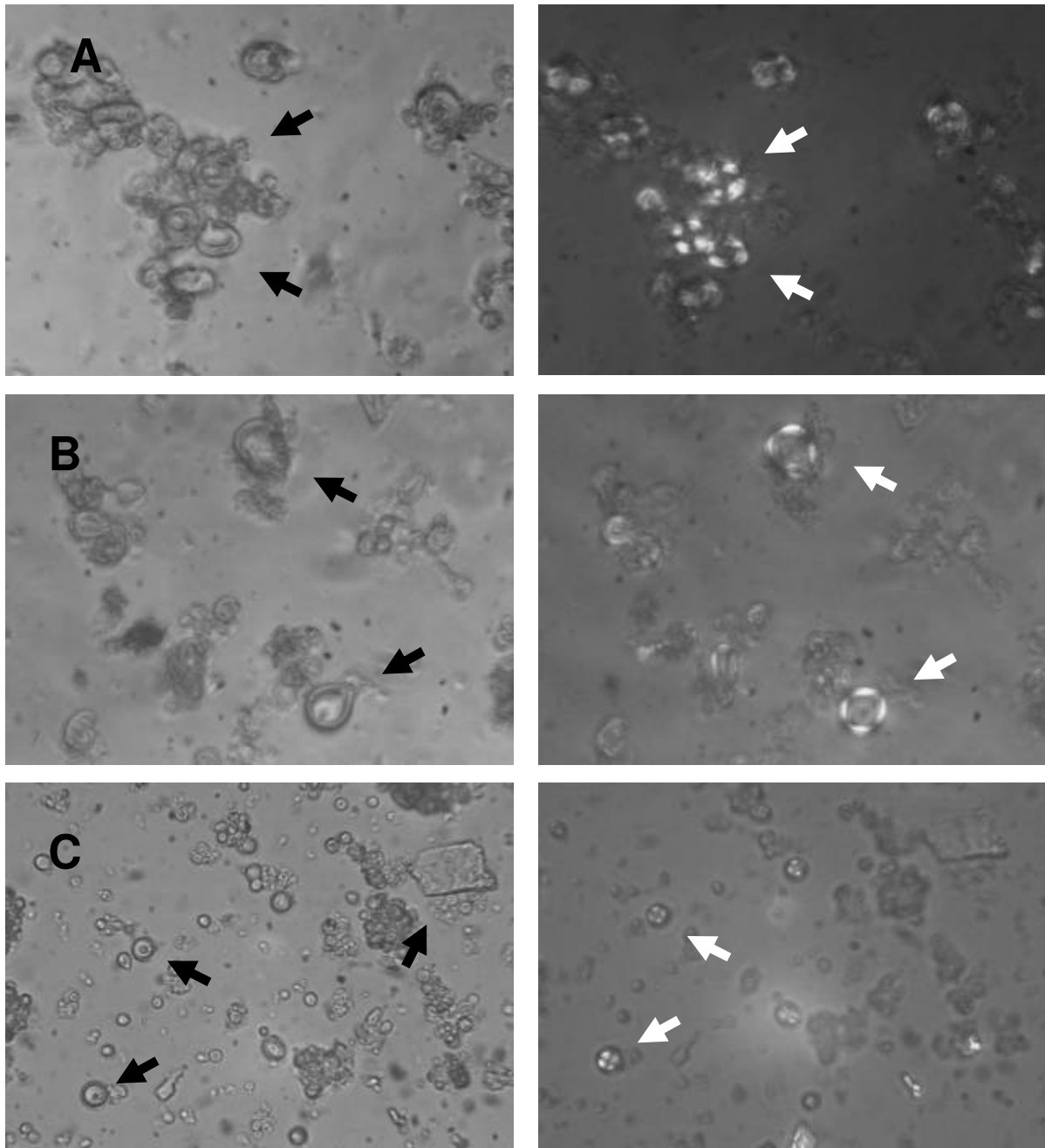


Abb. 4.38: Lichtmikroskopische Aufnahmen bei 790-facher Vergrößerung solvatisierter proliposomaler Zubereitungen: (A) und (B) Lip_32; (C) Lip_20 (links: normale Ansicht; rechts: Ansicht im polarisierten Licht).

Im Bild C (Lip_20) ist zusätzlich zu den entstandenen Liposomen ein größeres Bruchstück erkennbar, wobei es sich hier um einen noch nicht vollständig

solvatisierten Bestandteil der Rezeptur handeln wird. Auf die Darstellung weiterer Aufnahmen wurde in diesem Fall verzichtet, da sich die einzelnen solvatisierten Proben kaum voneinander unterschieden.

Im Allgemeinen wird durch diese Aufnahmen deutlich, dass durch die Solvatisierung im Puffermedium aus den proliposomalen Zubereitungen Liposomen entstehen können und diese somit eine Alternative zu z.B. gefriergetrockneten Liposomensuspensionen darstellen.

4.3.3.4 Röntgenuntersuchungen

Die Röntgenuntersuchungen der proliposomalen Zubereitungen wurden, wie bereits in Kapitel 3.2.3 beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich zur Bestimmung der einzelnen proliposomalen Zubereitungen wurden mit dem PL 90H und dem PL 100H physikalische Mischungen mit einer Zusammensetzung von 8:2 hergestellt und mit den übrigen Röntgendiffraktogrammen verglichen.

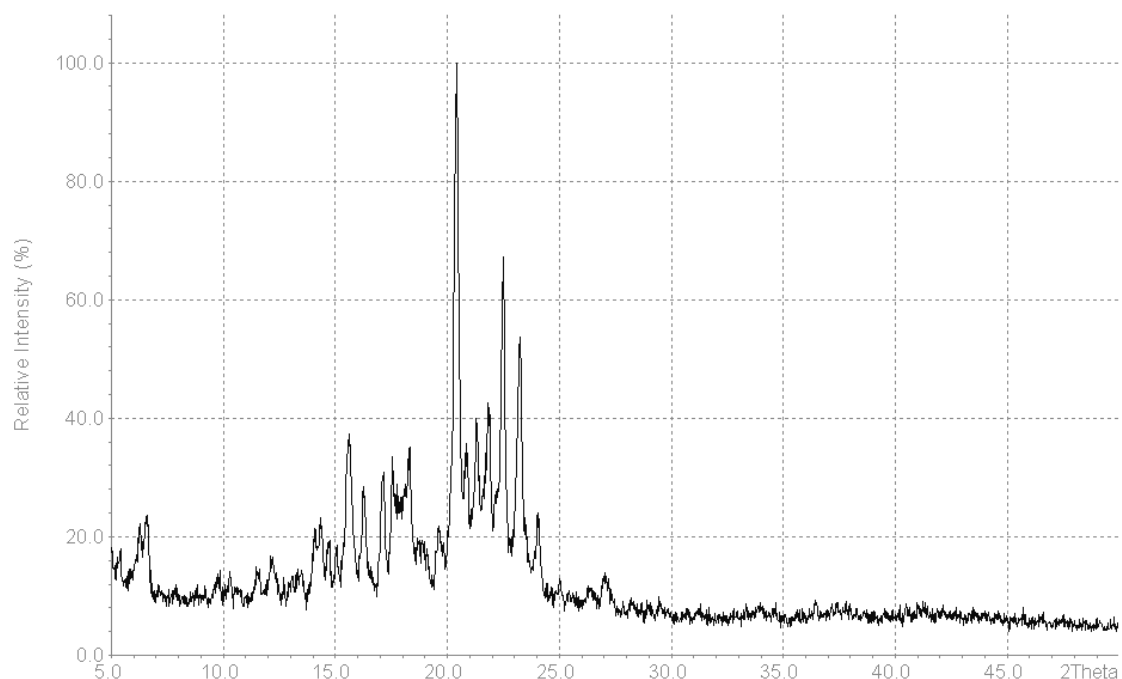


Abb. 4.39: Röntgendiffraktogramm einer physikalischen Mischung mit PL 90H, Cholesterol und Budesonid (Zusammensetzung 8:2).

In Abb. 4.40 sind die einzelnen Röntgendiffraktogramme der PL 90H Zubereitungen dargestellt. Im Vergleich zur physikalischen Mischung der einzelnen Bestandteile (Abb. 4.39) zeigt sich bei allen Diffraktogrammen ein Verlust von Kristallinität. Einzig die Proben Lip_44, _18 und _24 (alle bei 45°C hergestellt) zeigen vereinzelte Peaks in einem Bereich von 20° - 25° 2Theta, wobei diese Peaks dem PL 90H zugeordnet werden konnten. Der Bereich von 15° - 18° 2Theta, der das Budesonid repräsentiert, konnte dabei in keinem der Diffraktogramme in Abb. 4.40 wieder gefunden werden.

