

**Herstellung und Charakterisierung von mesopräbeladenen
Nanopartikeln für die Behandlung chronisch entzündlicher
Darmerkrankungen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Senyu Chen

Kiel

2007

Referent: PD Dr. habil. H. Steckel

Koreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. B. W. Müller

Datum der mündlichen Prüfungen: 02., 04. und 05. Juni 2007

Zum Druck genehmigt: Juni 2007

Gez. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Grotemeyer

(Dekan)

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.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabelleverzeichnis.....	10
1 Einführung.....	12
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	12
1.2 Targeting und kontrollierte Freisetzung bei Darmerkrankungen.....	15
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2 Materialien und Methoden.....	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Arzneistoffe.....	19
2.1.1.1 Mesopram.....	19
2.1.1.2 Budesonid.....	20
2.1.2 Hilfsstoffe und sonstige Materialien.....	21
2.2 Methode.....	27
2.2.1 Allgemeine Methoden.....	27
2.2.1.1 Partikelgröße.....	27
2.2.1.2 Zetapotenzial.....	29
2.2.1.3 Bestimmung des Wirkstoffgehalts mittels HPLC.....	30
2.2.1.4 Gefriertrocknung.....	32
2.2.1.5 Chemische bzw. physikalische Stabilität.....	35
2.2.1.6 Wirkstofffreisetzung.....	37
2.2.1.7 Taguchi Orthogonal Array (Taguchi OA).....	37
2.2.1.8 Beladungskapazität.....	42
2.2.1.9 Bestimmung des Restlösungsmittels mit Hilfe von GC.....	43
2.2.2 Mesopram beladenen Eudragit [®] S100 Nanopartikel.....	44
2.2.2.1 Allgemeine Information.....	44
2.2.2.2 Herstellungsmethode.....	44
2.2.2.3 Verkapselungsrate.....	48
2.2.2.4 pH-Stabilität der Mesopram beladenen Eudragit [®] S100 Nanopartikel im SIF.....	49
2.2.3 Mesopram beladenen Eudragit [®] RS Nanopartikel.....	49

2.2.3.1	Allgemeine Information	49
2.2.3.2	Herstellungsmethode	51
2.2.4	Mesopram beladene Chitosan Nanopartikel	51
2.2.4.1	Allgemeine Information	51
2.2.4.2	Herstellungsmethode	51
2.2.5	Mesopram beladenen CAB, PCL und EC Nanopartikel	57
2.2.5.1	Allgemeine Information	57
2.2.5.2	Herstellungsmethode	58
2.2.5.3	Bestimmung der Verkapselungs- sowie der Beladungsrate	59
2.2.5.4	Bestimmung der Partikelgröße mit DLS	59
2.2.6	Maßstabsvergrößerung mit dem Homogenisator	60
3	Ergebnisse und Diskussion	61
3.1	Mesopram beladene Eudragit [®] S100 Nanopartikel	61
3.1.1	Vorversuch	61
3.1.2	Charakterisierung der Eudragit [®] S100 Nanopartikel	62
3.1.2.1	Partikelgröße (nm)	62
3.1.2.2	Zetapotenzial (mV)	65
3.1.2.3	Verkapselungsrate	67
3.1.2.4	pH-Stabilität	68
3.1.2.5	Zusammenfassung	70
3.2	Mesopram beladenen Eudragit [®] RS Nanopartikel	71
3.2.1	Vorversuch	71
3.2.2	Charakterisierung der Eudragit [®] RS Nanopartikel	72
3.2.2.1	Partikelgrößenbestimmung	72
3.2.2.2	Verkapselungsrate	75
3.2.2.3	Zetapotenzial	76
3.2.2.4	Stabilität	76
3.2.3	Zusammenfassung	77
3.3	Mesopram beladene Chitosan Nanopartikel	79
3.3.1	Tokumitsu's Methode - Abtrennung und Reinigung der Chitosan Nanopartikel	79
3.3.2	Charakterisierung der Chitosan Nanopartikel	81
3.3.2.1	Partikelgröße (nm)	81
3.3.2.2	Verkapselungsrate	81

3.3.2.3	Zetapotenzial (mV)	82
3.3.2.4	Stabilität	83
3.3.2.5	Zusammenfassung	84
3.4	Mesopram beladene PCL Nanopartikel	84
3.4.1	Vorversuch	84
3.4.2	Charakterisierung der PCL Nanopartikel	86
3.4.2.1	Partikelgröße (nm)	86
3.4.2.2	Zetapotenzial (mV)	87
3.4.2.3	Verkapselungsrate	87
3.4.2.4	Stabilität	88
3.4.2.5	Zusammenfassung	90
3.5	Mesopram beladene CAB Nanopartikel	91
3.5.1	Vorversuche	91
3.5.2	Experimententwurf mit Design-Expert	92
3.5.3	Analyse nach Taguchi OA	98
3.5.4	Optimierung der Herstellungsbedingungen	104
3.5.5	Herstellung mit optimierter Rezeptur	106
3.5.5.1	Partikelgröße (nm)	106
3.5.5.2	Verkapselungsrate	108
3.5.5.3	Zetapotenzial (mV)	109
3.5.6	Stabilität	110
3.5.6.1	Stabilität der Partikel im SIF	110
3.5.6.2	Stabilität der Partikel - Gefriertrocknung	111
3.5.6.3	Stabilität des Wirkstoffs	113
3.5.7	Mesopram-Freisetzung	114
3.5.8	Vergleich mit der Modellsubstanz Budesonid	115
3.5.9	Zusammenfassung	117
3.6	Mesopram beladene EC Nanopartikel	118
3.6.1	Vorversuch	118
3.6.2	Experimententwurf mit Design-Expert	119
3.6.3	Analyse nach Taguchi OA	121
3.6.4	Optimierung der Herstellungsbedingungen	126
3.6.5	Herstellung mit optimierter Rezeptur	128
3.6.5.1	Partikelgröße und Verkapselungsrate	128

3.6.5.2	Zetapotenzial	130
3.6.5.3	Stabilität	131
3.6.6	Wirkstofffreisetzung.....	135
3.6.7	Zusammenfassung.....	136
3.7	Maßstabsvergrößerung mit Hilfe eines Homogenisators	137
3.7.1	Partikelgröße	138
3.7.2	Verkapselungsrate	139
3.7.3	Zetapotenzial	140
3.7.4	Stabilität	141
3.7.5	Zusammenfassung.....	141
4	Zusammenfassung der Arbeit.....	143
5	Abstract (English)	145
6	Anhang	147
6.1	Liste der verwendeten Abkürzungen.....	147
6.2	Materialien in der Übersicht.....	148
7	Literaturverzeichnis.....	150

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Strukturformel von Mesopram	19
Abb. 2.2:	Strukturformeln von Budesonid	20
Abb. 2.3:	Das Turbiscan [®] Prinzip: Optisches Abtastverfahren des Turbiscan [®] in Transmission und Rücksteuerung	36
Abb. 2.4:	Experimentale Matrix der Software Design Expert für die geplanten Optimierungsversuche (L ₁₆)	41
Abb. 2.5:	Die Zustände der vier Einflussfaktoren sowie weitere Parameter der Tabellenpalte „f(x) Models“	42
Abb. 2.6:	Die graphische Darstellung der klassischen Becherglas-Methode	45
Abb. 2.7:	Aufbau eines Kaskaden-Mikromischers	46
Abb. 2.8:	Die graphische Darstellung des Mischvorgangs mit dem Kaskaden-Mikromischer für die Herstellung der Mesopram beladenen Eudragit [®] S100 Nanopartikel	48
Abb. 2.9:	Herstellung Mesopram beladener Chitosan Nanopartikel mit Hilfe der Emulsions-Tröpfchen Koaleszenz Methode	52
Abb. 2.10:	Herstellung von Mesopram beladenen Chitosan Nanopartikel mit Hilfe der Emulsions-Tröpfchen Koaleszenz Methode	56
Abb. 3.1:	100 % Eudragit [®] S100	61
Abb. 3.2:	Mesopram in Eudragit [®] S100 (50 %)	61
Abb. 3.3:	Mesopram in Eudragit [®] S100 (60 %)	61
Abb. 3.4:	100 % Mesopram	61
Abb. 3.5:	Graphische Darstellung der Einflüsse der Herstellungsmethode bzw. der Tensidart auf die Partikelgrößen von Eudragit [®] S100 Nanopartikeln (MW±SD; n=3)	64
Abb. 3.6:	Vergleich des Zetapotenzials der Eudragit [®] S100 Nanopartikel mit und ohne Mesopram hergestellt mittels der klassischen Becherglas-Methode (MW ± SD; n=3)	65
Abb. 3.7:	Vergleich des Zetapotenzials der Mesopram beladenen Eudragit [®] S100 Nanopartikel, hergestellt mittels der klassischen Becherglas-Methode sowie der Mikromischer-Methode (MW ± SD; n=4)	66

Abb. 3.8:	Stabilität der Mesopram beladenen Eudragit [®] S100 Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 und pH 7,0	68
Abb. 3.9:	Stabilität der Mesopram beladenen Eudragit [®] S100 Nanopartikel im SIF bei pH 6,8	69
Abb. 3.10:	100 % Eudragit [®] RS	71
Abb. 3.11:	Mesopram in Eudragit [®] RS (60 %)	71
Abb. 3.12:	Mesopram in Eudragit [®] RS (65 %)	71
Abb. 3.13:	Mesopram in Eudragit [®] RS (70 %)	71
Abb. 3.14:	Die intensitätsgewichteten PartikelgröÙeverteilung der mesoprambeladenen Eudragit [®] RS Nanopartikel hergestellt mit O/O Lösungsmittel Austausch Methode.....	73
Abb. 3.15:	Die intensitätsgewichtete PartikelgröÙe der Mesopram beladenen Eudragit [®] RS Nanopartikel hergestellt mit der Bodmeier Methode.....	74
Abb. 3.16:	REM Aufnahme der Mesopram beladenen Eudragit [®] RS Nanopartikel	75
Abb. 3.17:	Bestimmung der Stabilität Mesopram beladener Eudragit [®] RS Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 mit Turbiscan [®] M 1000	77
Abb. 3.18:	Naopartiekel enthaltende Gel-Struktur aus Tensiden und Paraffinöl.....	79
Abb. 3.19:	Zerstörung der Gel-Struktur bei Zugabe von 96% Ethanol	79
Abb. 3.20:	Mikroskopische Aufnahme der Paraffinöltröpfchen stabilisiert von Chitosan Nanopartikel (Mittelschicht der Lösung in Abb. 3.19)	80
Abb. 3.21:	Die resultierenden intensitätsgewichteten PartikelgröÙeverteilungen dreier Wiederholungsversuche	81
Abb. 3.22:	Bestimmung der Stabilität der Chitosan Nanopartikel im SIF mittels Turbiscan [®] M 1000	83
Abb. 3.23:	100 % PCL	85
Abb. 3.24:	5 % Mesopram in PCL	85
Abb. 3.25:	REM Aufnahme der Mesopram beladenen PCL Nanopartikel.....	86
Abb. 3.26:	Bestimmung der Stabilität Mesopram beladener PCL-Nanopartikel im SIF bei pH6,8 mit Hilfe des TurbiScan [®] M 1000.....	89
Abb. 3.27:	Die Veränderung der PartikelgröÙeverteilung der Mesopram beladenen PCL-Nanopartikel vor und nach dem Stabilitätsversuch im SIF bei pH 6,8	90
Abb. 3.28:	100 % CAB 70.000	91
Abb. 3.29:	Mesopram in CAB 70.000 (60 %)	91
Abb. 3.30:	Mesopram in CAB 70.000 (70 %)	91

Abb. 3.31:	100 % Mesopram	91
Abb. 3.32:	Einfluss der Tensid-Konzentration (Natriumcholot) auf die Partikelgröße der Nanopartikel (CAB 70000)	93
Abb. 3.33:	Einfluss der Tensidkonzentration (Natriumcholot) auf die Verkapselungsrate des Wirkstoffs (Mesopram) in den Nanopartikeln (CAB 70000)	94
Abb. 3.34:	Vergleich der Zetapotentials von Ethocel [®] 100 Nanopartikel hergestellt mit SDS und Natriumcholot (MW ± SD; n=3)	95
Abb. 3.35:	Vergleich des Tensid-Einflusses (Natriumcholot und SDS) auf die Partikelgröße bei der Herstellung Mesopram beladener Ethocel [®] 100 Nanopartikel	96
Abb. 3.36:	Vergleich des Tensid-Einflusses (Natriumcholot und SDS) auf die Verkapselungsrate bei der Herstellung Mesopram beladener Ethocel [®] 100 Nanopartikel	96
Abb. 3.37:	Liste der Taguchi OA Versuchsplanung für die Optimierung der CAB 70.000 Partikelgröße bzw. Verkapselungsrate und die generierten Messdaten	97
Abb. 3.38:	Ergebnisse der ANOVA-Analyse für das Polymer CAB 70,000 - Partikelgröße	98
Abb. 3.39:	Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren A und B auf die Partikelgröße	99
Abb. 3.40:	Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren C und B auf die Partikelgröße	100
Abb. 3.41:	Der Einfluss der Faktoren C und D auf die Partikelgröße	101
Abb. 3.42:	Ergebnisse der Signifikanzprüfung bei ANOVA für die Verkapselungsrate von CAB 70,000 Nanopartikel	102
Abb. 3.43:	Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren C und B auf die Verkapselungsrate	103
Abb. 3.44:	Einfluss der Faktoren C und D auf die Verkapselungsrate	104
Abb. 3.45:	Optimierung der Herstellungsbedingungen für Mesopram beladene CAB 70.000 Nanopartikel	105
Abb. 3.46:	Vergleich der Partikelgrößen Mesopram beladener CAB 30.000 und CAB 70.000 Nanopartikel hergestellt mit der optimierten Rezeptur (n=4) ...	107
Abb. 3.47:	REM Aufnahmen Mesopram beladener CAB 70.000 Nanopartikel	108
Abb. 3.48:	Bestimmung der Stabilität der CAB 70.000 Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 mittels Turbiscan [®] M 1000	110

Abb. 3.49:	Die Veränderung der PartikelgröÙeverteilung von Mesopram beladenen CAB 70.000 Nanopartikel vor und nach dem Stabilitätsversuch im SIF bei pH 6,8.....	111
Abb. 3.50:	Linke Seite: Photo eines Lyophilisats Mesopram beladener CAB 70.000 Nanopartikel.....	112
Abb. 3.51:	Qualitative Bestimmung der Abbauprodukte von Mesopram mittels HPLC nach der Herstellung der CAB 70.000 Nanopartikel	113
Abb. 3.52:	Qualitative Bestimmung der Abbauprodukte von Mesopram in lyophilisierten CAB 70.000 Nanopartikel mittels HPLC nach sechsmonatiger Lagerung....	113
Abb. 3.53:	Die kumulierte Mesopramfreisetzung aus den CAB 70.000 Nanopartikel (MW ± SD; n=3).....	114
Abb. 3.54:	Budesonid-Freisetzung aus den CAB 70.000 Nanopartikel verglichen mit der Freisetzung aus der Bulkware (MW ± SD; n=3).....	116
Abb. 3.55:	Mesopram in Ethocel [®] 100 (50 %)	118
Abb. 3.56:	Mesopram im Ethocel [®] 100 (60 %)	118
Abb. 3.57:	Tabelle der Taguchi OA Versuchsplanung zur Optimierung der Ethocel [®] 100 PartikelgröÙe bzw. der Verkapselungsrate.....	120
Abb. 3.58:	Ergebnisse der ANOVA-Analyse für das Polymer Ethocel [®] 100 bezüglich der PartikelgröÙe	121
Abb. 3.59:	Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren A und B auf die PartikelgröÙe	123
Abb. 3.60:	Der Einfluss der Faktoren C und D auf die PartikelgröÙe	124
Abb. 3.61:	Ergebnisse der Signifikantprüfung bei ANOVA für die Verkapselungsrate von Ethocel [®] 100 Nanopartikeln.....	125
Abb. 3.62:	Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren C und B auf die Verkapselungsrate	126
Abb. 3.63:	Numerische Optimierung - Rezeptur der Mesopram beladenen Ethocel [®] 100 Nanopartikel.....	127
Abb. 3.64:	REM Aufnahme der Mesopram beladenen Ethocel [®] 100 Nanopartikel.....	130
Abb. 3.65:	Bestimmung der Stabilität der Ethocel [®] 100 Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 mittels Turbiscan [®] M 1000	131
Abb. 3.66:	Die Veränderung der PartikelgröÙeverteilung von Mesopram beladenen Ethocel [®] 100 Nanopartikel vor und nach dem Stabilitätsversuch im SIF bei pH 6,8.....	132

Abb. 3.67:	Linke Seite: Photo eines Lyophilisats der Mesopram beladenen Ethocel [®] 100 Nanopartikel	133
Abb. 3.68:	Qualitative Bestimmung der Abbauprodukte von Mesopram mittels HPLC nach der Herstellung der Ethocel [®] 100 Nanopartikel	134
Abb. 3.69:	Qualitative Bestimmung der Abbauprodukte von Mesopram in lyophilisierten Ethocel [®] 100 Nanopartikel mittels HPLC nach sechsmonatiger Lagerung...	134
Abb. 3.70:	Die kumulierte Mesopramfreisetzung aus Ethocel [®] 100 Nanopartikel (MW ± SD; n=3)	135
Abb. 3.71:	Vergleich der Mesopramfreisetzung aus CAB 70.000 und Ethocel [®] 100 Nanopartikeln (MW ± SD; n=3)	136
Abb. 3.72:	Mesopram beladene CAB 70.000 Nanopartikel hergestellt mit der optimierten Rezeptur nach der Maßstabsvergrößerung.....	138
Abb. 3.73:	Gegenüberstellung der Partikelgrößen von mesoprambeladenen Ethocel [®] 100 und CAB 70.000 Nanopartikeln hergestellt mittels Ultraschall sowie im Homogenisator (MW ± SD; n=4).....	139
Abb. 3.74:	Gegenüberstellung der Verkapselungsrate von Mesopram beladenen Ethocel [®] 100 und CAB 70.000 Nanopartikeln, hergestellt mit Hilfe von Ultraschall sowie im Homogenisator (MW ± SD; n=4)	140
Abb. 3.75:	Gegenüberstellung der Zetapotenziale mesoprambeladener Ethocel [®] 100 und CAB 70.000 Nanopartikel, hergestellt mit Hilfe von Ultraschall sowie im Homogenisator (MW ± SD; n=4).....	141

Tabellerverzeichnis

Tabelle 2.1:	Hydrolyse von Mesopram bei 37 °C in Abhängigkeit zum pH-Wert.....	20
Tabelle 2.2:	Gefriertrocknungsprogramm.....	34
Tabelle 2.3:	Vergleich der Versuchesanzahlen bei Taguchi OA mit den Vollversuchen....	38
Tabelle 2.4:	Tabelle der L4 (2 ³) Orthogonal Array.....	39
Tabelle 2.5:	Die Faktoren A (Wirkstoffgehalt), B (Volumen der zugesetzten organischen Phase), C (Tensid-Konzentration) und D (Tensidart) sowie die dazugehörigen Stufen	40
Tabelle 3.1:	Vergleich der Eudragit [®] S100 Nanopartikelgrößen mit und ohne Mesopram.	63
Tabelle 3.2:	Vergleich der Einflüsse der Herstellungsmethode bzw. der Tensidart auf die Partikelgrößen von Mesopram beladenen Eudragit [®] S100 Nanopartikeln	64
Tabelle 3.3:	Vergleich der Verkapselungsrate von Mesopram beladenen Eudragit [®] S100 Nanopartikel hergestellt mit der klassischen Becherglas-Methode sowie der Mikromischer-Methode.....	67
Tabelle 3.4:	Die Partikelgröße von mesoprambeladenen Eudragit [®] RS Nanopartikeln hergestellt mit der O/O Lösungsmittel Austausch Methode.....	72
Tabelle 3.5:	Die Partikelgröße von mesoprambeladenen Eudragit [®] RS Nanopartikeln hergestellt mit der Bodmeier Methode.....	74
Tabelle 3.6:	Die Verkapselungsrate bzw. die Beladung von Mesopram in den Eudragit [®] RS Nanopartikel hergestellt mit der Bodmeier Methode.....	75
Tabelle 3.7:	Zetapotenzial der Mesopram beladenen Eudragit [®] RS Nanopartikel hergestellt mit der Bodmeier Methode	76
Tabelle 3.8:	Die Verkapselungsrate bzw. die Beladung von Mesopram in den Chitosan Nanopartikel hergestellt mittels der Tokumitsu's Methode.....	82
Tabelle 3.9:	Zetapotenzial der Chitosan Nanopartikel hergestellt mit der Tokumitsu's Methode.....	82
Tabelle 3.10:	Die Partikelgrößen der Mesopram beladenen PCL Nanopartikel.....	86
Tabelle 3.11:	Das Zetapotenzial der Mesopram beladenen PCL Nanopartikel.....	87
Tabelle 3.12:	Die Verkapselungsrate bzw. Beladung von Mesopram in PCL Nanopartikel.	88
Tabelle 3.13:	Vergleich der Verkapselungsrate der mit der optimierten Rezeptur hergestellten CAB 70.000 sowie CAB 30.000 Nanopartikel.....	108

Tabelle 3.14: Vergleich der Zetapotentiale der CAB 70.000 und CAB 30.000 Nanopartikel hergestellt mit der optimierten Rezeptur	109
Tabelle 3.15: Die Verkapselungsrate bzw. Beladung von Budesonid in CAB 70.000 Nanopartikel	115
Tabelle 3.16: Die Ergebnisse der Vorversuchen bei der Herstellung Mesopram beladener Ethocel [®] 45 Nanopartikel.....	119
Tabelle 3.17: Messdaten der mesoprabeladenen Ethocel [®] 100 Nanopartikel nach der Herstellung mit der ermittelten optimalen Rezeptur	129
Tabelle 3.18: Zetapotenzial der Ethocel [®] 100 Nanopartikel, hergestellt mit der optimierten Rezeptur	130

1 Einführung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Unter dem Krankensbild „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ (CED) versteht man wiederkehrende und anhaltende Entzündungen des Darms. In Deutschland leiden ca. 300.000 Menschen an einer CED. Die Tendenz ist zunehmend (Ebinger, Leidl et al., 2004). Je nach Befall der Darmabschnitte und der Begleitsymptome unterscheidet man zwei Subtypen der CED: Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa.

Morbus Crohn zeigt Entzündungsherde im ganzen Magen-Darm-Trakt (überwiegend der letzte Teil des Dün- bzw. Dickdarms), während bei der **Colitis ulcerosa** nur der Dick- bzw. Enddarm betroffen ist (Kirsner, 1991; Maxwell-Armstrong and Cohen, 2003). In den akuten Schüben der Colitis ulcerosa bilden sich Geschwüre, die eine blutige Diarrhöe verursachen (Roy, 1997). Beim Morbus Crohn entzünden sich, in den befallenen Darmabschnitten, häufig alle Darmwandschichten, wobei zwischen den Entzündungsherden immer wieder gesunde Stellen liegen. Heilt ein Entzündungsherd ab, entstehen Narben, die den Darm zusammenziehen und verengen. Vernarbte Abschnitte können zu einem Darmverschluss führen. In schweren Fällen bilden sich auch Abszesse oder Fisteln, was zu einer nicht mehr ausreichenden Nahrungsaufnahme in den betroffenen Darmabschnitten führt. Oft ist dann ein chirurgischer Eingriff unvermeidbar.

Typische Symptome einer CED sind anhaltende Diarrhöe, krampfartige Bauchschmerzen, Gewichtsverluste und Darmblutungen. 25 Prozent der Patienten leiden gleichzeitig an Arthritis. Begleitsymptome wie Erythema nodosa, Aphthen, oder Hepatitis können ebenfalls auftreten.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind in den ersten Jahren oft latent und brechen oft erst zwischen dem 15 ten und dem 35 ten Lebensjahr aus. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. Die Erkrankung erscheint in immer wiederkehrenden Schüben und beeinträchtigt das ganze Leben eines Erkrankten.

Die Ursachen sind bisher nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass die Erkrankung durch eine Überreaktion des Immunsystems ausgelöst wird. Sowohl die genetische Determination, als auch Faktoren der Umwelt (z.B. ungesunde Ernährung) können die Erkrankung auslösen (Danese, Sans et al., 2004; Hugot, 2004).

Die CED gehört zu den Autoimmunkrankheiten und ist bis heute noch nicht heilbar. Die Behandlung setzt auf die Linderung der Beschwerden (Symptomatische Therapie). Durch

Medikamente können lokale Symptome vermindert und die Zeiten zwischen den Schüben verlängert werden.

Für detaillierte Informationen über dieses Krankheitsbild sei auf weiterführende Literatur (Fleig, 1994; Zonderman and Ronald, 2000) verwiesen:

Normalerweise können vier der folgenden Medikamentengruppen zur Behandlung dieser Krankheit eingesetzt werden (Sands, 2000):

1. *Glucocorticoid und NSAIDs*

Die Glucocorticoide Cortison und Hydrocortison gehören zu den wichtigen endogenen Modulatoren der Immunantwort, welche für die systemische Behandlung von CED eingesetzt werden (Margolin, Krumholz et al., 1988). Im Rahmen akuter Stressreaktionen kommt es nach Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zur Freisetzung von endogenen Corticosteroiden, die akute Entzündungs- und Immunreaktionen hemmen. Cortison bzw. seine Derivate werden seit Jahrzehnten erfolgreich zur Behandlung von Entzündungen und Autoimmunkrankheiten eingesetzt, jedoch versteht man erst heute die molekularen Wirkmechanismen (Boumpas, Chrousos et al., 1993). Cortison ist bei oraler, parenteraler sowie rektaler Behandlung der aktiven Darmerkrankung effektiv, aber wegen der systemischen Nebenwirkungen nicht für die Dauertherapie geeignet (Hawthorne and Hawkey, 1989).

2. *Immunsuppressiva (Azathioprine)*

Immunsuppressiva werden in den folgenden Fällen eingesetzt:

Bei schweren Verläufen der CED, bei denen Glucocorticoide keine ausreichende Wirksamkeit aufweisen, zu hohen Nebenwirkungen verursacht oder aus einem anderen Grund nicht gegeben werden können. Besonders bei Kindern und Jugendlichen müssen die unterschiedlichen Nebenwirkungen von Immunsuppressiva und Glucocorticoiden sorgfältig gegeneinander abgewogen werden (Podolsky, 2002).

3. *TNF-Antikörper (Infliximab)*

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) wird quantitativ vor allem von aktivierten Monozyten/Makrophagen, Memory-T-Zellen und Killerzellen gebildet. Aber auch das präformierte und damit nach Stimulation extrem schnell freigesetzte TNF- α aus Mastzellen spielt eine wichtige Rolle in der akuten Entzündungsheilung und bei der Wundheilung der Haut und Schleimhaut. TNF- α ist der stärkste endogene Aktivator des akuten Stresstranskriptionsfaktors NF κ B. Des Weiteren induziert TNF- α in Monozyten/Makrophagen die Expression proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-1, IL-6, MIF). TNF- α spielt eine Schlüsselrolle bei physiologischen, aber auch bei unerwünschten Entzündungs- und Immunreaktionen. Da diese Prozesse sehr redundant ablaufen, hatte man die Bedeutung von TNF- α vor allem für chronische Entzündungen zunächst unterschätzt. Die Studien an Patienten mit M. Crohn bzw. Rheumatoider Arthritis verliefen überraschend erfolgreich (Cottone, Mocchiari et al., 2006).

Zur Behandlung der chronischen Darmentzündung (M. Crohn) bzw. der Rheumatoiden Arthritis gibt es den TNF-Antikörper Infliximab (Remicade[®]) auf dem Markt. Dieser Stoff bindet Botenstoffe (proinflammatorische Zytokine) zwischen den Entzündungszellen und verhindert so eine Ausbreitung der Entzündungsreaktion (Rutgeerts, Van et al., 2004).

4. *Phosphodiesterasehemmstoffe*

Bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erfolgt die Signalübertragung nach Andocken des Liganden an den Rezeptor. Die dadurch bewirkte Konformationsänderung des Rezeptors stimuliert oder hemmt die Aktivität des Enzyms (AC, Adenylatcyclase) und beeinflusst dadurch die Produktion des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP). cAMP wird durch Phosphodiesterase (PDE) abgebaut. Der Phosphodiesterasehemmstoff stoppt die Aktivität des Enzyms. und löst eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in den Zellen aus. Hierdurch wird die Proteinkinase A aktiviert. Die Aktivierung von Proteinkinasen löst dann die Phosphorylierung von Proteinen sowie die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus. Letztere sind für die Regulation zahlreicher zellulärer Funktionen von zentraler Bedeutung (Lüllmann, Mohr et al., 2006).

Elf PDE-Subtypen sind bis jetzt identifiziert worden (Xiang, Naro et al., 2005). Die PDE-IV ist für die Hydrolyse der „second messenger“ cAMP und cGMP in Nerven- und Immunzellen verantwortlich (Zhu, Mix et al., 2001).

Es stehen zahlreiche spezielle Phosphodiesterasehemmstoffe für pharmazeutische Anwendungen zur Verfügung.

Der in dieser Arbeit untersuchte Arzneistoff Mesopram ist ein selektiver PDE-IV Hemmstoff, welcher von der Firma Schering AG zur Behandlung der Multiple Sklerose entwickelt wurde. Wegen ausgeprägter zentraler Nebenwirkungen nach hoch dosierter oraler Applikation wurde die Entwicklung der Substanz jedoch eingestellt. Die niedrige Dosierung bei einer lokalen Applikation zur Behandlung von CED könnte einen therapeutischen Einsatz dieser Substanz ermöglichen.

Die Anwendung von Mesopram löst eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration durch die Hemmung der Aktivität von PDE-IV in den Nervenzellen bzw. in den Makrophagen aus, welches die Zunahme der Synthese und Freisetzung von Noradrenalin induzieren kann. Die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α) wird dadurch gehemmt.

1.2 Targeting und kontrollierte Freisetzung bei Darmerkrankungen

Für die Behandlung der CED stehen zahlreiche Wirkstoffe zur Verfügung. Optimaler Weise ist der Wirkstoff in einer geeigneten pharmazeutischen Arzneiform eingebettet, die, je nach Darreichungsform und klinischer Anwendung, den Wirkstoff am Bestimmungsort in ausreichender Menge kontrolliert freisetzt. Für das Darm-Targeting zur Behandlung der CED muss der Wirkstoff bei oraler Einnahme im Darm freigesetzt werden. Um das Ziel zu erreichen, werden zurzeit vier galenische Ansätze verfolgt (Rubinstein, 1995; Leopold, 1999; Friend, 2005):

1. Zeit-Kontrollierte Freisetzung: Eine typische Formulierung, welche auf diesem Prinzip basiert, ist die Pulsincap[®], patentiert im Jahr 1990 (MacNeil, Rashid et al., 1990). Das Prinzip beruht auf der Überwindung der Magen- oder Dünndarmtransitzeit, in der keine Wirkstofffreisetzung stattfindet. Die Formulierung besteht aus einem wasserunlöslichen Kapselunterteil und einem quellenden Pfropf als Verschluss. In Abhängigkeit von der

Geometrie und der Struktur des Pfropfes verzögert sich die Arzneistofffreigabe um ca. 5 Stunden. Präparate mit wasserunlöslichen aber quellenden Retardüberzügen (Eudragit[®] RS oder Ethylcellulose) gehören ebenfalls zu dieser Freisetzungsort (Narisawa, Nagata et al., 1994; Niwa, Takaya et al., 1995; Leopold, 1999).

2. pH-Kontrollierte Freisetzung: Viele für das Darm-Targeting entwickelte Formulierungen basieren auf den physiologischen pH-Unterschieden zwischen Magen und Dünndarm oder zwischen Dünndarm und distalem Dickdarm (z.B. Budenofalk[®]). Magensaftresistente Überzüge schützen die Arzneiformen vor dem sauren Magenmilieu und erlauben ein Dünndarm-Targeting, Außerdem können die Arzneiformen unter Kontrolle der Polymerschichtdicke und des Auflösungs-pHs unbeschadet den Dünndarm passieren, und dann den Dickdarm erreichen. Der Wirkstoff kann damit sowohl im Dünndarm, als auch im Dickdarm, gezielt freigesetzt werden (Leopold, 1999).
3. Enzym-Kontrollierte Freisetzung: Die enzymkontrollierte Freisetzung beruht auf der Existenz von enzymproduzierenden Mikroorganismen im Dickdarm. Die Dickdarmmikroflora bildet eine Reihe von Enzymen, deren Aktivität für das Dickdarm-Targeting genutzt werden kann. Eine Formulierung mit bioabbaubareren Überzugsmaterialien (Chitosan z.B.) bleibt bis zum Dickdarm intakt. Der Wirkstoff wird dann durch den Abbau der Überzugsmaterialien von den Dickdarm besiedelnden Mikroorganismen freigesetzt (Lorenzo-Lamosa, Remunan-Lopez et al., 1998).
4. Druck-Kontrollierte Freisetzung: Druck-Kontrollierte Systeme nutzen die physiologischen Verhältnisse des Dickdarms. Dieser ist zum einen durch eine erhöhte Viskosität des luminalen Dickdarminhalts sowie durch einen peristaltisch verursachten hohen intraluminalen Druck charakterisiert. Der intraluminalen Druck löst bei der Druck kontrollierten Freisetzung die Wirkstofffreigabe aus (Takaya, Sawada et al., 1997). Eine für diesen Zweck entwickelte Formulierung basiert auf einer Gelatine kapsel mit einer Ethylcellulosebeschichtung der Innenwände (pressure controlled colon delivery capsule; PCDC), welche mit einer Wirkstoff-PEG-Mischung gefüllt werden. Die Gelatineschicht löst sich unmittelbar nach der Einnahme. Die PEG-Mischung schmilzt bei Körpertemperatur. Durch die umgebende Ethylcelluloseschicht entsteht ein ballonähnliches Konstrukt. Der intraluminalen Druck im Dickdarm induziert das Zerreißen der Ethylcellulosehülle und die wirkstoffhaltige PEG-Lösung wird freigesetzt (Muraoka,

Hu et al., 1998b). Um den eventuell verlangsamten Auflösungsprozess des Wirkstoffs und die schlechte Resorption durch die geringe Flüssigkeitsmenge im eingedickten Dickdarminhalt zu umgehen besteht der Kapselinhalt hier aus einer PEG-Wirkstoff-Lösung (Takaya, Niwa et al., 1998; Muraoka, Hu et al., 1998a; Leopold, 1999).

Durch ein Drug-Targeting kann die Gesamtdosis gesenkt werden. Die Gefahr einer Überdosierung oder das Auftreten von Nebenwirkung kann minimiert werden.

Das Drug-Targeting mit Nanopartikel unterteilt sich in ein aktives und ein passives Targeting (Wartlick, 2004). Beim aktiven Targeting werden die Nanopartikel beispielsweise mit einem monoklonalen Antikörper oder anderen Liganden gekoppelt, um die Spezifität des Targetings zu erhöhen (Illum, Jones et al., 1983). Beim passiven Targeting kommt es zu einer passiven Anreicherung der Nanopartikel in bestimmten Geweben bzw. Organen. Diese Verteilung ist abhängig von der Größe und den Oberflächeneigenschaften der Partikel (Brigger, Dubernet et al., 2002).

Der Begriff Nanopartikel bezeichnet einen kolloidalen Feststoffverbund von wenigen bis einigen tausend Molekülen oder Atomen im Größenbereich zwischen 10 und 1000 nm (Kreuter, 1994). Nanopartikel können aus reinem Wirkstoff, Polymermolekülen oder Metallatomen bestehen. In der vorliegenden Arbeit wurden Nanopartikel bestehend aus Polymermolekülen hergestellt, in denen der Wirkstoff verkapselt oder in der Polymermatrix eingebettet vorlag.

Arzneiformen mit Nanopartikeln bieten die folgenden Vorteile:

1. Nanopartikel sind wegen ihrer geringen Größe für die intravenöse Applikation geeignet (Kreuter, 1991; Langer, Balthasar et al., 2003).
2. Es zeigte sich, dass Nanopartikel bei intramuskulärer sowie subkutaner Applikation geringere Irritation an den Einspritzungsstelle erzeugen, als die klassischen Arzneiformen (Little and Parkhouse, 1962).
3. Drug-Targeting ist möglich (Brasseur, Couvreur et al., 1980; Illum, Jones et al., 1983; Brigger, Dubernet et al., 2002)

Im Jahr 2005 ist die erste nanopartikuläre Arzneiform (ca. 130 nm) Abraxane[®], für die die Behandlung von Brustkrebs von der FDA zugelassen worden. Nach der parenteralen

Applikation reichern sich die Partikel vorwiegend im Tumorgewebe der Brust an und setzen den Wirkstoff frei (Green, Manikhas et al., 2006; Gradishar, 2006).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ohne ein Drug-Targeting wird bei der klassischen Behandlung der CED ein hoch dosiertes Arzneimittel mehrfach täglich eingenommen. Ein großer Teil des applizierten Wirkstoffs wird schon im Dünndarm aufgenommen, was oft zu schweren systemischen Nebenwirkungen führen kann (Lamprecht, Schaefer et al., 2001). Abhilfe schaffen Darreichungsformen, die nach den im Kap. 1.2 beschriebenen Prinzipien aufgebaut sind.

Da die CED meist von schwerer Diarrhöe begleitet wird, ist die so genannte Transitzeit der Arzneiform sehr kurz und die Arzneistofffreisetzung unzureichend (Hardy, Davis et al., 1988; Lamprecht, Ubrich et al., 2001a). Durch Mehrfacheinnahmen versucht man dies auszugleichen. Allerdings schaden Mehrfacheinnahmen die Compliance des Patienten und erhöht die Gefahr einer Überdosierung.

Im Gegensatz dazu können sich Nanopartikel durch ein passives Targeting auf den Entzündungsherden anlagern. Je kleiner die Partikelgröße ist, desto mehr Partikel reichern sich auf dem erkrankten Darmgewebe, trotz Diarrhöe, an (Lamprecht, Schaefer et al., 2001). Die wirkstoffbeladenen Nanopartikel werden von Makrophagen, welche im erkrankten Darmgewebe lokalisiert sind, durch Phagozytose aufgenommen (Pinto-Alphandary, Balland et al., 1994; Tabata, Inoue et al., 1996). Eine erhöhte lokale Wirkstoffkonzentration und hierdurch eine Dosisreduktion des Arzneistoffes sind möglich (Lamprecht, Schaefer et al., 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, eine nanopartikuläre Arzneiform für den Arzneistoff Mesopram zur oralen Applikation zu entwickeln. Dies sollte unter Zuhilfenahme verschiedener Polymere sowie unterschiedlicher Herstellungstechniken erfolgen. Es sollte ein System identifiziert werden, in dem eine maximale Menge Arzneistoff verkapselt wird. Dieses System sollte im Hinblick auf seine Stabilität optimiert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Arzneistoffe

2.1.1.1 Mesopram

Chemischer Name: (R)-(-)-5-(4-Methoxy-3-propoxyphenyl)-5-methyl-2-oxazolidinon

Chemische Formel: C₁₄H₁₉NO₄

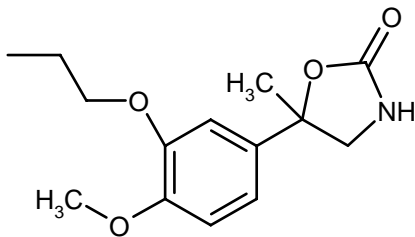


Abb. 2.1: Strukturformel von Mesopram

Mesopram ist ursprünglich für die Behandlung der Multiplen Sklerose von der Schering AG entwickelt worden. Mesopram ist ein Phosphodiesterase Hemmstoff (Subtyp IV). Bei systemischer Anwendung zeigte eine Mesopram Formulierung Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Kopfschmerzen, so dass die Schering AG Mesopram nicht auf dem Markt bringen wollte.

Da Mesopram bei lokaler Anwendung Entzündungen wirkungsvoll hemmt und die lokale Therapie im Gastrointestinaltrakt mit Hilfe einer innovativen Arzneiform vermutlich nebenwirkungsarm erfolgen kann, sollte eine mesopramhaltige Formulierung für eine CED Indikation entwickelt werden.

Die Löslichkeit von Mesopram im Wasser beträgt 0,650 g/l bei 20 °C und in n-Hexan 0,020 g/l. In Ethanol, Aceton und Dichlormethan ist die Substanz sehr gut löslich.

Mesopram ist nicht säurestabil: Die Hydrolyse bei 37 °C zeigte eine Kinetik pseudo-erster Ordnung. Der Zusammenhang der Abbaugeschwindigkeit vom pH-Wert ist in der Tabelle 2.1 dargestellt. Hier sind die ermittelten Halbwertszeiten aufgelistet.

Tabelle 2.1: Hydrolyse von Mesopram bei 37 °C in Abhängigkeit zum pH-Wert

	pH 1,0	pH 2,0	pH 3,5	pH 5,0	≥pH 7,0
$t_{1/2}$	2,5 h	29 h	18 h	70 Tage	stabil

Mesopram hat ein pK_a -Wert von 16,2 und liegt damit als neutrales Molekül im Wasser zwischen pH 2 bis 12 vor.

2.1.1.2 Budesonid

Chemische Formel: $C_{25}H_{34}O_6$

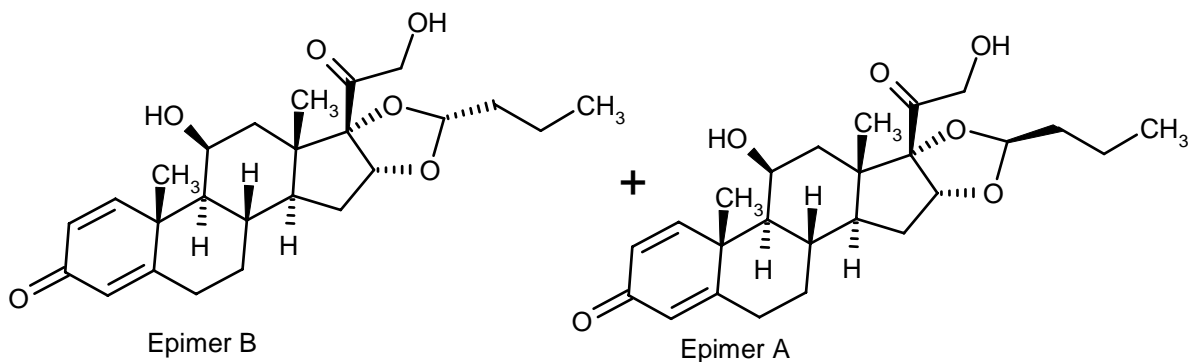


Abb. 2.2: Strukturformeln von Budesonid

Budesonid ist ein Corticosteroid zur örtlichen Behandlung von Asthma bronchiale, nichtinfektiöser Rhinitis und CED (Stanaland, 2004; Klotz and Schwab, 2005; Ricciardolo, 2005). Budesonid enthält nach dem europäischen Arzneibuch mindestens 98,0 Prozent eines Gemischs von C-22S-(Epimer A) und C-22R-(Epimer B)Epimeren von 16α , 17-[(1R)-Butyridenbis(oxy)]-11 β , 21-dihydroxyprena-1,4-dien-3,20-dion. Budesonid ist ein weißes bis fast weißes, kristallines Pulver, das bei Raumtemperatur eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser (12-18 $\mu\text{g/ml}$) aufweist. Es ist leicht löslich in Dichlormethan und Aceton.

In dieser Arbeit wurde Budesonid als gering löslich Variante im Vergleich zu Mesopram für die Verkapslungs- und Freisetzungsversuche eingesetzt.

2.1.2 Hilfsstoffe und sonstige Materialien

Eudragit® S100

Eudragit® S100 ist ein anionisches Acrylharz, das in der pharmazeutischen Industrie zur Herstellung von magensaftresistenten Formulierungen eingesetzt wird. Eudragit® S100 trägt einige Carboxygruppen und ist im pH-Bereich $< \text{pH } 7$ unlöslich und löst sich damit im Verdauungstrakt erst in Abschnitt des Ileums. Eudragit® S100 eignet sich als Hilfsstoff für Nanopartikel, die den Wirkstoff für die Behandlung der CED lokal freisetzen lassen (Lamprecht, 2003; Meissner, Pellequer et al., 2006). Der Wirkstoff gelangt so geschützt bis zum Dünndarm bzw. zum Dickdarm bei CED, um sich dort aufzulösen

Eudragit® RS

Eudragit® RS ist ein Copolymer aus Acrylsäuren und Methacrylsäureestern mit wenigen, endständigen quartären Ammoniumgruppen. Der Gehalt an Ammoniummethacrylat-Gruppen beträgt 8,9 bis 12,3 Prozent (getrocknete Substanz). Die Substanz ist farblos bis weiß oder fast weiß, praktisch unlöslich im Wasser, leicht löslich in Dichlormethan und wasserfreiem Ethanol. Eudragit® RS ist im gesamten pH-Bereich wasserunlöslich, es hat aber die Eigenschaft im Wasser zu quellen. Dabei steuern die Ammoniummethacrylat-Gruppen (hydrophil) die Wasseraufnahme und damit den Quellungsgrad. Hierüber wird die Permeabilität beeinflusst.

Damit ist eine retardierte Freisetzung möglich: Der eingebettete Arzneistoff wird durch das langsame Eindringen von Wasser gelöst und nach der Diffusion durch das gequollene Polymer freigesetzt (Siepmann, Le Brun et al., 2006).

Chitosan

Chitosan, ein natürlich vorkommendes Polyaminosaccharid. Chitosan (v. griech. χιτών „Unterkleid, Hülle, Panzer“), wurde 1859 von Prof. C. Rouget in Frankreich durch Kochen von Chitin mit Kalilauge entdeckt (Hennen, 1996). Chitin besteht aus β -1,4-glykosidisch

verknüpften N-Acetylglucosaminresten (genau 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glukopyranose-Resten). Liegen im Gesamtmolekül mehr deacetylierte 2-Amino-2-desoxy- β -D-glukopyranose-Einheiten vor, spricht man von Chitosan.

Chitosan ist ein farbloser, amorpher, zäher Stoff. Industriell hergestelltes, hochmolekulares Chitosan ist in verdünnten starken Säuren (außer Schwefelsäure) und organischen Säuren löslich. Mit abnehmender molarer Masse ist Chitosan auch im wässrigen löslich. Auf Grund der durch die Deacetylierung entstandenen freien Aminogruppen ist es in Lösung ein Polykation mit einer hohen Ladungsdichte. Die LD_{50} von Chitosan liegt über 16 g/kg (Agnihotri, Mallikarjuna et al., 2004).

Chitosan wird in der Kosmetik-, Lebensmittel- und der pharmazeutischen Industrie verwendet. In der pharmazeutischen Industrie wird Chitosan für „mucoadhesive“ Arzneiformen, das Kolon-Targeting sowie für ophthalmologische Präparate eingesetzt (Hejazi and Amiji, 2003).

Chitosan ist ein bioabbaubares Polymer, aus dem sich wirkstoffbeladene Nano- und Mikropartikel herstellen lassen (Agnihotri, Mallikarjuna et al., 2004).

Nanopartikel aus Chitosan besitzen eine Affinität zu Schleim (He, Davis et al., 1998). Bei einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung schüttet das erkrankte Darmgewebe vermehrt Schleim aus (Lamprecht, Ubrich et al., 2001a), an welchen die Chitosanpartikel anhaften könnten. Die wirkstoffbeladene Chitosan Nanopartikel eignen sich besonders gut für die Therapie der CED.

Als Trägermaterial für die Herstellung der Mesopram beladenen Nanopartikel wurde Chitosan in dieser Arbeit untersucht. Eingesetzt wurde Chitopharm[®] L von der Firma Cognis: Die mittlere Molmasse des Polymers betrug 50.000-5.000.000 Da und der Deacetylationsgrad betrug ≥ 80 %.

Polycaprolacton (PCL)

PCL ist ein bioabbaubares thermoplastisches Polymer mit niedrigem Schmelzpunkt (58-60 °C). Das Polymer wird durch Polymerisation von ϵ -Caprolacton beim Öffnen des Rings

synthetisiert und bei der Hydrolyse der Esterbindung unter physiologische Bedingungen abgebaut. PCL zeichnet sich durch eine längere Halbwertszeit als PLA oder PLGA aus (Landis, Jacquet et al., 2005). Es ist wasser-, öl-, bzw. chlorresistent, und hat eine niedrige Viskosität. Aufgrund der mechanischen Eigenschaften des PCL findet es auch Anwendung in der Herstellung von Knorpelersatzgerüsten für menschliche Stammzellen (Li, Tuli et al., 2005). Die FDA hat PCL für die Herstellung von Implantaten für Menschen zugelassen. PCL darf auch für die Herstellung der Arzneiformen mit kontrollierter Wirkstofffreigabe verwendet werden (Dhanaraju, Gopinath et al., 2006). Das bei den Versuchen verwendete Polymer PCL besaß ein mittleres Molgewicht (Mn) von 42,500 Da.

Celluloseacetatbutyrat (CAB)

Celluloseacetatbutyrat ist eine partiell oder vollständig *O*-acetylierte und *O*-butyrylierte Cellulose. Sie enthält mindestens 2,0 und höchstens 30,0 Prozent Acetyl-Gruppen sowie mindestens 16,0 und höchstens 53,0 Prozent Butyryl-Gruppen. Die Substanz ist weiß, gelblich weiß bis grauweiß und schwach hygroskopisch. CAB löst sich nicht in Wasser und Ethanol 96 %, ist aber löslich in Aceton, Ameisensäure und in einer Mischung gleicher Volumenteile Dichlormethan und Methanol. CAB wird durch das Mischen von Essigsäure und Buttersäure mit gereinigter Cellulose unter Zusatz von etwas Schwefelsäure als Katalysator hergestellt. Die Reaktion verläuft sehr schnell, so dass alle drei freien Hydroxylgruppen im Cellulosemonomer verestert werden. CAB wird für die Herstellung von halbfesten Kontaktlinsen sowie für Negativfilme verwendet. In der pharmazeutischen Industrie verwendet man CAB als retardierenden Filmbildner (Vaithiyalingam, Nutan et al., 2002).

