

Wässrige Nanosuspensionen zur pulmonalen Applikation



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT
ZU KIEL

VORGELEGT VON
HOLGER SCHERLIEß

KIEL 2008

Referent: Professor Dr. Hartwig Steckel
Korreferent: Professor Dr. Karin Schwarz
Tag der Disputation: 10. Juli 2008
zum Druck genehmigt: 10. Juli 2008

Prof. Dr. L. Kipp
(Dekan)

Meinen Eltern gewidmet

*Willst du dich am Ganzen erquicken,
so musst du das Ganze im Kleinsten erblicken.*

Johann Wolfgang von Goethe

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

Tagungsbeiträge:

- Scherliess, H. und Steckel, H., Development of a Budesonide nanosuspension for pulmonary delivery, Proceedings DDL 18 (2007)
- Scherliess, H. und Steckel, H., Production of nanosuspensions in a stirred media mill: Determination of milling parameters, Proceedings 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona (2008)

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

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	3
2	Theoretischer Teil	2
2.1	Anatomie der Lunge	2
2.2	Pharmazeutische Aerosole	5
2.2.1	Inhalation und Partikelabscheidung	6
2.2.2	Geräte zur Aerosolerzeugung	9
2.3	Pilzinfektionen der Lunge	10
2.3.1	Therapie von Pilzinfektionen	15
2.4	Suspensionen	18
2.4.1	Nanopartikel	20
2.4.2	Nanosuspensionen	21
2.4.3	Möglichkeiten zur Erzeugung von Nanosuspensionen	25
2.5	Mühlen zur Erzeugung von Nanosuspensionen	27
2.5.1	Rührwerkskugelmühle	27
2.5.2	Umbau der Rührwerkskugelmühle	30
2.5.3	Arten der Partikelzerkleinerung	32
2.5.4	Mahlkörper	35
3	Methoden	39
3.1	Teilchengrößenbestimmung	39
3.1.1	Laserlichtstreuung	39
3.1.2	Laserlichtbeugung	50
3.1.3	Mikroskopische Verfahren	50
3.2	Zetapotential	52
3.3	Kapillarviskosimeter	52
3.4	Präparation der Suspensionen	53
4	Verwendete Materialien	55
4.1	Reinstwasser	55

4.2	Stabilisatoren	55
4.2.1	Polysorbat 80.....	56
4.2.2	Poloxamer 188.....	56
4.2.3	Solutol® HS 15	57
4.3	Itraconazol.....	58
5	Praktischer Teil	61
5.1	Evaluierung der Mühlenparameter.....	61
5.2	Herstellung von Nanosuspensionen mit Itraconazol	67
5.3	Entwicklung einer Nanosuspensionsformulierung.....	75
5.4	Rezepturfindung für Nanosuspensionsformulierungen	76
5.4.1	Auswahl eines geeigneten Stabilisators	77
5.4.2	Test unterschiedlicher Stabilisatoren	78
5.5	Ermittlung einer geeigneten Stabilisatorkonzentration	84
5.6	Mahlung in Kombination verschiedener Stabilisatoren	92
5.7	Einstellung verschiedener pH-Werte.....	100
5.7.1	Mahlung im Puffermedium.....	102
5.8	Einfluss der Mahlkörper auf das Mahlergebnis	106
5.9	Einfluss der Mahlkörpergröße auf das Mahlergebnis.....	111
5.10	Charakterisierung der Mahlkörper.....	116
5.10.1	Zirkonoxid-Mahlkörper	116
5.10.2	Polycarbonat-Mahlkörper.....	118
5.10.3	Polystyrol-Mahlkörper	121
5.11	Quantifizierung des Mahlabriebs.....	123
5.12	Untersuchungen zur Langzeitstabilität	128
5.13	Autoklavierbarkeit der Nanosuspensionen.....	133
5.14	Keimzahlreduktion.....	138
5.14.1	Ermittlung der temperaturabhängigen Viskosität	144
5.15	Vernebelbarkeit der hergestellten Formulierungen	147
5.16	Testung der Suspensionen im Tierversuch.....	152

5.16.1	Durchführung der Versuche.....	152
5.16.2	Inhalationsprozedur	152
5.16.3	Entnahme der Lungen und Pathohistologie.....	154
5.16.4	Tolerabilität nach einmaliger Anwendung	155
5.16.5	Tolerabilität nach mehrmaliger Anwendung.....	157
5.16.6	Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchungen.....	159
6	Zusammenfassung.....	160
7	Abstract (english version).....	164
8	Anhang.....	167
8.1	Geräte	167
8.2	verwendete Software	169
8.3	Tierversuche	169
8.3.1	verwendete Materialien:.....	169
8.3.2	verwendete Tiere	169
8.4	Verwendete Arznei- und Hilfsstoffe	170
9	Literaturverzeichnis	171

1 Einleitung

Um einen Arzneistoff sicher und reproduzierbar zur Wirkung zu bringen, muss er in ausreichendem Ausmaß und Schnelligkeit absorbiert werden können. Dazu ist es notwendig, dass er zunächst in Lösung gebracht wird, was aufgrund der Schwerlöslichkeit vieler neuer Arzneistoffe eine große Herausforderung für die Galenik darstellt. Klassischerweise werden für die Formulierung schwerlöslicher Substanzen lösungsvermittelnde Zusätze verwendet oder es wird die Partikelgröße verringert, um zumindest die Lösungsgeschwindigkeit zu verbessern. Ein moderner Formulierungsansatz ist die Herstellung von Nanosuspensionen, in denen der Wirkstoff nanopartikulär verteilt vorliegt. Das hat den Vorteil, dass zum einen durch die große Partikeloberfläche eine hohe Lösungsgeschwindigkeit erreicht wird, zum anderen wird so auch eine Erhöhung der Sättigungslöslichkeit der Substanz erreicht. Darüber hinaus haben Nanosuspensionen den Vorteil, dass sie nicht sedimentieren und daher eine gute physikalische Stabilität aufweisen. Nanosuspensionen werden im nicht-pharmazeutischen Bereich bereits vielfältig eingesetzt, die Bandbreite der Produkte reicht von Pflanzenschutzmitteln über Nahrungsmittelzusatzstoffe bis hin zu Lacken und Farben, Pigmenten und Reinigungsmitteln. Nanosuspensionen können sowohl peroral als auch pulmonal appliziert werden und erscheinen erfolgversprechend für den Einsatz im Rahmen klinischer Prüfungen und Dosisfindungsstudien. Betrachtet man die pulmonale Gabe, so haben Nanosuspensionen den Vorteil, dass viele kleine Wirkstoffpartikel mit den Tröpfchen einer fein vernebelten Nanosuspension in der Lunge verteilt werden und dort gut absorbiert werden können. Dabei haften Nanopartikel auf der Schleimhautoberfläche und können somit nicht so einfach von

pulmonalen Reinigungsmechanismen ausgetragen werden. Dadurch können lokal höhere Arzneistoffkonzentrationen erreicht werden, als sie durch die systemische Gabe möglich sind, ohne Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen. Dieser Aspekt ist beispielsweise für die Therapie von Lungenmykosen interessant, wo bisher aufgrund der Schwerlöslichkeit der eingesetzten Arzneistoffe nur systemisch applizierbare Therapeutika zur Verfügung stehen. Dort spielt vor allem Amphotericin B eine Rolle, das jedoch eine hohe Nebenwirkungsrate aufweist. Die verbesserten lipidbasierten Formulierungen reduzieren die Rate zwar, verursachen aber immense Kosten. Ein weiterer Wirkstoff, der peroral als Kapsel gegeben werden kann, ist das ebenfalls schwerlösliche Triazol Itraconazol.

Zur Herstellung von Nanosuspensionen gibt es eine Reihe von Verfahren, dazu gehören aufbauende Verfahren wie die Fällung des Wirkstoffes aus einer Lösung als auch abbauende Verfahren wie die Zerkleinerung mithilfe eines Hochdruckhomogenisators oder das Vermahlen in Rührwerkskugelmöhlen.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Nanosuspensionsformulierung zur pulmonalen Applikation des schwer löslichen antimykotischen Wirkstoffs Itraconazol zu entwickeln. Aufgrund des Applikationsortes soll sie auf wässriger Basis formuliert werden und darf nur Komponenten enthalten, die zur Anwendung in der Lunge geeignet sind. Zur Herstellung der Nanosuspension soll eine Rührwerkskugelmühle zum Einsatz kommen, mit der der Wirkstoff im Dispersionsmedium bis in den Nanometerbereich zerkleinert werden kann. Dabei sollen die entscheidenden Parameter zur Zerkleinerung in der Rührwerkskugelmühle ermittelt werden und der Abrieb des Herstellungsprozesses minimiert werden. Da es bei der starken Vergrößerung der Oberfläche zu einer Agglomeration der Partikel kommt, muss ein besonderes Augenmerk auf die Stabilisierung der Formulierung gelegt werden. Die fertige Formulierung soll über eine enge Partikelgrößenverteilung und eine ausreichende Lagerstabilität verfügen. Die entwickelte Nanosuspension soll über eine ausreichende Vernebelbarkeit verfügen und in vivo gut toleriert werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Anatomie der Lunge

Die Lunge ist aus zwei Lungenflügeln aufgebaut, die durch tiefe Einschnitte in Lungenlappen unterteilt sind. Der rechte Lungenflügel ist dabei aus drei, der linke aus zwei Lungenlappen aufgebaut (Abbildung 2.1-1). Da das Herz auf der linken Körperseite sitzt, ist der linke Lungenflügel aus Platzgründen im Brustkorb zudem etwas kleiner als der rechte.

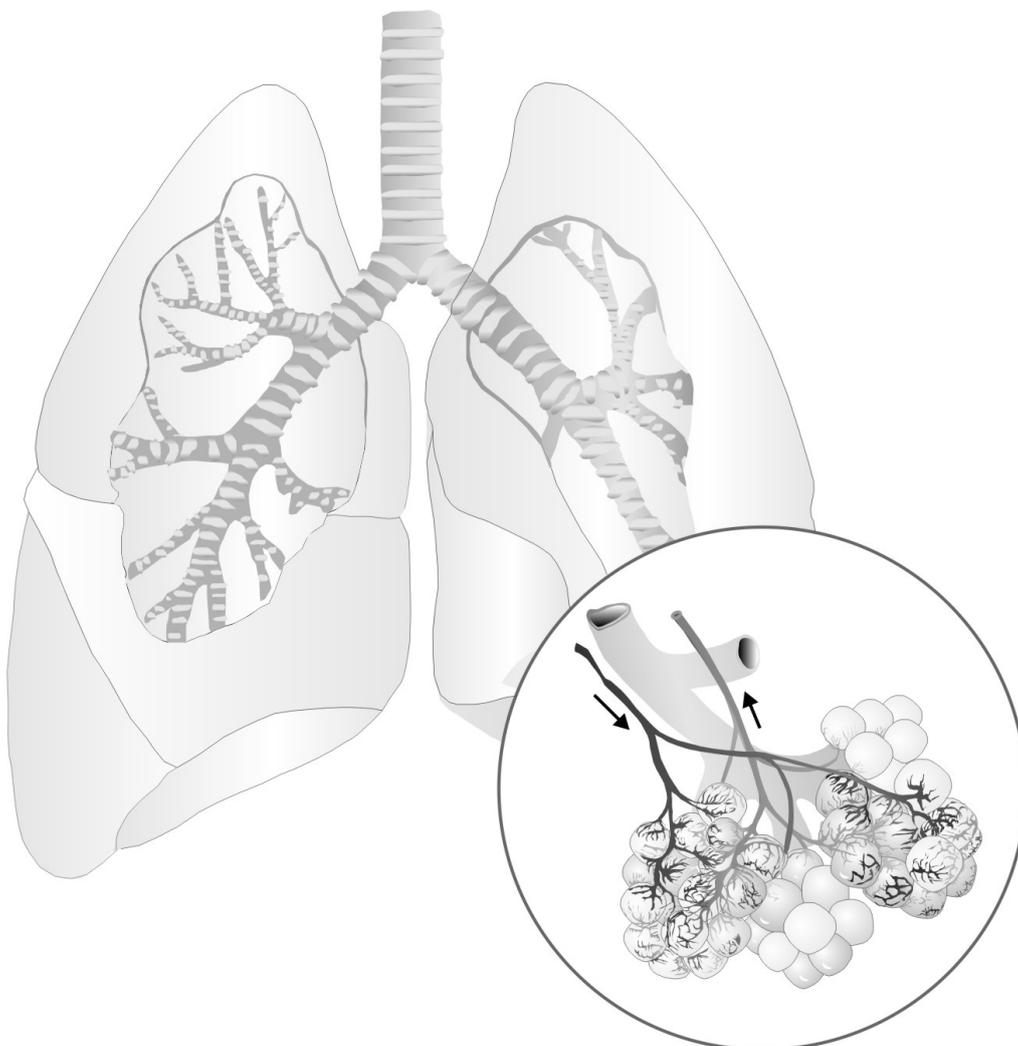


Abbildung 2.1-1: Aufbau der Lunge mit Darstellung der Alveolen

Beim Einatmen gelangt die Atemluft über Rachen und Kehlkopf in die Luftröhre, die sich, je nach Körpergröße, nach 10 bis 12 Zentimetern an der Carina in die beiden Hauptbronchien aufgabelt. Die Hauptbronchien verzweigen sich ihrerseits in immer kleinere Äste, welche als Bronchien bezeichnet werden. In 22 Schritten erfolgt eine Aufästelung des Bronchialbaums, wobei die Oberfläche ab der vierten Verästelung stark zunimmt (Abbildung 2.1-2). Erst in den letzten 3 cm des Bronchialbaums

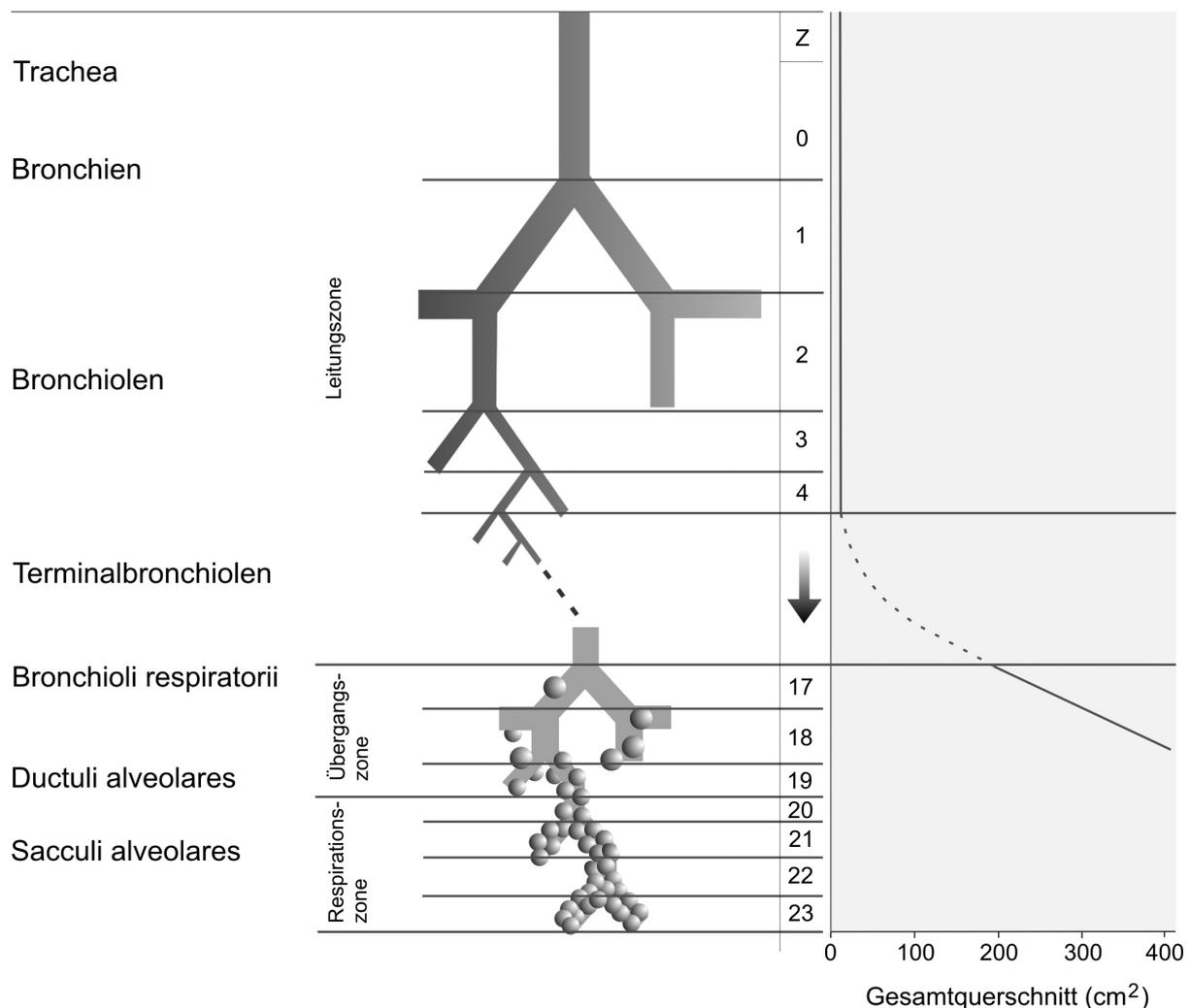


Abbildung 2.1-2: Lungenmodell mit Darstellung der Zunahme des Gesamtquerschnitts und der Anzahl der Verästelungen (Z) (nach Thews et al., 1999)

erfolgt dabei eine Oberflächenvergrößerung von ca. 6 cm² auf ca. 75 m² (Meier; Dettli, 1981). Die kleinsten Bronchien, auch als Bronchiolen bezeichnet, gehen schließlich in das Lungengewebe über. Luftröhre und Hauptbronchien sind von Knorpelspangen umschlossen, bei den

kleineren Bronchien sind es Knorpelplättchen, welche ihnen eine elastische Festigkeit verleihen und sie auch bei Druckänderungen offen halten. Bei den Bronchiolen fehlen die stützenden Knorpelspangen. Diese werden über einen leichten Unterdruck, der im Brustkorb herrscht, offen gehalten. Je nach Bedarf kann die Weite der Bronchien vom Körper reguliert werden. Dazu befindet sich zwischen und unter den Knorpeln glatte Muskulatur. Die Weite der Bronchien wird vom vegetativen Nervensystem gesteuert. Unter Einfluss des Sympathikus kommt es zu einer Erschlaffung der Bronchialmuskulatur und damit zu einer Erweiterung der Bronchien (Bronchodilatation). Überwiegt der Parasympathikus, tritt der gegenteilige Effekt ein. Die glatte Muskulatur wird kontrahiert und die Bronchien werden verengt. Kommt es aufgrund einer Erkrankung zu einer unphysiologischen Verengung der Bronchien, wie z.B. beim Asthma bronchiale, kann es zu Atemproblemen kommen, da der Atemwiderstand stark erhöht wird. Ein gesunder Mensch atmet pro Tag ca. 20000 mal und pumpt dabei schätzungsweise 8000 bis 10000 Liter Luft durch seine Lunge. Mit der Einatmung wird sauerstoffreiche Frischluft in die Lunge gesogen. Damit der Körper möglichst viel Sauerstoff aus der Luft aufnehmen kann, ist die Oberfläche der Lunge durch die Verzweigungen bis in die Alveolen stark vergrößert. Die eingeatmete Luft wird durch die Atembewegung über die Bronchien in die Lungenflügel eingesogen. Das Lungengewebe eines gesunden Erwachsenen besteht aus 300 bis 400 Millionen Lungenbläschen, den Alveolen. Diese sind traubenförmig um die Enden der kleinsten Bronchiolen angeordnet (Abbildung 2.1-1) und haben einen Durchmesser von 0,2 bis 0,3 mm (Langguth et al., 2004). In den Alveolen gibt es keine aktive Luftbewegung, sondern die Durchmischung erfolgt ausschließlich durch Diffusionsprozesse. Die Alveolen sind von einem Netz feinsten Blutkapillaren durchzogen. In diesem Geflecht findet

der Gasaustausch zwischen Atemluft und Blutkreislauf des Körpers statt. Voraussetzung für den Gasaustausch ist allerdings nicht allein die große Oberfläche der Alveolen, sondern vor allem eine dünne Barriere. Dies ist im Alveolargewebe durch die alveolokapilläre Membran sichergestellt, die nur aus dem Alveolarepithel, einem Interstitium und dem Kapillarendothel besteht und eine Dicke von weniger als 1 µm aufweist (Thews et al., 1999). Über die Alveolen werden täglich 400 bis 800 Liter Sauerstoff vom Körper aufgenommen und 350 bis 700 Liter Kohlendioxid abgegeben (Pschyrembel; Dornblüth, 2004; Huhn, 2001).

Die Oberflächenspannung in den Alveolen ist erheblich niedriger, als für eine wässrige Grenzfläche zu erwarten wäre. Der Flüssigkeitsfilm, der die Oberfläche der Alveolen überzieht, enthält ein Substanzgemisch, das die Oberflächenspannung stark herabsetzt und als Surfactant bezeichnet wird. Es besteht zu 90% aus einem Gemisch von Phospholipiden sowie aus neutralen Lipiden und Proteinen und weist einen pH-Wert von 7,4 auf. Die Substanz erfüllt mehrere Aufgaben. Sie schützt die Lungenbläschen am Ende der Ausatmung vor dem Kollabieren, ermöglicht eine homogene Belüftung, erleichtert den Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid und verbessert den Schleimtransport (Mutschler et al.; Pfeifer et al., 1995).

2.2 Pharmazeutische Aerosole

Unter Aerosolen versteht man disperse Systeme vom Typ "fest in gasförmig" oder "flüssig in gasförmig". Sie dienen im pharmazeutischen Bereich der Applikation von Arzneistoffen auf die Haut, in die Nase oder Lunge und sollen eine lokale oder systemische Wirkung entfalten.

2.2.1 Inhalation und Partikelabscheidung

Bei der Therapie von Lungenerkrankungen ist zu berücksichtigen, dass die Arzneistoffe im Aerosol an den Wirkort transportiert werden müssen. Dazu ist eine Tröpfchen- oder Partikelgröße im Größenbereich von 0,5 bis 5 μm optimal, um den Hauptabsorptionsort zu erreichen. Kleinere Tröpfchen oder Partikel werden wieder ausgeatmet, während größere bereits vorher abgeschieden werden. Die Abscheidung der Partikel aus dem Gasstrom beruht dabei auf den Mechanismen von Impaktion, Sedimentation und Diffusion (Abbildung 2.2-1).

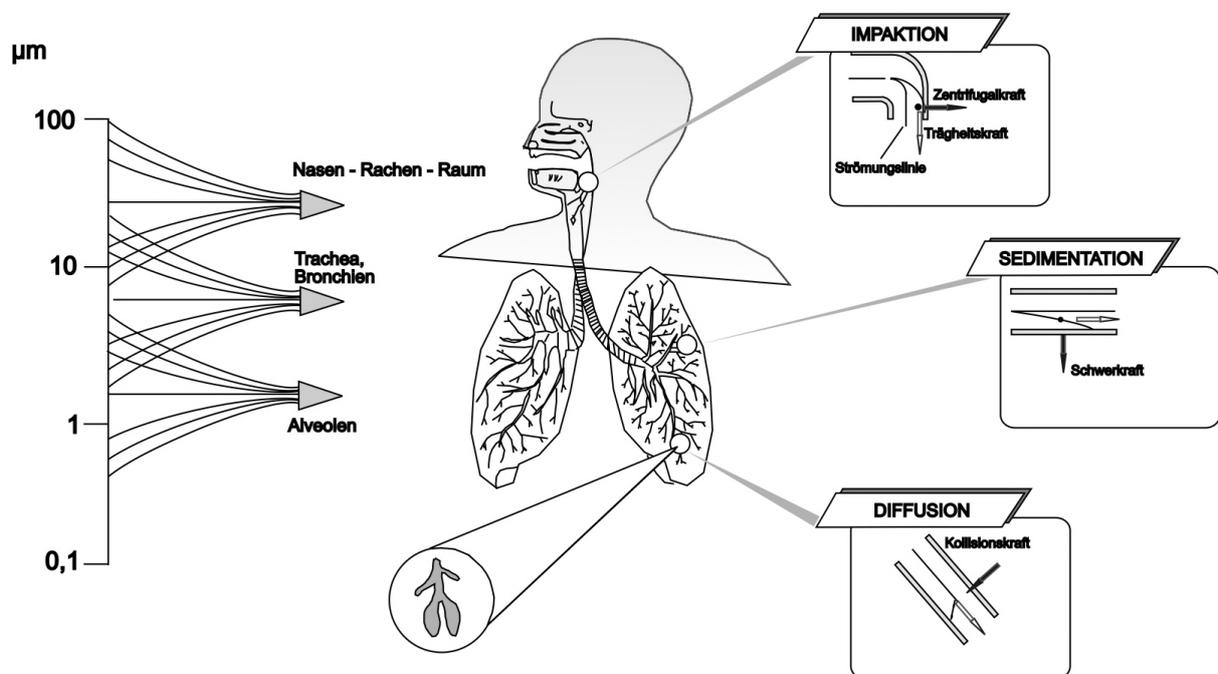


Abbildung 2.2-1: Partikeldeposition im Respirationstrakt

Als Impaktion wird die Prallabscheidung von Partikeln aus einem Volumenstrom aufgrund ihrer Massenträgheit bezeichnet. Sie ist für Partikel ab einer Größe von 2 bis 3 μm relevant. Diese haben das Bestreben, einer Richtungsänderung des Volumenstroms nicht zu folgen und geradeaus zu fliegen. Partikel mit einer Größe über 10 μm werden bereits zu 90% in den oberen Atemwegen abgeschieden (Langguth et al., 2004). Partikel im Größenbereich zwischen 1 bis 6 μm können aus

einem Volumenstrom sedimentieren. Sie erreichen aufgrund ihrer Größe auch tiefere Gebiete der Lunge und können bis in die Alveolen vordringen. Diese Fraktion stellt das wirksame Kollektiv eines Aerosols dar. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel wird durch das Stokes-Cunningham-Gesetz beschrieben und ist vor allem vom Teilchenradius, der im Quadrat in die Gleichung einfließt, abhängig.

Partikel mit einer Größe unter $0,5\ \mu\text{m}$ folgen zwar dem Volumenstrom, ihre Abscheidung in den Alveolen erfolgt aber vorwiegend durch Diffusionsprozesse aufgrund der Brownschen Molekularbewegung. Sie spielen nur noch eine untergeordnete therapeutische Rolle, da ihr Anteil in der verabreichten Dosis sehr gering ist und der Großteil mit der Ausatmung wieder exhaliiert wird. Bei der therapeutischen Anwendung eines Aerosols spielt nicht zuletzt die Atemtechnik eine wichtige Rolle. Die Abscheidung von Partikeln $\leq 1\ \mu\text{m}$ kann durch langsames und sehr tiefes Atmen deutlich verbessert werden, da den Partikeln mehr Zeit zur Sedimentation oder Abscheidung per Diffusion gegeben wird (Byron, 1986).

Die Mehrzahl der Aerosole zur therapeutischen Anwendung soll eine vorwiegend lokale Wirkung am Applikationsort entfalten. Beim Auftreffen eines Aerosoltröpfchens auf die Oberfläche der Alveolen, filmt der Tropfen auf dieser aus und die gelösten oder suspendierten Arzneistoffe entfalten ihre lokale Wirkung (siehe Abbildung 2.2-2). Außerdem passieren diese die alveolare Barriere und gehen in den Blutkreislauf über. Neben der Diffusion der Stoffe durch das Alveolarepithel wird ein Transport über Pinozytose und durch Makrophagen diskutiert, die auch bei der Elimination von Staubpartikeln eine wichtige Rolle spielen. Carrier-vermittelte Transportprozesse spielen für die Absorption von Wirkstoffen keine Rolle (Pfeifer et al., 1995). Aufgrund ihrer großen Oberfläche, der dünnen Barriere und dem Fehlen eines Enzymsystems

eignet sich die Lunge auch sehr gut zur Applikation systemisch anzuwendender Stoffe. Die Entwicklung von Produkten in diesem Bereich hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Als Inhalationsaerosole zur systemischen Therapie waren früher Ergotamin- und Isosorbiddinitrat im Handel (Meier; Dettli, 1981). Auch die Absorption von Peptiden, wie z.B. Insulin, ist über die Lunge möglich (von Wichert und von Wichert, 2006). Das erste Produkt, das auf diesem Gebiet eine Zulassung erhalten hat, ist das inhalativ anzuwendende Insulin der Firma Pfizer (Exubera[®]). Da jedoch nur ca. 10% der inhalierten Dosis überhaupt absorbiert werden, ist diese Form der Therapie mit hohen Kosten verbunden. Dies hat unter anderem zu einer geringen Akzeptanz des Präparates geführt, so dass Exubera[®] Anfang 2008 wieder vom Markt genommen wurde.

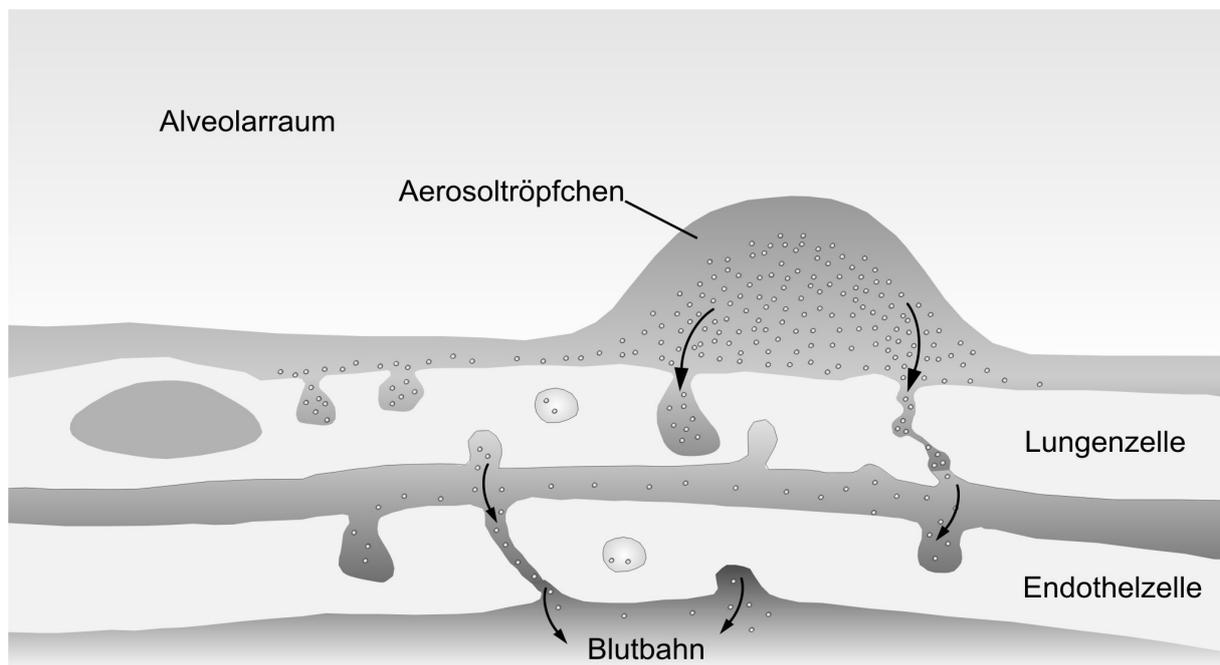


Abbildung 2.2-2: Darstellung des Aufnahmeweges eines Aerosolpartikels in der Lunge (modifiziert nach Bernhard, 2006)

2.2.2 Geräte zur Aerosolerzeugung

Um einen Arzneistoff pulmonal applizieren zu können, muss dieser zuerst in ein Aerosol überführt werden (Folke Morén, 1987).

Dazu gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten, nämlich

- die Applikation mittels eines Dosieraerosols
- die Applikation als Pulver aus einem Pulverinhalator
- die Verneblung in einem Ultraschall-, Membran- oder Druckluftvernebler

Bei einem Dosieraerosol liegt der Arzneistoff als Lösung oder Suspension in einem druckverflüssigten Treibmittel vor. Über ein Dosierventil wird bei der Anwendung eine Dosis abgeteilt und über eine Düse fein zerteilt, so dass sich ein Aerosol bildet. Bei Pulverinhalatoren liegt der Arzneistoff in fester Form in einem Reservoir oder einer Kapsel vor. Bei der Anwendung wird die abgeteilte Dosis mithilfe eines Volumenstroms in ein inhalierbares Aerosol dispergiert. Zur Erzeugung eines Aerosols mit Hilfe eines Verneblers kommen drei unterschiedliche Prinzipien zur Anwendung. Da im Zuge dieser Arbeit mit Verneblern gearbeitet wurde, wird kurz auf die verwendeten Geräte eingegangen. Zur Verneblung der Suspensionen wurden mit dem Pari LC Plus[®], dem Pari eFlow Rapid[®] und dem Multisonic infra control[®] drei Geräte eingesetzt, die nach unterschiedlichen Vernebelungsprinzipien arbeiten. Der Pari LC Plus[®] ist ein konventioneller atemunterstützter Druckluftvernebler. Das Gerät arbeitet mit Druckluft, die in einem geräteeigenen Kompressor erzeugt wird. Die komprimierte Luft wird durch eine Düse im Reservoir geleitet, wo sie die zu vernebelnde Lösung oder Suspension mit sich reißt und fein zerteilt. Der Pari eFlow Rapid[®] gehört zur neuen Generation der Membranvernebler. Bei diesem Gerät wird das Aerosol mit Hilfe einer schwingenden Membran erzeugt, in der sich feine Poren befinden. Durch die Schwingungen wird die

Arzneistofflösung oder –suspension durch die Löcher gedrückt und vernebelt.

Beim Multisonic infra control® handelt es sich um einen atemzuggesteuerten Ultraschallvernebler. Das Aerosol wird mit Hilfe eines Piezo-Kristalls erzeugt, der im Boden des Reservoirs untergebracht ist. Durch Anlegen einer hochfrequenten Wechsellspannung wird dieser zu Schwingungen von 2,4 MHz angeregt. Diese übertragen sich auf die zu vernebelnde Lösung oder Suspension im Reservoir. An der Flüssigkeitsoberfläche entstehen so aufgrund von Kavitations- und Kapillareffekten die Aerosoltröpfchen.

2.3 Pilzinfektionen der Lunge

Die große Oberfläche der Lunge, die stets feucht und warm gehalten wird, stellt für Krankheitserreger wie Pilze und Bakterien einen idealen Nährboden dar. Der Körper verfügt daher über Mechanismen zur Reinigung der Atemluft. Diese beginnen bereits in der Nase und den zuleitenden Atemwegen, wo kleinere Partikel, Bakterien und Staub von den Schleimhäuten abgefangen werden. Außerdem verfügt die Lunge über effiziente Immunabwehrmechanismen, wie beispielsweise Makrophagen, um Infektionen zu verhindern. Bei Patienten, die aufgrund einer Erkrankung oder medikamentösen Behandlung in ihrer Immunantwort geschwächt sind, kann es jedoch zu Infektionen der Lunge kommen. Dabei ist die häufigste Erkrankung eine Infektion durch Pilze der Gattung *Aspergillus*. Der häufigste Erreger ist *Aspergillus fumigatus* (Abbildung 2.3-1), der für ca. 90% der Erkrankungen verantwortlich ist. Als weitere Erreger kommen *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* und *Aspergillus niger* und *Candidaspezies* vor. Da die Sporen ubiquitär vorkommen, erfolgt eine Infektion meist über die Atemluft. Aufgrund ihrer Größe von 2 bis 3 µm können sie bis in die Alveolen vordringen und sich dort vermehren (Zaspel, 2003).