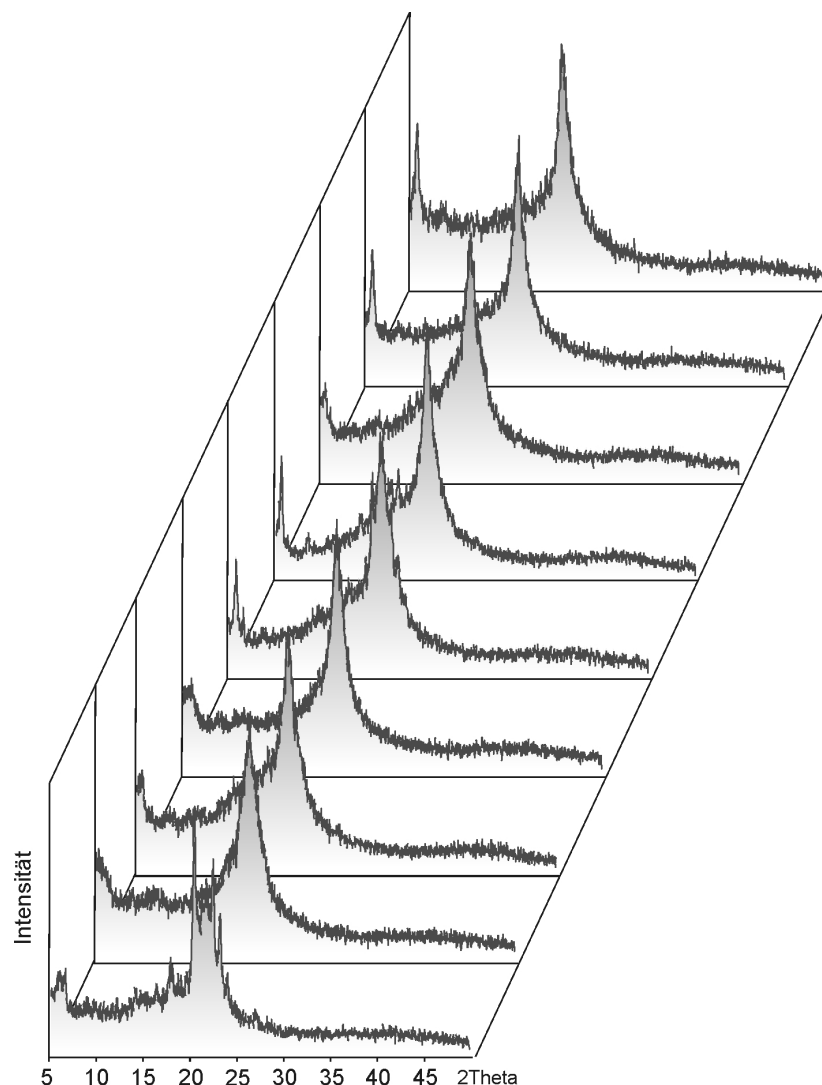


Abb. 4.40: Röntgendiffraktogramme der einzelnen PL 90H Zubereitungen; von unten aufsteigend: Lip_44, _45, _46, _17, _18, _24, _47, _22, _20.



Abb. 4.41: Röntgendiffraktogramm einer physikalischen Mischung mit PL 100H, Cholesterol und Budesonid (Zusammensetzung 8:2).

Für die Zubereitungen mit PL 100H wurden die in Abb. 4.42 dargestellten Röntgendiffraktogramme erhalten. Auffällig in dieser Abbildung sind die Diffraktogramme der Proben Lip_40 (85 bar/45°C), _41 (90 bar/40°C) und _36 (90 bar/45°C), wobei in diesen Fällen ebenfalls eine deutlich höhere Kristallinität als bei den übrigen Proben zu erkennen ist. Es zeigt sich, dass diese Diffraktogramme eine Ähnlichkeit zu dem der physikalischen Mischung (Abb. 4.41) aufweisen. Dabei konnten jeweils die Peaks zwischen 20° und 25° 2Theta, die in den Diffraktogrammen der proliposomalen Zubereitungen sehr auffällig erscheinen, dem PL 100H zugeordnet werden. Der Bereich von ca. 15° bis 18° 2Theta, der bei der physikalischen Mischung ebenfalls sehr ausgeprägt ist und das Budesonid repräsentiert, findet sich allerdings nicht bei den Diffraktogrammen der proliposomalen Zubereitungen wieder. Auch in diesen Rezepturen sind somit keine diskreten Budesonid-Peaks mehr zu erkennen.

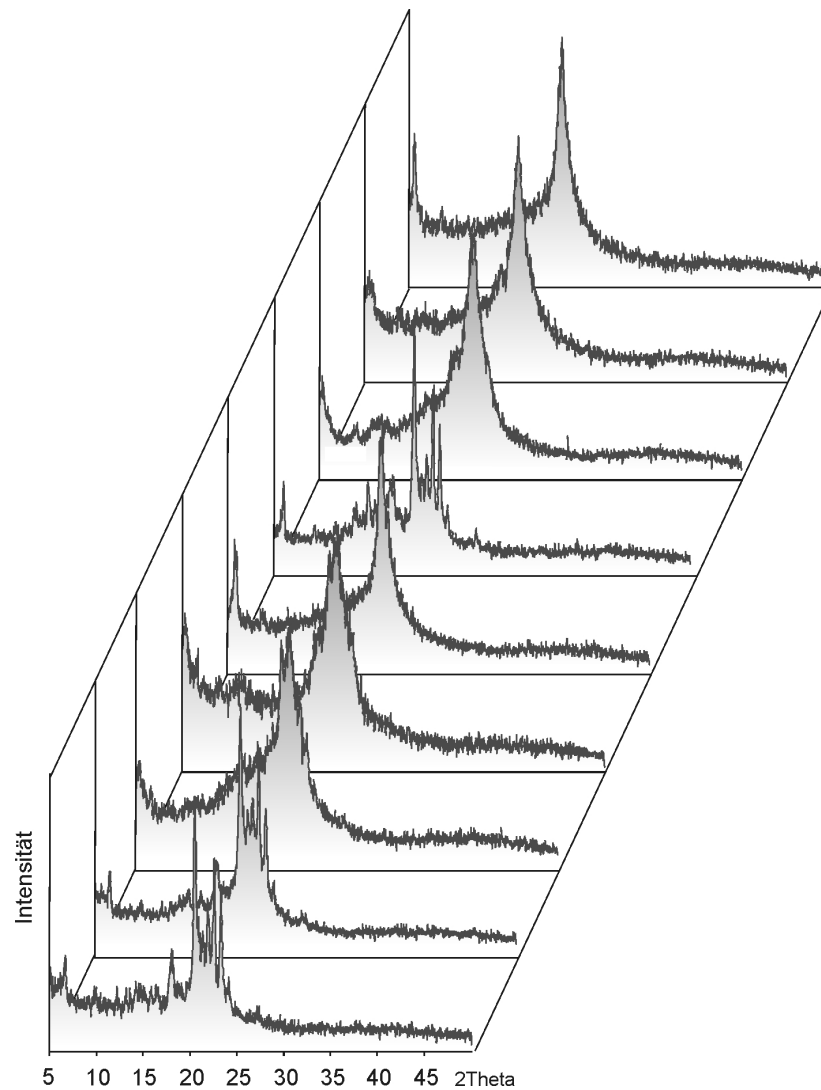


Abb. 4.42: Röntgendiffraktogramme der einzelnen PL 100H Zubereitungen; von unten aufsteigend: Lip_40, _41, _42, _28, _30, _36, _43, _34, _32.

Es ist daher davon auszugehen, dass die beobachtete erhöhte Kristallinität durch das PL 100H verursacht wird. Betrachtet man parallel dazu die Herstellungsparameter (siehe auch Kapitel 4.3.2) dieser auffälligen Proben, so wird deutlich, dass dieses Phänomen auch in diesem Fall bevorzugt bei einer Herstellungstemperatur von 45°C auftritt. Eine Ausnahme bildet dabei die Probe Lip_41, welche bei 90 bar und 40°C hergestellt wurde. Allerdings zeigte sich,

dass gerade bei höheren Temperaturen und einer Kombination aus hohem Druck und Temperatur eine solche Veränderung resultiert.

Trotz der erhöhten Kristallinität, die sowohl bei einigen Zubereitungen des PL 90H, als auch des PL 100H zu finden ist, scheint in jedem Fall das Budesonid in den einzelnen Zubereitungen verkapselt vorzuliegen, da die Peaks des Budesonids in keinem der Diffraktogramme mehr zu erkennen sind. Somit besteht ein weiterer Vorteil in der Herstellung dieser proliposomalen Zubereitungen mit überkritischem Kohlendioxid in der direkten Verkapselung des Wirkstoffes durch die Lipidzusammensetzung.

4.3.3.5 *Einschlusseffizienz*

Die Ermittlung der Einschlusseffizienzen wurde entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.2.9 durchgeführt, wobei die einzelnen proliposomalen Zubereitungen, wie bei der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung, sowohl bei 60°C, als auch bei 37°C im Puffermedium solvatisiert wurden.

In Tab. 4.21 sind die Ergebnisse dieser Bestimmung für die PL 90H Zubereitungen dargestellt. Dabei konnten durch die Solvatisierung bei 60°C Werte zwischen 62,2 % (Lip_45) und 96,4 % (Lip_24) ermittelt werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach der Solvatisierung bei 37°C, wobei hier Werte zwischen 28,3 % (Lip_22) und 87,4 % (Lip_24) erreicht wurden.

Tab. 4.21: Ergebnisse der Bestimmung der Einschlusseffizienzen [%] für die PL 90H Zubereitungen.

Chargennummer	Einschlusseffizienz bei 60°C [% Budesonid]	Einschlusseffizienz bei 37°C [% Budesonid]
Lip_44	72,4 (±5,9)	47,0 (±3,3)
Lip_45	62,2 (±9,7)	50,1 (±2,8)
Lip_46	69,0 (±12,4)	67,5 (±4,0)

Chargennummer	Einschlusseffizienz bei 60°C [% Budesonid]	Einschlusseffizienz bei 37°C [% Budesonid]
Lip_17	88,9 ($\pm 4,9$)	82,6 ($\pm 4,1$)
Lip_18	87,6 ($\pm 4,9$)	81,3 ($\pm 12,4$)
Lip_24	96,4 ($\pm 9,7$)	87,4 ($\pm 9,0$)
Lip_47	79,9 ($\pm 9,5$)	63,3 ($\pm 3,7$)
Lip_22	84,1 ($\pm 5,5$)	28,3 ($\pm 6,3$)
Lip_20	80,3 ($\pm 1,5$)	77,1 ($\pm 21,2$)

Wie schon bei der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung zeigten auch hier die Prozessparameter Druck und Temperatur des ASES-Prozesses keinen Einfluss auf die Einschlusseffizienz (hier nicht dargestellt).