CAB steht, in Kombination mit Chitosan, für die Herstellung von Multi-Mikrokapsel-Systemen zur Verfügung. Die Diffusion des Arzneistoffs vom Chitosankern ist durch die CAB-Hülle kontrollierbar. Das Multi-Mikrokapsel-System kann für das Colon-Targeting zur Behandlung von Darmerkrankungen eingesetzt werden (Varshosaz, Jaffarian et al., 2006).

Zur peroralen Behandlung chronischer Darmerkrankung kann CAB als Matrixgerüste dienen. Hier wird der Arzneistoff erst im Darm durch Diffusion kontrolliert freigesetzt. Eine

Eudragit[®] S oder R Hülle verhindert die vorzeitige Freisetzung im Magen (Rodriguez, Vila-Jato et al., 1998).

Ethylcellulose (EC)

Ethylcellulose ist ein weißer bis gelblich weißer Celluloseether, nichtionischer und wasserunlöslicher Cellulosederivate. 1930 wurde EC zuerst von der „Dow Chemical Company“ in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt.

Als pharmazeutischer Hilfsstoff ist EC zwischen pH 3 und 11 stabil und daher mit vielen sauren und basischen Wirkstoffen kompatibel. Die Substanz ist im ganzen GIT unlöslich (Wilson and Washington, 1989).

Verwendung findet EC als Überzug oder zur Einbettung in oralen Arzneiformen, aus denen der Wirkstoff sich durch Diffusion freisetzen kann. Die Freisetzung eines Wirkstoffes aus einer klassischen Arzneiform wird über die Größe der Partikel und der Länge des Diffusionsweges reguliert.

EC kann auch für die Herstellung von Mikro- bzw. Nanokapseln verwendet werden (Perugini, Simeoni et al., 2002).

Eingesetzt wurde Ethocel[®] 45 mit einer Viskosität von 41 bis 49 mPas und Ethocel[®] 100 mit einer Viskosität von 90 bis 110 mPas.

Sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (Aerosol OT; AOT)

AOT zählt zu den anionischen Tensiden und bildet Mizellen in wässrigen und organischen Phasen (z. B. n-Hexan). Daher findet AOT Anwendung für die Herstellung von W/O und O/W Emulsion. Bei der oralen Applikation beträgt bei Ratten der LD_{50} 1,9 g/kg. Die Verbindung kann als Wirkstoff (Dioctyl[®], Schwarz Pharma Limited) bzw. als Hilfsstoff (Xanax[®] Tablets, Phamacia & Upjohn Company) verwendet werden.

Natriumcholat

Das Salz der Trihydroxygallensäure ist ein anionischer Emulgator. Aus Cholesterol wird in der Leber Cholat synthetisiert und zum konjugierten Glycocholat- bzw. Taurocholat

umgebaut. Diese werden über die Galle im Darmtrakt ausgeschüttet, um dort die wasserunlöslichen Bestandteile (besonders Lipide) zu emulgieren sowie für ein optimales Wirken der Enzyme im Darmtrakt zu sorgen.

Triton[®] X-100

Triton[®] X-100 ist ein nicht-ionisches Tensid. Als ein aktives und bioabbaubares Tensid (SIGMA, 1999), wird Triton[®] X-100 oft in den biochemischen Laboratorien für die Isolierung und Reinigung von Membran-Proteinen eingesetzt (Neugebauer and Thurm, 1984; Burrell, 1993). Die CMC von Triton[®] X-100 in Wasser beträgt 0,22-0,24 mM bei 25°C (Tiller, Mueller et al., 1984) und der HLB-Wert ist 13,5 (SIGMA, 1999). Das Tensid ist ein hervorragendes Benetzungsmittel sowie ein sehr guter Emulgator, mit dem sich O/W Emulsionen stabilisieren lassen. Triton[®] X-100 ist in Wasser und in polaren organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Ethanol, löslich.

Tween[®] 80

Tween[®] 80 (Polysorbat 80) ist ein Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester. Es handelt sich bei dem nichtionogenen O/W-Emulgator um ein Gemisch von Partialestern des Sorbitols und seiner Anhydride mit Ölsäure, welche mit etwa 20 Molen Ethylenoxid pro Mol Sorbitol und Sorbitan copolymerisiert wurde. Der HLB-Wert von Tween[®] 80 beträgt 15,0 und die Viskosität liegt bei 25 °C zwischen 375 und 480 mPas (Bauer, Frömming et al., 1999).

Span[®] 80

Sorbitanmonooleat (Span[®] 80) ist ein nichtionischer künstlicher W/O-Emulgator, welcher aus einer Mischung von partiellen Fettsäureestern des Sorbitans und seiner Anhydride mit Fettsäure besteht. Der HLB-Wert beträgt 4,3 und die Viskosität liegt bei 25 °C zwischen 1200-1500 mPas (Bauer, Frömming et al., 1999).

Natriumdodecylsulfat (SDS)

SDS (auch als Natriumlaurylsulfat bezeichnet) ist ein anionischer Emulgator. Verwendet wird SDS in Cremes und Salben sowie in oralen Arzneimitteln. Nach oraler Applikation in Ratten beträgt die LD_{50} 1288 mg/kg. Aufgrund hepatotoxischer und hämolytischer Wirkungen darf SDS beim Menschen nicht als Emulgator in parenteralen Präparaten Verwendung finden. Mit SDS lassen sich stark negativ geladene Partikeloberflächen in Suspension herstellen, die Nanopartikel in Darmflüssigkeiten mit vielen Anionen stabilisieren können. SDS ist als Tensid in einer Konzentration $< 0,15\%$ für orale Arzneimittel von der FDA zugelassen.

Simulated intestinal fluid (SIF)

SIF (ohne Pankreatin) wurde für die Bestimmung der physikalischen Stabilität der Nanopartikel sowie der Wirkstoff-Freisetzung eingesetzt. Die Lösung wurde nach USP 26 wie folgend hergestellt:

6,8 g KH_2PO_4 wurden in 250 ml Wasser gelöst. 77 ml 0,2 N NaOH und 500 ml Wasser wurden anschließend zugesetzt. Die Lösung wurde mit 0,2 N NaOH oder 0,2 N HCl auf einen pH-Wert von $6,8 \pm 0,1$ eingestellt und zu 1000 ml aufgefüllt (USP, 2003)

2.2 Methode

2.2.1 Allgemeine Methoden

2.2.1.1 Partikelgröße

2.2.1.1.1 Dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Dynamische Lichtstreuung (auch als Photonenkorrelationsspektroskopie bezeichnet) ist ein dynamisches Streulichtverfahren, das zur Bestimmung der Teilchengröße bzw. Teilchengrößenverteilung kolloidaler Dispersionen verwendet werden kann.

Die Probe wird mit einem Laser durchstrahlt und die Intensität des Streulichtes zeit- und winkelabhängig detektiert. Mit einem Photomultiplier werden dabei Lichtphotonen erfasst. Der nachgeschaltete Korrelator nimmt die zeitliche Schwankung des Lichtes auf und vergleicht die Signale mit dem Ausgangswert. Vergleichsweise kurz aufeinander folgende Signale korrelieren gut. Mit zunehmender Zeit ist eine Abnahme der Korrelation zu verzeichnen, bis schließlich keine Korrelation mehr besteht. Die Autokorrelationsfunktion wird dann über eine Fouriertransformation in eine Frequenzverschiebung umgewandelt, aus der der Diffusionskoeffizient bestimmt wird.

Dabei verursachen kleine Teilchen aufgrund der höheren Diffusionsgeschwindigkeit eine stärkere Fluktuation der Intensität als große Teilchen. Die Bewegung erfolgt ungerichtet aufgrund der Brownschen Molekularbewegung und wird mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten beschrieben. In der Stokes-Einstein-Gleichung ist der Diffusionskoeffizient D_T mit dem hydrodynamischen Radius r_H in Beziehung gesetzt:

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H}$$

r_H	hydrodynamischer Radius
k_B	Boltzmann-Konstante ($\approx 1,4 \times 10^{-23}$ [J/K])
T	absolute Temperatur [K]
η	dynamische Viskosität [Pas]

Der erhaltene Durchmesser ist der äquivalente Durchmesser einer Kugel, mit der gleichen Brownschen Molekularbewegung.

Bei dieser Messmethode lassen sich über eine Kumulantenanalyse nur monodisperse Verteilungen bestimmen. Bei bi- oder multidispersen Proben lässt sich die mittlere Partikelgröße der einzelnen Populationen über die Contin Berechnung ermitteln. Hier ist Vorsicht geboten, inwieweit die Werte realistisch sind!

Zur Bestimmung der Teilchengrößen von mesopramhaltigen Nanokapseln wurde der Nicomp[®] Submicron Particle Size Modell 380 eingesetzt (Fa. Santa Barbara, USA). Die Laserwellenlänge lag bei 632,8 nm und das Streulicht wurde bei einem Winkel von 90° erfasst.

Zur detaillierten Beschreibung der Lichtstreuungstheorie sei auf folgende Literatur verwiesen: (Washington, 1992; Brown, 1996; Berne and Pecora, 2000)

Durchführung:

Die frisch hergestellte Nanosuspension wird in eine zylindrische Küvette aus Glas überführt und je nach Medium mit 0,1 % iger Synperonic[®] F68 Lösung oder Hexan bis zu einer Zählrate von ca. 300 kHz verdünnt. Die Parameter (z.B. dynamische Viskosität, Brechungsindex) des Mediums werden vor der Messung eingegeben. Die Bestimmung dauert 5 Minuten.

Das Gerät ist mit einem Autosampler ausgerüstet, der besonders für Untersuchungen vieler Proben geeignet ist. Die Proben werden automatisch vom Autosampler gezogen und vom Messgerät mit 0,1 % iger Synperonic[®] F68 Lösung bis zum Idealbereich verdünnt. Die Ergebnisse werden von der Software bewertet und graphisch dargestellt.

2.2.1.1.2 Raster-Elektronen-Mikroskop (REM)

Zur Beobachtung der Oberfläche, Form und Größe von einzelnen Partikeln eignet sich die Raster-Elektronen-Mikroskopie.

Im Gegensatz zur konventionellen Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie, wo ein untersuchtes Objekt optisch direkt abgebildet wird, erfolgt bei der REM die Abbildung durch eine zeilenweise Abrasterung des Objekts mit einem dünnen Elektronenstrahl. Durch die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt entstehen lokal, und abhängig vom Auftreffpunkt des Elektronenstrahls, verschiedene Signale, die Informationen, sowohl über die Objektstruktur, als auch über die Objektzusammensetzung enthalten. Mittels geeigneter Detektoren können alle Signale simultan registriert und zum Bildaufbau nach dem Fernsehprinzip verwendet werden.

Mit Hilfe der Raster-Elektronen-Mikroskopie wurden Nanosuspensionen untersucht, um reine Mesopramkristalle von mesopramhaltigen Nanokapseln zu unterscheiden.

Durchführung:

1,5 ml Nanosuspension wurden in eine Mikrozentrifugentube überführt und 10 Minuten bei 14.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Nanopartikel mit 1,5 ml *Aqua purificata* resuspendiert. Ein Teil der Suspension wird auf ein REM - Träger aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben sollten dann, sofern sie trocken erschienen, in einem Excikator über Phosphorpentoxid oder Magnesiumperchlorat bis zur Bearbeitung gelagert werden (Restfeuchtigkeit ~ 20 %). Die Nanopartikel auf dem Träger wurden mit Metallplasma in Edelgas beschichtet und unter Vakuum im REM betrachtet.

Weitere Informationen über diese Technik erhält man über folgende Literatur:

(Echlin, Joy et al., 1986)

2.2.1.2 Zetapotenzial

Das Zetapotenzial (auch ζ -Potenzial) ist das elektrische Potential (auch als Coulomb-Potenzial bezeichnet) an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in einer Dispersion. Das elektrische Potential beschreibt die Fähigkeit eines (von einer Ladung hervorgerufenen) Feldes Kraft auf andere Ladungen auszuüben. Die Differenz des elektrischen Potentials an zwei Orten ist die elektrische Spannung.

$$U_{\varepsilon} = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$

U_{ε}	elektrophoretische Mobilität
ε	dielektrische Konstante
ζ	Zetapotenzial [mV]
$f(ka)$	Henry-Funktion (Huckel und Smoluchowski-Näherung)
η	dynamische Viskosität [Pas]

Die Bestimmung des Zetapotentials der Nanopartikel wurde mit dem Zetasizer[®] Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd.) bei 25 °C durchgeführt. Die Nanosuspension wurde mit gereinigtem Wasser (pH 7,0, Leitfähigkeit: 40-50 µS/cm) zehnfach verdünnt und in eine spezielle U-förmigen Messküvette überführt. Für die Bestimmung der Eudragit[®] S100 Nanopartikel wurde der pH-Wert des gereinigten Wassers mit 0,1 M NaOH und HCl bis auf 4,0 eingestellt, damit sich die Partikel bei der Verdünnung nicht auflösen. Eine Spannung wurde dann auf den Elektroden in Küvette aufgebaut. Das Zetapotenzial wurde durch die Analyse der Partikelwanderung im elektrischen Feld bestimmt. Eine Messung dauerte ca. 2 Minuten und wurde dreimal wiederholt.

2.2.1.3 Bestimmung des Wirkstoffgehalts mittels HPLC

Durchführung

1,5 ml Nanosuspension wurden in eine Mikrozentrifugentube überführt und 5 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Nanopartikel mit 1,5 ml *Aqua purificata* resuspendiert. In einer anschließend durchgeführten Zentrifugation (5 min., 14.000 upm) setzten sich die Partikel wieder ab und wurden in 0,5 ml Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde dann in ein genau abgewogenes HPLC-Vial (*W1*) überführt und 2 Stunden im Vakuum (0,1 Bar) bei 35 °C getrocknet. Das Vial mit den getrockneten Partikeln wurde nach dem Abkühlen genau abgewogen (*W2*). Nachdem die Partikel in 1,5 ml Ethanol oder Aceton gelöst worden sind, wurde die Wirkstoffkonzentration (*C*) mittels HPLC bestimmt.

Die Gehaltsbestimmung von Mesopram und Budesonid in den Nanopartikeln ist nachfolgend beschrieben.

1. Methodenparameter für den Mesopramgehalt

HPLC-Anlage	Dionex
Säule	Novapak RP18, 250×4,6 mm, 4 µm
UV-Detektor	λ=230 nm
Fluss	1 ml/min.
Phase A	25:75 (v/v) Acetonitril:Phosphat-Pufferlösung pH 5,0
Phase B	reines Acetonitril

Gradientenelution mit folgendem Programm:

- 0-11 min. 0-40% Phase B (linear)
- 11-14 min. 40% Phase B
- 14-20 min. 40-80% Phase B (linear)
- 20-25 min. 80-0% Phase B (linear)

Eine einzelne Bestimmung dauerte 25 Minuten.

2. Methodenparameter für den Budesonidgehalt

HPLC-Anlage	Dionex
Säule	Novapak RP18, 250×4,6 mm, 4 µm
UV-Detektor	λ=240 nm
Fluss	1,5 ml/min.
Eluent	30:70 (v/v) Acetonitril:Phosphat-Pufferlösung pH 3,2

Eine einzelne Bestimmung dauerte 30 Minuten

Die allgemeine Methode zur Bestimmung der Verkapselungsrate bzw. Beladungsrate wird im Kapitel zu den entsprechenden Polymeren beschrieben. Sie variierte ein wenig von Polymer zu Polymer.

Die Verkapselungsrate (V) errechnet sich aus

$$V(\%) = \frac{C \times 1,5}{(W2 - W1)} \times \frac{M1 + M2}{M1 \times 1000} \times 100$$

V	<i>Verkapselungsrate</i>
C	<i>Mesopramkonzentration der Probe ($\mu\text{g/ml}$)</i>
$W2$	<i>Gewicht der getrockneten Partikel und des HPLC-Vials (mg)</i>
$W1$	<i>Gewicht des HPLC-Vials (mg)</i>
$M1$	<i>zur Herstellung eingesetzte Mesopram Masse (mg)</i>
$M2$	<i>zur Herstellung eingesetzte Polymer Masse (mg)</i>

Die Beladungsrate (B) wurde errechnet sich aus

$$B(\%) = \frac{C \times 1,5}{(W2 - W1) \times 1000 - C \times 1,5} \times 100$$

B	<i>Beladungsrate</i>
C	<i>Mesopramkonzentration der Probe ($\mu\text{g/ml}$)</i>
$W2$	<i>Gewicht der getrockneten Partikel und des HPLC-Vials (mg)</i>
$W1$	<i>Gewicht des HPLC-Vials (mg)</i>

2.2.1.4 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) ist ein schonendes Trocknungsverfahren zur Stabilisierung von Arzneizubereitungen. Sie ist insbesondere geeignet für thermolabile und hydrolyseempfindliche Materialien. Die Lyophilisation parenteraler Formulierungen wird

beispielsweise für Penicilline, Enzyme oder Vitamine, sowie für Blutbestandteilen, Seren, Impfstoffen und Liposomen angewendet (Bauer, Frömming et al., 1999). Das entstehende Lyophilisat ist lagerfähig, aber auch hygroskopisch. Infolge der großen Oberflächen ist das Produkt durch Zugabe vom Wasser schnell rekonstituierbar.

Um einen guten Lyophilisatkuchen zu erhalten, werden dem Produkt vor der Gefriertrocknung Kryoprotektoren zugemischt.

Die Gefriertrocknung ist sehr kostenintensiv und aufwendig. Jedoch lässt sich die Lagerstabilität für empfindliche Lösungen oder Suspensionen erhöhen. Aus diesem Grund ist eine Kosten-Nutzen-Rechnung vor dem Einsatz dieser Methode zu erwägen.

Der Prozess der Lyophilisation gliedert sich normalerweise in drei Schritte (Bauer, Frömming et al., 1999):

☆ Einfrierphase

Die Zubereitung wird mit einer Temperatur unterhalb des eutektischen Punktes eingefroren

☆ Haupttrocknung

Trocknung durch Sublimation unter Vakuum. Die dafür notwendige Energie wird durch Wärmezufuhr erzeugt.

☆ Nachtrocknung

Entfernung des Restwassers bei erhöhter Temperatur

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gefriertrocknung von Mesopramhaltigen Polymeranopartikel durchgeführt. Verwendet wurde hierfür eine GT-Anlage der Firma *SP Industries, Inc.* Modell AdVantage 2.0

Nach folgenden Herstellparametern wurde gearbeitet:

Probenvorbereitung

1,5 ml frisch hergestellte Nanosuspension wurden 5 Minuten bei 8.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Trennung verworfen und die sedimentierten Nanopartikel mit 1,5 ml *Aqua purificata* resuspendiert. Nach diesem Waschschrift wurde die Suspension nochmals zentrifugiert. Die Partikel wurden danach mit 1 ml 0,1 % Synperonic® F68 Lösung und 1 ml 10 % PEG 4000 Lösung redispergiert. Das PEG 4000 diente als Kryoprotektor. Die

entstandene Suspension wurde in 20 ml Vials mit einem Stopfen, der jeweils 2 Rasten besaß, überführt und im Gefrierschrank bei ca. -50 °C eingefroren.

Die Stopfen saßen nur locker auf den Gefäßen, damit die Wassermolekülen bei der Trocknung entweichen können.

Für eine optimale Gefriertrocknung sind die folgenden Punkte von entscheidender Bedeutung (Voigt and Fahr, 2000):

- ☆ möglichst große Temperaturdifferenz zwischen Gut und Kondensatoroberfläche
- ☆ möglichst große Kondensatoroberfläche
- ☆ möglichst gutes Vakuum

Vor jeder Gefriertrocknung müssen die Stellflächen der Proben sowie der Eiskondensator abgekühlt wurden. Nach ca. 1 Stunde wird die Arbeitstemperatur von – 35 °C auf den Stellfläche erreicht.

Die Zyklen der Trocknung wurden wie folgt durchgeführt:

Tabelle 2.2: Gefriertrocknungsprogramm

Prozess	Zeit (min)	Temp. (°C)	Druck (mTorr)	Phase
1	155	-35	760	Einfrierphase
2	30	-35	146	Haupttrocknung
3	102	-30	146	
4	390	-10	146	
5	300	5	100	Nachtrocknung

Nachdem die Gefriertrocknung beendet ist, wurden die Proben entnommen und mit den Stopfen verschlossen, um die Lyophilisate vor der Raumfeuchtigkeit zu schützen. Die Proben standen dann für weitere Studien zur Verfügung.

2.2.1.5 Chemische bzw. physikalische Stabilität

Für die Qualität einer Arzneiform spielt die Stabilitätsprüfung eine zentrale Rolle. Unter Stabilität im Bereich der Pharmazie ist zu verstehen, dass sich das Arzneimittel unter definierten Lagerbedingungen und über einen begrenzten Zeitraum (Laufzeit) in seinen wesentlichen Qualitätsmerkmalen nicht oder nur in einem zulässigen Ausmaß verändert (Voigt and Fahr, 2000). Ein Produkt ist stabil, wenn es über die Zeit keine wesentlichen Veränderungen erfährt. Zur Untersuchung der Stabilität werden die Proben unter definierten Umweltbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) gelagert und das Produkt nach definierten Abständen auf das Ausmaß der Veränderung wesentlicher Qualitätsmerkmale (z.B. Gehalt Wirkstoffe und Abbauprodukte, Partikelgrößenverteilung etc.) hin untersucht. Man unterscheidet dabei zwischen chemischer und physikalischer Stabilitäten.

Untersucht wurde die Stabilität des Wirkstoffes Mesopram und die daraus hergestellten Arzneiformen.

2.2.1.5.1 Stabilität des Wirkstoffs

Die Wirkstoffstabilität in den gefriergetrockneten Nanopartikeln sollte untersucht werden. Hierzu wurden die Nanopartikeln über einen Zeitraum von 6 Monaten bei Raumtemperatur in geschlossenen Vials gelagert. Nach dieser Zeit wurden die Abbauprodukte mittels HPLC analysiert.

2.2.1.5.2 Stabilität der Partikel

Die Stabilitätsuntersuchung von mesopramhaltigen Nanopartikeln im SIF erfolgte mittels DLS sowie und der Methode des Turbiscan[®] M 1000. Die DLS erfasst die Partikelgrößenverteilung der Nanopartikel (s. Kap. 2.2.1.1.1). Die hergestellten Lyophilisate wurden 6 Monate bei Raumtemperatur in den geschlossenen Vials gelagert, anschließend resuspendiert und auf ihre Stabilität untersucht.

Anhand des Turbiscan[®] kann die Migration bzw. Größenänderung von Partikel über die Zeit beobachtet werden. Mit dem Turbiscan[®] M 1000 wird die Stabilität einer Suspension in der Messküvette orts- und zeitabhängig bestimmt. Das Messprinzip beruht auf der gleichzeitigen Messung der Transmission sowie der Rückstreuung von Licht (λ 850 nm) (s. Abb. 2.3). Die Detektion der zeitlichen Veränderungen der Signale über die gesamte Länge der Messküvette basiert grundsätzlich auf dem Unterschied im Brechungsindex zwischen der Matrix und dem dispergierten Medium. Tritt eine Aggregation oder Sedimentation der Nanopartikel auf, so verändert sich die Intensität der Transmission- und/oder Rückstreuung in Verhältnis zur Intensität des eingestrahlten Lichtes. Die Veränderung wird in Abhängigkeit zur Küvettenhöhe erfasst.

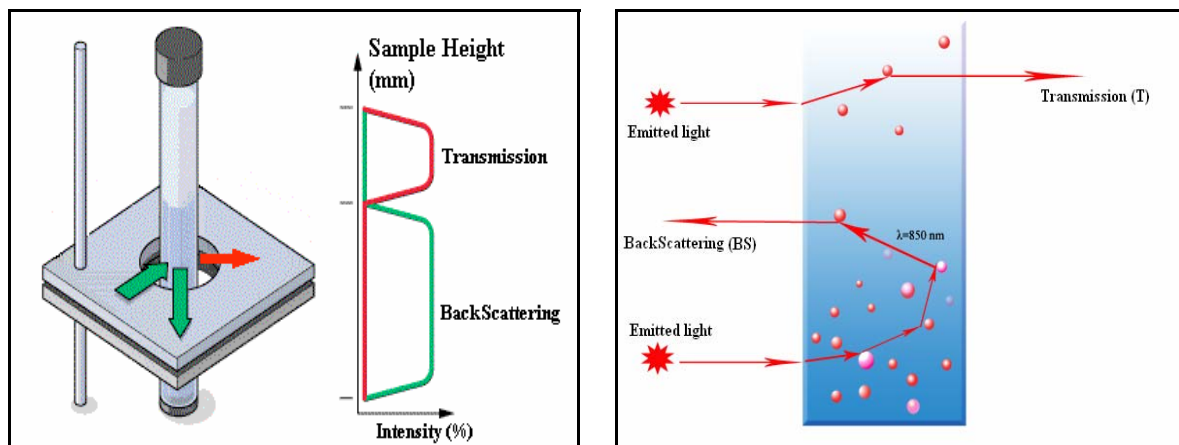


Abb. 2.3: Das Turbiscan[®] Prinzip: Optisches Abtastverfahren des Turbiscan[®] in Transmission und Rücksteuerung

Durchführung

1,5 ml Prüfsuspension wurden 5 min mit 14.000 bzw. 8.000 upm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1,5 ml *Aqua purificata* gewaschen. Die Partikel wurden im Anschluss in 1 ml 10% PEG 4000 und 1 ml 0,1% Synperonic[®] F68 redispersiert und danach in die Messküvette überführt. Die Messküvette wurde auf ~8 ml mit SIF bei pH 6,8 aufgefüllt und vermessen. Alle 2 bis 3 min wurden die Transmissions- und Rückstreuwerte erfasst, so dass 200 Messkurven vorlagen. Veränderungen der Transmission und Rückstreuung wurden in verschiedenen Höhen ausgewertet.

Nach den Stabilitätsprüfungen mit Hilfe des Turbiscan[®] M 1000 wurden die Nanopartikel noch einmal mittels DLS analysiert, um die Größenänderung der Partikel genau zu bestimmen. Die SIF-Dispersion wurde stark geschüttelt und im Auto-Sampler von Nicomp[®] eingeführt. Die Bestimmung der Partikelgröße wurde wie im Kap. 2.2.1.1.1 beschrieben durchgeführt.

Nach der Gefriertrocknung bzw. nach der langen Lagerung der Lyophilisate könnte sich die Partikelgröße ändern. Um die Änderung zu ermitteln, wurden die Lyophilisate in 2 ml destilliertem Wasser gelöst, anschließend stark geschüttelt und mit DLS analysiert.

2.2.1.6 Wirkstofffreisetzung

Für Nanosuspensionen ist keine Standardmethode der Wirkstofffreisetzung im Arzneibuch beschrieben. Abhängig vom Einsatz der Formulierung sollte die Freisetzungsmethode angepasst werden.

Oral zu applizierende Nanosuspensionen, können im SIF bei $37 \pm 0,5$ °C freigesetzt werden (Lamprecht, Ubrich et al., 2001b).

Durchführung

Die zu prüfenden Lyophilisate, die ~2 mg Nanopartikel enthielten, wurden in 25 ml SIF bei 37 °C unter Rühren freigesetzt. In verschiedenen Zeitintervallen wurden je 1,5 ml des Mediums mit Partikeln über ein 0,2 µm Filter entnommen und der Wirkstoffgehalt mittels HPLC (s. Kap. 2.2.1.3) bestimmt.

Die an der Filtermembran adhären Partikel wurden mit 1,5 ml SIF von der Gegenrichtung zurück gespült. Die Freisetzungskinetik wurde grafisch dargestellt.

2.2.1.7 Taguchi Orthogonal Array (Taguchi OA)

In den 30er Jahren entwickelte R.A. Fischer in England eine statistische Methode zur Verbesserung der Agrarproduktion (Fischer, 1925; Tippett, 1934). 1950 vereinfachte Dr. Genichi Taguchi die Methode, welche unter dem Namen Taguchi OA bekannt wurde. In

Japan wurde sie zur Qualitätskontrolle und Kostensenkung in den Firmen eingesetzt. In den 80er Jahren wurde Taguchi OA auch im Westen populär.

Die Taguchi Methode (Taguchi OA) ist eine effektive Entwurfs- und Optimierungsmethode, die für eine statistische Analyse der ganzen Versuche nur Bruchzahlen der vollen Versucheskombinationen als Datengrundlage benötigt. Bei vollen Versucheskombinationen sind 1024 (4^5) Tests erforderlich, wenn 5 Faktoren mit jeweils 4 Stufen zu prüfen sind. Mit Taguchi OA sind aber nur 16 Versuche durchzuführen (s. Tabelle 2.3). Jeder Faktor kann, unabhängig von den Anderen, bewertet werden. Der Effekt einzelner Faktoren würde die Anderen nicht beeinflussen.

Tabelle 2.3: Vergleich der Versuchesanzahlen bei Taguchi OA mit den Vollversuchen

Taguchi OA	Faktoren und Stufen	Anzahlen der Vollversuchen
4	3 Faktoren je mit 2 Stufen	8
9	4 Faktoren je mit 3 Stufen	81
16	15 Faktoren je mit 2 Stufen	32.768
16	5 Faktoren je mit 4 Stufen	1.024

Die Taguchi Methode basiert auf einer Matrix-Experimentalen Methode (Nagarjun, Rao et al., 2005; Azin, Moravej et al., 2006). Alle Stufen der Faktoren in der Matrix werden mit den Anderen während der Versuche kombiniert. Taguchi nutzt die tabellarische Anordnung, so wie sie in der Tabelle 2.4 dargestellt ist. Die experimentale Matrix ist ein spezielles orthogonales Array, das eine effiziente Analyse des Einflusses von Prozessparametern und wenn erforderlich auch eine Ermittlung einzelner Wechselwirkungen erlaubt.

Tabelle 2.4: Tabelle der L4 (2³) Orthogonal Array

Faktoren	A	B	C	Response 1	Response 2
Versuche Nr.					
1	1	1	1		
2	1	2	2		
3	2	1	2		
4	2	2	1		

In diesem Array (Tabelle 2.4) gibt es 3 Spalten mit den Faktoren (z.B. Herstellparameter) A, B und C sowie jeweils 2 Stufen (z.B. Parametereinstellung). Die unterschiedlichen Faktoren und Stufen werden in 4 Versuchen (z.B. Herstellungen) untereinander kombiniert und durchgeführt. Anschließend wird mit Hilfe der Response 1 und 2 (z.B. Qualitätsmerkmale eines Endproduktes) der Array analysiert. Taguchi OA nährt sich dabei dem optimalen Signal-Rausch-Verhältnis S/N, definiert durch das Verhältnis der Mittelwerte (Signale) zu den Standardabweichungen (Rauschen).

Von Interesse sind 3 S/N-Verhältnisse:

- Der Größte ist der Beste Ausbeute, Stärke etc.
- Der Kleinste ist der Beste Kontamination etc.
- Nominal ist die beste Voreinstellung (On-target) Dimension

Im Fall der Herstellung mesopräbeladener Nanopartikel, sind insbesondere die Qualitätsmerkmale Partikelgröße und Verkapselungsrate zu beachten: Ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis ist wünschenswert. Zur Analyse der Annäherung des optimalen S/N Verhältnis wurde eine ANOVA Prüfung durchgeführt. Hierüber kann die Signifikanz einzelner Faktoren geprüft werden.

Dr. Taguchi setzte noch andere Verfahren ein, um die Einflüsse der Faktoren sowie die statische Signifikanz grafisch sichtbar zu machen (Roy, 2001).

Die oben erwähnten Grundlagen wurden in der Software Design-Expert 7.0 integriert und die durchgeführten Entwurf- bzw. Optimierungsversuche sind im Folgenden aufgeführt.

Zur Optimierung der Herstellung Mesopram beladener CAB und EC Nanopartikel mittels der Emulsion-Verdampfungsmethode wurde die Taguchi Methode genutzt. Die Rezeptur der Emulsion sollte optimiert werden. Die Beladungsrate ist aus der Verkapslungsrate errechenbar, da die eingesetzten Wirkstoff-Mengen bei den Versuchen festgelegt sind. Sie sollte aus diesem Grund nicht im Speziellen betrachtet werden. Es wurde also nur die Verkapselungsrate als Parameter optimiert.

Die zu optimierenden Parameter werden in der genutzten Software Responses genannt.

In der Tabelle 2.5 sind die für die Polymere CAB, und EC optimierten Faktoren und Stufen dargestellt.

Tabelle 2.5: Die Faktoren A (Wirkstoffgehalt), B (Volumen der zugesetzten organischen Phase), C (Tensid-Konzentration) und D (Tensidart) sowie die dazugehörigen Stufen

Faktoren Stufen	A	B	C	D
1	75 mg	100 µl	0,05%	Natriumcholat
2	100 mg	150 µl	0,10%	AOT
3	125 mg	200 µl	0,50%	SDS
4	150 mg	250 µl	1,00%	SDS+Tween®80

L₁₆ (16 Versuche für 4 Faktoren mit je 4 Stufen) wurde als Entwurfsmodell verwendet um die Partikelgröße bzw. die Verkapselungsrate als Parameter zu optimieren. Die experimentale Matrix (s. Abb. 2.4) wurde von der Software automatisch errechnet. Die Standard Oder Nummer (Std) wurde randomisiert von der Software ermittelt, um einen systematischen Fehler zu vermeiden. Die Versuche wurden nach den in der Abb. 2.4 gegebenen Kombinationen durchgeführt.

Exemplarisch ergibt sich nach Run 1 die folgende Rezeptur: 125 mg Mesopram und 250 mg Polymer werden in 5 g Dichlormethan gelöst. 100 µl der organischen Phase werden in 6 ml 0,5 % iger AOT überführt. Nach der standardmäßigen Herstellung wurden die Messwerte der

Partikelgröße und Verkapselungsrate in den entsprechenden Zellen Response 1 und 2 eingetragen.

	Std	Run	Block	Factor1 A: Mesopram in Polymer mg/250mg	Factor2 B: organische Phase ul/6ml wässrige Phase	Factor3 C: Tensidkonzentration %	Factor4 D: Tensidsorten	Response 1 Partikelgröße nm	Response 2 Verkapselungsrate %
	8	1	Block 1	125	100	0.5	AOT		
	12	2	Block 1	100	100	0.1	Cholate		
	16	3	Block 1	75	100	0.05	SDS		
	13	4	Block 1	75	250	1.0	AOT		
	14	5	Block 1	75	200	0.5	Cholate		
	15	6	Block 1	75	150	0.1	SDS+TW80		
	10	7	Block 1	100	200	1.0	SDS		
	9	8	Block 1	100	250	0.5	SDS+TW80		
	11	9	Block 1	100	150	0.05	AOT		
	3	10	Block 1	150	150	0.5	SDS		
	5	11	Block 1	125	250	0.1	SDS		
	2	12	Block 1	150	200	0.1	AOT		
	6	13	Block 1	125	200	0.05	SDS+TW80		
	1	14	Block 1	150	250	0.05	Cholate		
	4	15	Block 1	150	100	1.0	SDS+TW80		
	7	16	Block 1	125	150	1.0	Cholate		

Abb. 2.4: Experimentale Matrix der Software Design Expert für die geplanten Optimierungsversuche (L₁₆)

Nach den Versuchen wurden alle resultierenden Daten in den jeweiligen Responsezellen eingetragen.

In der Tabellenspalte „f(x) Models“ bei der Funktion „Analyse“ wurden alle Faktoren als „Model“ (M) gewählt und analysiert. Die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren wurden nicht berücksichtigt. Bei der Wahl „Process order“ wurde „linear“ festgelegt. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens mehrfacher Wechselwirkungen ist sehr gering und wurde aus diesem Grund als „Exclude“ gewählt und somit ausgeschlossen. (s. Abb. 2.5)

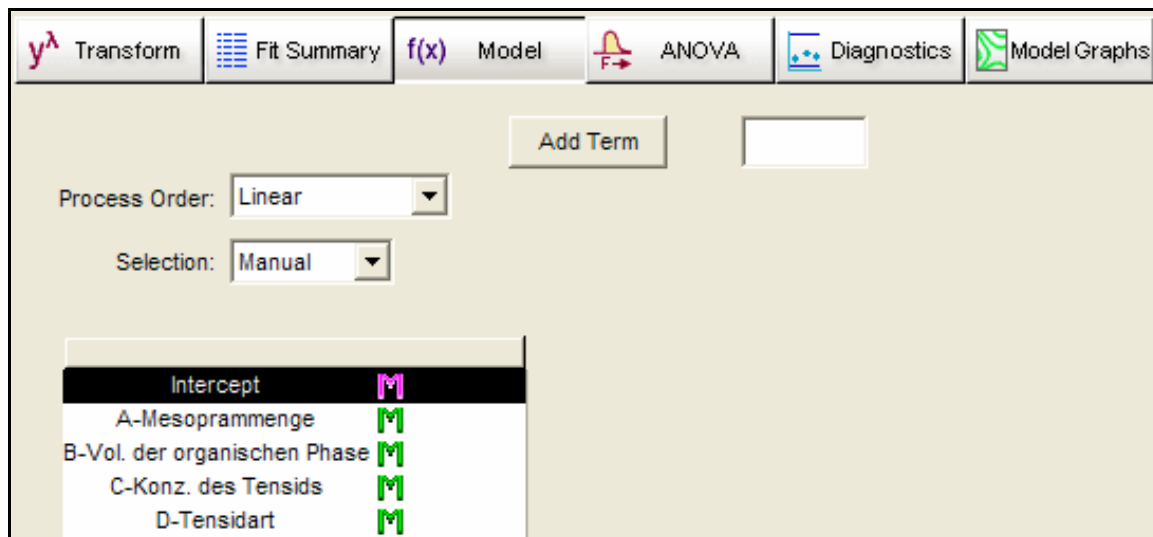


Abb. 2.5: Die Zustände der vier Einflussfaktoren sowie weitere Parameter der Tabellenpalte „f(x) Models“

Bei der Optimierung hat sich die Funktion „Optimization“ in drei Teile gegliedert: Numerische-, Graphische-Optimierung und die Punkt-Vorhersage. Bei der numerischen Optimierung (Numerical Optimization) wurden die Optimierungsziele eines jeden Parameters im Vorfeld definiert. In der Funktion „Solution“, wurden die optimalen Herstellungsbedingungen für die erwünschten Ziele ermittelt.

Für die Graphische-Optimierung wurden die erwünschten minimalen und maximalen Werte als Begrenzungen für jeden Parameter festgelegt. Die Durchführbarkeit zum Erfüllen der Ziele wurde graphisch dargestellt.

Bei der Punkt-Vorhersage (Point Prediction) kann man sich mit den festgelegten Herstellungsbedingungen die Prognose der Parameter errechnen lassen.

2.2.1.8 Beladungskapazität

Mesoprambeladene Partikelsysteme bestehen aus Mesopram, Polymer und geringen Mengen anderer Hilfsstoffe. Der Einfluss des Wirkstoffes auf das Polymer und die Beladungsmenge werden vorab untersucht. Polymere mit niedriger Beladungskapazität wurden für weitere Herstellungsversuche ausgeschlossen.

Zur Bestimmung der Beladungskapazität wurde Mesopram und Polymer mit unterschiedlichen Verhältnissen gemischt (Mesopramgehalt von 0 % bis 100 %). 50 mg einer Mischung wurden in ~1 g Dichlormethan gelöst und auf einen Objektträger aufgetragen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels mittels Erwärmen und einstündiger Lagerung bei Raumtemperatur wurde das Trägerglas unter polarisiertem Licht mikroskopisch betrachtet. Hier sollten freie Wirkstoffkristalle von Polymer mit/ohne Wirkstoff unterschieden werden.

2.2.1.9 Bestimmung des Restlösungsmittels mit Hilfe von GC

Durchführung:

100 mg der zu prüfenden Lyophilisate wurden jeweils mit 2,00 ml DMF versetzt und ca. 5 Minuten geschüttelt. Nach der Filtration wurden die DMF-Extrakte in GC-Vials überführt. Die Gehaltsbestimmung von Dichlormethan ist nachfolgend beschrieben:

Methodenparameter für Restlösungsmittel (Dichlormethan):

GC-Anlage	HP-6890
Säule	DB624 (6% cyanopropylphenyl-94% dimethyl polysiloxan)
Länge	30 m
Detektor	FID
Detektor Temp.	250 °C
Inj. Zeit:	1 min
Inj. Volumen	1 ml
Trägergas	Helium
Säulenfluß	1,5ml /min Helium (oder 34 cm/s.)
Brennergase	H ₂ und Luft (45 ml + 450 ml)
Temp. Prog. 1	5 °C /min auf 70 °C
Temp. Prog. 2	30 °C / min auf 220 °C
Laufzeit	21 min

2.2.2 Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel

2.2.2.1 Allgemeine Information

Das Polymer Eudragit[®] S100 löst sich im Wasser bei $\text{pH} > 7,0$ und wird deshalb für die Herstellung von magensaftresistenten Formulierungen eingesetzt. Eudragit[®] S100 und Mesopram sind beide in Ethanol und Aceton gut löslich, was eine Voraussetzung für die nachfolgend beschriebenen Herstellmethoden ist.

2.2.2.2 Herstellungsmethode

2.2.2.2.1 Lösungsmittel Austausch Methode (solvent displacement method)

Die Lösungsmittel Austausch Methode ist eine einfache Methode, die oft für die Herstellung von Nano- bzw. Mikropartikeln eingesetzt wird (Fessi, Puisieux et al., 1989). Das Prinzip basiert auf dem Unterschied der Löslichkeit von Polymer bzw. Wirkstoff in zwei ganz mischbaren Flüssigkeiten. Polymer und Wirkstoff werden zuerst in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst und danach in eine Tensidlösung eingetragen. Das Polymer und der Wirkstoff fallen wegen der geringen Löslichkeit in der Tensidlösung zusammen aus. Der Wirkstoff wird dabei im Polymer verkapselt. Durch mehrere Waschschrte wird der unverkapselte Wirkstoff entfernt. Man erhält eine wirkstoffhaltige Nanosuspension.

Es ist schwierig bei dieser Technik das optimale System (Wirkstoff/Polymer/organische Phase/wässrige Phase) herauszufinden, in dem das Polymer Partikel bildet und der Wirkstoff ausfällt.

Diese Methode ist nicht geeignet für die Verkapselung von wasserlöslichen Wirkstoffen, die schnell von der organischen Phase in die wässrige Phase diffundieren können (Govender, Stolnik et al., 1999).

Basierend auf diesem Prinzip wurden in dieser Arbeit zwei variierte Methoden eingesetzt: Die klassische Bechglas-Methode und die Mikromischer-Methode.

1. Klassische Becherglas-Verfahren (Semi-batch)

Allgemeine Information:

Die einfachste Methode, basierend auf diesem Prinzip, ist klassische Becherglas-Methode (Semi-batch). Bei der klassischen Becherglas-Methode findet der Ausfällungsprozess im Becherglas unter Rühren statt. Der Zustand der Nanosuspension unterscheidet sich, durch ständig ändernde Polymer- und Wirkstoffkonzentration, vom Start bis zum Ende stark. Es ist schwierig eine gleichmäßige Partikelgrößenverteilung zu erhalten.

Früh entstandene Nanopartikel rotieren in der Suspension und der verkapselte Wirkstoff wird während der Verarbeitung freigesetzt. Eine hohe Verkapselungsrate ist mit dieser Methode nicht zu erreichen, wenn die Löslichkeit des Wirkstoffs im Wässrigen groß ist (Lamprecht, Ubrich et al., 2001b). Diese Methode wurde aber wegen des geringen Technik- und Kostenaufwands für die Herstellung der Mesopram beladenen Eudragit® S100 Nanopartikel eingesetzt und untersucht. (Abb.2.6).

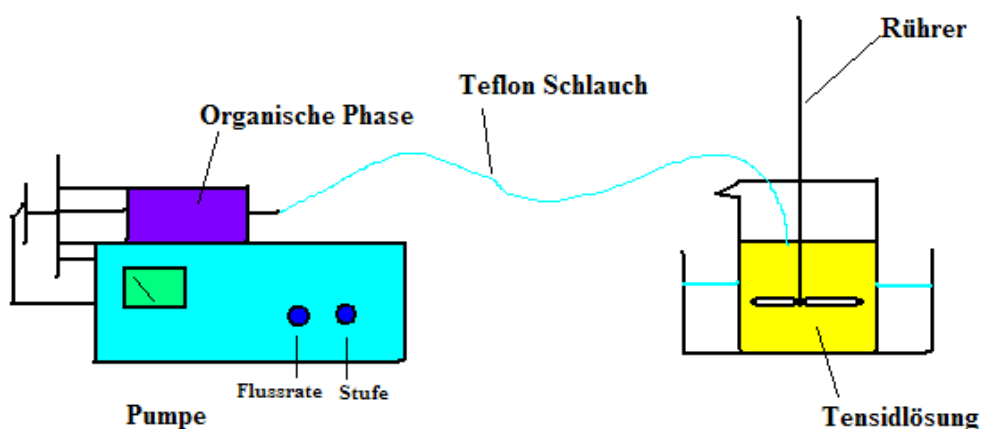


Abb. 2.6: Die graphische Darstellung der klassischen Becherglas-Methode

Partikelherstellung:

2,0 g Eudragit® S100 und 400 mg Mesopram wurden abgewogen und in ca. 25 ml Ethanol 96 % gelöst und im Anschluss auf 100 ml verdünnt. Die organische Phase wurde mit konstanter Fließrate (5×10^{-3} ml/s) in 100 ml 0,1 % iger Tensidlösung (SDS oder Triton® X-100; pH 4,0; bei Raumtemperatur; 200 ml Becherglas) unter Rühren (400 upm) zudosiert. Nach der Zugabe der organischen Phase (5 ml Lösung, enthält 20 mg Mesopram und 100 mg

Eudragit® S100), wurde die Suspension noch 5 Minuten lang gerührt. Nur ca. 100 mg Polymer konnte in 100 ml 0,1 % iger Tensidlösung dispergiert werden. Eine Überdosierung der organischen Phasen würde zu einer schlechten Partikelgrößeverteilung führen bzw. eine Agglomeration verursachen. Die Versuche mit 0,1 % SDS und Triton® X-100 Tensidlösung wurden je dreimal wiederholt. Die Partikelgröße, das Zetapotenzial, die Verkapselungsrate und die Stabilität des Wirkstoffs wurden untersucht.

2. Mikromischerverfahren:

Allgemeine Information:

Die Vermischung zweier Flüssigkeitsströme findet in Mikrostruktur statt. Unter der so genannten Mikrovermischung wird eine Vermischung zweier völlig mischbarer Flüssigkeiten in kleinsten Kanälen oder in anderen Mikroreaktionsräumen verstanden (Bothe, Stemich et al., 2006).

Man unterscheidet zwei Arten von Mikromischern: Der passive Mikromischer, welcher ohne Energiezufuhr arbeitet und der aktive Mikromischer, bei welchem für den Mischungsprozess extra Energie zugeführt werden muss (Hessel, Lowe et al., 2005)

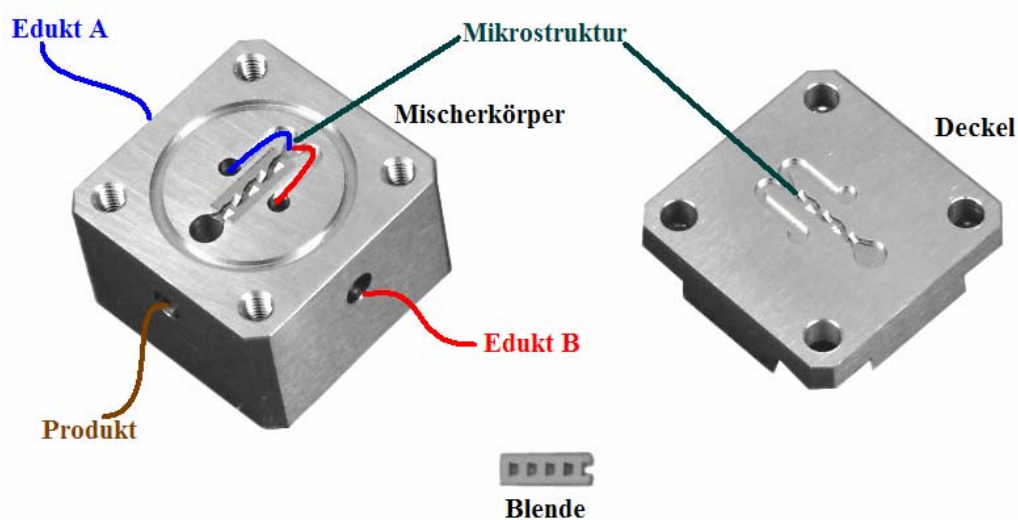


Abb. 2.7: Aufbau eines Kaskaden-Mikromischers

Aufgrund der Einfachheit wurde bei dieser Arbeit der passive Mikromischer verwendet. Der eingesetzte Kaskaden-Mikromischer bestand aus drei Hauptteilen: Die Blende, der Mischerkörper und der Mischerdeckel. Die Blende liegt zwischen dem Mischerkörper und dem Mischerdeckel und bildet einen Zick-Zack Mischkanal (s. Abb. 2.7). Die Edukte gelangen von zwei Einlässen A und B des Mikromischers in den Mikrokanal und werden dort gemischt. Die entstandene Suspension kommt dann am Produktausgang heraus.