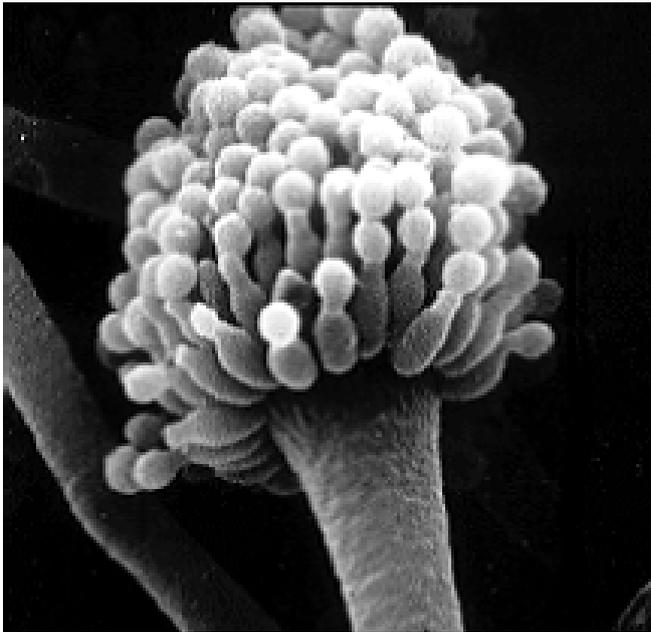
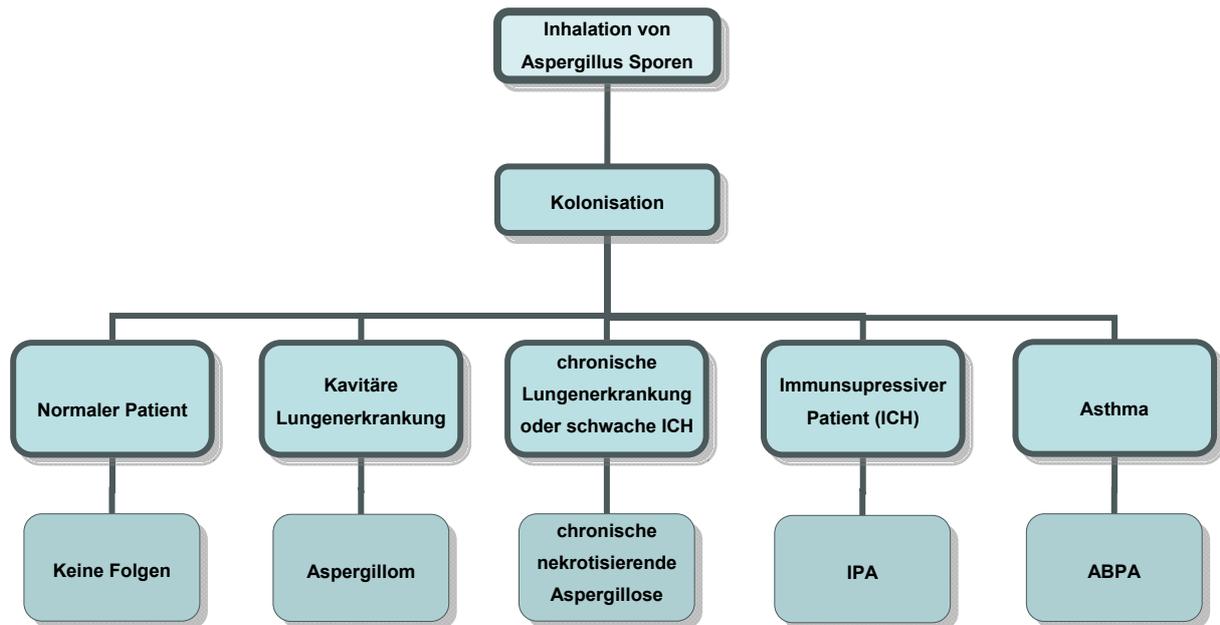


Abbildung 2.3-1: *Aspergillus fumigatus* (aus Reif, 2004)

Schätzungen zufolge atmet jeder Mensch täglich ca. 40 Aspergillus-sporen ein. Die Inhalation kann dabei, wie in Abbildung 2.3-2 gezeigt, je nach Verfassung des Patienten zu unterschiedlichen Erkrankungen der Lunge führen.

Die häufigste Form stellt die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) dar, die vorwiegend bei Patienten mit Asthma oder cystischer Fibrose auftritt. Dabei kommt es zu einer allergischen Immunantwort auf die Sporen des Aspergillus, die vor allem durch asthmatische Reaktionen gekennzeichnet ist. Eine frühzeitige Gabe von Prednisolon kann den Verlauf der Erkrankung beeinflussen und die Verschlechterung einer milden Form der ABPA bis hin zu einer schweren destruktiven Lungenerkrankung verhindern. (Kumar, et al., 2003).



ABPA = allergische bronchopulmonale Aspergillose

IPA = invasive pulmonale Aspergillose

ICH = Immunocompromised host

Abbildung 2.3-2: Klinisches Spektrum nach Inhalation von Aspergillus Sporen (nach Kumar, et al., 2003)

Invasive Aspergillosen (IA) – und hier steht die invasive pulmonale Aspergillose (IPA) mit 80-90% aller invasiven Aspergillosen im Vordergrund – entstehen im Zusammenspiel von Exposition mit Aspergillus sporen oder -konidien und einer Beeinträchtigung des Immunsystems. Diese tritt vorrangig bei immunsupprimierten Patienten auf und führt unbehandelt innerhalb eines Zeitraums von 7 bis 14 Tagen zum Tod des Patienten. Jedoch beträgt die durchschnittliche Letalität auch bei rechtzeitiger Erkennung und Behandlung der Erkrankung ca. 50%. Immunsupprimierte Patienten mit einer reduzierten Anzahl der neutrophilen Granulozyten ($<500/\text{mm}^3$), die länger als 12 Tage dauert, haben keine Möglichkeit, sich gegen eindringende Erreger zu schützen und haben daher das größte Risiko einer Infektion (Latgé, 1999). Die Inzidenz für andere Patientengruppen, an einer invasiven Aspergillose zu erkranken, ist in Tabelle 2.3-1 dargestellt.

Tabelle 2.3-1: Inzidenz der Invasiven Aspergillose bei:

Herz- und Lungen- bzw. Lungentransplantationen	19-26 %
Chronisch granulomatösen Erkrankungen	25-40 %
Akuten Leukämien	5-24 %
Allogenen Knochenmarkstransplantationen/KMT	4-9 %
Autologen Knochenmarkstransplantationen/KMT ohne Zytokine	0,5-6 %
AIDS	0-12 %
Lebertransplantationen	1,5-10 %
Herz- und Nierentransplantationen	0,5-10 %
Schwerer kombinierter Immundefizienz	3,5 %
Verbrennungen	1-7 %
Systemischem Lupus erythematodes	1 %
Autologen Knochenmarkstransplantationen/KMT mit Zytokinen	<1 %

Quelle: (Wild, 2004)

Die Zahl der Patienten, die nach einer Transplantation, einer Chemotherapie oder durch eine erworbene Immunschwäche an einer gefährlichen Aspergillusinfektion der Lunge erkranken, steigt in Deutschland und weltweit weiter an. Dies ist nicht zuletzt eine Folge moderner medizinischer Maßnahmen, wie Chemotherapie, Immunsuppression und Organtransplantationen. Die Anzahl der Neuinfektionen liegt in Deutschland momentan bei ca. 5000 Fällen pro Jahr. Im Jahr 2002 waren es hingegen ca. 4000 Fälle, was die steigende Anzahl in den letzten Jahren zeigt. Die Erkrankung beginnt dabei meistens in der Lunge, kann sich später aber auch auf das Gehirn des Betroffenen ausweiten. Die Sterblichkeitsrate bei diesen Infektionen liegt mit ca. 50% der Patienten auf einem sehr hohen Niveau (Chiller und Stevens, 2000).

Die Diagnose einer Lungenmykose ist sehr schwierig, da die Patienten keine spezifischen Symptome zeigen und es außerdem keine spezifische Diagnostik für den Nachweis der Erkrankung gibt. Dadurch

werden viele invasive Aspergillosen erst sehr spät erkannt und können dann kaum noch adäquat behandelt werden. Zu den unspezifischen Symptomen gehören Husten, Fieber $>38^{\circ}\text{C}$ auch unter Antibiotikagabe sowie Brustschmerzen und Atemnot. Im Röntgenbild der Lunge ist nach Auftreten der ersten Symptomen häufig noch keine Veränderung erkennbar, so dass die weitere Diagnostik aufgrund der patientenindividuellen Risikofaktoren für eine Invasive Aspergillose (IA) erfolgen muss. Im Spätstadium der IA erscheinen Schatten im Röntgenbild. Eine verbesserte bildliche Diagnostik ist per Computertomographie (CT) möglich, die bereits frühzeitig Veränderungen erkennen lässt. So sind Läsionen der Lunge, teilweise mit Ausbildung von Kavitäten zu beobachten, des weiteren lassen sich ischämisch anmutende Areale ausmachen. Solche im CT veränderten Bereiche der Lunge bieten sich dann für eine Lungenbiopsie an, mit der ein gezielter Erregernachweis durchgeführt und damit die Diagnose gesichert werden kann. Bei zirka 30% der Patienten wird eine sichere Diagnose allerdings erst post mortem gestellt. Aufgrund der schwierigen Diagnostik und der hohen Letalität der erkrankten Patienten wird häufig bereits bei einer noch ungesicherten IA ein Therapieversuch unternommen. Studien besagen, dass von 100 vermuteten IA-Patienten, die mit Amphotericin B behandelt wurden, nur 25% tatsächlich eine IA aufwiesen. Dies stellt jedoch einen hohen Kostenfaktor dar, da die Therapie aufwändig und überaus kostspielig ist (Wilson, et al., 2002).

Die Behandlung und Prognose hängt von Art und Schwere der Erkrankung und vom immunologischen Status des Patienten ab und erfolgt vor allem durch systemische Gabe eines Antimykotikums.

2.3.1 Therapie von Pilzinfektionen

Pilze gehören im Gegensatz zu den Bakterien den Eukaryonten an. Sie verfügen über einen Zellkern, Mitochondrien und ein endoplasmatisches Retikulum, was die medikamentöse Behandlung von Mykosen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur menschlichen Zelle erschwert. Da die Zellen jedoch Ergosterol als wichtigen Baustein der Zellmembran benötigen, ist die Biosynthese des Moleküls ein wichtiger Angriffspunkt in der antimykotischen Therapie. Die Substanzen greifen dabei nicht in die Biosynthese von Cholesterol ein, das für die Zellmembran der menschlichen Zelle benötigt wird. Die Ergosterolbiosynthese erfolgt vom Squalen aus über verschiedene Zwischenstufen bis zum Ergosterol. Der Weg der Biosynthese und die Angriffspunkte der einzelnen Antimykotika sind in Abbildung 2.3-3 gezeigt.

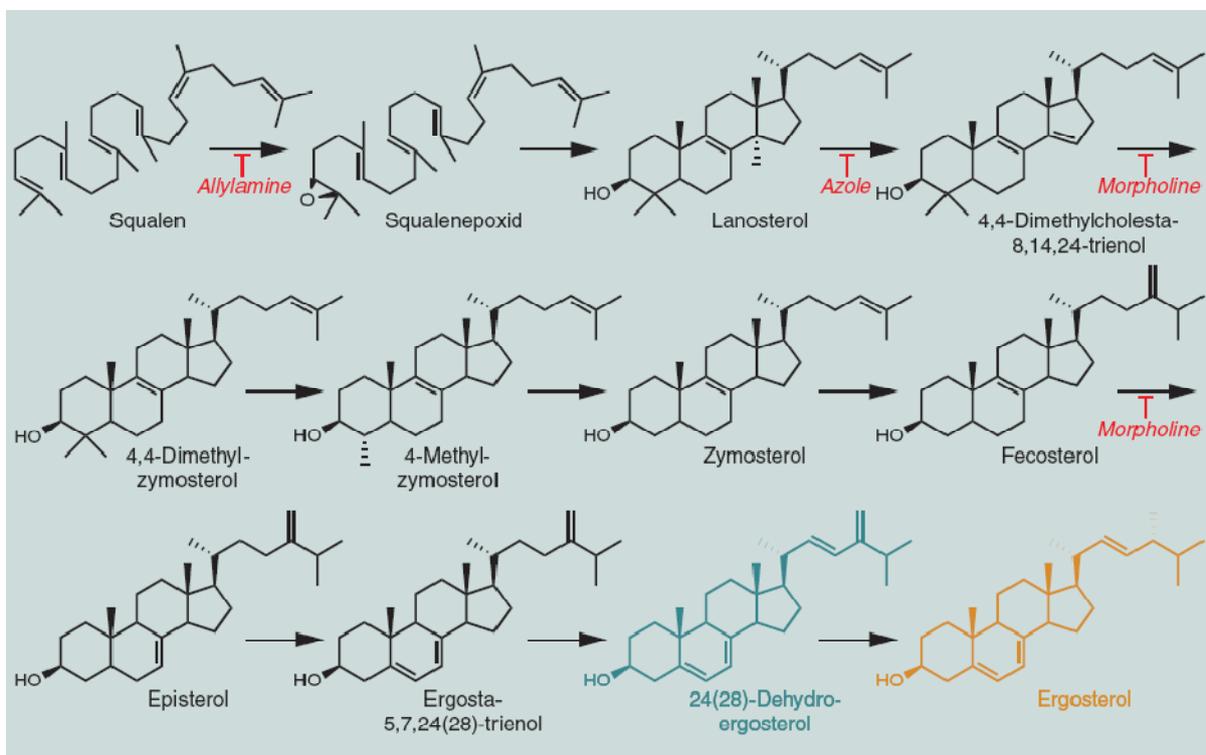


Abbildung 2.3-3: Weg der Ergosterolbiosynthese und Angriffspunkte der Antimykotika (aus Bracher, 2003)

Die Antimykotika lassen sich in unterschiedliche Klassen unterteilen. Die wichtigsten sind dabei die Azole, Allylamine und Morpholine, die in die Ergosterolbiosynthese eingreifen sowie die Polyene (z.B. Amphotericin B). Des Weiteren sind Ciclopirox, Flucytosin, Griseofulvin (obsolet) und etliche unspezifische Antiseptika, wie Undecylensäure, PVP-Iod und Triarylaminfarbstoffe wie Fuchsin, Gentianaviolett und Pyoktanin auf dem Markt (Bracher, 2003).

Aufgrund der besonderen Schwere der Erkrankung erfolgt eine Therapie der invasiven Aspergillose durch systemische Gabe von Antimykotika. Das Mittel der Wahl ist dabei seit 1959 Amphotericin B (Denning et al.). Die Therapie ist jedoch von starken Nebenwirkungen begleitet, die hohe Folgekosten nach sich ziehen. Außerdem liegt die Letalitätsrate auch unter Behandlung mit Amphotericin B bei ca. 50%. Die Einführung von besser verträglichen Formulierungen des Arzneistoffes in die Therapie brachte keinen größeren Behandlungserfolg, die Nebenwirkungsrate konnte jedoch um ein Vielfaches gesenkt werden. Leider liegen die Kosten der neueren lipidbasierten Arzneiformen jedoch bei einem Vielfachen der ursprünglichen Behandlung. In Tabelle 2.3-2 sind die Tagestherapiekosten der herkömmlichen Behandlung mit Amphotericin B und des liposomalen Amphotericin B-Handelspräparates Ambisome[®] gegenübergestellt.

Tabelle 2.3-2: Vergleich der Tagestherapiekosten pro Patient für Amphotericin B und das liposomale Amphotericin B Handelspräparat Ambisome[®] (nach Wild, 2004)

	Preis pro 1mg	Tagesdosis bei 70 kg	Tagestherapiekosten
Amphotericin B	3,44 €	70 mg (1 mg/kg KG)	240,80
AmBisome[®]	49,50 €	350 mg (5 mg/kg KG)	17.325,-

Das zweite bedeutende Antimykotikum in der Behandlung der invasiven Aspergillosen ist das Triazol Itraconazol, das seit 1985 Verwendung findet. Der Arzneistoff hemmt Cytochrom P-450 abhängige Enzyme und verhindert so die Umwandlung von Lanosterol zu Dimethylcholestatrienol, was eine Verarmung der Zelle an Ergosterol nach sich zieht. Der Wirkstoff ist als Kapsel, Suspension zur peroralen Applikation oder Infusionslösung im Handel. Die Dosis liegt bei schweren Mykosen bei 3 mal täglich 200 mg über einen Zeitraum von vier Tagen. Anschließend wird die Dosierung auf 2 mal täglich 200 mg abgesenkt. Allerdings weist Itraconazol eine sehr schlechte Löslichkeit und eine damit verbundene schlechte Bioverfügbarkeit auf. Bei Patienten mit gastrointestinalen Problemen, AIDS-Patienten und bei unkorrekter Einnahme kommt es zu einer Verringerung der Absorption. Die Verträglichkeit von Itraconazol ist jedoch sehr gut und es besitzt ein breites Wirkspektrum (de Beule und van Gestel, 2001; Conway, et al., 2004). Allerdings ist Itraconazol bei systemischer Gabe nicht zur Behandlung von akuten lebensbedrohlichen Mykosen geeignet, da es aufgrund seiner fungistatischen Aktivität nur langsame Wirkung zeigt (Lipp, 2003).

2.4 Suspensionen

Als Suspensionen werden allgemein disperse Systeme mit einer flüssigen äußeren Phase sowie einer festen, fein verteilten, dispersen inneren Phase bezeichnet. Dabei ist Voraussetzung, dass sich der dispergierte Stoff nicht in der äußeren Phase löst. Die Partikel der dispersen Phase haben dabei im Allgemeinen eine Größe von ca. 0,5 μm bis 100 μm . Je nach Anwendungsbereich der Suspension kann die Größe der Partikel jedoch stark variieren. So liegen Partikel in Suspensionssystemen für die pulmonale Applikation im Bereich von ca. 1 bis 5 μm , so dass sie den Applikationsort erreichen können. Suspensionen zur parenteralen Anwendung sollten eine Partikelgröße von 40 μm nicht überschreiten, wohingegen Suspensionen zur dermalen oder oralen Applikation durchaus mittlere Partikelgrößen im Bereich von hundert Mikrometern aufweisen können, ohne dass sie unangenehme Empfindungen auslösen. Eine Suspension sollte so formuliert sein, dass sie über die Lagerzeit sowohl chemisch als auch physikalisch stabil ist. Das bedeutet, dass sich nicht nur der Wirkstoff nicht zersetzen darf, sondern auch, dass ein sich bildendes Sediment einfach wieder aufzuschütteln sein muss und dass sich die Partikelgröße über die Lagerzeit nicht ändert. Da der Wirkstoff oder die Wirkstoffe in einer Suspension als Feststoffe in einer gesättigten Lösung vorliegen, stellt die chemische Stabilität in der Regel im Unterschied zu einer Lösungsformulierung kein Problem dar. Aufgrund ihrer Masse sedimentieren die Partikel einer Suspension mit der Zeit und bilden einen mehr oder minder festen Bodensatz. Die Sedimentationsgeschwindigkeit lässt sich mit dem Stokesschen Gesetz beschreiben, das gleichzeitig die Möglichkeiten der Suspensionsstabilisierung aufzeigt.

Formel 2.4-1: Stokessches Sedimentationsgesetz

$$v = \frac{2 * (\rho_S - \rho_D) * r^2 * g}{9 * \eta}$$

v	=	Sinkgeschwindigkeit des Partikels
r	=	Radius des Partikels
ρ_S	=	Dichte des Feststoffes [kg/m ³]
ρ_D	=	Dichte des Dispersionsmediums [kg/m ³]
g	=	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
η	=	Viskosität des Dispersionsmediums

Um eine stabile Formulierung zu erhalten, werden daher häufig Maßnahmen ergriffen, die die physikalische Stabilität erhöhen. Anhand der Parameter aus Formel 2.4-1 lässt sich erkennen, dass eine Verringerung der Sedimentationsgeschwindigkeit über eine Angleichung der Dichten von Dispersionsmedium und Partikel, eine Erhöhung der Viskosität des Dispersionsmediums sowie eine Verringerung des Partikelradius erreicht werden kann. Erstere Möglichkeit wird sich bei den meisten Suspensionsformulierungen nur schwer realisieren lassen. Die Erhöhung der Viskosität, insbesondere mit thixotropen Zusätzen, stellt eine schöne Formulierungsvariante für Suspensionen dar, die zur Sedimentation neigen, dies ist jedoch nicht in allen Bereichen möglich. Soll die Suspension beispielsweise vernebelt werden, wirkt sich eine Erhöhung der Viskosität negativ auf die Partikelgröße der resultierenden Tröpfchen aus. Eine weitere Möglichkeit besteht in der gezielten Flockung, bei der eine Sedimentation der dispersen Phase gezielt herbeigeführt wird, so dass diese ein lockeres Sediment bildet, das leicht wieder aufzuschütteln ist. Anders verhält es sich mit Formulierungen, deren disperse Phase bereits eine Partikelgröße im unteren

Mikrometerbereich oder im Nanometerbereich aufweist, da solche Partikel nicht mehr der Schwerkraft folgen, sondern durch die Brownsche Molekularbewegung in der Schwebelage gehalten werden. Dementsprechend zeigen Systeme, deren disperse Phase aus Nanopartikeln besteht, keine Sedimentation.

2.4.1 Nanopartikel

Der Begriff Nanopartikel leitet sich vom altgriechischen Wort *nános* bzw. dem italienischen Wort *nano* für Zwerg ab und steht für ein Milliardstel. Im Hinblick auf die Abmessungen eines Partikels bedeutet dies, dass ein Nanometer ein Milliardstel eines Meters (10^{-9} m) ist. In Abbildung 2.4-1 ist der Größenbereich einer nanopartikulären Formulierung im Vergleich zu anderen kleinen Strukturen dargestellt. Bei Nanopartikeln handelt es sich um feste Partikel. Die Definition der Partikelgröße für Nanopartikel weicht je nach Autor voneinander ab. So definieren (Müller et al., 1998b) den gesamten Nanometerbereich von 1 bis 1000 nm als Nanopartikel. Andere Autoren schränken den Bereich weiter ein und bezeichnen nur Partikel kleiner 300 nm als Nanopartikel (Speiser, P. P., 1998).

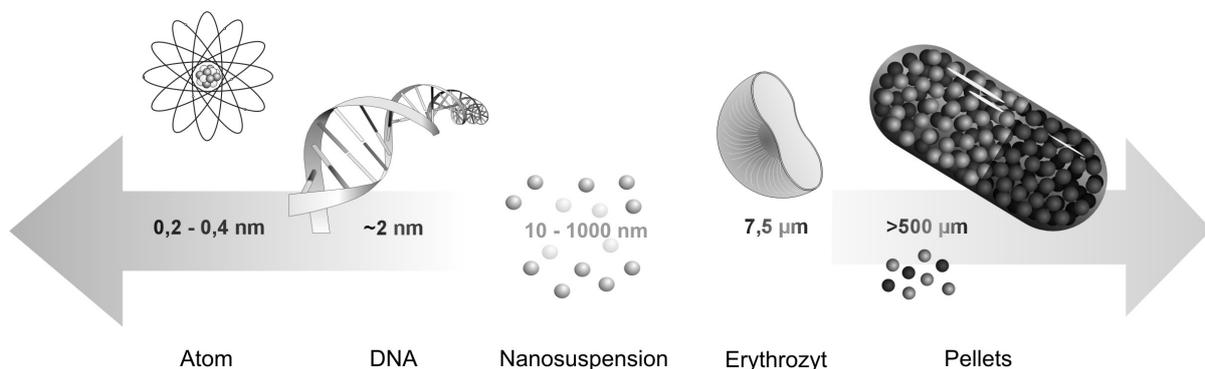


Abbildung 2.4-1: Veranschaulichung des Größenvergleichs

2.4.2 Nanosuspensionen

Analog zur Definition von Suspensionen sind Nanosuspensionen disperse Systeme von feinverteiltem Feststoff in einem flüssigen Medium, in dem der Feststoff nicht löslich ist. Die Partikelgröße des dispergierten Feststoffs liegt dabei im Nanometerbereich (siehe Abbildung 2.4-1).

Die Formulierung von schwer wasserlöslichen Stoffen gehört schon immer zu den schwierigsten Aufgaben der pharmazeutischen Technologie. Eine große Herausforderung stellen dabei vor allem Stoffe dar, die sowohl im wässrigen, als auch in organischen Medien schwer löslich sind. Zur Einteilung der Löslichkeiten von Stoffen führt das Arzneibuch eine Tabelle auf, in der die Bedeutung der Löslichkeitsangaben in den Monographien erläutert ist. Diese Angaben sind in Tabelle 2.4-1 dargestellt:

Tabelle 2.4-1: Löslichkeitsangaben des Arzneibuchs (Europäisches Arzneibuch, 2005).

Bezeichnung	Ungefähre Anzahl Volumenteile Lösungsmittel in Milliliter je Gramm Substanz
sehr leicht löslich	weniger als 1 Teil
leicht löslich	von 1 Teil bis 10 Teile
löslich	von 10 Teilen bis 30 Teile
wenig löslich	von 30 Teilen bis 100 Teile
schwer löslich	von 100 Teilen bis 1000 Teile
sehr schwer löslich	von 1000 Teilen bis 10000 Teile
praktisch unlöslich	über 10000 Teile

Nach Schätzungen sind etwa 40% der neuen Arzneistoffe schwer löslich und werden aufgrund dessen nicht weiter in die Entwicklung einbezogen (Patravale, 2004). Traditionelle technologische Verfahren zur Verbesserung der Löslichkeit, wie die Mikronisation eines Arzneistoffes, die Verwendung von Lösungsvermittlern, der Einsatz von Permeationsverbesserern oder die Formulierung als ölige Lösung führen oft nur zu begrenztem Erfolg. In den letzten Jahren hat es daher bereits

eine Vielzahl neuer Formulierungsansätze gegeben. So bieten z.B. die Herstellung von Mikroemulsionen, der Einsatz von Cyclodextrinen oder die Herstellung von Liposomen in einigen Fällen eine Möglichkeit zur Formulierung. Alle diese Ansätze sind jedoch nicht uneingeschränkt für alle Arzneistoffe möglich. Den Nanosuspensionen ist in den letzten Jahren eine immer größere Bedeutung zugekommen, da sie eine einfache und schnelle Möglichkeit zur Formulierung, vor allem auch in den frühen Phasen der Arzneimittelentwicklung, bieten (Hu, et al., 2004; Kesisoglou, et al., 2007). So beschäftigen sich mittlerweile viele Pharmafirmen mit der Entwicklung von Nanosuspensionsformulierungen und es sind mit dem Immunsuppressivum Rapamune[®] und dem Antiemetikum Emend[®] beispielsweise auch bereits einige Produkte auf dem Markt. In organischen und wässrigen Medien schlecht lösliche Stoffe lassen sich vergleichsweise einfach als Nanosuspension formulieren. Die Formulierung der Arzneistoffe als Nanosuspension bietet dabei viele Vorteile. Die Bioverfügbarkeit eines schwer löslichen oder praktisch unlöslichen Arzneistoffes kann starken Schwankungen unterliegen. So kann es nach oraler Gabe in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme oder dem Allgemeinzustand des Patienten zu starken Unterschieden im Plasmaspiegel kommen, was Therapieprobleme mit sich bringt. Ein Beispiel ist Danazol, ein Arzneistoff, der in die Klasse vier des biopharmazeutischen Klassifikationssystems einzuordnen ist. Wie eine Studie im Tiermodell zeigen konnte, ließ sich die Bioverfügbarkeit bei Gabe einer Nanosuspension von 5,1% auf 82,3% steigern (Liversidge, 1995). Hier können Nanosuspensionsformulierungen deutliche Vorteile gegenüber anderen Darreichungsformen bieten .

Nach der Nernst-Brunner- und Levich-Modifikation des Noyes-Whitney-Gesetzes nimmt die Lösungsgeschwindigkeit einer Nanosuspension mit

der starken Vergrößerung der Oberfläche bei der Reduktion der Partikelgröße vom Mikrometer- in den Nanometermaßstab dramatisch zu, wie Formel 2.4-2 zeigt. Aufgrund ihrer geringen Partikelgröße verfügen Nanosuspensionen über eine sehr große Oberfläche, die zwischen 60 bis 6000 m² pro Gramm Substanz liegt (Jander et al., 1995). Dadurch werden Substanzen, die als Nanosuspension formuliert sind, deutlich schneller aufgelöst. Eine gute Lösungsgeschwindigkeit ist häufig der wichtigste Parameter für eine schnelle und vollständige Absorption, was in der Folge zu einer hohen Bioverfügbarkeit und einem schnellen Anfluten des Arzneistoffs im Körper führt .

Formel 2.4-2: Modifikation des Noyes-Whitney Gesetzes nach Levich und Nernst-Brunner

$$\frac{dX}{dt} = ((D \times A)/h)(C_s - X/V)$$

dX/dt =	Lösungsgeschwindigkeit
D =	Diffusionskoeffizient
A =	Oberfläche des Partikels
h =	Dicke der Diffusionsschicht
C _s =	Sättigungslöslichkeit des Arzneistoffes
X =	Konzentration in der umliegenden Lösung
V =	Volumen des Freisetzungsmediums

Darüber hinaus kommt für Nanosuspensionsformulierungen ein weiteres Phänomen zum Tragen, das grundsätzlich mit der Kelvin-Gleichung (siehe Formel 2.4-3) beschrieben ist.

Formel 2.4-3: Kelvin Gleichung

$$\ln \frac{P_r}{P_\infty} = \frac{2\gamma * V_m}{r * T * R}$$

- P_r Dampfdruck eines Partikels mit dem Radius r
 P_∞ Dampfdruck eines Partikels mit unendlichem Radius (ebene Oberfläche)
 γ Grenzflächenspannung der Partikel
 V molares Volumen (in m^3/mol)
 r Radius des Partikels
 R allgemeine Gaskonstante (8,134 J/K* mol)
 T absolute Temperatur [K]

Darin wird die Erhöhung des Dampfdruckes eines Flüssigkeitstropfens mit zunehmender Krümmung der Oberfläche beschrieben. Übertragen auf einen dispersen Feststoff bedeutet das: wird die Teilchengröße eines Partikels bis in den Bereich von etwa 2 μm und darunter verringert, entsteht ein derart stark gekrümmter Partikel, dass der Partikel eine höhere Partiallöslichkeit aufweist, als die Sättigungslöslichkeit der Substanz es möglich erscheinen lässt. Dadurch führen Nanosuspensionsformulierungen schwerlöslicher Substanzen zu einer erhöhten Löslichkeit der so formulierten Arzneistoffe (Müller et al., 1998a).

2.4.3 Möglichkeiten zur Erzeugung von Nanosuspensionen

Die Methoden zur Herstellung von Nanopartikeln beziehungsweise Nanosuspensionen lassen sich nach der Art der Herstellung in „top-down“- und „bottom-up“-Methoden unterscheiden. Bei den top-down Methoden erfolgt dabei eine *Zerkleinerung* von Partikeln im unteren Mikrometerbereich mit Hilfe geeigneter Zerkleinerungsverfahren bis in den Nanometerbereich. Zu den gebräuchlichsten Verfahren gehören dabei das Mahlen in Rührwerkskugelmöhlen (Merisko-Liversidge, et al., 2003) sowie die Hochdruckhomogenisation (Keck und Müller, 2006). Bei den bottom-up Methoden handelt es sich um aufbauende Verfahren. Die Partikel werden durch Assoziation von Molekülen aus einer wirkstoffhaltigen Lösung oder durch Polymerisation von Monomeren aus einer Lösung hergestellt. Mit Hilfe dieser Methoden können Nanopartikel beliebiger Größe hergestellt werden, da sich der Aufbauprozess an beliebiger Stelle stoppen lässt. Grundsätzlich kann dabei nach folgenden Herstellungsverfahren unterschieden werden:

1. Polymerisation von Monomer- oder Oligomermolekülen aus wässriger Phase
2. Polymerisation und Vernetzung aus hydrophilen O/W-Emulsionen
3. Polymerisation und Vernetzung aus ultrafeinen lipophilen W/O – Emulsionen
4. Grenzflächenpolymerisation und –polykondensation
5. Physikalische Methoden: Solvent Deposition und Solvent Evaporation
6. Wirkstoffbeladung während und nach der Herstellung durch Adsorption und Adhäsion

(Hou, et al., 2007; Müller et al., 1998b).

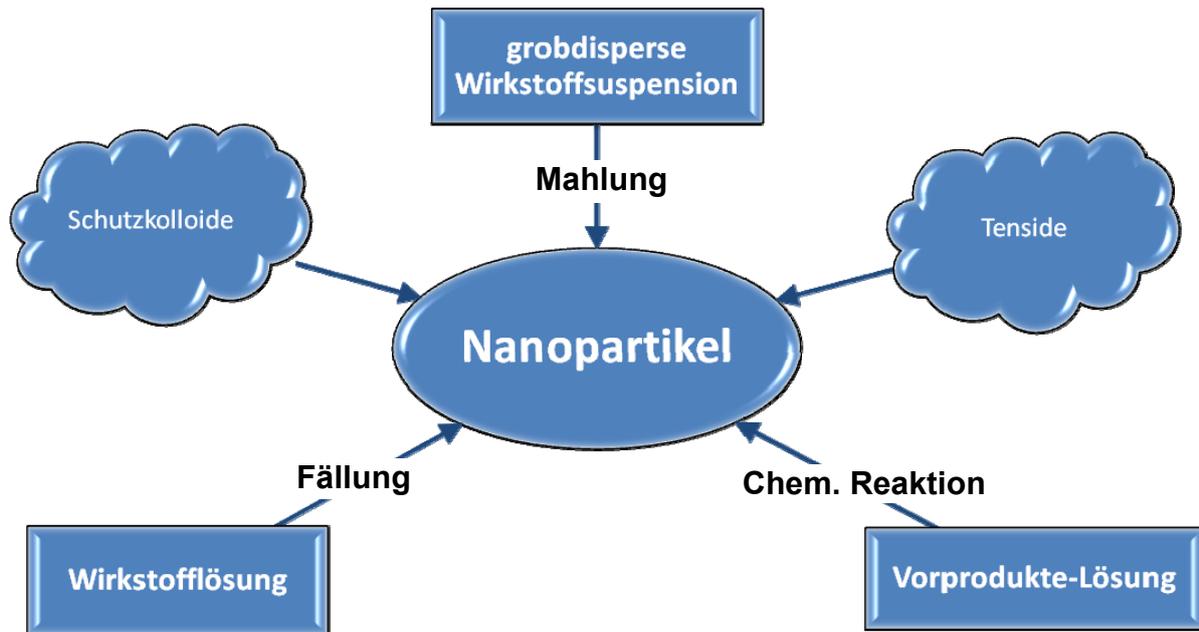


Abbildung 2.4-2: Methoden zur Herstellung von Nanopartikeln (nach Horn und Rieger, 2001)

Zur Erzeugung von Nanosuspensionen werden vorrangig Zerkleinerungsverfahren wie die zuvor erwähnte Hochdruckhomogenisation oder das Mahlen in Rührwerkskugelmöhlen eingesetzt (Stenger, 2005). Dazu wird eine (Makro)Suspension hergestellt, deren disperse Phase anschließend durch eine intensive Beanspruchung zerkleinert wird. Dabei ist zu berücksichtigen, dass ein solches Verfahren einen hohen Energieeintrag in das System bedeutet. In der Regel müssen die Partikel, deren Oberfläche enorm vergrößert wird, außerdem durch einen geeigneten Hilfsstoffzusatz vor Agglomeration geschützt werden (siehe Abbildung 2.4-2). Ein Upscaling ist meist problemlos und die Herstellverfahren liefern in der Regel eine enge Teilchengrößenverteilung und gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Außerdem sind die Verfahren in einem weiten Konzentrationsbereich flexibel in der Konzentration des eingesetzten Feststoffes. Feststoffgehalte von 1 bis 400 mg/ml sind erreichbar, was sehr gering bis hoch konzentrierte Suspensionen ermöglicht.

2.5 Mühlen zur Erzeugung von Nanosuspensionen

2.5.1 Rührwerkskugelmühle

Bei Rührwerkskugelmühlen handelt es sich um eine Sonderform der Kugelmühlen. Es sind sowohl Geräte mit horizontaler als auch vertikaler Mahlkammer üblich. Die Mahlkammer ist mit losen Mahlkörpern gefüllt, die von einem Rotor bewegt werden. Je nach Verwendung und Beschaffenheit der Mühle können die Mahlkörper im Größenbereich von mehreren Zentimetern Durchmesser bis in den Mikrometerbereich liegen. Für pharmazeutische Anwendungen werden die Mühlen für die Zerkleinerung in den Nanometerbereich genutzt, wobei Mahlkörper mit einer Größe im Mikrometer- bis Millimeterbereich eingesetzt werden.

Die verwendete Mühle der Firma VMA Getzmann (VMA Getzmann GmbH, Reichshof, Deutschland) verfügt über eine horizontal liegende Mahlkammer, die von einem Kühlmantel umgeben ist. Das Volumen der Kammer beträgt bei dem verwendeten Modell 50 ml. Wie in Abbildung 2.5-1 zu sehen, ist ein Vorratsgefäß mit einem Volumen von 1000 ml auf die Mahlkammer aufgesetzt. Die Förderung der Suspension durch die Mahlkammer erfolgt mit einer Pump- und Rühreinheit (Dissolver), die auf das Vorratsgefäß aufgesetzt ist. Der Motor treibt dabei eine Welle an, an deren Ende eine Pumpscheibe befestigt ist. An der Welle über der Pumpscheibe befindet sich eine Dissolverscheibe, die die Suspension im Vorratsbehältnis bei Rotation der Welle in Bewegung hält und so eine Sedimentation der Partikel verhindert. Bei Rotation der Pumpscheibe wird die Suspension von oben aus dem Vorratsgefäß zentrisch angesogen und nach unten in die Mahlkammer gedrückt.