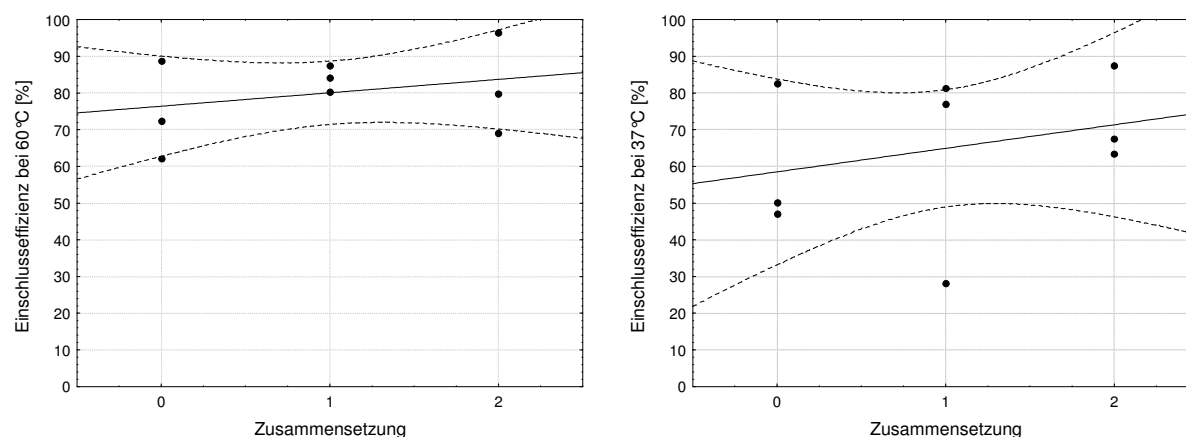


Abb. 4.43: Scatterplots der Einschlusseffizienzen nach der Solvatisierung bei 60°C (links) und 37°C (rechts) der PL 90H Zubereitungen gegen die Zusammensetzung [0 = 10:0; 1 = 9:1; 2 = 8:2]. Die gestrichelten Linien stellen die Regressionsbänder mit einem Konfidenzintervall von 95 % dar.

Dagegen konnte durch die Erhöhung des Cholesterol-Anteils in den Zubereitungen tendenziell eine Erhöhung der Einschlusseffizienz nach der Solvatisierung bei 60°C, sowie bei 37°C beobachtet werden (Abb. 4.43). Auch

in diesem Fall scheint durch einen erhöhten Cholesterol-Anteil eine Verbesserung der Solvatisierung der Zubereitungen zu resultieren. Durch diesen erhöhten Anteil scheint wiederum eine gleichmäßigere Liposomenbildung möglich zu sein, wodurch gleichzeitig das Budesonid besser in die Lipiddoppelschichten eingebaut werden kann.

Die Einschlusseffizienzen für die Zubereitungen mit PL 100H als Hauptbestandteil zeigen ähnlich hohe Werte wie bei der Verwendung von PL 90H (Tab. 4.22). So konnten nach der Solvatisierung bei 60°C Werte zwischen 44,2 % (Lip_32) und 104,7 % (Lip_28) erreicht werden. Die Solvatisierung bei 37°C zeigte Werte zwischen 50,7 % (Lip_43) und 90,6 % (Lip_36). Eine Tendenz in Bezug auf den Druck und die Temperatur des ASES-Prozesses konnte auch in diesem Fall nicht ermittelt werden. Auch die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Zubereitungen zeigten in diesem Fall keine eindeutige Tendenz in Bezug auf die Einschlusseffizienz (Scatterplots hier nicht dargestellt). Allgemein ist zu erkennen, dass die Werte für die Einschlusseffizienzen unter Verwendung des PL 100H in einem engeren Bereich liegen, als bei Verwendung des PL 90H, was hier die Auswertung erschwerte.

Tab. 4.22: Ergebnisse der Bestimmung der Einschlusseffizienzen [%] für die PL 100H Zubereitungen.

Chargennummer	Einschlusseffizienz bei 60°C [% Budesonid]	Einschlusseffizienz bei 37°C [% Budesonid]
Lip_40	81,3 (±3,4)	63,4 (±10,4)
Lip_41	75,9 (±3,8)	58,9 (±10,8)
Lip_42	80,9 (±12,6)	55,0 (±1,0)
Lip_28	104,7 (±19,4)	87,9 (±10,2)
Lip_30	87,7 (±10,8)	89,4 (±7,6)

Chargennummer	Einschlusseffizienz bei 60°C [% Budesonid]	Einschlusseffizienz bei 37°C [% Budesonid]
Lip_36	86,0 (±4,6)	90,6 (±8,6)
Lip_43	67,6 (±5,0)	50,7 (±13,7)
Lip_34	85,0 (±5,2)	70,1 (±8,0)
Lip_32	44,2 (±7,9)	79,2 (±2,3)

Alle hier untersuchten Liposomen zeigten akzeptable Werte in Bezug auf den Einschluss des Budesonids. Dabei konnte bei vielen Proben ein Wirkstoffgehalt von > 80 % Budesonid ermittelt werden.

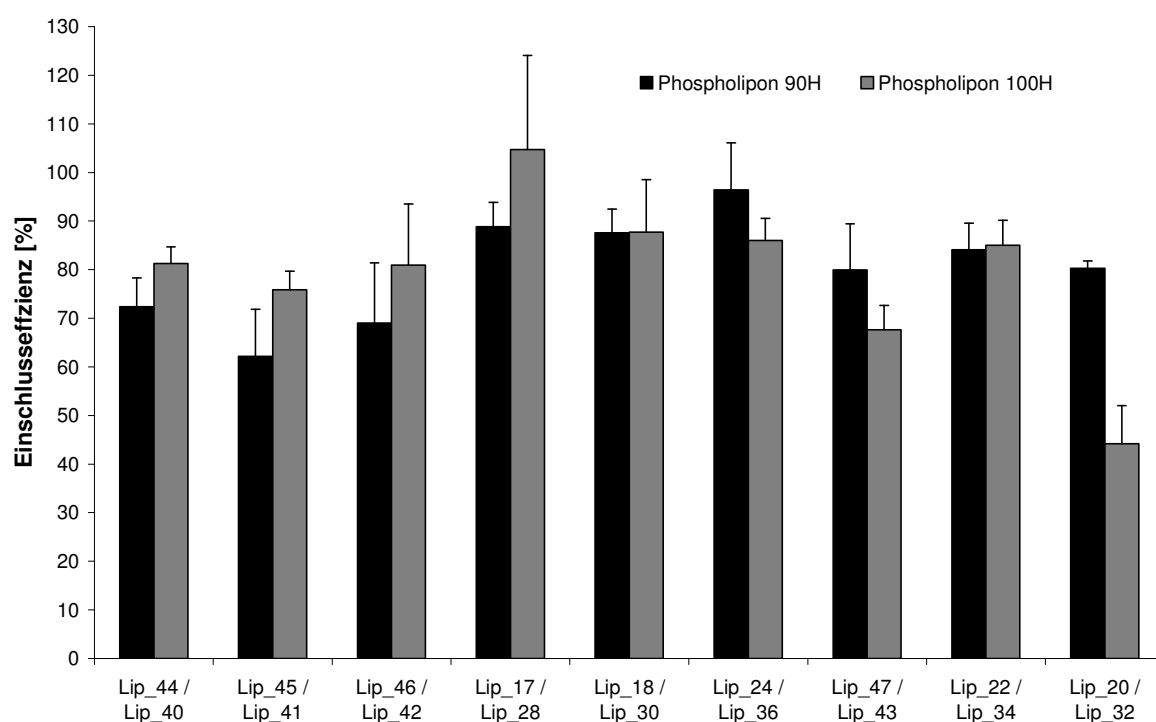


Abb. 4.44: Vergleich der Einschlusseffizienzen [%] nach der Solvatisierung bei 60°C unter Verwendung von PL 90H und PL 100H.

In Abb. 4.44 und Abb. 4.45 sind im Vergleich die Einschlusseffizienzen der einzelnen Proben unter Verwendung von PL 90H und PL 100H bei den

verschiedenen Solvatisierungstemperaturen dargestellt. Die Abbildungen zeigen, dass im Allgemeinen nach der Solvatisierung bei 60°C höhere Werte erreicht werden konnten, als bei der Verwendung von 37°C.

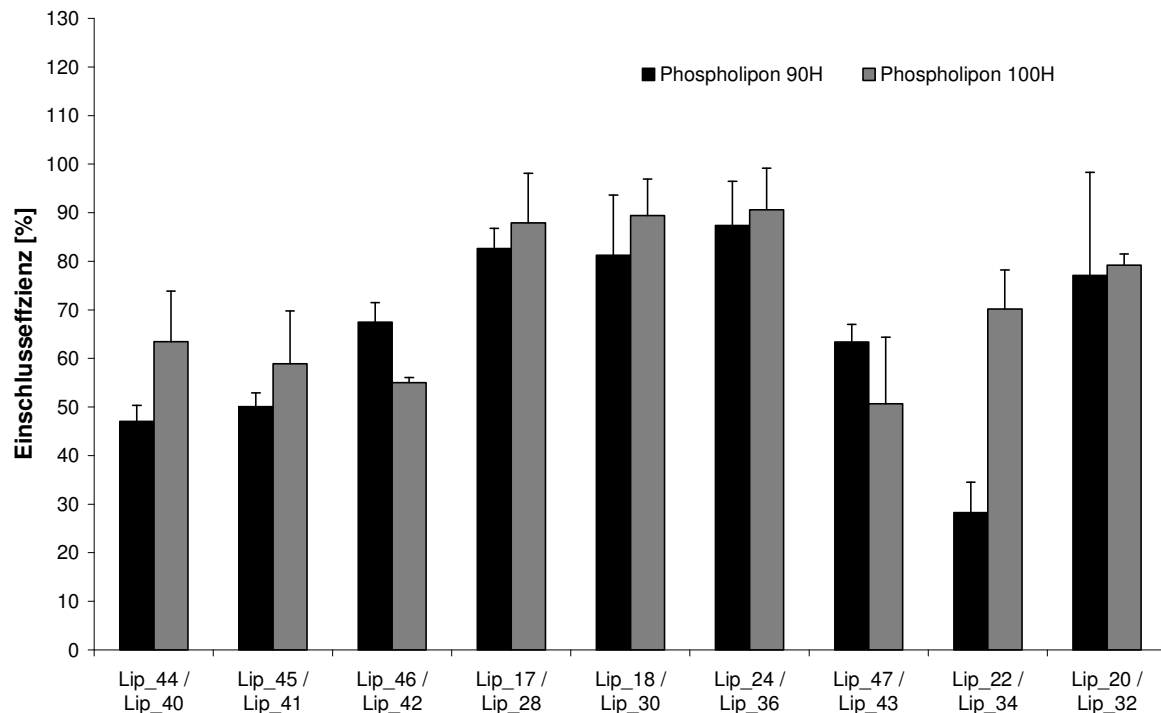


Abb. 4.45: Vergleich der Einschlusseffizienzen [%] nach der Solvatisierung bei 37°C unter Verwendung von PL 90H und PL 100H.