In den kaskadenartig angeordneten Mischstrukturen wird der Flüssigkeitsstrom jeweils an der Mischblende geteilt und durch die Strömungsführende Wandstruktur seitlich wieder vereinigt. In jeder der fünf Mischkaskaden werden die Lamellenbreiten halbiert. Die Besonderheit dieses Mixers liegt darin, dass sehr schmale Strömungslamellen entstehen, obwohl keine Strukturen in der Größe der Strömungslamellen enthalten sind. Der Mischer ist dadurch für partikelhaltige Flüssigkeiten (Max. zulässige Partikelgröße 50 µm) und höher viskose Medien gut geeignet (Ehrfeld Mikrotechnik BTS, 2005). Weil der Mischvorgang nur den Bruchteil einer Sekunde dauert (Mittlere Verweilzeit ist ca. 0,2 Sekunden bei einem Volumenstrom von 100 ml/Minute) und das Verhältnis zwischen den Edukten während der Versuch konstant bleibt, ist eine kleine Partikelgröße mit enger Verteilung durch den Einsatz dieser Technik zu erwarten. Aufgrund des schnellen Mischvorgangs ist die unerwünschte Diffusion des verkapselten Wirkstoffs aus den Partikeln reduziert.

Partikelherstellung:

Edukt B (organische Phase): 100 ml Ethanol enthielt 2,0 g Eudragit® S100 und 400 mg Mesopram.

Edukt A (wässrige Phase): 0,1 % Triton® X-100 oder 0,1 %ige SDS.

Die Herstellungsparameter sind in der Abbildung 2.8 dargestellt. 100 ml Edukt A und 5 ml Edukt B wurden innerhalb von 1 Minute mit einem Druck von ca. 2 bar in den Mikromischer eingetragen und in dem Mischkanal vermischt. Die ausgetragene Nanosuspension wurde mit Ultrafiltration aufkonzentriert. Die erhaltene Suspension stand für die Bestimmung der Partikelgröße und weiteren Untersuchungen zur Verfügung.

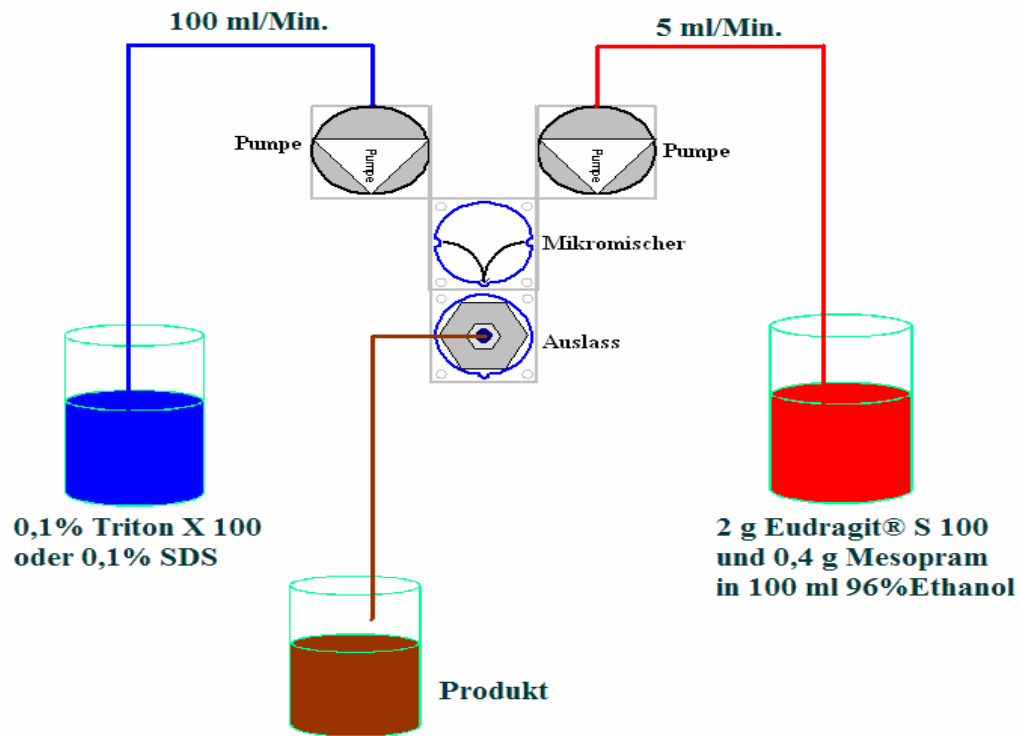


Abb. 2.8: Die graphische Darstellung des Mischvorgangs mit dem Kaskaden-Mikromischer für die Herstellung der Mesopram beladenen Eudragit® S100 Nanopartikel.

2.2.2.3 Verkapselungsrate

Weil die Partikelkonzentration in der Nanosuspension niedrig war, musste die Nanosuspension durch Ultrafiltration aufkonzentriert (verengt) werden. Der Wirkstoffgehalt in den Nanopartikel wurde mittels HPLC bestimmt. Hierzu wurden 100 ml der hergestellten Nanosuspension mit einem Millipore Labscale TFF System ultrafiltriert. Der Filter war PXB 030A50 (cut-off 30 kD). Der Druck betrug zwischen 1-2 bar. Die Suspension wurde bis ca. 15 ml aufkonzentriert, dann mit ca. 30 ml Wasser (mit 0,1 M NaOH und HCL auf pH 4,0 eingestellt) gespült und wieder auf ca. 15 ml aufkonzentriert. 1,5 ml der aufkonzentrierten Nanosuspension wurden bei 14.000 upm 5 Minuten abzentrifugiert und das Sediment wurde im Vakuum bei 30 °C 2 Stunden getrocknet und im Anschluss in 1,5 ml 96 % Ethanol gelöst. Der Mesopramgehalt im Ethanol wurde mittels HPLC bestimmt.

2.2.2.4 pH-Stabilität der Mesopram beladenen Eudragit® S100 Nanopartikel im SIF

Eudragit® S100 ist wasserunlöslich bei $\text{pH} < 7,0$. Diese Eigenschaft wird für die Herstellung magensaftresistenter Filmtabletten von pharmazeutischer Industrie oft genutzt. Die Nanopartikel besitzen eine große Oberfläche und viele Eigenschaften der Substanzen ändern sich im kolloidalen Zustand. Ob die Eudragit® S100 Nanopartikel bei $\text{pH} < 7,0$ stabil und unlöslich sind, ist für den Einsatz des Polymers für weitere Untersuchung entscheidend. Nur wenn die Eudragit® S100 Nanopartikel bei $\text{pH} < 7,0$ stabil sind, können sie bis zum Dünndarm oder sogar zum Dickdarm gelangen und den Wirkstoff dorthin transportieren.

Zur Bestimmung der Stabilität der Eudragit® S100 Nanopartikel im SIF bei $\text{pH} 6,8$ und $\text{pH} 7,0$ wurde das Spektralphotometer (Fa. Shimadzu, UV-VIS 2401) eingesetzt. Die Parameter des Spektralphotometers wurden wie folgt eingestellt:

- | | |
|------------------|------------------------------|
| ▪ Wellenlänge | 300 nm |
| ▪ Spaltbreite | 1 nm |
| ▪ Daten-Aufnahme | 1 Sekunde |
| ▪ Aufnahmezeit | 3500 Sekunden (ca. 1 Stunde) |

200 μl konzentrierter Eudragit® S100 Nanosuspension wurden in eine Quarzküvette gefüllt. Dieser wurden 2,5 ml SIF ($\text{pH} 6,8$ oder $\text{pH} 7,0$) zugesetzt. Die Messungen haben nach dem Zusatz der Nanosuspension sofort angefangen. Der ganze Versuch hat ca. 1 Stunde gedauert und die Änderung der Absorption wurde automatisch registriert und graphisch dargestellt.

2.2.3 Mesopram beladenen Eudragit® RS Nanopartikel

2.2.3.1 Allgemeine Information

Eudragit® RS ist ein Copolymer aus Acrylsäuren mit Methacrylsäureestern und besitzt wenige endständige quartäre Ammoniumgruppen. Es ist im wässrigen pH-unabhängig unlöslich und quillt unter Wasseraufnahme auf.

Eudragit[®] RS wird in der pharmazeutischen Industrie sehr oft für die Herstellung von Filmtablets mit retardierter Wirkstoff-Freisetzung eingesetzt.

Weil das Polymer endständige quartäre Ammoniumgruppen besitzt, tragen die Oberflächen der Eudragit[®] RS Nanopartikel positive Ladungen, die für das stark positive Zetapotenzial und die Stabilisierung der Partikel verantwortlich sind (s. Kap. 3.2.2.3). Es ist aus diesem Grund möglich Eudragit[®] RS-Nanopartikel ohne Tensidzusatz herzustellen (Bodmeier, Chen et al., 1991).

Weil der Arzneistoff Mesopram eine relativ hohe Wasserlöslichkeit besitzt, ist zur Herstellung von Nanopartikel die Anwendung der normalen Lösungsmittel Austausch Methode nicht anwendbar (s. Kap. 2.2.2.1). Aus diesem Grund wurde eine alternative Lösungsmittel Austausch Methode eingesetzt. Hier sollten zwei Variationen der Methode auf ihre Tauglichkeit hin untersucht werden.

1. Der Arzneistoff Mesopram sowie das Polymer Eudragit[®] RS wurden in Aceton gelöst. Da sowohl der Arzneistoff, als auch das Polymer in n-Hexan sehr schwerlöslich sind und des Weiteren das n-Hexan mit Aceton in jedem Verhältnis mischbar ist, sollte dieses Lösungsmittel zum Ausfällen der Partikel genutzt werden. Hierzu wurde die Arzneistoff/Polymer-Lösung in das n-Hexan eingetroppt, woraufhin das Polymer und der Wirkstoff zusammen zu Nanopartikeln ausfielen. Wegen der geringen Löslichkeit von Mesopram in n-Hexan, ist eine hohe Verkapselungsrate zu erwarten. Diese Methode wird im folgendem „O/O Lösungsmittel Austausch Methode“ genannt.

2. Das hohe Zetapotential der Eudragit[®] RS-Nanopartikel ermöglicht eine Variante der Lösungsmittel Austausch Methode, welche von dem Arbeitskreis um Bodmeier entwickelt wurde (Bodmeier, Chen et al., 1991). Hierbei wird eine Wirkstoff/Polymerlösung in eine geringe Menge Wasser gegeben, was zu einem Ausfällen von Wirkstoff-Nanopartikeln führt. Da die hierbei angewandten Wassermengen gering sind, steigt vermutlich die Verkapselungsrate des Mesoprams mit der „Bodmeier Methode“.

2.2.3.2 Herstellungsmethode

Wie einleitend erwähnt, wurde für die Herstellung Mesopram beladener Eudragit[®] RS Nanopartikel zwei Variationen der Lösungsmittel Austausch Methode untersucht. Im Folgenden sei der genaue Versuchsaufbau beschrieben:

1. O/O Lösungsmittel Austausch Methode: 100 mg Eudragit[®] RS und 50 mg Mesopram wurden in 5 g Aceton gelöst. 100 µl dieser Aceton Lösung wurden langsam, unter starkem Schütteln, zu 6 ml einer Tensidlösung aus n-Hexan und Span[®] 80 (1 %), getropft. Die entstandene Nanosuspension wurde noch 10 Minuten weiter geschüttelt.
2. Bodmeier Methode: Bis zum Auflösen aller festen Substanzen wurde auf 715 mg Eudragit[®] RS sowie 50 mg Mesopram Ethanol (96 %) zugetropft. Diese Ethanollösung wurde unter Rühren 25 ml destilliertem Wasser sehr rasch zugesetzt und die entstandene Suspension 25 Minuten weiter gerührt.

2.2.4 Mesopram beladene Chitosan Nanopartikel

2.2.4.1 Allgemeine Information

Chitosan ist ein bioabbaubares und im leicht sauren wasserlösliches Polymer. Es wurde in dieser Arbeit für die Herstellung von Mesopram beladenen Nanopartikeln eingesetzt.

Genutzt wurde das Handelsprodukt Chitopharm[®] L, welches freundlicherweise kostenfrei von Firma Cognis zur Verfügung gestellt wurde.

2.2.4.2 Herstellungsmethode

Für Herstellung von Chitosan-Nanopartikeln haben sich drei Methoden als geeignet herausgestellt (Agnihotri, Mallikarjuna et al., 2004). Die Ionische Gelbildungs Methode, die Emulsions-Tröpfchen Koalescence Methode sowie die Reverse Mizellare Methode. In dieser Arbeit sollten die beiden letztgenannten auf ihre Eignung hin untersucht werden.

2.2.4.2.1 Emulsions-Tröpfchen Koalescence Methode (Tokumitsu's Methode)

Diese Technik wurde von Tokumitsu entwickelt und soll im Folgenden beschrieben werden (Tokumitsu, Ichikawa et al., 1999): Eine W/O-Emulsion mit einer Wirkstoff/Chitosan-Lösung (im Folgenden wässrige Phase 1 genannt) sowie Paraffinöl wird mit einer weiteren W/O-Emulsion aus Natronlauge (im Folgendem wässrige Phase 2 genannt) und Paraffinöl gemischt und stark gerührt.

Ein Zusammenfließen der inneren Phasen beider Emulsionen ist nun möglich. Da das Chitosan im basischen nicht löslich ist, kommt es im Folgenden zu einem Ausfällen des Polymers unter der Ausbildung von Nanopartikeln. Diese Chitosan Nanopartikel werden im Anschluss abgetrennt und aufgereinigt (s. Abb. 2.9). Diese Herstellungsmethode erscheint für diese Arbeit von Bedeutung zu sein, da das Mesopram im Paraffinöl nicht löslich ist und eine hohe Verkapselungsrate zu erwarten ist.

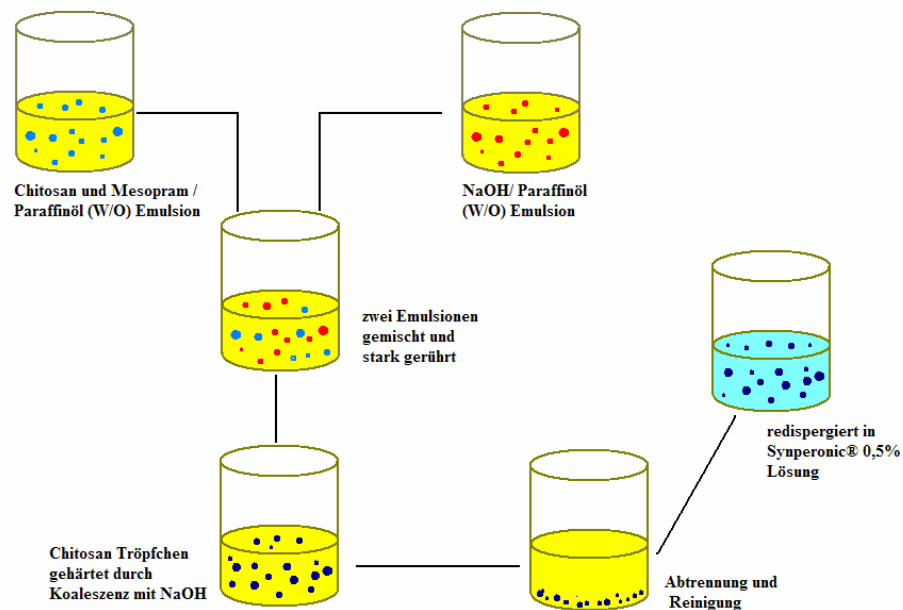


Abb. 2.9: Herstellung Mesopram beladener Chitosan Nanopartikel mit Hilfe der Emulsions-Tröpfchen Koaleszenz Methode

Materialien:

- ☆ Chitosan-Lösung (2 %): 2 g Chitopharm[®] L wurde genau abgewogen und in ca. 85 g destilliertem Wasser dispergiert. Die Dispersion wurde leicht erwärmt (bis ca. 35 °C). Unter Rühren wurde 1 M HCL zugetropft bis sich das Chitosan-Pulver völlig gelöst hat und eine klare zähflüssige Lösung entstanden ist. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 0,1 M NaOH und 0,1 M HCl auf pH 4,5 eingestellt und dann mit destilliertem Wasser auf 100 g aufgefüllt.
- ☆ Wässrige Phase 1: 10 mg Mesopram wurden in 0,2 g Ethanol gelöst und im Anschluss 10 g Chitosan-Lösung (2 %) zugesetzt.
Für die im Ergebnisteil beschriebenen Vorversuche wurde alternativ eine wirkstofffreie wässrige Phase 1 eingesetzt, die 800 µl Bromthymolblau-Lösung (1 %) enthielt.
- ☆ Wässrige Phase 2: 3 M NaOH.
- ☆ Ölige Phase: Ein Gramm einer Mischung aus Span[®] 80 und Tween[®] 80 (49:51) wurden in 9 g Paraffinöl gelöst.
Für die im Ergebnisteil beschriebenen Vorversuche wurde alternativ 0,1 mg Sudanrot B im Paraffinöl gelöst.

Partikelherstellung

Die für die Partikelherstellung benötigten Emulsionen wurden sowohl mit Ultraschall, als auch alternativ mit einem Mikrofluidizer hergestellt. Die Emulsionsherstellung mit Ultraschall verursacht unerwünschte Wärme und chemische Reaktion, die die chemische Stabilität des Wirkstoffs beeinflussen kann. Die Methode wurde aus diesem Grund nur für die Vorversuche eingesetzt.

Der Mikrofluidizer ist geeignet größere Chargen herzustellen. Die Anzahl der durchlaufenen Produktionszyklen bestimmt die Größeverteilung der Emulsionstropfchen. Im Folgenden werden die genauen Produktionsparameter dargestellt:

Ultraschall: 2 g wässrige Phase 1 wurden 10 g ölige Phase zugesetzt. Die Mischung wurde mit Hilfe eines Ultraschallfingers (BRANSON SONIFIER[®] B-12; Output Stufe 10) 5 Minuten homogenisiert (Emulsion 1). Parallel wurde ein Ansatz mit 1 g wässrige Phase 2 und 10 g ölige Phase 5 Minuten lang mit Ultraschall behandelt bis

eine homogene Emulsion entstand (Emulsion 2). Emulsion 1 und Emulsion 2 wurden gemischt und anschließend mit Ultraschall für weitere 5 Minuten homogenisiert.

Mikrofluidizer: 10 g wässrige Phase 1 wurden 50 g öliger Phase zugesetzt. Die Mischung homogenisierte mit einem Mikrofluidizer unter folgenden Bedingungen: Die Mischung wurde 3 Minuten lang bei 200-400 bar homogenisiert (Emulsion 1). Parallel wurden 5 g wässrige Phase 2 und 50 g ölige Phase unter denselben Bedingungen wie die Emulsion 1 homogenisiert (Emulsion 2). Die zwei Emulsionen wurden gemischt und 3 Minuten mit dem Mikrofluidizer homogenisiert.

Partikeltrennung und Reinigung

Die Chitosan-Nanopartikel wurden 50 min. bei 8.000 upm abzentrifugiert. Das Sediment wurde dreimal mit 50 ml n-Hexan gewaschen. Das gereinigte gelartige Sediment, welches noch immer einen Rest Paraffinöl enthält wurde in 10 ml Synperonic[®] 0,5 % überführt. Im Anschluss wurde Ethanol (96 %) der Mischung zugetropft. Dies hatte ein auflösen des Gels zur Folge. Im Folgenden konnte der Paraffinrest mit Hilfe eines weiteren Zentrifugationsschrittes bei 3.000 upm abgetrennt werden. Der ölige Überstand im Zentrifugenröhrchen wurde verworfen und die Chitosan Partikel in der wässrigen Phase wurden für die weitere Charakterisierung verwendet.

Bestimmung der Partikelgröße und Verkapselungsrate

Die Bestimmung der Chitosan Nanopartikelgröße wurde mittels DLS durchgeführt (s. Kap. 2.2.1.1.1).

Zur Bestimmung der Verkapselungsrate wurden die Chitosan Nanopartikel durch eine Zentrifugation bei 14.000 upm abgetrennt. Die Partikel wurden im Anschluss in genau abgewogenen HPLC Vials (*W1*) überführt, im Vakuum (0,1 bar) bei 35 °C getrocknet und anschließend wieder gewogen (*W2*). Nach dem Zusatz von 1,5 ml 50 % Ethanol wurden die HPLC Vials 24 Stunden geschüttelt. Dies hat ein quellen der getrockneten Chitosan Partikel zur Folge und das eingeschlossene Mesopram konnte extrahiert werden. Nach dem

abfiltrieren der gequollenen Partikel wurde der Mesopramgehalt mittels HPLC bestimmt (s. Kap. 2.2.1.3).

2.2.4.2.2 Reverse Mizellare Methode

Reverse Mizellen Systeme sind thermodynamisch stabile Systeme, welche aus einem Tensid, einer öligen- sowie einer wässrigen Phase bestehen. Diese Systeme besitzen feine wässrige Tröpfchen, welche in Reversen Mizellen eingeschlossen sind und als Nanoreaktoren für die Herstellung von Chitosan Nanopartikel genutzt werden können.

Da die Mizellen normalerweise eine monodisperse Größenverteilung aufweisen (Maitra, 1984), besitzen die mit dieser Methode hergestellten Nanopartikel eine kleinere Partikelgröße (1-10 nm) sowie eine sehr enge Größeverteilung im Vergleich mit der konventionellen Emulsion Koaleszenz Methode (Leong and Candau, 1982).

Das eingesetzte Tensid muss bei dieser Methode einen HLB-Wert von 3-8 aufweisen. Initial wird es in n-Hexan (organische Phase) gelöst, woraufhin sich Reverse Mizellen bilden. Eine Chitosan und Mesopram Lösung (wässrige Phase) wird unter Rühren in die organische Phase anteilsweise eingearbeitet. Im Anschluss wird das Chitosan in der wässrigen Phase durch Zusatz eines Vernetzungsmittels erhärtet. Die Mesopram beladenen Chitosan Nanopartikel sind nun abzutrennen und zu reinigen.

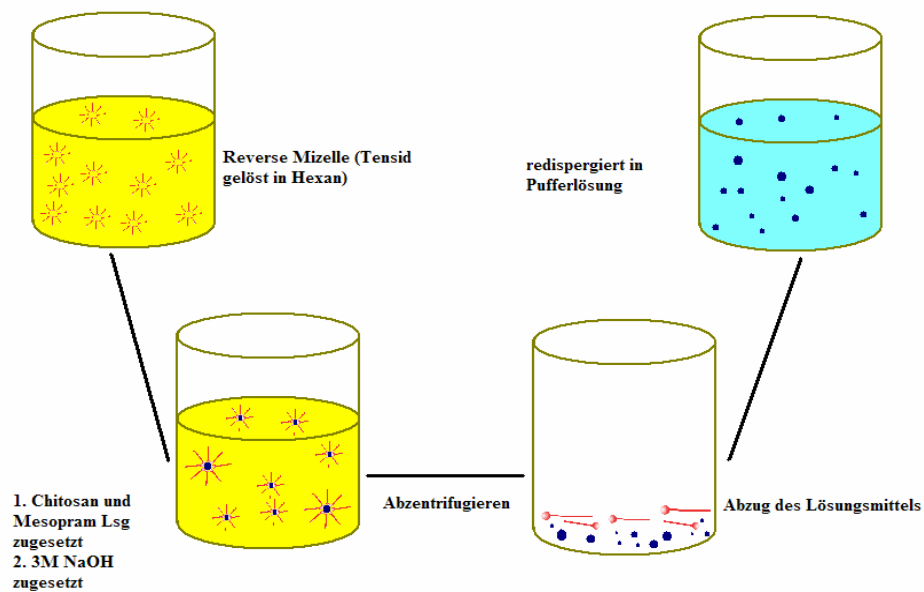


Abb. 2.10: Herstellung von Mesopram beladenen Chitosan Nanopartikel mit Hilfe der Emulsions-Tröpfchen Koaleszenz Methode

Materialien

- ☆ Wässrige Phase 1: 5,00 mg Mesopram wurden in 0,1 g Ethanol (96 %) gelöst und anschließend in 5,00 g Chitosan Lösung (0,50 %) überführt. Die Lösung wurde stark gerührt und, falls erforderlich, Ethanol tropfenweise zugesetzt, um eventuell auskristallisiertes Mesopram zu lösen.
- ☆ Wässrige Phase 2: 3 M NaOH.
- ☆ Ölige Phase: 1%-ige Span[®] 80 n-Hexan Lösung.

Partikelherstellung

10 ml ölige Phase wurden im Eisbad 10 Minuten lang abgekühlt. Anschließend wurden 200 µl wässrige Phase 1, unter starkem Rühren, langsam der öligen Phase pipettiert. Nach dem Zusatz von 30 µl der wässrigen Phase 3, wurde die Nanoemulsion in geschlossenen Vials über Nacht gerührt.

Partikeltrennung und Reinigung

Die frisch hergestellte Nanosuspension wurde bei 14.000 upm abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die sedimentierten Nanopartikel mit 1,5 ml n-Hexan gewaschen und am Ende getrocknet. Leider waren die Nanopartikel nach diesem Reinigungsschritt zerstört.

Bestimmung der Partikelgröße und Verkapselungsrate

Die Chitosan Nanopartikel könnten nach der Trennung und Reinigung nicht mehr im Wässrigen aufgeschüttelt werden. Die Partikelgröße wurde aus diesem Grund vor der Trennung in n-Hexan direkt mittels DLS bestimmt. Weil das Nanopartikelsystem nach der Abzentrifugation zerstört worden war, konnte die Verkapselungsrate nicht mehr bestimmt werden.

2.2.5 Mesopram beladenen CAB, PCL und EC Nanopartikel

2.2.5.1 Allgemeine Information

CAB, PCL und EC sind die Polymere, welche in der Forschung sehr häufig für die Herstellung wirkstoffbeladener Partikel eingesetzt werden. Als geeignete Herstellungsmethode für die Nano- bzw. Mikropartikel wird in der Literatur die Emulsion-Verdampfungsmethode genannt (Uzunkaya and Bergisadi, 2003; Song, Li et al., 2005; Zhao, Liu et al., 2007).

CAB 30.000 sowie Ethocel[®] 45 sind in 96 % igem Ethanol gut löslich. Für die Bestimmung der Verkapselungsrate der Nanopartikel konnte Ethanol zum Lösen der Partikel eingesetzt werden. Für die CAB 70.000-, Ethocel[®] 100- sowie die PCL-Nanopartikel war Aceton als Lösungsmittel einsetzbar.

2.2.5.2 Herstellungsmethode

2.2.5.2.1 Emulsion-Verdampfungsmethode (EVM)

Bei der EVM wird initial eine O/W- bzw. eine W/O/W-Nanoemulsion hergestellt, welche als organische Phase den Arzneistoff sowie das Polymer gelöst enthält. Im Anschluss wird das organische Lösungsmittel mittels Vakuum oder einer anderen geeigneten Methode entfernt. Hierdurch verfestigt sich die innere Phase unter der Ausbildung fester Nanopartikel.

Die Emulsionsqualität ist für die Nanosuspensionsqualität von entscheidender Bedeutung. Eine Nano- oder Mikroemulsion mit kleiner und enger Teilchengrößenverteilung wird nach dem Verdampfen des Lösungsmittels eine Nanosuspension mit vergleichbar kleinen und engen Partikelgrößen erzeugen. Um die optimale Partikelgröße bzw. die maximale Beladungsrate des Wirkstoffs zu erreichen, sind viele Einflussfaktoren von Bedeutung. In dieser Arbeit war es nicht das Ziel diese Parameter mittels der Geräteparameter zu optimieren – diese waren in allen untersuchten Fällen gleich – sondern über die Rezeptur der Emulsion die Partikelgröße zu reduzieren sowie die maximale Beladung zu erhöhen.

2.2.5.2.2 Materialien

Der Hersteller der Polymere CAB (Mn: 70.000 und 30.000) war die ABCR GmbH. Das Polymer PCL (Mn: 42.500) wurde von der Firma Sigma Aldrich produziert. Ethocel[®] 100 sowie Ethocel[®] 45 wurden von der Firma DOW bezogen.

Die genannten Polymere wurden genutzt, um die im Folgenden dargestellte Organische Phase herzustellen.

1. Organische Phase: 250 mg Polymer (*M2*) und 75, 100, 125 oder 150 mg Mesopram (*M1*) wurden abgewogen und in 5,0 g Dichlormethan gelöst
2. Wässrige Phase: 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % und 1,0 %ige (w/v) Tensidlösung (SDS, AOT, Natriumcholat oder Gemisch von Tween80 und SDS (1:1))

2.2.5.2.3 Herstellung

100, 150, 200 oder 250 µl organische Lösung wurden schnell in 6 ml wässriger Phase überführt. Das Gemisch wurde mit dem Ultraschallgerät B-12 (Fa. BRANSON SONIFIER®) bei einer Output Stufe von 10 drei Minuten lang behandelt bis eine homogene Lösung entstand. Die bei der Behandlung mit Ultraschall entstehende Wärme führte zu einer Erwärmung der Lösung auf ca. 40°C. Der Wirkstoff war bei dieser Temperatur stabil.

2.2.5.3 Bestimmung der Verkapselungs- sowie der Beladungsrate

1,5 ml der frisch hergestellten Nanosuspension wurden in ein Mikrozentrifugentube überführt und 5 min. lang bei 14.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 1,5 ml Wasser, so gut wie möglich, resuspendiert. Bei einer nachfolgenden Zentrifugation (5 min., 14.000 upm) setzten sich die Partikel wieder ab und wurden in 0,5 ml Wasser redispergiert. Die Suspension wurde im Anschluss in ein genau abgewogenes HPLC-Vial (*W1*) überführt und 2 Stunden im Vakuum (0,1 bar) bei 35 °C getrocknet. Das Vial mit den getrockneten Partikeln wurde nach dem Abkühlen genau abgewogen (*W2*).

Die Partikel wurden nun in 1,5 ml chromatographiereinem Aceton gelöst und der Gehalt an Mesopram (*C*) mittels HPLC bestimmt. Die Verkapselungs- sowie die Beladungsrate wurden mit den im Kap. 2.2.1.3 gezeigten Formeln berechnet.

2.2.5.4 Bestimmung der Partikelgröße mit DLS

Für die Bestimmung der Partikelgröße mittels DLS wurde ein Auto-Sampler Nicomp® 380 (Fa. PSSNICOMP) eingesetzt. Hierzu wurden 1,5 ml frisch hergestellte Nanosuspension in ein 5 ml Fläschchen überführt und mit 0,1 % iger Synperonic® F68 Lösung bis auf ca. 4 ml aufgefüllt. Die Probe wurde anschließend in den Auto-Sampler eingeführt. Der Auto-Sampler stellte die Probeverdünnung vollautomatisch ein. Die Verteilung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers wurde mit der geräteeigenen Software analysiert.

2.2.6 Maßstabsvergrößerung mit dem Homogenisator

Um zu testen, ob die im Labor entwickelten Herstellungsmethoden bzw. -bedingungen für die Produktion im industriellen Maßstab einsetzbar sind, muss eine Maßstabsvergrößerung durchgeführt werden.

Die Zusammensetzung der organischen und der wässrigen Phase sowie das Verhältnis zwischen der organischen und der wässrigen Phase sollten bei diesem Test gleich bleiben, nur die Mengen wurden proportional vergrößert.

Für die Maßstabsvergrößerung wurde ein Homogenisator verwendet. Die Durchführung wird im Folgenden beschrieben:

- ☆ organische Phase: 500 mg CAB 70.000 oder 500 mg Ethocel[®] 100 wurden zusammen mit 300 mg Mesopram in 10 g Dichlormethan gelöst und in geschlossenen Fläschchen im Kühlschrank aufbewahrt.
- ☆ wässrige Phase: *Aqua purificata* versetzt mit 0,05 % AOT

2 ml der organischen Phase wurden schnell in 50 ml der wässrigen Phase pipettiert und im direkten Anschluss im Eisbad mittels Ultra-Turrax[®] ca. 1 Minute homogenisiert. Nach dem Herstellen dieser Voremulsion wurde sie in einen Homogenisator überführt und 15 Minuten lang bei einem Druck von 500-1000 bar homogenisiert. Die Temperatur der Emulsion wurde dabei, mittels einer Kühlung, konstant bei ca. 4 °C gehalten. Nach dem Homogenisationsprozess wurde die entstandene Nanoemulsion in einen Rotavaporkolben überführt. Das Restlösungsmittel in der Nanosuspension wurde unter Vakuum und leichtem Erwärmen bei ca. 50 °C entfernt. Die Nanosuspension wurde in einem geschlossenen Schliffkolben aufbewahrt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Mesopram beladene Eudragit[®] S100 Nanopartikel

3.1.1 Vorversuch

Es wurde getestet, ob das Polymer Eudragit[®] S100 für die Herstellung Mesopram beladener Nanopartikel geeignet ist. Hierzu muss ein Beladungsversuch analog der im Kap. 2.2.1.8 beschriebenen Methode durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieses Tests sind in den nachfolgenden Fotos dargestellt. Es handelt sich dabei um die mikroskopischen Aufnahmen der getrockneten Filme.

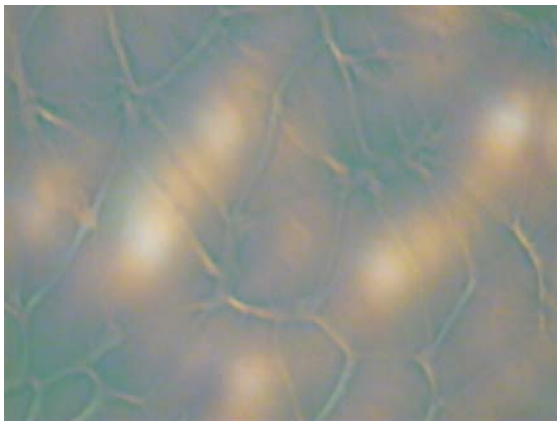


Abb. 3.1: 100 % Eudragit[®] S100



Abb. 3.2: Mesopram in Eudragit[®] S100
(50 %)



Abb. 3.3: Mesopram in Eudragit[®] S100
(60 %)

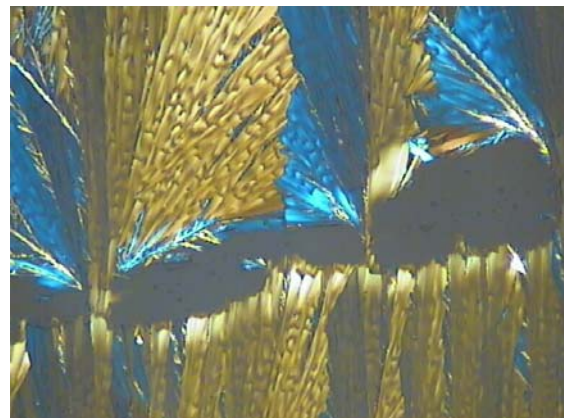


Abb. 3.4: 100 % Mesopram

Aus der Abb. 3.1 ist ersichtlich, dass Eudragit[®] S100 ohne Wirkstoff nach der Trocknung einen festen Film bildet. Unter polarisiertem Licht hat der Film grün gelblich geleuchtet.

Verglichen mit dem, auch unter polarisiertem Licht aufgenommenen, Foto der reinen Mesopram Kristalle, fehlt bei dem reinen Polymer die typische Erscheinung kristalliner Strukturen im polarisierten Licht (Abb. 3.4).

Die Abb. 3.2 zeigte die mikroskopische Aufnahme des Eudragit[®] S100 Films mit 50 % Mesopram. Unterhalb von 50 % waren keine Kristalle zu sehen. Der Wirkstoff verteilte sich amorph oder als einzelnes Molekül im Polymergerüst. Wenn dies auch bei Herstellung zutrifft, ist ein Nanopartikelsystem zu erwarten.

Wenn der Mesopramgehalt von 60 % überschritten wurde, bildeten sich Mesopramkristalle in der Polymermatrix (s. Abb. 3.3). Wenn der Mesopramgehalt bei der Herstellung größer als dieser Grenzwert wäre, würde das Mesopram wahrscheinlich im Polymergerüst ausfallen und somit ein Nanokapselsystem entstehen. Es ist auch möglich, dass der Wirkstoff und das Polymer getrennt ausfallen. In diesem Fall wären die Mesopramkristalle im elektronmikroskopischen Bild (REM) ersichtlich.

3.1.2 Charakterisierung der Eudragit[®] S100 Nanopartikel

3.1.2.1 Partikelgröße (nm)

Für die Herstellung der Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel wurden zwei verschiedene Tenside eingesetzt. Eines war das stark anionische Tensid SDS. Zum anderen wurde das nicht-ionische Tensid Triton[®] X 100 eingesetzt. Um den Einfluss des Wirkstoffs auf die Partikelgröße bzw. auf das Zetapotenzial zu ermitteln, wurden als Vergleich Eudragit[®] S100 Nanopartikel ohne Wirkstoff hergestellt.

Alle Nanopartikel wurden nach der klassischen Becherglas-Methode hergestellt.

Die Partikelgröße, Verkapselungsrate, das Zetapotenzial sowie die Stabilität wurden standardmäßig bestimmt.

Tabelle 3.1: Vergleich der Eudragit® S100 Nanopartikelgrößen mit und ohne Mesopram

Versuch	Ohne Mesopram		Mit Mesopram	
	SDS 0,1%	Triton® 0,1%	SDS 0,1%	Triton® 0,1%
1	105 nm	100 nm	118 nm	111 nm
2	100 nm	180 nm	113 nm	103 nm
3	114 nm	134 nm	116 nm	102 nm
MW	106 nm	138 nm	116 nm	106 nm
SD	7 nm	41 nm	3 nm	5 nm
VK(%)	7	29	2,5	5

Aus der Tabelle 3.1 ist ersichtlich, dass der Einfluss des Mesoprams auf die Partikelgröße bei der Herstellung mit 0,1% SDS nicht signifikant war. Die Partikelgrößen lagen bei ca. 110 nm. Bei Herstellung der wirkstofffreien Eudragit® S100 Nanopartikel mit 0,1 % iger Triton® X 100 waren die ermittelten Partikelgrößen sehr unterschiedlich. Des Weiteren waren die Partikel bei den nachfolgenden Stabilitätsversuchen im SIF instabil. Die wirkstoffhaltigen Eudragit® S100 Nanopartikel mit 0,1 % iger Triton® X-100 hatten eine einheitliche Partikelgröße von ca. 106 nm. Es zeigte sich also, dass die Partikel durch den Arzneistoff Mesopram stabilisiert wurden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das Mesopram bei einem pH-Wert von 4,0 amphotere Eigenschaften aufweist und so als Tensid wirksam werden kann. Im folgendem kommt es zu einer Stabilisierung der Eudragit® S100 Nanopartikel. Die an der Grenzfläche lokalisierten Mesopram Moleküle können sehr leicht durch das Abwaschen mit destilliertem Wasser weggespült werden und somit eine niedrige Verkapselungsrate verursachen.

Die Messdaten zu den Partikelgrößen sind in der Tabelle 3.2 aufgeführt.

Die Einflüsse der Herstellungsmethode bzw. der Tensidart auf die Eudragit® S100 Partikelgrößen werden in der Abb. 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.2: Vergleich der Einflüsse der Herstellungsmethode bzw. der Tensidart auf die Partikelgrößen von Mesopram beladenen Eudragit® S100 Nanopartikeln

Versuche	Mikromischer		Becherglas	
	SDS 0,1%	Triton® 0,1%	SDS 0,1%	Triton® 0,1%
1	67 nm	69 nm	118 nm	111 nm
2	65 nm	70 nm	113 nm	103 nm
3	63 nm	71 nm	116 nm	102 nm
MW	65 nm	70 nm	116 nm	106 nm
SD	2 nm	1 nm	3 nm	5 nm
VK (%)	3	2	3	5

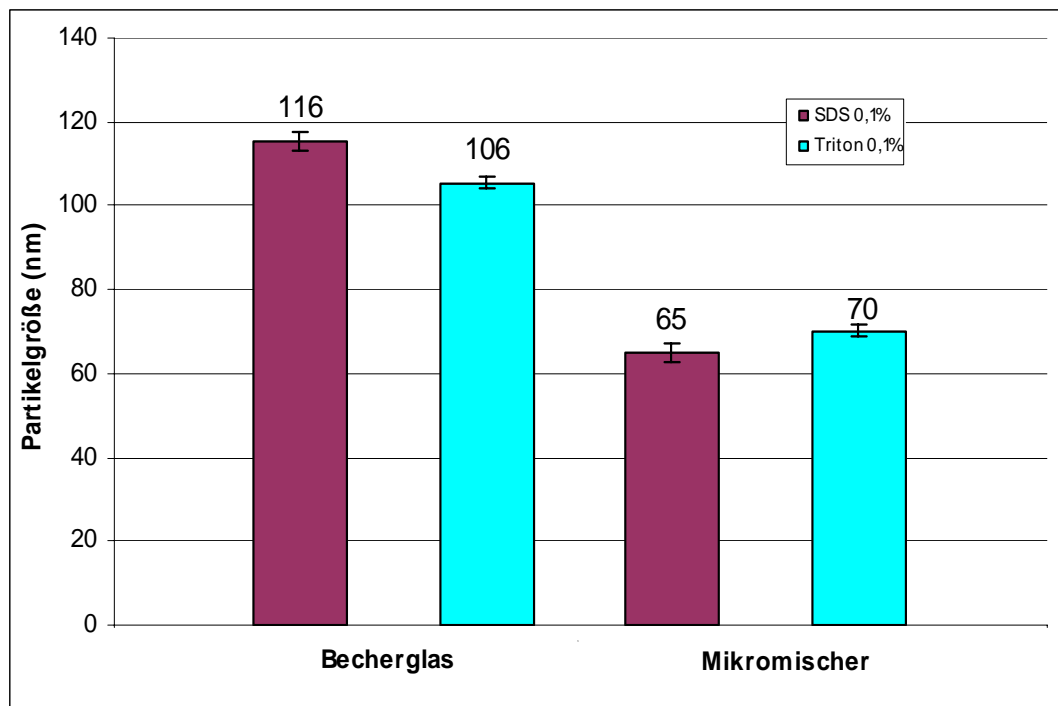


Abb. 3.5: Graphische Darstellung der Einflüsse der Herstellungsmethode bzw. der Tensidart auf die Partikelgrößen von Eudragit® S100 Nanopartikeln (MW±SD; n=3)

Wie in der Abb. 3.5 gezeigt, konnten mit dem Mikromischer signifikant kleinere Eudragit® S100 Nanopartikel hergestellt werden, als mit der klassischen Becherglas-Methode. Die Tensidart hat keinen signifikanten Einfluss gezeigt ($P < 0,05$; $df = 4$; Student's t-Test).

Wie schon im Kap. 2.2.2.2.1 erwähnt, könnten die Hauptgründe für das gute Ergebnis der mittels Mikromischer hergestellten Nanopartikel im sehr kurzen Vermischungsverlauf liegen, da der Mischprozess nur den Bruchteil einer Sekunde dauert (Ehrfeld Mikrotechnik BTS, 2005).

Des Weiteren wird bei der Anwendung der Mikromischer-Methode ein Druck von ca. 2 Bar mittels zweier HPLC Pumpen aufgebaut. Die von dem Druck verursachten Scherkräfte könnten die noch nicht verfestigten Nanopartikel zerkleinern, und somit für die kleine Partikelgröße verantwortlich sein.

3.1.2.2 Zetapotenzial (mV)

Die Bestimmung des Zetapotenzials wurde mit der im Kap. 2.2.1.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Die erzeugten Messdaten wurden in der Abb. 3.6 sowie der Abb. 3.7 graphisch dargestellt.

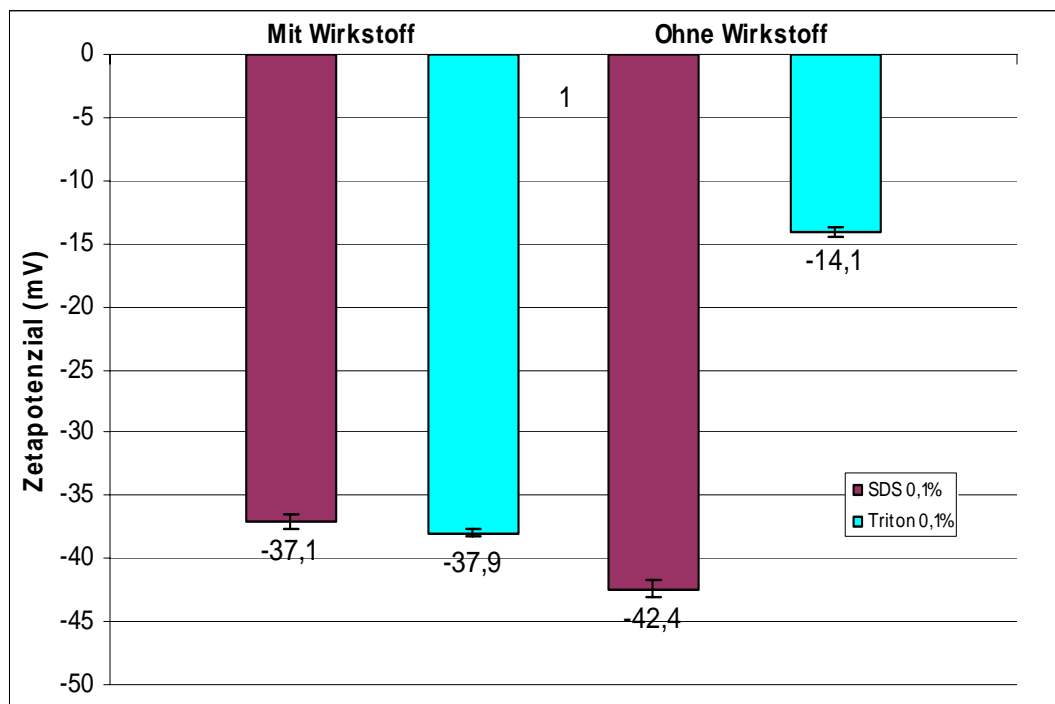


Abb. 3.6: Vergleich des Zetapotenzials der Eudragit® S100 Nanopartikel mit und ohne Mesopram hergestellt mittels der klassischen Becherglas-Methode (MW \pm SD; n=3)

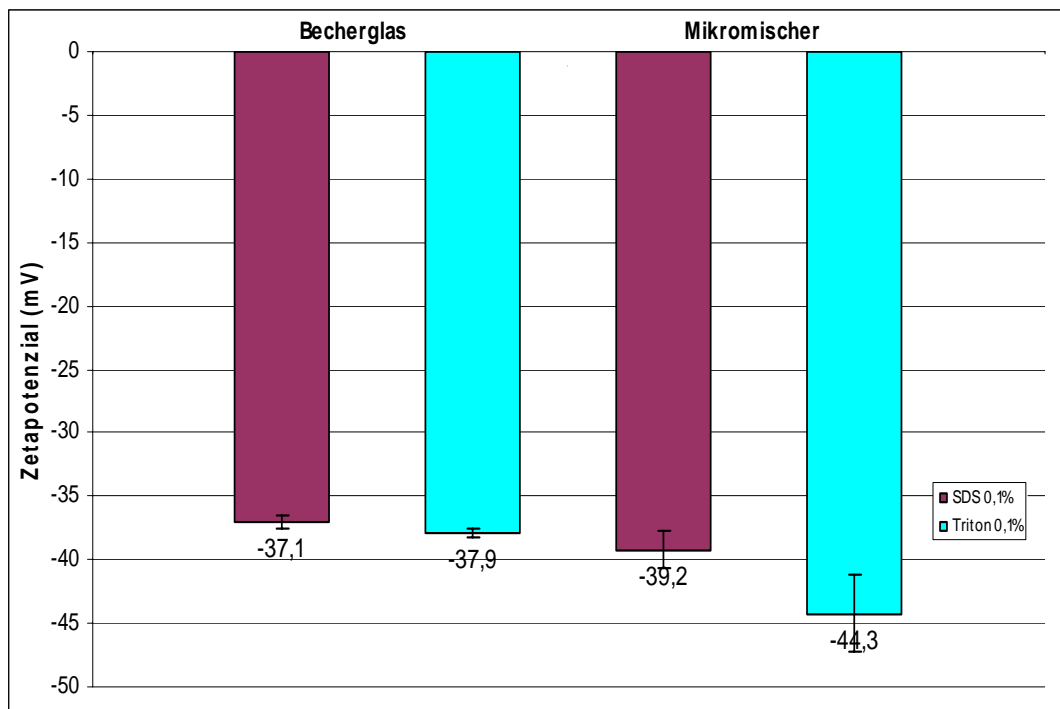


Abb. 3.7: Vergleich des Zetapotenzials der Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel, hergestellt mittels der klassischen Becherglas-Methode sowie der Mikromischer-Methode (MW \pm SD; n=4)

Wie im [Kap. 3.1.2.1](#) dargestellt, besteht die Möglichkeit, dass sich Mesopram Moleküle an der Grenzfläche anreichern. Die Eudragit[®] S100 Nanopartikel könnten dadurch zusätzliche Ladungen an der Grenzfläche tragen, welche das Zetapotenzial beeinflussen würden. Um den Einfluss des Mesoprams auf das Zetapotenzial zu ermitteln, wurden die Zetapotenziale der wirkstoffhaltigen- mit den wirkstofffreien Nanopartikel verglichen. Aus der Abb. 3.6 ist ersichtlich, dass das Zetapotenzial der Eudragit[®] S100 Nanopartikel sowohl von der Tensidart, als auch vom Wirkstoff Mesopram beeinflusst wurde. Mit dem nicht-ionischen Tensid Triton[®] X-100 besaßen die Partikel ein geringes Zetapotenzial von ca. -14 mV. Beim Einsatz von SDS hat das Zetapotenzial Werte von bis zu ca. -42 mV erreicht. Die Zetapotenziale der Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel zeigten, unabhängig von der Tensidart, Zetapotenziale mit Werten von ca. -40 mV. Dieses Phänomen lässt sich durch die Lokalisation der Mesoprammoleküle an die Partikelgrenzfläche erklären.

3.1.2.3 Verkapselungsrate

Die Verkapselungsrate der Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel wurde analog der im Kap. 2.2.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt. In der Tabelle 3.3 sind die Messdaten aufgeführt.