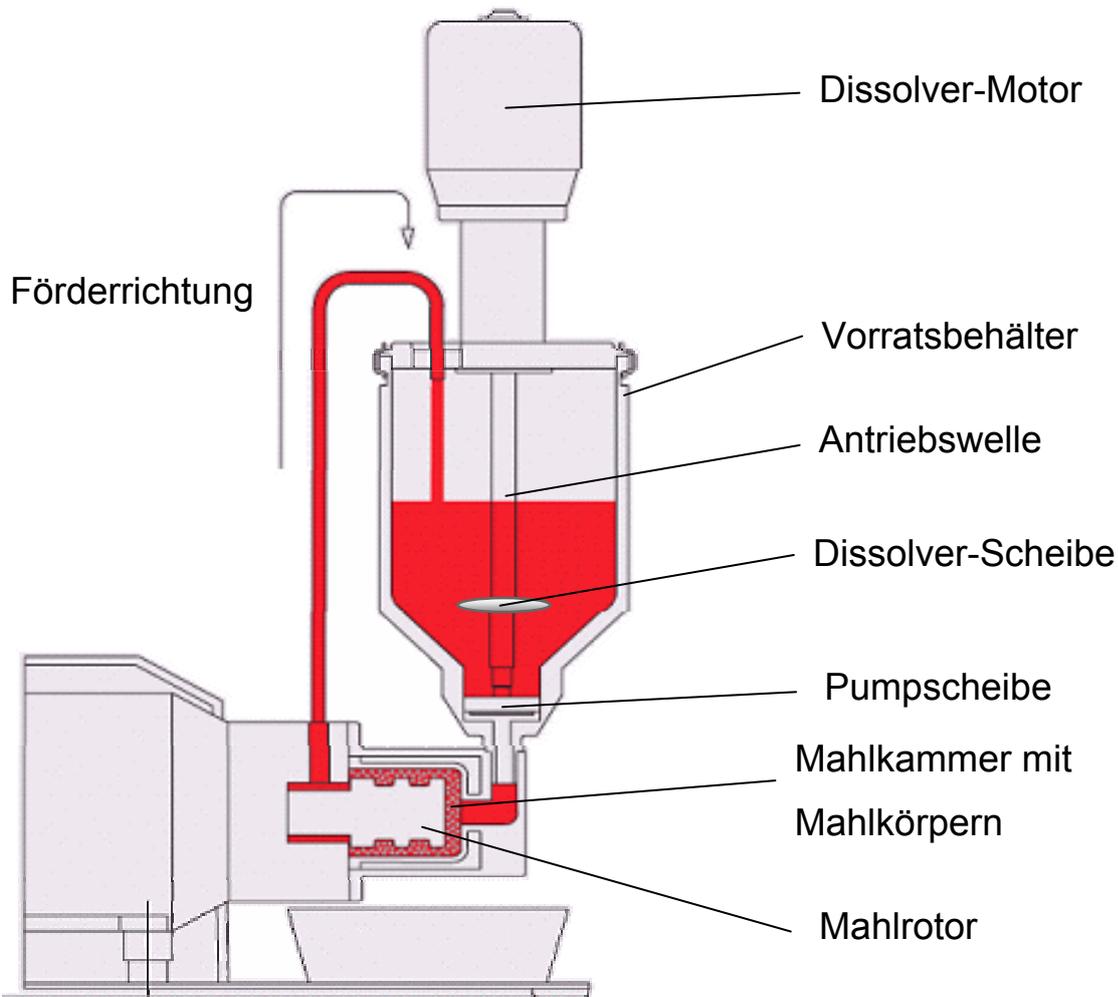


Abbildung 2.5-1: Schematische Darstellung der Rührwerkskugelmühle im Zirkulationsbetrieb

Nach Passage der Mahlchamber tritt die Suspension seitlich über einen Produktauslass aus, in dem auch der Temperaturfühler befestigt ist. Die Temperatur der Suspension wird also nach Passage der Mahlchamber ermittelt. Die Mahlung kann im Zirkulationsbetrieb oder nach dem Passageverfahren erfolgen. Bei ersterem wird die Suspension, die aus der Mahlchamber austritt, wieder in den Vorratsbehälter gefördert und kann die Mahlchamber sofort wieder durchlaufen. Beim Passageverfahren durchläuft die Suspension nur einmal komplett die Mahlchamber und wird anschließend in einem Gefäß aufgefangen. Die aufgefangene Suspension kann für weitere Passagen wieder in den Vorratsbehälter der Mühle überführt werden. Die Anzahl der erfolgten Passagen kann als Prozessparameter genutzt werden.

Außerdem bietet das Passageverfahren eine bessere Temperaturkontrolle bei temperaturempfindlichen Suspensionen.

Da die Mühle für die Entwicklung pharmazeutischer Formulierungen bestimmt war, wurde bei der Auswahl der Komponenten der Mühle besonderer Wert auf die Abriebsbeständigkeit gelegt. Um einen möglichst geringen Abrieb der Mahlkammerwandung zu gewährleisten, besteht die Auskleidung aus siliziuminfiltriertem Siliziumkarbid (SiSiC). Das Material bietet den Vorteil einer großen Härte von 9,6 auf der Mohs Skala. Der Diamant hat nach dieser Skala mit einem Wert von 10 die größte Härte. Alle Härten werden relativ zueinander angegeben, wobei immer das Material mit der höheren Kennzahl befähigt ist, das mit der niedrigeren Kennzahl anzuritzen. Vorteilhaft wirkt sich weiterhin die gute Wärmeleitfähigkeit aus. Die Abwärme, die während des Mahlprozesses entsteht, kann so über eine Gegenkühlung abgeführt werden. Nachteilig ist, dass SiSiC sehr spröde ist und somit nicht für alle Bauteile verwendet werden kann. Der Mahlrotor besteht aus einer Zirkonoxid-Keramik, die ebenfalls als sehr abriebsarm angesehen werden kann. Die Hochleistungskeramik Zirkoniumdioxid (ZrO_2) gehört zu der Gruppe der Oxidkeramiken und ist ein nichtmetallischer, anorganischer Werkstoff. Die Trennung von Suspension und Mahlkörpern vor dem Verlassen der Mahlkammer wird bei Rührwerkskugelmühlen mit Hilfe einer Siebpatrone oder eines dynamischen Reibspaltes ermöglicht. Die verwendete Mühle arbeitet mit der Abtrennung durch einen Reibspalt. Dies ist ein Spalt zwischen Rotor und Rückwand der Mahlkammer, der auf eine definierte Breite eingestellt ist. Bei der verwendeten Mühle betrug die Spaltbreite 100 μm . Die Suspension kann somit durch den Spalt abgepumpt werden, während die Mahlkörper zu groß sind und in der Mahlkammer zurückgehalten werden. Für die Auswahl der Mahlkörper ist allerdings zu beachten, dass diese mindestens die dreifache Größe des Reibspaltes

aufweisen müssen, da es sonst zu einem Verkanten der Mahlkörper im Reibspalt und einer Beschädigung des Mahlrotors kommen kann. Nach Passieren des Reibspaltes wird die Suspension durch eine seitliche Bohrung des Flansches durch den Produktauslass und ein Schlauchsystem zurück in den Vorratsbehälter gepumpt. Die übliche Mahldauer in Rührwerkskugelmühlen beträgt 30 Minuten bis mehrere Tage, wobei Mahlzeiten im pharmazeutischen Bereich eher im Bereich von 30 Minuten bis einigen Stunden liegen (Merisko-Liversidge et al., 2003).

Die Steuerung der Mühle erfolgt über ein Bedienfeld mit Digitaldisplay, auf dem die wichtigsten Parameter der Mahlung abgelesen werden können. Dies sind vor allem die Drehzahl, die Mahldauer, der Leistungseintrag und die Produkttemperatur. Diese wird über einen Temperaturfühler am Produktauslass in der Suspension ermittelt. Außerdem verfügt die Mühle über die Möglichkeit, anstelle der Drehzahl über die Leistung gesteuert zu werden.

2.5.2 Umbau der Rührwerkskugelmühle

Die Mühle ist von Seiten des Herstellers mit einer Dispergier- und Pumpeinheit ausgestattet (siehe Abbildung 2.5-1), die die Suspension aus dem Vorratsbehälter durch die Mahlkammer fördert. Die Drehzahl des Dissolver-Motors wird dabei über ein Drehpotentiometer an der Mühle gesteuert. Nach ersten Versuchen stellte sich heraus, dass der vom Hersteller angebotene Aufbau für die Präparation pharmazeutischer Suspensionen mit kleinen Ansatzgrößen ungeeignet war. Das System aus Pump- und Dissolverscheibe war nicht für kleine Mengen Suspension ausgelegt. Um eine Pumpwirkung zu erzielen, waren außerdem recht hohe Drehzahlen des Dissolver-Motors erforderlich, was dazu führte, dass die Suspension durch die starke Scherung der

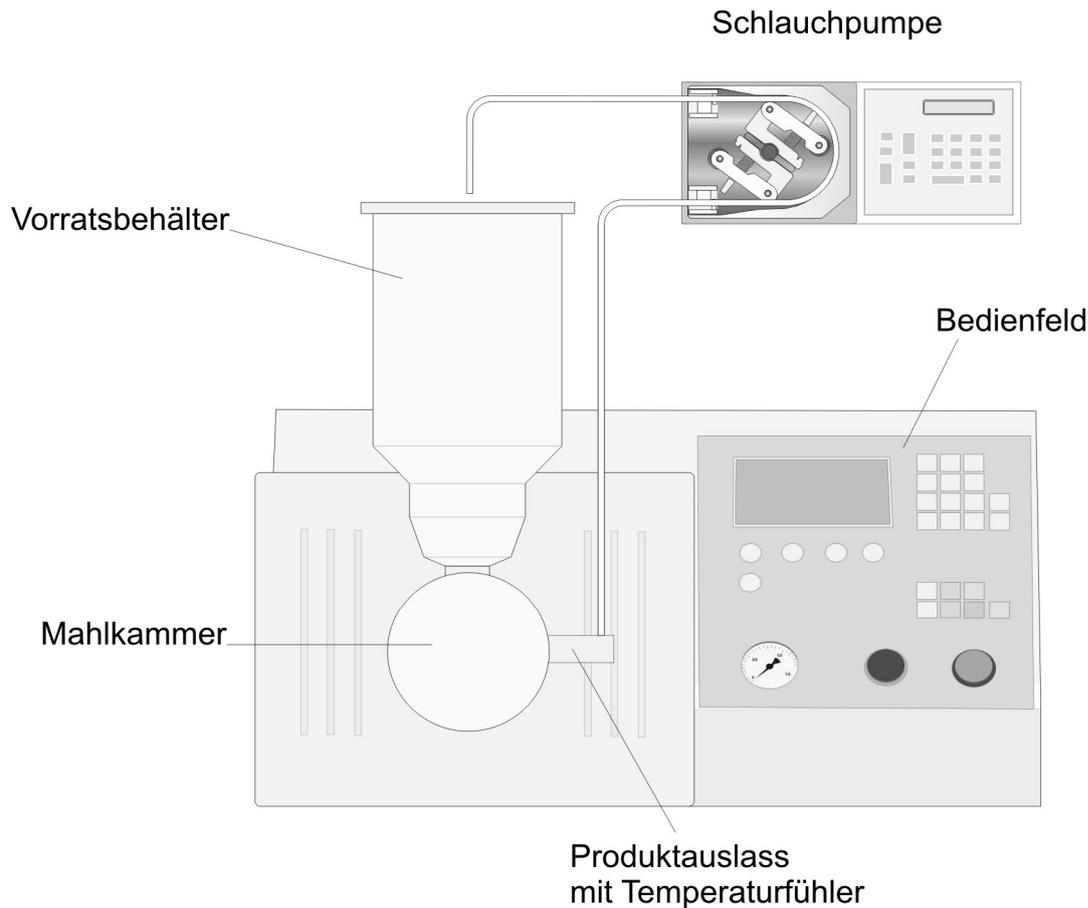


Abbildung 2.5-2: Schematische Darstellung in Aufsicht nach dem Umbau der Mühle

Dissolver- und Pumpscheibe stark zu schäumen begann. Der Produktauslass und die Produktrückführung waren ebenfalls für große Volumina ausgelegt, so dass sich ein recht großes Totvolumen ergab. Aus diesem Grund wurde der Aufbau der Mühle so verändert, dass er den eigenen Bedürfnissen entsprach. Zum einen wurde ein neuer Produktauslassstutzen gefertigt, bei dem der Durchmesser der Bohrung von 9,5 mm auf nur noch 6 mm reduziert wurde. Des Weiteren wurde das Pumpsystem mit Pump- und Dissolverscheibe demontiert und durch eine externe Schlauchpumpe (Watson Marlow, Cheltenham, England) ersetzt. Diese Umstellung von einem drückenden System auf ein saugendes Pumpsystem ermöglichte auch bei hohen Förderraten eine Schaumbildung der Suspensionen im Vorratsgefäß komplett zu

vermeiden. Als weitere Maßnahme wurde der Durchmesser des verwendeten Silikonschlauches für den Zirkulationsbetrieb von 6 mm auf einen Millimeter reduziert. Durch die Umbaumaßnahmen konnte das Volumen von Mahlkammer (bei Befüllung mit Mahlkörpern), Produktauslass und Schlauchsystem auf 33 ml gesenkt werden, was bei Verwendung hochpreisiger Arzneistoffe einen großen Vorteil darstellt.

2.5.3 Arten der Partikelzerkleinerung

Die Mahlkörper werden durch den Mahlrotor in Bewegung versetzt und in der Mahlkammer verwirbelt. Sie verfügen somit über eine recht große Bewegungsenergie, die zur Zerkleinerung der Feststoffpartikel in der Suspension genutzt werden kann. Nach Mende (Mende, 2004) erfolgt die Zerkleinerung der Partikel dabei hauptsächlich nach drei verschiedenen Mechanismen. Damit ein Partikel zwischen zwei Mahlkörpern zerkleinert werden kann, muss er zwischen diesen eingefangen und beansprucht werden. Es kann nach der Anzahl der eingefangenen Partikel zwischen drei Fällen der Beanspruchung unterschieden werden:

- *Einzelpartikelbeanspruchung:*
Nur ein Partikel wird zwischen zwei Mahlkörpern eingefangen und mit deren gesamter Prallenergie beansprucht.
- *Beanspruchung mehrerer Partikel:*
Im Gegensatz zur Einzelpartikelbeanspruchung werden mehrere Partikel zwischen zwei Mahlkörperoberflächen eingefangen. Jeder einzelne Partikel hatte am Ende des Beanspruchungsvorgangs Kontakt zu beiden Mahlkörpern und wurde unabhängig von den anderen Partikeln beansprucht. Der größte Partikel oder der Partikel, der sich am nächsten an der Verbindungslinie der beiden

Mahlkörpermittelpunkte befindet (Abbildung 2.5-3) wird bei der Annäherung der Mahlkörper als erstes eingefangen und mit der vollen Energie beansprucht. Bei allen weiteren Partikeln des Kollektivs ist die Beanspruchungsenergie geringer als beim ersten Partikel. Somit kommt es bei einem Kontakt der Mahlkörper zu mehreren Einzelpartikelbeanspruchungen mit unterschiedlichen Beanspruchungsenergien.

- *Beanspruchung eines Gutbettes:*

Bei diesem Beanspruchungstyp wird ein Gutbett zwischen den Mahlkörpern eingefangen und komplett beansprucht.

Die Anzahl der Partikel, die zwischen zwei Mahlkörpern eingefangen werden, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So spielt z.B. die Feststoffkonzentration und die Größe der Partikel eine Rolle. Wird die Konzentration des Feststoffes in der Suspension zu weit erniedrigt, sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Partikel von zwei Mahlkörpern eingefangen wird. Auch der Durchmesser d_{MK} der eingesetzten Mahlkörper hat einen Einfluss auf die Partikelzerkleinerung. Die Zerkleinerung des Partikels kann nur in einem aktiven Volumen zwischen zwei Mahlkörpern erfolgen. Der Abstand der Mahlkörperoberflächen im zerkleinerungsaktiven Volumen muss dabei kleiner sein als der Durchmesser d_p des Partikels (Abbildung 2.5-3).

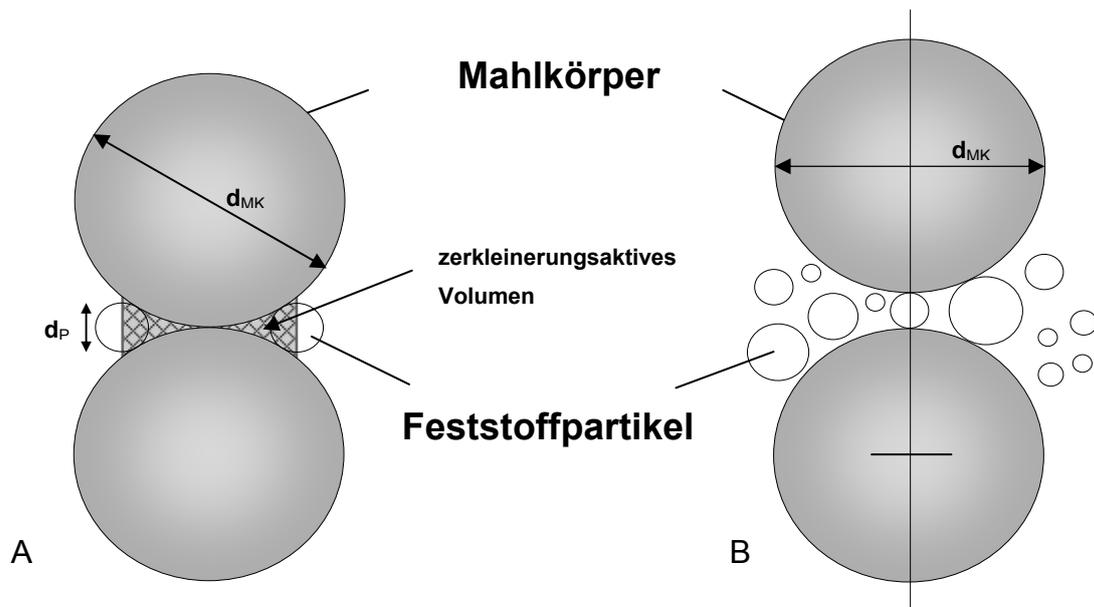


Abbildung 2.5-3: Zerkleinerungsaktives Volumen zwischen zwei Mahlkörpern (A) und Beanspruchung mehrerer Partikel (B)

Dabei muss berücksichtigt werden, dass im Verlauf der Mahlung mit der Reduktion der Partikelgröße auch das zerkleinerungsaktive Volumen zwischen zwei Mahlkörpern abnimmt. Dafür steigt jedoch die Anzahl der Partikel in der Suspension an. Ein weiterer Aspekt ist, dass bei der Annäherung zweier Mahlkörper das Suspensionsmedium zwischen ihnen verdrängt wird. Mit abnehmendem Abstand erhöht sich dabei die Geschwindigkeit der Verdrängung. Je kleiner die Partikel in der Suspension werden, desto eher werden sie mit der Strömung aus dem Spalt zwischen den Mahlkörpern gerissen und somit der weiteren Zerkleinerung entzogen. Diese Effekte führen dazu, dass sich eine Untergrenze der Partikelzerkleinerung aufgrund der verwendeten Mahlkörper ergibt.

2.5.4 Mahlkörper

Für den Betrieb in Rührwerkskugelmühlen sind Mahlkörper aus unterschiedlichen Materialien verfügbar. Die Mahlkörper befinden sich als lose Schüttung in der Mahlkammer der Mühle. Sie werden vom Mahlrotor der Mühle in Bewegung versetzt und sind das zerkleinerungsaktive Medium. Unter dem Überbegriff Mahlkörper sind alle zur Mahlung eingesetzten Formen zusammengefasst. Dies können zylindrische oder sphärische Körper sein. Bei sphärischen Mahlkörpern spricht man allgemein von Mahlkugeln, unterhalb einer Größe von 3,0 mm wird eher von Mahlperlen gesprochen. Als Materialien werden hauptsächlich Glas, Stahl, Keramiken und Polymere eingesetzt. Für pharmazeutische Anwendungen spielt neben der Zerkleinerungswirkung jedoch vor allem der Abrieb der Mahlkörper eine entscheidende Rolle, da dieser eine Verunreinigung des Produktes darstellt. Ein interessanter Ansatz zur Lösung der Problematik wurde von Juhnke verfolgt (Juhnke und Weichert, 2005a; Juhnke und Weichert, 2005b). Es wurden über ein Tropfverfahren in flüssigen Stickstoff kleine Mahlkörper aus Eis hergestellt. Bei der Mahlung unter tiefen Temperaturen konnte gezeigt werden, dass sie zur Herstellung von Nanopartikeln geeignet waren. Als großer Nachteil sind allerdings die tiefen Temperaturen anzusehen, die für die Mahlung notwendig sind, was das Verfahren aufwändig und kostspielig macht. Es werden daher Mahlkörper benötigt, die über eine hohe Abriebsfestigkeit verfügen. Gebräuchlich sind stabilisierte Zirkonoxid-Keramiken und in den letzten Jahren vermehrt Polystyrol (Merisko-Liversidge et al., 2003) und andere Polymere.

In dieser Arbeit kamen vier verschiedenen Mahlkörpertypen zum Einsatz. Zum einen wurden zwei Chargen Keramik-Mahlperlen verwendet, die unterschiedlich stabilisiert waren, um die Abriebsfestigkeit zu erhöhen; zum anderen wurden zwei verschiedene Polymere verwendet. Dies

waren zum einen Mahlperlen aus Polystyrol und zum anderen zylindrische Polycarbonat Mahlkörper.

2.5.4.1 Zirkonoxid Mahlkörper

Zirconiumdioxid (ZrO_2) ist eine Hochleistungskeramik und gehört in die Gruppe der Oxidkeramiken. Da es nicht möglich ist, das reine Material als Werkstoff zu nutzen, werden ca. 5% weitere Metalloxide zugesetzt, um die Keramik zu stabilisieren. Durch den Zusatz wird die tetragonale Struktur des Materials bei Raumtemperatur stabilisiert, wodurch die Keramik ihre Festigkeit erhält. Sie zeichnet sich durch ihre hohe Beständigkeit gegenüber Lösemitteln und ihre gute Abriebsfestigkeit aus. Für die Untersuchungen wurden zwei Typen von Mahlperlen aus Zirkonoxid verwendet. Als stabilisierender Zusatz waren diesen zum einen Yttriumoxid (Y_2O_3) und zum anderen Ceroxid (CeO) zugesetzt.

Tabelle 2.5-1: Kennzahlen der stabilisierten Zirkonoxid Mahlperlen

	Zirkonoxid Cer stabilisiert	Zirkonoxid Yttrium stabilisiert
Farbe	braun	weiß
spezifisches Gewicht in [kg/l]	6,1	6,0
Schüttdichte in [kg/l]	3,5	3,6
Härte nach Mohs	>9	>8
Lebensdauer in Std.	bis 4.000	bis 6.000

Die Mahlperlen verfügen über eine große Härte von 8 bis 9 auf der Mohs-Skala. Aufgrund ihrer hohen Schüttdichte verfügen die Mahlperlen während des Mahlprozesses über eine hohe kinetische Energie und können durch den geringen Abrieb über einen Zeitraum von 4000 bis 6000 Stunden eingesetzt werden.

2.5.4.2 Polycarbonat-Mahlkörper

Polycarbonat ist ein glasklarer synthetischer Polyester. Das Polymer verfügt über eine hohe Schlagzähigkeit und weist eine sehr gute Biokompatibilität auf, weshalb es für die Herstellung vieler medizinischer Einmalprodukte verwendet wird. Das Polymer ist jedoch gegen viele organische Lösemittel, Säuren und Laugen nicht beständig, so dass die Beständigkeit vor dem Einsatz von Polycarbonat geklärt sein muss. Für die Durchführung der Versuche wurden Polycarbonat-Mahlkörper eingesetzt (Norstone Inc., Wyncote, USA), die nicht sphärisch, sondern zylindrisch waren. Die Größe der kleinen Zylinder betrug $380 * 380 * 540 \mu\text{m}$.

2.5.4.3 Polystyrol-Mahlkörper

Polystyrol ist ein transparentes Polymer, das aufgrund seiner Eigenschaften, genau wie Polycarbonat, breite Verwendung in vielen Bereichen des täglichen Lebens findet. Es gilt als physiologisch unbedenklich und ist z.B. für Lebensmittelverpackungen uneingeschränkt zugelassen. Die chemische Beständigkeit des Polymers ist temperaturabhängig. Es zeigt eine gute Beständigkeit gegen aliphatische Alkohole und Laugen. Auch gegenüber Säuren ist es teilweise beständig. Gegenüber organischen Lösemitteln ist die Beständigkeit jedoch gering und muss vor Verwendung geklärt werden.

Es wurden zwei Chargen Polystyrolmahlperlen mit einer Mahlkörpergröße von 0,360 – 0,610 mm sowie 0,610 – 0,990 mm verwendet (Norstone Inc., Wyncote, USA). Vor allem die Charge mit der geringeren Mahlperlengröße zeigte eine hohe Adhäsivität der Mahlkörper, was auf herstellungsbedingtes freies Styrol zurückzuführen war. Laut Herstellerangaben sollten die Mahlkörper daher vor der ersten Anwendung mit einer ausreichenden Menge heißen Wassers gespült

werden. Dazu wurde eine Perkolatorsäule mit den Mahlperlen befüllt und anschließend mit einer großen Menge 85°C heißen Wassers gespült. Bei Verwendung neuer Mahlkörper im Mahlprozess wurden diese vor Beginn der Mahlung zudem bei niedrigen Drehzahlen des Mahlrotors in der Mahlkammer mit einer ausreichenden Menge partikelfreien Wassers gespült.

Tabelle 2.5-2: Kennzahlen der verwendeten Polymer-Mahlkörper

	Polycarbonat	Polystyrol
Farbe	gelb eingefärbt	klar
spezifisches Gewicht in [kg/l]	1,20	1,05
Schüttdichte in [kg/l]	0,72	0,63

3 Methoden

3.1 Teilchengrößenbestimmung

Je nach Größenbereich der zu untersuchenden Partikel stehen unterschiedliche Messverfahren zur Verfügung.

3.1.1 Laserlichtstreuung

Da dem Verfahren der Laserlichtstreuung in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zukommt, wird auf die theoretischen Grundlagen im Folgenden näher eingegangen.

Die Bestimmung von Partikeln im Bereich unter einem Mikrometer, auch als Submikronbereich bezeichnet, kann nicht mit lichtmikroskopischen oder Lichtbeugungsverfahren erfolgen. Zur Bestimmung der Partikelgröße sind in diesem Größenbereich nur zwei Verfahren, die Elektronenmikroskopie und die Laserlichtstreuung, üblich. Ein drittes Verfahren, das Coulter-Counter Prinzip, weist gegenüber diesen beiden Verfahren einige Nachteile auf und kann seit der Verbreitung der Laserlichtstreuung als obsolet angesehen werden. Die Laserlichtstreuung, auch als Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) oder dynamische Lichtstreuung (DLS) bezeichnet, hat dabei den Vorteil der einfachen Probenpräparation und der Schnelligkeit. Eine Kalibrierung des Systems ist bei diesem Verfahren nicht erforderlich und eine Probe lässt sich innerhalb weniger Minuten analysieren.

3.1.1.1 Messprinzip

Die Laserlichtstreuung basiert auf der Messung der Brownschen Molekularbewegung der einzelnen Partikel in der Probe über die Zeit. Bei der Brownschen Molekularbewegung handelt es sich um eine statistische, ungeordnete Bewegung von Partikeln im Größenbereich unter 5 μm , die durch den Zusammenstoß mit Lösemittelmolekülen in

dem sie umgebenden Dispersionsmedium zustande kommt. Kleine Partikel werden durch die Zusammenstöße stärker angeregt und bewegen sich daher schneller. Die Brownsche Molekularbewegung kann mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung näher beschrieben werden:

Formel 3.1-1: Stokes-Einstein-Gleichung

$$d(H) = \frac{k * T}{3\pi * \eta * D}$$

$d(H)$	=	<i>hydrodynamischer Durchmesser</i>
D	=	<i>Diffusionskoeffizient</i>
T	=	<i>absolute Temperatur</i>
η	=	<i>Viskosität</i>
k	=	<i>Boltzmann Konstante</i>

Der gemessene hydrodynamische Durchmesser entspricht dabei nicht dem Volumen- oder Massendurchmesser, sondern gibt den Durchmesser einer Kugel mit äquivalenter Diffusionsgeschwindigkeit wieder (Goetting, 1998). Der Volumen- oder Massendurchmesser kann mit Hilfe der Mie-Theorie direkt aus dem Wert für $d(H)$ errechnet werden. Für die Umrechnung ist die Kenntnis der optischen Parameter (Brechungsindex und Absorptionsverhalten) der Partikel notwendig (Rawle und Nitzsche). Wie aus der Gleichung ersichtlich ist, haben Temperatur und Viskosität des Dispersionsmediums einen entscheidenden Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel. Trifft ein Lichtstrahl auf die Partikel in der Probe, wird das auftreffende Licht an diesen gestreut. Je nach Größe der Partikel kommt es dabei zu unterschiedlichen Arten der Lichtstreuung. Für die Photonenkorrelations-spektroskopie sind dabei vor allem die Rayleigh- und die Mie-Streuung von Bedeutung. Das von den Partikeln gestreute Licht dient als Messsignal (Hunnius und Ammon, 2004).

3.1.1.2 Rayleigh – Näherung

Die Rayleigh-Näherung gilt für Partikel mit einem Durchmesser von

$$d < \lambda/10.$$

Dies entspricht bei Verwendung eines Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge von 633 nm einer Partikelgröße von <70 nm. Die Partikel in diesem Größenbereich zeigen isotropes Streuverhalten, d.h. sie streuen das Licht innerhalb der Streuebene in alle Raumrichtungen intensitätsgleich ab. Deshalb bezeichnet man diese Partikel auch als "Rayleigh-Streuer". Die Anwendung der Laserlichtbeugung ist in diesem Größenbereich nicht möglich.

Rayleigh-Näherung

a. $I \sim d^6$

b. $I \sim I/\lambda^4$

I = Streulichtintensität

d = Partikeldurchmesser

λ = Wellenlänge des eingestrahnten Lichts

Der Term d^6 zeigt die extreme Abhängigkeit der Streulichtintensität von der Partikelgröße. Ein Partikel mit einem Durchmesser von 1 nm hat demnach eine um 10^{-6} geringere Streulichtintensität als ein Partikel von 10 nm Durchmesser. Die Verdopplung des Partikeldurchmessers führt bereits zu einer 64-fachen Streulichtintensität. Ergebnis dessen kann sein, dass größere Partikel aufgrund ihrer hohen Streulichtintensität das Streulicht kleinerer Teilchen praktisch "unsichtbar" machen (Rawle und Nitzsche). Die untere Messgrenze hängt folglich wesentlich von der Sauberkeit des Systems (Probe, Messzelle, Optik) und von der verfügbaren Laserintensität ab. Wenn z.B. Teilchen mit einer Größe von

1 nm zu messen sind, sollte das Dispergiermedium sehr sorgfältig filtriert werden, um sämtliche großen Teilchen (Staubpartikel) zu entfernen (Rawle und Nitzsche).

Mie-Bereich

Dieser Bereich ist definiert als der Größenbereich zwischen

$$\lambda/10 < d < 5\lambda$$

Bei Verwendung eines Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge von 633 nm ergibt sich daraus eine Partikelgröße von 70 nm bis 3 μm . Die Partikel zeigen in diesem Größenbereich keine Streuung in alle Raumrichtungen, sondern die Streustrahlung geht immer mehr in eine gerichtete Vorwärtsstreuung über. Der Zusammenhang zwischen Streuintensität und Partikelgröße kann mit Hilfe folgender Gleichung ausgedrückt werden:

$$I \sim d^2$$

d = Partikeldurchmesser

λ = Wellenlänge des eingestrahnten Lichts

Die gleichzeitige Anwesenheit kleiner und großer Teilchen hat nach dieser Beziehung nicht mehr den starken Einfluss auf die Zunahme der Streulichtintensität, wie dies im Rayleigh-Bereich der Fall ist. Eine Verdopplung der Teilchengröße von z.B. 100 nm auf 200 nm würde damit zu einer Zunahme der Streulichtintensität um das 4-fache führen.

Vergleicht man die Intensität der Messsignale über einen Zeitraum von einigen Sekunden, lässt sich eine Änderung des Messsignals feststellen. In Abbildung 3.1-1 ist eine zeitliche Abfolge der Partikelbewegung am Beispiel großer Partikel zur Veranschaulichung dargestellt. Abbildung 3.1-2 zeigt den entsprechenden Ablauf anhand kleiner, sich schneller bewegendender Partikel. Die Beobachtung beginnt bei $t=0$. Nach kurzer Zeit, bei $t=\delta t$, hat sich die Position der großen Partikel gegenüber der Ausgangsposition nur unwesentlich verändert. Die Partikel haben ihre Position gegenüber dem Ausgangszustand kaum verändert und die Korrelation der beiden Messsignale von $t=0$ und $t=\delta t$ ist somit hoch (Korrelationskoeffizient nahe 1,0). Mit fortschreitender Beobachtungszeit ändert sich die Position der Partikel und lässt die Korrelation der Messsignale abnehmen. Bei der Beobachtungszeit $t=\infty$ haben sich die Partikelpositionen so verändert, dass sich kein Partikel mehr an seiner Ausgangsposition von $t=0$ befindet. Die Korrelation der Messsignale von $t=0$ und $t=\infty$ ist somit auf null gesunken (Korrelationskoeffizient = 0). Da kleine Partikel stärker durch die Moleküle des Dispersionsmediums angeregt werden und somit eine stärkere Diffusion zeigen, ist der Zustand bei $t=\infty$, nämlich keine Korrelation zu $t=0$, in dieser Probe früher erreicht. Für die Messung der Partikelgröße ist daher eine kurze Samplezeit zur Beobachtung schneller Diffusionen, gleichzeitig aber auch eine lange Beobachtungszeit für die Messung langsamer Diffusionsprozesse notwendig (Rawle und Nitzsche). Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Messpunkten liegt im Bereich von Mikro- bzw. Nanosekunden. Die Messzeit von $t=\infty$ liegt somit im Bereich von einigen zehn Millisekunden.

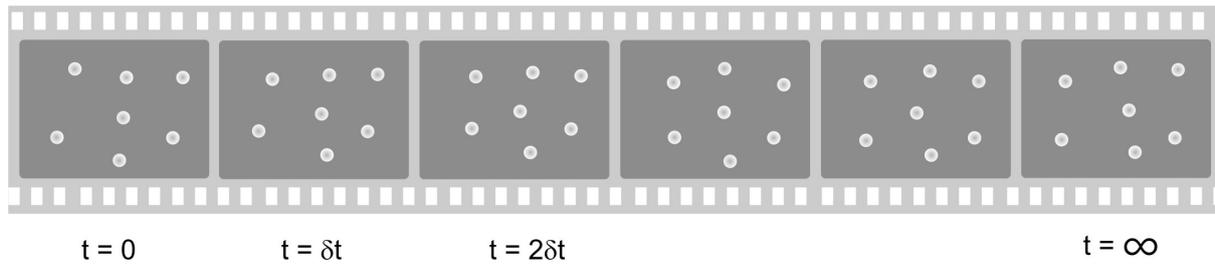


Abbildung 3.1-1: zeitliche Abfolge der Partikelbewegung am Beispiel großer Partikel

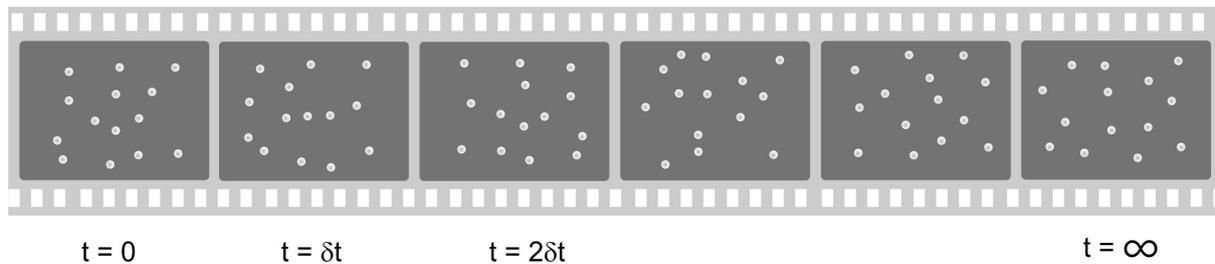


Abbildung 3.1-2: zeitliche Abfolge der Partikelbewegung am Beispiel kleiner Partikel

Je kleiner die Partikel sind, desto steiler ist der Abfall der Korrelationsfunktion, da sich die Partikel schneller bewegen. In Abbildung 3.1-3 ist der Abfall der Korrelationsfunktion G am Beispiel großer und kleiner Partikel dargestellt. Durch die langsamere Bewegung großer Partikel resultiert eine langsamere Signaländerung, was wiederum zu einem langsamen Abfall der Korrelationsfunktion führt. Die Vermessung der Proben erfolgt normalerweise in starker Verdünnung. Allerdings ist es erforderlich, dass sich eine Mindestanzahl von in etwa 10^3 Partikel in der Probe befinden, damit sich der Ein- und Austritt von Partikeln aus dem Streuvolumen nicht zu stark bemerkbar macht. Die Probe sollte dazu optisch eine leichte Opaleszenz oder „Milchigkeit“ aufweisen.