Dies zeigt, dass durch das Überschreiten der Phaseninversionstemperatur (hier 54°C für PL 90H und PL 100H) und dem damit verbundenem Übergang der Phosphatidylcholine in die flüssigkristalline Phase die Einschlusseffizienz positiv beeinflusst werden kann. Durch die Fluidität der Lipiddoppelschichten bei dieser Temperatur wird der Einschluss des Budesonids erleichtert. Die Solvatisierung der proliposomalen Zubereitungen bei 60°C ist somit zu bevorzugen. Die Verwendung verschiedener Phosphatidylcholine dagegen spielte hier nur eine untergeordnete Rolle.

4.3.3.6 Freisetzungsuntersuchungen

Um einen Eindruck davon zu erlangen, auf welche Weise die proliposomalen Zubereitungen ihren Wirkstoff über eine längere Zeit abgeben, wurden diese über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Hilfe einer Durchflusszelle (siehe auch Kapitel 3.2.10) freigesetzt. Dazu wurden ca. 150 mg der jeweiligen Zubereitungen eingewogen und in die Freisetzungszelle überführt. Bei dem für diese Prüfung verwendeten Puffer handelte es sich um das physiologische Puffermedium pH 7,2 (Ph. Eur. 5, 2005), das mit einer Flussrate von ca. 8 ml/min durch die Zellen gepumpt wurde. In Abb. 4.46 sind die verschiedenen Freisetzungskurven für die PL 90H Zubereitungen dargestellt, wobei es sich dabei jeweils um proliposomale Zubereitungen mit einer Zusammensetzung von 10:0 (Lip_17), 9:1 (Lip_21) und 8:1 (Lip_06) handelte. Als Vergleichsprobe diente eine physikalische Mischung mit einer Zusammensetzung von 8:2 (PL 90H Mix), die parallel zu den übrigen Proben freigesetzt wurde.

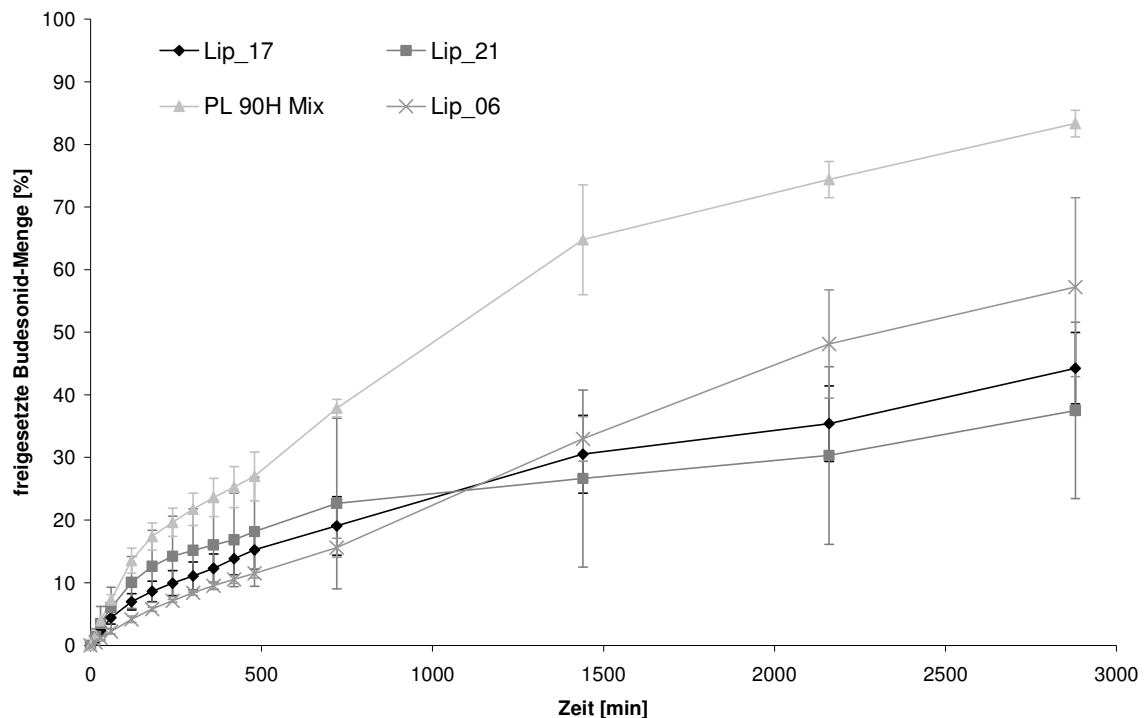


Abb. 4.46: Freigesetzte Menge Budesonid [%] gegen die Zeit verschiedener Zubereitungen und einer physikalischen Mischung auf Basis von PL 90H.

Anhand der Freisetzungskurven wird die verzögerte Freisetzung der proliposomalen Zubereitungen deutlich. Nach insgesamt 48 Stunden konnten aus Lip_17 ca. 44,3 %, aus Lip_21 ca. 37,5 % und aus Lip_06 ca. 57,2 % an Budesonid freigesetzt werden. Mit der Vergleichsprobe dagegen konnte eine freigesetzte Menge an Budesonid von ca. 83,4 % erreicht werden. Dabei unterscheiden sich die Freisetzungskurven der einzelnen proliposomalen Zubereitungen nur wenig voneinander. Einzig die Probe Lip_06, mit der eine freigesetzte Menge von ca. 57,2 % nach insgesamt 48 Stunden erreicht werden konnte, sticht etwas hervor. Die stark verzögerte Freisetzung der einzelnen Proben scheint in diesem Fall auf der Tatsache zu beruhen, dass die gebildeten Liposomen multilamellare Systeme bilden, die den Wirkstoff nur sehr langsam freigeben. Zu erkennen ist weiterhin, dass nach einer anfänglichen nicht-linearen Phase, die bis etwa zur 6. Stunde andauert, die Freisetzung in eine lineare Phase übergeht.

Es ist wahrscheinlich, dass die Bildung von Liposomen bis zu diesem Übergang in die lineare Phase andauert und somit vorher nicht eingeschlossenes Budesonid freigesetzt wird. Durch die Bildung der Lipiddoppelmembranen und dem Einschluss des Budesonids in diese, kann im Anschluss das Budesonid aus diesen Membranen konstant über die Zeit freigesetzt werden.

Eine Ausnahme bildet hier das Lip_06, bei der die Freisetzung von Anfang an nahezu linear (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9936$) verläuft. Die Tatsache, dass mit Lip_06 (Probe mit dem höchsten Cholesterol-Anteil) die höchste freigesetzte Menge an Budesonid nach 48 Stunden erreicht und dazu ein nahezu linearer Freisetzungsverlauf beobachtet werden konnte, lässt darauf schließen, dass durch den erhöhten Cholesterol-Anteil die Bildung von einheitlichen Liposomen beschleunigt abläuft.

Auffällig weiterhin ist das Freisetzungsverhalten der physikalischen Mischung gegenüber den Zubereitungen aus dem ASES-Prozess. Insgesamt konnten aus dieser im Vergleich zu den ASES-Produkten ca. 25 % mehr Budesonid

freigesetzt werden, allerdings scheint auch hier die Bildung von einheitlichen Liposomen wesentlich langsamer abzulaufen, als noch bei den proliposomalen Zubereitungen. Dies zeigt nicht zuletzt auch die Zweiteilung der Freisetzung in eine nicht-lineare und eine lineare Phase, die auch schon bei den proliposomalen Zusammensetzungen mit niedrigem und keinem Cholesterol-Anteil auftrat.

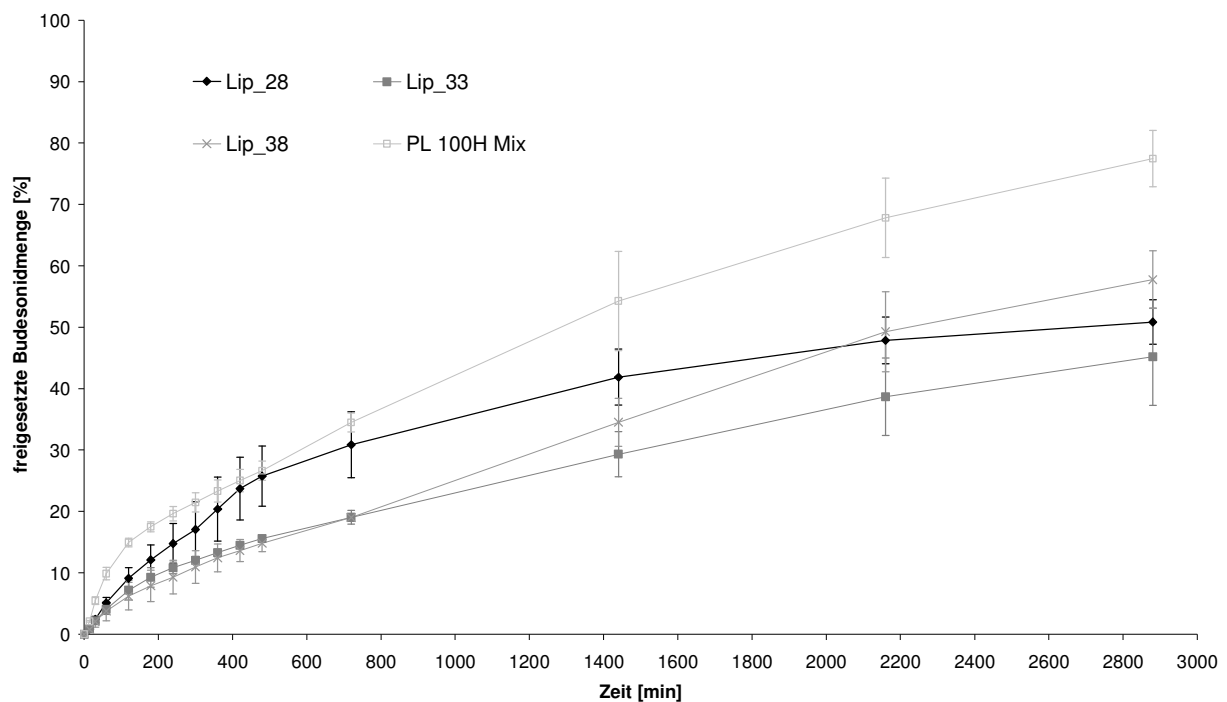


Abb. 4.47: Freigesetzte Menge Budesonid [%] gegen die Zeit verschiedener Zubereitungen und einer physikalischen Mischung auf Basis von PL 100H.