Tabelle 3.3: Vergleich der Verkapselungsrate von Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel hergestellt mit der klassischen Becherglas-Methode sowie der Mikromischer-Methode

N=3		Mikromischer		Becherglas	
		Verkapselungsrate	Beladung	Verkapselungsrate	Beladung
SDS 0,1%	MW	1,2 %	2,0 µg/mg	1,4 %	2,3 µg/mg
	SD	0,2 %	0,3 µg/mg	0,02 %	0,04 µg/mg
	VK (%)	16	16	1,5	2
Triton 0,1%	MW	1,6 %	2,6 µg/mg	1,4 %	2,3 µg/mg
	SD	0,3 %	0,5 µg/mg	0,01 %	0,02 µg/mg
	VK (%)	18	17	0,9	1

Es ist auffällig, dass die Verkapselungsrate sehr gering war (ca. 1 %). Die potentielle Ursache hierfür ist die in den Kapiteln 3.1.2.1 und 3.1.2.2 aufgestellte Hypothese, dass sich ein Teil der Mesopram Moleküle in die Grenzfläche der Eudragit[®] S100 Partikel lokalisiert. Diese Moleküle können eventuell leichter durch das Spülen mit Wasser aus den Partikeln entfernt werden und dadurch zu einer niedrigen Verkapselungsrate führen. Eine weitere Ursache für die geringe Verkapselungsrate könnte in der großen Löslichkeit des Mesoprams im Wasser liegen (650 µg/ml). Da die Löslichkeit des Mesoprams im wässrigen sehr groß ist, wird sich bei der Präzipitation der Nanopartikel nur ein geringer Teil des Mesoprams im Polymer niedergeschlagen haben.

3.1.2.4 pH-Stabilität

Da das Polymer Eudragit® S100 in Abhängigkeit des pH-Wertes wasserlöslich ist, sollte untersucht werden, ob die Löslichkeit und somit die Stabilität der Mesopram beladenen Eudragit® S100 Nanopartikel ein ähnliche pH-Wert Abhängigkeit zeigt wie das reine Polymer. Es ist bekannt, dass sich Eudragit® S100 bei einem pH-Wert von 7,0 vollständig auflöst. Bei einem pH-Wert von 6,8 ist es jedoch unlöslich. Diese beiden pH-Werte sollten bei der Bestimmung der Löslichkeit der Nanopartikel genutzt werden.

Das Auflösungsverhalten wurde analog der im Kap. 2.2.2.4 beschriebenen Methode analysiert. Die Messdaten sind in der Abb. 3.8 graphisch dargestellt.

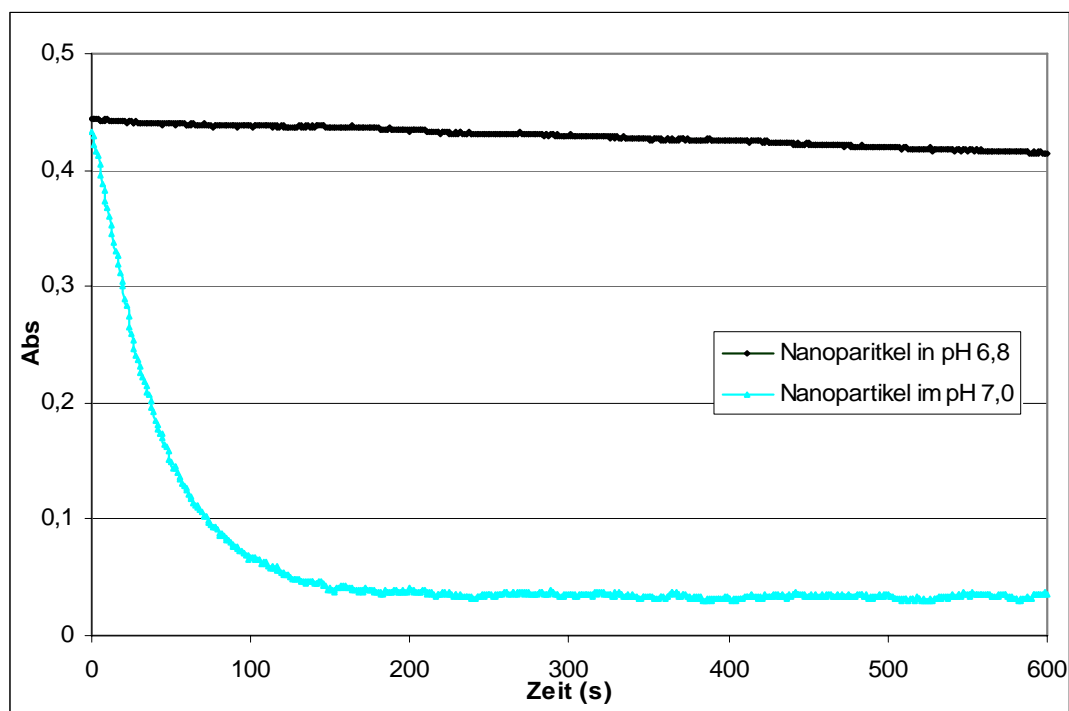


Abb. 3.8: Stabilität der Mesopram beladenen Eudragit® S100 Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 und pH 7,0

Aus der Abb. 3.8 ist ersichtlich, dass die Eudragit® S100 Nanopartikel im SIF bei einem pH-Wert von 6,8 sehr stabil waren. Die Absorption hat nach 10 Minuten um nur ca. 0,025 (ca. 6 %) abgenommen, was auf eine sehr geringe Auflösungsgeschwindigkeit hindeutet. Im SIF bei einem pH-Wert von 7,0 haben sich die Eudragit® S100 Nanopartikel innerhalb von nur ca. 2,5 Minuten aufgelöst. Die Absorption erreichte nach ca. 2,5 Minuten ein Minimum, welches sich nicht mehr änderte. Es konnte also gezeigt werden, dass die Eudragit® S100

Nanopartikel bei den getesteten pH-Werten ein ähnliches Lösungsverhalten zeigten wie das reine Polymer. Das Ileum bei gesunden Menschen weist einen pH-Wert von ca. 6,8 auf. Bei den CED Patienten senkt sogar der pH-Wert im ganzen Darmtrakt, so dass zu erwarten ist, dass die Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel bis tief in den Dickdarm gelangen können.

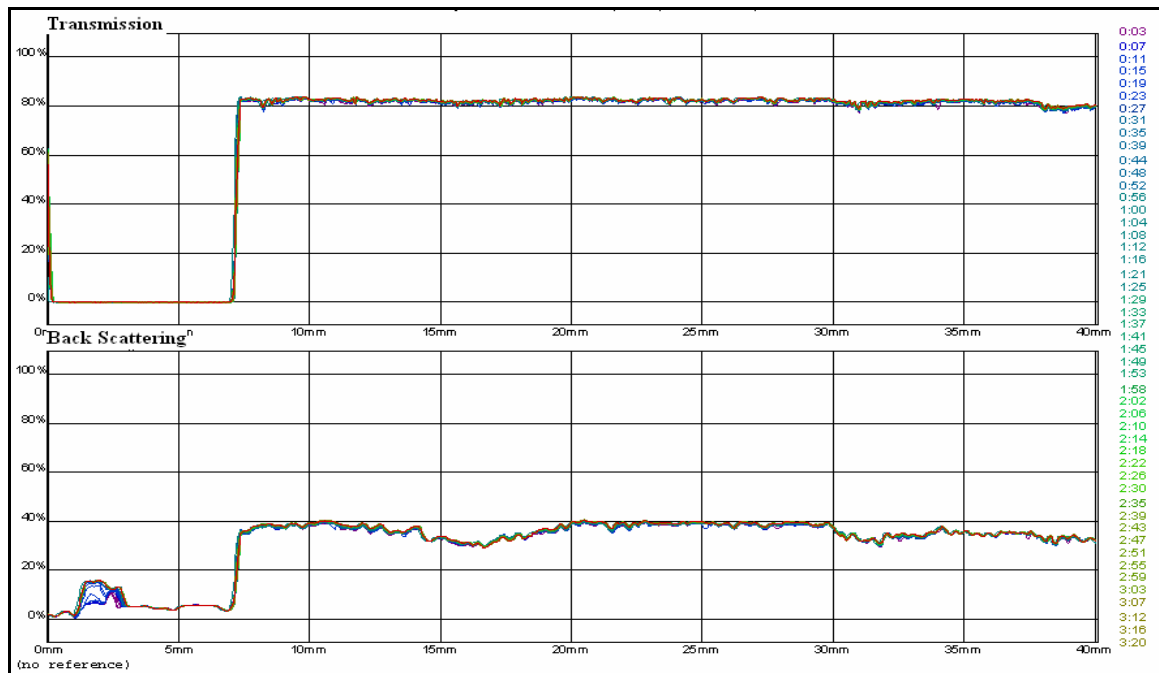


Abb. 3.9: Stabilität der Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel im SIF bei pH 6,8

Um zu untersuchen, ob die Eudragit[®] S100 Nanopartikel im SIF über einen Zeitraum von 3,5 Stunden eine Agglomeration oder Ausflockung zeigen, wurde die Stabilität der Eudragit[®] S100 Nanopartikel im SIF bei einem pH-Wert von 6,8 mittels Turbiscan[®] M 1000 nach dem im [Kap. 2.2.1.5.2](#) beschriebenen Verfahren bestimmt. In der Abb. 3.9 ist dargestellt, dass die Eudragit[®] S100 Nanopartikel im SIF sehr stabil waren und sich keine Agglomerate gebildet haben. Die Nanopartikel werden also über den Zeitraum der Darmpassage agglomeratfrei die erkrankten Darmbereiche erreichen können.

3.1.2.5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass eine reine Wirkstoff/Polymer-Mischung aus Eudragit[®] S100 und Mesopram den Arzneistoff bis zu einem Gehalt von 50 % amorph im Polymergerüst aufnehmen konnte. Ab einem Arzneistoffgehalt von 60 % haben sich Mesopram-Kristalle im Polymergerüst gebildet (s. Abb. 3.1-3.4).

Für Herstellung der Mesopram beladenen Eudragit[®] S100 Nanopartikel wurde die Lösungsmittel Austausch Methode genutzt. Auf diesem Prinzip basierend gibt es zwei Variationsmöglichkeiten: die klassische Becherglas-Methode sowie die Mikromischer-Methode. Die beiden Methoden wurden zur Herstellung der Nanopartikel genutzt und auf ihre Eignung hin verglichen. Es hat sich keine der beiden Methoden als geeignet erwiesen. Die Verkapslungsrate war in allen untersuchten Fällen zu gering, als dass die Arzneiform therapeutisch nutzbar wäre.

Als mögliche Ursache für dieses Ergebnis wurden die hohe Löslichkeit des Mesoprams im wässrigen, sowie die Lokalisation des Arzneistoffs in der Oberfläche der Partikel diskutiert.

3.2 Mesopram beladenen Eudragit® RS Nanopartikel

3.2.1 Vorversuch

Erneut wurde vor der Herstellung der Mesopram beladenen Eudragit® RS Nanopartikel ein Vorversuch analog der im [Kap. 2.2.1.8](#) beschriebenen Methode durchgeführt, um die Beladungskapazität des Polymers zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.



Abb. 3.10: 100 % Eudragit® RS



Abb. 3.11: Mesopram in Eudragit® RS (60 %)



Abb. 3.12: Mesopram in Eudragit® RS (65 %)

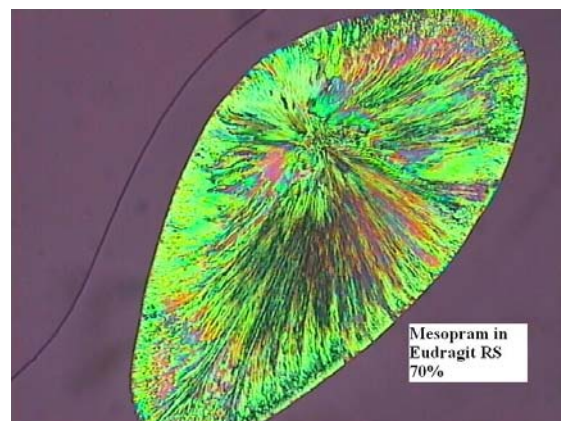


Abb. 3.13: Mesopram in Eudragit® RS (70 %)

Die Abb. 3.10 zeigt die mikroskopische Aufnahme eines reinen Eudragit® RS Films. Es ist zu erkennen, dass sich nach dem Verdunsten des Lösungsmittels ein transparenter dünner Film gebildet hat. Ab einem Mesopramgehalt von über 65 % bildeten sich Mesopram-Kristalle, welche im polarisierten Licht stark leuchtend zu erkennen sind (siehe Abb. 3.12). Bei einem Mesopramgehalt von unter 60 % kam es zu einer amorphen Verteilung des Mesoprams in der Polymermatrix (siehe Abb. 3.11).

3.2.2 Charakterisierung der Eudragit® RS Nanopartikel

3.2.2.1 Partikelgrößenbestimmung

Zur Herstellung der Nanopartikel wurden sowohl die O/O Lösungsmittel Austausch Methode, als auch die Bodmeier-Methode angewandt. Zur Partikelgrößencharakterisierung müssen die Proben je nach Herstellungsmethode unterschiedlich aufgearbeitet werden.

☆ O/O Lösungsmittel Austausch Methode: Die Eudragit® RS Nanopartikel wurden nach der Herstellung in n-Hexan dispergiert. Um die Partikelgröße mittels DLS bestimmen zu können, musste die Probe zuvor auf eine Zählrate von ca. 300 kHz mit n-Hexan verdünnt werden. Die dynamische Viskosität sowie der Brechungsindex des n-Hexans flossen bei der Berechnung der Partikelgröße als Parameter für das Dispersionsmedium mit ein.

Die resultierenden intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilungen von den drei parallelen Wiederholungsversuchen wurden in der Tabelle 3.4 tabellarisch dargestellt.

Es war möglich mittels der O/O Lösungsmittel Austausch Methode Eudragit® RS Nanopartikel mit einer sehr engen Partikelgrößenverteilung herzustellen (siehe Abb. 3.14). Die Partikelgröße lag bei nur 223 ± 9 nm (n=3). Diese Partikelgröße konnte mit einer hohen Reproduzierbarkeit hergestellt werden (s. Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Die Partikelgröße von mesopräbeladenen Eudragit® RS Nanopartikeln hergestellt mit der O/O Lösungsmittel Austausch Methode

Versuche (n=3)	Partikelgröße
1	232 nm
2	224 nm
3	214 nm
MW	223 nm
SD	9 nm
VK(%)	4

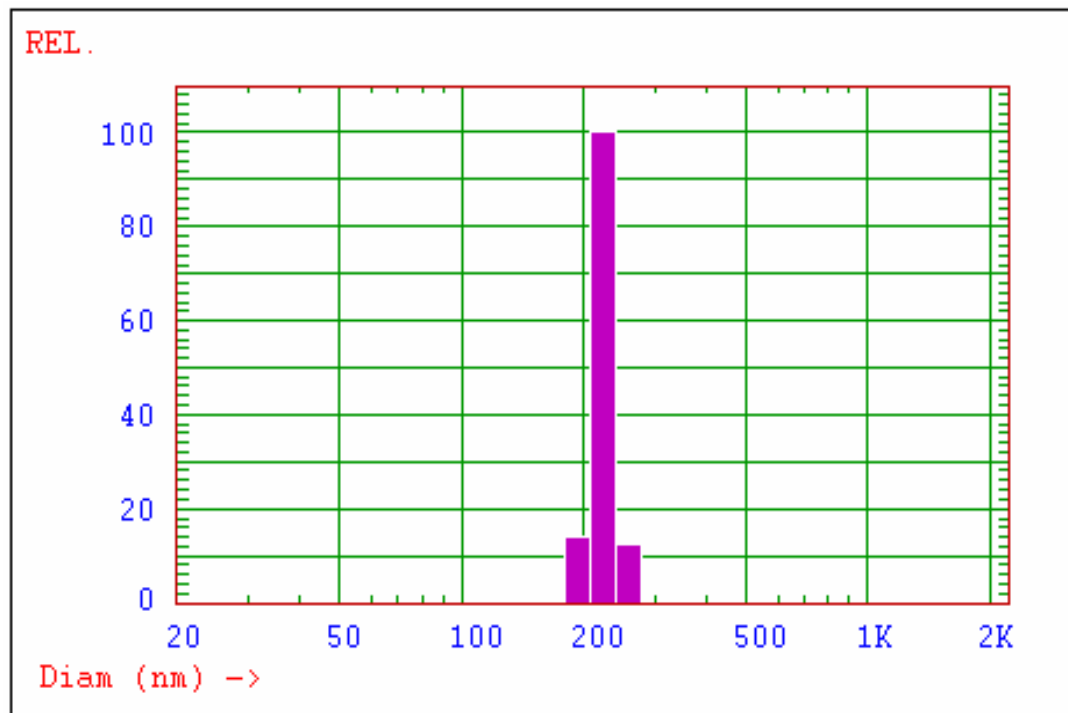


Abb. 3.14: Die intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung der mesoprambeladenen Eudragit® RS Nanopartikel hergestellt mit O/O Lösungsmittel Austausch Methode

Wie schon bei den Chitosan-Nanopartikeln, welche mit Hilfe der Reverse Mizellare Methode hergestellt wurden, zeigt sich erneut, dass auch im Falle des Polymers Eudragit® RS die Nanopartikel in n-Hexan nach der Zentrifugation nicht wieder zu dispergieren waren. Die Eudragit® RS Nanopartikel konnten aus diesem Grund nicht in eine wässrige Phase überführt werden. Die Bestimmung der Verkapselungsrate und des Zetapotentials wurden folglich nicht durchgeführt.

- ☆ Bodmeier Methode: Nach der Herstellung der Nanopartikel wurde die Partikelgröße mittels DLS bestimmt. Hierzu wurde die Nanopartikel-Suspension mit einer 0,5 % igen Lösung von Synperonic in Wasser auf eine Zählrate von ca. 300 kHz verdünnt. Die resultierende intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung einer von drei produzierten Nanopartikel-Suspensionen in der Abbildung 3.15 dargestellt. Die Messwerte aller Nanopartikel-Suspensionen sind in der Tabelle 3.5 aufgelistet. Aus der Tabelle 3.5 ist ersichtlich, dass die mittels der „Bodmeier Methode“ hergestellten Eudragit® RS Nanopartikel eine kleine Partikelgröße (146 ± 14 nm)

besaßen. Verglichen mit der Öl in Öl Lösungsmittel Austausch Methode zeigte sich, dass die Partikelgrößenverteilung relativ breit war (s. Abb. 3.15).

Die Nanopartikel waren sehr stabil im Wässrigen und konnten bei 14.000 upm abzentrifugiert und anschließend durch leichtes Schütteln in frischem Wasser vollständig redispersiert werden.

Tabelle 3.5: Die Partikelgröße von mesoprabeladenen Eudragit® RS Nanopartikeln hergestellt mit der Bodmeier Methode

Versuche (n=3)	Partikelgröße
1	141 nm
2	135 nm
3	162 nm
MW	146 nm
SD	14 nm
VK (%)	10

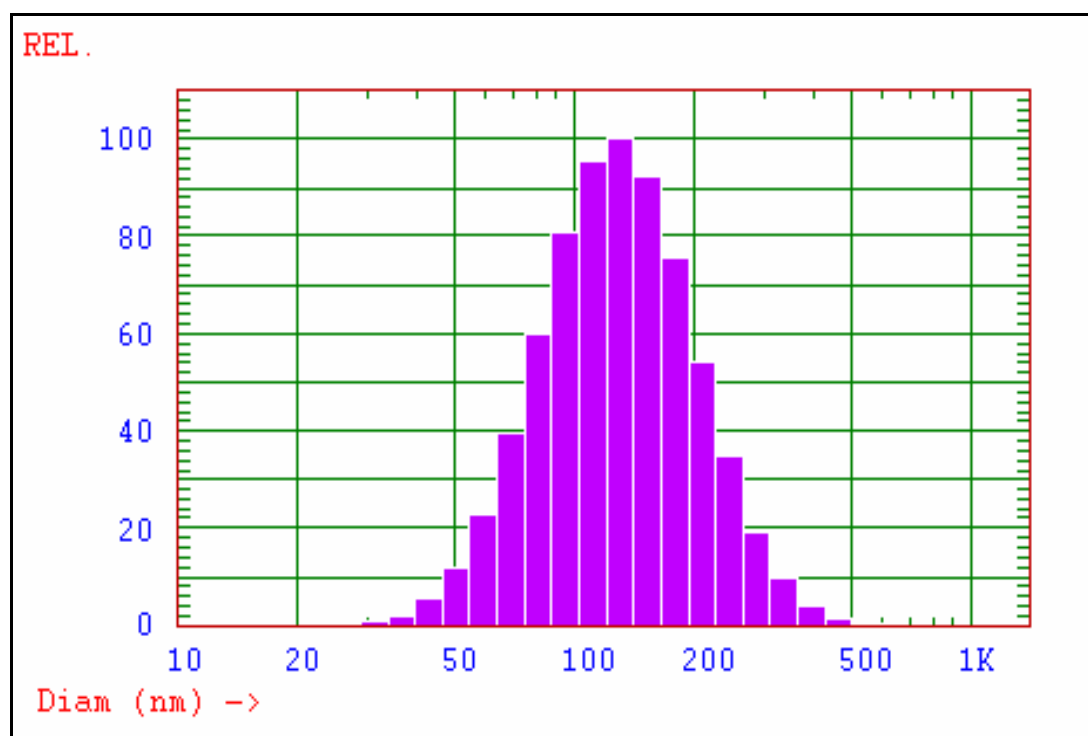


Abb. 3.15: Die intensitätsgewichtete Partikelgröße der Mesopram beladenen Eudragit® RS Nanopartikel hergestellt mit der Bodmeier Methode

Zusätzlich zu der Partikelgrößenbestimmung mittels DLS wurden die Eudragit® RS Nanopartikel auch mit Hilfe der REM betrachtet. Die REM Aufnahmen sind in der Abb. 3.16 gezeigt.

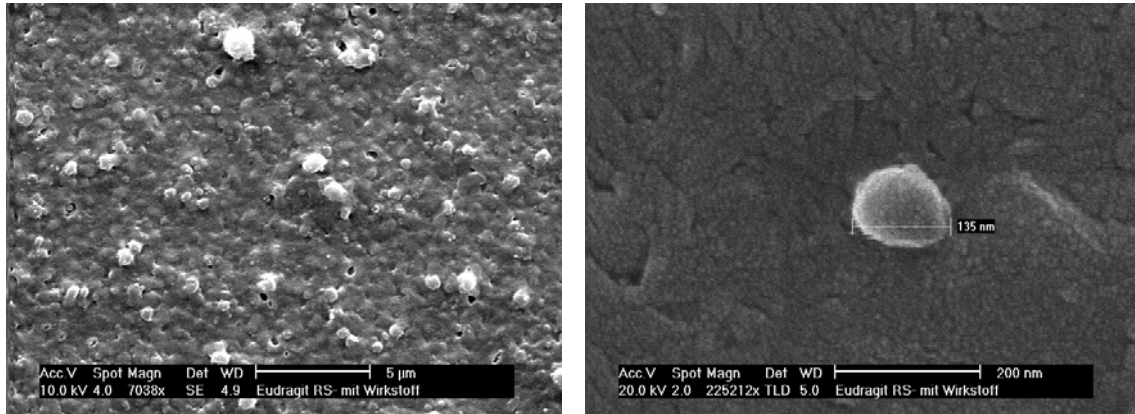


Abb. 3.16: REM Aufnahme der Mesopram beladenen Eudragit® RS Nanopartikel

Da die Eudragit® RS Nanopartikel im Wässrigen sehr stabil waren, könnte auch ohne einen Tensidzusatz eine sehr hohe Partikelkonzentration erreicht werden. Die Nanosuspensionen mussten folglich vor den REM Aufnahmen stark verdünnt werden. Die Darstellung eines einzelnen Eudragit® RS Nanopartikels wurde hierdurch ermöglicht (siehe Abb. 3.16 rechts). Die Partikelgröße lag zwischen 150 und 200 nm.

3.2.2.2 Verkapselungsrate

Die Bestimmung der Verkapselungsrate wurde wie im [Kap.2.2.1.3](#) beschrieben durchgeführt. Die Messdaten sind in der nachfolgenden Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Die Verkapselungsrate bzw. die Beladung von Mesopram in den Eudragit® RS Nanopartikel hergestellt mit der Bodmeier Methode

n=3	Verkapselungsrate	Beladung
MW	26,7 %	17 µg/mg
SD	3,0 %	2 µg/mg
VK (%)	11	14

Wie in der Tabelle 3.6 dargestellt konnte eine sehr hohe Verkapselungsrate erzielt werden. 26,7 % des eingesetzten Mesopram wurden verkapselt. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das Polymer Eudragit® RS schon bei den Vorversuchen eine sehr hohe Beladungskapazität zeigte.

3.2.2.3 Zetapotenzial

Zur Bestimmung des Zetapotenzials wurden 1,5 ml der frisch hergestellten Nanosuspension mit gereinigtem Wasser 1:10 verdünnt und wie im Kap. 2.2.1.2. beschrieben das Zetapotential bestimmt. Die Messdaten sind in der nachfolgenden Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Zetapotenzial der Mesopram beladenen Eudragit® RS Nanopartikel hergestellt mit der Bodmeier Methode

Zetapotenzial (N=3)	
MW	+61.8 mV
SD	1.1 mV
VK (%)	2

Eudragit® RS ist ein kationisches Polymer aus Ethylacrylat und Methylacrylat mit quartären Ammoniumgruppen. Die Nanopartikel aus diesem Polymer besaßen ein stark positives Zetapotenzial im Wässrigen, welches die Nanopartikel elektrostatisch stabilisieren könnte. Aufgrund der positiven Oberflächenladung ist das Polymer mit anionischen Wirkstoffen sowie anionreichen Dispersionsmedien nicht kompatibel.

3.2.2.4 Stabilität

Die Stabilität der Mesopram beladenen Eudragit® RS Nanopartikel im SIF bei einem pH-Wert von 6,8 wurde mit Turbisan® M 1000 ermittelt (s. Kap.2.2.1.5.2.).

Die Intensitätsänderung der Lichttransmission sowie der Lichtrückstreuung wurde in der Abbildung 3.17 dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Mesopram beladenen Eudragit® RS Nanopartikel im SIF sofort Aggregate ausgebildet haben, welche sehr schnell sedimentierten (siehe Photo in der Abb. 3.17). Die Energie der Lichttransmission sowie der Lichtstreuung wurde von den

Aggregaten absorbiert. Wie vermutet, waren die Nanopartikel im anionreichen SIF nicht stabil. Die Nanopartikel würden aus diesem Grund im Magen-Darm-Trakt ausflocken, was die orale Anwendung der Eudragit® RS Nanopartikel beeinträchtigt. Für Darreichungsformen zur Anwendung am Auge sind Eudragit® RS Nanopartikel potentiell einsetzbar (Pignatello, Bucolo et al., 2002).

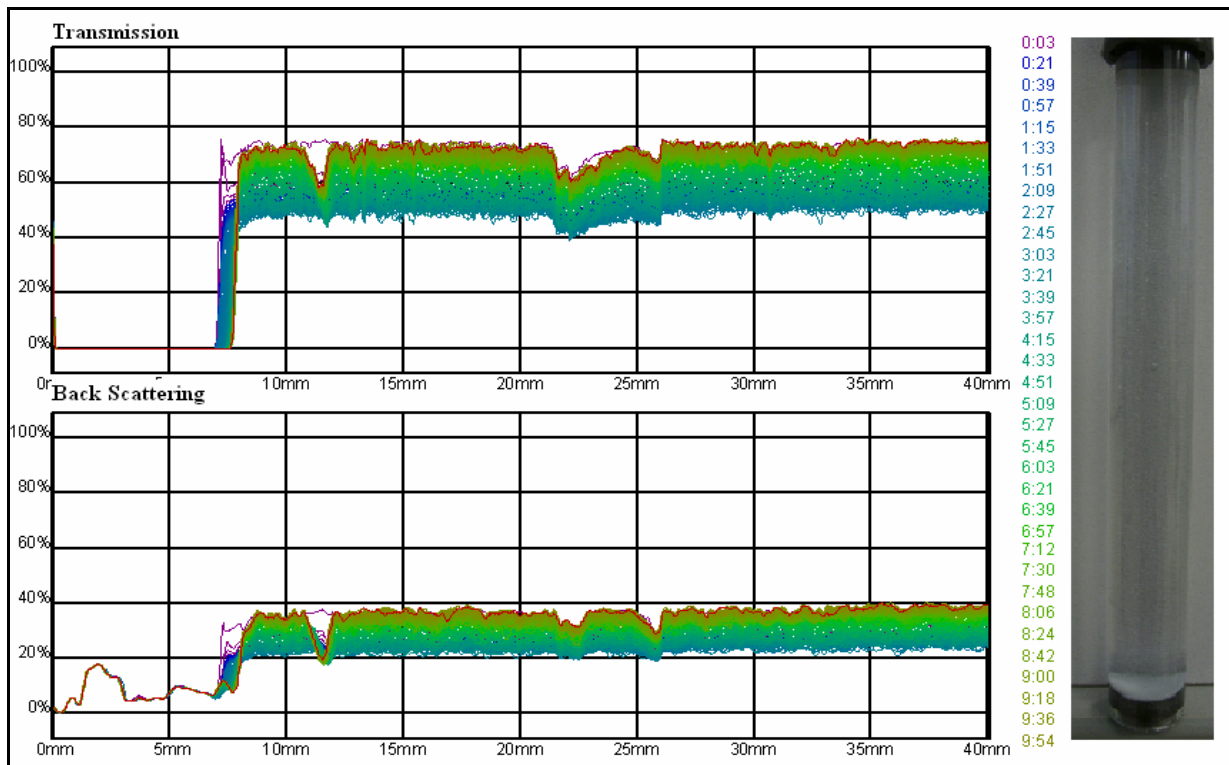


Abb. 3.17: Bestimmung der Stabilität Mesopram beladener Eudragit® RS Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 mit Turbiscan® M 1000

3.2.3 Zusammenfassung

Eudragit® RS, ein kationisches Polymer, wird in der pharmazeutischen Industrie für die Herstellung retardierender Darreichungsformen eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde die Eignung des Polymers zur Herstellung oral anwendbarer Mesopram beladener Nanopartikel geprüft.

Es zeigte sich, dass Mesopram in der Eudragit® RS Matrix bis zu einem Anteil von 60 % amorph dispergiert werden konnte. Die ersten Mesopram-Kristalle bildeten sich aus, als ein Mesopramgehalt von 65 % überschritten wurde. Die Beladungskapazität des Eudragit® RS Polymers war hoch..

Zur Herstellung Mesopram beladener Eudragit[®] RS Nanopartikel wurden zwei Methoden eingesetzt - die O/O Lösungsmittel Austausch Methode sowie die Bodmeier Methode.

Mit Hilfe der O/O Lösungsmittel Austausch Methode konnten Nanosuspensionen mit einer kleinen Partikelgröße (ca. 200 nm) hergestellt werden. Leider zeigte sich, dass die Nanopartikel aus dem Herstellungsmedium n-Hexan nicht mehr abzutrennen waren. Ein hierzu notwendiges Abzentrifugieren der Partikel führte zu einem zusammenkleben der Eudragit[®] RS Nanopartikel, welche somit nicht mehr in einer wässriger Phase dispergierbar sind.

Die Bodmeier Methode führte zu Eudragit[®] RS Nanopartikeln mit einer kleinen Partikelgrößenverteilung sowie einer hohen Verkapslungsrate. Leider zeigte sich, dass die Nanosuspensionen im SIF nicht stabil waren. Dieses Phänomen konnte über das kationische Zetapotential der Nanopartikel erklärt werden, welches zu einer Inkompatibilität mit dem anionreichen Dispersionsmedium führte. Die Eudragit[®] RS Nanopartikel erweisen sich somit als ungeeignet zur oralen Therapie der CED.

Mesopram beladene Eudragit[®] RS Nanopartikel wurden aufgrund dieser Inkompatibilität nicht weiter untersucht.

3.3 Mesopram beladene Chitosan Nanopartikel

3.3.1 Tokumitsu's Methode - Abtrennung und Reinigung der Chitosan Nanopartikel

Die mittels der Tokumitsu Methode hergestellten Chitosan Nanopartikel liegen initial als Nanosuspension vor, aus der die Nanopartikel abzentrifugiert werden müssen. Nach der Zentrifugation bilden die Chitosan Nanopartikel zusammen mit dem Tensid sowie dem Paraffinöl ein stabiles Gel aus.



Abb. 3.18: Naopartikkel enthaltende Gel-Struktur aus Tensiden und Paraffinöl



Abb. 3.19: Zerstörung der Gel-Struktur bei Zugabe von 96% Ethanol

In der Abb. 3.18 ist dieses Gel exemplarisch für die eingefärbten placebo Chitosan-Nanopartikel gezeigt. Die mit Bromthymolblau eingefärbten Chitosan Nanopartikel verteilten sich in die stabilisierten Paraffinöltröpfchen und sedimentierten gemeinsam mit diesen.

Da das Paraffinöl in n-Hexan sehr gut löslich ist, könnte n-Hexan zur Entfernung des Restparaffinöls eingesetzt werden. Mesopram hat eine geringe Löslichkeit in n-Hexan (20 g/ml), so dass beim Abwaschen des Gels mit Hexan nur wenig Mesopram aus den Nanopartikeln verloren ginge. Leider konnte beim Abwaschen die stabile Gel-Struktur nicht vollständig zerstört werden. Aus diesem Grund blieb ein großer Teil des Paraffinöls in

der Gel-Struktur. Nach dreimaligem Abwaschen mit Hexan wurde das Gel in 6 ml einer 0,5 % igen Synperonic[®] Lösung überführt. Das aufschwimmende Gel wurde durch tropfenweise Zugabe von 96 % Ethanol zerstört und die Chitosan Nanopartikel verteilten sich in wässriger Phase. Aus der Abb. 3.19 ist dieser Zusammenhang ersichtlich. In der mittleren Schicht ist die zerstörte Gel-Struktur zu sehen, in der oberen Schicht das vom Gel freigesetzte Paraffinöl (eingefärbt mit Sudanrot B) sowie in der unteren Schicht die 0,5 % ige Synperonic[®] Lösung, welche die Chitosan Nanopartikel dispergiert enthält (eingefärbt mit Bromthymolblau). Die Mikroskopische Aufnahme der mittleren Schicht ist in der Abb. 3.20 wiedergegeben. Es ist ersichtlich, dass die Chitosan Nanopartikel die Paraffinöltröpfchen stabilisierten und sich eine so genannte Pickering-Emulsion bildet (Yang, Liu et al., 2006; Yang, Niu et al., 2007).

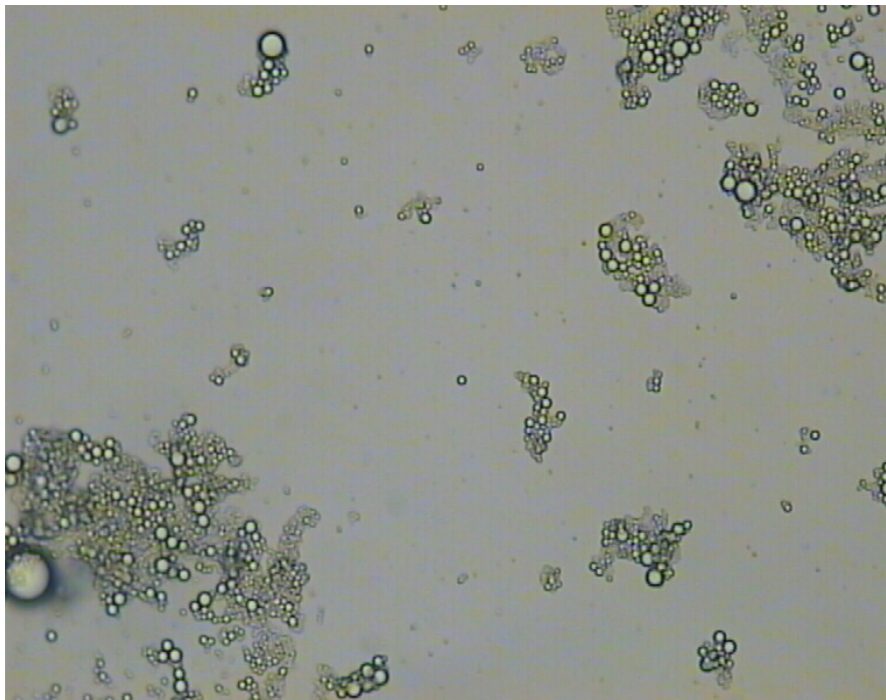


Abb. 3.20: Mikroskopische Aufnahme der Paraffinöltröpfchen stabilisiert von Chitosan Nanopartikel (Mittelschicht der Lösung in Abb. 3.19)

Bei Zugabe von 96 % Ethanol könnte die Gel-Struktur zerstört werden und die Bindung der Öltröpfchen an die Chitosan Nanopartikel wurde aufgehoben. Hierdurch wurden die Nanopartikel freigesetzt. Da das Mesopram in Ethanol eine sehr hohe Löslichkeit aufweist, könnte in diesem Reinigungsschritt die Ursache für die im Folgenden dargestellte niedrige Verkapselungsrate liegen.

3.3.2 Charakterisierung der Chitosan Nanopartikel

3.3.2.1 Partikelgröße (nm)

Die in der 0,5 % Synperonic[®] Lösung dispergierten Nanopartikel wurden durch Zentrifugation (3.000 upm) aufkonzentriert und anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen. Die Partikelgröße wurde mittels DLS bestimmt. In der Abb. 3.21 sind die Partikelgrößenverteilungen von drei Wiederholungsversuchen dargestellt.

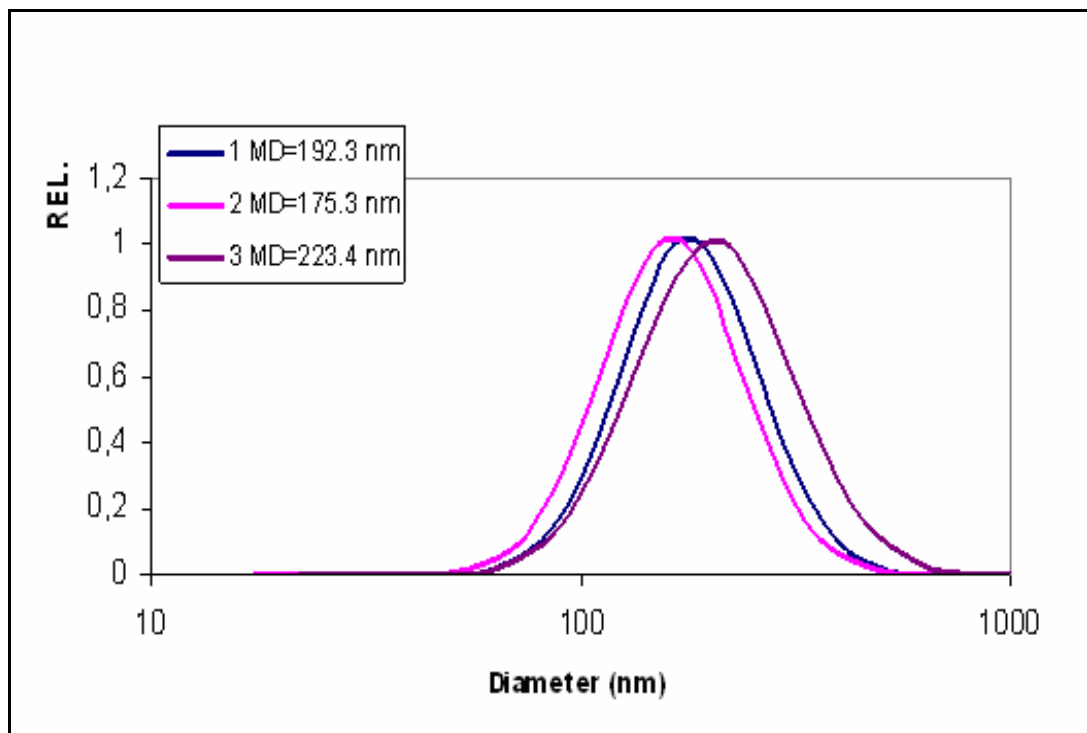


Abb. 3.21: Die resultierenden intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilungen dreier Wiederholungsversuche

Die mittlere Partikelgröße der drei Wiederholungsversuche betrug 197 nm bei einer Standardabweichung von 24 nm. Die Partikelgröße entsprach den Anforderung (<250 nm).

3.3.2.2 Verkapselungsrate

Das in den Chitosan Nanopartikel verkapselte Mesopram wurde, wie im [Kap. 2.2.4.2.1](#) dargestellt, durch 50% Ethanol extrahiert und anschließend mittels HPLC bestimmt.

Tabelle 3.8: Die Verkapselungsrate bzw. die Beladung von Mesopram in den Chitosan Nanopartikel hergestellt mittels der Tokumitsu´s Methode

n=3	Tokumitsu´s Methode	
	Verkapselungsrate	Beladung (µg/mg Polymer)
MW	0,8%	2,4
SD	0,1%	0,4
VK (%)	16,9	16,3

Wie in der Tabelle 3.8 gezeigt, war Verkapselungsrate sehr niedrig. Als mögliche Ursache wurde bereits der Reinigungsschritt mittels 96 % igem Ethanol diskutiert. Nach der Reinigung war nur 0,83 % des eingesetzten Mesopram wieder zu finden. Ein Milligramm Chitosan wurde mit nur ca. 2 µg Mesopram beladen. Mehr als 99 % des eingesetzten Mesopram ging verloren. Die Herstellungsmethode ist aus diesem Grund nicht wirtschaftlich und somit industriell nicht einsetzbar.

3.3.2.3 Zetapotenzial (mV)

Das Zetapotenzial der Chitosan Nanopartikel wurde mit Hilfe des Zetasizers Nano-ZS[®] bestimmt.

Tabelle 3.9: Zetapotenzial der Chitosan Nanopartikel hergestellt mit der Tokumitsu´s Methode

Zetapotenzial (n=3)	
MW	-37,3 mV
SD	8,6 mV
VK (%)	23

Wie in der Tabelle 3.9 dargestellt lag das Zetapotenzial bei ca. -40 mV.

3.3.2.4 Stabilität

Die Stabilität der Chitosan Nanopartikel im SIF (pH 6,8) wurde mittels Turbiscan M 1000 wie im Kap. 2.2.1.5.1 beschrieben durchgeführt. Das Intervall zwischen jeder Messung lag bei 3 Minuten. Der ganze Versuch lief über 10 Stunden.

Wie in der Abb. 3.22 gezeigt, waren die Mesopram beladenen Chitosan Nanopartikel im SIF nicht stabil. Nach wenigen Minuten agglomerierten die Partikel und bildeten lockere Ausflockungen. Die Intensität der Lichttransmission durch den unteren Bereich nahm stark ab. Nur ca. 1 % der eingegangenen Lichtenergie wurde vom Detektor aufgenommen. Die Intensität der Lichtrückstreuung nahm parallel zu der Lichttransmission ab. Dies bedeutet, dass die Lichtenergie nicht durch Streulicht von der Probe wieder abgegeben wird, sondern von der Ausflockung resorbiert wurde. In der Abb. 3.22 rechts ist das Photo der zylindrischen Messzelle nach dem Versuch wiedergegeben. Die Agglomerate befanden sich exakt an dem Ort, wo die Intensität der Lichttransmission bzw. der Lichtrückstreuung abnahm.

Die Stabilität der Chitosan Nanopartikel im SIF war also nicht gewährleistet und macht die Nanopartikel ungeeignet zur oralen Anwendung.

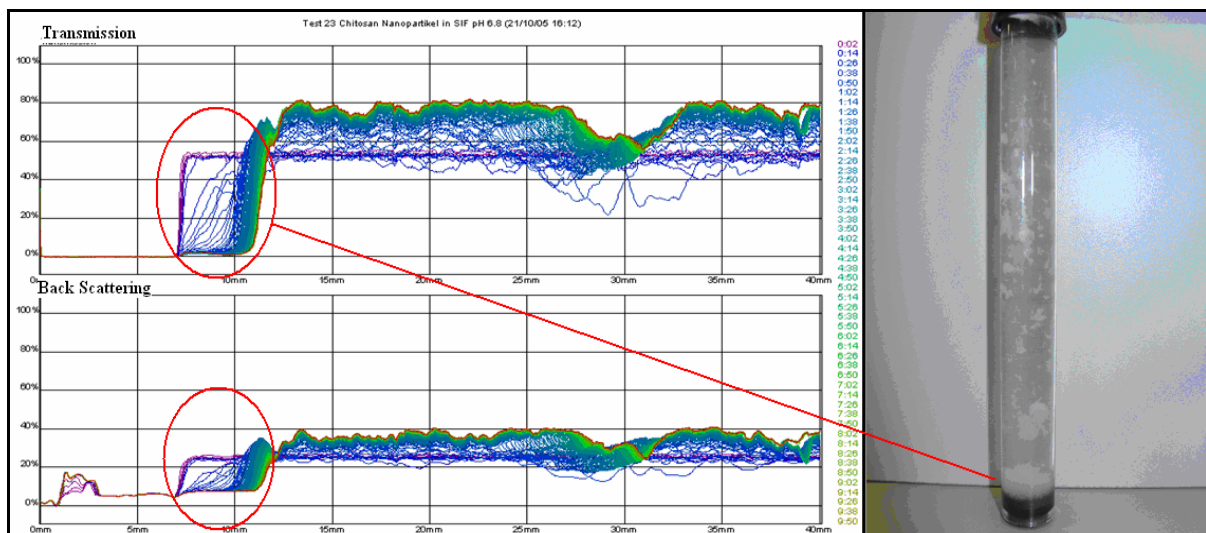


Abb. 3.22: Bestimmung der Stabilität der Chitosan Nanopartikel im SIF mittels Turbiscan® M 1000

3.3.2.5 Zusammenfassung

Zwei Methoden wurden für Herstellung der Mesopram beladenen Chitosan Nanopartikel untersucht; die Tokumitsu- sowie die Reverse Mizellare Methode.

Die „Reverse Mizellare Methode“ erwies sich hierbei als ungeeignet, da bei den Trennungs- sowie den Reinigungsschritten die Chitosan Nanopartikel nicht stabil waren. Die Herstellungsmethode wurde aus diesem Grund nicht weiter erforscht.

Die Herstellung der Chitosan Nanopartikel mit Hilfe der Tokumitsu's Methode erbrachte Nanopartikel mit einer kleinen Partikelgröße (ca. 200 nm). Die Verkapselungsrate bzw. die Beladung der Chitosan Partikel war jedoch sehr niedrig. Des Weiteren waren die Nanopartikel im SIF nicht stabil. Schon nach wenigen Minuten kam es zu einer Agglomeration der Chitosan Partikel, welches zu einem Sedimentierten der Partikel führte.

Auf Basis der Datenlage dieser Arbeit, konnte keine geeignete Methode zur Herstellung Mesopram beladener Chitosan Nanopartikel gefunden werden, welche peroral applizierbar sind.

3.4 Mesopram beladene PCL Nanopartikel

3.4.1 Vorversuch

Vor der Herstellung Mesopram beladener PCL Nanopartikel, wurde ein Vorversuch zur Bestimmung der Beladungskapazität durchgeführt. Es sollte zum einen untersucht werden, wie sich der Wirkstoff im Polymer verhält und zum anderen wie viel Wirkstoff das Polymer tragen kann. Der Versuch wurde wie folgt durchgeführt: Mesopram wurde mit PCL in unterschiedlichen Verhältnissen (0-70 %) gemischt. 50 mg dieser Mischungen wurden in ca. 1 g Dichlormethan gelöst und im Anschluss auf einen Objektträger aufgetragen. Nach dem Abzug des Lösungsmittels, wurden die gebildeten Polymerfilme auf den Objektträgern mikroskopisch untersucht (siehe Abb. 3.23 und Abb. 3.24).

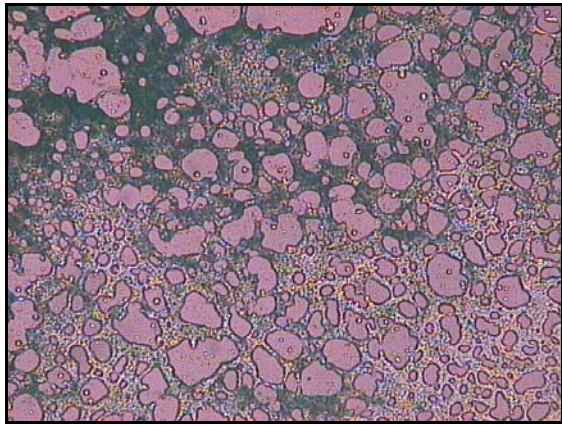


Abb. 3.23: 100 % PCL

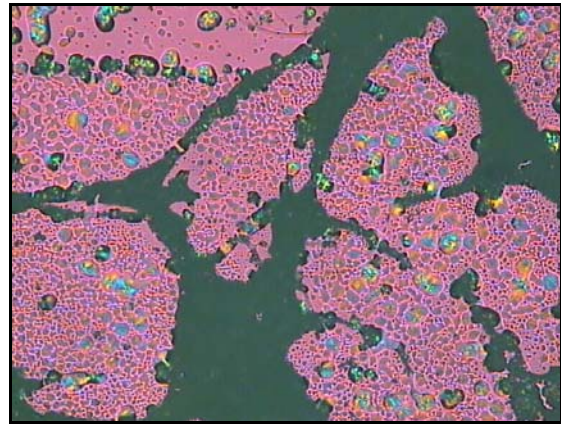


Abb. 3.24: 5 % Mesopram in PCL

Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass das Mesopram bei einem Gehalt von $\leq 5\%$ auskristallisierte. Die Kristalle haben sich außerhalb des Polymergerüsts ausgebildet. Dies lässt vermuten, dass die Beladungskapazität von PCL relativ niedrig sein wird. Eine hohe Verkapslungsrate wird über eine optimierte Herstellung schwer zu erreichen sein.