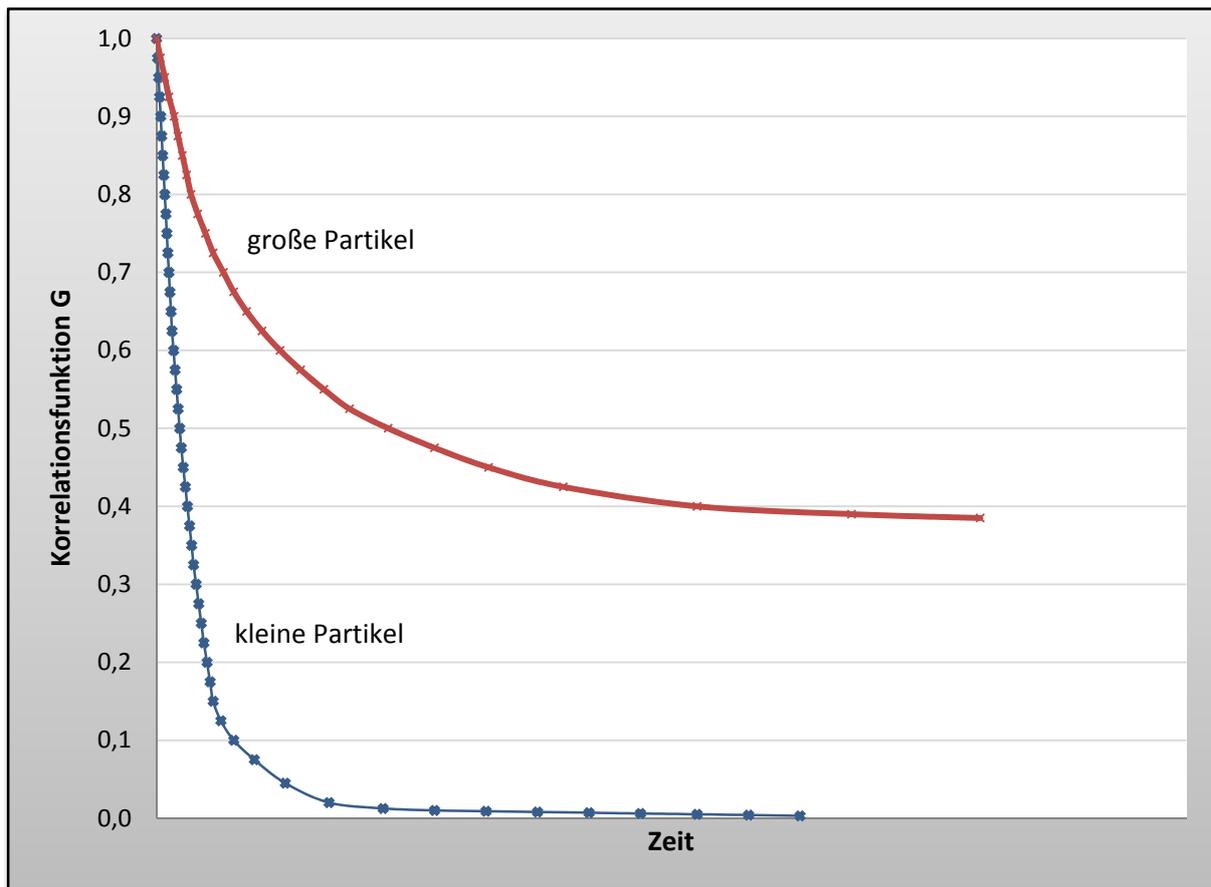


Abbildung 3.1-3: Korrelationsfunktion für große und kleine Partikel

3.1.1.3 Aufbau der Messanordnung

In Abbildung 3.1-4 ist der Aufbau der Messanordnung des verwendeten Zetasizer Nano ZS schematisch dargestellt. Als optische Einheit dient ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm. Im Strahlengang des Lasers befindet sich vor der Küvette ein Attenuator, mit dessen Hilfe die Intensität des Laserlichts abgeschwächt werden kann. Die Küvettenhalterung ist für die Aufnahme von Standardküvetten mit den Abmessung 10 x 10 mm ausgelegt und kann zur Festlegung der Messposition in der Küvette horizontal verschoben werden. Des weiteren ist die Küvettenhalterung temperierbar, um eine einheitliche Messtemperatur zu gewährleisten. Das von den Partikeln zurückgestreute Licht wird in einem Winkel von 173° zur Einstrahlposition gemessen und an den Photomultiplier geleitet.

Aufgrund der sehr geringen Lichtmenge ist es erforderlich, das gemessene Signal in einem Photomultiplier elektronisch zu verstärken. Die so aufbereiteten Signale werden an den Korrelator weitergeleitet, der die eigentliche Datenauswertung übernimmt (Nitzsche, 1997a).

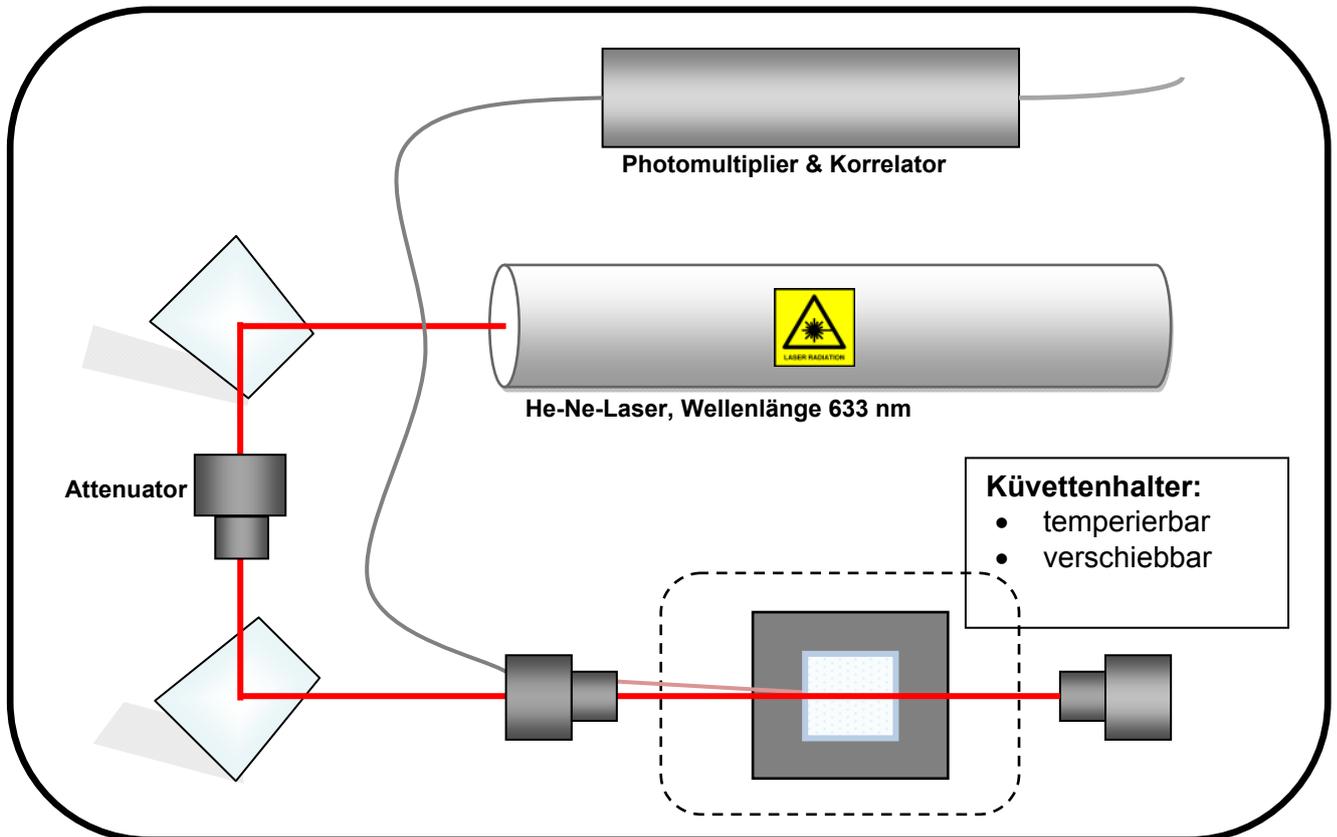


Abbildung 3.1-4: Aufbau des Zetasizer Nano ZS (nach Malvern Instruments)

3.1.1.4 Kumulantenanalyse

Die einfachste Möglichkeit der Auswertung des Messsignals ist eine Kumulantenanalyse. Da die Autokorrelationsfunktion einen exponentiellen Abfall zeigt, kann man eine halblogarithmische Darstellung wählen, um das Ergebnis linear darzustellen. Der Anstieg der linearen Regressionsgeraden liefert dabei die Z-Average Partikelgröße, die auch als mittlerer intensitätsgewichteter Partikeldurchmesser bezeichnet wird. Sie liefert jedoch nur für monomodal verteilte Proben korrekte Aussagen. Es handelt sich bei der

Angabe des Z-Average weder um eine Massen-, noch um eine Anzahlangabe. Der Wert wird ausschließlich aus den Signalintensitäten der Streulichtintensität errechnet. Möchte man über diese Angabe hinaus Volumen- oder Massenangaben seiner Probe erhalten, muss man diese mit Hilfe der Mie-Theorie errechnen. Für diese Berechnungen ist jedoch die Kenntnis der Brechungsindices von Probenpartikel und Dispersionsmedium erforderlich.

3.1.1.5 Einflussgrößen bei der Partikelgrößenbestimmung

PCS-Messungen sind sehr empfindlich gegenüber störenden Einflüssen (Gaumet, et al., 2008). So muss sichergestellt sein, dass in der Küvette ausschließlich Diffusion der zu vermessenden Partikel vorliegt. Andere Einflüsse, wie z.B. Vibrationen, Sedimentation zu großer Partikel, Flotation oder Konvektion sind auszuschließen. Bei zu großen Partikeln, die aufgrund ihrer Größe einer zu schnellen Sedimentation unterliegen, ist das Messverfahren daher ungeeignet. Die obere Messgrenze der Photonenkorrelationsspektroskopie ist begrenzt durch die Sedimentation der Partikel in der Probe. Für das in dieser Arbeit verwendete Gerät der Firma Malvern ist ein Größenmessbereich von 0,6 bis 6000 nm angegeben. Bei Feststoffen mit einer hohen Dichte liegt die Messgrenze in wässrigem Medium jedoch niedriger als für Feststoffe mit einer geringen Dichte in gleichem Medium. Für die meisten Proben im pharmazeutischen Bereich kann eine obere Messgrenze von 5 bis 10 μm angenommen werden (Rawle und Nitzsche). Wie aus der Stokes-Einstein-Gleichung ersichtlich ist, haben Viskosität und Temperatur einen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel. Je höher die Viskosität des Dispersionsmediums ist, desto eingeschränkter ist die Brownsche Molekularbewegung. Die Messung der Partikelbewegung hängt somit stark von der Viskosität der Probe ab. Der zweite gewichtige Faktor der Stokes-Einstein-Gleichung ist die Temperatur der Probe. Bei

höherer Temperatur bewegen sich die Partikel aufgrund der erhöhten Molekularbewegung schneller. Außerdem hat die Temperatur wiederum Einfluss auf die Viskosität der Probe, was ebenfalls zu berücksichtigen ist. Bei einer unzureichenden Temperierung der Probe vor Messbeginn kann es zu Konvektionsströmungen innerhalb der Küvette und damit zu einer unkontrollierten Teilchenbewegung kommen. Es ist daher wichtig, bei Messtemperaturen, die von der Raumtemperatur abweichen, eine ausreichende Equilibrierungszeit der Probe zu berücksichtigen, um diese Effekte auszuschließen. Des Weiteren hat die Sauberkeit der Probe einen entscheidenden Einfluss auf das Messergebnis. Wie anhand der Rayleigh-Näherung bereits beschrieben wurde, führt die Koexistenz kleiner und großer Partikel in einer Probe zu fehlerhaften Messergebnissen. Daher kann es durch Staubpartikel, deren Größe normalerweise im Mikrometerbereich liegt, zu starken Verfälschungen des Messwertes kommen. Werden sehr kleine Partikelgrößen erwartet, sollten die Proben daher vor der Messung durch einen geeigneten Filter filtriert werden.

3.1.1.6 Polydispersitätsindex

Der Polydispersitätsindex (PDI) kann je nach Kontext seiner Verwendung unterschiedlichste Bedeutungen haben. So ist er im Bereich der Polymerchemie und Größenausschlusschromatographie ein Maß für die Massenverteilung einer Polymerprobe. Der Quotient aus massenmittlerem Molekulargewicht zu zahlenmittlerem Molekulargewicht (M_w/M_n) ist dabei der Polydispersitätsindex der Probe. Im Bereich der Laserlichtstreuung oder auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) hat er jedoch eine andere Bedeutung. Wie bereits in Abschnitt 3.1.1.4 beschrieben, wird aus den Messwerten der PCS mit Hilfe eines Korrelators eine Autokorrelationsfunktion errechnet, an die dann

anschließend eine theoretische Korrelationsfunktion angepasst wird. Die Abweichung der beiden Korrelationsfunktionen voneinander wird als Polydispersitätsindex bezeichnet (Goetting, 1998). Er ist somit ein Maß für die Verteilungsbreite, die praktisch als Varianz der Verteilung zu sehen ist. Dieser kann als Maß für die Breite der Verteilung angenommen werden und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Der Polydispersitätsindex ist ein wichtiges Maß bei der Beurteilung der erhaltenen Werte. Es ist aufgrund des Messprinzips durchaus möglich, zufriedenstellende Angaben für die Partikelgröße zu erhalten, die jedoch einen PDI-Wert nahe 1,0 haben und somit als nicht auswertbar gelten müssen. In Tabelle 3.1-1 sind Grenzen für den PDI angegeben, die bei der Beurteilung der Messergebnisse hilfreich sein können (Malvern Instr.).

Tabelle 3.1-1: Beurteilung des Polydispersitätsindex

PDI-Wert	Verteilung
< 0,05	streng monodispers
0,1 ... 0,2	enge Verteilung
0,2 ... 0,5	breite Verteilung
0,5 ... 0,7	sehr breite Verteilung
>0,7	PCS nicht auswertbar

3.1.1.7 Präparation der Proben

Vor der Vermessung wurden die Proben zum Erreichen der entsprechenden optischen Dichte mit Wasser verdünnt und anschließend in Polystyrol-Einmalküvetten in dem auf 25°C temperierten Gerät vermessen. Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte nach einer festgelegten Methode, bei der 10 Einzelruns à 30 Sekunden Messdauer eine Messung ergaben. Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte drei mal.

3.1.2 Laserlichtbeugung

Bei der Vermessung von Partikeln im Größenbereich über dem Bereich der PCS ist die Laserlichtbeugung ein etabliertes Verfahren. Die Methode hat sich mittlerweile als Standard für die Charakterisierung und Qualitätskontrolle in vielen Bereichen der Industrie durchgesetzt. Die für das Verfahren geeignete Teilchengröße beträgt nach der ISO-Norm 13320 zwischen 0,1 und 3000 μm . Die Analyse beruht auf dem nach Fraunhofer beschriebenen Phänomen der Lichtbeugung. Das auf die Partikel treffende Licht wird an diesen entsprechend der Partikelgröße gebeugt, über eine Linse gebündelt und auf einen Ringdetektor geworfen. Die Dispergierung kann in Flüssigkeit in der Küvette oder im Druckluftstrom erfolgen.

Zum Einsatz kam ein HELOS-System (**H**elium-**N**eon **L**aser **O**ptisches **S**ystem) der Firma Sympatec (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland).

3.1.3 Mikroskopische Verfahren

Mit den mikroskopischen Verfahren ist es möglich, einen „direkten“ Blick auf die Partikel in der Probe zu werfen. Es ist somit möglich, sowohl die Form der Partikel zu beurteilen, als auch eine Aussage über Agglomeration von Partikeln zu treffen. Aufgrund der großen Anzahl von Partikeln in einer Probe ist es mit Hilfe der Mikroskopie jedoch nur möglich, einen kleinen Ausschnitt der Partikel in der Probe zu betrachten. Ein Gramm einer Probe mit Partikeln von 10 μm Durchmesser enthält beispielsweise $760 \cdot 10^6$ Partikel. Diese Anzahl kann niemals mit Hilfe lichtmikroskopischer Verfahren betrachtet werden. Eine Kopplung der Lichtmikroskopie mit Bildanalyse-Systemen, die in der Lage sind, eine Vielzahl von Partikel mikroskopisch auszuwerten, ermöglicht es jedoch, einen repräsentativen Stichprobenumfang zu

untersuchen. Unterscheiden kann man bei den mikroskopischen Verfahren nach zwei Verfahren, die je nach Größenbereich der zu analysierenden Partikel zur Anwendung kommen können.

3.1.3.1 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie ist ein Verfahren, bei dem die Wellenlänge des Lichtes die limitierende Größe der Messung darstellt. Das Verfahren ermöglicht daher nur die Betrachtung von Proben bis zu einer Größe von ca. 1 μm . Das Verfahren hat den Vorteil der einfachen Probenpräparation sowie der geringen Kosten. Außerdem erschließen sich bei der Kopplung lichtmikroskopische Systeme mit digitaler Technik neue Möglichkeiten.

3.1.3.2 Elektronenmikroskopie

Sind die zu betrachtenden Strukturen kleiner als die Messgrenze der Lichtmikroskopie, ermöglicht die Elektronenmikroskopie die Betrachtung der Strukturen. Die Elektronenmikroskopie ist ebenfalls ein bildgebendes Verfahren. Allerdings wird die Oberfläche mit Hilfe eines Elektronenstrahls abgetastet. Der Vorteil des Verfahrens ist die hohe Auflösung der Geräte, die nicht auf die Wellenlänge des Lichtes beschränkt ist. Die zu untersuchende Probe lässt sich in hoher Auflösung und Vergrößerung darstellen. Allerdings ist es nur möglich, trockene Proben zu betrachten und die Präparation der Proben ist recht aufwendig und teuer. Die Proben wurden auf einem Aluminium-Probenträger fixiert, der mit einem elektrisch leitfähigen Kohlenstoffpad beklebt war. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben in einem Sputter Coater mit einer dünnen Goldschicht überzogen. Die verwendeten Geräte sind im Anhang aufgeführt.

3.2 Zetapotential

Das Oberflächenpotential von Partikeln in Suspension lässt sich nicht direkt ermitteln. Elektrolyte in der Lösung bilden eine diffuse Schicht um die geladenen Partikel und gleichen deren Potential nach außen hin aus, was die Partikel ungeladen erscheinen lässt. Zur Bestimmung der Oberflächenladung muss die diffuse Schicht daher entfernt werden. Dazu macht man sich zunutze, dass geladene Partikel im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung wandern. Durch diese Bewegung wird die diffuse Schicht an Elektrolyten abgeschert und die wahre Oberflächenladung ist der Messung zugänglich (Müller et al., 1996; Nitzsche, 1997b). Die Messung erfolgt im Zetasizer mit Hilfe der Beobachtung der Partikelwanderung nach Anlegen einer elektrischen Spannung an die Messküvette.

3.3 Kapillarviskosimeter

Die Viskosität idealviskoser Proben lässt sich mit Hilfe eines Kapillarviskosimeters vermessen. Man macht sich bei der Messung die Tatsache zunutze, dass die Auslaufgeschwindigkeit einer Flüssigkeit aus einer Kapillare der Viskosität umgekehrt proportional ist. Die Auslaufgeschwindigkeit folgt dabei dem Hagen-Poiseuilleschen-Gesetz. Die zu vermessende Flüssigkeit wird in das Vorratsgefäß (A) des Viskosimeters gefüllt und die Flüssigkeit anschließend durch die Kapillare bis zur Füllung der Vorratskugeln (B & C) hochgesaugt. Zur Messung wird sie durch die Kapillare (K) zurück in das Vorratsgefäß laufen gelassen, wobei die Zeit gemessen wird, die der Flüssigkeitsspiegel zum Passieren der beiden Messmarken m_1 und m_2 benötigt (Bauer et al., 1999).

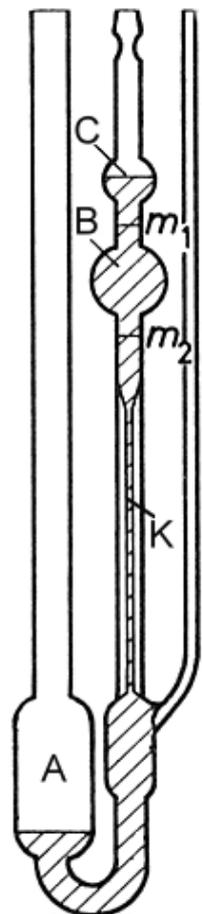


Abbildung 3.3-1:
Kapillarviskosimeter
nach Ubbelohde

3.4 Präparation der Suspensionen

Vor Beginn der Mahlung wurde die Mühle bis zum Dichtungssystem demontiert und komplett gereinigt. Nach dem Zusammenbau des Mahlsystems wurde die Mahlkammer der Mühle für die Herstellung der Suspensionen mit 80% Mahlperlen befüllt, was bei einem Mahlkammervolumen von 50 ml einem Volumen von ca. 40 ml entsprach. Die Mahlkörper wurden in einem Standzylinder volumetrisch abgemessen und in das Vorratsgefäß der Mühle gegeben. Dann wurde der Mahlrotor der Mühle mit einer Drehzahl von 100-200 U/Min gestartet und die Mahlkörper per Druckluft in die Mahlkammer eingeblasen. Anschließend wurde ausgiebig mit partikelfreiem Wasser gespült, um Staubpartikel oder Reinigungsrückstände komplett zu entfernen. Da eine Kontamination der Ausgangssuspension mit Fremdpartikeln, wie z.B. Staub, zu verfälschten Messergebnissen bei der Partikelgrößenanalyse geführt hätte, wurde bei der Herstellung der Suspensionen sehr sorgfältig vorgegangen, um Verunreinigungen weitestgehend auszuschließen. Um dies zu gewährleisten, wurden die Suspensionen in Gefäßen angesetzt, die zuvor mehrfach mit partikelfreiem Wasser gespült wurden. In die Gefäße wurden das verwendete Tensid sowie die benötigte Menge Aqua purificata eingewogen und das Tensid auf dem Laborschüttler vollständig gelöst. Anschließend wurde der Wirkstoff in das Gefäß eingewogen und mit Hilfe eines UltraTurrax in der Lösung dispergiert. Die hergestellte Suspension wurde direkt nach der Dispergierung in die Mahlkammer der Rührwerkskugelmühle überführt und der Mahlvorgang gestartet. Während der Mahlung wurden die Konsistenz der Suspension sowie die Pumpgeschwindigkeit in regelmäßigen Abständen kontrolliert und gegebenenfalls regulierend in den Prozess eingegriffen. Die hergestellten Suspensionen wurden mit einer Mahlzeit von bis zu 240 Min. im Zirkulationsverfahren hergestellt.

Die Mahlkammer wurde während der Mahlung über ein externes Kühlbad auf 10°C gekühlt. Die resultierende Temperatur der Suspensionen ließ sich damit gut kontrollieren und lag zwischen 20 und 25°C. Zur Partikelgrößenbestimmung wurden nach 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten Proben direkt aus dem Rücklaufschlauch der Mühle entnommen um sicherzustellen, dass die Partikel direkt aus der Mahlkammer kamen und kein eventuelles Totvolumen aus dem Vorratsgefäß untersucht wurde. Die Proben wurden in fabrikneue Glasvials überführt, die mit einem teflonisierten Gummistopfen verschlossen wurden. Die Vermessung der Proben erfolgte mit Hilfe der Laserlichtstreuung direkt nach der Entnahme der Probe aus der Mahlkammer. Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette wurden 10 µl der Probe entnommen und in eine Polystyrol-Einmalküvette überführt. In der Küvette wurde die Probe dann mit 1000 µl partikelfreiem Wasser verdünnt, so dass sich eine leicht trübe, durchscheinende Suspension ergab. Die Abwesenheit störender Staubpartikel in der Küvette wurde optisch im Gegenlicht kontrolliert und die Messung daraufhin gestartet.

4 Verwendete Materialien

4.1 Reinstwasser

Die Partikelfreiheit der Proben spielt gerade bei der Messung der Nanosuspensionsformulierungen eine entscheidende Rolle. Enthalten die Proben Verunreinigungen, die oft im Mikrometerbereich liegen, streuen diese das Licht und können zu fehlerhaften Messungen der Proben führen. Daher wurde Wert auf die Partikelfreiheit der Proben gelegt. Um dies zu gewährleisten, wurde partikelfreies Wasser aus einer Seralpur Delta Einheit (Seral Reinstwasser-Systeme, Ransbach-Baumbach, Deutschland) für die Versuche verwendet. In diesem System wird Aqua dem. aus der hauseigenen Demineralisationsanlage über ein Kartuschensystem weiter aufgereinigt. Das so aufgereinigte Wasser wird am Entnahmehahn nochmals durch eine Filterkartusche geleitet, die einen Partikel- (0,8 μm) sowie einen Sterilfilter (0,2 μm) enthält. Die Leitfähigkeit des so erhaltenen Wassers liegt bei 0,055 μS . Zur Vermeidung von Re-Ionisierung des Wassers bei Stillstand der Anlage wird das Wasser in der Anlage in einem Intervall von 50 Minuten über einen Zeitraum von 10 Minuten rezirkuliert. Das Wasser wurde mit Hilfe der Laserlichtstreuung auf Partikelfreiheit untersucht. Die Messung ergab eine so geringe Lichtstreuung, dass eine Auswertung des Signals nicht möglich war und das Wasser als partikelfrei angenommen werden kann.

4.2 Stabilisatoren

Partikel neigen bei Zerkleinerung in den Nanometerbereich stark zur Aggregation. Daher ist die Verwendung eines Stabilisatorzusatzes notwendig. Da die zu entwickelnden Formulierungen zur Applikation in der Lunge bestimmt waren, war die Auswahl des stabilisierenden Zusatzes stark eingeschränkt. Ausgewählt wurden daher Stoffe, die in

bereits zugelassenen Produkten Verwendung finden. Dies sind vor allem Polysorbat 80 sowie Poloxamer 188. Als weitere Substanz wurde Solutol HS 15 ausgewählt, da es auf Schleimhäuten eine sehr gute Verträglichkeit zeigt und auch für die Herstellung von Parenteralia eingesetzt wird.

4.2.1 Polysorbat 80

Bei Polysorbat 80 handelt es sich um ein nicht-ionogenes Tensid. Die Substanz ist ein Polyoxyethylen-Sorbitan-Fettsäureester. Bei den Fettsäuren handelt es sich hauptsächlich um Ölsäure. Die Konsistenz ist leicht ölig mit einer Viskosität von ca. 400 mPa*s bei 25°C. Es ist leicht gelblich bis bräunlich gefärbt und klar. Polysorbat 80 ist ein Tensid mit einem HLB-Wert von 15, das somit gut in wässrigen Systemen löslich ist (Europäisches Arzneibuch, 2005).

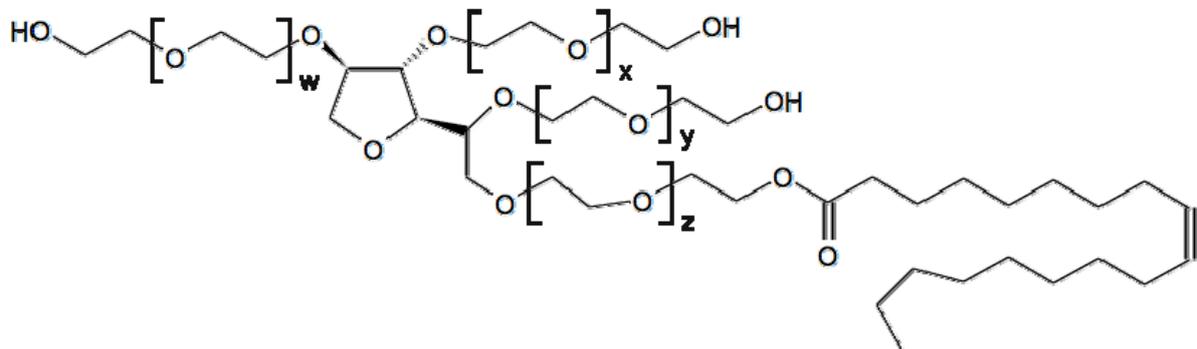


Abbildung 4.2-1: Polysorbat 80

4.2.2 Poloxamer 188

Die Poloxamere sind Blockpolymere, die aus einem zentralen Polypropylenoxid mit zwei endständigen Macrogol-Anteilen zusammengesetzt sind. Sie zählen zu den makromolekularen nichtionischen Tensiden und werden durch eine zwei- oder dreistellige Ziffernfolge charakterisiert. Multipliziert man die letzte Ziffer mit dem Faktor 10, ergibt sich in etwa der relative prozentuale Masseanteil der Ethylenoxid Einheiten des Moleküls. Die vordere oder die vorderen

beiden Ziffern codieren die relative Molekülmasse des Polypropylenoxidblocks. Poloxamer 188 ist ein weißes, wachsartiges, sprüherstarrtes Pulver mit einem Schmelzpunkt von 52 bis 57°C. Die Substanz ist leicht löslich in Wasser und sehr gut haut- und schleimhautverträglich. Sie wird häufig in Parenteralia eingesetzt, da sie kein Mizellbildner ist und somit nicht zur Hämolyse führt (Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker, 1986; Bauer et al., 1999).

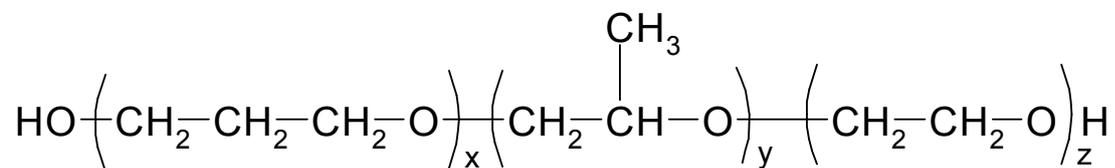


Abbildung 4.2-2: Aufbau der Poloxamere

4.2.3 Solutol[®] HS 15

Solutol HS 15 ist die Handelsbezeichnung für Macrogol 15 Hydroxystearat der Firma BASF. Es ist ein nichtionisches Tensid mit einer sehr guten Verträglichkeit und geringer Toxizität und wird vor allem für die Herstellung von Injektionslösungen eingesetzt. Die Substanz ist bei Raumtemperatur halbfest mit leicht gelblichem Aussehen und einem Schmelzpunkt von ca. 30°C.

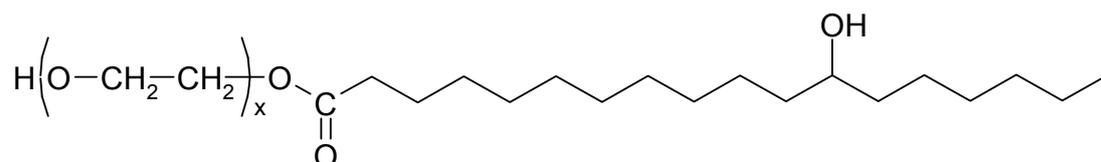


Abbildung 4.2-3: Solutol[®] HS 15

4.3 Itraconazol

Bei Itraconazol handelt es sich um ein Triazol-Antimykotikum, das vor allem zur systemischen Behandlung von Pilzinfektionen verwendet wird (siehe Abschnitt 2.3.1). Die Substanz ist ein weißes Pulver mit einem Schmelzpunkt von 166°C bis 170°C, die in Wasser praktisch unlöslich ist (entspricht >10000 Volumenteile Lösungsmittel je Teil Substanz, siehe Tabelle 2.4-1). Die Ausgangsware, die zur Durchführung der Mahlungen verwendet wurde, wurde von der Firma Revive Impex (Revive Impex, Hyderabad, Indien) als mikronisierte Ware bezogen.

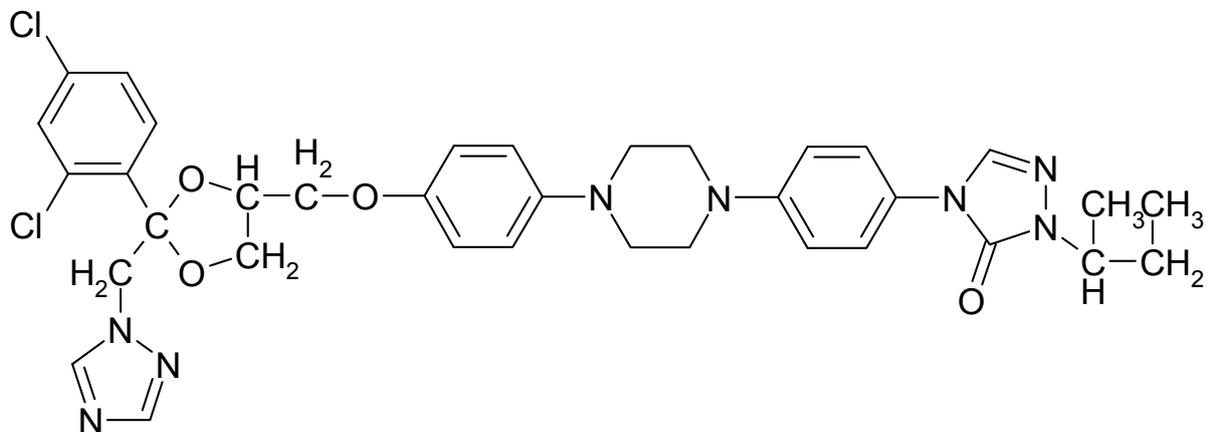


Abbildung 4.3-1: Strukturformel von Itraconazol

Vor der Herstellung der Nanosuspensionen wurde die Ausgangsware mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops und der Laserlichtbeugung und auf ihre Partikelgrößenverteilung, bzw. die Form der Partikel untersucht, um einen Eindruck von der Partikelgeometrie und -verteilung zu bekommen. Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Ausgangsware ist in Abbildung 4.3-2 zu sehen.

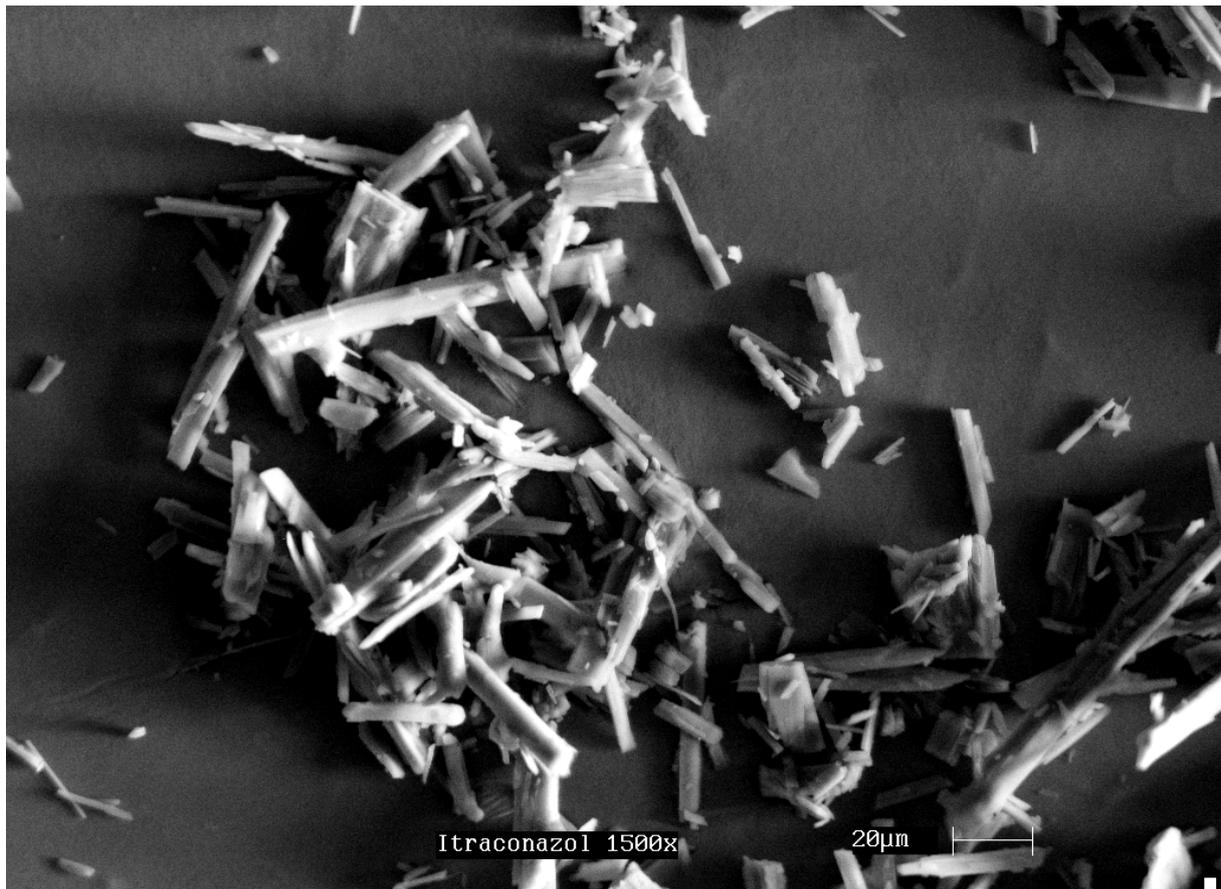


Abbildung 4.3-2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Itraconazol-Rohware in einer 1500fachen Vergrößerung und einem Mikrometerbalken von 20 µm

Wie in der Aufnahme zu sehen ist, besteht die verwendete Ausgangsware aus länglichen, nadelförmigen Partikeln. Die Länge des Mikrometerbalkens der Abbildung beträgt 20 µm. Somit liegt die Größe der Partikel in einem Bereich zwischen ca. 5 µm bis 100 µm. Aufgrund der nadelförmigen Form der Partikel lässt sich vermuten, dass sich diese sehr gut vermahlen lassen. Eine Analyse der Ausgangsware mit Hilfe der Laserlichtbeugung ergab bei Trockendispergierung einen Wert von 5,8 µm für den x_{50} der Probe (Abbildung 4.3-3). Auch der x_{90} Wert lag mit 16,83 µm deutlich unter den optisch beobachteten Partikelgrößen, was sich mit der Form und Orientierung der Partikel im Luftstrom erklären lässt. Passieren die nadelförmigen Partikel den Messtrahl in Längs- oder Querrichtung, ergibt sich für beide Orientierungen eine völlig unterschiedliche Partikelgröße (Abbildung 4.3-4).