Die Ergebnisse des Freisetungsverhaltens für die Zubereitungen auf der Basis des PL 100H sind in Abb. 4.47 dargestellt. Auch in diesem Fall wurden drei Zubereitungen verschiedener Zusammensetzungen ausgewählt und parallel dazu eine physikalische Mischung freigesetzt. Dabei konnten bei einer Zusammensetzung von 10:0 (Lip_28) ca. 50,9 %, von 9:1 (Lip_33) ca. 45,2 % und von 8:2 (Lip_38) ca. 57,8 % des Budesonid freigesetzt werden. Dagegen wurde mit der physikalischen Mischung, einer Zusammensetzung von 8:2 (PL 100H Mix), eine freigesetzte Menge an Budesonid von ca. 77,5 % erreicht.

Deutlich wird auch hier, dass bei der Zusammensetzung mit dem höchsten Cholesterol-Anteil (Lip_38) die Freisetzung nahezu linear verläuft (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9854$). Je niedriger der Cholesterol-Anteil, desto mehr zeigt sich auch hier die Zweiteilung der Freisetzung in eine nicht-lineare und eine lineare Phase. Allerdings trifft dieses Verhalten, ebenso wie beim PL 90H, nicht auf die physikalische Mischung zu. Auch in diesem Fall zeigt sich die Zweiteilung der Freisetzung, was wiederum auf die verlangsamte Liposomenbildung schließen lässt.

Allgemein konnte somit bei den proliposomalen Zubereitungen aus dem ASES-Prozess eine stark verzögerte Freisetzung beobachtet werden, die durch die Bildung der Liposomen zu erklären ist. Bei den Freisetzungen aus den physikalischen Mischungen kam es zwar ebenfalls zu einer verzögerten Freisetzung, allerdings scheint dabei die Bildung der Liposomen sehr viel langsamer zu verlaufen als bei den Proben aus dem ASES-Prozess. Somit resultiert mit den proliposomalen Zubereitungen aus dem ASES-Prozess ein System, was durch Solvatisierung sehr schnell zu Liposomen umwandelbar ist und damit eine Alternative zu konventionell hergestellten und getrockneten Liposomen darstellt.

4.3.3.7 Stabilitätsuntersuchungen

Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden für die Zubereitungen auf Basis von PL 90H und PL 100H jeweils Proben verschiedener Zusammensetzungen ausgewählt und anschließend bei Raumtemperatur und 75 % relativer Feuchte in einem Exsikkator für 7 Tage eingelagert. Die Bestimmung der Einschlusseffizienz fand dabei am Tag 0, Tag 2 und am Tag 7 statt und wurde wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben nach der Solvatisierung bei 60°C durchgeführt. In Abb. 4.48 sind die Ergebnisse der Einschlusseffizienzen für die jeweiligen Zeitpunkte der verschiedenen PL 90H Zubereitungen dargestellt. Allgemein ist zu erkennen, dass mit zunehmender Lagerung eine Abnahme der

Einschlusseffizienz stattfindet, auch wenn anfänglich bei einigen Proben an Tag 2 höhere Einschlusseffizienzen ermittelt wurden. Ein ähnliches Bild zeigen auch die Zubereitungen auf Basis von PL 100H in Abb. 4.49. Allerdings ist die Tendenz der Abnahme der Einschlusseffizienz mit zunehmender Lagerung bei Raumtemperatur und 75 % relativer Feuchte etwas deutlicher ausgeprägt. Daher stellt die Lagerung der proliposomalen Zubereitungen einen wichtigen Faktor dar, der in Hinblick auf die Einschlusseffizienz beachtet werden sollte.

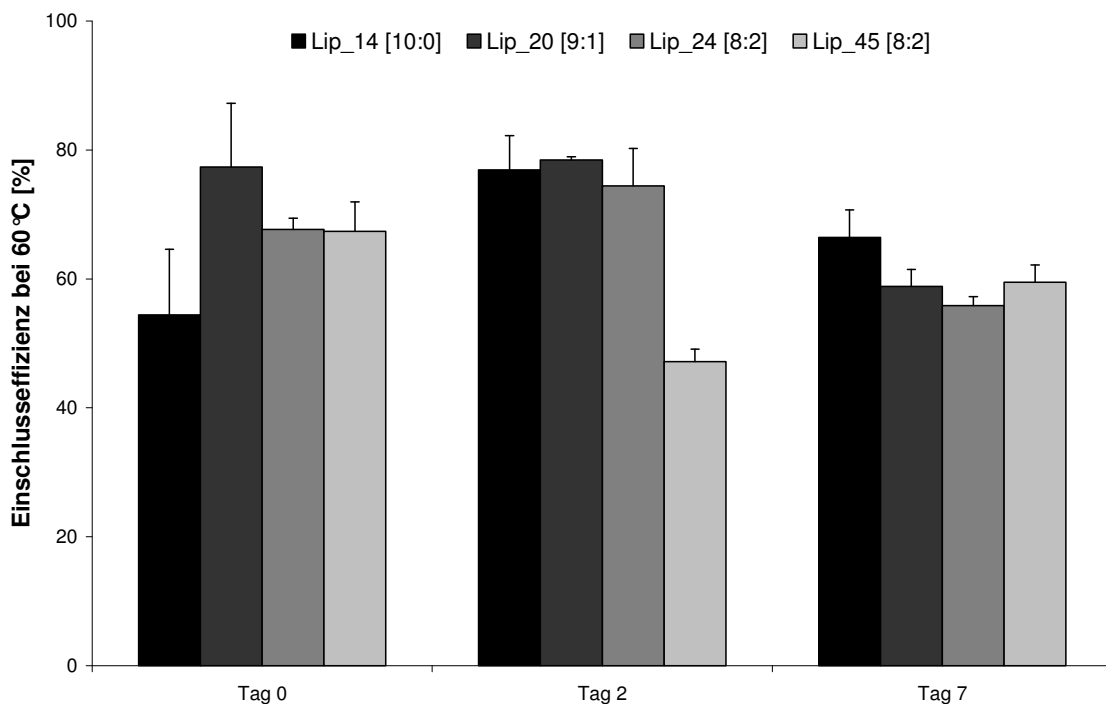


Abb. 4.48: Ergebnisse der Einschlusseffizienz [%] verschiedener PL 90H Zusammensetzungen nach Einlagerung bei Raumtemperatur und 75 % relativer Feuchte für 7 Tage.

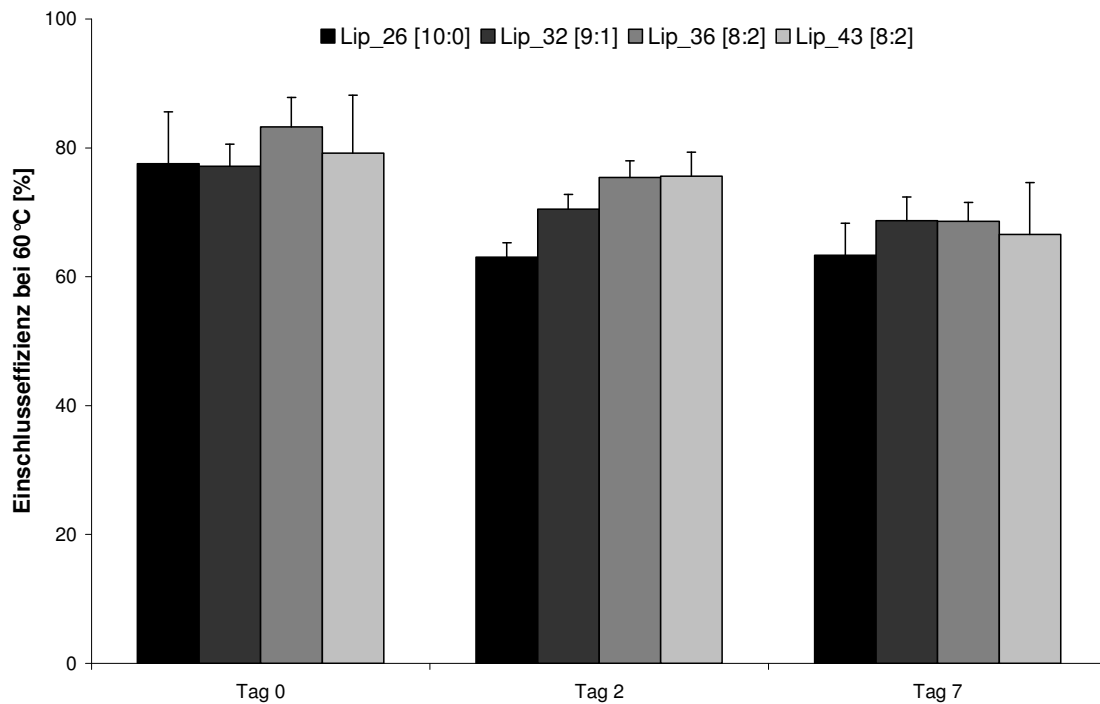


Abb. 4.49: Ergebnisse der Einschlusseffizienz [%] verschiedener PL 100H Zusammensetzungen nach Einlagerung bei Raumtemperatur und 75 % relativer Feuchte für 7 Tage.

4.3.4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass die Herstellung proliposomaler Zubereitungen mit überkritischem Kohlendioxid im ASES-Prozess prinzipiell möglich ist, wobei die Phaseninversionstemperatur der verwendeten Lecithine für die Verarbeitung im überkritischen Kohlendioxid eine große Rolle spielt. Weiterhin führten auch die Prozesstemperatur und die Zusammensetzung der Zubereitungen zu einer Beeinflussung der Verarbeitung, woraus ersichtlich wird, dass der Prozess dem jeweiligen Produkt angepasst werden muss.