Aus der Abb. 3.23 ist zusätzlich ersichtlich, dass PCL eine relativ schlechte Filmbildungsfähigkeit besitzt und dazu neigt sich zusammen zu ziehen. Dies könnte für kleine Partikelgrößen günstig sein.

Das Polymer wurde trotz der festgestellten schlechten Beladungskapazität in die Versuchsreihe mit eingebunden. Es diente in diesem Kontext als eine Ergänzung. Die Rezeptur wurde nicht systematisch geprüft und optimiert. Anwendung fanden die für die Polymere CAB und EC optimierten Herstellungsbedingungen (s. Kap. 3.5.4).

250 mg PCL und 150 mg Mesopram wurden in 5 g Dichlormethan gelöst. 250 μl dieser organischen Phase wurden direkt in 6 ml einer 0,05 % igen AOT Lösung überführt. Im Anschluss wurde diese Lösung ca. 3 Minuten mit Ultraschall behandelt. Zur Entfernung des Restlösungsmittels wurde die Probe im Wasserbad kurz erwärmt und erneut mit Ultraschall behandelt.

3.4.2 Charakterisierung der PCL Nanopartikel

3.4.2.1 Partikelgröße (nm)

Die Partikelgröße der frisch hergestellten Nanosuspension wurde mittels DLS bestimmt. Die Messdaten der Partikelgrößen wurden in der Tabelle. 3.10 aufgeführt.

Tabelle 3.10: Die Partikelgrößen der Mesopram beladenen PCL Nanopartikel

Partikelgröße (n=3)	
MW	190 nm
SD	8 nm
VK (%)	4

Aus der Tabelle 3.10 ist ersichtlich, dass mit den angewandten Herstellungsbedingungen eine geringe PCL-Nanopartikelgröße erzielt werden könnte (190 nm). Die Reproduzierbarkeit war sehr gut.

Zusätzlich wurden die produzierten PCL Nanopartikel getrocknet und mit REM analysiert. (siehe Abb. 3.25). Die REM Aufnahmen weisen darauf hin, dass das Mesopram in den runden und intakten PCL Nanopartikel verkapselt wurde. Es sind keine Mesopram Kristalle auf den REM-Aufnahmen gefunden worden. In der Abb. 3.25 rechts ist ein einzelnes PCL Nanopartikel dargestellt. Die Mehrheit der Nanopartikel wies eine Größe von unter 200 nm auf.

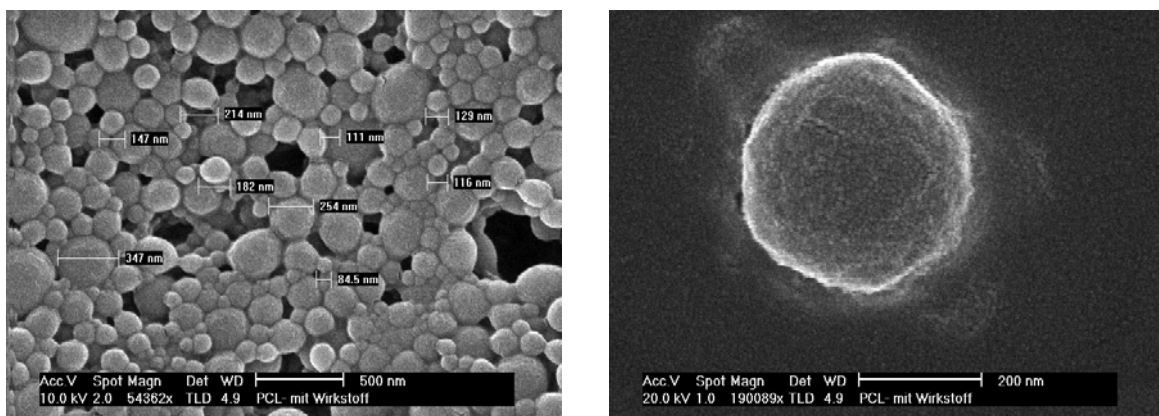


Abb. 3.25: REM Aufnahme der Mesopram beladenen PCL Nanopartikel

3.4.2.2 Zetapotenzial (mV)

Die Bestimmung des Zetapotenzials der Mesopram beladenen PCL Nanopartikel wurde mit Hilfe des Zetasizer Nano-ZS[®] durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden in der nachfolgenden Tabelle 3.11 aufgelistet.

Tabelle 3.11: Das Zetapotenzial der Mesopram beladenen PCL Nanopartikel

Zetapotenzial (n=3)	
MW	-46,7 mV
SD	2,2 mV
VK (%)	5

Die Mesopram beladenen PCL Nanopartikel besaßen ein negatives Zetapotenzial (ca. -47 mV). Die Ursache hierfür ist in dem zur Herstellung eingesetzten Tensid AOT zu suchen. Dieses stellt einen negativen Ladungsträger dar, welcher sich an der Partikeloberfläche lokalisiert. Ein negatives Zetapotenzial erscheint günstig für die Stabilisierung der Nanopartikel im anionreichen SIF. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass das PCL Nanopartikelsystem im SIF stabil ist.

3.4.2.3 Verkapselungsrate

Die frisch hergestellte Nanosuspension wurde bei 14.000 upm zentrifugiert.

Nach dem Waschen und Trocknen der Partikel wurden sie in 1,5 ml Aceton gelöst. Der Mesopramgehalt dieser Lösung wurde mittels HPLC bestimmt.

Tabelle 3.12: Die Verkapselungsrate bzw. Beladung von Mesopram in PCL Nanopartikel

N=3	Verkapselungsrate	Beladung
MW	13,3%	47 µg/mg
SD	3,1%	11 µg/mg
VK (%)	23	24

Wie in der Tabelle 3.12 gezeigt, lag die Verkapselungsrate bei nur 13,3%. Ein Milligramm PCL konnte mit nur ca. 47 µg Mesopram beladen werden.

Wie schon die Vorversuche erwarten ließen, ist die Mehrheit des eingesetzten Mesoprams nicht amorph im Polymer PLC dispergiert worden. Aus diesem Grund ging der größte Teil des Mesoprams durch das Waschen verloren. Verglichen mit den im Folgenden vorgestellten Polymeren CAB und EC erwiesen sich die PCL-Nanopartikel als nicht geeignet für die Herstellung Mesopram beladener Nanopartikel.

3.4.2.4 Stabilität

Die Stabilität der Nanopartikel wurde mittels Turbiscan[®] M 1000 sowie DLS bestimmt. Die Bestimmung erfolgte analog der Methodenbeschreibung im [Kap. 2.2.1.5.2](#)

In der Abb. 3.26 ist dargestellt, dass die PCL Nanopartikel im SIF sehr stabil waren. Die Intensität der Lichttransmission hat sich während des Versuchs nicht geändert und ist bei ca. 70 % geblieben (Oberer Teil der Abb. 3.26). Die Intensität der Lichtrückstreuung blieb ebenso konstant (Unterer Teil der Abb. 3.26). Der ganze Versuch bestand aus 200 Messungen und dauerte insgesamt ca. 7 Stunden. Nach der Messung wurde die Probe bei Raumtemperatur weitere 5 Tage gelagert und im Anschluss mittels DLS vermessen. Es sollte untersucht werden, ob sich die Partikelgröße verändert hat. In der Abb. 3.27 wird gezeigt, dass nach 5 Tagen die Partikelgröße von 152 nm auf 211 nm zugenommen hat. Diese Veränderung könnte auf eine Agglomeration der Partikel hinweisen.

Die Stabilität der PCL-Nanopartikel ist jedoch als hinreichend groß anzusehen, um als perorale Formulierung die erkrankten Darmgewebe erreichen.

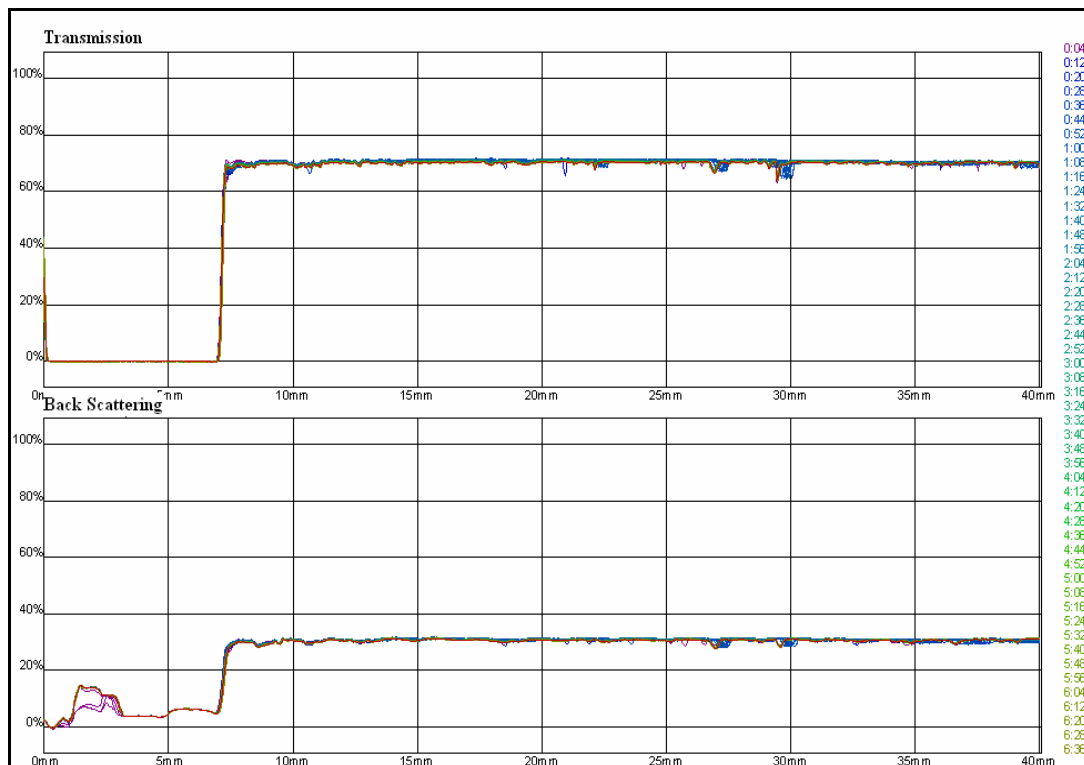


Abb. 3.26: Bestimmung der Stabilität Mesopram beladener PCL-Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 mit Hilfe des TurbiScan® M 1000

In der Abb. 3.26 ist dargestellt, dass die PCL Nanopartikel im SIF sehr stabil waren. Die Intensität der Lichttransmission hat sich während des Versuchs nicht geändert und ist bei ca. 70 % geblieben (Oberer Teil der Abb. 3.26). Die Intensität der Lichtrückstreuung blieb ebenso konstant (Unterer Teil der Abb. 3.26). Der ganze Versuch bestand aus 200 Messungen und dauerte insgesamt ca. 7 Stunden. Nach der Messung wurde die Probe bei Raumtemperatur weitere 5 Tage gelagert und im Anschluss mittels DLS vermessen. Es sollte untersucht werden, ob sich die Partikelgröße verändert hat. In der Abb. 3.27 wird gezeigt, dass nach 5 Tagen die Partikelgröße von 152 nm auf 211 nm zugenommen hat. Diese Veränderung könnte auf eine Agglomeration der Partikel hinweisen.

Die Stabilität der PCL-Nanopartikel ist jedoch als hinreichend groß anzusehen, um als perorale Formulierung die erkrankten Darmgewebe erreichen.

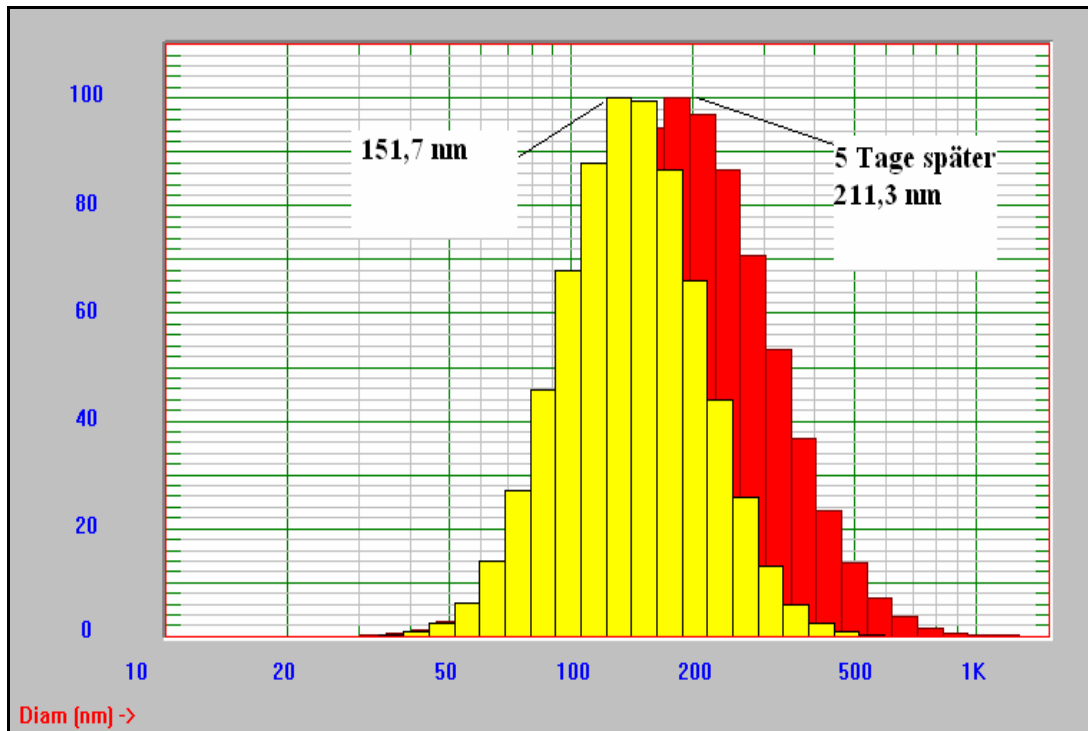


Abb. 3.27: Die Veränderung der PartikelgröÙeverteilung der Mesopram beladenen PCL-Nanopartikel vor und nach dem Stabilitätsversuch im SIF bei pH 6,8

3.4.2.5 Zusammenfassung

Die Versuche zur Beladungskapazität des Polymers PCL ergaben, dass ab einem Mesopramgehalt im Polymer von über 5% der Wirkstoff in sichtbaren Kristallen ausfiel.

Die Mesopram beladenen PCL Nanopartikel zeigten eine ausreichende Stabilität im SIF bei einem pH-Wert von 6,8. Während der Untersuchung bildeten die Partikel keine Aggregate. Auch nach fünftägiger Lagerung der Nanopartikel im SIF zeigte sich, dass die PartikelgröÙe fast identisch geblieben ist.

Für Herstellung Mesopram beladener Nanopartikel ist es wegen der geringen Verkapselungsrate nicht geeignet. Ein Großteil des eingesetzten Mesoprams ging beim Abwaschen verloren.

3.5 Mesopram beladene CAB Nanopartikel

3.5.1 Vorversuche

Vor der Herstellung Mesopram beladener CAB Nanopartikel, wurde erneut ein Vorversuch zur Bestimmung der Beladungskapazität durchgeführt.

Mesopram wurde mit dem Polymer CAB 70.000 in verschiedenen Verhältnissen (0-80 %) gemischt. 50 mg dieser Mischungen wurden im Anschluss in 1 g Dichlormethan gelöst und auf ein Objektträger aufgetragen. Nach Abzug des Lösungsmittels wurden die gebildeten Filme mikroskopisch untersucht:

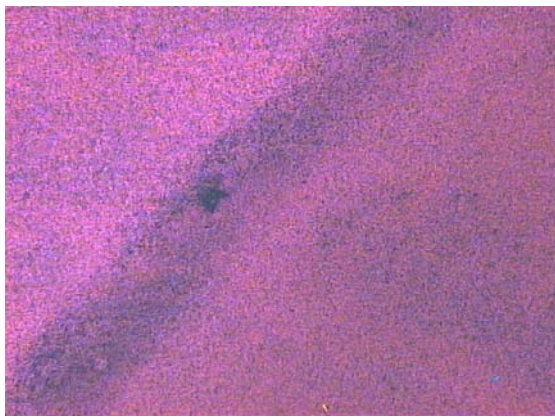


Abb. 3.28: 100 % CAB 70.000

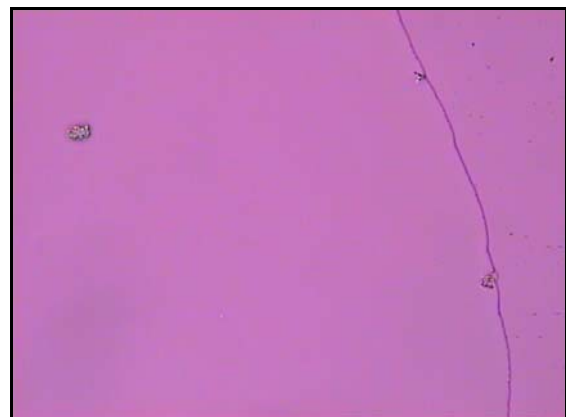


Abb. 3.29: Mesopram in CAB 70.000 (60 %)



Abb. 3.30: Mesopram in CAB 70.000 (70 %)

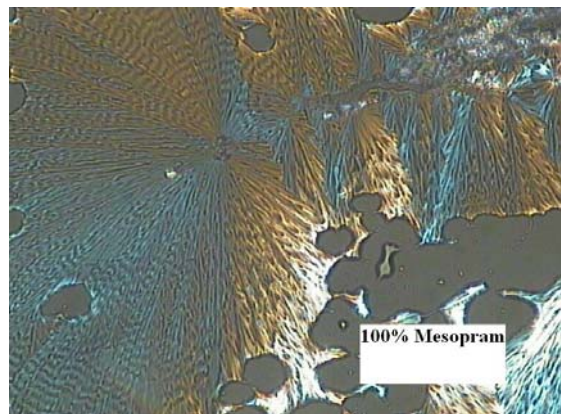


Abb. 3.31: 100 % Mesopram

Wie in der Abb. 3.28 dargestellt hat das Polymer CAB 70.000 nach dem Abzug des Lösungsmittels einen dünnen transparenten Film ausgebildet. Bis zu einem Mesopramgehalt von 60 % konnten keine Kristalle des Arzneistoffs detektiert werden (siehe Abb. 3.29).

Ab einem Mesopramgehalt von über 70 % kristallisierte Mesopram in dem Polymergerüst aus (s. Abb. 3.30).

3.5.2 Experimententwurf mit Design-Expert

Bei den durchgeführten Versuchen wurden die nachfolgenden 4 Einflussfaktoren analysiert und optimiert.

☆ Der Faktor A – Wirkstoffgehalt in der organischen Phase:

Für die Herstellung der Wirkstoff beladenen Nanopartikel müssen die Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Polymer berücksichtigt werden. Ein amphiphiler Wirkstoff könnte sich beispielsweise in der Grenzoberfläche anreichern und als Tensid wirksam werden. Dies hätte einen Einfluss auf die Stabilität bzw. die Partikelgröße der Emulsion. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Wirkstoffgehalt in der organischen Phase und sein Einfluss auf die Qualität der produzierten Nanosuspension untersucht.

Hierzu wurden 250 mg Polymer mit 150, 125, 100 oder 75 mg Mesopram in 5 g Dichlormethan gelöst und als organische Phase zur Emulsionsherstellung genutzt.

Die Software analysierte die Mengen des Mesoprams in 250 mg Polymer als 4 Variablen (Stufen) im Faktor A.

☆ Der Faktor B - Verhältnis zwischen organischer Phase und wässrigere Phase:

In dieser Arbeit wurde geprüft, ob die Menge der zugesetzten organischen Phase bei konstantem Wasservolumen ein wichtiger Einflussfaktor für die Partikelgröße bzw. die Verkapselungsrate ist. Die wässrige Phase hatte aus diesem Grund bei allen Versuchen ein konstantes Volumen von 6 ml. Das Volumen der zugesetzten organischen Phase lag bei 100, 150, 200 und 250 µl. Diese Volumina wurden in der Software auf 4 Stufen aufgeteilt.

☆ Der Faktor C - Tensidkonzentration:

Bei der Emulsionsherstellung ist die Tensidkonzentration von entscheidender Bedeutung. Das Tensidmolekül ist in der Lage, sich an der Grenzfläche zwischen organischer und wässriger Phase anzureichern und dort die Grenzflächenspannung zu senken. Da die Grenzflächenspannung abhängig ist von der Grenzfläche, ist es auf diesem Wege möglich, die bei der Emulsionsherstellung entstehenden hohen Grenzflächen zu stabilisieren. Ein Brechen der Emulsion wird dadurch gehemmt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit steigender Tensidkonzentration die Nanotröpfchen besser stabilisiert wurden. Der Erhalt einer kleineren Partikelgröße ist mit

höheren Tensidkonzentrationen möglich (s. Abb. 3.32). Ist die Grenzfläche gesättigt, so kommt es zur Ausbildung von Mizellen in der wässrigen Phase, welche die Verkapselungsrate beeinflussen (s. Abb.3.33). Über einen Einschluss des Arzneistoffes in die Mizellen wird die Verkapselungsrate reduziert. Ziel muss es also sein, die geringste Tensidkonzentration zu finden, welche die Emulsion ausreichend stabilisiert, um den negativen Einfluss der Mizellen auf die Verkapselungsrate zu minimieren.

Der Einfluss des Tensids Natriumchololat auf die Partikelgröße sowie die Verkapselungsrate wurde in Vorversuchen mit variabler Tensidkonzentration (0,01 %, 0,10 %, 0,50 % und 1,00 %) getestet. Alle weiteren Rezepturbestandteile waren gleich. In der Abb. 3.32 wird der Einfluss der Tensidkonzentration auf die Partikelgröße dargestellt. Ab einer Tensidkonzentration von 0,10 % konnte eine stabile Emulsion erzeugt werden. Eine weitere Erhöhung der Tensidkonzentration führte zu keiner signifikanten Verkleinerung der Partikelgröße. In der Abb. 3.33 wurde der Einfluss der Tensidkonzentration auf die Verkapselungsrate dargestellt. Wie Oben erwähnt, zeigte sich, dass eine höhere Tensidkonzentration eine geringere Verkapselungsrate zur Folge hatte.

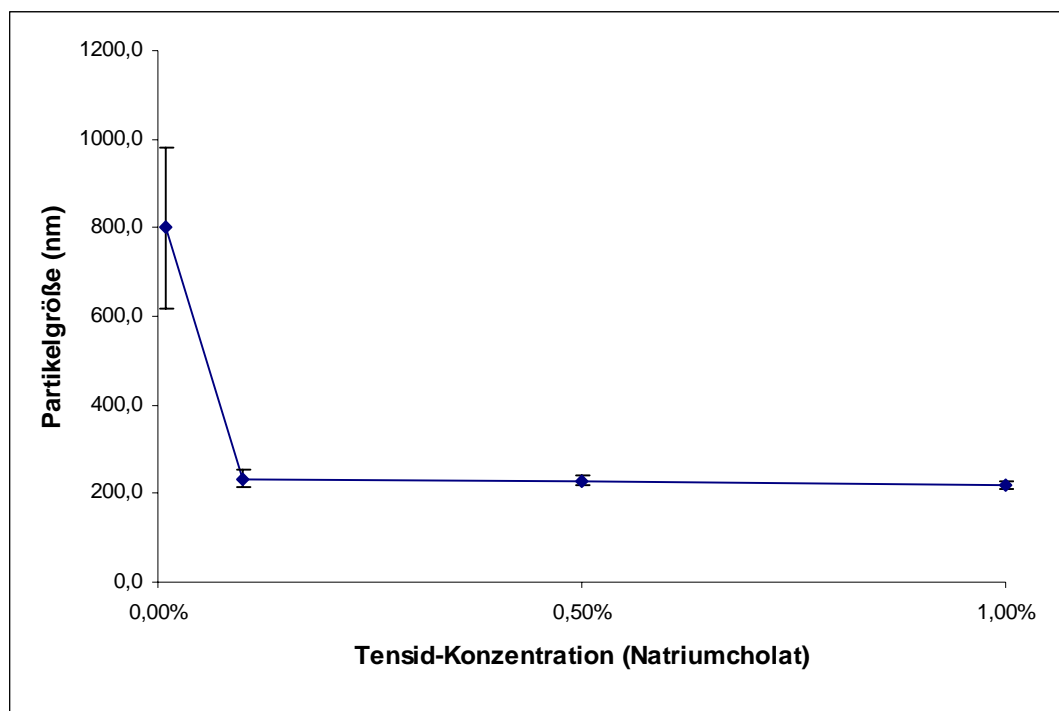


Abb. 3.32: Einfluss der Tensid-Konzentration (Natriumchololat) auf die Partikelgröße der Nanopartikel (CAB 70000)

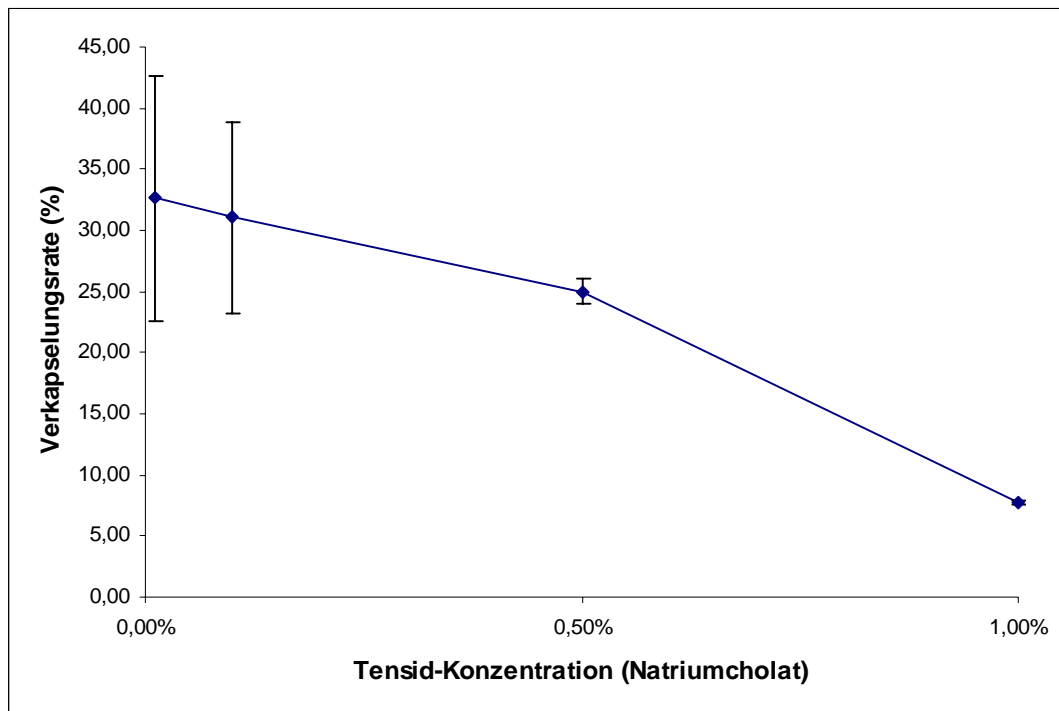


Abb. 3.33: Einfluss der Tensidkonzentration (Natriumcholat) auf die Verkapselungsrate des Wirkstoffs (Mesopram) in den Nanopartikeln (CAB 70000)

☆ Der Faktor D - die Tensidart:

Für die Stabilisierung von Nanosuspensionen bzw. Nanopartikeln ist der chemische Aufbau des Tensids von entscheidender Bedeutung. Beispielsweise sind die Wertigkeit sowie die Stärke des Zetapotentials, als ein wichtiger Parameter für die physikalische Stabilität von Emulsionen, nicht nur von der Tensidkonzentration, sondern auch von der Tensidart abhängig.

In dieser Arbeit wurde das Tensid SDS mit dem Tensid Natriumcholat im Hinblick auf die Partikelgröße der produzierten Nanosuspensionen sowie auf die Verkapselungsrate des Wirkstoffes verglichen.

SDS ist das Salz einer im wässrigen sehr gut löslichen mehrwertigen Säure. Im Vergleich mit Natriumcholat ergab sich ein relativ stärker negatives Zetapotenzial (s. Abb. 3.34).

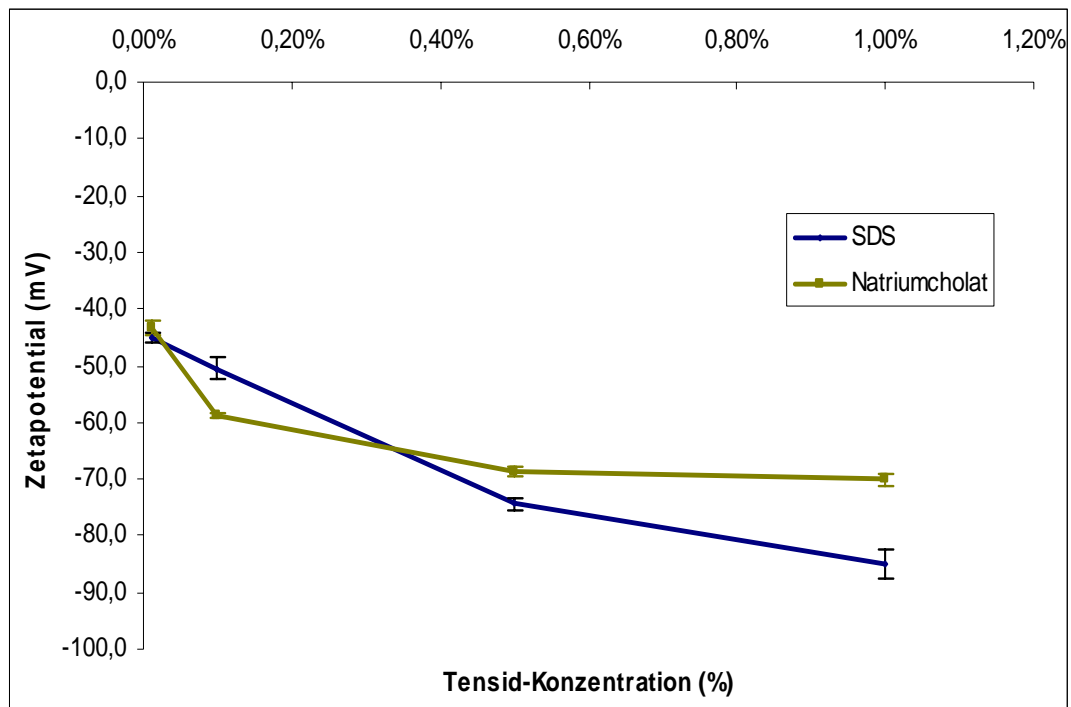


Abb. 3.34: Vergleich der Zetapotentials von Ethocel® 100 Nanopartikel hergestellt mit SDS und Natriumcholat (MW \pm SD; n=3)

Verglichen mit dem Natriumcholat zeigten die mittels SDS produzierten Nanosuspensionen eine ähnliche Partikelgröße aber eine schlechtere Verkapslungsrate des Mesoprams (s. Abb. 3.35 und Abb. 3.36). Dieses Ergebnis kann zwei Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass im Falle des SDS eine geringere Konzentration zum Absättigen der Emulsionsgrenzfläche nötig ist. In diesem Fall wäre der Emulgatorüberschuss, welcher eine Mizellbildung zu Folge hat, höher. Die höhere Mizellkonzentration bedingt die schlechtere Verkapslungsrate. Zum anderen ist es auch denkbar, dass die physiko-chemischen Eigenschaften der SDS-Mizellen eine bessere Löslichkeit für den Arzneistoff Mesopram aufweisen.

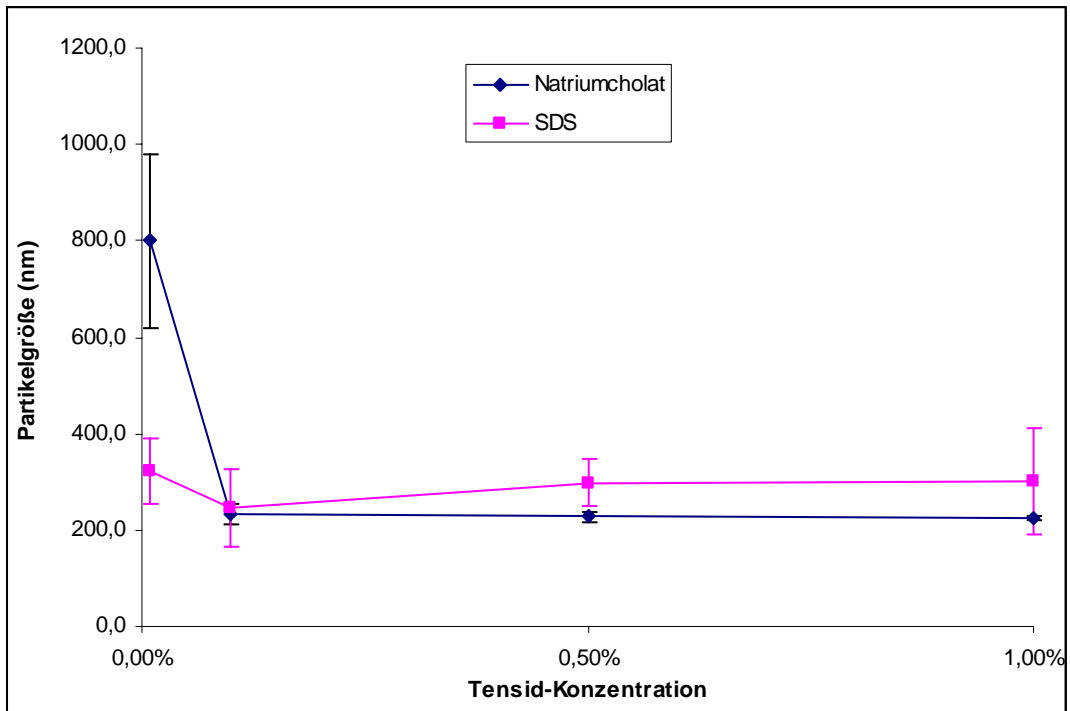


Abb. 3.35: Vergleich des Tensid-Einflusses (Natriumcholat und SDS) auf die Partikelgröße bei der Herstellung Mesopram beladener Ethocel® 100 Nanopartikel

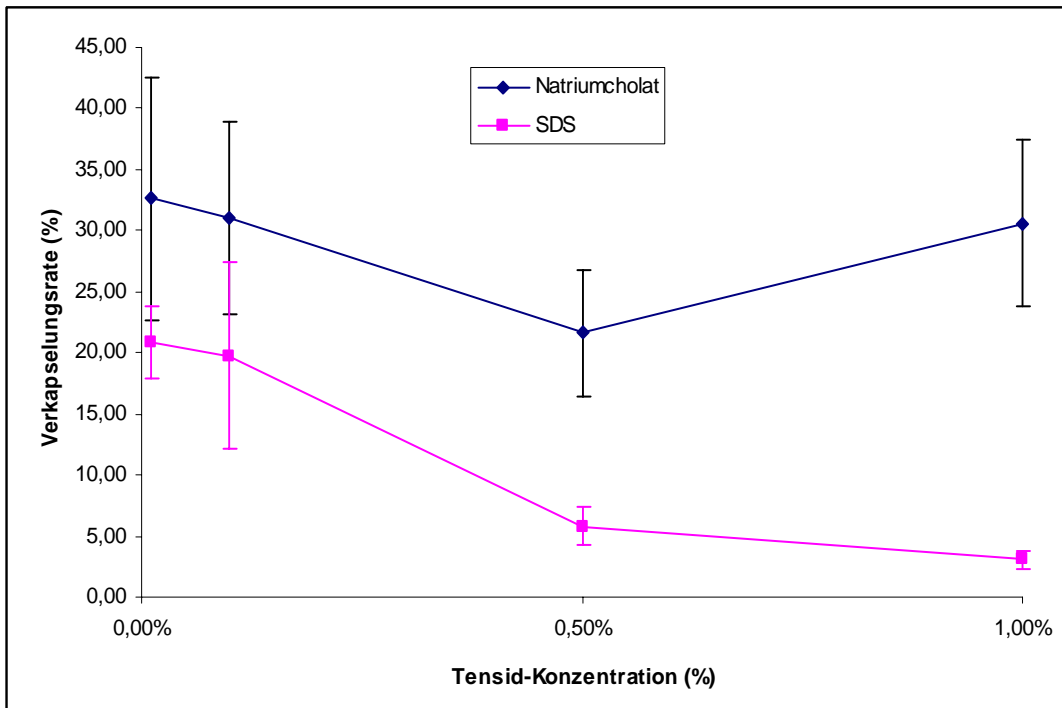


Abb. 3.36: Vergleich des Tensid-Einflusses (Natriumcholat und SDS) auf die Verkapselungsrate bei der Herstellung Mesopram beladener Ethocel® 100 Nanopartikel

Bei der statistischen Versuchsplanung fanden des Weiteren eine Mischung des Emulgators SDS mit Tween® 80 sowie der Emulgator AOT Anwendung.

Die vorgestellten Faktoren A-D wurden genutzt, um mit Hilfe der Software „Design-Expert“ die optimale Rezeptur zur Herstellung einer Nanosuspension zu finden, welche im Hinblick auf die Verkapslungsrate sowie die Partikelgröße den Anforderungen entspricht. Die Software arbeitet nach dem integrierten statistischen Model „Taguchi OA“.

Die 4 Einflussfaktoren wurden im von Design-Expert (Taguchi OA) herausgegebenen Formular eingetragen. Anschließend gab die Software eine Kombination der Faktoren randomisiert heraus (Std Nr.). Die Versuche wurden nach den so generierten Kombinationen durchgeführt (s. Abb. 3.37).

Beispielweise wurden im Run 1 die folgenden Herstellungsparameter definiert:

150 µl organische Phase (Zusammensetzung: 150 mg Mesopram und 250 mg CAB 70,000 in 5 g Dichlormethan gelöst) werden 6 ml 0,50 % iger SDS Lösung zugesetzt.

Die technischen Parameter der Herstellung müssen bei allen Versuchen gleich bleiben.

Nach dem Versuch werden die erhaltenen Daten (Partikelgröße: 449,3 nm und Verkapselungsrate: 7,94 %) in die zwei Responsspalten eingetragen.

	Std	Run	Block	Factor 1 A:Mesoprämie mg/250mg Polymer	Factor 2 B:Vol. der organischen Phase µl	Factor 3 C:Konz. des Tensids %	Factor 4 D:Tensidart	Response 1 Partikelgröße nm	Response 2 Verkapselung %
	3	1	Block 1	150	150	0.50	SDS	449.3	7.94
	7	2	Block 1	125	150	1.00	Natriumcholot	416.8	18.23
	11	3	Block 1	100	150	0.05	AOT	459.9	28.05
	13	4	Block 1	75	250	1.00	AOT	287.5	15.05
	10	5	Block 1	100	200	1.00	SDS	394.6	4.31
	6	6	Block 1	125	200	0.05	SDS:TW80	516.4	28.48
	15	7	Block 1	75	150	0.10	SDS:TW80	520.4	25.57
	9	8	Block 1	100	250	0.50	SDS:TW80	289.5	23.88
	14	9	Block 1	75	200	0.50	Natriumcholot	311.8	23.65
	16	10	Block 1	75	100	0.05	SDS	533	18.91
	4	11	Block 1	150	100	1.00	SDS:TW80	635.3	9.01
	12	12	Block 1	100	100	0.10	Natriumcholot	769.7	14.21
	8	13	Block 1	125	100	0.50	AOT	522.2	14.52
	1	14	Block 1	150	250	0.05	Natriumcholot	246.2	39.75
	5	15	Block 1	125	250	0.10	SDS	203.5	38.7
	2	16	Block 1	150	200	0.10	AOT	273.5	31.66

Abb. 3.37: Liste der Taguchi OA Versuchsplanung für die Optimierung der CAB 70.000 Partikelgröße bzw. Verkapselungsrate und die generierten Messdaten

Die Faktoren A, B und C sind numerische Faktoren. Der Faktor D (Tensidart) ist ein charakterisierender Faktor. Diese Eigenschaften mussten vor der Softwareanalyse eingegeben werden.

3.5.3 Analyse nach Taguchi OA

Nachdem der Versuch beendet war, wurden alle Messdaten in die Liste eingetragen. Die zwei Parameter Partikelgröße und Verkapselungsrate wurden anschließend mit der Funktion „Analysis“ untersucht:

☆ Partikelgröße:

Die Ergebnisse der ANOVA-Analyse sind in der Abb. 3.38 gezeigt:

Response	1	Partikelgröße				
ANOVA for Response Surface Linear Model						
Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	3.001E+005	6	50012.30	7.71	0.0038	significant
<i>A-Mesoprammenge</i>	2000.00	1	2000.00	0.31	0.5921	
<i>B-Vol. der organischen Phase</i>	2.704E+005	1	2.704E+005	41.70	0.0001	
<i>C-Konz. des Tensids</i>	443.40	1	443.40	0.068	0.7996	
<i>D-Tensidart</i>	27279.38	3	9093.13	1.40	0.3043	
Residual	58347.17	9	6483.02			
Cor Total	3.584E+005	15				

Abb. 3.38: Ergebnisse der ANOVA-Analyse für das Polymer CAB 70,000 - Partikelgröße

Das ganze Model wurde als signifikant (F-Wert=7,71; p-Wert<0,05) bewertet. Hierdurch kann angenommen werden, dass während der Versuche in den Gruppen unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten gewirkt haben. Es besteht nur eine 0,38 % ige Wahrscheinlichkeit, dass der F-Wert aufgrund eines Signalrauschens auftritt.

Der p-Wert von Faktor B betrug 0,0001 und ist somit viel kleiner als 0,0500. Der Faktor B war somit signifikant. Dies bedeutet, dass die Stufenvariierung des Faktors B signifikant

die Partikelgröße beeinflussen könnte. Der Faktor C (Tensidkonzentration) hatte im Gegensatz dazu einen großen p-Wert (0,7996). Dieser Faktor besaß demnach den geringsten Einfluss auf der Partikelgröße.

Die Rohdaten könnten mit der Funktion „Model Graphs“ analysiert und graphisch dargestellt werden.

Der Faktor A (Mesoprämgehalt) sowie der Faktor B (Volumen der organischen Phase) werden hierfür auf einer X1 sowie einer X2-Achse gegen die Partikelgröße auf der Y-Achse aufgetragen. Rechnerisch ergibt sich so beispielsweise bei Werten von 150 mg für den Faktor A sowie 250 µl für den Faktor B bei einer AOT-Tensidkonzentration von 0,05 % eine Partikelgröße von 200 nm (s. Abb. 3.39).

Bei einem konstanten Wert für den Faktor A von 75 mg, zeigt sich beim Variieren des Faktors B von 100 µl auf 250 µl, dass die Partikelgröße von ca.580 nm auf ca. 240 nm abnimmt. Fixiert man den Faktor B auf 250 µl und variiert den Faktor A von 75 mg bis 150 mg, so nimmt die Partikelgröße von ca. 240 nm auf 200 nm ab. Der Faktor B hat somit einen stärkeren Einfluss auf die Partikelgröße als der Faktor A.

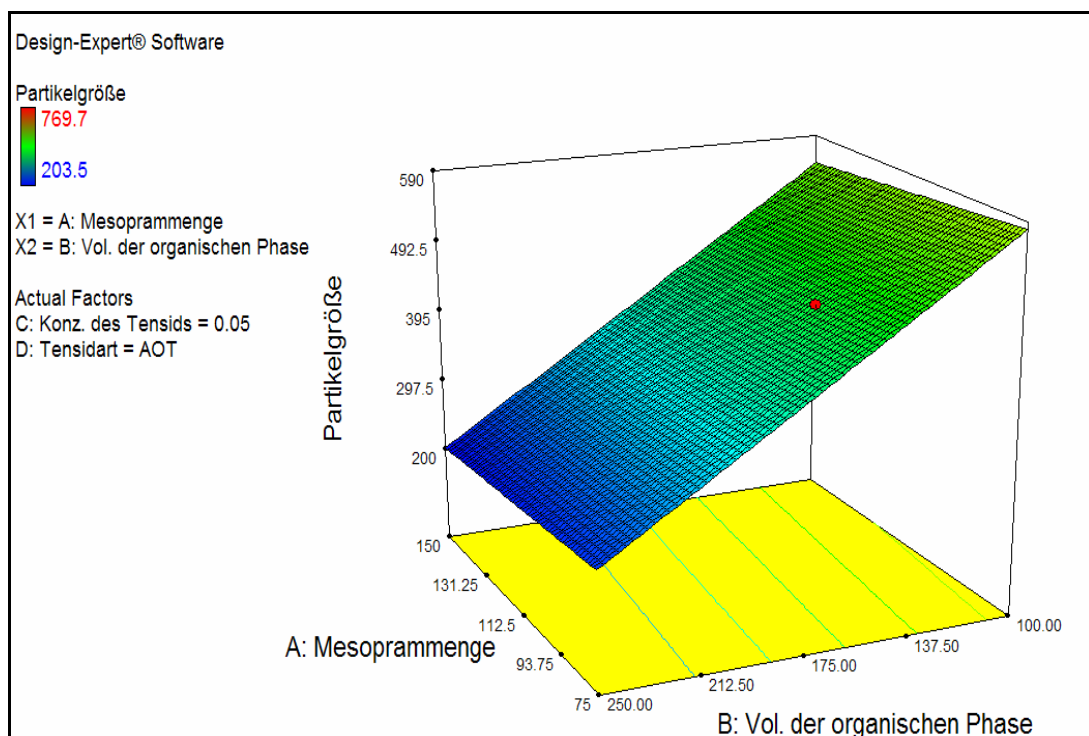


Abb. 3.39: Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren A und B auf die Partikelgröße

In der Abb. 3.40 ist das folgende Szenario dargestellt: Die Faktoren A (Mesopramgehalt) und D (Tensidart) bleiben konstant. Einzig die Faktoren B (Vol. der organischen Phase) sowie C (Tensidkonzentration) werden variiert. Im Bezug auf die Partikelgröße zeigte sich, dass der Faktor C nur einen geringen Einfluss ausübt. Der Faktor B besitzt einen deutlich stärkeren Effekt.

Rechnerisch ergibt sich so für das Tensid AOT eine minimale Partikelgröße von ca. 185 nm, wenn der Faktor A auf 150 mg, der Faktor B auf 250 µl und der Faktor C auf 1,0 % eingestellt werden.

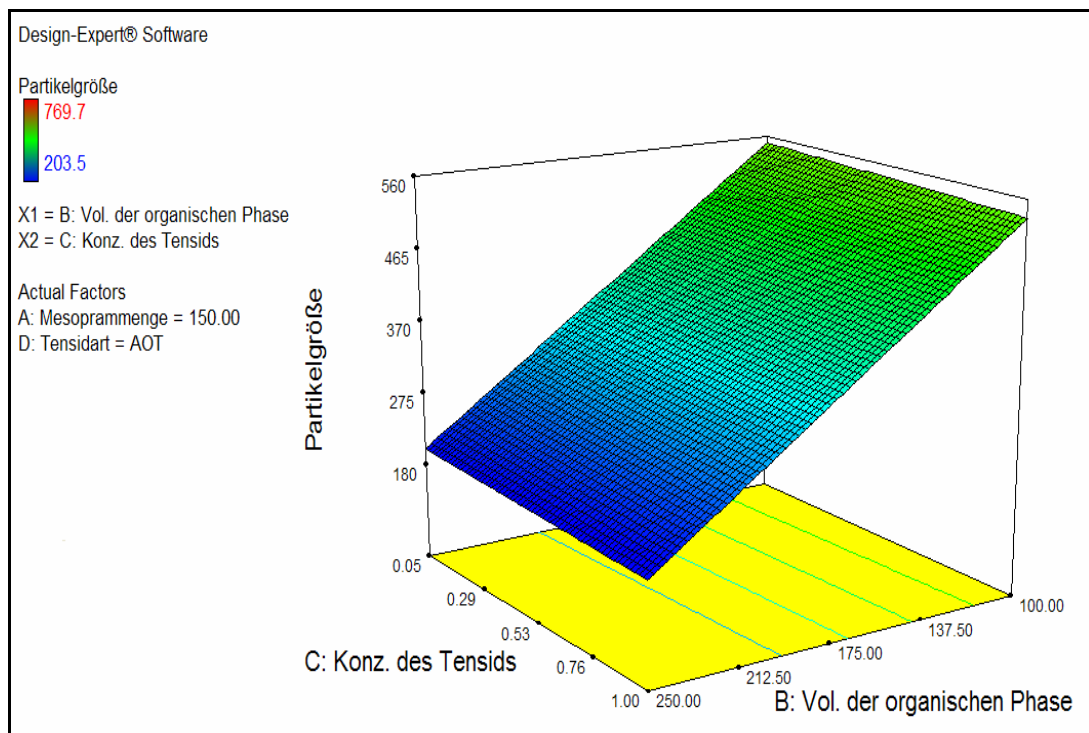


Abb. 3.40: Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren C und B auf die Partikelgröße

Die ANOVA Prüfung zeigte, dass der Faktor C, verglichen mit den anderen Faktoren, insgesamt den geringsten Einfluss auf der Partikelgröße zeigte (p-Wert=0,7996). Beim Variieren dieses Faktors hat sich die Partikelgröße nicht signifikant verändert.

Der charakterisierende Faktor D (Tensidart) kann nicht kontinuierlich verändert werden. Eine dreidimensionale Darstellung ist aus diesem Grund nicht möglich.

Um den Einfluss dieses Faktors zu charakterisieren bietet sich eine zweidimensionale Darstellung gegen einen weiteren Faktor an. Dies ist in der Abb. 3.41 exemplarisch mit Faktor C dargestellt.

In der Darstellung symbolisieren verschieden farbige Linien die 4 Tensidarten (Faktor D). Der Unterschied zwischen allen 4 Tensiden ist nicht signifikant, da sich die Vertrauensbereiche aller Tenside überlappten.