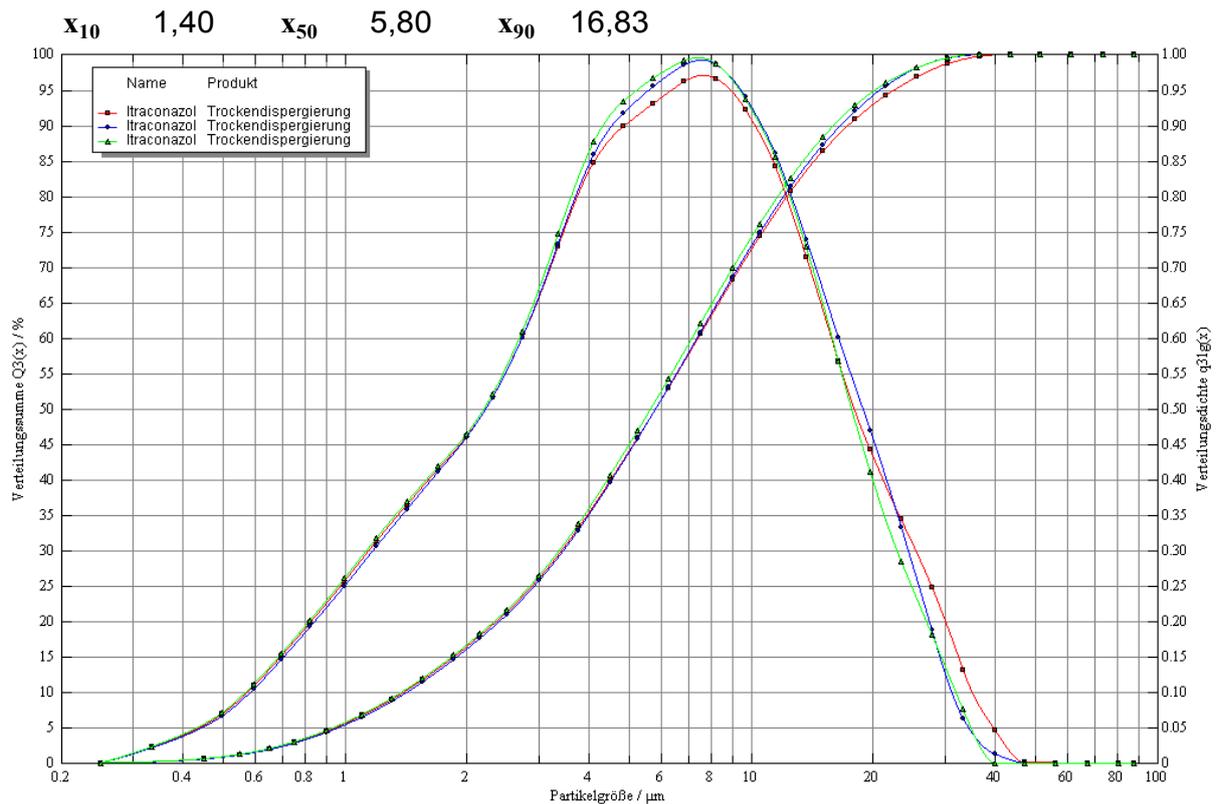


Abbildung 4.3-3: Messung der Partikelgrößenverteilung der Itraconazol Ausgangsware mit Hilfe der Laserlichtbeugung

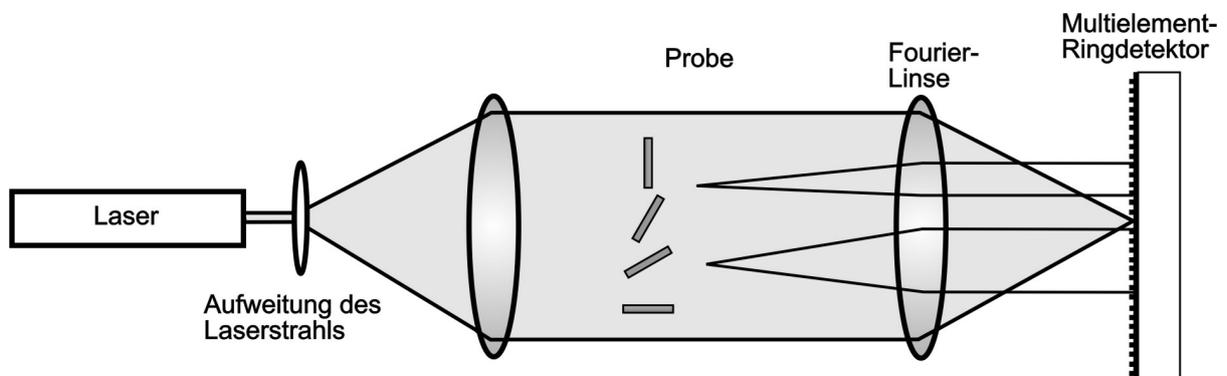


Abbildung 4.3-4: Messaufbau der Laserdiffraktometrie mit unterschiedlicher Orientierung der nadelförmigen Partikel

Die Messergebnisse der Ausgangsware von Itraconazol zeigen, dass es sich um mikronisierte Ware handelt. Da Itraconazol praktisch unlöslich in wässrigen Medien ist, wird bei der Herstellung der Ausgangssuspensionen von Partikeln im Größenbereich $>5 \mu\text{m}$ ausgegangen.

5 Praktischer Teil

5.1 *Evaluierung der Mühlenparameter*

Um reproduzierbare Mahlergebnisse erlangen zu können, ist es sinnvoll, die Parameter der Mühle und des Mahlverfahrens zu kennen. Daher wurden diese über eine Versuchsreihe evaluiert. Zur Durchführung der ersten Versuche wurde ein geeigneter Modellarzneistoff gesucht, der in großen Mengen verfügbar ist und mit dem es möglich war, die Mahlungen mit einem minimierten Kostenaufwand durchzuführen. Als geeigneter Stoff wurde Cholesterol ausgewählt, da dieses eine schlechte Löslichkeit in wässrigen Systemen aufweist. Reines Cholesterol ist ein fast weißes, kristallines Pulver, das in Wasser praktisch unlöslich ist (Europäisches Arzneibuch, 2005).

Um die geeigneten Parameter der Mühle herausfinden zu können, wurde mit Hilfe von Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, USA), ein zweistufiger Versuchsplan erstellt, in dem die wichtigsten Mühlenparameter untersucht werden sollten. Als Variablen dienten der Wirkstoffanteil der Suspension sowie der Hilfsstoffzusatz, die Drehzahl des Mahlrotors und die Dauer der Mahlung. Als abhängige Größen wurden die ermittelte Teilchengröße sowie der Polydispersitätsindex der Proben in die Auswertung einbezogen. Die Parameter des Versuchsplans sind in Tabelle 5.1-1 aufgeführt. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wurde in dem Versuchsplan eine Feststoffkonzentration zwischen 1% und 10% untersucht. Als stabilisierender Hilfsstoff wurde Polysorbat 80 in Konzentrationen zwischen 10% und 50% gewählt. Da die Menge des Wirkstoffes mit der Oberfläche der suspendierten Partikel korreliert, wurde die Menge des Stabilisators prozentual auf den Anteil des eingesetzten Wirkstoffes bezogen. Dies hatte den Vorteil, dass eine

direkte Aussage zum Verhältnis zwischen Feststoff und Hilfsstoff gemacht werden konnte.

Tabelle 5.1-1: Versuchsplan zur Evaluierung der Mühlenparameter

Nr.	Masse [g]	Drehzahl [U/Min]	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff [% , bezogen auf WS]	Mahldauer [Min]
1	100	2000	1,0	10,0	30
9	100	2000	1,0	10,0	240
2	100	6000	1,0	10,0	30
10	100	6000	1,0	10,0	240
5	100	2000	1,0	50,0	30
13	100	2000	1,0	50,0	240
6	100	6000	1,0	50,0	30
14	100	6000	1,0	50,0	240
3	100	2000	10,0	10,0	30
11	100	2000	10,0	10,0	240
4	100	6000	10,0	10,0	30
12	100	6000	10,0	10,0	240
7	100	2000	10,0	50,0	30
15	100	2000	10,0	50,0	240
8	100	6000	10,0	50,0	30
16	100	6000	10,0	50,0	240
17	100	4000	5,5	30,0	135

Die Umdrehungsgeschwindigkeit des Mahlrotors wurde auf Werte zwischen 2000 und 6000 U/Min festgelegt und die Mahldauer betrug zwischen 30 und 240 Minuten. Versuch Nr. 17 ist der Nullpunkt des statistischen Versuchsplans. Dieser hat Werte zwischen den oberen und unteren festgelegten Grenzen und wird von der Software aufgrund der angegebenen Minima und Maxima errechnet. Der Nullpunkt erlaubt bei der Analyse der Daten statistische Tests auf das Vorliegen von Krümmungen und Nichtlinearität in den Beziehungen zwischen den Faktoren und der abhängigen Variablen durchzuführen. Die Suspensionen wurden wie in Abschnitt 3.4 beschrieben hergestellt, die Masse betrug bei allen Versuchen 100,0 g. Die Messergebnisse der Partikelgrößenanalyse wurden aus der Messsoftware in eine Tabellenkalkulation übertragen und dort ausgewertet. Die Angabe der

Partikelgröße bei den angegebenen Werten bezieht sich auf den Z-Average Wert, der von der Software des Messsystems ermittelt wurde. Sowohl bei den angegebenen Werten für Partikelgröße als auch für den Polydispersitätsindex handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus drei Messungen. Die statistische Analyse der Daten und Erstellung der Grafiken erfolgte durch Übertrag in Statistica. Bei der Beurteilung der Flächenplots muss berücksichtigt werden, dass es sich um eine von der Software errechnete Darstellung handelt, die nicht die wahren Gegebenheiten widerspiegeln muss. Die Darstellung ermöglicht jedoch eine Abschätzung der Parameter und liefert einen Trend, der sehr wertvoll bei der Beurteilung der Daten sein kann.

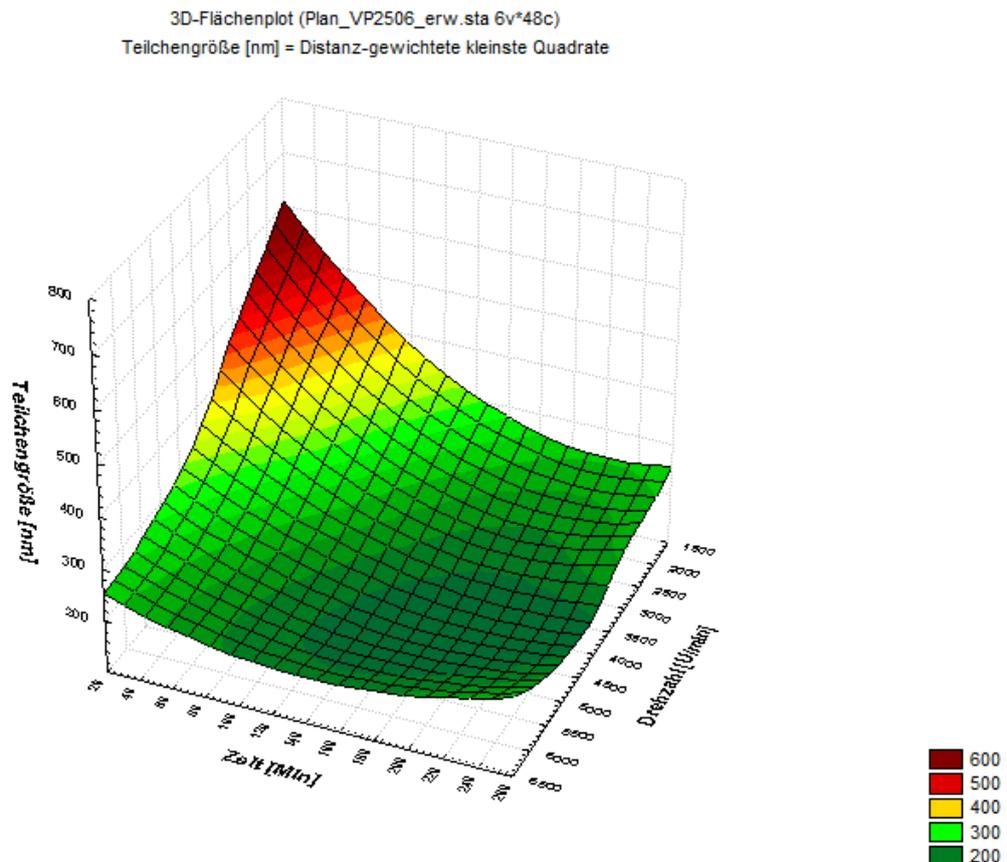


Abbildung 5.1-1: Flächenplot der Partikelgrößenbestimmung aus dem Versuchsplan zur Evaluierung der Mühlenparameter mit dem Modellarzneistoff Cholesterol

Wie in Abbildung 5.1-1 zu sehen ist, zeigte die Auswertung der Partikelgrößen, dass sowohl eine höhere Drehzahl des Mahlrotors als auch eine Verlängerung der Mahldauer zu einer Abnahme der Partikelgröße führten. Auffällig ist dabei vor allem die Abnahme der Teilchengröße bei steigender Drehzahl während der ersten 30 Minuten Mahldauer. Eine Partikelgröße von 300 nm ist nach dieser Darstellung bei einer Drehzahl von 5000 U/Min bereits nach 20 Minuten Mahldauer erreicht. Dahingegen würde eine Zerkleinerung bis in diesen Größenbereich bei der geringeren Umdrehungsgeschwindigkeit von 2000 U/Min erst nach einer Mahldauer von 140 Minuten erfolgen. Der Einfluss der Rotordrehzahl überwiegt damit zu Beginn der Mahldauer den Einfluss der Zeit. Über den weiteren Verlauf der Mahlung nimmt der Einfluss der Umdrehungsgeschwindigkeit jedoch immer weiter ab. Nach einer Mahldauer von 240 Minuten zeigt sich für alle Drehzahlen eine mittlere Partikelgröße von unter 250 nm bei einem lokalen Minimum bei 4000 bis 5000 U/Min.

Der Einfluss der einzelnen Parameter auf die Teilchengröße ist in Abbildung 5.1-2 anhand eines Pareto-Diagramms dargestellt. Ab einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ ist der Einfluss des jeweiligen Parameters dabei als signifikant anzusehen. Wie aus dem Diagramm ersichtlich, haben sowohl die Konzentration des Feststoffs als auch die des Hilfsstoffes keinen signifikanten Einfluss auf die resultierende Teilchengröße des Mahlgutes. Dieser lässt sich nur für die Parameter Mahldauer und Drehzahl des Mahlrotors erkennen, wobei die Zeit den stärksten Einfluss auf die Abnahme der Partikelgröße zeigt.

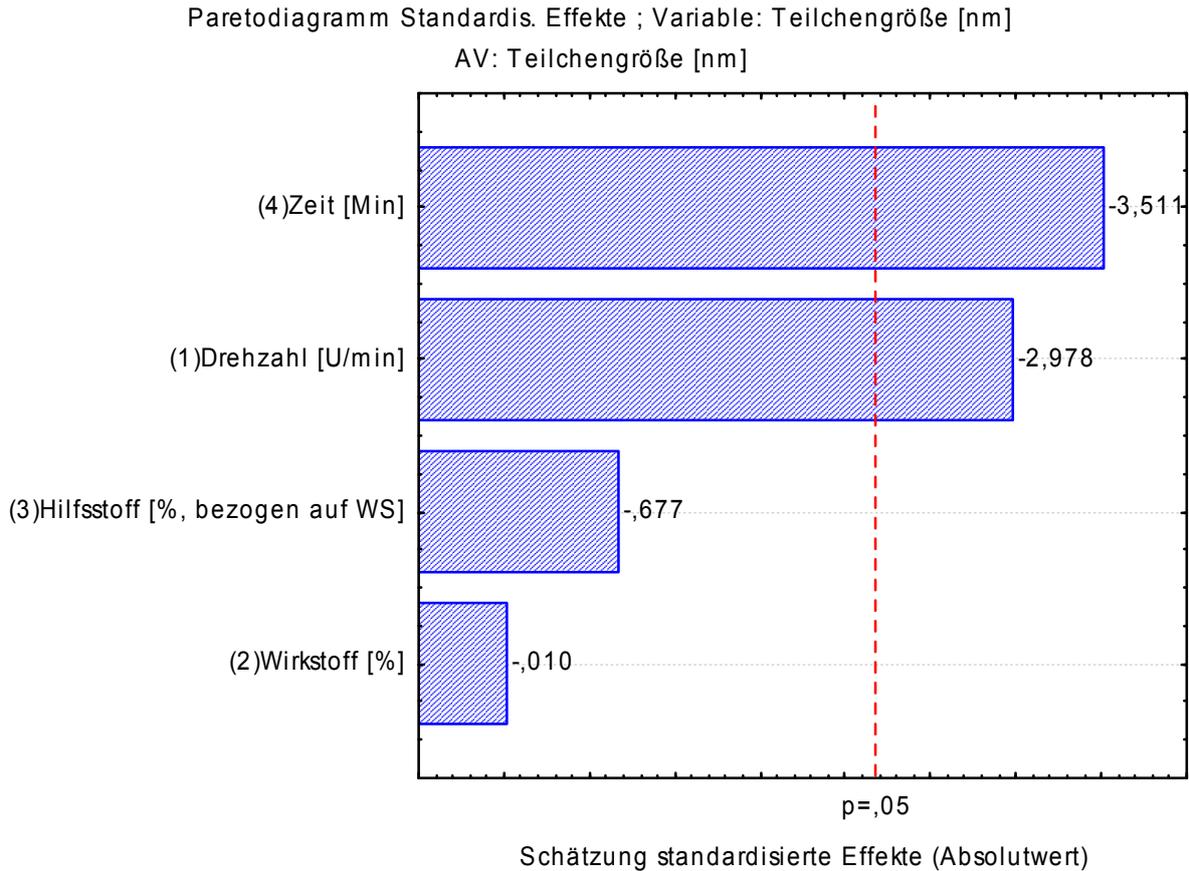


Abbildung 5.1-2: Paretdiagramm des Einflusses der Mühlenparameter auf die Partikelgröße

Als weiteres Ergebnis liefert die Partikelgrößenanalyse den Wert des Polydispersitätsindex, der wie in Abschnitt 3.1.1.6 beschrieben, im engen Zusammenhang mit der Bewertung der Partikelgröße steht. Auch die Daten der PDI-Werte aus den Untersuchungen der Mühlenparameter wurden mit Hilfe von Statistica ausgewertet und in einem Flächenplot bildlich dargestellt.

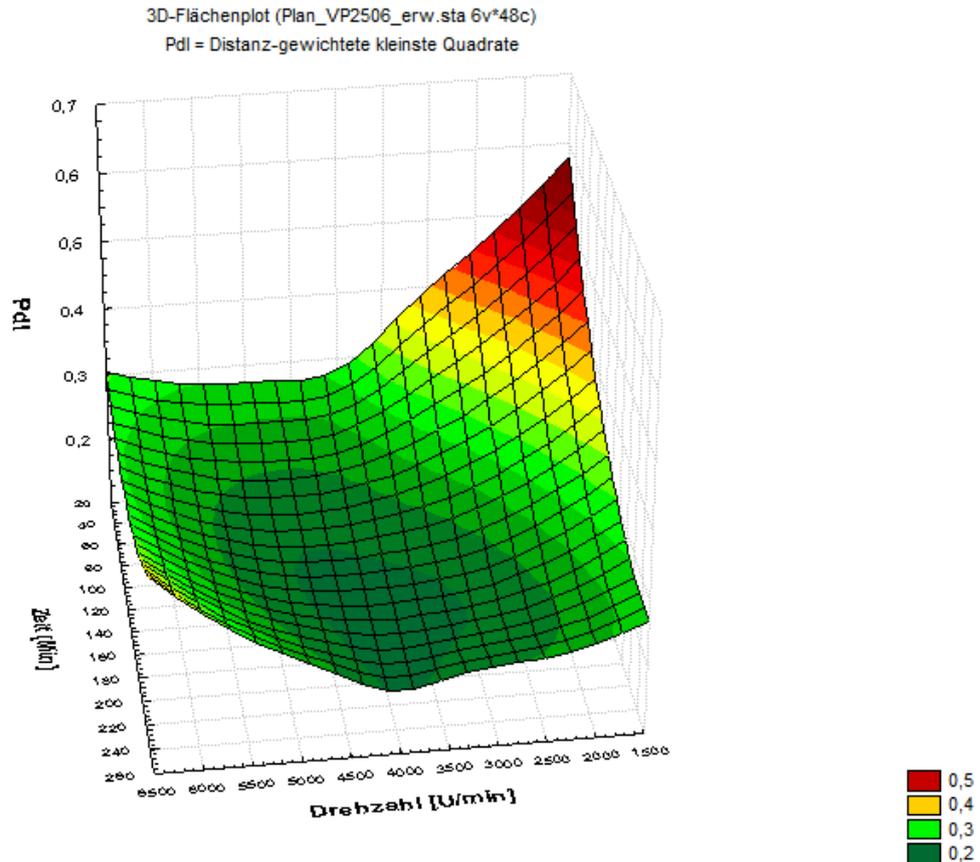


Abbildung 5.1-3: Flächenplot der Angaben zum Polydispersitätsindex aus dem Versuchsplan zur Evaluierung der Mühlenparameter mit dem Modellarzneistoff Cholesterol

Abbildung 5.1-3 zeigt die anhand des Versuchsplans errechneten Verteilungen im Zusammenhang zu Mahldauer und Drehzahl des Mahlrotors. Auch hier zeigt sich eine Abhängigkeit von diesen beiden Parametern, wobei eine Abnahme des PDI-Wertes mit steigenden Drehzahlen innerhalb der ersten 30 Minuten zu erkennen ist. Werte niedriger als 0,3, und damit eine recht homogene Verteilung, sind bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von ca. 4000 U/Min demnach bereits nach einer Mahldauer von 20 Minuten erreicht. Bei niedrigeren Drehzahlen von 2000 U/Min dauert das Erreichen des gleichen PDI-Wertes hingegen 160 Minuten. Auch für den Polydispersitätsindex zeigt die Auswertung ein errechnetes Minimum bei ca. 4000 U/Min. Aus der Durchführung der ersten Versuche lässt sich also eine Abhängigkeit von Drehzahl des Mahlrotors und Mahldauer sowohl auf Partikelgröße

als auch Polydispersitätsindex der Probe erkennen. Der Einfluss der Menge des Feststoffes und des Hilfsstoffes spielen eine untergeordnete Rolle. Dabei zeigt sich für die Partikelgröße und für den Wert des Polydispersitätsindexes ein errechnetes Optimum bei einer Drehzahl von 4000 U/Min. Alle weiteren Versuche wurden daher bei dieser Umdrehungsgeschwindigkeit des Mahlrotors durchgeführt.

5.2 Herstellung von Nanosuspensionen mit Itraconazol

Da die Entwicklung einer Nanosuspensionsformulierung mit dem schwerlöslichen Arzneistoff Itraconazol Ziel dieser Arbeit war, sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse der Untersuchungen mit Cholesterol auf diesen Feststoff übertragen lassen. Für die Mahlungen wurde ein zweistufiger Versuchsplan mit 3 Faktoren und 9 Runs erstellt, in dem die Parameter Wirkstoffmenge, Hilfsstoffzusatz sowie Mahldauer variiert wurden. Die Konzentration des Wirkstoffes wurde auf eine maximale Konzentration von 20% Feststoff erhöht. Die untere Feststoffkonzentration lag bei 5%. Als Stabilisator wurde wiederum Polysorbat 80 verwendet. Die Berechnung des Hilfsstoffes bezog sich wieder auf die Konzentration des Feststoffes und wurde zwischen 25% und 100% variiert. Die Herstellung der Suspensionen und Durchführung der Versuche sowie die Auswertung der Messergebnisse erfolgte wie bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben.

Tabelle 5.2-1: Parameter des Versuchsplans mit Itraconazol

Drehzahl [U/min]	Zeit [Min]	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff [% , bezogen auf WS]
4000	30	5,0	25,0
4000	240	5,0	25,0
4000	30	20,0	25,0
4000	240	20,0	25,0
4000	30	5,0	100,0
4000	240	5,0	100,0
4000	30	20,0	100,0
4000	240	20,0	100,0
4000	135	12,5	62,5

Auch bei diesen Untersuchungen wurde der Einfluss der Mahldauer auf die Partikelzerkleinerung näher untersucht. In Abbildung 5.2-1 ist die Abhängigkeit anhand eines Scatterplots dargestellt. Wie bereits in den vorhergehenden Untersuchungen, zeigt sich auch für Itraconazol ein offensichtlicher Einfluss der Mahldauer auf die Partikelgröße. Der Mittelwert der Partikelgröße zeigt in der Darstellung einen Abfall von 276,5 nm nach 30 Minuten Mahldauer auf eine Größe von 174 nm nach Abschluss der Mahlung nach 240 Minuten. Auch die Betrachtung der Abhängigkeit des Zeiteinflusses auf den Polydispersitätsindex in Abbildung 5.2-2 lässt einen deutlichen Abfall erkennen. Die ermittelten PDI-Werte zeigen dabei mit einem maximalen Wert von 0,247 bereits nach 30 Minuten eine sehr gute Verteilung. Die Schwankungsbreite der Werte ist jedoch nach 30 Minuten noch recht groß. Nach 240 Minuten zeigt sich für alle Proben mit Messwerten zwischen 0,116 bis 0,148 eine sehr gute Homogenität.

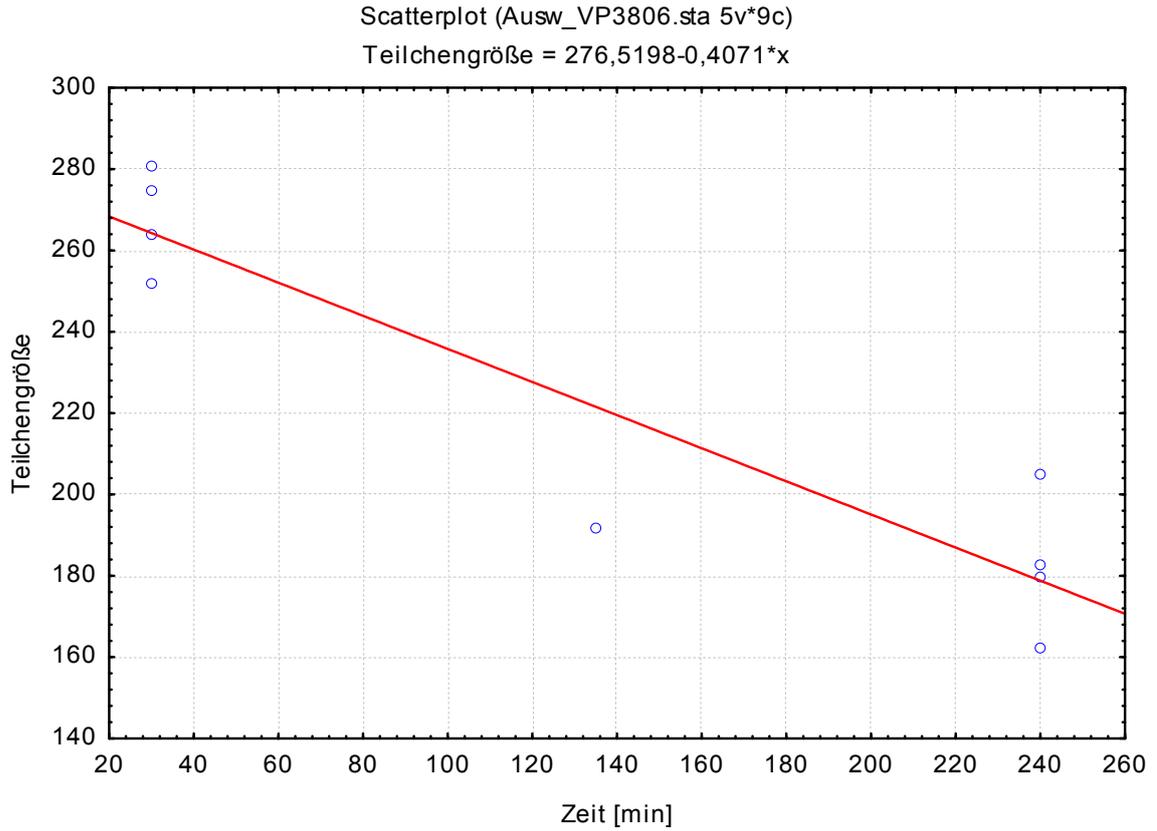


Abbildung 5.2-1: Scatterplot des Zeiteinflusses auf die Partikelgröße

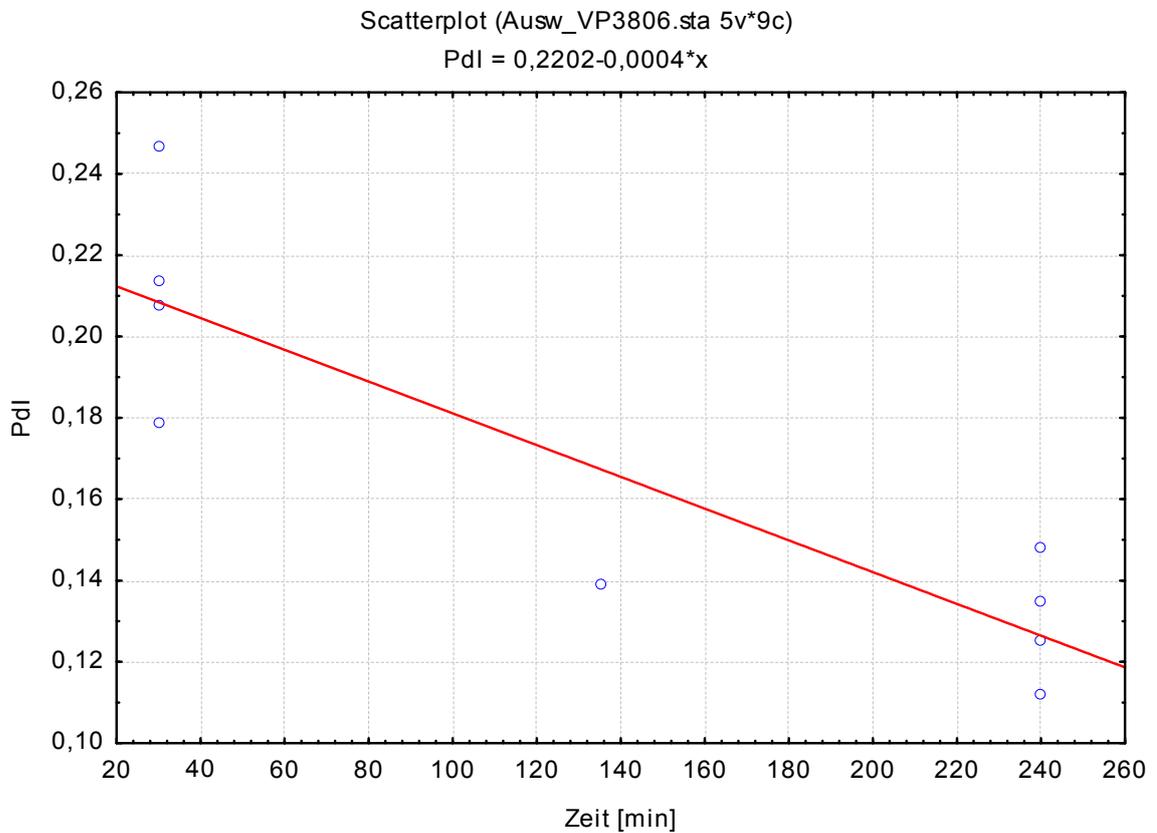


Abbildung 5.2-2: Scatterplot des Zeiteinflusses auf den Polydispersitätsindex

Die mittlere Partikelgröße und die Homogenität der Chargen zeigen also auch bei Verwendung von Itraconazol als Feststoff eine starke Abhängigkeit von der Mahldauer.

Zudem ist bei der Darstellung des Einflusses der Wirkstoffkonzentration auf die Abnahme der Partikelgröße aus Abbildung 5.2-3 ersichtlich, dass der Einfluss der Wirkstoffkonzentration keinen Einfluss auf den Mahlerfolg zeigt.

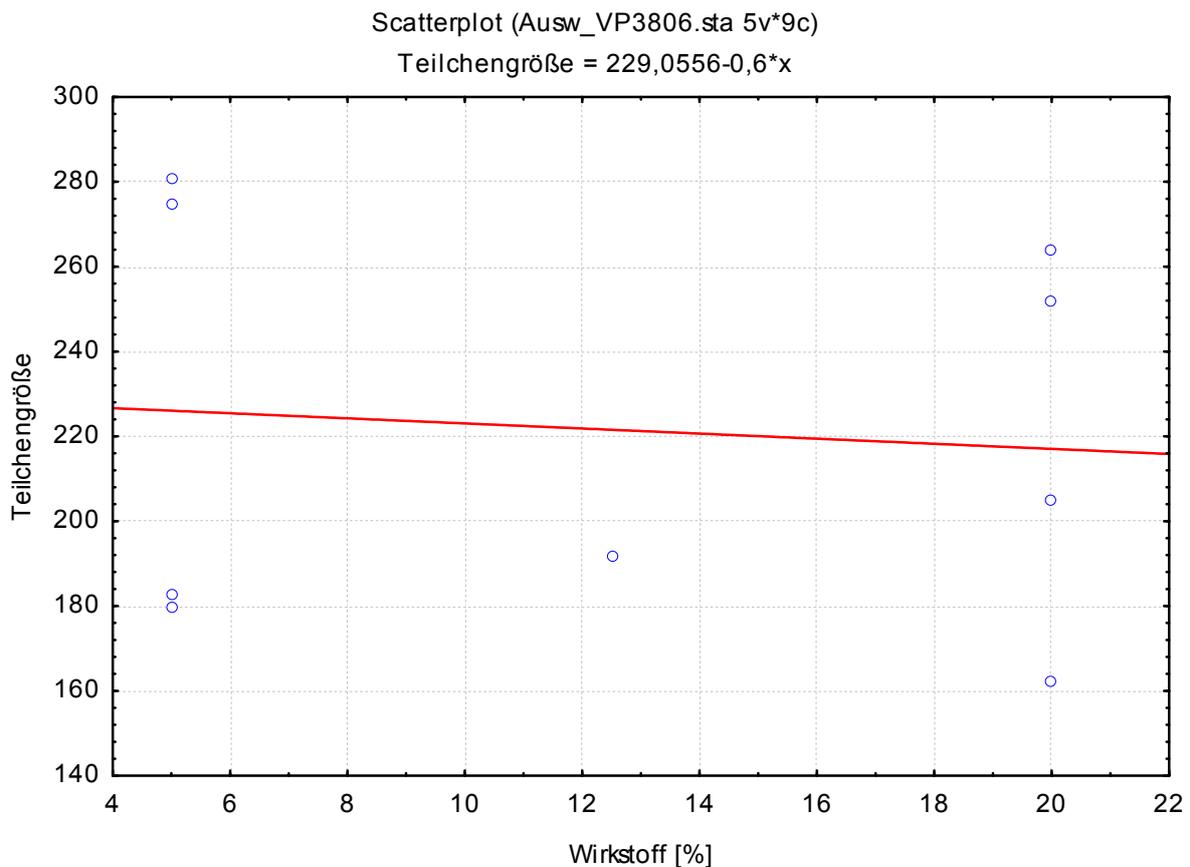


Abbildung 5.2-3: Scatterplot des Einflusses der Wirkstoffkonzentration auf die Teilchengröße

In der niedrigen Konzentration von 5% und der hohen Feststoffkonzentration von 20% Wirkstoff ist eine starke Streuung der Messwerte der Partikelgröße zu erkennen. In die Darstellung des Scatterplots gehen allerdings nicht nur die Mahlergebnisse nach 30 und 240 Minuten, sondern auch die verschiedenen Hilfsstoffkonzentrationen mit ein. Bezieht man ausschließlich die Messergebnisse für 240 Minuten in die Auswertung ein und berücksichtigt dabei den jeweiligen relativen

Hilfsstoffzusatz der Charge lässt sich allerdings ebenfalls kein Einfluss der eingesetzten Wirkstoffkonzentration auf die Partikelgröße erkennen (Abbildung 5.2-4).