Ein Vorteil solcher pulverförmigen proliposomalen Zubereitungen zeigt die gute Weiterverarbeitung zu Liposomen. So führte die Solvatisierung dieser Zubereitungen im Puffermedium bei Temperaturen oberhalb, aber auch unterhalb der Phaseninversionstemperatur zu hohen Werten der Einschlusseffizienz des verwendeten Budesonids, unter der Bildung von akzeptablen

Partikelgrößen der entstandenen Liposomen. In diesem Fall spielt die Beeinflussung durch die Prozessparameter des ASES-Prozesses nur noch eine untergeordnete Rolle und es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Zubereitungen einen entscheidenden Einfluss auf diese Ergebnisse ausübt. So konnte in fast jedem Fall ein positiver Einfluss durch die Erhöhung des Cholesterol-Anteils in den Zubereitungen ermittelt werden.

Die Untersuchungen des Freigabeverhaltens des Wirkstoffes der verschiedenen Zubereitungen, bzw. der daraus entstandenen Liposomen zeigten, dass hier eine stark verzögerte Freisetzung durch die Liposomen erzielt werden konnte. Dadurch konnte letztendlich die Bildung der Liposomen aus den proliposomalen Zubereitungen bestätigt werden.

Die Anwendungsmöglichkeiten solcher mit dem ASES-Prozess hergestellten Partikel erscheinen vielfältig. So können sie nach der Rekonstitution zum Beispiel inhalativ über Vernebler eingesetzt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Nutzung der Depotwirkung durch subkutane Anwendung und nicht zuletzt können diese Partikel zur parenteralen Applikation mit dem Wunsch einer verzögerten Wirkstofffreisetzung dienen.

5 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Die Mikronisation von Arzneistoffen stellt einen wichtigen Schritt dar, um diese für die inhalativen Anwendung zu nutzen. Dabei sollte ein MMAD von 1 - 5 μm zwingend eingehalten werden. Mittlerweile erlangt die Mikronisation mit überkritischem Kohlendioxid als Alternative zu den Standardverfahren immer mehr Aufmerksamkeit, da viele Nachteile der sonst üblichen Mikronisationsverfahren mit dieser Methode ausgeräumt werden können. Das Prinzip des in dieser Arbeit verwendeten ASES-Prozesses besteht dabei darin, dass eine Substanzlösung in die überkritische Gasphase eingesprüht wird und während dieses Vorgangs die jeweilige Substanz spontan präzipitiert. Eine zwingende Voraussetzung hierbei ist, dass das Lösungsmittel, im Gegensatz zur fällenden Substanz, im überkritischen Kohlendioxid löslich sein muss.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen das Kristallisationsverhalten des Wirkstoffes Budesonid im überkritischen Kohlendioxid durch Veränderung verschiedener Prozessparameter zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass der Kristallisationsprozess sehr robust abläuft und Änderungen der Produkt- und CO_2 -Flussrate kaum einen direkten Einfluss auf die entstandenen Mikropartikel ausübten. Im Vergleich zu gemahlene Budesonid-Mikropartikeln wurden zwar mit dem ASES-Prozess insgesamt höhere Werte der Partikelgrößen erreicht, allerdings zeigten sich deutlich bessere Ergebnisse in Bezug auf die Untersuchungen zur FPF (47,9 % ASES-Produkt gegenüber 29,0 % Jet-Mill Produkt). Weiterhin wurde bei allen ASES-Produkten eine deutlich geringere dispersive Oberflächenenergie ermittelt, was sich auch durch das fast vollständige Fehlen von elektrostatischen Wechselwirkungen zeigte. Letztendlich führte die Mikronisation von Budesonid im ASES-Prozess zu Mikropartikeln, die sehr gut weiterverarbeitbar und dem gemahlene Produkt, in Hinblick auf die aerodynamischen Eigenschaften, deutlich überlegen waren.

Zum anderen sollte die Möglichkeit der Mikronisation von Formoterol in überkritischem Kohlendioxid mit dem ASES-Prozess untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Prozessparameter Druck und Temperatur über einen weiten Bereich variiert, sowie verschiedene Lösungsmittel zur Fällung verwendet. Weiterhin sollte der Einfluss eines Zusatzes, in diesem Fall DPPC, zur Arzneistofflösung untersucht werden. Dabei kam es in jedem Fall zur Bildung von Formoterol-Mikropartikeln, die eine ausgeprägte Amorphie aufwiesen, sich jedoch bei entsprechender Lagerung wieder in das Formoterol-Dihydrat rekristallisieren ließen. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den ASES-Prozess weder eine Polymorphie, noch eine Pseudopolymorphie für das Formoterol beobachtet werden konnte. Ferner wurden durch die Fällung des Formoterol im überkritischen Kohlendioxid sehr kleine Partikelgrößen (kleinster X_{50} -Wert $0,85\mu\text{m}$) erhalten, woraufhin sich ebenfalls Untersuchungen zu den aerodynamischen Eigenschaften der entstandenen Mikropartikel anschlossen. Dabei resultierten FPF-Werte von bis zu 29 %, was darauf schließen lässt, dass auch hier durch den ASES-Prozess Mikropartikel hergestellt werden konnten, die durchaus für die inhalative Anwendung geeignet erscheinen.

Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit stellte die Entwicklung pulverförmiger proliposomaler Zubereitungen mit dem ASES-Prozess dar. Auch in diesem Fall sollte dabei das ASES-Verfahren als eine Alternative zu den üblichen Herstellungsverfahren für Liposomen dienen. Die Überlegung mit diesem Verfahren in einem Schritt pulverförmige Zubereitungen zu erhalten, die nach einer anschließenden Solvatisierung Liposomen bilden, stand dabei im Vordergrund der folgenden Untersuchungen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zusammensetzungen aus Lecithin, Cholesterol und Budesonid im überkritischen Kohlendioxid gefällt und dabei Lipid-Mikropartikel erhalten, die in einem zweiten Schritt durch Solvatisierung im Puffermedium Liposomen bildeten. Die Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften dieser Zubereitungen zeigten, dass durch die Solvatisierung bei 60°C verschiedene

Partikelgrößen, je nach verwendetem Lecithin, Zusammensetzung und Prozessparametern erreicht werden konnten, wobei kleinste X_{50} -Werte von ca. 5 μm resultierten. Eine Reduktion der Solvatisierungstemperatur auf 37°C führte dagegen zu durchschnittlich größeren X_{50} -Werten der einzelnen Zubereitungen, was auf die schlechtere Bildung von Liposomen unterhalb der Phaseninversionstemperatur schließen lässt. Die Überprüfung der Einschlusseffizienz des Budesonids lieferte in jedem Fall sehr hohe und je nach Zusammensetzung und Versuchsparametern unterschiedliche Werte (44,2 % - 104,7 %). Dabei zeigte sich, wie auch schon bei der Partikelgröße, dass die Parameter Druck und Temperatur lediglich einen geringen Effekt ausüben und ein Haupteinfluss durch die verschiedenen Cholesterol-Anteile der einzelnen Zusammensetzungen verursacht wurde. Je höher dieser dabei war, desto positiver wirkte sich dies auf die Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungen aus. Letztendlich konnte durch das Freigabeverhalten des Budesonids aus den solvatisierten proliposomalen Zubereitungen die Bildung von Liposomen bestätigt werden. Dies zeigt die starke Verzögerung der Freisetzung des Wirkstoffes, die auf die Bildung der Lipiddoppelmembranen und der anschließenden Freisetzung des Wirkstoffes aus diesen erklärt werden kann. Somit zeigt sich mit den proliposomalen Zubereitungen aus dem ASES-Prozess ein System, was durch Solvatisierung sehr schnell zu Liposomen umwandelbar ist und damit eine Alternative zu konventionell hergestellten und getrockneten Liposomen darstellt.

6 ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

The micronisation of drugs represents an important process during development of drug products for pulmonary delivery. One of the major prerequisites for a successful pulmonary drug application is a suitable particle size of the drug with a mass median aerodynamic diameter (MMAD) in the range of 1-5 μm .

Meanwhile the micronisation of drugs with supercritical carbon dioxide is an attractive alternative to conventional methods due to the reason that a lot of disadvantages of these standard methods could be eliminated. The Aerosol Solvent Extraction System (ASES) used in this study is based on the principle that a drug which is insoluble in supercritical carbon dioxide is precipitated from an organic solution that is sprayed into the supercritical gas phase.

The aim of this study on the one hand was to evaluate the micronisation of budesonide at various process conditions in the ASES-process. Thereby the obtained results show that the varied parameters CO_2 flow rate and solution feed rate did hardly influence the micronisation process. In contrast to a jet-milled budesonide batch the ASES produced microparticles showed increasing volume mean diameters; however with respect to the fine particle fraction better results were obtained with the ASES-products (47.9 % ASES-product compared to 29.0 % jet-milled product). Furthermore, the determination of the dispersive surface energy shows decreasing results for the ASES-batches compared to the jet-milled product which was also shown by the nearly complete absence of electrostatical interactions. Finally, the micronisation of budesonide with supercritical carbon dioxide leads to microparticles which were suitable for subsequent processing and show improved aerodynamic properties in contrast to a milled product.

On the other hand the feasibility of the micronisation of formoterol with supercritical carbon dioxide in the ASES-process was investigated. For these purposes the process parameters pressure and temperature in the ASES-process

were varied as well as the drug solvents. Furthermore, the influence of DPPC as an additive of the drug solution was tested. In all cases amorphous formoterol microparticles were obtained after the precipitation in the supercritical gas phase which shows a recrystallisation into the formoterol-dihydrate after appropriate storage. However, a polymorphism or pseudopolymorphism was not observed. Also low volume mean diameters for the precipitated formoterol batches were determined (lowest d50% 0.85 μm) whereupon the aerodynamic behaviour of the batches has been evaluated. These results show a maximum fine particle fraction of 29 % which demonstrates the suitability of the ASES processed formoterol microparticles for pulmonary delivery.