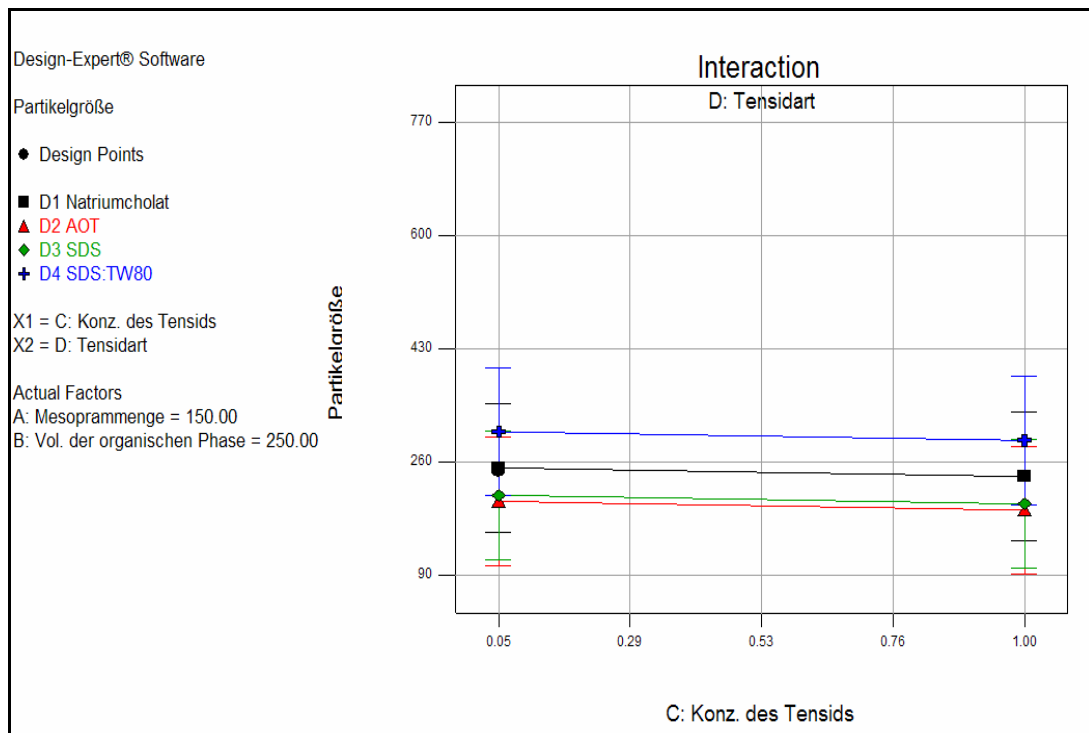


Abb. 3.41: Der Einfluss der Faktoren C und D auf die Partikelgröße

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Herstellung Mesopram beladener CAB 70.000 Nanopartikel der Faktor B auf die Partikelgröße den größten Einfluss nahm. Die geringste Partikelgröße von ca. 185 nm ergab sich rechnerisch nach der folgenden Rezeptur: 250 µl organischer Phase werden 6 ml 1,0 % iger AOT Lösung zugesetzt.

☆ Verkapselungsrate:

Analog dem Procedere der Partikelgrößenanalyse, wurden dieselben 4 Faktoren als Einflussgrößen gewählt.

Erst wurde erneut eine Signifikanzanalyse mittels ANOVA durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 3.42 wiedergegeben. Das Versuchsaufbau entsprach der ANOVA Prüfung auf Signifikanz (F-Wert=6,92; p-Wert=0,0055). Aus diesem Grund konnte angenommen werden, dass während der Untersuchungen in den Gruppen unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten gewirkt haben. Die Faktoren B und C hatten während der Versuche einen signifikanten Einfluss auf die Verkapselungsrate (p-Wert<0,05).

Response	2	Verkapselungsrate				
ANOVA for Response Surface Linear Model						
Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1353.33	6	225.56	6.92	0.0055	significant
<i>A-Mesoprammenge</i>	25.34	1	25.34	0.78	0.4008	
<i>B-Vol. der organischen Phase</i>	453.63	1	453.63	13.92	0.0047	
<i>C-Konz. des Tensids</i>	782.40	1	782.40	24.01	0.0008	
<i>D-Tensidart</i>	91.97	3	30.66	0.94	0.4606	
Residual	293.24	9	32.58			
Cor Total	1646.57	15				

Abb. 3.42: Ergebnisse der Signifikanzprüfung bei ANOVA für die Verkapselungsrate von CAB 70,000 Nanopartikel

Der Einfluss der Faktoren kann in der Funktion „Model Graphs“ graphisch dargestellt werden.

Im ersten Fall wurde der Faktor A auf einen Wert von 150 mg eingestellt sowie der Faktor D als Natriumcholat gekennzeichnet.

Der Faktor B (Mesopram-Gehalt) sowie der Faktor C (Tensidkonzentration) wurden auf einer X1 sowie einer X2-Achse gegen die Verkapselungsrate auf der Y-Achse aufgetragen. Bei einem konstanten Wert für den Faktor C von 1,0 %, zeigt sich beim Variieren des Faktors B von 100 µl auf 250 µl, dass die Verkapselungsrate von ca. 7 % auf ca. 23 % zunimmt. Fixiert man den Faktor B auf 100 µl und variiert den Faktor C von 1,0 % bis 0,05 %, so nimmt die Verkapselungsrate von ca. 7 % auf 24 % zu. Beide Faktoren zeigten also einen vergleichbaren Einfluss auf die Verkapselungsrate.

Rechnerisch ergibt sich eine größtmögliche Verkapselungsrate von ca. 40 % bei einem Wert von 250 µl für den Faktor B sowie einem Wert von 0,05 % für den Faktor C.

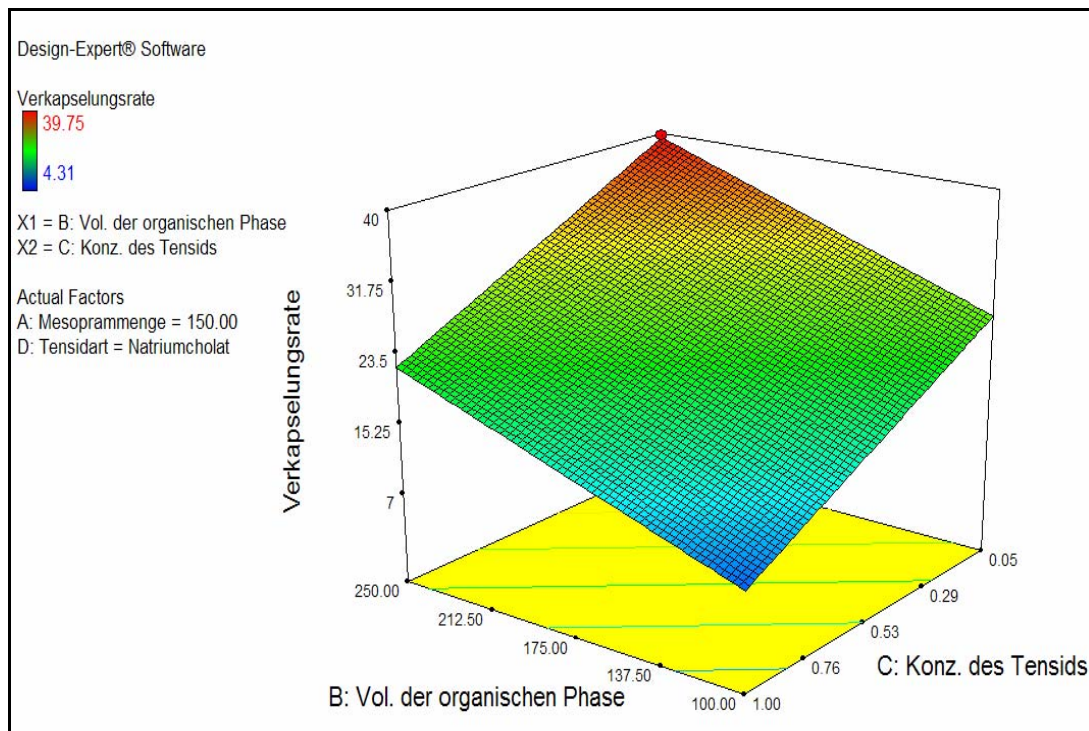


Abb. 3.43: Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren C und B auf die Verkapselungsrate

Da der Faktor D kein numerischer Faktor ist, könnte der Einfluss dieses Faktors nicht mit der Funktion „3D surface“ dargestellt werden. Um den Einfluss dieses Faktors zu charakterisieren bietet sich eine zweidimensionale Darstellung gegen einen weiteren Faktor an. Dies ist in der Abb. 3.44 exemplarisch mit Faktor C dargestellt.

In der Darstellung symbolisieren verschieden farbige Linien die 4 Tensidarten (Faktor D). Der Unterschied zwischen allen 4 Tensiden ist nicht signifikant, da sich die Vertrauensbereiche aller Tenside überlappen.

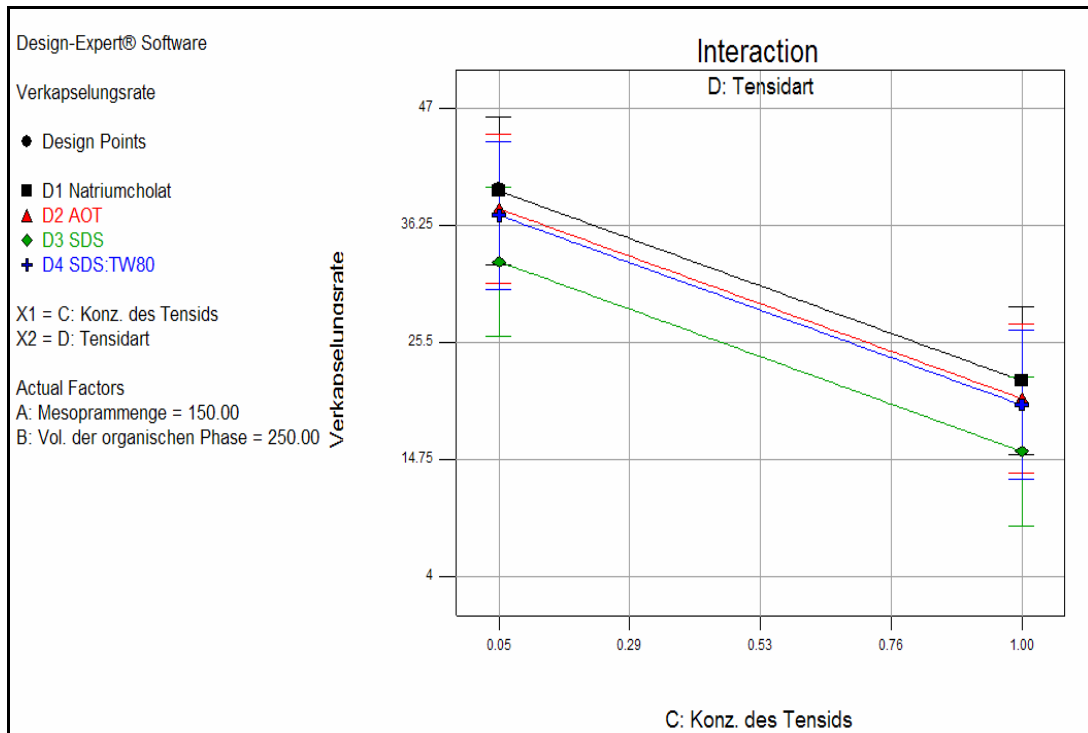


Abb. 3.44: Einfluss der Faktoren C und D auf die Verkapselungsrate

3.5.4 Optimierung der Herstellungsbedingungen

Bis zum jetzigen Zeitpunkt erfolgte die Datenanalyse nur im Hinblick auf einen der beiden entscheidenden Parameter (Partikelgröße, Verkapselungsrate). Die optimalen Herstellungsbedingungen für einen der beiden Parameter könnten jedoch im Widerspruch zu den optimalen Herstellungsbedingungen des anderen Parameters liegen. Aus diesem Grund erfolgte eine weitere Datenanalyse um einen optimalen Kompromiss für die zwei Parameter zu finden.

Die Optimierung wurde durch die Software mit Hilfe der Funktion „Optimization“ durchgeführt.

Als Parameter wurden eine minimale Partikelgröße sowie eine hohe Verkapselungsrate gewählt. Beide Parameter wurden als gleich wichtig eingestuft.

Das Ergebnis dieser Berechnung ist in der Abb. 3.45 dargestellt.

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Mesoprammen	is in range	75	150	1	1	3
Vol. der organis	is in range	100	250	1	1	3
Konz. des Tens	is in range	0.05	1	1	1	3
Tensidart	is in range	Natriumcholot	SDS:TW80	1	1	3
Partikelgröße	minimize	203.5	769.7	1	1	3
Verkapselungs	maximize	4.31	39.75	1	1	3

Solutions for 4 combinations of categoric factor levels							
Number	Mesoprammen	Vol. der organis	Konz. des Tensi	Tensidart	Partikelgröße	Verkapselungs	Desirability
1	<u>150.00</u>	<u>250.00</u>	<u>0.05</u>	<u>AOT</u>	<u>201.382</u>	<u>37.7982</u>	<u>0.972</u>
2	148.56	249.87	0.05	AOT	202.254	37.7213	0.971
3	149.93	250.00	0.05	AOT	201.351	37.7198	0.971
4	150.00	249.06	0.05	AOT	203.563	37.7088	0.971
5	150.00	249.39	0.05	AOT	202.74	37.6597	0.970
6	146.83	250.00	0.05	AOT	202.653	37.6552	0.970
7	143.04	250.00	0.05	AOT	204.165	37.4849	0.967
8	142.30	250.00	0.05	AOT	204.463	37.4514	0.966
9	141.81	250.00	0.05	AOT	204.658	37.4294	0.966
10	150.00	246.64	0.05	AOT	209.206	37.4776	0.963
11	135.30	250.00	0.05	AOT	207.261	37.1365	0.959
12	134.09	250.00	0.05	AOT	207.746	37.0819	0.958
13	150.00	243.98	0.05	AOT	215.371	37.2251	0.954
14	149.99	250.00	0.05	Natriumcholot	251.734	39.4379	0.952
15	150.00	250.00	0.06	Natriumcholot	251.658	39.3404	0.951
16	149.26	249.67	0.05	Natriumcholot	252.793	39.3735	0.950
17	148.06	250.00	0.05	Natriumcholot	252.508	39.3508	0.950

Abb. 3.45: Optimierung der Herstellungsbedingungen für Mesopram beladene CAB 70.000 Nanopartikel

Nach der Berechnung kann im günstigsten Fall eine Partikelgröße von 201 nm sowie eine Verkapselungsrate von ca. 38 % erreicht werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Ergebnis produziert werden kann lag bei 97,2 % (s. in der Abb. 3.45 Nummer 1).

Insgesamt wurden 84 Bedingungskombinationen aufgelistet. Die Kombination Nr. 1 entsprach nicht der Bedingung für die kleinste Partikelgröße noch der Bedingung für die größte Verkapselungsrate. Sie stellt, wie einleitend erwähnt, einen Kompromiss zwischen den beiden optimierten Parametern dar.

Diese Rezeptur würde für die weiteren Untersuchungen sowie für das Upscaling mit einem Homogenisator verwendet.

3.5.5 Herstellung mit optimierter Rezeptur

Die von Design Expert optimierte Rezeptur kam in den bislang durchgeführten 16 Versuchen nicht vor.

Aus diesem Grund sollten Wiederholungsversuche zur Bestätigung der Hypothese durchgeführt werden.

Die Herstellung erfolgte wie in [Kap. 2.2.5.2.3](#) beschrieben. Anwendung fand die optimierte Rezeptur:

250 µl organische Lösung (150 mg Mesopram und 250 mg CAB 70.000 gelöst in 5 g Dichlormethan) wurden sofort in 6 ml 0,05 % iger AOT Lösung überführt und ca. 3 Minuten mit Ultraschall (Outputstufe 10) behandelt. Hierdurch entstand eine homogenisierte Nanoemulsion. Nach dem Abzug des Lösungsmittels, stand die Nanosuspension für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Parallel zu diesem Versuch wurden Nanopartikel mit dem Polymer CAB 30.000 unter identischen Bedingungen hergestellt. Es sollte an diesem Beispiel untersucht werden, ob die geringere Molekularmasse des Polymers einen Einfluss auf die Partikelgröße sowie die Verkapslungsrate zeigt.

3.5.5.1 Partikelgröße (nm)

Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte analog dem im [Kap. 2.2.5.4](#) beschriebenen Verfahren.

Wie in der Abb. 3.46 dargestellt entsprach die Partikelgröße der CAB 70000 Nanopartikel (ca. 204 nm) der berechneten Voraussage des Programms (ca. 201 nm).

Des Weiteren zeigte sich, dass die Molekülmasse des Polymers einen Einfluss auf die Partikelgröße hat. Die Partikelgröße der CAB 30.000 Nanopartikel lag ca. 70 nm unter der Partikelgröße der CAB 70000 Nanopartikel.

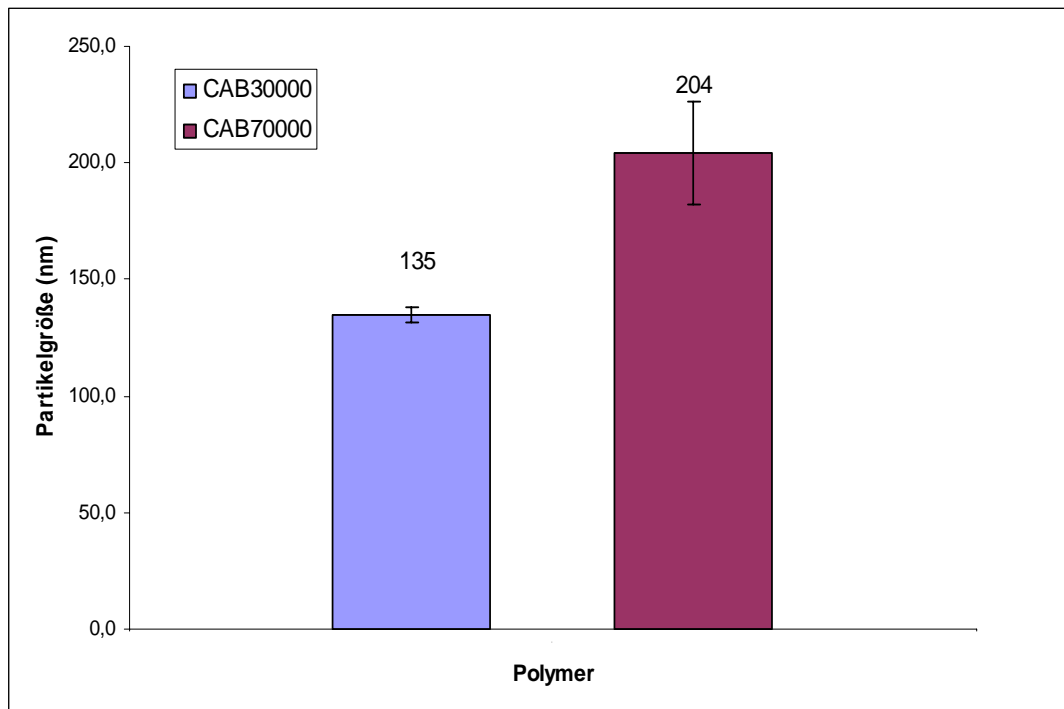


Abb. 3.46: Vergleich der Partikelgrößen Mesopram beladener CAB 30.000 und CAB 70.000 Nanopartikel hergestellt mit der optimierten Rezeptur (n=4)

Die Mesopram beladenen CAB 70.000 Nanopartikel wurden auch elektronenmikroskopisch untersucht. Wie in der Abb. 3.46 dargestellt, besaßen die Nanopartikel eine glatte Oberfläche sowie eine runde Form. Außerhalb der Partikel konnten keine Mesopram-Kristalle detektiert werden. Die Partikelgrößen, die mittels REM bestimmt wurden, lagen unter 200 nm. Eine Hydrathülle wurde beim Trocknen entfernt. Die wahren Partikelgrößen lagen aus diesem Grund unter den mittels DLS bestimmten Werten, da dieses Verfahren den mittleren hydrodynamischen Durchmesser bestimmt.

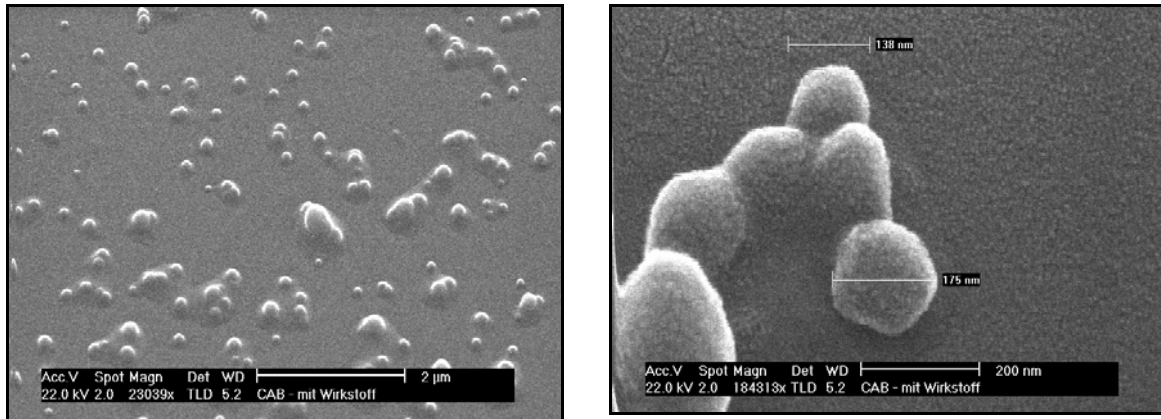


Abb. 3.47: REM Aufnahmen Mesopram beladener CAB 70.000 Nanopartikel

3.5.5.2 Verkapselungsrate

Die Bestimmung der Verkapselungsrate der Nanopartikel wurde wie im [Kap. 2.2.5.3](#) beschrieben durchgeführt.

Die Verkapselungsraten der CAB 70.000 sowie der CAB 30.000 Nanopartikel sind in der nachfolgenden Tabelle 3.13 aufgeführt.

Tabelle 3.13: Vergleich der Verkapselungsrate der mit der optimierten Rezeptur hergestellten CAB 70.000 sowie CAB 30.000 Nanopartikel

n=4	CAB 70.000	CAB 30.000
MW	38,3 %	16,2 %
SD	4,2 %	1,9 %
VK (%)	11	12

Bei der Partikelherstellung mit dem Polymer CAB 70.000 wurden ca. 38 % des eingesetzten Mesoprams verkapselt. Ein Milligramm Polymer enthielt ca. 168 µg Mesopram. Die Beladungsrate betrug ca. 17 %.

Die Verkapselungsrate des Polymers CAB 30.000 betrug im Vergleich mit CAB 70.000 nur ca. 16 %. Die Beladungsrate lag bei ca. 6,5 %. Dies bedeutet, dass ein Milligramm CAB 30.000 mit nur ca. 65 µg Mesopram beladen werden konnte. Die Verkapselungsrate

bzw. die Beladungsrate lag beim Polymer CAB 30.000 deutlich unter der des Polymers CAB 70.000.

Da bei den CAB 70.000 Nanopartikel die angestrebte Partikelgröße von 250 nm nicht überschritten wurde und des Weiteren die Verkapslungsrate deutlich höher lag, als beim Polymer CAB 30.000, wurde das Polymer CAB 70.000 für die weitere Entwicklung eingesetzt.

3.5.5.3 Zetapotenzial (mV)

Die Messung des Zetapotentials wurde wie im [Kap. 2.2.1.2](#) beschrieben durchgeführt.

In der Tabelle 3.14 wurden die Messdaten des Zetapotenzials von CAB 70.000 bzw. CAB 30.000 Nanopartikel aufgeführt.

Tabelle 3.14: Vergleich der Zetapotentiale der CAB 70.000 und CAB 30.000 Nanopartikel hergestellt mit der optimierten Rezeptur

n=4	CAB 70.000	CAB 30.000
MW	-43,2 mV	-40,4 mV
SD	1,5 mV	2,0 mV
VK(%)	4	5

Die aufgeführten Zetapotentiale der CAB 70.000 sowie der CAB 30.000 Nanopartikel waren nahezu identisch. Das Zetapotential zeigte keine Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Polymers.

3.5.6 Stabilität

3.5.6.1 Stabilität der Partikel im SIF

Die Stabilität der CAB 70.000 Nanopartikel im SIF wurde geprüft.

Die Stabilitätsprüfung wurde wie in [Kap. 2.2.1.5.1](#) beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden nachfolgend graphisch dargestellt (s. Abb. 3.48).

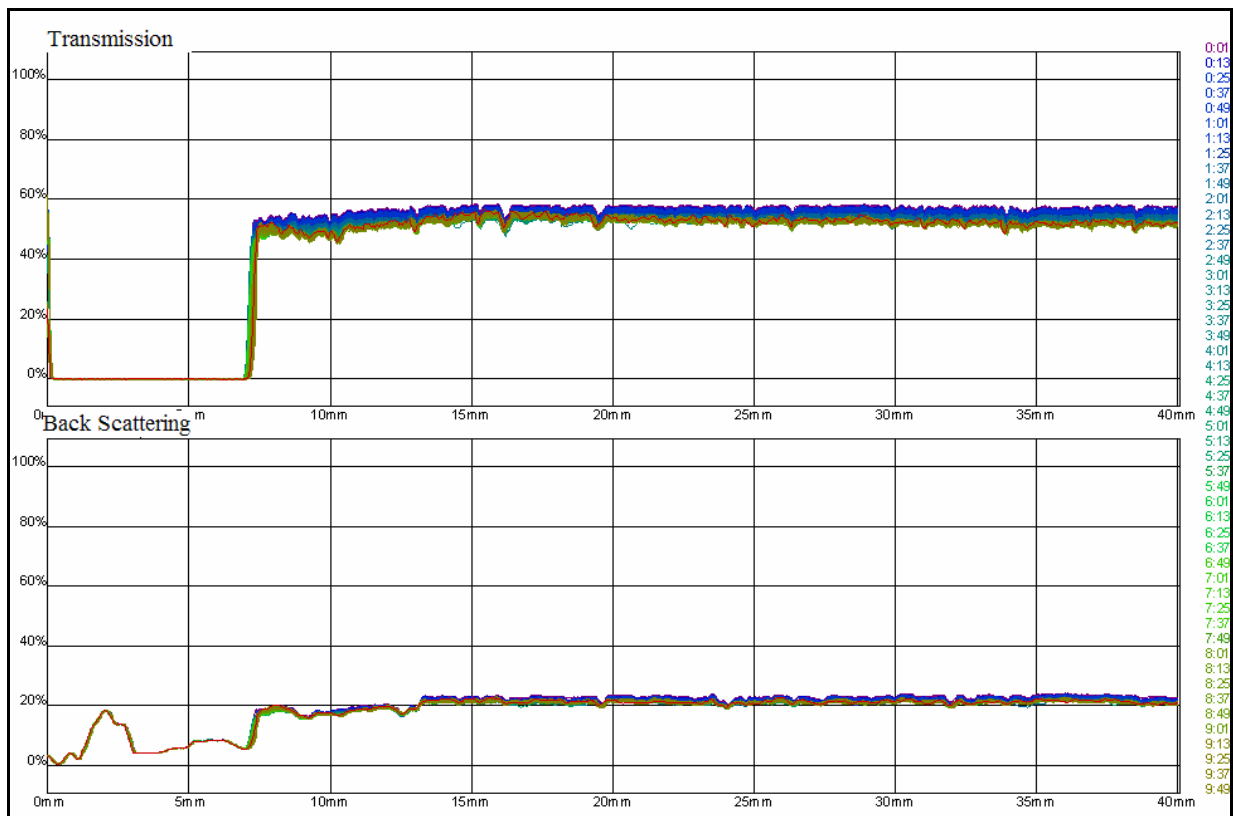


Abb. 3.48: Bestimmung der Stabilität der CAB 70.000 Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 mittels Turbiscan® M 1000

Wie in der Abb. 3.48 gezeigt, waren die mit der optimierten Rezeptur hergestellten CAB 70.000 Nanopartikel im SIF stabil. Die Intensität der Lichttransmission hat sich während des ganzen Versuchs um nur ca. 10 % (60 % bis 50 %) reduziert.

Eine geringe Sedimentation wurde innerhalb von ca. 10 Stunden beobachtet. Die Lösung trübte sich ein wenig, was auf eine Agglomeration der Partikel hindeutet. Diese Agglomerate waren durch leichtes Schütteln trennbar.

Die Intensität der Lichtrückstreuung (Unterteil der Abb. 3.48) hat sich nicht verändert.

Aus der Abb. 3.49 ist ersichtlich, dass sich die CAB PartikelgröÙeverteilung im Zuge der Stabilitätsversuche im SIF nicht verändert hat. Die PartikelgröÙe vor und nach den Versuchen lag bei ca. 200 nm.

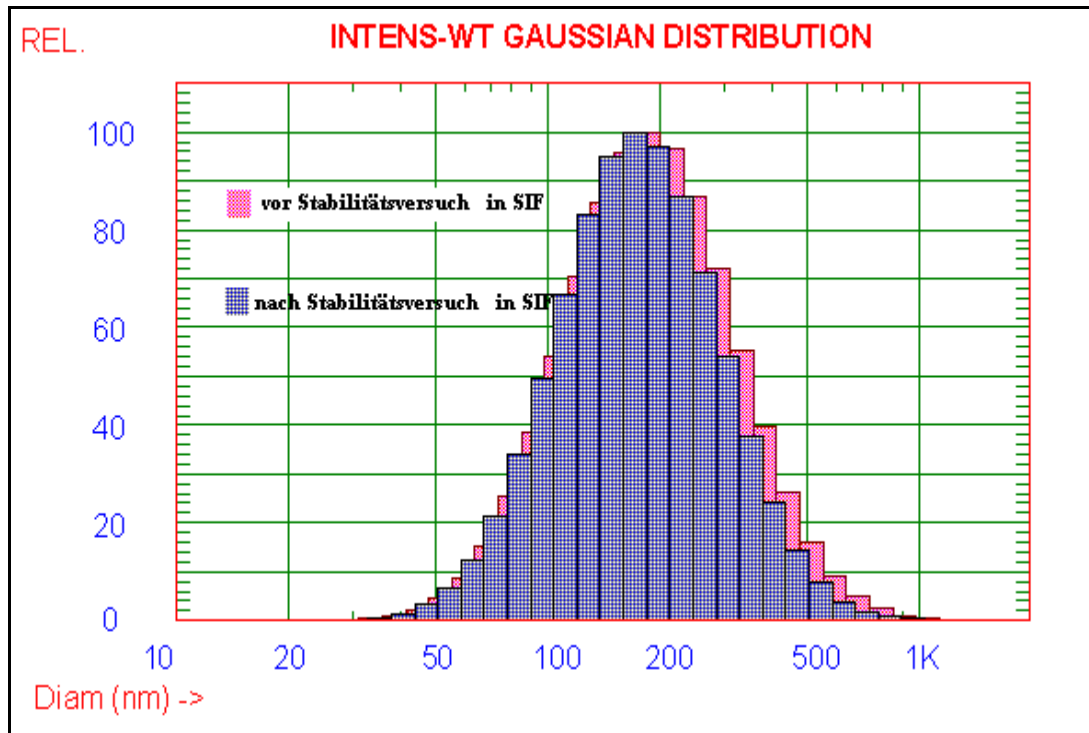


Abb. 3.49: Die Veränderung der PartikelgröÙeverteilung von Mesopram beladenen CAB 70.000 Nanopartikel vor und nach dem Stabilitätsversuch im SIF bei pH 6,8

3.5.6.2 Stabilität der Partikel - Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung wurde als geeignetes und schonendes Trocknungsverfahren in dieser Arbeit eingesetzt. Es sollte zum einen gezeigt werden, ob sich die PartikelgröÙe nach der Trocknung verändert, zum anderen wurde untersucht, ob das Lyophilisat über einen definierten Lagerzeitraum eine PartikelgröÙenänderung aufweist.

Zur detaillierten Beschreibung des Trocknungsprozesses sei auf das [Kap. 2.2.1.4](#) verwiesen.

Das resultierende Lyophilisat war ein lockerer und poröser Feststoff, welcher sich in Wasser sehr gut auflösen lässt. Nach dem Zusatz von 1,5 ml destillierten Wassers und kurzem Schütteln wurde die Partikelgröße in der entstandenen Suspension mit Hilfe von DLS ermittelt. Die Partikelgröße der CAB 70.000 Nanopartikel in der neu entstandenen Suspension betrug 259 nm. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Partikelgröße vor der Gefriertrocknung (214 nm) (s. Abb. 3.50).

Der Versuch hat gezeigt, dass die Gefriertrocknung ein geeignetes Verfahren zur Trocknung der Nanosuspension ist. Alle Proben wurden mit Hilfe dieser Technik getrocknet und in einem geschlossenen Vial bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 6 Monaten gelagert. Nach diesem Zeitraum wurde die Partikelgröße des aufgelösten Lyophilisats bestimmt (s. Abb. 3.50).

Es zeigte sich, dass die Partikelgröße über den Lagerzeitraum nicht stark zunahm (220 nm). Das Lyophilisat zeigte somit keine Tendenzen zur Partikelgrößenänderung.

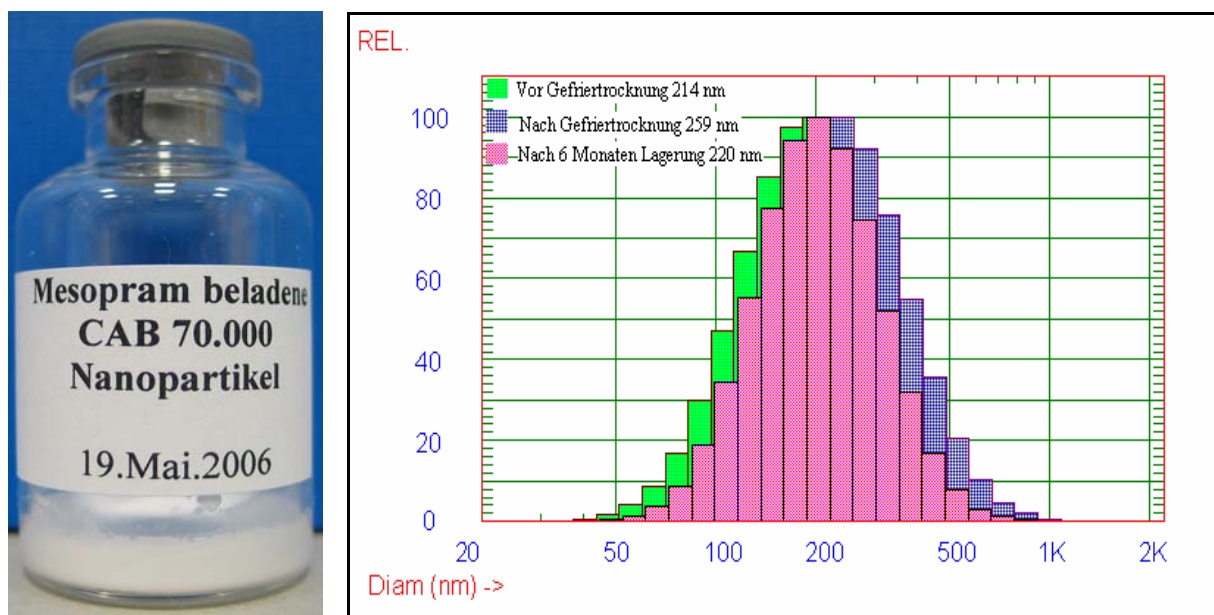


Abb. 3.50: Linke Seite: Photo eines Lyophilisats Mesopram beladener CAB 70.000 Nanopartikel
 Rechte Seite: Verteilung der Partikelgrößen vor sowie nach der Lyophilisation (direkt bzw. nach sechsmonatiger Lagerung).

3.5.6.3 Stabilität des Wirkstoffs

Wie im [Kap. 2.2.1.5](#) berichtet, ist der Arzneistoff Mesopram bei einem pH-Wert von über 7 stabil. Die Polymere, die Tenside sowie die Herstellungsprozesse könnten jedoch eine Wirkstoffinstabilität verursacht haben. Aus diesem Grund wurde der Arzneistoff nach der Partikelherstellung sowie nach sechsmonatiger Lagerung exemplarisch für das Polymer CAB 70.000 analysiert. Es konnten keine Abbauprodukte des Wirkstoffs detektiert werden (s. Abb. 3.51 und Abb. 3.52). Das lyophilisierte Mesopram erwies sich somit als lagerstabil.

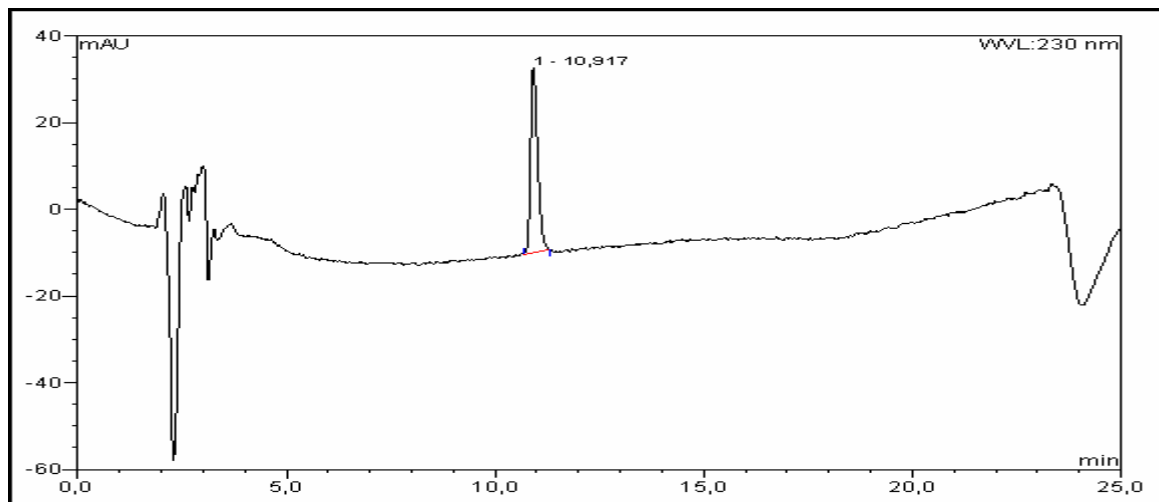


Abb. 3.51: Qualitative Bestimmung der Abbauprodukte von Mesopram mittels HPLC nach der Herstellung der CAB 70.000 Nanopartikel

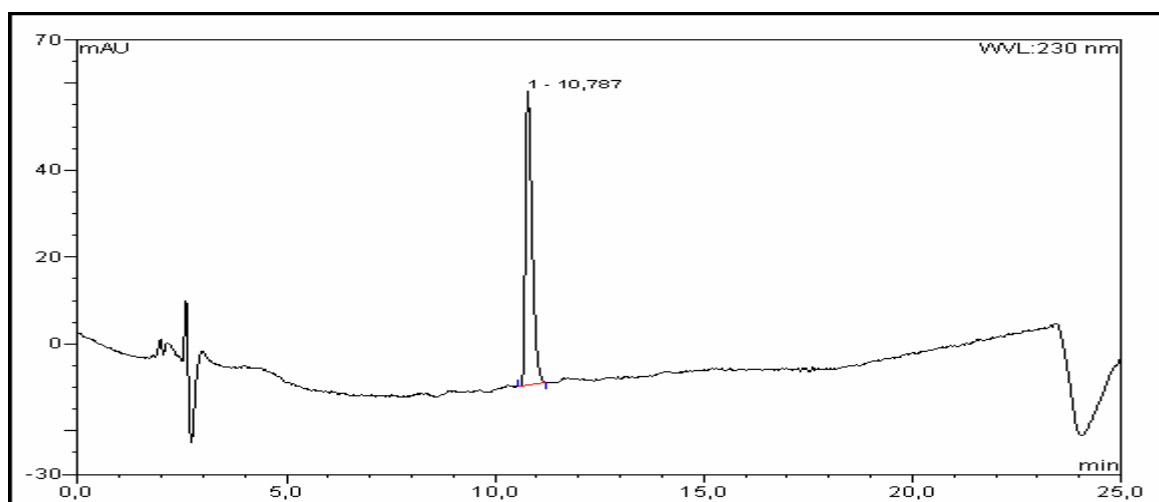


Abb. 3.52: Qualitative Bestimmung der Abbauprodukte von Mesopram in lyophilisierten CAB 70.000 Nanopartikel mittels HPLC nach sechsmonatiger Lagerung

3.5.7 Mesopram-Freisetzung

Die Wirkstoff-Freisetzung aus den getrockneten CAB 70000 Nanopartikeln des Lyophilisats wurde wie im [Kap. 2.2.1.6](#) beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung wurde dreimal wiederholt. Die erhobene Freisetzungskurve ist in der Abb. 3.53 dargestellt.

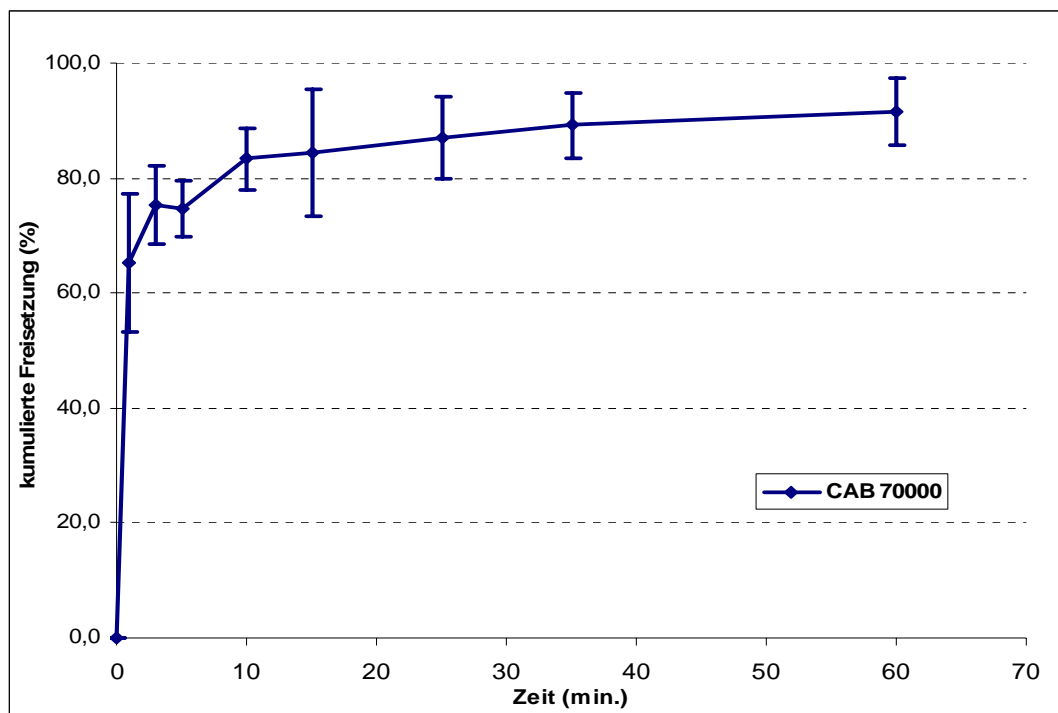


Abb. 3.53: Die kumulierte Mesopramfreisetzung aus den CAB 70.000 Nanopartikel (MW \pm SD; n=3)

Aus der Abb. 3.51 ist ersichtlich, dass ca. 70 % des Mesoprams während der ersten 3 Minuten aus den Partikeln freigesetzt wurde. Ein starker „initial burst effect“ kann eine unkontrollierte Freisetzung verursachen und ist ungünstig für den gezielten Wirkstoff-Transport zum erkrankten Darmgewebe. Dieses Resultat könnte auf eine bevorzugte Lokalisation des Wirkstoffs an die Oberfläche der Nanopartikel hinweisen. Diese Wirkstoffmoleküle werden initial schnell freigesetzt und können einen „initial burst effect“ verursachen (Sampath, Garvin et al., 1992).

Weitere 20 % Mesopram wurden nach ca. einer Stunde freigesetzt. Die restlichen 10 % Mesopram wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden freigesetzt (Daten nicht gezeigt). Die Freisetzung war insgesamt sehr schnell.

Die Nanopartikel hatten eine sehr große Kontaktfläche mit dem Freisetzungsmedium, welche *in vivo* nicht vorhanden ist. Ein „burst effect“ ist aus diesem Grund *in vivo* unwahrscheinlich (Lamprecht, Ubrich et al., 2001b).

Aufgrund der verstärkten Schleimausschüttung vom entzündeten Gewebe (Jani, Halbert et al., 1990; Ponchel, Montisci et al., 1997; Sakuma, Sudo et al., 1999) sowie der kleinen Partikelgrößen (Lamprecht, Schaefer et al., 2001), reichern sich die Mesopram beladenen CAB 70.000 Nanopartikel an den erkrankten Stellen an. Die noch nicht freigesetzte Wirkstoffmenge würde in den Zellen über einen längeren Zeitraum freigesetzt werden.

3.5.8 Vergleich mit der Modellschubstanz Budesonid

Um zu untersuchen, ob die große Löslichkeit des Mesoprams im Wasser für die schnelle Freisetzung verantwortlich war, wurde Budesonid als Modellschubstanz als Vergleich eingesetzt.

Die Budesonid beladenen Nanopartikel wurden wie folgt hergestellt: 250 mg CAB 70.000 und 20 mg Budesonid wurden in 5 g Dichlormethan gelöst. 250 µl dieser organischen Lösung wurden sofort 6 ml 0,05 %iger AOT Lösungen zugesetzt. Nach ca. 3 Minuten Behandlung mit Ultraschall folgte dann ein Lösungsmittelabzug. Die entstandene Nanosuspension wurde gereinigt und redispersiert. Die Bestimmung der Verkapselungsrate und der Wirkstoff-Freisetzung wurde nach der bereits beschriebenen Methoden durchgeführt.

Tabelle 3.15: Die Verkapselungsrate bzw. Beladung von Budesonid in CAB 70.000 Nanopartikel

N=3	Verkapselungsrate	Partikelgröße
MW	64,0 %	228 nm
SD	5,9 %	10 nm
VK (%)	9	4

Zwischen den Partikelgrößen der Budesonid beladenen CAB 70.000 Nanopartikel und der Mesopram beladenen Partikel (204 ± 22 nm) gab es keinen signifikanten Unterschied. Die Wirkstoffart und Wirkstoffkonzentration haben hier keine Wirkung auf die Partikelgröße ausgeübt. Verglichen mit dem Mesopram wurde auf Grund der geringeren Löslichkeit des Budesonids mehr Arzneistoff in den CAB 70.000 Nanopartikel verkapselt (s. Tabelle 3.15).

Nach der Lyophilisation wurde die Budesonid-Freisetzung aus den CAB 70.000 Nanopartikeln untersucht und mit der Wirkstoff-Freisetzung aus der Bulkware verglichen.

Die erhaltenen Freisetzungskurven sind in der Abb.3.54 dargestellt.

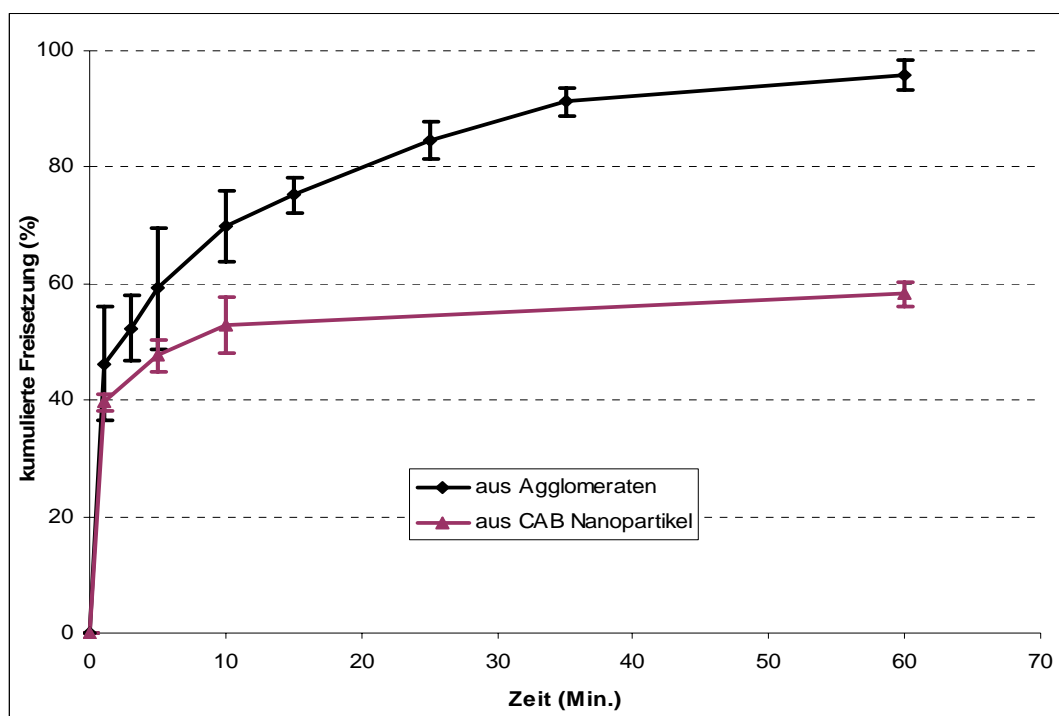


Abb. 3.54: Budesonid-Freisetzung aus den CAB 70.000 Nanopartikel verglichen mit der Freisetzung aus der Bulkware (MW \pm SD; n=3)

Es ist erkennbar, dass wieder ein „initial burst effect“ bei Freisetzung aus den CAB 70.000 Nanopartikel aufgetreten ist. Innerhalb von 3 Minuten wurde aber nur ca. 40 % des eingeschlossenen Budesonids schnell freigesetzt. Ca. 60 % des verkapselten Budesonids wurde während der nachfolgenden 57 Minuten freigesetzt. 17,6 Stunden später blieb noch ca. 30 % des Budesonids in den Partikeln. Im Vergleich mit der Budesonidfreisetzung aus der

Bulkware hat das Polymer CAB 70.000 als eine Art Diffusionsbarriere gedient. Die Freisetzung war langsamer.