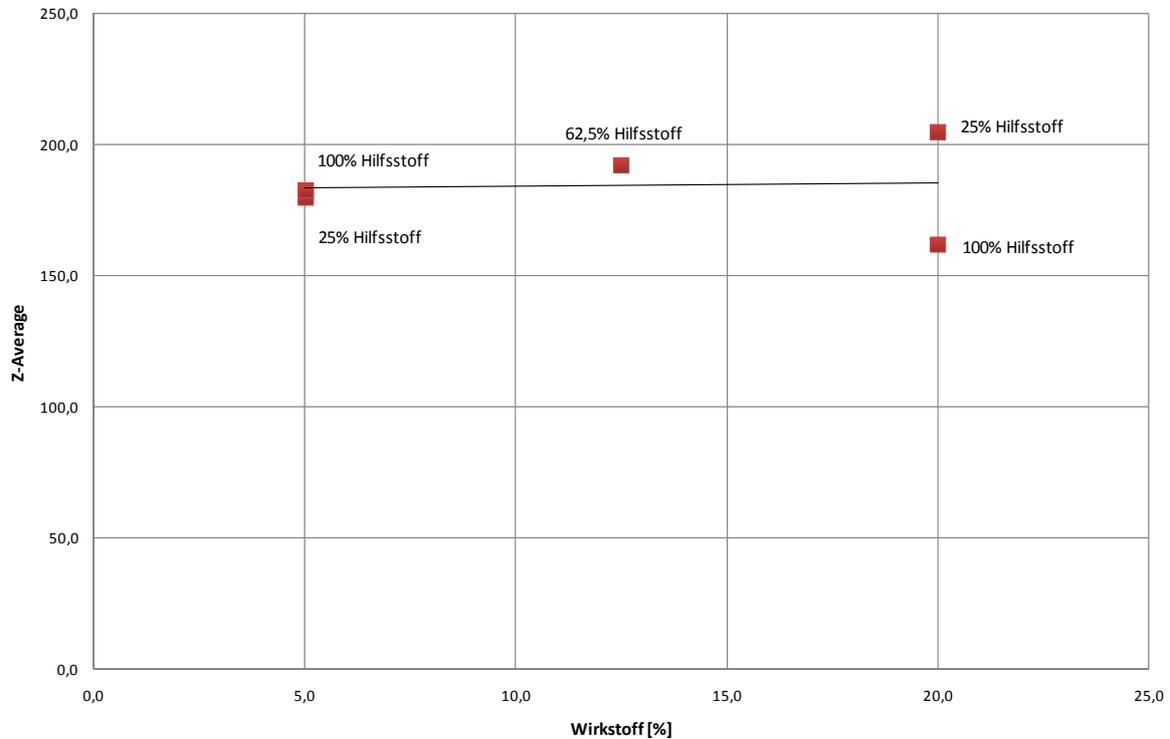


Abbildung 5.2-4: Einfluss der Wirkstoffkonzentration auf die Teilchengröße nach 240 Minuten Mahldauer unter Berücksichtigung des Hilfsstoffzusatzes

Betrachtet man allerdings die Messergebnisse des Polydispersitätsindex, wird eine Abhängigkeit zwischen der Homogenität der Probe und der eingesetzten Wirkstoffkonzentration deutlich. Bezieht man die relative Hilfsstoffkonzentration in diese Darstellung ein, zeigt sich außerdem, dass die Proben mit einer geringeren Hilfsstoffkonzentration die besseren Polydispersitätswerte zeigten. Ob dieser Einfluss jedoch reproduzierbar und signifikant ist, kann nicht beurteilt werden (Abbildung 5.2-5).

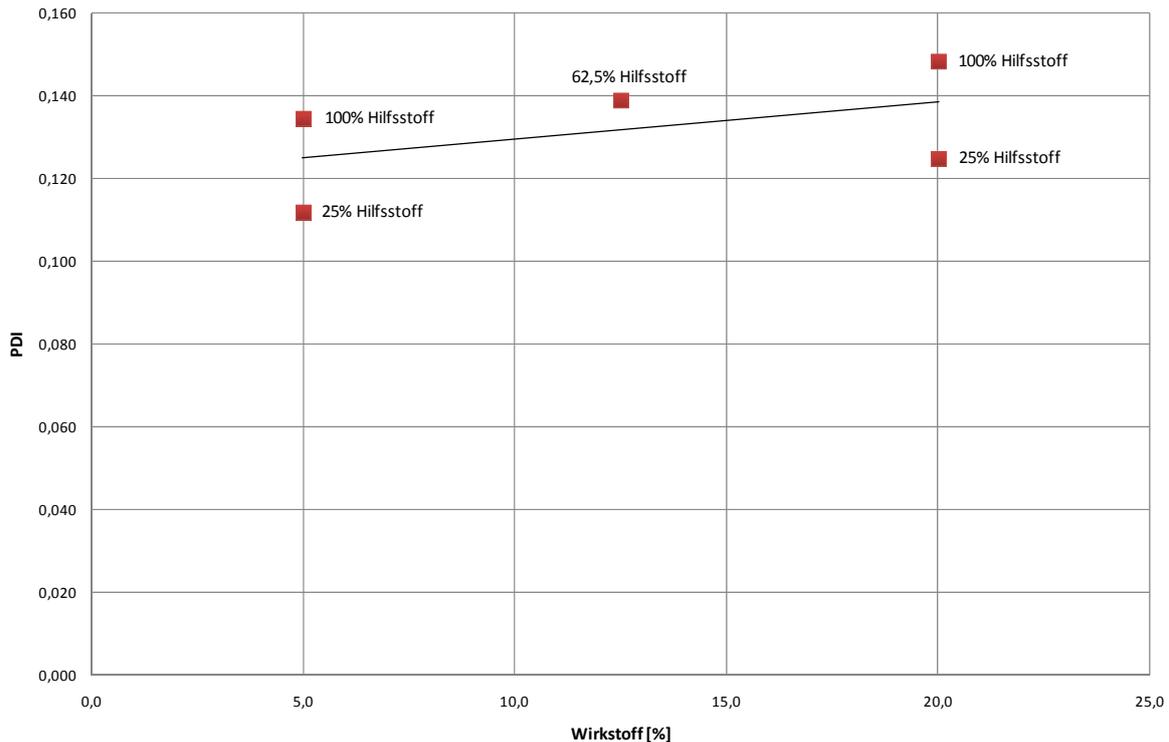


Abbildung 5.2-5: Einfluss der Wirkstoffkonzentration auf den PDI-Wert mit Angabe der jeweiligen relativen Stabilisatorzusätze

Bei der alleinigen Darstellung der Hilfsstoffkonzentration ist kein Einfluss auf die Partikelgröße erkennbar (Abbildung 5.2-6). Wie bei der Konzentration des Wirkstoffes zeigt sich aufgrund der Streuung der Messwerte keine eindeutige Abnahme der Partikelgröße in Abhängigkeit der eingesetzten Hilfsstoffmenge. Bei der Betrachtung des Hilfsstoffeinflusses auf den Polydispersitätsindex lässt sich hingegen erkennen, dass die Messwerte bei hohen Konzentrationen des Hilfsstoffes eine engere Verteilung aufweisen (Abbildung 5.2-7), wobei berücksichtigt werden muss, dass hier wiederum die PDI-Werte bei 30 und 240 Minuten in die Darstellung eingehen und die Mahldauer, wie bereits diskutiert, den entscheidenden Einfluss auf den Polydispersitätsindex hat.

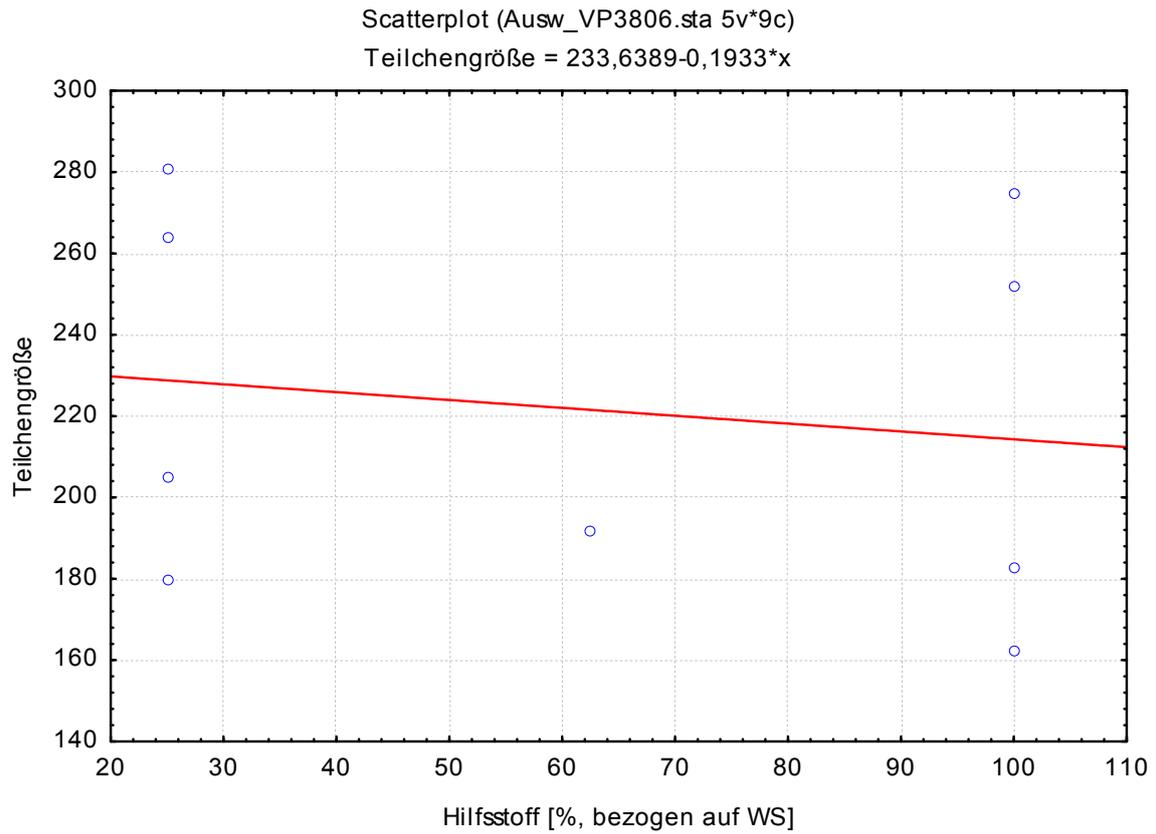


Abbildung 5.2-6: Scatterplot des Einflusses der Hilfsstoffkonzentration auf die Teilchengröße

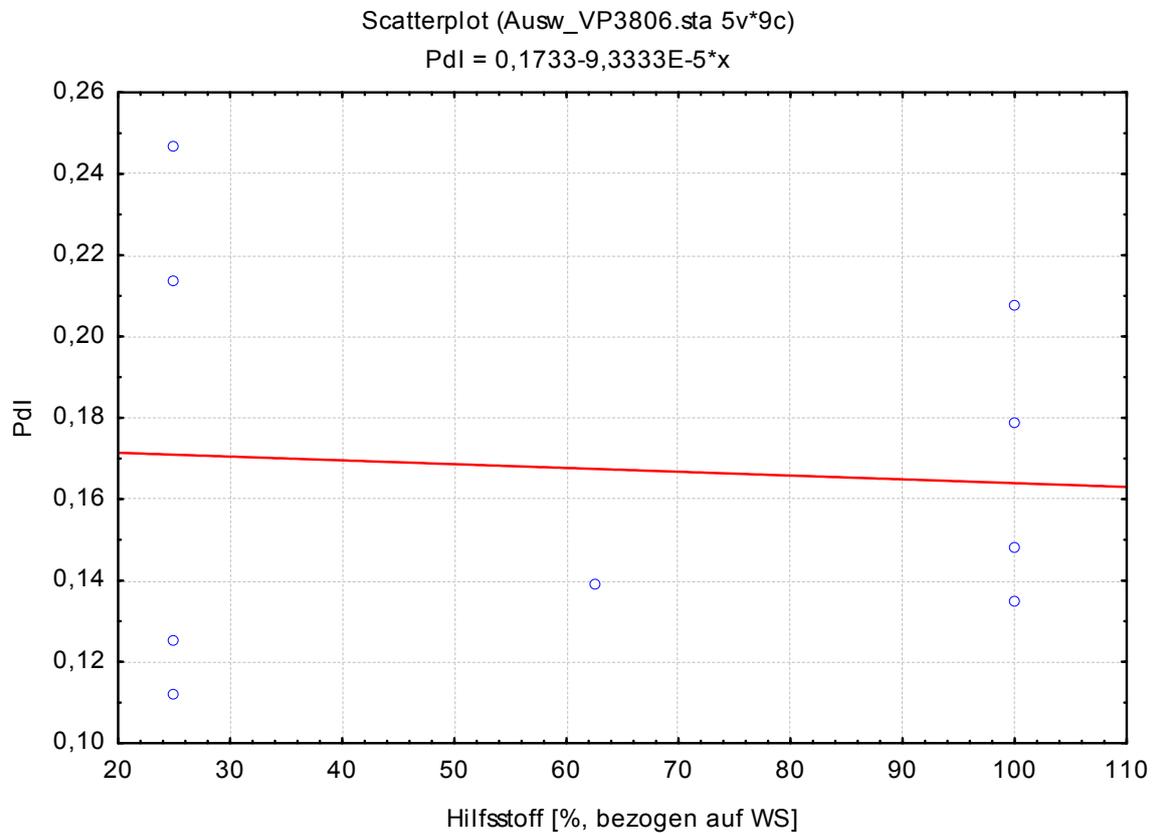


Abbildung 5.2-7: Scatterplot des Einflusses der Hilfsstoffkonzentration auf den PDI-Wert

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Partikelgröße als auch Polydispersitätsindex eine deutliche Abhängigkeit von den Parametern Zeit und Drehzahl des Mahlrotors zeigen. Die Auswertung ergab einen signifikanten Einfluss dieser Parameter, wohingegen der Feststoffanteil, wie auch der Anteil des verwendeten Hilfsstoffes Polysorbat 80 keinen signifikanten Einfluss zeigten. Dabei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass sich der Hilfsstoffanteil nicht beliebig verringern lässt, da es sonst zu einer Agglomeration der Partikel kommt. Auch ist immer zu berücksichtigen, dass die resultierende Partikelgröße letztendlich von den Eigenschaften des zu vermahlenden Gutes abhängt. Dieses Modell kann damit nur Anhaltspunkte für die Parameter zur Zerkleinerung und Stabilisierung in Rührwerkskugelmöhlen geben. Bei einer zu großen Menge an Hilfsstoff oder einer zu hohen Feststoffkonzentration ist außerdem davon auszugehen, dass die Viskosität der Suspension ansteigt. Dies hat wiederum einen Einfluss auf den Mahlerfolg, da ein großer Teil der Energie durch innere Reibung verloren geht und somit nicht zur Partikelzerkleinerung genutzt werden kann. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass eine hohe Umdrehungsgeschwindigkeit des Mahlwerkzeugs auch einen hohen Energieeintrag in das Mahlgut zur Folge hat. Dies kann wiederum zu einer thermischen Belastung des Mahlgutes in der Mahlkammer führen und die chemische Stabilität des Wirkstoffes möglicherweise negativ beeinflussen. Auf jeden Fall wird jedoch die Löslichkeit bei höheren Temperaturen verbessert, was beim Abkühlen der Suspension nach der Herstellung ein Partikelwachstum aufgrund von Rekristallisationen zur Folge hat. Eine ausreichende Kühlung des Mahlprozesses sollte daher immer erfolgen. Aus den Untersuchungen wurde der Energieeintrag bei einer Drehzahl des Mahlrotors von 4000 U/Min als optimal für die Zerkleinerung der Partikel

ermittelt. Daher wurde diese Umdrehungsgeschwindigkeit für die weiteren Untersuchungen auf diesen Wert festgelegt.

5.3 Entwicklung einer Nanosuspensionsformulierung

Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, sind Pilzinfektionen der Lunge eine sehr ernst zu nehmende Erkrankung und die Zahl der erkrankten Patienten steigt pro Jahr an. Außerdem sind die Kosten einer Behandlung pro Patient für eine Behandlungsdauer von 14 Tagen sehr hoch. Die herkömmliche Behandlung erfolgt durch systemische Gabe hoher Dosen Antimykotika, wie z.B. Itraconazol.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte sollte eine Formulierung für die inhalative Applikation bei Lungenmykosen entwickelt werden. Der Sinn einer solchen Formulierung liegt in einer Erhöhung der lokalen Arzneistoffkonzentration in der Lunge, während die Rate der potenziellen Nebenwirkungen gleichzeitig gemindert wird (Vaughn et. al., 2006). Eine weitere Möglichkeit ist die prophylaktische Anwendung in niedriger Dosierung bei Patienten, die zu einer Risikogruppe gehören. Ein großer Nachteil der Antimykotika zur Behandlung von Lungenmykosen ist ihre Schwerlöslichkeit, was die Entwicklung einer Arzneistofflösung unmöglich macht. Die Arzneistoffdosen, die für eine Behandlung erforderlich sind, sind außerdem zu hoch, um eine Trockenpulverformulierung zu ermöglichen. Eine inhalative Formulierung sollte zudem eine gewisse Verweildauer in der Lunge haben (Depot-Effekt), um die lokal benötigten hohen Dosen zu ermöglichen. Es wurde daher eine Nanosuspensionsformulierung für die Verneblung entwickelt, welche die Anforderungen erfüllt. Die Adhäsivität sowie die erhöhte Sättigungslöslichkeit der Nanopartikel (Müller et al., 1998b) sorgen für eine höhere Konzentration am Wirkort und schaffen den gewünschten Depoteffekt der Formulierung. Die Nanosuspensionspartikel können mit

Hilfe eines handelsüblichen Druckluftverneblers oder vergleichbarer Geräte vernebelt werden. Da es sich bei den Verneblern um aktive Geräte handelt, ist eine Inhalation somit auch bei Kindern, Behinderten sowie bei Intensivpatienten mit Hilfe einer Atemmaske problemlos möglich.

Der Fokus bei der Entwicklung lag nicht nur auf der Entwicklung einer lagerstabilen Suspension. Es wurde vor allem Wert darauf gelegt, möglichst keine anorganischen Rückstände durch das Herstellungsverfahren in die Nanosuspensionsformulierung einzutragen. Dies ist besonders kritisch bei inhalativen Arzneiformen, da unlösliche anorganische Rückstände nur schwer aus der Lunge eliminiert werden können. Diese sind jedoch häufig in Nanosuspensionsformulierungen als Rückstände aus dem Herstellungsprozess anzufinden. Durch die Verwendung von Polystyrol Mahlkörpern sollte daher versucht werden, den Abrieb der Mahlkörper als auch der Mühlenbauteile zu minimieren.

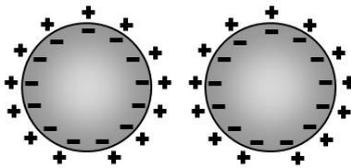
5.4 Rezepturfindung für Nanosuspensionsformulierungen

Eine Nanosuspensionsformulierung muss aus mindestens drei Komponenten bestehen. Dies sind das Dispergiermedium, der in diesem Medium unlösliche, suspendierte Wirkstoff sowie der Stabilisator. Als Stabilisatoren kommen grundsätzlich alle oberflächenaktiven Stoffe in Frage, die diese Voraussetzung erfüllen. Die Stabilisierung kann dabei sowohl sterisch, als auch elektrostatisch über die Abstoßung von geladenen Oberflächen erfolgen (Lucks et al., 1990), wie in Abbildung 5.4-1 dargestellt ist. Da der Stabilisator die neu geschaffenen Oberflächen stabilisieren soll, muss er in ausreichender Geschwindigkeit an die neu entstandenen Grenzflächen diffundieren können.

Stabilisierung

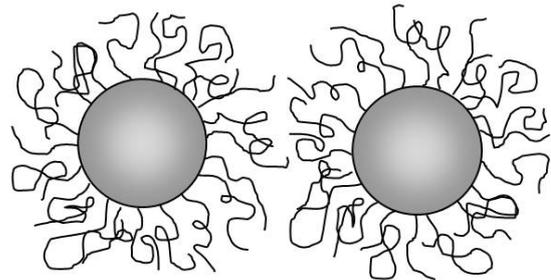


Elektrostatische Stabilisierung



Abstoßung durch Oberflächenladung

Sterische Stabilisierung



Sterische Behinderung durch adsorbierte Makromoleküle

Abbildung 5.4-1: Stabilisierungsmöglichkeiten in Suspensionen (nach Mende)

Im pharmazeutischen Bereich können grundsätzlich beide Verfahren zur Stabilisierung genutzt werden, jedoch gibt es je nach Anwendungsbereich Einschränkungen bei der Auswahl des Stabilisators.

5.4.1 Auswahl eines geeigneten Stabilisators

Für die Entwicklung der inhalativen Nanosuspensionsformulierung war es aufgrund der Voruntersuchungen zunächst wichtig, einen geeigneten Stabilisator zu ermitteln. Da der stabilisierende Zusatz einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilisierung der während des Mahlprozesses entstehenden kleinen Partikel hat, ist die Menge des Zusatzes entscheidend für die Suspensionsstabilität. Erfolgt die Besetzung der Oberflächen außerdem nicht mit ausreichender Geschwindigkeit, kann es zu einer Agglomeration der Partikel in der Suspension und damit zu einer Zunahme der Partikelgröße kommen. Bei den zu entwickelnden Formulierungen lag der Fokus auf einer

inhalativen Anwendung der Nanosuspensionsformulierungen. Aus diesem Grund wurde auf die Verwendung von ionischen Stabilisatoren verzichtet und die Auswahl auf Stoffe beschränkt, die bereits für die inhalative Anwendung zugelassen sind. Für die Versuche wurden drei Stabilisatoren ausgewählt, die in weiteren Versuchsreihen auf ihre Eignung zur Stabilisierung von Nanosuspensionsformulierungen untersucht wurden. Zur Anwendung kamen Polysorbat 80, Poloxamer 188 sowie Solutol HS15 (siehe Abschnitt 4.2). Die Toxizität vieler Tenside lässt keine Applikation in die Lunge zu. Aus diesem Grund wurden mit Polysorbat 80 und Poloxamer 188 zwei Hilfsstoffe ausgewählt, die gute Schleimhautverträglichkeit zeigen und zur Applikation in der Lunge bereits zugelassen sind. Als dritter Stabilisator wurde Solutol[®] HS 15 ausgewählt, da es zur Herstellung von Parenteralia eingesetzt wird und ebenfalls sehr gut schleimhautverträglich ist. Alle drei Hilfsstoffe sind nichtionische Tenside, die über Polyethylenglykolketten verfügen. Diese haben aufgrund ihres Platzbedarfs einen wichtigen Anteil bei der sterischen Stabilisierung der Partikel.

5.4.2 Test unterschiedlicher Stabilisatoren

Für die Durchführung der Versuchsreihen wurde ein zweistufiger Versuchsplan mit 3 Faktoren und 9 Runs erstellt, in dem die Parameter Wirkstoffmenge, Hilfsstoffzusatz sowie Mahldauer variiert wurden (Tabelle 5.4-1). Die Drehzahl des Mahlrotors wurde aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 5.1 auf 4000 U/Min festgesetzt.

Die Proben wurden nach 30 und 240 Minuten, bzw. 135 Minuten mit Hilfe der Laserlichtstreuung untersucht. Der Versuchsplan wurde mit jedem Stabilisator abgearbeitet, was zu einer dreifachen Durchführung des gesamten Versuchsplans führte.

Tabelle 5.4-1: Parameter der Versuchspläne zur Ermittlung eines geeigneten Stabilisators

Drehzahl [U/min]	Zeit [Min]	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff [% , bezogen auf WS]
4000	30	5,0	25,0
4000	240	5,0	25,0
4000	30	20,0	25,0
4000	240	20,0	25,0
4000	30	5,0	100,0
4000	240	5,0	100,0
4000	30	20,0	100,0
4000	240	20,0	100,0
4000	135	12,5	62,5

In Abbildung 5.4-2 und Tabelle 5.4-2 sind die Ergebnisse der Partikelgrößenmessung aus den drei Versuchsreihen nach 240 Minuten Mahldauer bei einem Hilfsstoffanteil von 25% (bezogen auf die Wirkstoffmenge) dargestellt. Auf der Hauptordinate ist dabei die Partikelgröße des Arzneistoffes als Z-Average-Wert angegeben. Die zweite Ordinate zeigt den Mittelwert der PDI-Werte der Messungen. Auf der Abszisse sind die verwendeten Hilfsstoffe, blockweise untergliedert nach Wirkstoffgehalt, dargestellt. Die mit Polysorbat 80 stabilisierten Proben lieferten sowohl mit 180,0 nm bei 5%, als auch mit 205,1 nm bei 20% Feststoffanteil die geringsten Partikelgrößen. Die ermittelten Polydispersitätsindices von 0,112 und 0,125 deuten ebenfalls auf eine gute Stabilisierung der Partikel ohne Reagglomeration und eine homogene Verteilung hin. Die Verwendung von Solutol HS15 zeigte mit Partikelgrößen von ca. 300 nm für beide Feststoffgehalte und PDI-Werten von 0,125 und 0,173 gute Ergebnisse, die jedoch deutlich über denen von Polysorbat 80 lagen. Eine Vermessung der Proben die mit Poloxamer 188 stabilisiert waren war nicht möglich, da es bereits während des Mahlprozesses zu einer Viskositätserhöhung der Probe

und damit zu einer Abnahme der Zirkulationsgeschwindigkeit durch die Mahlkammer kam. Nach einem Probenzug zeigte sich außerdem eine Flotation der Partikel im Probengefäß. Die Suspensionen ließen sich nach Beendigung der Mahlung teilweise nur durch Auswaschen aus der Mahlkammer entfernen, da ein normales Fördern nicht mehr möglich war. Eine Präparation der Partikel für die Vermessung mit Hilfe der PCS zeigte optisch bereits eine grobe Dispersität und eine Messung lieferte keine verwertbaren Ergebnisse. Die Beobachtungen sprechen für eine unzureichende Stabilisierung der Partikel während des Mahlprozesses. Es erfolgte zwar eine mechanische Zerkleinerung der Partikel, die jedoch nicht ausreichend stabilisiert werden konnten und sofort wieder agglomerierten. Das Blockpolymer scheint in der eingesetzten Konzentration nicht in ausreichender Geschwindigkeit an die Grenzflächen diffundieren zu können. Dabei wird dem System immer mehr Stabilisator entzogen, der sich an den neuen Oberflächen in unzureichender Menge anlagert und somit in den Agglomeraten eingeschlossen wird. Im Verlauf des Mahlprozesses wird die Menge des Stabilisators somit immer weiter erniedrigt und die Agglomeration der Partikel nimmt weiter zu, was schließlich zu der beobachteten Viskositätserhöhung der Probe führt.

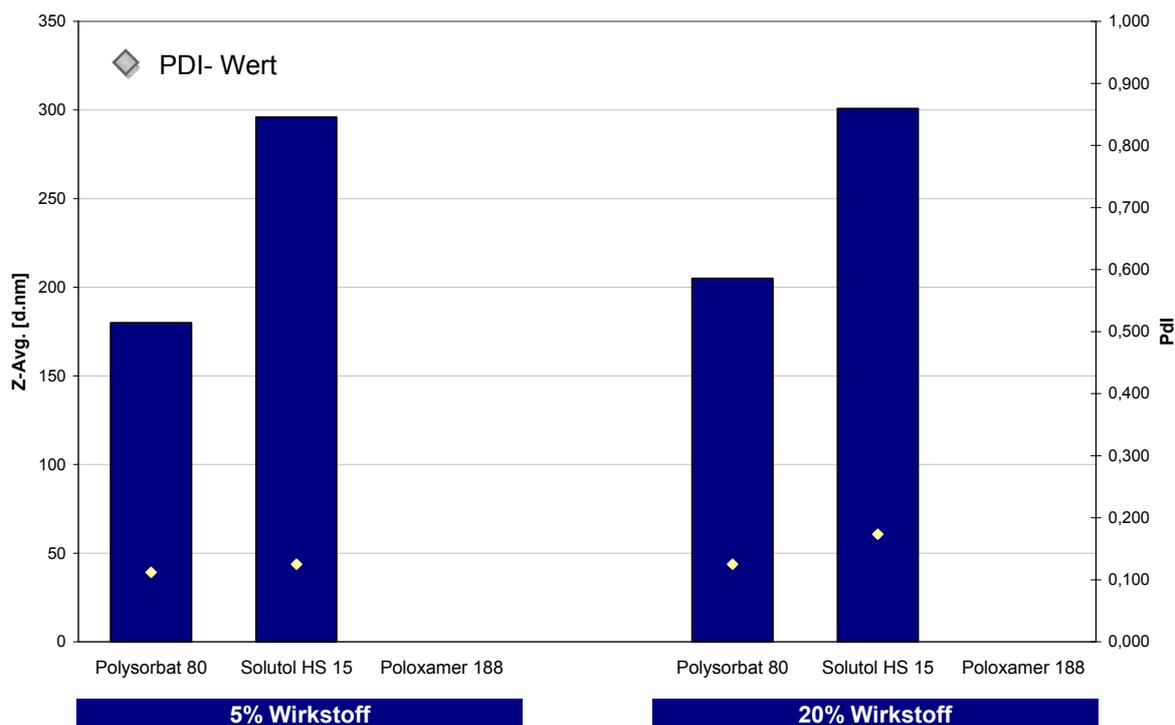


Abbildung 5.4-2: Einfluss des Stabilisatorzusatzes auf die Partikelzerkleinerung nach 240 Minuten Mahldauer bei 25% Stabilisatorzusatz (bezogen auf die Feststoffkonzentration)

Tabelle 5.4-2: Messergebnisse bei 25% Stabilisatorzusatz (bezogen auf die Wirkstoffkonzentration) nach 240 Minuten Mahldauer

Wirkstoffanteil	Hilfsstoff	Z-Avg. [d.nm]	PdI
5%	Polysorbat 80	180,0	0,112
	Solutol HS 15	296,0	0,125
	Poloxamer 188	Werte außerhalb des Messbereichs	
20%	Polysorbat 80	205,1	0,125
	Solutol HS 15	300,9	0,173
	Poloxamer 188	Werte außerhalb des Messbereichs	

Abbildung 5.4-3 und Tabelle 5.4-3 zeigen die ermittelten Messwerte für einen Stabilisatorzusatz von 100% (bezogen auf die Masse des Wirkstoffes). Die Erhöhung des Stabilisatorzusatzes um die vierfache Menge führte vor allem bei Solutol HS 15 und Poloxamer 188

offensichtlich zu einer Verringerung der Partikelgröße. Polysorbat 80 weist nur für einen Wirkstoffanteil von 20% eine Verringerung der Partikelgröße auf. Polysorbat 80 scheint daher bei der Stabilisierung der Partikel der potentere Hilfsstoff zu sein.

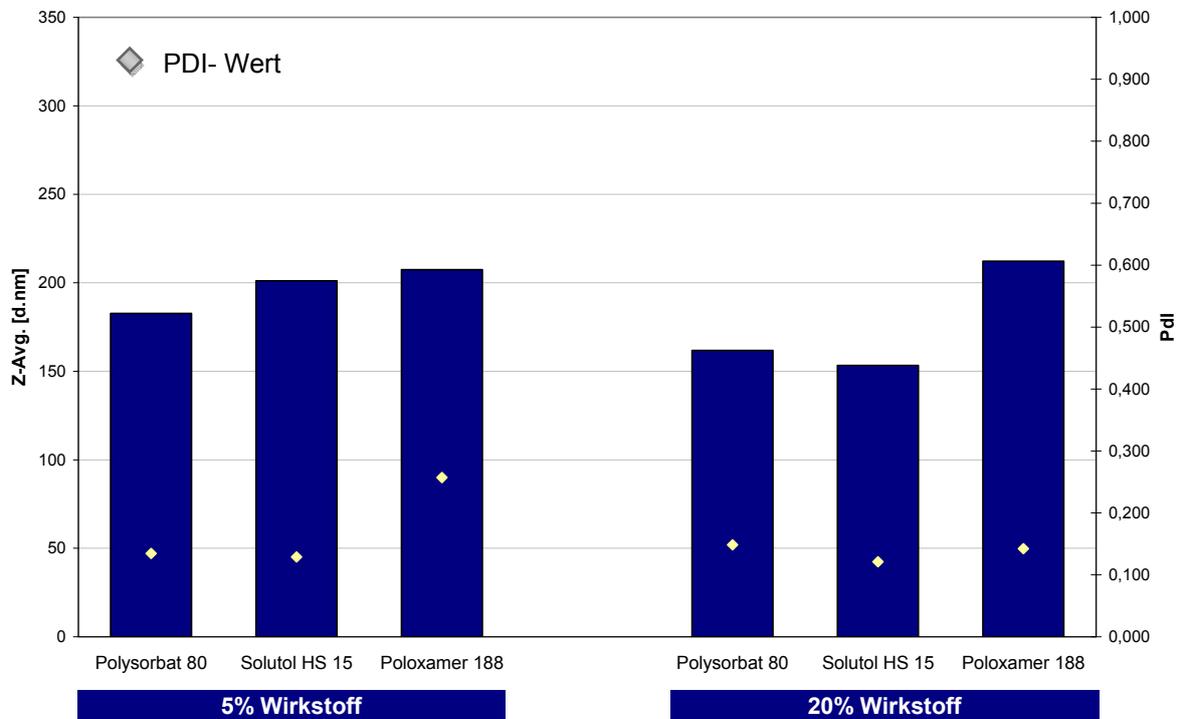


Abbildung 5.4-3: Einfluss des Stabilisatorzusatzes auf die Partikelzerkleinerung nach 240 Minuten Mahldauer bei 100% Stabilisatorzusatz (bezogen auf die Feststoffkonzentration)

Tabelle 5.4-3: Messergebnisse bei 100% Stabilisatorzusatz (bezogen auf die Wirkstoffkonzentration) nach 240 Minuten Mahldauer

Wirkstoffanteil	Hilfsstoff	Z-Avg. [d.nm]	PDI
5%	Polysorbat 80	182,7	0,135
	Solutol HS 15	201,2	0,129
	Poloxamer 188	207,5	0,257
20%	Polysorbat 80	161,8	0,148
	Solutol HS 15	153,3	0,121
	Poloxamer 188	212,2	0,142

Poloxamer 188 ist in der hohen Konzentration von 100% in Relation zum Wirkstoff offensichtlich in der Lage, die Partikel hinreichend zu stabilisieren. Die Größe der Partikel liegt mit ca. 210 nm in einem für eine Nanosuspension annehmbaren Größenbereich. Auch die PDI-Werte zeigen mit Werten von 0,257 und 0,142 eine gute Homogenität der Chargen, wobei der Wert von 0,257 evtl. auf eine weniger gute Stabilisierung mit Agglomerationen schließen lässt (Tabelle 5.4-3).