Another aspect of this work was the development of liposomes in a dry reconstitutable form. Also in this case the ASES-process should act as an alternative to the standard liposome preparation methods. For these purposes different compositions consisting of lecithin, cholesterol and budesonide were precipitated under various conditions in supercritical carbon dioxide. Thereby lipid microparticles were formed which could be reconstituted to liposomes in a second step. After reconstitution at 60°C different volume mean diameters could be obtained depending on the quality of the used lecithin, batch composition and process parameters of the ASES-process. The lowest volume mean diameter obtained was 5 μm . In contrast, a reduction of the reconstitution temperature to 37°C leads to an increased volume mean diameter which shows a reduced formation of liposomes from the dry form. The determination of the entrapment efficacy of the budesonide indicates in all cases, depending on the batch composition and the process parameters, satisfactory results (44.2 % - 104.7 %). Similar to the results of the particle size analysis the process parameters pressure and temperature hardly influence the results. It was found that an increasing cholesterol to lecithin ratio leads to the best results in particle size analysis and entrapment efficacy. Finally the dissolution tests of the reconstituted dry lipid microparticles demonstrate the formation of liposomes and a sustained release of

the budesonide which appears to be depending on the formation of lipid bilayers. As a consequence these reconstitutable dry lipid microparticles produced with the ASES-process represent a promising alternative to conventional produced liposomes.

In summary, the ASES-process using supercritical carbon dioxide was found to be a suitable method for the micronisation of drug substances with improved physico-chemical properties, e.g. reduced surface energy and improved flowability. Both, lipophilic and hydrophilic compounds were shown to be candidates for this process. The processing of lecithin and cholesterol led to dry pre-liposomes that were shown to be reconstitutable with high drug entrapment efficacy and sustained drug release.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen und Symbole

ASES	Aerosol Solvent Extraction System
Bud	Budesonid
CAN-BD	CO ₂ -Assisted Nebulization Bubble-Dryer
CO ₂	Kohlendioxid
C _p	kritischer Punkt
DD	Delivered Dose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Dry Powder Inhaler
DSC	Differential Scanning Calorimetrie
DVS	Dynamic Vapour Sorption
FID	Flammenionisationsdetektor
Form	Formoterol
FPD	Fine Particle Dose
FPF	Fine Particle Fraction
GAS	Gas Anti-Solvent Kristallisation
GC	Gas Chromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
iGC	Inverser Gas Chromatograph
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MDI	Metered Dose Inhaler
MeOH	Methanol
MLV	Multilamellar Large Vesicles
MMAD	Mass Median Aerodynamic Diameter
MSLI	Multi Stage Liquid Impinger

p_c	kritischer Druck
PGSS	Particles from Gas - Saturated Solutions
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
PL 90H	Phospholipon 90 H
PL 100h	Phospholipon 100 H
Q	Flussrate
$q_r(x)$	Verteilungsdichtefunktion der Teilchengröße x
$Q_r(x)$	Verteilungssummenfunktion der Teilchengröße x
REM	Raster Elektronen Mikroskop
RES	Retikuloendotheliales System
RESS	Rapid Expansion of Supercritical Solutions
SD	Standard Deviation
SEDS	Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids
SUV	Small Unilamellar Vesicles
T_c	kritische Temperatur
T_p	Tripelpunkt
TCD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organisation
X_{10}	Partikeldurchmesser für 10 % des Kontingents
X_{50}	Partikeldurchmesser für 50 % des Kontingents
X_{90}	Partikeldurchmesser für 90 % des Kontingents

8 LITERATURVERZEICHNIS

Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. und Yau-Young, A. (1991). Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochimica et biophysica acta* 1066(1): 29-36.

Angus, S., Armstrong, B. und De Reuck, K. M. (1976). *International Thermodynamic Tables of the Fluid State: Carbon Dioxide*.

Badens, E., Magnan, C. und Charbit, G. (2001). Microparticles of soy lecithin formed by supercritical processes. *Biotechnol Bioeng* 72(2): 194-204.

Bangham, A. D. und Horne, R. W. (1964). Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *Journal of molecular biology* 12: 660-8.

Bertucco, A. und Vetter, G. (2001). *High pressure process technology: fundamentals and applications*. Amsterdam [u.a.], Elsevier.

Best, W., Müller, F. J., Schmieder, K., Frank, R. und Paust, J. (1979). Verfahren zur Herstellung von feinstverteilten Carotinoiden. DE2943267

Bolzen, N. (2001). *Pulver zur Inhalation: physikochemische Charakterisierung, Herstellung und Optimierung*. Dissertation Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Cagniard de la Tour, C. (1822). *Annales de Chimie et de Physics* 21 (127), 178.

- Castor, T. P. und Chu, L. (1998). Methods and apparatus for making liposomes containing hydrophobic drugs. 96-631808 5776486
- Cattel, L., Ceruti, M. und Dosio, F. (2004). From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. *Journal of Chemotherapy (Firenze, Italy)* 16(Suppl. 4): 94-97.
- Chawla, A., Taylor, K.M.G., Newton, J.M., Johnson, M.C.R., Production of spray-dried salbutamol sulphate for use in dry powder aerosol formulations, *Int. J. Pharm.* 108 (1994) 233-240
- Debenedetti, P. G., Lim, G. B. und Prud Homme, K. (1993). Formation of Protein Microparticles by Antisolvent Precipitation. EP0542314
- Desai, T. R., Hancock, R. E. und Finlay, W. H. (2003). Delivery of liposomes in dry powder form: aerodynamic dispersion properties. *Eur J Pharm Sci* 20(4-5): 459-67.
- Eggers, R. und Stein, W. (1984). High pressure extraction of oil seeds. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 86(1): 10-16.
- Gallagher, P. M., Coffey, M. P., Krukonis, V. J. und Klasutis, N. (1989). Gas antisolvent recrystallization: new process to recrystallize compounds insoluble in supercritical fluids. *ACS Symposium Series 406(Supercrit. Fluid Sci. Technol.)*: 334-54.
- Gallagher, P. M., Krukonis, V. J. und Coffey, M. P. (1995). Separation of RDX and HMX by recrystallization using supercritical fluids as anti-solvent. US5389263

- Ganderton, D., Targeted delivery of inhaled drugs: current challenges and future trends, *J. Aerosol Med.* 12, Suppl.1 (1999) 3-8
- Gonzalez-Rothi, R. J., Straub, L., Cacace, J. L. und Schreier, H. (1991). Liposomes and pulmonary alveolar macrophages: functional and morphologic interactions. *Exp Lung Res* 17(4): 687-705.
- Gregoriadis, G., Florence, A. T., Patel, H. M. und Editors (1993). *Liposomes in Drug Delivery. Drug Targeting Delivery*; 2.
- Hamilton, R. L., Jr., Goerke, J., Guo, L. S. S., Williams, M. C. und Havel, R. J. (1980). Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. *Journal of Lipid Research* 21(8): 981-92.
- Hanna, M. und York, P. (1998). Method and apparatus for the formation of particles. US5851453; WO9501221
- Hanna, M. und York, P. (2000). Method and apparatus for the formation of particles. WO9600610
- Hanna, M. und York, P. (2002). Method and apparatus for the formation of particles. WO9836825
- Huang, C. (1969). Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* 8(1): 344-52.

- Joshi, M. und Misra, A. N. (2001). Pulmonary disposition of budesonide from liposomal dry powder inhaler. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 23(10): 531-536.
- Jung, J. und Perrut, M. (2001). Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *Journal of Supercritical Fluids* 20: 179-219.
- Kaiser, C. S., Römpp, H. und Schmidt, P. C. (2001). Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide. *Pharmazie* 56(12): 907-26.
- Kamihira, M., Taniguchi, M. und Kobayashi, T. (1987). Removal of organic solvent from antibiotics with supercritical carbon dioxide. *Journal of Fermentation Technology* 65(1): 71-5.
- Kleppmann, W. (2003). *Taschenbuch Versuchsplanung*. München, Carl Hanser Verlag.
- Kremer, J. M. H., Van der Esker, M. W., Pathmamanoharan, C. und Wiersema, P. H. (1977). Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* 16(17): 3932-5.
- Kunastitchai, S., Pichert, L., Sarisuta, N. und Müller, B. W. (2005). Influence of drug solubility in phosphatidylcholine-cholesterol carrier on microparticle production by the aerosol solvent extraction system (ASES) process. *Druck in Vorbereitung*.
- Kunastitchai, S., Pichert, L., Sarisuta, N. und Müller, B. W. (2005). Application of aerosol solvent extraction system (ASES) process for preparation of liposomes in a dry and reconstitutable form. *Druck in Vorbereitung*.

- Lansley, A. B. (1993). Mucociliary clearance and drug delivery via the respiratory tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 11(3): 299-327.
- Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: from Physics to Application*, Elsevier Science Publishers.
- Leuenberger, H. (2002). *Martin: Physikalische Pharmazie*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Magnan, C., Badens, E., Commenges, N. und Charbit, G. (2000). Soy lecithin micronization by precipitation with a compressed fluid antisolvent - influence of process parameters. *The journal of supercritical fluids* 19(1): 69-77.
- Martin, T. M., Bandi, N., Shulz, R., Roberts, C. B. und Kompella, U. B. (2002). Preparation of Budesonide and Budesonide-PLA microparticles using supercritical fluid precipitation technology. *AAPS PharmSciTech* 3(3): 11.
- Mayhew, E., Lazo, R., Vail, W. J., King, J. und Green, A. M. (1984). Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* 775(2): 169-74.
- Müller, B. W. und Fischer, W. (1989). Manufacture of sterile sustained-release drug formulations using liquefied gases. DE3744329, US5043280
- Müller, R. H. und Hildebrand, G. E. (1998). *Moderne Arzneiformen*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

- Ohm, A. und Lippold, B. C. (1985). Charakterisierung der Benetzbarkeit von Arzneistoffpulvern mit Hilfe der Sessile Drop Technik, Teil 1: Benetzungswinkel. *Pharm. Ind.* 47: 661-664.
- Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J. und Papahadjopoulos, D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et biophysica acta* 557(1): 9-23.
- Parrott, E.L., Comminution. In: Swarbrick, J., Boylan, J.C. (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Vol. 3., New York: Marcel Decker Inc. (1990) pp. 101-121
- Perrut, M. (2003). Supercritical fluids applications in the pharmaceutical industry. *STP pharma* 13(2): 83-91.
- Rehman, M., Shekunov, B. Y., York, P., Lechuga-Ballesteros, D., Miller, D. P., Tan, T. und Colthorpe, P. (2004). Optimisation of powders for pulmonary delivery using supercritical fluid technology. *Eur J Pharm Sci* 22(1): 1-17.
- Reverchon, E., Della Porta, G. und Pallado, P. (2001). Supercritical antisolvent precipitation of salbutamol microparticles. *Powder Technology* 114(1-3): 17-22.
- Ruchatz, F., Kleinebudde, P. und Müller, B. W. (1997). Residual solvents in biodegradable microparticles. Influence of process parameters on the residual solvent in microparticles produced by the aerosol solvent extraction system (ASES) process. *J Pharm Sci* 86(1): 101-5.