3.5.9 Zusammenfassung

Die Tauglichkeit des Taguchi OA Modells zur Optimierung der CAB 70.000 Nanopartikelherstellung wurde bestätigt. Verglichen mit anderen statistischen Modellen (z.B. 4 Faktoren mit je 4 Stufen bei dem Modell General Faktorial Design) konnte die Anzahl der Versuche von 256 auf 16 stark reduziert werden.

Mit Hilfe der 16 Versuche wurde eine statistische Vorhersage berechnet. Die Richtigkeit dieser Vorhersage wurde über Bestätigungsversuche mit der optimierten Rezeptur nachgewiesen.

Die durchgeführten Versuche bewiesen, dass das Polymer CAB 70.000 als Trägermaterial zur Herstellung Mesopram beladener Nanopartikel geeignet ist. Als geeignete Herstellungsmethode dieser Partikel erwies sich die Emulsion Verdampfungsmethode (EVM). Verglichen mit den zuvor untersuchten Polymeren Eudragit[®] S100, Eudragit[®] RS, Chitosan sowie den alternativen Herstellungsmethoden, wurde über diesen Herstellungsweg mit dem Polymer CAB 70.000 eine höhere Verkapselungsrate erzielt. Die Mesopram beladenen CAB 70.000 Nanopartikel zeigten eine ausreichende Stabilität bei den Herstellungsschritten, im SIF sowie bei der Gefriertrocknung. Die Konzentration des Restlösungsmittels Dichlormethan wurde mittels GC bestimmt. Die Konzentration von Dichlormethan betrug nur ca. 10 ppm im Lyophilisat. Diese Konzentration entsprach den Anforderungen der entsprechenden ICH-Richtlinie (ICH Expert Working Group, 2005). Diese ICH-Richtlinie schreibt eine Restkonzentration von Dichlormethan in oralen Arzneiformen von unter 600 ppm vor.

Für das Lyophilisat stellen die Verkapselung oder alternativ die Direkttablettierung sinnvolle weitere Verarbeitungsschritte dar.

3.6 Mesopram beladene EC Nanopartikel

3.6.1 Vorversuch

Bei der Herstelloptimierung mesoprambeladener EC Nanopartikel wurde zu Beginn die Beladungskapazität (s. [Kap. 2.2.1.8](#)) bestimmt.

Mesopram wurde mit dem Polymer Ethocel[®] 100 in verschiedenen Verhältnissen (0-80 %) gemischt. 50 mg dieser Mischungen wurden im Anschluss in 1 g Dichlormethan gelöst und auf ein Objektträger aufgetragen. Nach Abzug des Lösungsmittels wurden die gebildeten Filme mikroskopisch im polarisierten Licht untersucht:

Wie in der Abb. 3.55 dargestellt konnten bis zu einem Mesopramgehalt von 50 % keine Kristalle des Arzneistoffs detektiert werden.

Ab einem Mesopramgehalt von über 60 % kristallisierte Mesopram in dem Polymergerüst aus (s. Abb. 3.56).

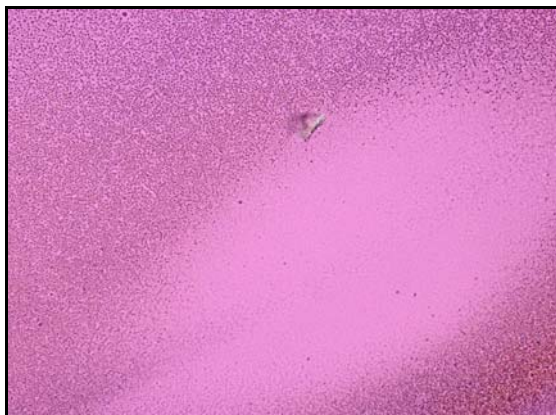


Abb. 3.55: Mesopram in Ethocel[®] 100 (50 %)

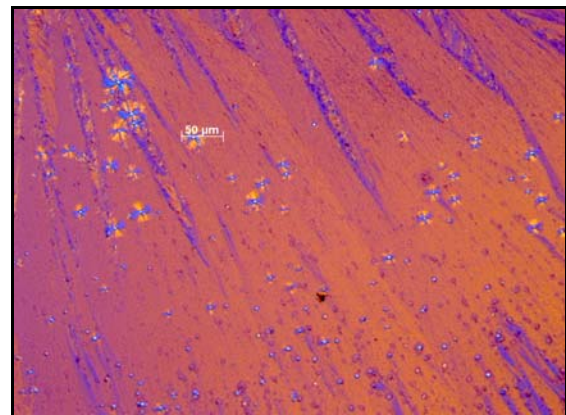


Abb. 3.56: Mesopram im Ethocel[®] 100 (60 %)

Zur Herstellung mesoprambeladener Ethocel[®] 100 Nanopartikel wurde initial mit Ethocel[®] 45 als Modellpolymer gearbeitet, um Erfahrungen beim Verarbeiten dieses Polymers zu sammeln. Auf Basis der in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse ist bekannt, dass die Herstellung kleiner Partikelgrößen mit der niedermolekularen Variante eines Polymers leichter zu realisieren ist, die Verkapslungsrate jedoch gering ausfällt (s: [Kap. 3.5.5.1](#) und [Kap. 3.5.5.2](#)). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst.

Tabelle 3.16:

Die Ergebnisse der Vorversuchen bei der Herstellung Mesopram beladener Ethocel[®] 45 Nanopartikel

n=3	Ethocel[®] 45	
Partikelgröße	MW	198 nm
	SD	9 nm
	VK(%)	5
Verkapselungsrate	MW	7,7 %
	SD	0,2 %
	VK(%)	2
Beladungsrate		2,9 % (ca. 30 µg/mg Polymer)
Zetapotenzial	MW	-71,3 mV
	SD	1,0 mV
	VK (%)	1

Die Nanosuspension hatte einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von ca. 200 nm und lag damit innerhalb der zu erreichenden Partikelgröße von 250 nm.

Wie zu erwarten war, ergab sich eine sehr niedrige Verkapselungsrate von 7,7 %.

Ziel sollte es sein, bei gleich bleibender Partikelgröße die Verkapselungsrate mit Hilfe des höhermolekularen Polymers Ethocel[®] 100 zu optimieren.

3.6.2 Experimententwurf mit Design-Expert

Analog der Herstelloptimierung der CAB Nanopartikel wurde sie nach einer Taguchi OA Versuchsplanung durchgeführt. Bei den durchgeführten Versuchen wurden die nachfolgenden 4 Einflussfaktoren analysiert und optimiert.

- ☆ Der Faktor A - Wirkstoffgehalt in der organischen Phase:
- ☆ Der Faktor B - Verhältnis zwischen organischer Phase und wässrigere Phase
- ☆ Der Faktor C - Tensidkonzentration
- ☆ Der Faktor D - die Tensidart

Die 4 Einflussfaktoren wurden im vom Design-Expert (Taguchi OA) herausgegebenen Formular eingetragen. Anschließend gab die Software die Kombinationen der Faktoren randomisiert heraus (Std Nr.). Die Versuche wurden nach den so generierten Kombinationen durchgeführt (s. Abb. 3.57).

Für die Verkapselungsrate und die Partikelgröße wurden die Einflüsse der vier Herstellfaktoren A-D beurteilt. Wechsel- und Mehrfachwechselwirkungen zwischen den Faktoren wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Faktoren A, B und C sind numerische Faktoren. Der Faktor D (Tensidart) ist ein charakterisierender Faktor. Diese Eigenschaften mussten vor der Softwareanalyse eingegeben werden. Nach dem Versuch wurden die erhaltenen Daten in die zwei Responsspalten eingetragen (Abb. 3.57) und die Signifikanz des Modells durch ANOVA geprüft.

Std	Run	Block	Factor 1 A: Mesopramgehalt mg/250mg	Factor 2 B: Vol. der organischen Phase ul/6ml wässrigen	Factor 3 C: Tensidkonzentration %	Factor 4 D: Tensidart	Response 1 Partikelgröße nm	Response 2 Verkapselungsrate %
8	1	Block 1	125.00	100.00	0.50	AOT	581.7	2.47
12	2	Block 1	100.00	100.00	0.10	Cholate	901.8	1.58
16	3	Block 1	75.00	100.00	0.05	SDS	670.7	5.51
13	4	Block 1	75.00	250.00	1.00	AOT	331.5	8.02
14	5	Block 1	75.00	200.00	0.50	Cholate	467.5	6.85
15	6	Block 1	75.00	150.00	0.10	SDS+TW80	554.1	8.16
10	7	Block 1	100.00	200.00	1.00	SDS	482.4	1.18
9	8	Block 1	100.00	250.00	0.50	SDS+TW80	334.5	11.55
11	9	Block 1	100.00	150.00	0.05	AOT	562	11.64
3	10	Block 1	150.00	150.00	0.50	SDS	437.2	1.74
5	11	Block 1	125.00	250.00	0.10	SDS	318.4	14.26
2	12	Block 1	150.00	200.00	0.10	AOT	346.1	11.14
6	13	Block 1	125.00	200.00	0.05	SDS+TW80	522.2	16.16
1	14	Block 1	150.00	250.00	0.05	Cholate	324.3	42.21
4	15	Block 1	150.00	100.00	1.00	SDS+TW80	442.3	2.48
7	16	Block 1	125.00	150.00	1.00	Cholate	539.5	5.11

Abb. 3.57: Tabelle der Taguchi OA Versuchsplanung zur Optimierung der Ethocel® 100 Partikelgröße bzw. der Verkapselungsrate

3.6.3 Analyse nach Taguchi OA

☆ Partikelgröße

Response	1	Partikelgröße				
ANOVA for Response Surface Linear Model						
Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2.964E+005	6	49396.80	7.47	0.0043	significant
<i>A-Mesopramgehalt</i>	37871.10	1	37871.10	5.72	0.0404	
<i>B-Vol. der organischen Phase</i>	2.140E+005	1	2.140E+005	32.35	0.0003	
<i>C-Tensidkonzentration</i>	17536.90	1	17536.90	2.65	0.1379	
<i>D-Tensidart</i>	26934.75	3	8978.25	1.36	0.3167	
Residual	59544.22	9	6616.02			
Cor Total	3.559E+005	15				

Abb. 3.58: Ergebnisse der ANOVA-Analyse für das Polymer Ethocel® 100 bezüglich der Partikelgröße

Die Ergebnisse der ANOVA-Analyse sind in der Abb. 3.58 gezeigt:

Das ganze Model wurde als signifikant (F-Wert=7,47; p-Wert<0,05) bewertet. Hierdurch kann angenommen werden, dass während der Versuche in den Gruppen unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten gewirkt haben. Es besteht nur eine 0,43 % ige Wahrscheinlichkeit, dass der F-Wert aufgrund eines Signalrauschens auftritt.

Die p-Werte von den Faktoren A und B lagen unterhalb des Grenzwertes von 0,0500. Die Faktoren A und B zeigten damit einen Einfluss auf die Partikelgröße, während die Faktoren C und D keinen signifikanten Einfluss aufwiesen.

Der p-Wert von Faktor B betrug 0,0003 und ist viel kleiner als 0,0500. Der Faktor B war somit signifikant. Dies bedeutet, dass die Stufenvariierung des Faktors B signifikant die Partikelgröße beeinflussen könnte. Der Faktor D (Tensidart) hatte im Gegensatz dazu einen großen p-Wert (0,3167). Dieser Faktor besaß demnach den geringsten Einfluss auf der Partikelgröße.

Die Rohdaten konnten mit der Funktion „Model Graphs“ analysiert und graphisch dargestellt werden.

Der Faktor A (Mesopramgehalt) sowie der Faktor B (Volumen der organischen Phase) wurden hierfür auf einer X1 sowie einer X2-Achse gegen die Partikelgröße auf der Y-Achse aufgetragen. Rechnerisch ergibt sich so beispielsweise bei Werten von 150 mg für den Faktor A sowie 250 μ l für den Faktor B bei einer AOT-Tensidkonzentration von 1,00 % eine Partikelgröße von 180 nm (s. Abb. 3.59). Tatsächliche hatten die kleinsten hergestellten Partikel jedoch eine Partikelgröße von 318 nm (s. Abb. 3.57).

Bei einem konstanten Wert für den Faktor A von 75 mg, zeigt sich beim Variieren des Faktors B von 100 μ l auf 250 μ l, dass die Partikelgröße von ca. 630 nm auf ca. 300 nm abnimmt. Fixiert man den Faktor B auf 250 μ l und variiert den Faktor A von 75 mg bis 150 mg, so nimmt die Partikelgröße von ca. 300 nm auf ca. 180 nm ab. Der Faktor B hat somit einen stärkeren Einfluss auf die Partikelgröße als der Faktor A.

Die Wirkungen aller Faktoren könnten auch graphisch dargestellt werden.

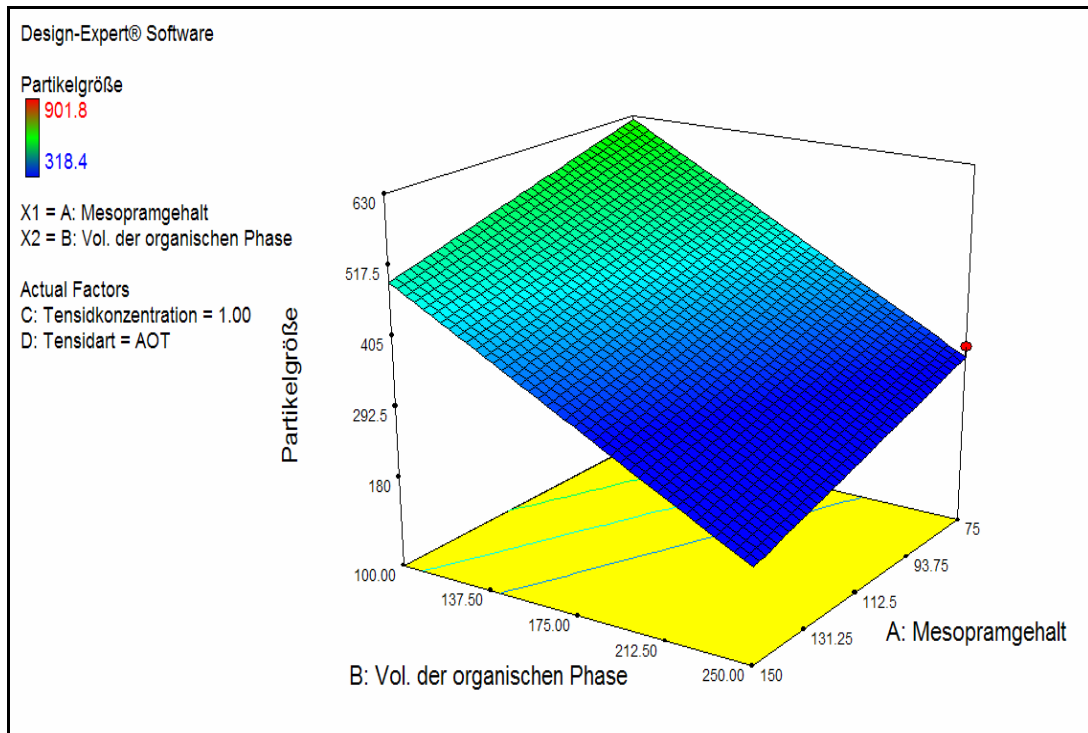


Abb. 3.59: Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren A und B auf die Partikelgröße

Die ANOVA Prüfung zeigte, dass der Faktor D (Tensidart), verglichen mit den anderen Faktoren, insgesamt den geringsten Einfluss auf die Partikelgröße zeigte (p -Wert=0,3167). Beim Variieren dieses Faktors würde sich die Partikelgröße nicht signifikant verändern.

Der charakterisierende Faktor D kann nicht kontinuierlich verändert werden. Eine dreidimensionale Darstellung ist aus diesem Grund nicht möglich.

Um den Einfluss dieses Faktors zu charakterisieren, bietet sich eine zweidimensionale Darstellung gegen einen weiteren Faktor an. Dies ist in der Abb. 3.60 exemplarisch mit Faktor C dargestellt.

In der Darstellung symbolisieren verschieden farbige Linien die 4 Tensidarten (Faktor D). Der Unterschied zwischen allen 4 Tensiden ist nicht signifikant, da sich die Vertrauensbereiche aller Tenside überlappten.

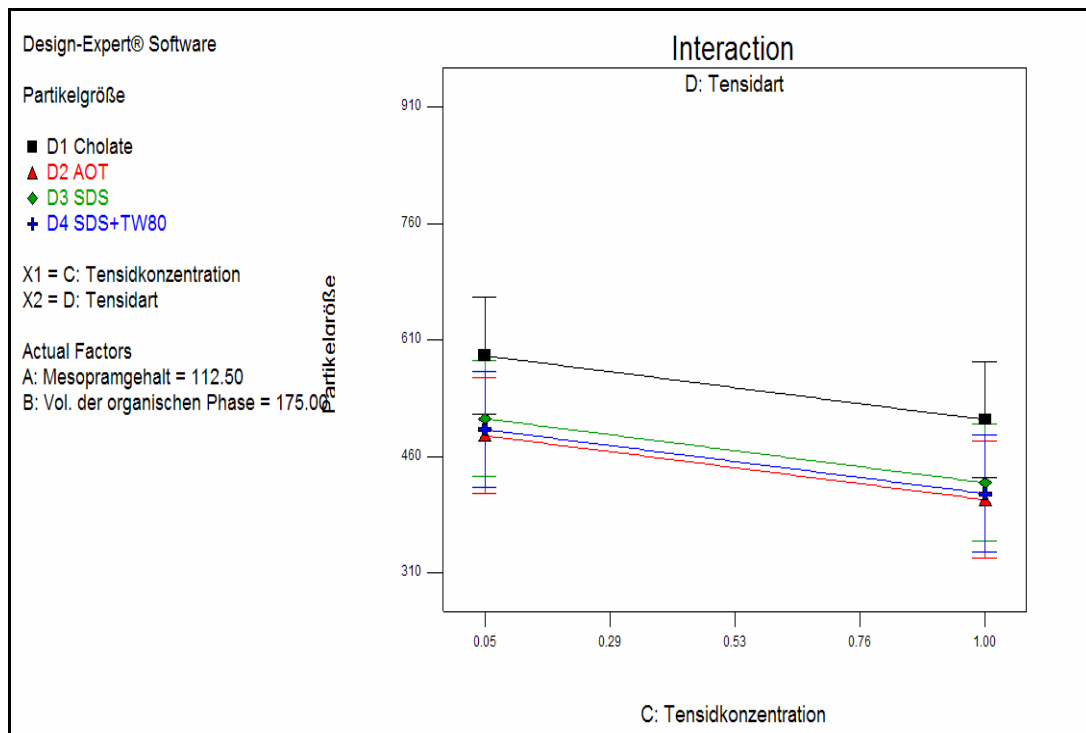


Abb. 3.60: Der Einfluss der Faktoren C und D auf die Partikelgröße

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Herstellung Mesopram beladener Ethocel® 100 Nanopartikel der Faktor B auf die Partikelgröße den größten Einfluss nahm. Die geringste Partikelgröße von ca. 180 nm ergab sich rechnerisch nach der folgenden Rezeptur: 250 µl organischer Phase (250 mg Polymer enthielt 150 mg Mesopram) werden 6 ml 1,0 % iger AOT Lösung zugesetzt.

☆ Verkapselungsrate

Analog dem Procedere der Partikelgrößenanalyse, wurden dieselben 4 Faktoren als Einflussgrößen gewählt.

Es wurde erneut eine Signifikanzanalyse mittels ANOVA durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 3.61 wiedergegeben. Auch für die Verkapselungsrate wurde die Signifikanz der Gruppeneinteilung erreicht, der F-Wert lag bei 3,88. Die Faktoren B und C zeigten damit einen signifikanten Einfluss auf die Verkapselungsrate, während die Faktoren A und D kein signifikanten Einfluss aufwiesen ($p\text{-Wert} > 0,05$).

Response	2	Verkapselungsrate				
ANOVA for Response Surface Linear Model						
Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1071.07	6	178.51	3.88	0.0341	significant
<i>A-Mesopramgehalt</i>	122.86	1	122.86	2.67	0.1367	
<i>B-Vol. der organischen Phase</i>	503.41	1	503.41	10.94	0.0091	
<i>C-Tensidkonzentration</i>	302.05	1	302.05	6.56	0.0306	
<i>D-Tensidart</i>	142.75	3	47.58	1.03	0.4230	
Residual	414.19	9	46.02			
Cor Total	1485.26	15				

Abb. 3.61: Ergebnisse der Signifikantprüfung bei ANOVA für die Verkapselungsrate von Ethocel® 100 Nanopartikeln

Über die Funktion „Model Graphics“ wurde der Einfluss der vier Herstellfaktoren auf die Verkapselungsrate grafisch dargestellt (s. Abb. 3.62). Insbesondere der Zusammenhang zwischen den Faktoren C und B und der Verkapselungsrate wird hier deutlich.

In diesem Fall wurde der Faktoren A auf einen Wert von 150 mg eingestellt sowie der Faktor D als AOT gekennzeichnet. Der Faktor B (Mesopramgehalt) sowie der Faktor C (Tensidkonzentration) werden auf einer X1 sowie einer X2-Achse gegen die Verkapselungsrate auf der Y-Achse aufgetragen.

Bei einem konstanten Wert für den Faktor C von 1,0 %, zeigt sich beim Variieren des Faktors B von 100 µl auf 250 µl, dass die Verkapselungsrate von ca. -2 % auf ca. 12 % zunimmt. Fixiert man den Faktor B auf 100 µl und variiert den Faktor C von 1,0 % auf 0,05 %, so nimmt die Verkapselungsrate von ca. -2 % auf ca. 9 % zu. Beide Faktoren zeigten also einen vergleichbaren Einfluss auf die Verkapselungsrate.

Aus der Grafik ist ersichtlich, dass sich rechnerisch auch negative Verkapselungsraten ergeben können, welche real nicht auftreten. Mit der Taguchi OA Analyse sind demnach nur Tendenzen erkennbar, auf deren Basis man eine Herstelloptimierung durchführen kann.

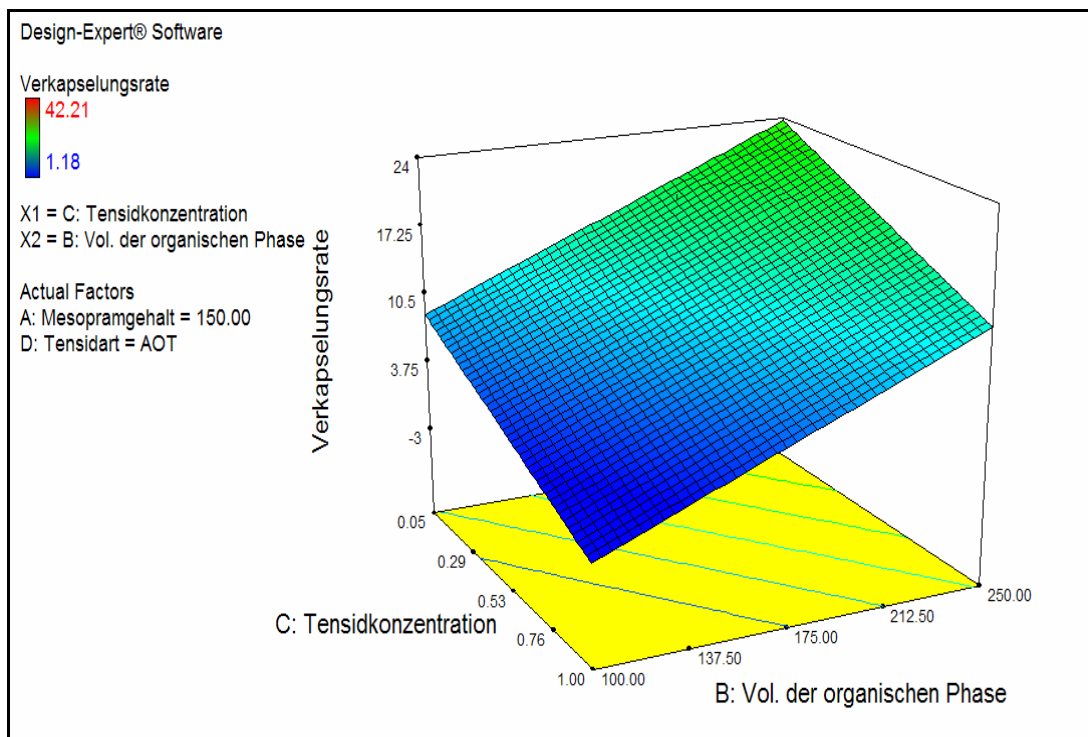


Abb. 3.62: Graphische Darstellung des Einflusses der Faktoren C und B auf die Verkapselungsrate

Rechnerisch ergibt sich eine größtmögliche Verkapselungsrate von ca. 24 % bei einem Wert von 250 μ l für den Faktor B sowie einem Wert von 0,05 % für den Faktor C.

3.6.4 Optimierung der Herstellungsbedingungen

Bis zum jetzigen Zeitpunkt erfolgte die Datenanalyse nur im Hinblick auf einen der beiden entscheidenden Parameter (Partikelgröße, Verkapselungsrate). Die optimale Rezeptur für einen der beiden Parameter könnte jedoch im Widerspruch zu der optimalen Rezeptur des anderen Parameters liegen. Aus diesem Grund erfolgte eine weitere Datenanalyse um einen optimalen Kompromiss für die zwei Parameter zu finden.

Für die numerische Optimierung wurden die minimale Partikelgröße und die maximale Verkapselungsrate in der Funktion „criteria“ eingegeben.

Über die Funktion „solution“ wurden die statistisch optimalen Rezepturen berechnet.

Number	Mesopram in Polymer	organic phase	surfactant conc.	surfactant types	Particle size	Encap. effi.	Desirability
1	150.00	250.00	0.05	Cholate	369.293	29.3102	0.791
2	150.00	249.98	0.06	Cholate	368.808	29.2402	0.790
3	149.48	250.00	0.05	Cholate	370.207	29.2577	0.790
4	148.99	250.00	0.05	Cholate	371.056	29.2099	0.788
5	148.47	250.00	0.05	Cholate	371.948	29.1591	0.787
6	149.99	250.00	0.11	Cholate	363.766	28.5812	0.785
7	150.00	247.53	0.05	Cholate	374.399	29.0627	0.784
8	147.12	250.00	0.05	Cholate	374.313	29.0244	0.783
9	150.00	250.00	0.17	Cholate	358.869	27.9423	0.779
10	143.89	250.00	0.06	Cholate	379.244	28.6149	0.774
11	150.00	244.03	0.05	Cholate	381.643	28.7112	0.773
12	150.00	250.00	0.26	Cholate	351.089	26.9212	0.770
13	149.03	242.87	0.05	Cholate	385.738	28.4984	0.767
14	150.00	250.00	0.05	SDS+TW80	274.3	24.96	0.761
15	150.00	250.00	0.06	SDS+TW80	273.851	24.9021	0.760
16	150.00	249.32	0.05	SDS+TW80	275.697	24.8921	0.760
17	150.00	250.00	0.35	Cholate	343.385	25.9099	0.760
18	150.00	248.68	0.05	SDS+TW80	277.034	24.8274	0.759
19	147.63	250.00	0.05	SDS+TW80	278.419	24.7253	0.758
20	150.00	247.34	0.05	SDS+TW80	279.791	24.6936	0.757
21	150.00	250.00	0.07	SDS+TW80	272.187	24.6837	0.757
22	150.00	246.71	0.05	SDS+TW80	281.104	24.63	0.756
23	150.00	250.00	0.08	SDS+TW80	271.673	24.6163	0.756
24	144.47	250.00	0.05	SDS+TW80	283.911	24.4125	0.752
25	144.13	249.95	0.05	SDS+TW80	284.607	24.3737	0.752
26	142.39	250.00	0.05	SDS+TW80	287.536	24.2061	0.749
27	150.00	250.00	0.48	Cholate	332.096	24.4284	0.744
28	<u>150.00</u>	<u>250.00</u>	<u>0.05</u>	<u>AOT</u>	<u>266.344</u>	<u>23.6902</u>	<u>0.741</u>

Abb. 3.63: Numerische Optimierung - Rezeptur der Mesopram beladenen Ethocel® 100 Nanopartikel

Die Reihenfolge der Kombinationen wurde nach den Optima gelistet (s. Abb. 3.63). So sind auf den Plätzen 1 bis 13 alle Kombinationen mit Natriumcholat. Allerdings sind mit Natriumcholat alle Partikel größer als 351 nm, damit wäre Natriumcholat nicht für die Herstellung geeignet.

Auf Platz 28 ist eine Partikelgröße von 266 nm sowie eine Verkapselungsrate von 23,7 % angegeben. Durch Erhöhung der Wichtung auf die Partikelgröße, zu Lasten der Verkapselungsrate unter „criteria“ lässt sich die Kombination von Platz 28 auf 12 platzieren. Die mit der Taguchi OA Analyse vorhergesagte Rezeptur auf dem Platz 28 stellt die Rezeptur dar, welche bei einer optimalen Verkapselungsrate der zu erreichenden Partikelgröße von

250 nm am nächsten lag. Aus diesem Grund wurde sie im Labor nachgearbeitet. Die dazugehörigen Messdaten sind im nächsten Kapitel aufgeführt.

3.6.5 Herstellung mit optimierter Rezeptur

Die von Design Expert optimierte Rezeptur kam in den bislang durchgeführten 16 Versuchen nicht vor.

Aus diesem Grund sollten Wiederholungsversuche zur Bestätigung der Hypothese durchgeführt werden.

Die Herstellung erfolgte wie im Kap. 2.2.5.2.3 beschrieben. Anwendung fand die optimierte Rezeptur:

250 µl organische Lösung (150 mg Mesopram und 250 mg Ethocel[®] 100 aufgelöst in 5 g Dichlormethan) in 6 ml 0,05 % iger AOT Lösung.

3.6.5.1 Partikelgröße und Verkapselungsrate

Nach der aus der Taguchi OA Analyse ermittelten optimalen Rezeptur wurden sechs Nanosuspensionen hergestellt und anschließend die Partikelgrößen sowie die Verkapselungsraten bestimmt.

Tabelle 3.17: Messdaten der mesoprabeladenen Ethocel® 100 Nanopartikel nach der Herstellung mit der ermittelten optimalen Rezeptur

Versuche	Partikelgröße	Verkapselungsrate	Beladung
1	245 nm	38,4 %	168 µg/mg
2	263 nm	21,8 %	89 µg/mg
3	264 nm	22,3 %	91 µg/mg
4	241 nm	21,3 %	87 µg/mg
5	278 nm	23,8 %	98 µg/mg
6	254 nm	21,1 %	86 µg/mg
MW	258 nm	22,1 %	90 µg/mg
SD	14 nm	1,1 %	4 µg/mg
VK (%)	5	5	4

Die Verkapselungsrate der Herstellung 1 lag bedeutend höher als bei den anderen Herstellungen und wurde als Ausreißer nach dem Grubbs Diskriminierungstest detektiert und im Anschluss vernachlässigt. Die mittlere Partikelgröße betrug 258 ± 14 nm; die mittlere Verkapselungsrate lag bei $22,1 \pm 1,1$ %, was einen Gehalt von 90 µg Mesopram pro mg Polymer entsprach.

Die Ergebnisse bestätigten die theoretisch erwarteten Partikelgrößen von 266 nm bei einer Verkapselungsrate von 23,7 % (s. Abb. 3.63).

Die mit Hilfe der optimierten Rezeptur hergestellten mesoprabeladenen Ethocel® 100 Nanopartikel wurden im REM mikroskopiert (s. Abb. 3.64).

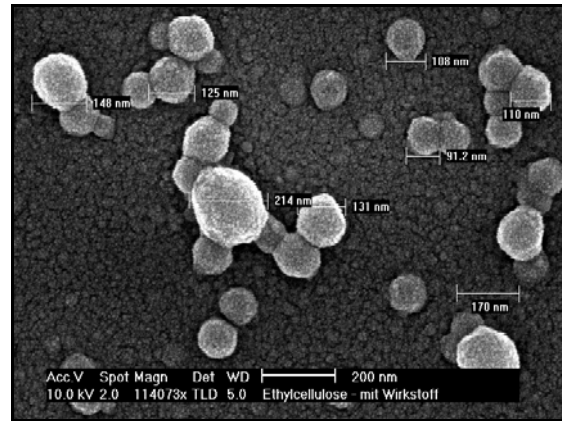
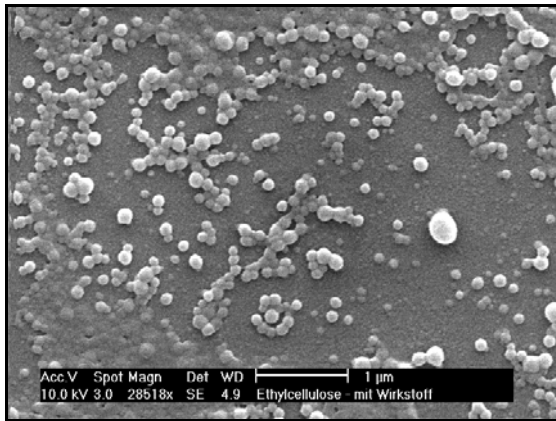


Abb. 3.64: REM Aufnahme der Mesopram beladenen Ethocel® 100 Nanopartikel

Die gewaschene Nanosuspension der mesoprambeladenen Ethocel® 100 Nanopartikel zeigte im REM-Bild runde intakte Nanopartikel mit einem Durchmesser um 200 nm. Neben den Nanopartikeln sind keine Mesopram-Kristalle zu finden. Damit entsprach der Gesamtgehalt an Mesopram aus der HPLC-Analytik der Beladungsrate.

3.6.5.2 Zetapotenzial

Von den mesoprambeladenen Ethocel® 100 Nanopartikeln wurde das Zetapotential bestimmt.

Tabelle 3.18: Zetapotenzial der Ethocel® 100 Nanopartikel, hergestellt mit der optimierten Rezeptur

Zetapotenzial (n=6)	
MW	-50,1 mV
SD	2,4 mV
VK (%)	5

Die Nanopartikel zeigten ein negatives Zetapotential, was auf die Verwendung des anionischen Tensids AOT zurückzuführen ist.

3.6.5.3 Stabilität

3.6.5.3.1 Stabilität der Partikel im SIF

Die Stabilität der Ethocel[®] 100 Nanopartikel wurde im SIF, entsprechend der im Kap. 2.2.1.5.1 beschriebenen Methode, geprüft.

Nachfolgend sind die Ergebnisse graphisch dargestellt (s. Abb. 3.65).

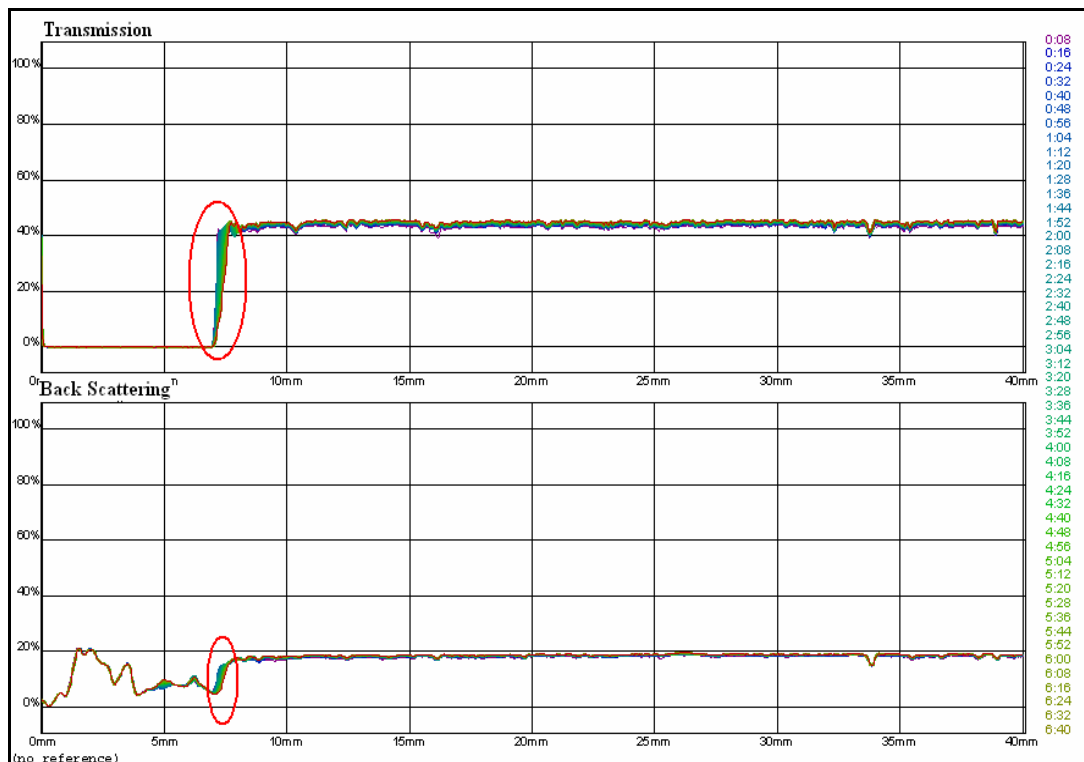


Abb. 3.65: Bestimmung der Stabilität der Ethocel[®] 100 Nanopartikel im SIF bei pH 6,8 mittels Turbiscan[®] M 1000

Bei diesem Test wurde die Lichttransmission und -rückstreuung über die ganze Länge der Messküvette beobachtet und bei einem Messintervall von 2 Minuten die Daten über einen Zeitraum von 7 Stunden aufgezeichnet. Die Transmissionen und Rückstreuungen der Suspension blieben über die Zeit unverändert, was für eine stabile Suspension ohne Agglomeratbildung spricht.

Bis zu einem Wert von 7 mm wurde der Probenfreie Boden der Messküvette vermessen. Kurz danach beginnt die Datenerhebung an der Nanosuspension (umkreist). Es ist zu sehen, dass auch nahe dem Boden der Messküvette nur eine minimale Veränderungen eintrat (s. Abb. 3.65).

Aus der Abb. 3.66 ist ersichtlich, dass sich die Ethocel[®] 100 PartikelgröÙeverteilung im Zuge der Stabilitätsversuche im SIF nicht verändert haben. Die PartikelgröÙe vor und nach den Versuchen lag bei ca. 250 nm.

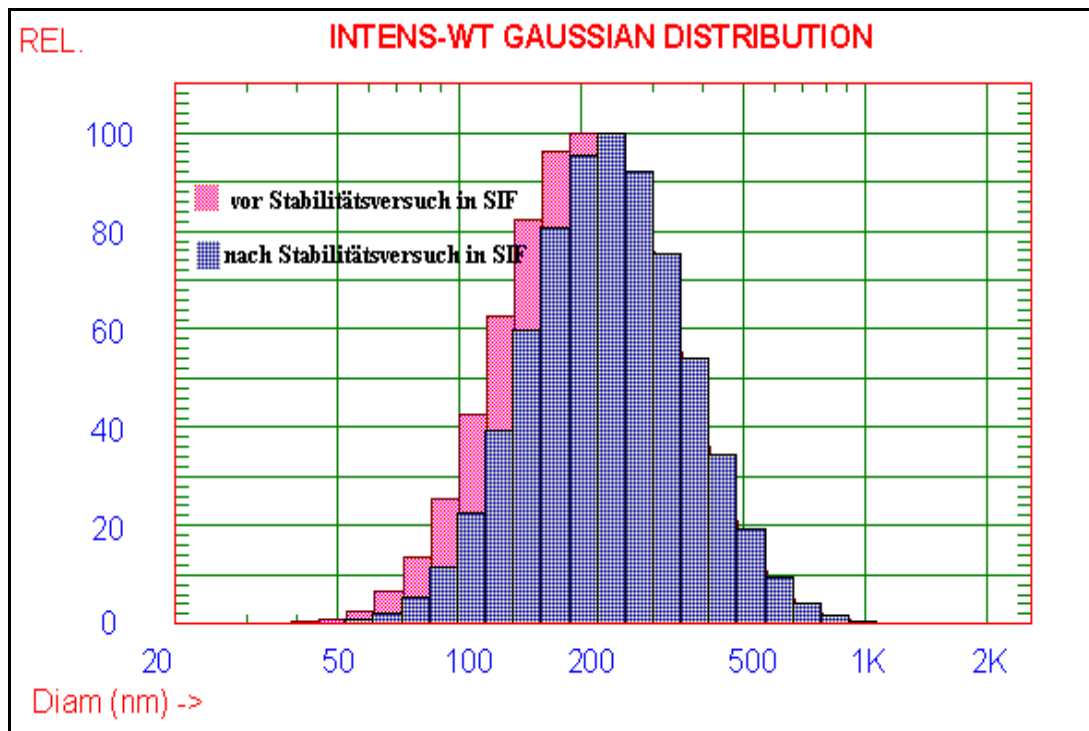


Abb. 3.66: Die Veränderung der PartikelgröÙeverteilung von Mesopram beladenen Ethocel[®] 100 Nanopartikel vor und nach dem Stabilitätsversuch im SIF bei pH 6,8

3.6.5.3.2 Stabilität der Partikel - Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung wurde als geeignetes und schonendes Trocknungsverfahren in dieser Arbeit eingesetzt. Es sollte zum einen gezeigt werden, ob sich die PartikelgröÙe nach der Trocknung verändert, zum anderen wurde untersucht, ob das Lyophilisat über einen definierten Lagerzeitraum eine PartikelgröÙenänderung aufweist.

Zur detaillierten Beschreibung des Trocknungsprozesses sei auf das [Kap. 2.2.1.4](#) verwiesen.

Das resultierende Lyophilisat war ein lockerer und poröser Feststoff, welcher sich in Wasser sehr gut auflösen lies. Nach dem Zusatz von 1,5 ml destillierenden Wassers und kurzem

Schütteln wurde die Partikelgröße in der entstandenen Suspension mit Hilfe von DLS ermittelt. Die Partikelgröße der Ethocel®100 Nanopartikel in der neu entstandenen Suspension betrug 251 nm. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Partikelgröße vor der Gefriertrocknung (252 nm) (s. Abb. 3.67).

Der Versuch hat gezeigt, dass die Gefriertrocknung ein geeignetes Verfahren zur Trocknung der Nanosuspension ist. Die Proben wurden mit Hilfe dieser Technik getrocknet und in einem geschlossenen Vial bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 6 Monaten gelagert.

Nach diesem Zeitraum wurde die Partikelgröße des auflösten des Lyophilisats erneut bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Partikelgröße über den Lagerzeitraum kaum zunahm (268 nm). Das Lyophilisat zeigte somit keine Tendenzen zur Partikelgrößenänderung.

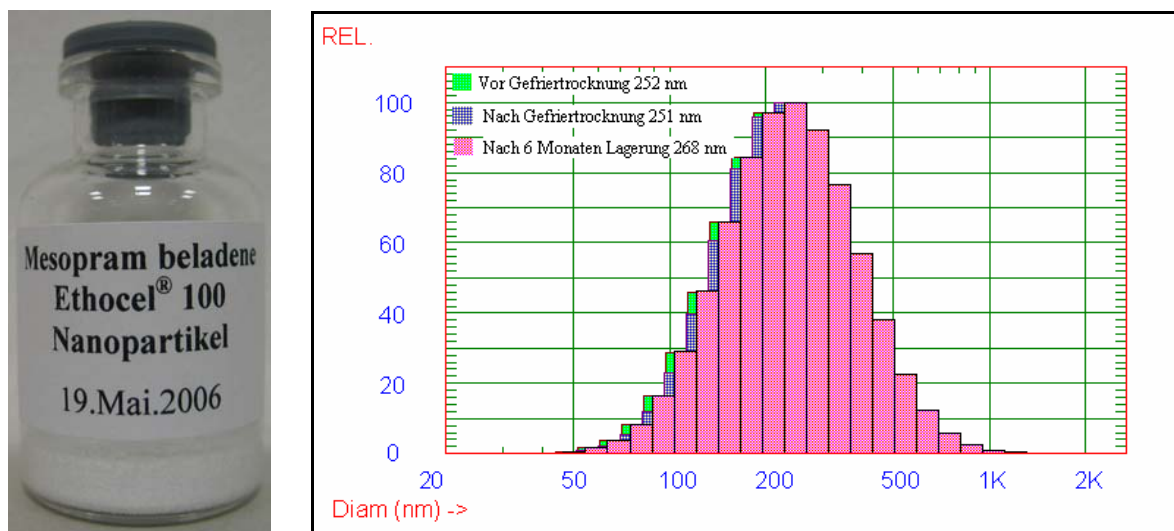


Abb. 3.67: Linke Seite: Photo eines Lyophilisats der Mesopram beladenen Ethocel® 100 Nanopartikel
 Rechte Seite: Verteilung der Partikelgrößen vor sowie nach der Lyophilisation (direkt bzw. nach sechsmonatiger Lagerung).

3.6.5.3.3 Stabilität des Wirkstoffs

Das Polymer, das Tensid bzw. die Herstellungsprozesse könnten eine Wirkstoffinstabilität verursacht haben. Aus diesem Grund wurde die Konzentration des Arzneistoffs nach der Partikelherstellung sowie nach sechsmonatiger Lagerung für das Polymer Ethocel analysiert.

Es konnten keine Abbauprodukte des Wirkstoffs detektiert werden (s. Abb. 3.68 und Abb. 3.69).

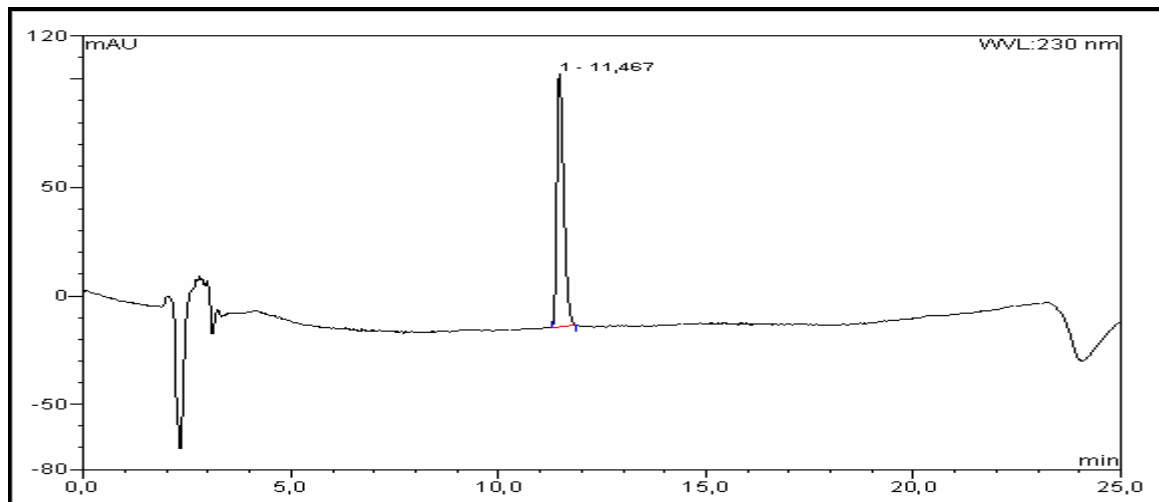


Abb. 3.68: Qualitative Bestimmung der Abbauprodukte von Mesopram mittels HPLC nach der Herstellung der Ethocel® 100 Nanopartikel

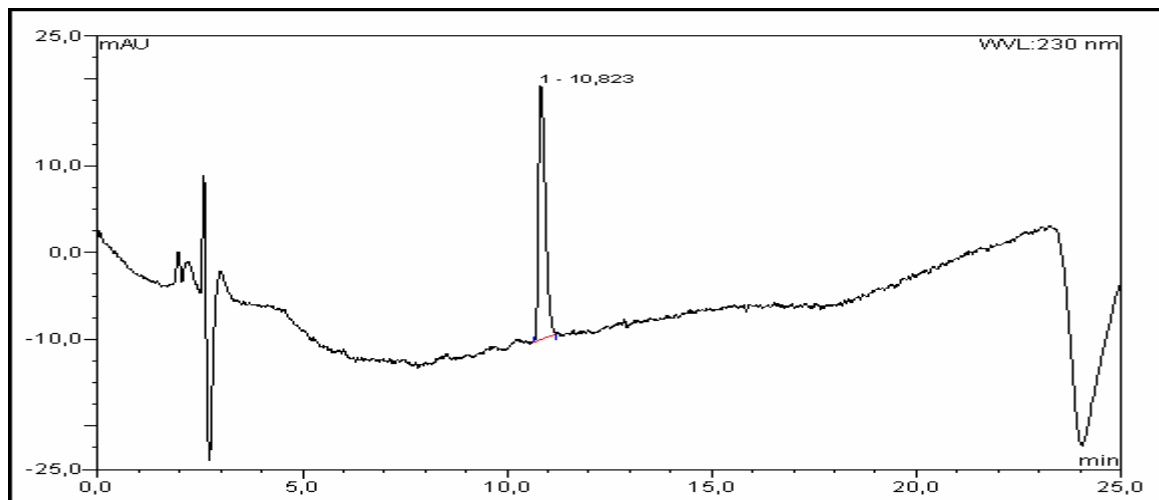


Abb. 3.69: Qualitative Bestimmung der Abbauprodukte von Mesopram in lyophilisierten Ethocel® 100 Nanopartikel mittels HPLC nach sechsmonatiger Lagerung

3.6.6 Wirkstofffreisetzung

Die Mesopramfreisetzung aus Ethocel® 100 Nanopartikeln wurde im SIF bei 37 °C (s. Kap. 2.2.1.6) durchgeführt und ist in der Abbildung 3.70 grafisch dargestellt.