An den Ergebnissen wird die Abhängigkeit der Partikelgröße vom verwendeten Stabilisator deutlich. Polysorbat 80 erbrachte in allen verwendeten Konzentrationen eine ausreichende Stabilisierung der Partikel in der Suspension, was auf eine ausreichende Geschwindigkeit des Stabilisators bei der Besetzung der bei der Mahlung entstehenden neuen Grenzflächen schließen lässt. Auch Solutol HS 15 ist offensichtlich in der Lage, schon bei geringen Stabilisatorzusätzen eine Stabilisierung der Partikel zu gewährleisten. Die Erhöhung des Hilfsstoffanteils zeigt für Solutol HS 15 ebenfalls noch eine deutliche Reduktion der Partikelgröße von ca. 300 nm auf 201,2 nm bei 5% Wirkstoffanteil, bzw. 153,3 nm bei 20% Wirkstoffanteil, was für eine verbesserte Stabilisierung spricht. Die PDI-Werte weisen mit Werten von <0,130 auf eine sehr homogene Verteilung und ausreichende Stabilisierung der Proben hin. Im Vergleich der unterschiedlichen Stabilisatorzusätze zeigt sich, dass die Erhöhung der Stabilisatorkonzentration auf 100% auch auf die bereits mit 25% ausreichend stabilisierten Proben einen Einfluss zeigt. Die geringsten Partikelgrößen zeigten sich bei Solutol HS 15 und Polysorbat 80 bei Feststoffgehalten von 20% und einem Hilfsstoffeinsatz von 100% in Relation zum Wirkstoffgehalt.

In einem tolerablen Mengenbereich für den Zusatz des Stabilisators lieferte Polysorbat 80 die besten Ergebnisse, was zur Auswahl dieses Hilfsstoffes für die weitere Verwendung führte.

5.5 Ermittlung einer geeigneten Stabilisatorkonzentration

Wie die Ergebnisse aus den Versuchen mit unterschiedlichen Stabilisatoren zeigen konnten, ist die resultierende Partikelgröße von der Art und der Menge des verwendeten Stabilisators abhängig. Da der Zusatz des oberflächenaktiven Hilfsstoffes so gering wie möglich gehalten werden sollte, wurden weitere Versuche mit unterschiedlichen Hilfsstoffkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurde eine Versuchsreihe mit 5% Itraconazol und Polysorbat 80 durchgeführt, bei der der Hilfsstoffzusatz ab einer Gesamtkonzentration von 0,4% in Schritten von 0,2% auf 1,2% erhöht wurde. Prozentual auf die Masse des Feststoffes entsprach dies somit einem Anteil zwischen 8% und 24% Hilfsstoff.

Tabelle 5.5-1: Versuchsreihe zur Ermittlung der minimalen Stabilisatorkonzentration bei einer Feststoffkonzentration von 5%

Drehzahl	Zeit	Wirkstoff	Hilfsstoff		
[U/min]	[Min]	[%]	Name	[%] relativ	[%]absolut
4000	240	5,0	Polysorbat 80	8,0	0,4
4000	240	5,0	Polysorbat 80	12,0	0,6
4000	240	5,0	Polysorbat 80	14,0	0,7
4000	240	5,0	Polysorbat 80	16,0	0,8
4000	240	5,0	Polysorbat 80	20,0	1,0
4000	240	5,0	Polysorbat 80	24,0	1,2

Die Herstellung der Suspensionen erfolgte wie in Abschnitt 3.4 beschrieben. Nach einer Mahldauer von 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten wurden Proben aus dem laufenden Mahlvorgang entnommen und umgehend die Partikelgröße mittels Laserlichtstreuung bestimmt. Die Proben ließen sich ab einer Konzentration von 0,6% absolutem, bzw. 12% relativem Zusatz von Polysorbat 80 ohne eine Viskositätszunahme vermahlen. Bei einer Konzentration von 0,6% zeigte sich jedoch ab einer Mahldauer von 180 Minuten wieder ein Anstieg der Partikelgröße von einem Minimum von 219 nm nach 120 Minuten auf 250 nm nach einer Mahldauer von 240 Minuten. Dies lässt den Schluss zu, dass eine weitere Zerkleinerung zu Reagglomeration der Partikel aufgrund einer unzureichenden Menge an stabilisierendem Hilfsstoff in der Suspension führt. Bei höheren Hilfsstoffkonzentrationen ab einer Konzentration von 0,8% konnte dieser Anstieg über den zeitlichen Verlauf der Mahlung nicht mehr beobachtet werden. Es wurde daher eine weitere Mahlung mit einem Masseanteil von 0,7% Polysorbat 80 durchgeführt, um die minimale Konzentration zur Stabilisierung zu ermitteln. Auch bei einem Hilfsstoffanteil von 0,7% kam es nicht zu einem Anstieg der Partikelgröße. Die Messergebnisse ergaben mit ca. 170 nm sogar die geringsten Partikelgrößen bei dieser Feststoffkonzentration. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Zusatz von 0,7% Polysorbat 80 optimal für die sterische Stabilisierung der Partikel ist. In Abbildung 5.5-1 lässt sich jedoch auch erkennen, dass bei allen Hilfsstoffzusätzen ab einer Mahldauer von 180 Minuten keine weitere Zerkleinerungswirkung mehr zu erkennen ist. Bei der Begutachtung der Ergebnisse für die Polydispersitätsindices zeigt sich jedoch, dass diese über den zeitlichen Verlauf weiter abnehmen.

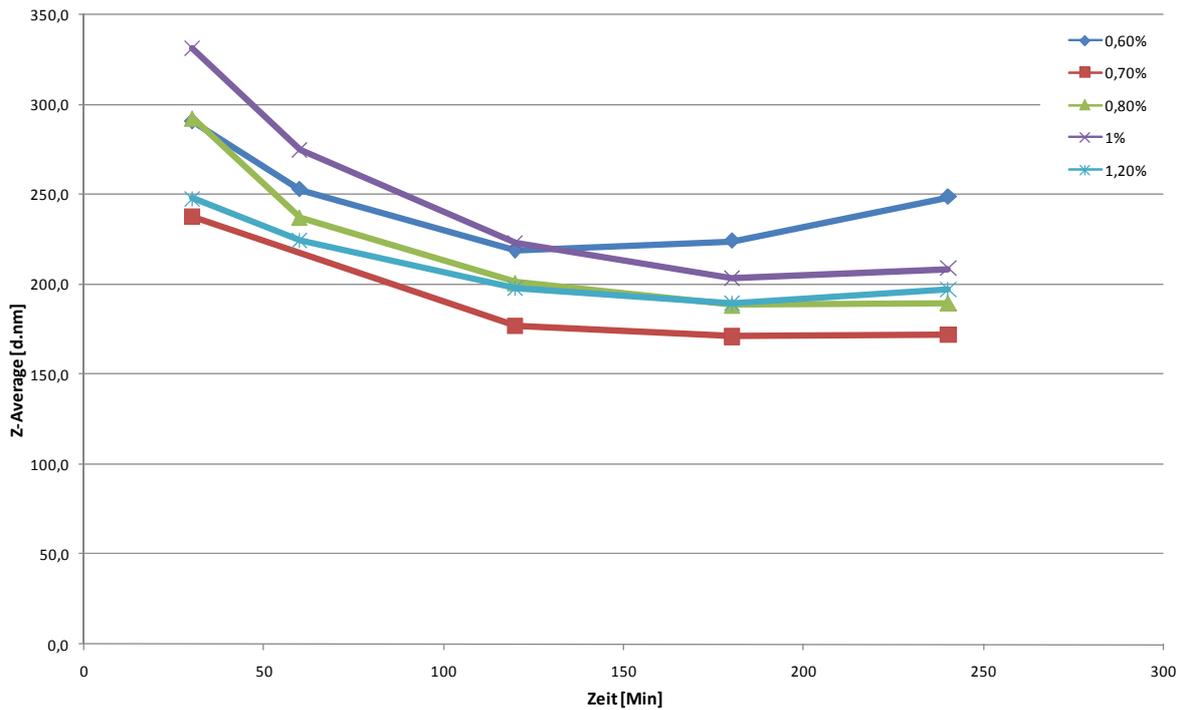


Abbildung 5.5-1: Abnahme der Partikelgröße über den zeitlichen Verlauf der Mahlung bei Einsatz von 0,6% bis 1,2% absolutem Hilfsstoff- und 5% Feststoffanteil.

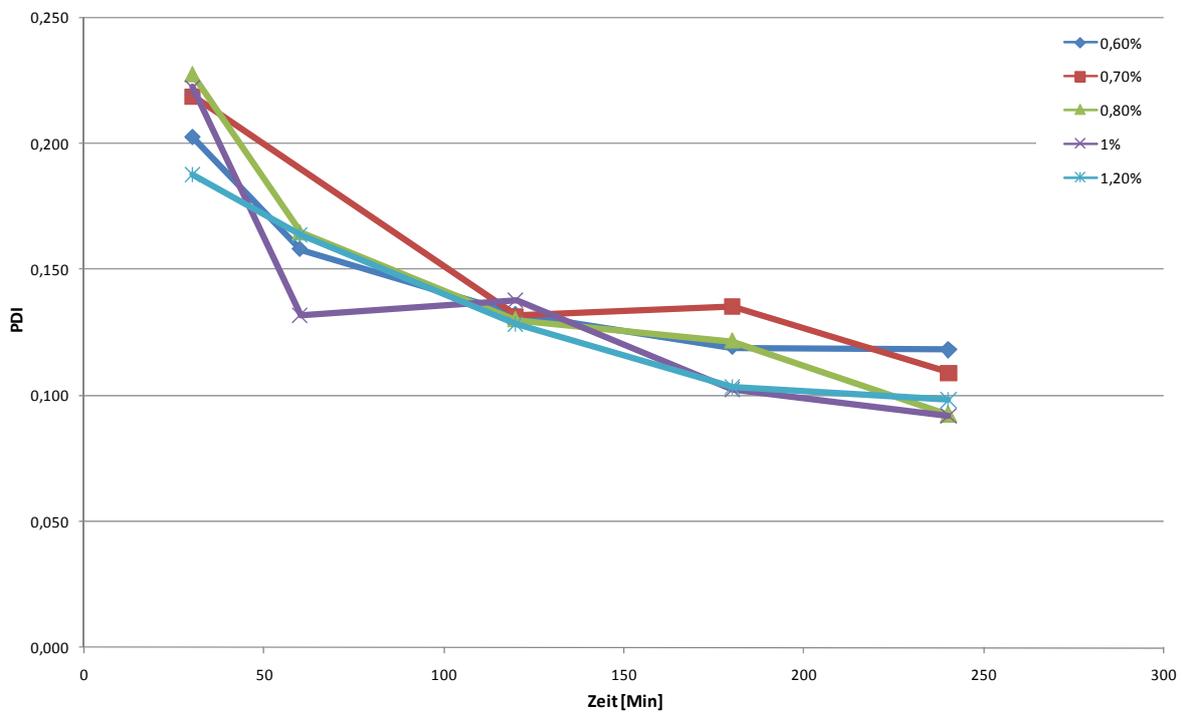


Abbildung 5.5-2: Abnahme der PDI-Werte über den zeitlichen Verlauf der Mahlung bei Einsatz von 0,6% bis 1,2% absolutem Hilfsstoff- und 5% Feststoffanteil.

Die Proben mit einem höheren Hilfsstoffzusatz zeigen dabei mit Werten zwischen 0,090 und 0,100 die niedrigsten PDI-Werte, die Probe mit 0,6% mit einem Wert von 0,118 den höchsten. Der Wert bei 0,7% Hilfsstoffzusatz liegt mit 0,109 genau zwischen diesen Werten. Auch wenn diese Ergebnisse dafür sprechen, dass ein höherer Zusatz an Polysorbat 80 auch eine bessere Homogenität der Probe zur Folge hat, muss berücksichtigt werden, dass die Werte in einem sehr engen Bereich liegen und auch der höchste Wert mit 0,118 noch für ein sehr homogenes Mahlergebnis spricht.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte ermittelt werden, ob sich die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit 5% Feststoff auch auf einen höheren Feststoffanteil von 10% übertragen lassen. Als Hilfsstoff wurde wiederum Polysorbat 80 eingesetzt, wobei der Hilfsstoffzusatz ab einer Gesamtkonzentration von 0,8% in Schritten von 0,2% auf 1,5% erhöht wurde. Prozentual auf die Masse des Feststoffes entsprach dies somit einem Anteil zwischen 8% und 15% Hilfsstoff und damit den gleichen Konzentrationen wie im vorherigen Versuchsplan. Die Parameter der einzelnen Versuche sind in Tabelle 5.5-2 aufgeführt.

Tabelle 5.5-2: Versuchsreihe zur Ermittlung der minimalen Stabilisatorkonzentration bei einer Feststoffkonzentration von 10%

Drehzahl [U/min]	Zeit [Min]	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff		
			Name	[%] relativ	[%] absolut
4000	240	10,0	Polysorbat 80	8,0	0,8
4000	240	10,0	Polysorbat 80	10,0	1,0
4000	240	10,0	Polysorbat 80	12,0	1,2
4000	240	10,0	Polysorbat 80	14,0	1,4
4000	240	10,0	Polysorbat 80	15,0	1,5

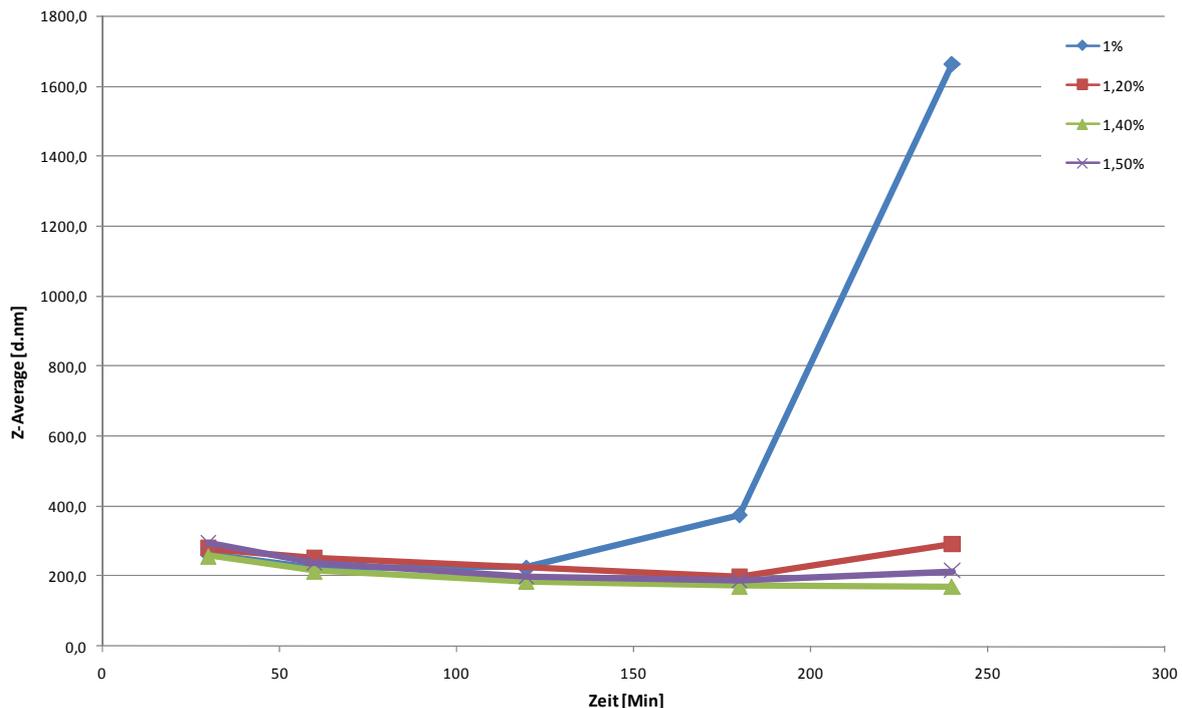


Abbildung 5.5-3: Abnahme der Partikelgröße über den zeitlichen Verlauf der Mahlung bei Einsatz von 1% bis 1,5% absolutem Hilfsstoff- und 10% Feststoffanteil.

Analog zu den Ergebnissen mit 5% Feststoffanteil zeigte sich auch bei diesen Versuchen eine unzureichende Stabilisierung der Partikel bei niedrigeren Hilfsstoffzusätzen. Bei einer Hilfsstoffkonzentration von 1,0% zeigte sich anfänglich eine Zerkleinerung der Partikel. Nach einer Mahldauer von 120 Minuten kam es jedoch zu einem starken Anstieg der Partikelgröße durch Agglomeration bis auf 1670 nm nach 240 Minuten. Ab 1,2% Hilfsstoffzusatz zeigte sich auch hier eine gute Stabilisierung der Chargen, wobei es bei 1,2% noch zu einem Anstieg der Partikelgröße von 197,7 nm auf 292,5 nm in den letzten 60 Minuten der Mahldauer kam. Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen von 0,6% Hilfsstoffzusatz bei 5% Feststoff, wobei beide Proben einen Hilfsstoffzusatz von 12% bezogen auf den Feststoffanteil haben. Die Erhöhung des Hilfsstoffzusatzes von 1,2% auf 1,4% erbrachte auch hier einen Erfolg bei der Partikelstabilisierung, wobei die Partikelgröße mit 171,5 nm wiederum die geringsten Werte der Versuchsreihe ergab.

Einhergehend mit den Beobachtungen mit 5% Feststoff zeigt sich auch bei Einsatz von 10% Feststoff keine nennenswerte Partikelzerkleinerung ab einer Mahldauer von 180 Minuten.

Bei den Polydispersitätsindices in Abbildung 5.5-4 ist zu beobachten, dass sich für die gut stabilisierten Chargen auch hier keine deutliche Abnahme der Werte mehr ergibt. Die niedrigeren PDI-Werte zeigt jedoch auch hier mit 0,095 die Probe mit dem höchsten Anteil an Polysorbat 80. Für die Charge mit 1,4% Stabilisator lag der Wert mit 0,131 bereits deutlich darüber. Bei der Hilfsstoffkonzentrationen von 1,2% nahm der PDI nach einem Minimum von 0,107 nach 180 Minuten wieder deutlich auf 0,219 nach 240 Minuten zu, was ebenfalls für eine Agglomeration spricht. Die Charge mit 1% Hilfsstoff zeigte diese Zunahme bereits nach 120 Minuten. Die Messung des PDI-Wertes ergab nach 240 Minuten einen Messwert von 0,562, so dass die Messung praktisch nicht mehr auswertbar ist.

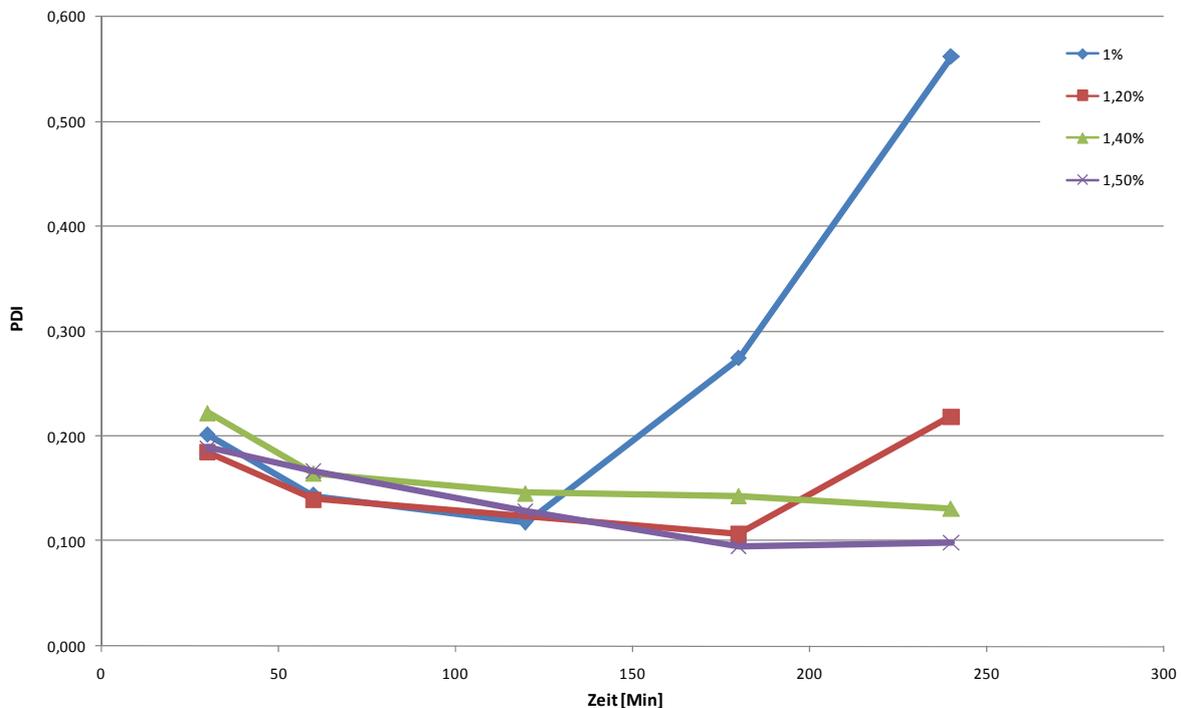


Abbildung 5.5-4: PDI-Werte über den zeitlichen Verlauf der Mahlung bei Einsatz von 1% bis 1,5% absolutem Hilfsstoff- und 10% Feststoffanteil.

Anhand der beiden niedrigsten Hilfsstoffzusätze von 0,4% bei 5% Feststoff und 0,8% bei 10% Feststoff lässt sich die Abhängigkeit der Partikelgröße vom Stabilisatorzusatz noch einmal verdeutlichen. In Abbildung 5.5-5 ist das Wachstum der Partikel über den zeitlichen Verlauf der Mahlung dargestellt. Nach einer Mahldauer von 30 Minuten konnten die Feststoffpartikel auf eine Größe von 271 nm bzw. 274 nm zerkleinert werden. Die annähernd gleiche Partikelgröße spricht dabei für die Effektivität und Reproduzierbarkeit des Mahlverfahrens. Im weiteren Verlauf der Mahlung kam es jedoch bei beiden Proben zu einer starken Partikelgrößenzunahme. Bei der Charge mit 5% Feststoffanteil ist der Messbereich der Photonenkorrelationspektroskopie von 6000 nm bereits nach 120 Minuten überschritten. Bei der Feststoffkonzentration von 10% kam es nach 180 Minuten zur Messbereichsüberschreitung.

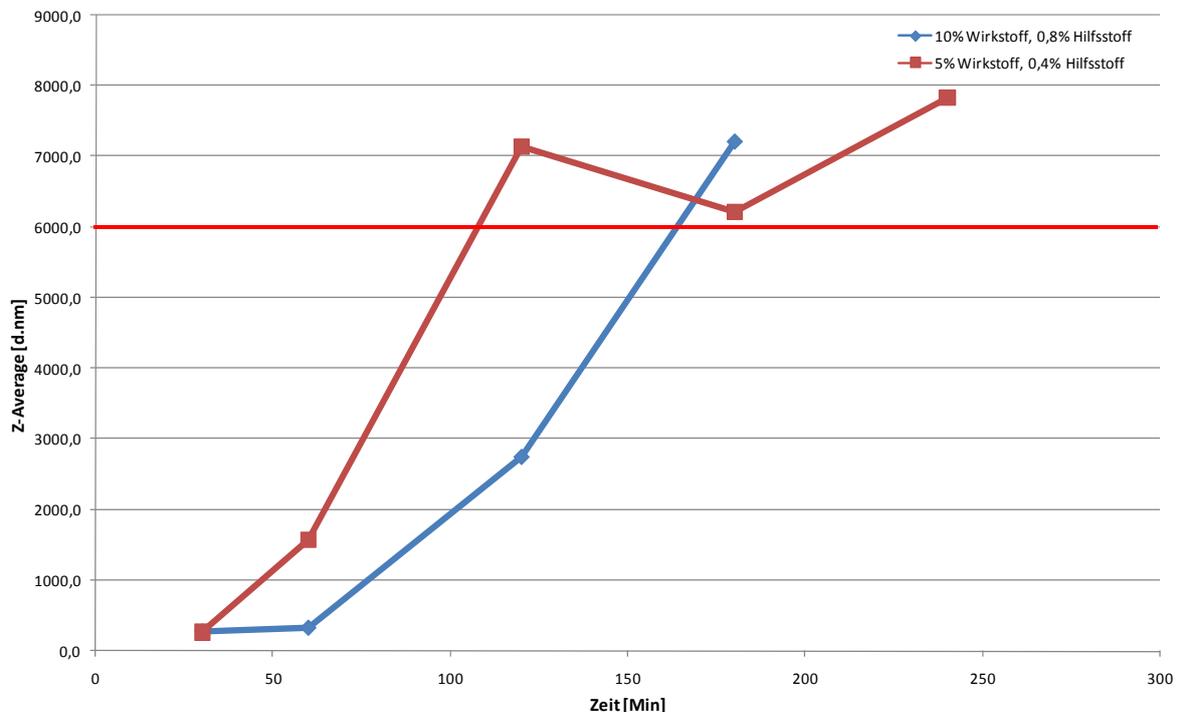


Abbildung 5.5-5: Wachstum der Partikelgröße über den zeitlichen Verlauf der Mahlung für Feststoffkonzentrationen von 5% und 10% (Messbereich der PCS bis 6000 nm).

Mit abnehmender Partikelgröße wird die zu stabilisierende Oberfläche immer größer. Der Stabilisator besetzt diese neuen Grenzflächen, wodurch dem System immer mehr Hilfsstoff entzogen wird. Dabei kann die Adsorption von Polysorbat 80 auf der Oberfläche der Partikel durch eine Langmuir Isotherme beschrieben werden (Doro et al., 1998). Ab einem bestimmten Zerkleinerungsgrad der Partikel reicht die Menge des Stabilisators nicht mehr aus, um die Grenzflächen vollständig zu besetzen und somit sterisch zu stabilisieren; es kommt zu einer Annäherung und schließlich zur Agglomeration der Partikel. In diesen Agglomeraten wird jedoch auch ein Anteil an Hilfsstoff eingeschlossen. Im Verlauf des Mahlprozesses wird die Menge des Stabilisators somit immer weiter erniedrigt. Auch von den Oberflächen der bereits ausreichend stabilisierten Partikel geht durch Diffusion Stabilisator verloren, was zu einem Gesamtanstieg der Partikelgröße durch Agglomeration in der Suspension führt.

Die Beobachtungen dieser Versuchsreihe zeigen deutlich, dass die untere Grenze bei einer Konzentration von 14% Polysorbat 80 bezogen auf den Feststoffanteil liegt. Dies entspricht bei einer Feststoffkonzentration von 5% einer absoluten Konzentration von 0,7% (m/m) und 1,4% (m/m) bei 10% Feststoff. Bei einer Erniedrigung des Stabilisatorzusatzes unter diese Grenze kommt es zu einer deutlichen Agglomeration der Partikel. Es muss jedoch angenommen werden, dass diese Werte nur für die vorliegende Kombination aus Wirkstoff und Hilfsstoff Gültigkeit besitzen. Der Hilfsstoffzusatz ist von der Oberfläche des Feststoffes abhängig, die aufgrund der Partikelgeometrie und Bruchcharakteristik für jeden Stoff unterschiedlich ist. Auch die Art des Hilfsstoffes spielt eine wichtige Rolle. Die Werte liefern jedoch eine ungefähre Näherung für die Einschätzung des minimal benötigten Hilfsstoffzusatzes für den Stabilisator Polysorbat 80.

5.6 *Mahlung in Kombination verschiedener Stabilisatoren*

Analog zum Tensid-Cotensid-Ansatz sollte untersucht werden, ob die Kombination von Stabilisatoren einen Einfluss auf die Partikelgröße zeigt. Dabei wurde vor allem der Zusatz von Polyethylenglykol (PEG) zu Polysorbat 80 stabilisierten Suspensionen untersucht. Die in Kapitel 5.4.2 untersuchten stabilisierenden Hilfsstoffe verfügen alle über einen Polyethylenglykolanteil, der mit für die sterische Stabilisierung verantwortlich ist. Bei weiterer Erhöhung des Polyethylenanteils sollte eine weitere sterische Behinderung der Agglomeration untersucht werden. Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 5.4 wurde der Stabilisatorzusatz von Polysorbat 80 für die Durchführung der Versuche so gewählt, dass er bei drei Versuchen mit 0,5% (absolut) nicht ausreichend für eine Stabilisierung der Partikel war und Agglomeration erwartet werden konnte. Den Chargen wurde jeweils Polyethylenglykol 400 als weiterer Stabilisator in steigenden absoluten Konzentrationen von 0,5%, 1% und 2,5% zugesetzt. Es sollte so ermittelt werden, ob sich die Menge des eigentlichen Stabilisators Polysorbat 80 durch Zusatz von PEG weiter erniedrigen lässt. Die Parameter der Versuche sind in Tabelle 5.6-1 aufgeführt.

Tabelle 5.6-1: Parameter für die Kombination von Polysorbat 80 mit PEG 400 unter Angabe des absoluten Hilfsstoffzusatzes in % (m/m)

Charge	Drehzahl	Zeit	Wirkstoff	Hilfsstoff			
	[U/min]			[Min]	[%]	[%]	[%]
1	4000	240	5,0	Polysorbat 80	0,5	PEG 400	0,5
2	4000	240	5,0	Polysorbat 80	0,5	PEG 400	1,0
3	4000	240	5,0	Polysorbat 80	0,5	PEG 400	2,5

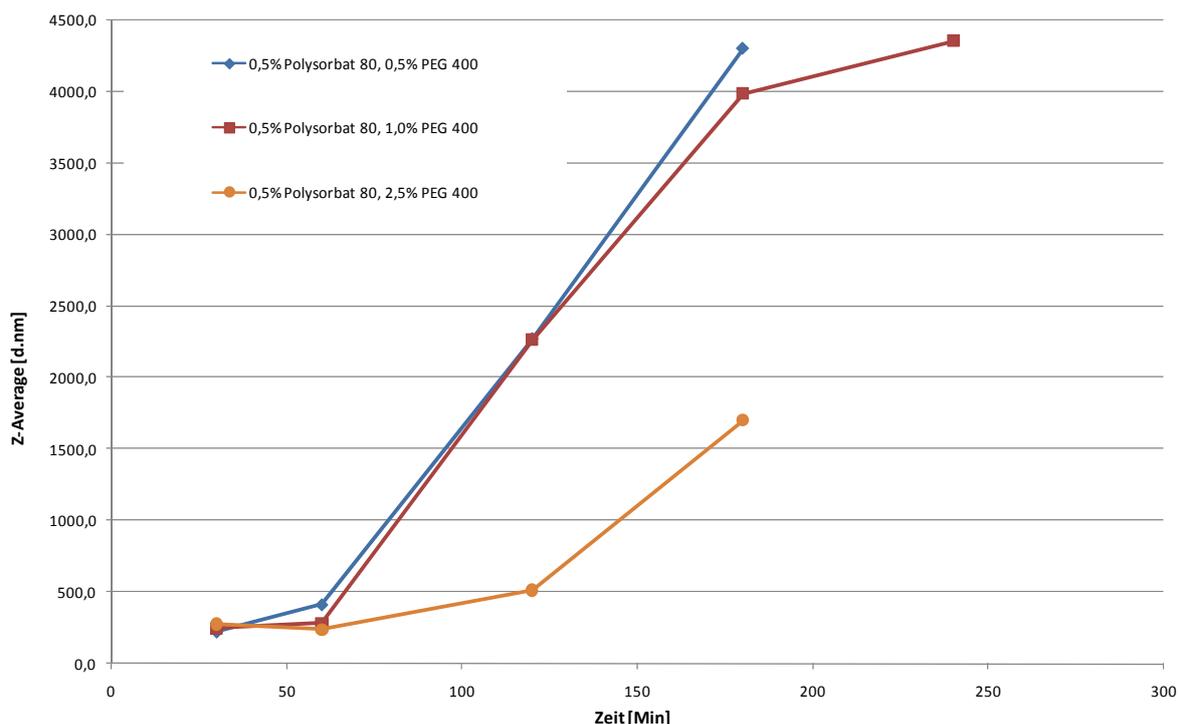


Abbildung 5.6-1: Ergebnis der Partikelgrößenmessung bei zu geringer Konzentration an Polysorbat 80 von 0,5% absolut unter Zusatz von Polyethylenglykol 400

Die Suspensionen wurden wie in 3.4 beschrieben hergestellt, wobei der Polyethylenglykolzusatz mit dem Polysorbat gemeinsam eingewogen und in der wässrigen Phase gelöst wurde. Die Einwaage des Arzneistoffes erfolgte anschließend in die hergestellte Lösung. In Abbildung 5.6-1 und Tabelle 5.6-2 sind die Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen der Mahlungen über den zeitlichen Ablauf dargestellt. Anfänglich zeigt sich eine gute Zerkleinerung des Feststoffes auf Werte von unter 276 nm nach 30 Minuten Mahldauer. Dabei fällt auf, dass Charge 1, mit dem niedrigsten Zusatz von 0,5% (absolut) PEG 400, die mit 223,7 nm geringste Partikelgröße aufweist. Die größten Partikel wurden mit 276,4 nm nach 30 Minuten Mahldauer in der Charge mit 2,5% (absolut) höchsten Gehalt an PEG 400 ermittelt. Im weiteren Verlauf der Mahlung zeigte sich bei allen Proben eine Agglomeration der Partikel. Hier wies allerdings die Probe mit dem geringsten PEG-Anteil als erste eine Partikelgrößenzunahme auf 413 nm nach 60 Minuten auf.

Tabelle 5.6-2: Messergebnisse der Partikelgrößenmessungen über 240 Minuten

Zeit [Min]	0,5% PEG 400		1% PEG 400		2,5% PEG 400	
	Z-Avg.	PDI	Z-Avg.	PDI	Z-Avg.	PDI
30	223,7	0,196	247,5	0,179	276,4	0,206
60	413,4	0,674	279,4	0,185	238,4	0,152
120	2272,3	0,541	2263,0	0,539	512,9	0,351
180	4301,0	0,497	3988,3	0,512	1701,7	0,903
240	-	-	4353,3	0,479	-	-

Bei der Charge mit 1% PEG 400 konnte nur eine leichte Zunahme der Partikelgröße von 247,5 nm nach 30 Minuten auf 279,4 nm nach 60 Minuten Mahldauer beobachtet werden. Die Charge mit dem höchsten PEG 400 Zusatz von 2,5% wies nach 60 Minuten eine weitere Partikelzerkleinerung auf 238,4 nm auf. Nach 120 Minuten Mahldauer zeigte sich jedoch auch hier eine Agglomeration mit einem Anstieg der gemessenen Partikelgröße auf 512,9 nm. Die beiden anderen Chargen wiesen allerdings bereits deutlich höhere Werte von über 2200 nm auf. Auch die Werte des Polydispersitätsindex lassen bei den drei Chargen auf eine Agglomeration der Partikel schließen. Nach anfänglichen Werten von 0,179 bis 0,206 zeigt sich mit zunehmender Partikelgröße auch ein Anstieg der PDI-Werte (siehe Tabelle 5.6-2). Insgesamt lässt sich sagen, dass bei steigendem Anteil an Polyethylenglykol in der Probe die anfängliche Zerkleinerung schlechter ist, über den Mahlverlauf jedoch eine bessere Stabilisierung der Partikel erreicht werden kann. Dies spricht für eine leichte sterische Behinderung der Agglomeration. Eine Erniedrigung des Stabilisators Polysorbat 80 scheint durch einen Zusatz von PEG 400 jedoch nicht möglich zu sein. Neben der sterischen Stabilisierung der Partikel kann auch eine Viskositätserhöhung der Charge durch den gesteigerten PEG-Anteil zur Stabilität der Chargen beitragen.

Bei einer weiteren Charge wurde eine Kombination von 0,5% Polysorbat 80 und 0,5% Poloxamer 188 eingesetzt. Der Hintergrund war der Versuch, die Konzentration von Polysorbat 80 mit einer zusätzlichen sterischen Stabilisierung durch den Zusatz von Poloxamer 188 absenken zu können. Außerdem enthielt die Charge noch 2,5% PEG 400. In weiteren Versuchen wurde die Konzentration an Polysorbat 80 auf 0,7% bzw. 1% unter Zusatz steigender Konzentrationen PEG 400 erhöht. Auf diesem Weg sollte ermittelt werden, ob der Zusatz von PEG 400 positive Eigenschaften auf die Homogenität des Mahlergebnis bei ausreichend stabilisierten Proben hat. Die Parameter der Untersuchungen sind in

Tabelle 5.6-3 aufgeführt.

Die Partikelgrößenmessung nach einer Mahldauer von 30 Minuten ergab für die Chargen, die nur Polysorbat 80 und PEG 400 enthielten eine Partikelgröße von 234 nm bis 325 nm. Auch hier zeigte sich eine Abhängigkeit zwischen ermittelter Partikelgröße und dem Zusatz des Polyethylenglykols. Bei steigender PEG-Konzentration war ein geringerer Mahlerfolg mit gestiegener Partikelgröße zu erkennen. Im weiteren Mahlverlauf zeigten alle drei Chargen eine gute Zerkleinerungswirkung und Stabilisierung der Partikel. Die Partikelgrößenmessung der Charge 7 mit einer Kombination von Polysorbat 80 mit Poloxamer 188 ergab nach einer Mahldauer von 30 Minuten einen Wert von 289 nm. Sieht man die Kombination der beiden Stabilisatoren zusammen als einen 1%igen Zusatz und vergleicht diesen Wert mit der Partikelgröße von Charge 6 mit 1% Polysorbat 80, zeigt sich ein besseres Mahlergebnis für Charge 7. Die Partikelgrößenmessungen dieser Charge ließen jedoch nach einer Mahldauer von 180 Minuten eine unzureichende Stabilisierung und eine Agglomeration der Partikel auf 279,2 nm erkennen (Abbildung 5.6-2).