- Sharma, A. und Sharma, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 154(2): 123-140.
- Sharma, A., Mayhew, E., Bolcsak, L., Cavanaugh, C., Harmon, P., Janoff, A. und Bernacki, R. J. (1997). Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 71(1): 103-7.
- Shaub, G. R., Brennecke, J. F. und McCready, M. J. (1995). Radial Model for particle formation from the Rapid Expansion of Supercritical Solutions. *The journal of supercritical fluids* 8(4): 318-328.
- Schubert, R. (1997). Liposomen in Arzneimitteln. *Moderne Arzneiformen*. W. V. m. Stuttgart: 167-185.
- Sievers, R. E. und Karst, U. (1997). Methods for fine particle formation. US5639441; EP0677332 ; (2002)
- Sievers, R. E., Hyberston, B. M. und Hansen, B. N. (1993). Methods and apparatus for drug delivery using supercritical solutions. US5301664
- Sievers, R. E., Karst, U., Milewski, P. D., Sellers, S. P., Miles, B. A., Schaefer, J. D., Stoldt, C. R. und Xu, C. Y. (1999). Formation of aqueous small droplet aerosols assisted by supercritical carbon dioxide. *Aerosol Science and Technology* 30(1): 3-15.
- Smith, R. D. (1986). Supercritical fluid molecular spray film deposition and powder formation. US4582731

- Stahl, E. und Glatz, A. (1984). Extraction of natural substances with supercritical gases, 10. Communication: Qualitative and quantitative determination of solubilities of steroids in supercritical carbon dioxide. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 86(9): 346-8.
- Stahl, E. und Schilz, W. (1976). Extraction with super-critical gases in direct coupling with thin-layer chromatography. Applications to natural products chemistry. *Chemie Ingenieur Technik* 48(9): 773-8.
- Stahl, E., Quirin, K.-W. und Gerard, D. (1987). *Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination*. Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag.
- Stahlhofen, W., Gebhart, J. und Heyder, J. (1980). Experimental determination of the regional deposition of aerosol particles in the human respiratory tract. *American Industrial Hygiene Association Journal (1958-1999)* 41(6): 385-98a.
- Steckel, H., Thies, J. und Müller, B. W. (1997). Micronizing of steroids for pulmonary delivery by supercritical carbon dioxide. *International Journal of Pharmaceutics* 152(1): 99-110.
- Szoka, F., Jr. und Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering* 9: 467-508.
- Taylor, K. M. G. und Farr, S. J. (1993). Liposomes for drug delivery to the respiratory tract. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 19(1-2): 123-42.

- Ticehurst, M.D., Basford, P.A., Dallman, C.I., Lukas, T.M., Marshall, P.V., Nichols, G., Smith, D., Characterisation of the influence of micronisation on the crystallinity and physical stability of revatropate hydrobromide, *Int. J. Pharm.* 193 (2000) 247-259
- Timmermann, I. L. (2004). Thermoanalytische Abschätzung der Stabilität von Komponenten zur Pulverinhalation. Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Dissertation.
- Tong, H. H., Shekunov, B. Y., York, P. und Chow, A. H. (2001). Characterization of two polymorphs of salmeterol xinafoate crystallized from supercritical fluids. *Pharm Res* 18(6): 852-8.
- Tong, H. H., Shekunov, B. Y., York, P. und Chow, A. H. (2002). Influence of polymorphism on the surface energetics of salmeterol xinafoate crystallized from supercritical fluids. *Pharm Res* 19(5): 640-8.
- USP 29 (2006). Monographie : Organic Volatile Compounds, The United States Pharmacopeial Convention.
- Velaga, S. P., Berger, R. und Carlfors, J. (2002). Supercritical fluids crystallization of budesonide and flunisolide. *Pharm Res* 19(10): 1564-71.
- Weidner, E., Knez, Z. und Novak, Z. (1995). Process for preparation of particles or powders. 95-EP5389521688
- Wettengel, R., Berdel, D., Hofmann, D. und Krause, J. (1998). *Pneumologie*. Stuttgart, Thieme Verlag.

York, P. (1999). Strategies for particle design using supercritical fluid technologies. 2(11): 430-440.

York, P. Powdered raw materials: Characterizing batch uniformity. Respir. Drug Del. IV (1994) 83-91.

DANKSAGUNG

Nachdem die eigentliche Arbeit nun erledigt ist, folgt hier der wohl schwierigste Teil (Hückstädt, 2005). Es gibt so viele Menschen, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben und ohne die diese Arbeit sicher nicht das geworden wäre, was sie jetzt ist. Allen diesen Menschen in diesem Abschnitt zu danken würde sicherlich den Rahmen sprengen, so dass keiner traurig sein sollte den ich hier nicht erwähne, denn ich habe euch nicht vergessen.

Mein größter Dank richtet sich an Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller, der mich in seinen Arbeitskreis aufgenommen hat. Die Überlassung der sehr interessanten Thematik war zwar nicht immer nur mit Freude verbunden, doch hat es viel Spaß gemacht mit Ihnen zusammenzuarbeiten.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an PD Dr. Steckel (Hardy), der mir viele Inspirationen für diese Arbeit lieferte. Dein offenes Ohr für Probleme und Nöte, aber auch deine Diskussionsbereitschaft haben mir oft sehr weitergeholfen. Ich wünsche dir für deine Zukunft alles Gute und hoffe, dass du den richtigen Weg für dich und deine Familie findest.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Schwarz und der gesamten Abteilung für Lebensmitteltechnologie für die wirklich nette Zusammenarbeit bedanken.

Nun soll aber auch genug sein mit dem Dankeschön für die Chefetage, denn da warten ja noch eine Menge anderer Personen, die hier nicht unerwähnt bleiben dürfen. Da ist zum einen der „alte“ Arbeitskreis (Kai L., Norbert, Peter, Birgit, Sven, Frank, Sebastian, Inga-Lis, Olli, Günny, Katja), der mich sehr nett aufgenommen und schnell integriert hat. Ihr habt mir die Anfangszeit mit vielen Ratschlägen und eurer Erfahrung wirklich erleichtert. Daher ist es auch schön anzusehen, dass mit vielen von euch bis heute Freundschaften bestehen, die hoffentlich noch lange Bestand haben werden. Ich könnte jetzt viele kleine Geschichten anfangen, aber ich denke, dass jeder von euch, der diese Zeilen liest, sich von selbst an viele Anekdoten erinnert. Danke !!!

Eine Sonderstellung nimmt dabei Kai ein, der kurz vor mir anfang und auch kurz vor mir seine Promotionszeit beendete. Es war eine tolle Zeit und mir immer wieder eine wahre Freude dir beim Verzehr deines zweiten Frühstücks zuzusehen. Darüber hinaus freut es mich umso mehr, dass über die Promotionszeit hinaus eine wirkliche Freundschaft entstanden ist.

Doch mir folgten natürlich auch weitere Kollegen, mit denen es nie langweilig wurde: Imke, Astrid und Dennis, mit dem ich die Leidenschaft HSV teilen konnte, Malte, Heike und Christina, die nun doch alle noch vor mir fertig geworden sind, Fadi, unser Arbeitstier aus Ägypten, Kew und Nate, unsere thailändischen Austauschdoktorandinnen, Steve, mein Leidensgenosse, Frank, Julia, Alexandra, Susanne, Henrike, Maren und Claudia, die noch mehr oder weniger Zeit vor sich haben, Holger und Regina, mit denen man jederzeit über alles reden und diskutieren konnte und nicht zuletzt Thorsten, der es neben Lost noch geschafft hat, meine Arbeit Korrektur zu lesen. Es war eine schöne Zeit mit euch, vielen Dank !!!

Daneben gibt es natürlich auch noch die guten Seelen des Hauses, ohne die ich bestimmt das ein oder andere Mal aufgeschmissen gewesen wäre. Auch euch sei allen gedankt für die schöne Zeit: Regina, Nora, Dirk, Rüdi, Kalle, Arne, Detlev und Frau Schütt.

Weiterhin geht mein Dank an meine lieben Eltern, die zwar nicht unmittelbar an diesem Werk beteiligt waren, jedoch einen großen Anteil dazu beigetragen haben, dass ich letztendlich diese Zeilen hier nun schreiben kann.

Und zu guter Letzt ein riesiges Dankeschön an Katrin. Du warst immer für mich da, wenn ich dich gebraucht habe und wenn es vielleicht auch oft schwer für dich war mich zu motivieren, so hast du es im Endeffekt doch immer wieder geschafft. Ich hoffe, ich kann dir bei deinem Vorhaben eine genauso große Stütze sein.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Vor- und Familienname: Lars Pichert
Geburtsdatum: 06. April 1976
Geburtsort: Hamburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung

06 / 1986 - 06 / 1995 Friedrich-Ebert Gymnasium, Hamburg

Wehrdienst

07 / 1995 - 06 / 1996 Grundwehrdienst in Kellinghusen

Studium und Ausbildung

10 / 1996 - 05 / 2001 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

1999 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

2001 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

06 / 2001 - 12 / 2001 1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Heidemarkt-Apotheke, München

01 / 2002 - 05 / 2002 2. Hälfte des Praktischen Jahres am Pharm. Institut der CAU-Kiel, Abteilung Pharm. Technologie und Biopharmazie

2002 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit

06 / 2002 - heute Wissenschaftlicher Angestellter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h. c. B. W. Müller

ERKLÄRUNG ZU § 10 ABS. 2, NR. 2 A), B), C)

Der Inhalt der im Rahmen des Antrages zur Promotionszulassung eingereichten Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Die eingereichte Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis.

Lars Pichert