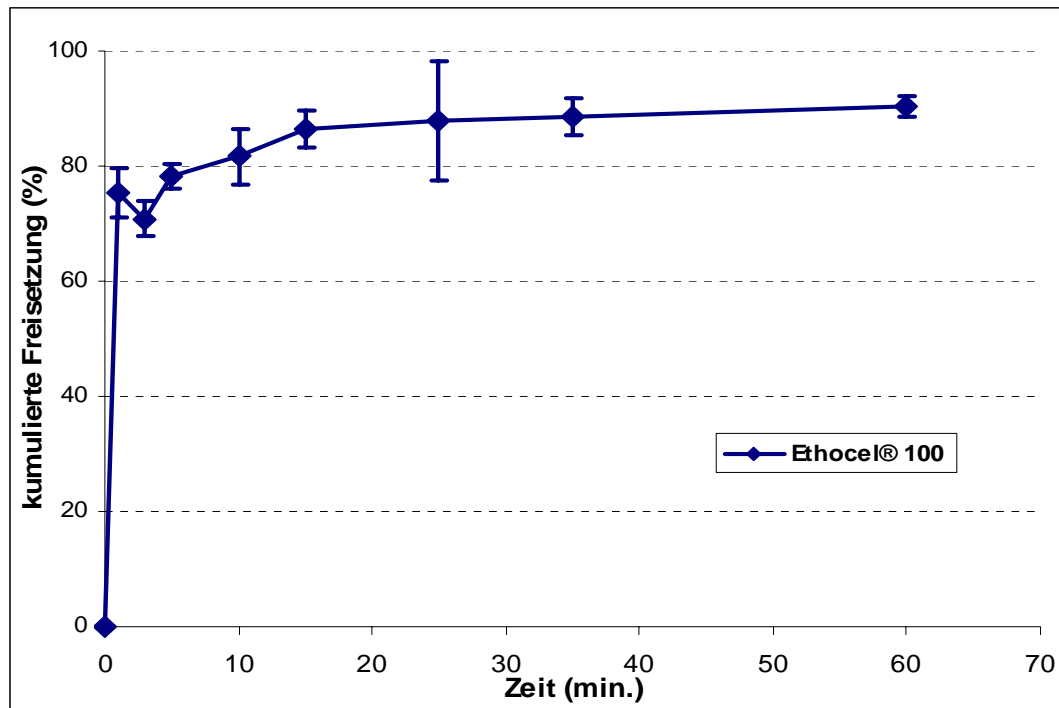


Abb. 3.70: Die kumulierte Mesopramfreisetzung aus Ethocel® 100 Nanopartikel (MW \pm SD; n=3)

Es ist ein „initial burst effect“ erkennbar, durch welchen fast 70 % des verkapselten Mesoprams in den ersten 3 min freigesetzt wurden.

Die verbleibenden 30 % wurden kontinuierlich über 16 h freigesetzt. Dieses Resultat könnte auf eine bevorzugte Lokalisation des Wirkstoffs in der Oberfläche der Nanopartikel hinweisen. Diese Wirkstoffmoleküle werden initial schnell freigesetzt und können einen „initial burst effect“ verursachen (Sampath, Garvin et al., 1992).

Weitere mögliche Ursachen für den „initial burst effect“ sind in der großen Oberfläche der Nanopartikel sowie der hohen Löslichkeit des Mesoprams im wässrigen zu suchen.

Der „initial burst effect“ ist theoretisch sehr ungünstig für den Wirkstofftransport in das entzündete Darmgewebe, da ein Großteil des Wirkstoffs vor dem Erreichen des Wirkorts freigesetzt wurde. Eine Übertragbarkeit des „initial burst effect“ von *in vitro* Tests auf *in vivo*

ist jedoch nicht zulässig, da die Bedingungen im Magen-Darmtrakt nicht wirklich übereinstimmen. (Lamprecht, Ubrich et al., 2001b).

Abbildung 3.71 vergleicht die Mesopramfreisetzungen aus CAB 70.000- und Ethocel® 100 Nanopartikeln: Der verkapselte Wirkstoff wird unabhängig von der Polymerart sehr schnell freigesetzt.

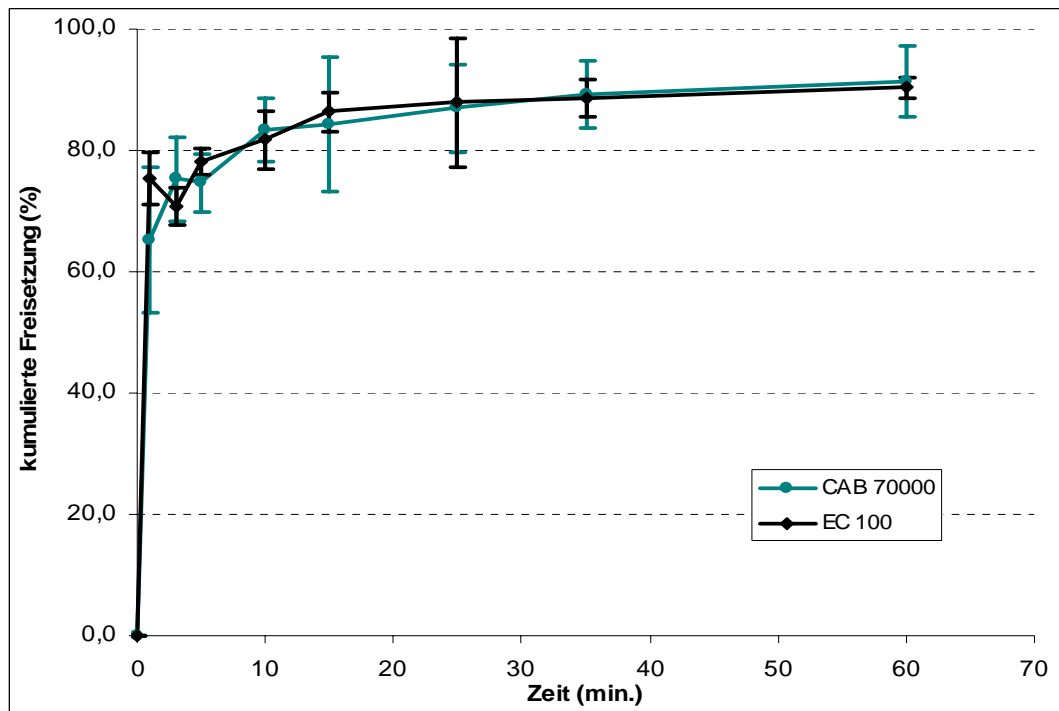


Abb. 3.71: Vergleich der Mesopramfreisetzung aus CAB 70.000 und Ethocel® 100 Nanopartikeln (MW \pm SD; n=3)

3.6.7 Zusammenfassung

Durch Anwendung der Taguchi OA Methode mit 16 Versuchen (4 Herstellfaktoren mit je 4 Stufen) wurde der Herstellprozess von mesoprambeladenen Ethocel® 100 Nanopartikeln optimiert. Hieraus resultierten Nanopartikel mit einer Partikelgröße von 258 nm sowie einer Verkapselungsrate von 22 %. 1 mg Ethocel® 100 dieser Nanopartikel enthielt ca. 90 μ g Mesopram.

Die Bestimmung des Restlösemittelgehaltes an Dichlormethan mittels GC ergab einen Wert von 10 ppm im Lyophilisat. Nach der ICH Richtlinie (ICH Expert Working Group, 2005) sind für orale Arzneiformen bis zu 600 ppm erlaubt.

Die Ethocel[®] 100 Nanopartikel waren im SIF sowie als Lyophilisat über 6 Monate bei Raumtemperatur stabil.

Die Freisetzungskinetik von Mesopram zeigte einen „initial burst effect“. Vermutlich ist der Effekt auf die bevorzugte Lokalisation des Wirkstoffs an die Oberfläche der Nanopartikel zurückzuführen. Weitere mögliche Ursachen für diesen Effekt können in der großen Oberfläche der Nanopartikel und der relativ hohen Löslichkeit des Mesoprams im wässrigen gesucht werden.

Der „initial burst effect“ ist nicht auf *in vivo* Bedingungen übertragbar.

3.7 Maßstabsvergrößerung mit Hilfe eines Homogenisators

Der Herstellprozess für die mesopramhaltigen Nanopartikel der Polymere CAB 70.000 und Ethocel[®] 100 wurde von einem 6 ml Laboransatz auf ein 50 ml Ansatz vergrößert. Hierzu wurde ein Homogenisator eingesetzt.

Die so erhaltenen Nanosuspensionen waren optisch unauffällig. Es waren keine Agglomerate zu sehen (s. Abb. 3.72).

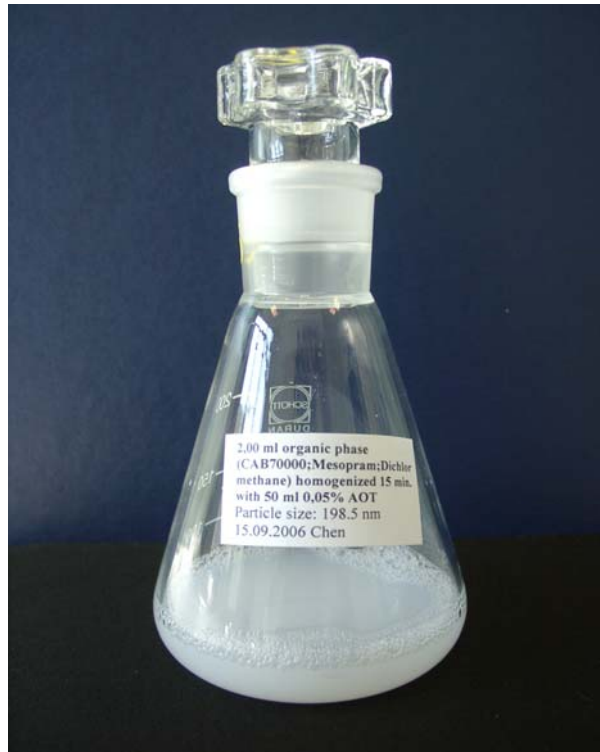


Abb. 3.72: Mesopram beladene CAB 70.000 Nanopartikel hergestellt mit der optimierten Rezeptur nach der Maßstabsvergrößerung

3.7.1 Partikelgröße

In der Abbildung 3.73 wurde die mittlere Partikelgröße von CAB 70.000 und Ethocel[®] 100 Nanopartikeln aus dem Labormaßstab mit den maßstabsvergrößerten Partikeln verglichen.

Die Partikelgrößen der CAB 70.000 Nanopartikel zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Nanosuspensionen hergestellt im Labormaßstab sowie nach der Maßstabsvergrößerung (von 204 ± 22 nm zu 194 ± 17 nm; $n=4$).

Die Nanopartikel des Polymers Ethocel[®] 100 waren nach der Maßstabsvergrößerung signifikant kleiner (von 258 ± 14 nm zu 163 ± 4 nm; $n=4$).

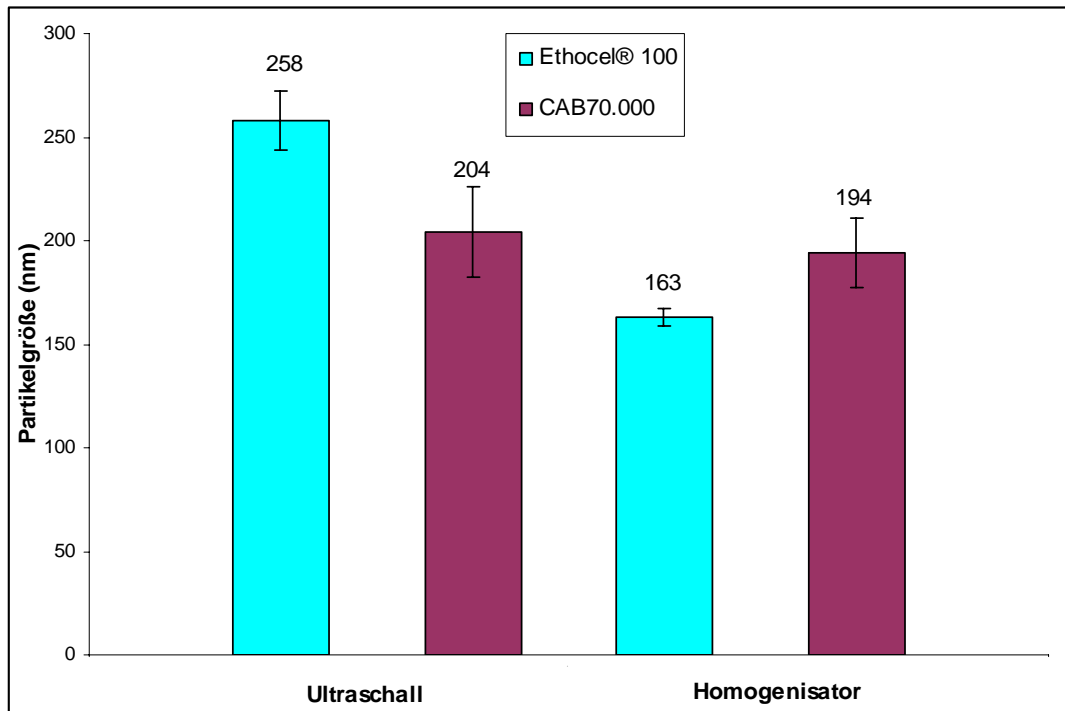


Abb. 3.73: Gegenüberstellung der Partikelgrößen von mesoprambeladenen Ethocel® 100 und CAB 70.000 Nanopartikeln hergestellt mittels Ultraschall sowie im Homogenisator (MW ± SD; n=4)

3.7.2 Verkapselungsrate

Die Verkapselungsraten wurden bestimmt und grafisch in der Abb. 3.74 dargestellt.

Die Maßstabsvergrößerung der CAB 70.000 und Ethocel® 100 Nanopartikeln wirkte sich auf die Verkapselungsrate aus: Bei den mesoprambeladenen CAB 70.000 Nanopartikeln betrug die Verkapselungsrate nur noch 19,5 %. Dieser Wert lag ca. 50 % unter dem Wert der Partikel, welche im Labormaßstab hergestellt wurden.

Die Verkapselungsrate der mesopramhaltigen EC Nanopartikeln sank nach der Maßstabsvergrößerung von 22,1 % auf 4,5 %.

Insgesamt erzielte man bei den CAB 70.000 Nanopartikeln eine höhere Verkapselungsrate des Mesoprams, als mit Hilfe des Polymers Ethocel® 100.

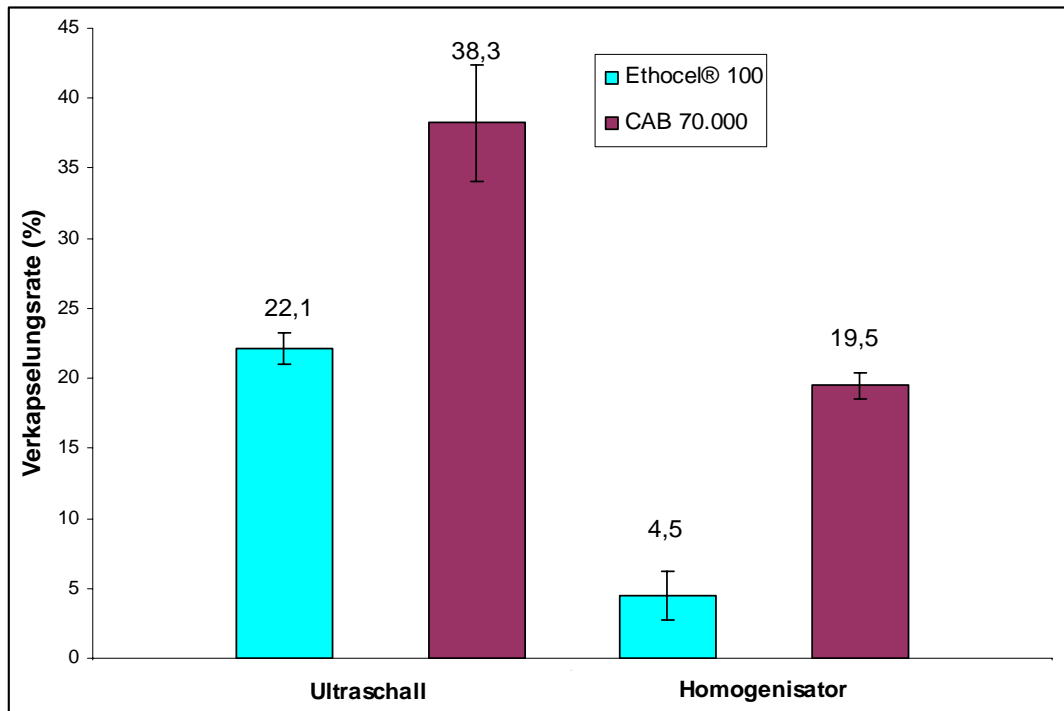


Abb. 3.74: Gegenüberstellung der Verkapselungsrate von Mesopram beladenen Ethocel® 100 und CAB 70.000 Nanopartikeln, hergestellt mit Hilfe von Ultraschall sowie im Homogenisator (MW ± SD; n=4)

Bei der Partikelherstellung mit Hilfe von Ultraschall wird Wärme erzeugt, die in einem kleinen Ansatzvolumen das Lösungsmittel schnell verdampfen lässt. Hierdurch entstehen aus den Nanotröpfchen spontan Nanopartikel. Eine Diffusion der eingeschlossenen Mesoprammoleküle wird dadurch erschwert. Im Gegensatz hierzu wurde die Lösung im Homogenisator gekühlt (s. Kap. 2.2.6.). Das Lösungsmittel wurde erst nach dem Homogenisationsprozess entfernt. Die Mesoprammoleküle konnten aus diesem Grund während des gesamten Homogenisationsprozesses ungehindert in die wässrige Phase diffundieren, was die geringere Verkapselungsrate verursacht haben könnte.

3.7.3 Zetapotenzial

Die Zetapotenziale wurden bestimmt und in der Abbildung 3.75 graphisch dargestellt. Die gemessenen Zetapotenziale der CAB 70.000 und Ethocel® 100 Nanopartikel lagen unabhängig von dem Herstellungsverfahren zwischen -43 mV und -50 mV.

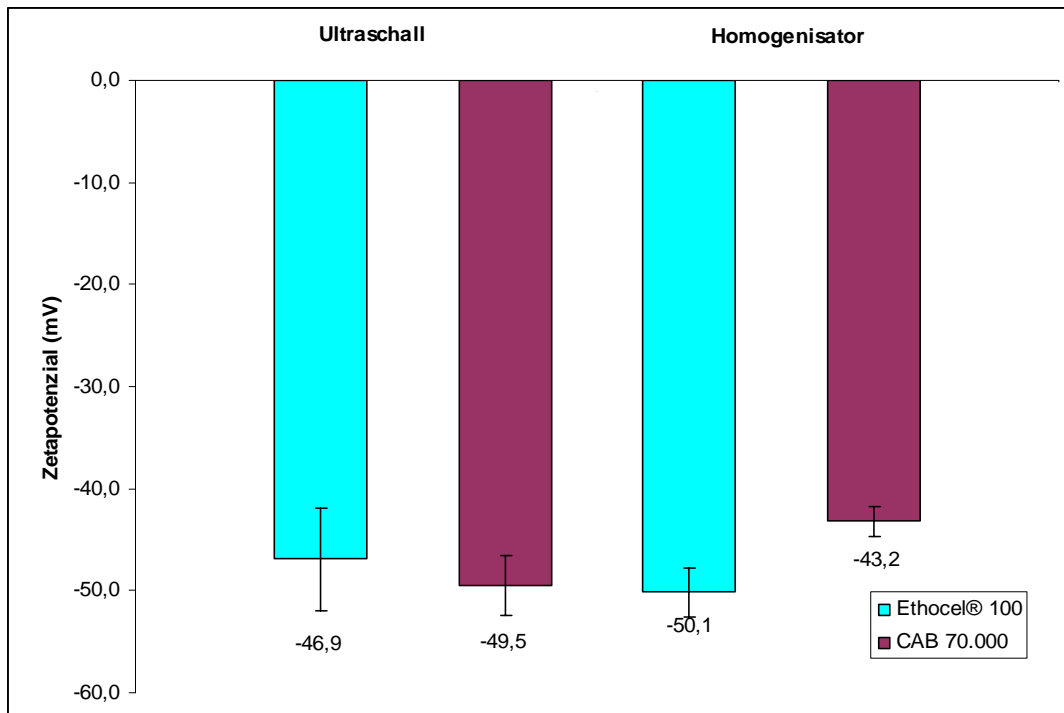


Abb. 3.75: Gegenüberstellung der Zetapotenziale mesoprambeladener Ethocel® 100 und CAB 70.000 Nanopartikel, hergestellt mit Hilfe von Ultraschall sowie im Homogenisator (MW \pm SD; n=4)

3.7.4 Stabilität

Die Stabilität der mesoprambeladenen CAB 70.000 und Ethocel® 100 Nanopartikel im SIF bei einem pH-Wert von 6,8 wurde wie im [Kap. 2.2.1.5.2.](#) beschrieben überprüft. Es ergaben sich bei diesem Test keine signifikanten Veränderungen der Partikel.

Beide Herstellungsverfahren erwiesen sich also als geeignet Nanopartikel mit einer ausreichenden Stabilität im SIF zu produzieren.

3.7.5 Zusammenfassung

Für die nach der Taguchi OA Analyse optimierten Rezeptur der Polymere CAB 70.000 und Ethocel® 100 wurde eine Maßstabvergrößerung von 6 ml auf 50 ml durchgeführt. Die so erhaltenen Nanosuspensionen wurden im Anschluss charakterisiert.

Für beide Polymere war es möglich eine Maßstabsvergrößerung durchzuführen. Die Partikelgröße, das Zetapotential sowie die Stabilität der Nanosuspensionen blieben auch nach der Maßstabvergrößerung erhalten. Einzig die Verkapselungsrate nahm in beiden Fällen ab. Die Verkapselungsrate der mesopräbeladenen CAB 70.000 Nanopartikel sank um ca. 50 %, die der mesopräbeladenen Ethocel[®] 100 Nanopartikel sogar um ca. 75 %.

4 Zusammenfassung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung oral applizierbarer mesoprambeladener Nanopartikel zur Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED).

Ein solcher Ansatz ist in dieser Arbeit untersucht worden. Ziel war es, für den Arzneistoff Mesopram eine Formulierung sowie eine Herstellungsmethode zu finden, welche zu einem nanopartikelärem System mit einer kleinen Partikelgröße sowie einer hohen Verkapselungsrate bzw. Beladungsrate führt.

Im Zuge dessen wurden verschiedene Polymere bzw. Herstellungsmethoden auf ihre Eignung hin überprüft. Die Polymere Ethylzellulose sowie Zelluloseacetylbutyrat erwiesen sich hierbei als optimale Arzneistoffträger. Mit Hilfe der Emulsion-Verdampfungsmethode (EVM) wurden Nanopartikel hergestellt, welche durch eine optimale Partikelgröße sowie einer hohen Verkapselungsrate gekennzeichnet waren.

Da viele Faktoren die Partikelgröße sowie die Verkapselungsrate bei der Herstellung beeinflussen können, wurde die Rezeptur mittels einer statistischen Methode (Taguchi OA) optimiert. Anwendung fand hierbei die Software „Design Expert“.

Die Berechnung der Software ergab zum einen, dass das Volumen der zugesetzten organischen Phase einen signifikanten Einfluss (ANOVA-Test) auf die Größe der CAB 70.000 sowie der Ethocel[®] 100 Nanopartikel besitzt.

Zum anderen zeigte sich, dass die Tensidkonzentration den größten Einfluss auf die Verkapselungsrate der mit Hilfe des Polymers CAB 70.000 hergestellten Nanopartikel hat. Das Volumen der zugesetzten organischen Phase hat im Falle des Polymers Ethocel[®] 100 den größten Einfluss auf die Verkapselungsrate. Nach der Optimierung mittels Taguchi OA wurde die ideale Rezeptur für die kleinste Partikelgröße sowie die größte Verkapselungsrate statistisch berechnet und vorhergesagt.

Mit Hilfe der optimierten Rezeptur konnte für die mesoprambeladenen CAB 70.000 Nanopartikel eine Partikelgröße von ca. 200 nm sowie eine Verkapselungsrate von ca. 40 % realisiert werden. Verglichen mit dem Polymer CAB 70.000 besaßen die mit Hilfe des Polymers Ethocel[®] 100 hergestellten Nanopartikel einen großen Partikeldurchmesser (ca. 260 nm) sowie eine niedrigere Verkapselungsrate (ca. 22 %). Die CAB- sowie die EC-Nanopartikel wurden mittels REM betrachtet. Keine Mesopram-Kristalle wurden außerhalb der Nanopartikel gefunden.

Ein „initial burst effect“ wurde beim Freisetzungstest festgestellt. Dieses Resultat könnte auf eine bevorzugte Lokalisation des Wirkstoffs an die Oberfläche der Nanopartikel hinweisen. Diese Wirkstoffmoleküle werden initial schnell freigesetzt und können einen „initial burst effect“ verursachen.

Weitere mögliche Ursachen für den „initial burst effect“ sind in der großen Oberfläche der Nanopartikel sowie der hohen Löslichkeit des Mesoprams im Wässrigen zu suchen.

Der „initial burst effect“ ist theoretisch sehr ungünstig für den Wirkstofftransport in das entzündete Darmgewebe, da ein Großteil des Wirkstoffs vor dem Erreichen des Wirkorts freigesetzt wurde. Eine Übertragbarkeit des „initial burst effect“ von *in vitro* Tests auf *in vivo* ist jedoch nicht zulässig, da die Bedingungen im Magen-Darmtrakt nicht wirklich übereinstimmen.

Der Unterschied der Freisetzung zwischen den CAB und EC Nanopartikeln war nicht signifikant.

Bezüglich der Stabilitätsversuche ergab sich, dass die Nanopartikel der Polymere EC und CAB im SIF bei pH 6,8, nach der Gefriertrocknung sowie nach einer Lagerung der gefriergetrockneten Proben über einen Zeitraum von 6 Monaten bei RT stabil blieben.

Die Konzentration des Restlösungsmittels Dichlormethan im Lyophilisat betrug ca. 10 ppm und war somit niedriger als der geforderte Grenzwert der entsprechenden ICH Richtlinie.

Als eine innovative Arzneiform können die Mesopram beladenen CAB und EC Nanopartikel für weitere klinische Untersuchungen sowie für die Entwicklung eines Fertigarzneimittels eingesetzt werden.

5 Abstract (English)

The goal of this dissertation was to develop a method to prepare and to characterise mesopram loaded polymer nanoparticles for treatment of inflammatory bowel disease by oral application.

This approach has been investigated in this work. The aim was to find a formulation type and a preparation method for compound mesopram, which can be used to set up a mesopram loaded nanoparticle system with small particle size and high encapsulation efficiency.

Many different polymers and related preparation methods have been tested and it has been proven that ethyl cellulose (EC), cellulose acetyl butyrate (CAB) and the applied emulsion solvent evaporation method were appropriate for the preparation.

Since many factors could influence the particle size and the encapsulation rate, the recipes of the solutions have been optimized with the aid of a statistic method “Taguchi orthogonal array” integrated in software “Design Expert”.

The data evaluation by software has clearly indicated that the volume of the applied organic phase had a significant impact on the CAB 70,000 und Ethocel[®] 100 particle size. On the other hand the surfactant concentration had the greatest influence on the encapsulation efficiency for CAB 70,000 Nanoparticles. In the case of Ethocel[®] 100, the volume of applied organic phase was still the most influential factor for encapsulation efficiency. After optimization by Taguchi OA, the preparation recipe for the smallest particle size and the greatest encapsulation efficiency has been statistically predicted.

With the optimized preparation recipe the particle size of CAB 70,000 can be controlled to about 200 nm and the encapsulation efficiency has been improved to about 40 %. Compared to CAB 70,000 the Ethocel[®] 100 Nanoparticles prepared with optimized recipe had a bigger particle size (about 260 nm) and lower encapsulation efficiency (about 22 %). The intact nanoparticles have been imaged by scanning electron microscope and no mesopram crystals have been detected outside the particles.

An initial burst effect has been observed by releasing tests. This can be attributed to the selected localisation of the Mesopram molecules on the particle surfaces. The compound molecules located on the surface will be initially released, which lead to such a effect.

The small particle size and the high solubility of mesopram in water can also be the reasons. The initial burst effect is theoretically very unfavourable for the drug transportation to the inflamed intestinal tissues, because the majority of the active compound would have been liberated before they reached the target location. Such an instinct burst effect could be much lower *in vivo* tests than *in vitro* tests, because such a release condition would not occur in gastrointestinal tract.

Using different polymers (CAB 70,000 and Ethocel[®] 100) had no significant impact on the release properties.

The CAB 70,000 and Ethocel[®] 100 nanoparticles were stable in SIF (pH 6.8). They showed also enough stability after freeze-drying and following six months storage at ambient temperature. The concentration of residual solvents (dichlorometane) in the lyophilisat (about 10 ppm) was much lower than the guideline of the ICH (600 ppm allowed).

The obtained mesopram loaded Nanoparticles, as an innovative drug delivery system, can be used for further medical research and for the development of end formulation (capsule or tablet).

6 Anhang

6.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
ANOVA	analysis of variance
AOT	Aerosol OT; Sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate
CAB	Celluloseacetatbutyrat
CED	chronische entzündlichen Darmerkrankungen
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CU	Colitis ulcerosa
d.h.	das heißt
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
EC	Ethylcellulose
etc.	und so weiter
et al	und andere
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gaschromatographie
GIT	Gastrointestinaltrakt
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICH	international conference of Harmonisation of technical requirement for registration of pharmaceuticals for human use
Inj.	Injektion
IR-Licht	Infrarot-Licht
LD	Letale Dosis
MC	Mobus Crohn
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
PCL	Polycaprolacton

PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglykol
Prog.	Programm
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RP	Reversed-Phase
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SIF	simulated intestinal fluid
Taguchi OA	Taguchi Orthogonal Array
TNF- α	Tumornekrosisfaktor-alpha
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient
z.B.	zum Beispiel

6.2 Materialien in der Übersicht

Material	Hersteller	Charge-Nr:	Land
n-Hexan	Merck	K32860850404	D
Dichlormethan	Merck	K31516379250	D
Ethanol	Merck	K34852071529	D
Paraffinöl dickflüssig	Riedel-de Haën	43200	D
Span 80	Fluka	1097347 52705234	Spanien
Eudragit [®] S100	Röhm Pharma	B030905070	D
Polycaprolacton	Aldrich	#02101LI	Japan
Chitopharm L [®]	Cognis	UPBH2172PR	D
Eudragit [®] RS100	Röhm Pharma	E040308038	D
Triton [®] X-100	Merck	31255303239	D
SDS	Sigma-Aldrich	074K0041	China
CAB 30000	Aldrich	#03603LC	USA
CAB 70000	ABCR GmbH	17-3-13-BS	D
Natriumcholat	Calbiochem	B59576	D

Ethocel [®] 100	Dow Chemical Comp.	06013T01	USA
Ethocel [®] 45	Dow Chemical Comp.	LA06013T01	USA
Budesonid	Sigma	036K1424	Spanien

7 Literaturverzeichnis

Agnihotri,S.A., Mallikarjuna,N.N., Aminabhavi,T.M., 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28.

Azin,M., Moravej,R., Zareh,D., 2006. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology*, In Press, Corrected Proof.

Bauer,K.H., Frömming,K., Führer,C., 1999. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Berne,B.J., Pecora,R., 2000. *Dynamic Light Scattering*. John Wiley & Sons. Inc., New York.

Bodmeier,R., Chen,H., Tyle,P., Jarosz,P., 1991. Spontaneous formation of drug-containing acrylic nanoparticles. *J Microencapsul.*, 8, 161-170.

Bothe,D., Stemich,C., Warnecke,H.J., 2006. Fluid mixing in a T-shaped micro-mixer. *Chemical Engineering Science*, 61, 2950-2958.

Boumpas,D.T., Chrousos,G.P., Wilder,R.L., Cupps,T.R., Balow,J.E., 1993. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann. Intern. Med.*, 119, 1198-1208.

Brasseur,F., Couvreur,P., Kante,B., Deckers-Passau,L., Roland,M., Deckers,C., Speisers,P., 1980. Actinomycin D adsorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles: Increased efficiency against an experimental tumor. *European Journal of Cancer (1965)*, 16, 1441-1445.

Brigger,I., Dubernet,C., Couvreur,P., 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 631-651.

Brown,W., 1996. *Light Scattering: Principles and Development*. Oxford University Press.

Burrell,M.M.ed., 1993. *Enzymes of Molecular Biology*. Humana Press, New York.

Cottone,M., Mocciaro,F., Modesto,I., 2006. Infliximab and ulcerative colitis. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 6, 401-408.

Danese,S., Sans,M., Fiocchi,C., 2004. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Reviews*, 3, 394-400.

Dhanaraju,M.D., Gopinath,D., Ahmed,M.R., Jayakumar,R., Vamsadhara,C., 2006. Characterization of polymeric poly(epsilon-caprolactone) injectable implant delivery system for the controlled delivery of contraceptive steroids. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 76, 63-72.

Ebinger,M., Leidl,R., Thomas,S., Von Tirpitz,C., Reinshagen,M., Adler,G., Konig,H.H., 2004. Cost of outpatient care in patients with inflammatory bowel disease in a German University Hospital. *J Gastroenterol. Hepatol.*, 19, 192-199.

Echlin,P., Joy,D.C., Fiori,C.E., Goldstein,J., 1986. *Advanced Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Ehrfeld Mikrotechnik BTS. Datenblatt des Produkts. 2005. Ehrfeld Mikrotechnik BTS.

Ref Type: Data File

Fessi,H., Puisieux,F., Devissaguet,J.P., Ammoury,N., Benita,S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55, R1-R4.

Fischer,R.A., 1925. *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver&Boyd, London.

Fleig,W.E., 1994. *Inflammatory Bowel Diseases: new developments and standards*. Kluwer Academic Publishers.

Friend,D.R., 2005. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 247-265.

Govender,T., Stolnik,S., Garnett,M.C., Illum,L., Davis,S.S., 1999. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control Release*, 57, 171-185.

Gradishar,W.J., 2006. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 7, 1041-1053.

Green,M.R., Manikhas,G.M., Orlov,S., Afanasyev,B., Makhson,A.M., Bhar,P., Hawkins,M.J., 2006. Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.*, 17, 1263-1268.

Hardy,J.G., Davis,S.S., Khosla,R., Robertson,C.S., 1988. Gastrointestinal transit of small tablets in patients with ulcerative colitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 48, 79-82.

Hawthorne,A.B., Hawkey,C.J., 1989. Immunosuppressive drugs in inflammatory bowel disease. A review of their mechanisms of efficacy and place in therapy. *Drugs*, 38, 267-288.

He,P., Davis,S.S., Illum,L., 1998. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 166, 75-88.

Hejazi,R., Amiji,M., 2003. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 89, 151-165.

Hennen,W.J., 1996. Chitosan. Woodland Publishing Inc..

Hessel,V., Lowe,H., Schonfeld,F., 2005. Micromixers--a review on passive and active mixing principles. *Chemical Engineering Science*, 60, 2479-2501.

Hugot,J.P., 2004. Inflammatory bowel disease: a complex group of genetic disorders. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 451-462.

ICH Expert Working Group. Impurities: Guideline For Residual Solvents Q3C (R3). [4]. 2005. ICH.

Ref Type: Data File

Illum,L., Jones,P.D.E., Kreuter,J., Baldwin,R.W., Davis,S.S., 1983. Adsorption of monoclonal antibodies to polyhexylcyanoacrylate nanoparticles and subsequent immunospecific binding to tumour cells in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 17, 65-76.

Jani,P., Halbert,G.W., Langridge,J., Florence,A.T., 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm. Pharmacol.*, 42, 821-826.

Kirsner,J.B., 1991. Inflammatory bowel disease part II: Clinical and therapeutic aspects. *Disease-a-Month*, 37, 669-746.

Klotz,U., Schwab,M., 2005. Topical delivery of therapeutic agents in the treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 267-279.

Kreuter,J., 1994. *Colloidal Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, New York.

Kreuter,J., 1991. Nanoparticle-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 16, 169-176.

Lamprecht,A., 2003. Multiparticulate systems in the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy*, 2, 137-144.

Lamprecht,A., Schaefer,U., Lehr,C.M., 2001. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharm. Res.*, 18, 788-793.

Lamprecht,A., Ubrich,N., Yamamoto,H., Schafer,U., Takeuchi,H., Maincent,P., Kawashima,Y., Lehr,C.M., 2001a. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299, 775-781.

Lamprecht,A., Ubrich,N., Yamamoto,H., Schafer,U., Takeuchi,H., Lehr,C.M., Maincent,P., Kawashima,Y., 2001b. Design of rolipram-loaded nanoparticles: comparison of two preparation methods. *Journal of Controlled Release*, 71, 297-306.

Landis,W.J., Jacquet,R., Hillyer,J., Lowder,E., Yanke,A., Siperko,L., Asamura,S., Kusuhara,H., Enjo,M., Chubinskaya,S., Potter,K., Isogai,N., 2005. Design and assessment of a tissue-engineered model of human phalanges and a small joint. *Orthod. Craniofac. Res.*, 8, 303-312.

Langer,K., Balthasar,S., Vogel,V., Dinauer,N., von Briesen,H., Schubert,D., 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257, 169-180.

Leong,Y.S., Candau,F., 1982. Inverse microemulsion polymerization. *the Journal of Physical Chemistry*, 86, 2269-2271.

Leopold,C.S., 1999. Coated dosage forms for colon-specific drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2, 197-204.

Li,W.J., Tuli,R., Okafor,C., Derfoul,A., Danielson,K.G., Hall,D.J., Tuan,R.S., 2005. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 26, 599-609.

Little,K., Parkhouse,J., 1962. TISSUE REACTIONS TO POLYMERS. *The Lancet*, 280, 857-861.

Lorenzo-Lamosa,M.L., Remunan-Lopez,C., Vila-Jato,J.L., Alonso,M.J., 1998. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 52, 109-118.

Lüllmann,H., Mohr,K., Hein,L., 2006. *Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme, Stuttgart.

MacNeil, M. E., Rashid, A, and Stevens, H. N. E. Dispensing device. [WO 9009168]. 1990. World Patent.

Ref Type: Patent

Maitra,A., 1984. Determination of size parameters of water–Aerosol OT–oil reverse micelles from their nuclear magnetic resonance data. *the Journal of Physical Chemistry*, 88, 5122-5125.

Margolin,M.L., Krumholz,M.P., Fochios,S.E., Korelitz,B.I., 1988. Clinical trials in ulcerative colitis: II. Historical review. *Am. J Gastroenterol.*, 83, 227-243.

Maxwell-Armstrong,C., Cohen,R., 2003. *Inflammatory Bowel Disease*. *Surgery (Oxford)*, 21, 34-38.

Meissner,Y., Pellequer,Y., Lamprecht,A., 2006. Nanoparticles in inflammatory bowel disease: Particle targeting versus pH-sensitive delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 316, 138-143.

Muraoka,M., Hu,Z., Shimokawa,T., Sekino,S.i., Kurogoshi,R., Kuboi,Y., Yoshikawa,Y., Takada,K., 1998a. Evaluation of intestinal pressure-controlled colon delivery capsule

containing caffeine as a model drug in human volunteers. *Journal of Controlled Release*, 52, 119-129.

Muraoka,M., Hu,Z., Shimokawa,T., Sekino,S.i., Kurogoshi,R., Kuboi,Y., Yoshikawa,Y., Takada,K., 1998b. Evaluation of intestinal pressure-controlled colon delivery capsule containing caffeine as a model drug in human volunteers. *Journal of Controlled Release*, 52, 119-129.

Nagarjun,P.A., Rao,R.S., Rajesham,S., Rao,L.V., 2005. Optimization of lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 using Taguchi methodology. *J Microbiol.*, 43, 38-43.

Narisawa,S., Nagata,M., Danyoshi,C., Yoshino,H., Murata,K., Hirakawa,Y., Noda,K., 1994. An organic acid-induced sigmoidal release system for oral controlled-release preparations. *Pharm. Res.*, 11, 111-116.

Neugebauer,D.C., Thurm,U., 1984. Chemical dissection of stereovilli from fish inner ear reveals differences from intestinal microvilli. *J. Neurocytol.*, 13, 797-808.

Niwa,K., Takaya,T., Morimoto,T., Takada,K., 1995. Preparation and evaluation of a time-controlled release capsule made of ethylcellulose for colon delivery of drugs. *J Drug Target*, 3, 83-89.

Perugini,P., Simeoni,S., Scalia,S., Genta,I., Modena,T., Conti,B., Pavanetto,F., 2002. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.*, 246, 37-45.

Pignatello,R., Bucolo,C., Spedalieri,G., Maltese,A., Puglisi,G., 2002. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials*, 23, 3247-3255.

Pinto-Alphandary,H., Balland,O., Laurent,M., Andreumont,A., Puisieux,F., Couvreur,P., 1994. Intracellular visualization of ampicillin-loaded nanoparticles in peritoneal macrophages infected in vitro with *Salmonella typhimurium*. *Pharm. Res.*, 11, 38-46.

Podolsky,D.K., 2002. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J Med.*, 347, 417-429.

Ponchel,G., Montisci,M.J., Dembri,A., Durrer,C., Duchene,D., 1997. Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 44, 25-31.

Ricciardolo,F.L.M., 2005. The treatment of asthma in children: Inhaled corticosteroids. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*.

Rodriguez,M., Vila-Jato,J.L., Torres,D., 1998. Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region. *J. Control Release*, 55, 67-77.

Roy,M.A., 1997. INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. *Surgical Clinics of North America*, 77, 1419-1431.

Roy,R.K., 2001. Design of experiments using the Taguchi approach. Wiley-Interscience.

Rubinstein,A., 1995. Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 12, 101-149.

Rutgeerts,P., Van,A.G., Vermeire,S., 2004. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 126, 1593-1610.

Sakuma,S., Sudo,R., Suzuki,N., Kikuchi,H., Akashi,M., Hayashi,M., 1999. Mucoadhesion of polystyrene nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains in the gastrointestinal tract. *International Journal of Pharmaceutics*, 177, 161-172.

Sampath,S.S., Garvin,K., Robinson,D.H., 1992. Preparation and characterization of biodegradable poly(-lactic acid) gentamicin delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 78, 165-174.

Sands,B.E., 2000. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 118, S68-S82.

Siepmann,F., Le Brun,V., Siepmann,J., 2006. Drugs acting as plasticizers in polymeric systems: A quantitative treatment. *Journal of Controlled Release*, 115, 298-306.

SIGMA. Production information. 1999. SIGMA[®].

Ref Type: Data File

Song,M., Li,N., Sun,S., Tiedt,L.R., Liebenberg,W., de Villiers,M.M., 2005. Effect of Viscosity and Concentration of Wall Former, Emulsifier and Pore-Inducer on the Properties of Amoxicillin Microcapsules Prepared by Emulsion Solvent Evaporation. *Il Farmaco*, 60, 261-267.

Stanaland,B.E., 2004. Once-daily budesonide aqueous nasal spray for allergic rhinitis: A review. *Clinical Therapeutics*, 26, 473-492.

Tabata,Y., Inoue,Y., Ikada,Y., 1996. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. *Vaccine*, 14, 1677-1685.

Takaya,T., Niwa,K., Muraoka,M., Ogita,I., Nagai,N., Yano,R., Kimura,G., Yoshikawa,Y., Yoshikawa,H., Takada,K., 1998. Importance of dissolution process on systemic availability of drugs delivered by colon delivery system. *J Control Release*, 50, 111-122.

Takaya,T., Sawada,K., Suzuki,H., Funaoka,A., Matsuda,K., Takada,K., 1997. Application of a colon delivery capsule to 5-aminosalicylic acid and evaluation of the pharmacokinetic profile after oral administration to beagle dogs. *J Drug Target*, 4, 271-276.

Tiller,G.E., Mueller,T.J., Dockter,M.E., Struve,W.G., 1984. Hydrogenation of triton X-100 eliminates its fluorescence and ultraviolet light absorption while preserving its detergent properties. *Anal. Biochem.*, 141, 262-266.

Tippett,L.C.H., 1934. Application of Statistical Methods to the Control of Quality in Industrial Production. *Journal of Manchester Statistical Society*.

Tokumitsu,H., Ichikawa,H., Fukumori,Y., 1999. Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. *Pharm. Res.*, 16, 1830-1835.

USP. United States Pharmacopeia and National Formulary. 26. 2003. Rockville,MD/USA, United States Pharmacopeial Convention Inc.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Uzunkaya,G., Bergisadi,N., 2003. In vitro drug liberation and kinetics of sustained release indomethacin suppository. *Il Farmaco*, 58, 509-512.

Vaithiyalingam,S., Nutan,M., Reddy,I., Khan,M., 2002. Preparation and characterization of a customized cellulose acetate butyrate dispersion for controlled drug delivery. *J Pharm. Sci.*, 91, 1512-1522.

Varshosaz,J., Jaffarian,D.A., Golafshan,S., 2006. Colon-specific delivery of mesalazine chitosan microspheres. *J Microencapsul.*, 23, 329-339.

Voigt,R., Fahr,A., 2000. *Pharmazeutische Technologie*. 9. Auflage Ed., Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.

Wartlick, H. Albumin-Nanopartikel als Trägersysteme für Antisense-Oligonukleotide zur Anwendung in der Brustkrebstherapie. 5-10. 2004. Frankfurt am Main, Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe - Universität.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Washington,C., 1992. *Particle Size Analysis in Pharmaceutics and Other Industries*. Ellis Horwood, London.

Wilson,C.G., Washington,N., 1989. *Biological Barriers to Drug Absorption*. Ellis Horwood Ltd, Chichester UK.

Xiang,Y., Naro,F., Zoudilova,M., Jin,S.L., Conti,M., Kobilka,B., 2005. Phosphodiesterase 4D is required for beta2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 909-914.

Yang,F., Liu,S., Xu,J., Lan,Q., Wei,F., Sun,D., 2006. Pickering emulsions stabilized solely by layered double hydroxides particles: The effect of salt on emulsion formation and stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 302, 159-169.

Yang,F., Niu,Q., Lan,Q., Sun,D., 2007. Effect of dispersion pH on the formation and stability of Pickering emulsions stabilized by layered double hydroxides particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 306, 285-295.

Zhao,J., Liu,C.S., Yuan,Y., Tao,X.Y., Shan,X.Q., Sheng,Y., Wu,F., 2007. Preparation of hemoglobin-loaded nano-sized particles with porous structure as oxygen carriers. *Biomaterials*, 28, 1414-1422.

Zhu,J., Mix,E., Winblad,B., 2001. The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS. Drug Rev.*, 7, 387-398.

Zonderman,J., Ronald,S.MD.V., 2000. *Understanding Crohn Disease and Ulcerative Colitis*. University Press of Mississippi.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Chen
Vorname: Senyu
Geburtstag: 14.08.1972
Geburtsort: Yunnan / V.R. China

Schulbildung

09/1979 – 07/1985 Grundsule der Südwestwaldhochschule/ V.R. China
09/1985 – 07/1988 Mittelschule der Südwestwaldhochschule/ V.R. China
09/1988 – 07/1991 Kunming Nr. 1 Oberschule/ V.R. China

Hochschulausbildung

09/1991 – 07/1995 Studium der Biopharmazie an „China Pharmazeutische Universität“, Bachelor Degree, Nanking/ V.R. China

10/1998 – 10/2002 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

17/03/2000 Der Erste Abschnitt der Pharmazeutischen Staatsexamen
21/11/2002 Der Zweite Abschnitt der Pharmazeutischen Staatsexamen
29/01/2004 Der Dritte Abschnitt der Pharmazeutischen Staatsexamen

Promotion

Seit Mail 2004 Anfertigung der vorliegenden Arbeit bei der Schering AG Berlin in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung/Drug Delivery System
Betreuung: PD Dr. habil. Hartwig Steckel, Christian-Albrechts-Universität Kiel; PD Dr. Carsten Olbrich, Bayer Schering Pharma AG / Pharmazeutische Entwicklung

Praktika

12/2002 – 06/2003

Apotheke am Rathaus, Heikendorf / Kiel

07/2003 – 12/2003

Schering AG in der Abteilung GMP / Prozesskontrolle /
Dokumentation (Charlottenburg)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Chef Herrn Spohn von der Schering AG in Berlin / Charlottenburg. Seine unermüdliche Unterstützung und Empfehlung ermöglichte die Erstellung dieser Arbeit in der Abteilung pharmazeutische Entwicklung. Die erste Tür für meinen Berufsweg in der pharmazeutischen Industrie wurde von ihm geöffnet.

Ein weiteres Dankschön geht an meine Betreuer Dr. Rößling, Dr. Olbrich und meinen Doktorvater PD Dr. Steckel für die Aufnahme in den Arbeitskreis der pharmazeutischen Technologie der Uni Kiel und in die Abteilung pharmazeutische Entwicklung der Bayer Schering Pharma AG. Einen herzlichen Dank Ihrem Wirken für ideale Forschungsbedingungen und angenehmes Arbeitsklima.

Von ganzem Herzen möchte ich mich auch bei meinen Kollegen Dennis Krickau und Thomas Trill bedanken. Ohne ihre unendliche Geduld und mehrfaches Korrekturlesen wäre diese Arbeit bestimmt sehr „chinesisch“ gewesen.

Mein Dank gilt auch den Arbeitskreisen der pharmazeutischen Technologie in Kiel und der Abteilung pharmazeutischer Entwicklung in Berlin. Dem Team danke ich dafür, dass Ihr mich all die Jahre ertragt habt und immer eine herzliche Unterstützung geboten habt. Alle deutschen Wörter in der Arbeit habe ich irgendwann von Euch gelernt.

Diese Arbeit sei meiner ganzen Familie besonders meinem verstorbenen Vater gewidmet.