Mahlung in Kombination verschiedener Stabilisatoren

Tabelle 5.6-3: Parameter für die Kombination von Polysorbat 80 mit PEG 400 unter Angabe des absoluten Hilfsstoffzusatzes in % (m/m)

Charge	Drehzahl [U/min]	Zeit [Min]	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff			
				Polysorbat 80		PEG 400	
				[%]	[%]	[%]	[%]
4	4000	240	5,0	Polysorbat 80	0,7	PEG 400	0,5
5	4000	240	5,0	Polysorbat 80	0,7	PEG 400	1,0
6	4000	240	5,0	Polysorbat 80	1,0	PEG 400	2,5
7	4000	240 </td <td>5,0</td> <td>Polysorbat 80 Poloxamer 188</td> <td>0,5 0,5</td> <td>PEG 400</td> <td>2,5</td>	5,0	Polysorbat 80 Poloxamer 188	0,5 0,5	PEG 400	2,5

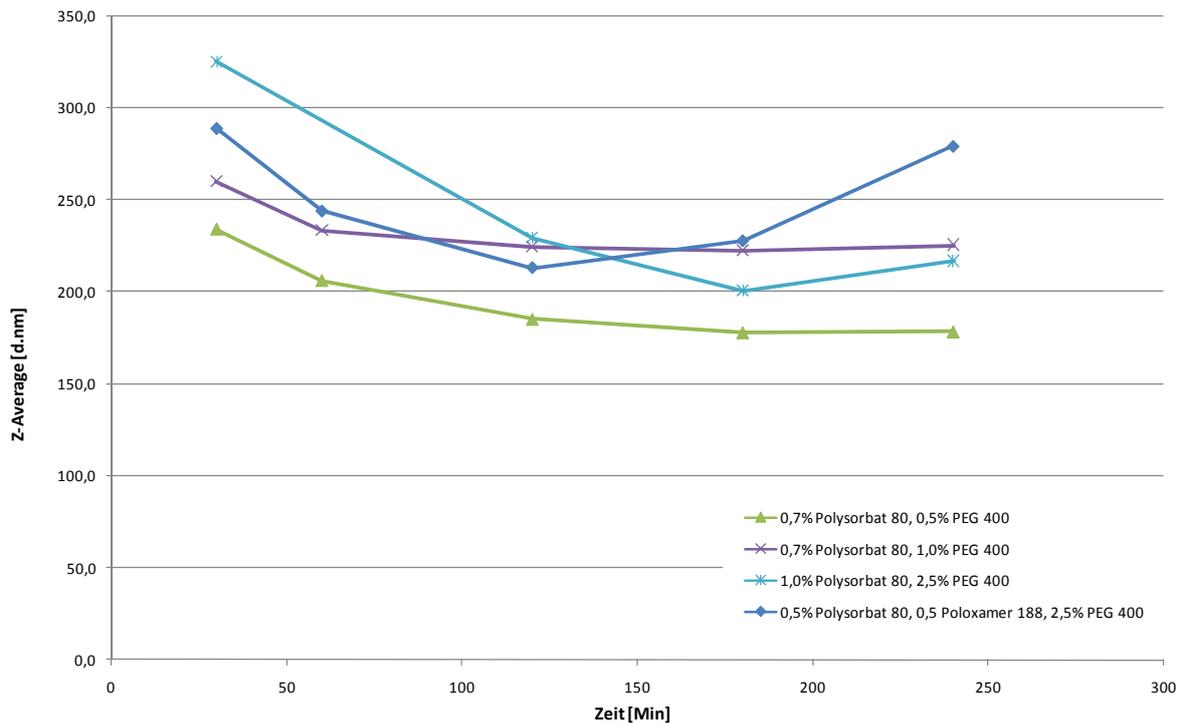


Abbildung 5.6-2: Ergebnis der Partikelgrößenmessung bei unterschiedlichen Stabilisatorkonzentrationen unter Zusatz von Polyethylenglykol 400

Tabelle 5.6-4: Ergebnisse der Messungen bei unterschiedlichen Stabilisatorkonzentrationen unter Zusatz von Polyethylenglykol 400

Zeit [Min]	0,7% Polysorbat 80				1,0% Polysorbat 80		0,5% Polysorbat 80, 0,5% Poloxamer 188	
	0,5% PEG 400		1,0% PEG 400		2,5% PEG 400		2,5% PEG 400	
	Z-Avg.	PDI	Z-Avg.	PDI	Z-Avg.	PDI	Z-Avg.	PDI
30	234,0	0,174	260,1	0,179	325,1	0,168	289,0	0,181
60	206,1	0,136	233,3	0,142	-	-	243,8	0,149
120	185,1	0,114	224,6	0,123	229,1	0,113	212,9	0,134
180	177,8	0,115	222,5	0,102	200,7	0,104	227,6	0,114
240	178,3	0,106	225,5	0,105	216,7	0,098	279,2	0,130

Die Mahlungen mit einem Stabilisatorzusatz von 0,7% und 1% Polysorbat 80 zeigten eine gute Zerkleinerungswirkung. mit Partikelgrößen von 178,3 nm bis 225,5 nm (Tabelle 5.6-4). Der Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und der Konzentration der Hilfsstoffe lässt sich jedoch auch nach Abschluss der Mahlung erkennen. Die kleinsten Partikelgrößen konnten mit dem geringsten Zusatz an Hilfsstoffen erzielt werden. Bei Charge 5 ließ sich ab einer Mahldauer von 120 Minuten keine weitere Zerkleinerung der Partikel mehr feststellen. Bei Charge 6 mit einem höheren Anteil an Stabilisator als auch PEG 400 ließ sich dieser Effekt nicht erkennen, womit der Einfluss einer zu hohen Konzentration eines Hilfsstoffes bei Charge 5 ausgeschlossen werden kann. Die ermittelten Teilchengrößen lagen nach Abschluss der Mahlung um ca. 40 nm über denen der nächst kleineren Charge 4.

Die Werte des Polydispersitätsindex lagen bei allen Chargen bereits nach einer Mahldauer von 30 Minuten unter 0,200. Auch nach Abschluss der Mahlung lagen die Werte um 0,100, was bei allen Chargen auf eine sehr gute Homogenität schließen lässt. Charge 7, mit einem Zusatz an Poloxamer 188 zeigte ab einer Mahldauer von 120 Minuten eine Agglomeration der Partikel. Der PDI-Wert nahm jedoch zum

Messzeitpunkt nach 180 Minuten auf ein Minimum von 0,114 weiter ab. Nach 240 Minuten zeigte sich jedoch auch beim PDI-Wert ein Anstieg auf 0,130.

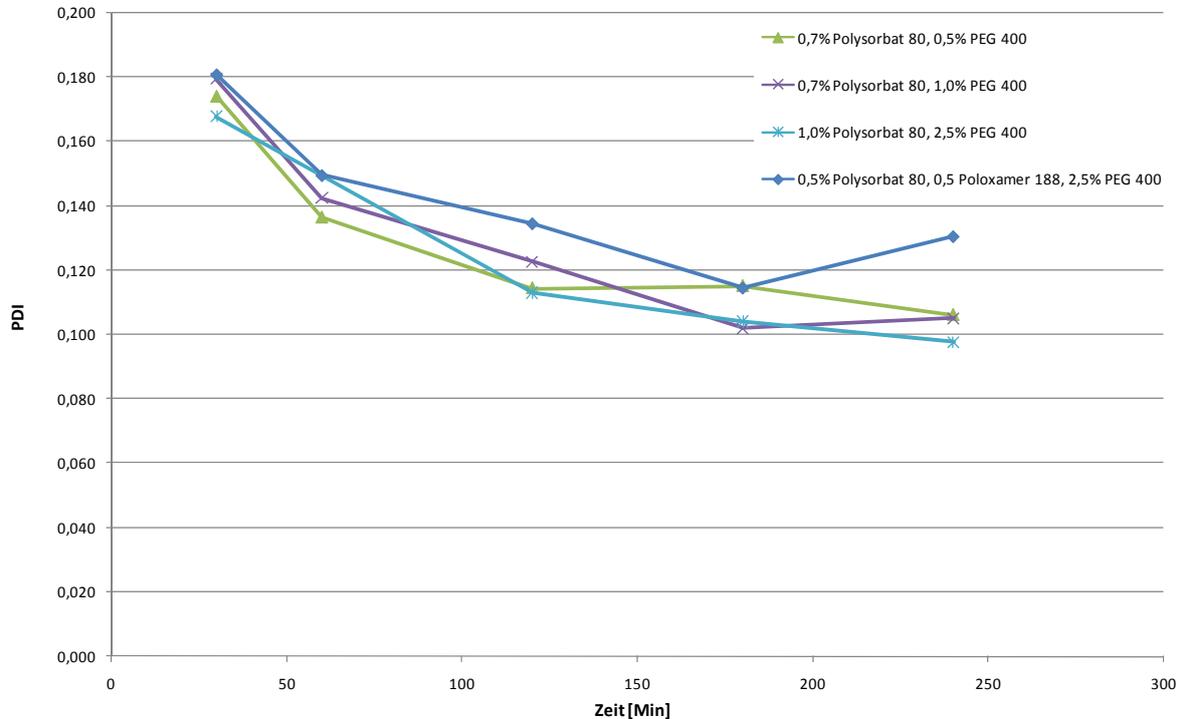


Abbildung 5.6-3: PDI-Werte bei unterschiedlichen Stabilisatorkonzentrationen unter Zusatz von Polyethylenglykol 400

Abschließend lässt sich sagen, dass eine weitere Reduktion des Stabilisatorzusatzes durch Kombination von Polysorbat 80 mit Poloxamer 188, zumindest in den verwendeten Konzentrationen, keinen Erfolg zu haben scheint. Chargen mit einem Zusatz von 1% Polysorbat 80 zeigen eine ausreichende Stabilisierung der Suspension. Beachtet man, dass die Gesamtkonzentration an Stabilisator in Charge 7 ebenfalls 1% beträgt, spricht dies für den unzureichenden stabilisierenden Effekt des Blockpolymers, der bereits in 5.4.2 festgestellt wurde. Im Gegensatz zu den Chargen 1 bis 3, die ausschließlich mit 0,5% Polysorbat 80 stabilisiert wurden, zeigt sich für Charge 7 jedoch eine wesentlich geringere Agglomerationsneigung der Partikel. Vergleicht man allerdings Charge 3, in der 0,5% Polysorbat 80 mit einem

Zusatz von 2,5% PEG 400 versehen wurde, mit den Ergebnissen der Charge 7, bei der die gleiche Rezeptur, nur mit dem weiteren Zusatz von Poloxamer 188, vorliegt, zeigt sich bei beiden eine Agglomeration der Partikel nach 120 Minuten Mahldauer. Die Agglomeration erfolgt bei Charge 7 jedoch wesentlich langsamer und auch die PDI-Werte lassen auf eine bessere Homogenität der Charge schließen.

Der Zusatz von Polyethylenglykol in den verwendeten Konzentrationen konnte insgesamt keinen positiven Einfluss auf das Mahlergebnis zeigen. In hohen Konzentrationen lässt sich eine verlangsamte Agglomerationsneigung der Partikel erkennen, was für eine leichte sterische Stabilisierung spricht. Allerdings führten steigende Konzentrationen von Polyethylenglykol auch zu einem schlechteren Mahlergebnis. Dieser Effekt kann auf eine Besetzung der Partikeloberflächen durch das Makromolekül zurückzuführen sein, bei der die Partikel an der Zerkleinerung gehindert werden. Eine weitere Möglichkeit ist eine Zunahme der Viskosität der Proben durch den steigenden PEG-Zusatz.

Insgesamt lässt sich sagen, dass auch eine Kombination von Polysorbat 80 mit Polyethylenglykol 400 keinen positiven Effekt auf die Suspensionsstabilisierung zeigte.

5.7 *Einstellung verschiedener pH-Werte*

Die Messung des Zetapotentials der entwickelten Formulierungen mit sterischer Stabilisierung ergab Werte zwischen -20 bis -30 mV. Trotz der sterischen Stabilisierung wurde diese Oberflächenladung als zu gering angesehen, weshalb versucht werden sollte das Zetapotential durch Zusatz von Elektrolyten zu verändern. Als Vorversuch wurde eine stabile Nanosuspension mit 5% Wirkstoff und 0,7% Polysorbat 80 als

Stabilisator hergestellt. Als äußere Phase wurde dabei Aq. bidest verwendet. Nach Abschluss der Mahlung wurde die Teilchengröße der Partikel in der Suspension bestimmt. Anschließend wurde die Probe auf 7 Vials aufgeteilt und in jedem Vial ein anderer pH-Wert eingestellt. Die Einstellung erfolgte mit Hilfe von verdünnter HCl und NaOH auf einen pH-Wert von 4, 5, 6, 7, 8 und 9. Nachdem der pH-Wert eingestellt war, wurden die Proben erneut auf Partikelgröße und Zetapotential untersucht, über einen Zeitraum von 14 Tagen bei Raumtemperatur gelagert und die Partikelgrößenänderung über diesen Zeitraum beobachtet. Die Ergebnisse der Partikelgrößenuntersuchungen sind in Abbildung 5.7-1 grafisch dargestellt. Daraus ergibt sich für alle Proben mit verändertem pH-Wert eine höhere Teilchengröße als bei der unveränderten Probe, was darauf schließen lässt, dass die Agglomerationsneigung durch Zusatz von Elektrolyten verstärkt wird. Da der Arzneistoff Itraconazol bei saurem pH-Wert eine bessere Löslichkeit zeigt war zu vermuten, dass es bei den sauren Proben zu einer Änderung der Partikelgröße aufgrund einer Ostwald-Reifung kommt. Der Effekt lässt sich an den Proben mit pH 4 bis pH 7 erkennen. Die Partikelgröße dieser Proben lag mit über 1100 nm deutlich über der Partikelgröße der alkalischen Proben. Die Ergebnisse der Proben mit einem pH-Wert von 8 und 9 ergaben nach 14 Tagen eine Partikelgröße von ca. 800 nm bzw. 550 nm. Damit lagen die Partikelgrößen dieser Proben jedoch immer noch deutlich über den Messwerten der Ausgangsprobe, was darauf hindeutet, dass die Anwesenheit von Ionen die Stabilität der Suspensionen beeinflusst.

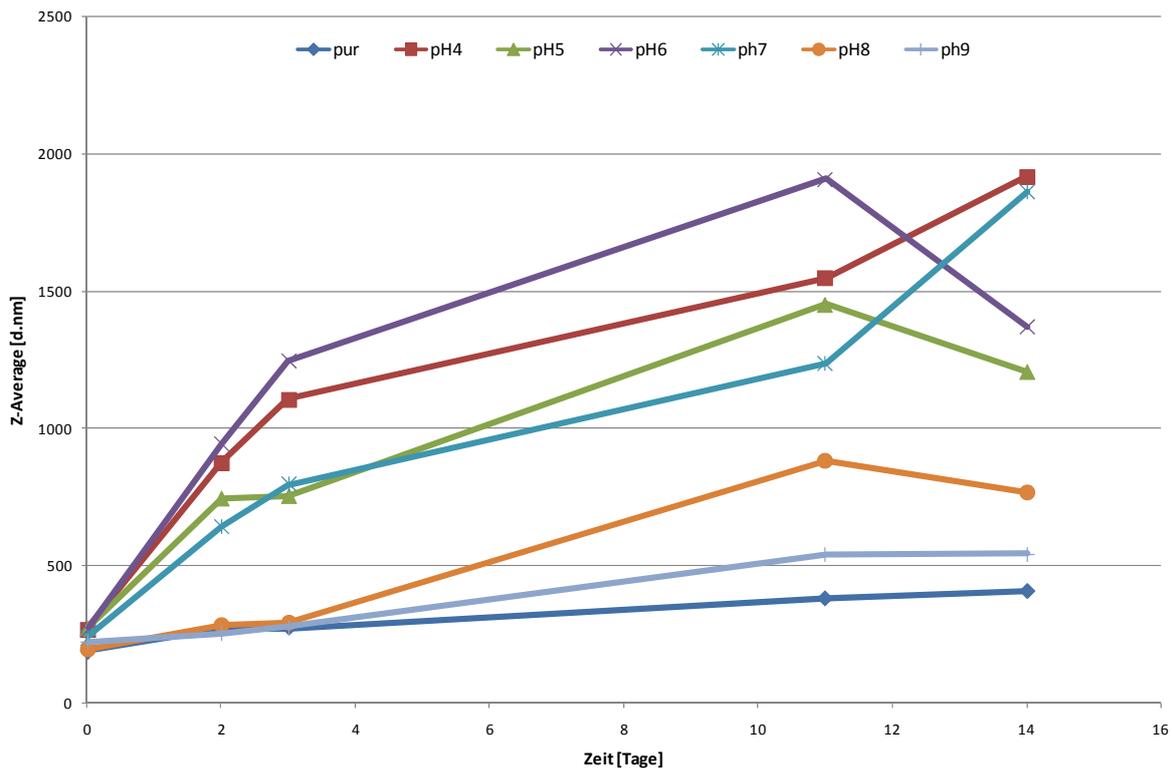


Abbildung 5.7-1: Partikelgrößenzunahme bei Einstellung der Proben auf unterschiedliche pH-Werte zwischen 4 und 9

5.7.1 Mahlung im Puffermedium

Um die Ergebnisse der pH-Wert Einstellung und die Stabilisierung der Suspension bei Elektrolytzusatz zu überprüfen, wurde eine Mahlung im Puffermedium durchgeführt. Dabei wurde ein Natriumcitrat-Puffer gewählt, da dieses Salz auch als Peptisator eingesetzt wird. Somit ist anzunehmen, dass bei Zugabe eines Peptisators die Oberflächenladung der Partikel steigt und es einen zusätzlichen stabilisierenden Effekt auf die Partikel gibt. Als pH-Wert des Puffersystems wurde pH 7,8 gewählt, da dies ungefähr dem pH-Wert in der Lunge als potentielltem Applikationsort entspricht. Die Bestandteile des Puffermediums sind in Tabelle 5.7-1 aufgeführt.

Tabelle 5.7-1: Natriumcitrat-Puffer pH 7,8 (Europäisches Arzneibuch, 2005)

Na-Citrat	10,03g
NaCl	5,91g
Aq. bidest	ad 1000,0 g

Für die Mahlung wurde eine Suspension mit 5% Wirkstoff und 0,8% Polysorbat 80 im Puffermedium hergestellt und über einen Zeitraum von 240 Minuten vermahlen. Inprozess-Kontrollen wurden nach einer Mahldauer von 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten gezogen und direkt vermessen. Die Ergebnisse der Mahlung wurden mit einer Probe, die bei gleichen Parametern im wässrigen Medium hergestellt worden war, verglichen. Die Partikelgröße nach 240 Minuten Mahldauer lag mit einem Z-Average von 398,9 nm deutlich über dem der Vergleichsprobe ohne Puffermedium mit einem Z-Average von 228,5 nm. Die Proben wurden anschließend über einen Zeitraum von 14 Tagen bei Raumtemperatur gelagert und die Partikelgrößenänderung verfolgt.

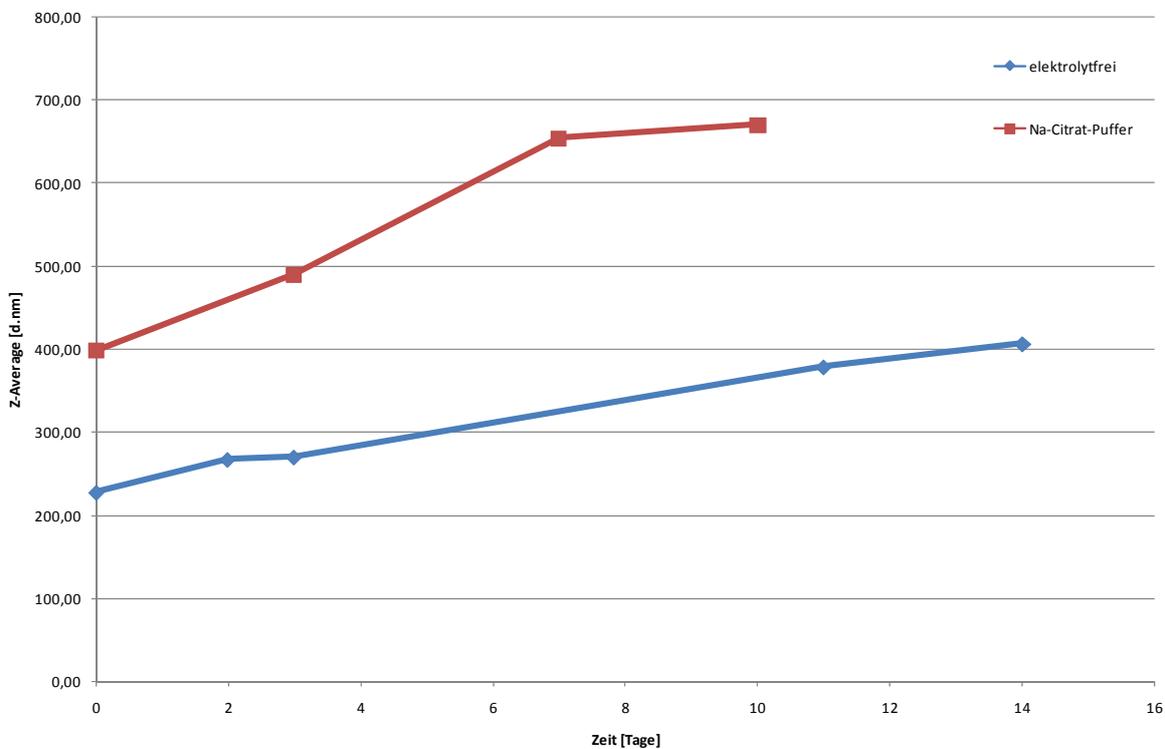


Abbildung 5.7-2: Vergleich der Mahlung im Na-Citrat Puffermedium mit der elektrolytfreien Nanosuspension über einen Zeitraum von 14 Tagen

Die Partikelgröße beider Proben nahm dabei im Beobachtungszeitraum zu. Die Probe im Natriumcitrat-Puffer zeigte mit einer Zunahme des Z-Average auf 671,2 nm nach 10 Tagen ein stärkeres Partikelwachstum als die Probe ohne Zusatz von Salzen mit einer Partikelgröße von 407,4 nm nach 14 Tagen. Die Beobachtung, dass die Zugabe von Elektrolyten das Partikelwachstum verstärkt, konnte auch in diesem Fall bestätigt werden.

Um einschätzen zu können, inwiefern sich die Oberflächenladung der Partikel durch Zusatz des Peptisators verändert hatte, wurde bei beiden Suspensionen das Zetapotential nach der Herstellung der Nanosuspension ermittelt. Die Messung sollte Aufschluss über die Möglichkeit der Abstoßung der Partikel untereinander und damit eine mögliche elektrostatische Stabilisierung geben. Sie wurden nach Verdünnung der Suspension in einer Zetapotential-Küvette in einem Probenvolumen von ca. 1 ml durchgeführt.

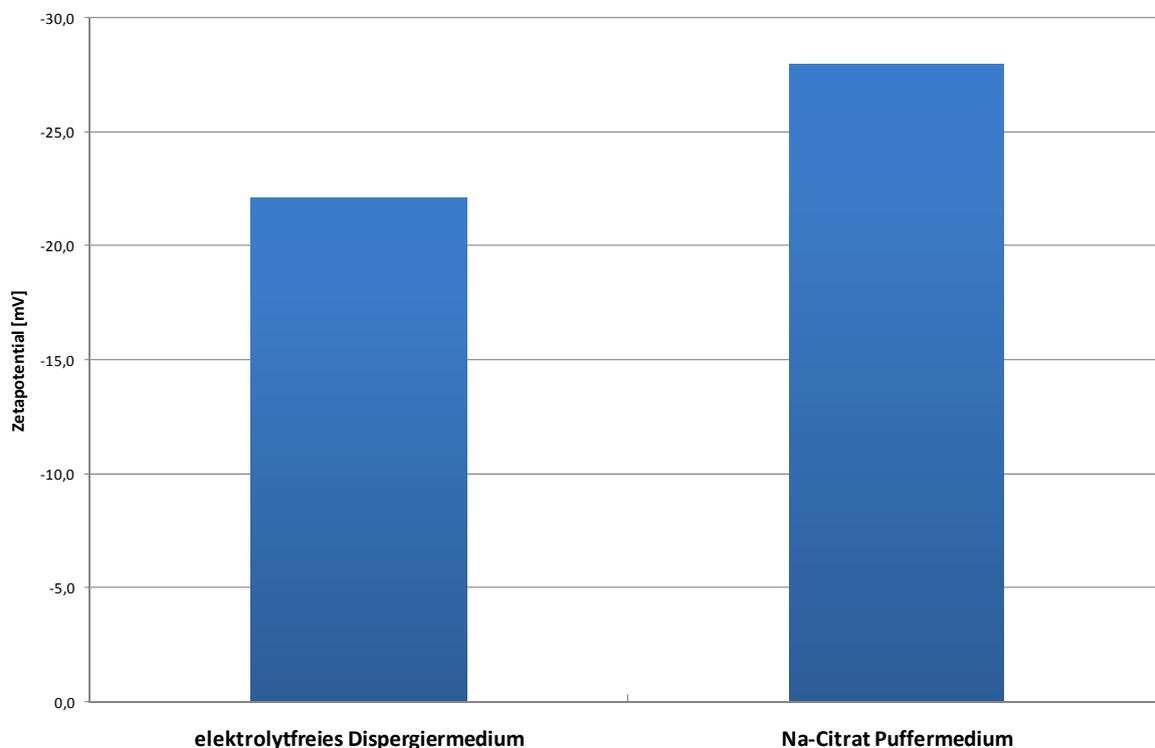


Abbildung 5.7-3: Ergebnisse der Zetapotentialmessungen für elektrolytfreies Dispergiermedium und Na-Citratpuffer

Die Kenntnis des Zetapotentials der Partikel in einer Suspension ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Langzeitstabilität einer Suspension. In Tabelle 5.7-2 sind Wertebereiche für das Zetapotential aufgeführt, die eine Hilfe bei der Einschätzung der Suspensionssatibilität geben sollen. Die Messergebnisse der beiden Chargen sind in Abbildung 5.7-3 dargestellt. Für die Charge mit elektrolytfreiem Dispergiermedium wurde ein Wert von -22,1 mV nach 240 Minuten Mahldauer ermittelt. Bei Mahlung im Na-Citratpuffermedium stieg das gemessene Zetapotential auf -28 mV an. Wie die Werte für das Zetapotential in Tabelle 5.7-2 verdeutlichen, reicht diese Ladung jedoch nicht aus, um eine vollständige Stabilisierung der Partikel zu gewährleisten.

Tabelle 5.7-2: Werte zur Stabilisierung über das Zetapotential (Müller et al., 1996)

Kennzeichen der Stabilität	Zetapotential [mV]
Maximale bis leichte Agglomeration und Sedimentation	+ 3 bis -10
Schwelle zur Agglomeration	-11 bis -20
Geringe bis keine Agglomeration	-21 bis -40
Gute bis sehr gute Stabilität	-41 bis -60
Ausgezeichnete Stabilität	-61 bis -80

Eine Mahlung in reinem Na-Citratpuffer ohne Zusatz weiterer Hilfsstoffe wurde nach 60 Minuten abgebrochen, da sich keine Zerkleinerung der Partikel zeigte oder diese so stark agglomeriert waren, dass es zu einer Überschreitung des Messbereichs im Zetasizer bei 6 µm kam.

Insgesamt lässt sich sagen, dass der Zusatz von Elektrolyten zu den Nanosuspensionsformulierungen oder eine Mahlung im Puffermedium einen negativen Einfluss auf die Suspensionsstabilisierung zeigt. Bei Anwesenheit von Elektrolyten kam es zu einer verstärkten Agglomeration der Partikel. Dieser Effekt war bereits bei Kontrolle der Partikelgröße während des Mahlprozesses erkennbar. Es wird vermutet,

dass die Elektrolyte in Konkurrenz zu dem sterischen Stabilisator Polysorbat 80 um die Besetzung der Oberfläche treten. Die Besetzung der Partikeloberfläche mit Citrat, das keine Hydrathülle aufbaut, führt zu einer Verdrängung des hydratisierten sterischen Stabilisators Polysorbat 80 auf der Oberfläche der Partikel.

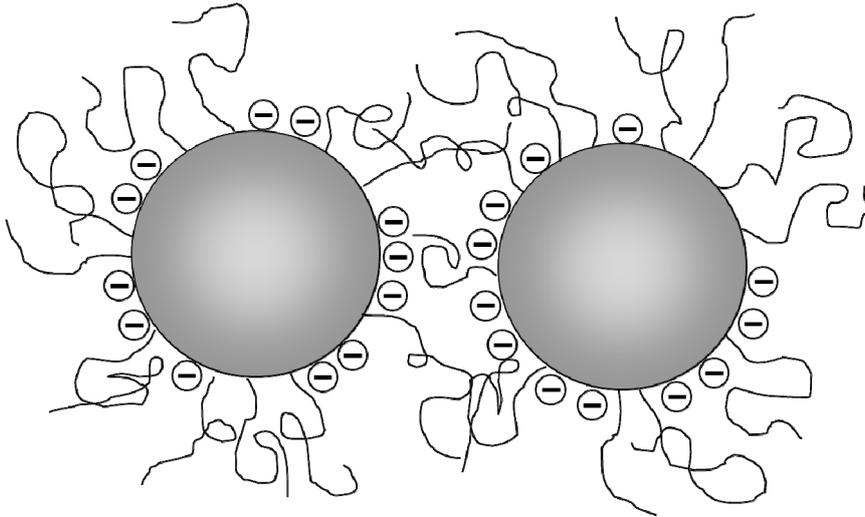


Abbildung 5.7-4: unzureichende Stabilisierung der Partikel durch Konkurrenz zwischen sterischem Stabilisator und Elektrolyt

Es ergibt sich somit eine Besetzung der Partikeloberfläche mit einer ungenügenden Menge an sterischem Stabilisator sowie einer nicht ausreichenden Elektrolytschicht. Bei Annäherung der Partikel in der Suspension kommt es somit zu einer Agglomeration und einer messbaren Zunahme der durchschnittlichen Partikelgröße.

5.8 Einfluss der Mahlkörper auf das Mahlergebnis

Aufgrund der in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Mechanismen der Partikelzerkleinerung und dem zerkleinerungsaktiven Volumen der Mahlkörper, hat die Größe der Mahlkörper einen Einfluss auf die Reduktion der Partikelgröße. Es sollte daher im Vergleich

unterschiedlicher Mahlkörpertypen untersucht werden, ob diese einen entscheidenden Einfluss auf das Mahlergebnis zeigen. Ausgewählt wurden vier unterschiedliche Mahlkörpertypen, die in Tabelle 5.8-1 aufgeführt sind.

Tabelle 5.8-1: verwendete Mahlkörpertypen

Mahlkörpertyp	Form	Größenbereich [µm]
Yttrium	sphärisch	400 – 600
Polystyrol	sphärisch	360 – 630
Polycarbonat	zylindrisch	380 x 380 x 540
Cer	sphärisch	400 – 700

Tabelle 5.8-2: Mahlparameter

Drehzahl [U/min]	Zeit [Min]	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff	
4000	240	5,0	Polysorbat 80	0,7 %

Die Parameter für die Mahlungen wurden auf die in Tabelle 5.8-2 dargestellten Werte festgelegt. Der Feststoffanteil betrug 5% Itraconazol bei einer Mahldauer von 240 Minuten und einer Drehzahl des Mahlrotors von 4000 U/Min. Als Stabilisator wurde Polysorbat 80 in einer absoluten Konzentration von 0,7% (m/m) verwendet. Die eingesetzten Mahlkörpertypen wurden bereits in 2.5.4 näher charakterisiert. Der auffälligste Unterschied ist der Dichteunterschied der Zirkonoxid Mahlperlen zu den Polymer-Varianten. Des Weiteren handelt es sich bei den Polycarbonat Mahlkörpern nicht um sphärische Körper, sondern um zylindrische Extrudate, was zur Folge hat, dass sich Kanten mit einem Winkel von 90° ergeben, die bruch- bzw. abriebsgefährdet sind. Vor Beginn der Mahlungen wurde die Mühle komplett gereinigt. Nach dem

Zusammenbau wurden 40 ml Mahlkörper in einem Messzylinder abgemessen und in die Mahlkammer überführt. Anschließend wurden das System bei niedrigen Drehzahlen des Mahlrotors mit partikelfreiem Wasser gespült. Nach dem Abpumpen des Spülwassers wurde die Mühle mit Druckluft freigeblasen, um das restliche Wasser aus dem System zu entfernen. Die Suspensionen wurden wie in Abschnitt 3.4 beschrieben hergestellt.

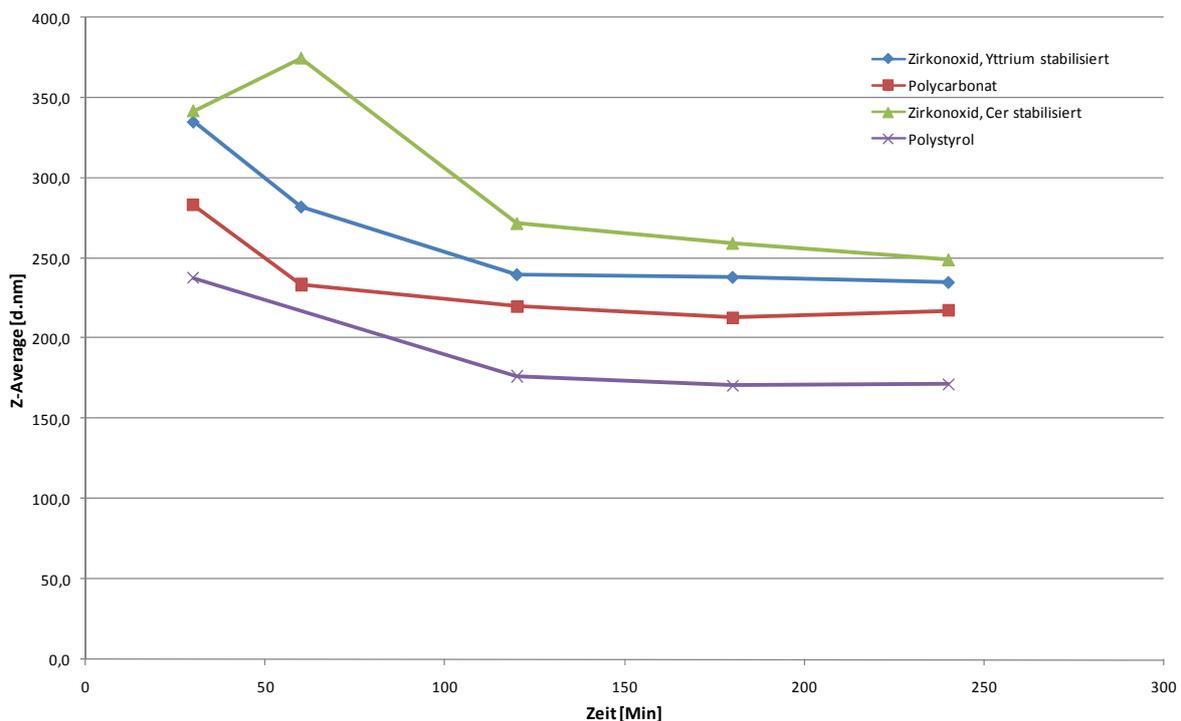


Abbildung 5.8-1: Einfluss des Mahlkörpertyps auf die Partikelzerkleinerung

Auffällig bei den Ergebnissen der Partikelgrößenmessung ist die gute Zerkleinerung der Polymer-Mahlkörper im Vergleich zu den Zirkonoxid Varianten (Abbildung 5.8-1). Bereits die Messung nach einer Mahldauer von 30 Minuten zeigt deutliche Unterschiede bei den einzelnen Chargen. Die Polymer-Mahlkörper-Chargen wiesen mit 283 nm und 238 nm die geringeren Partikelgrößen gegenüber den Chargen der keramischen Mahlkörpern mit 342 nm und 335 nm auf. Dieser Trend setzt sich über den weiteren Verlauf der Mahlung fort. Bei allen Mahlkörpertypen zeigt

sich ab einer Mahldauer von 120 Minuten keine wesentlich Zerkleinerungswirkung mehr. Die stärkste Reduktion der Partikelgröße ergibt sich in diesem Bereich für die Charge der Cer-stabilisierten Zirkonoxid-Mahlperlen mit einem Abfall von 271,6 nm nach 120 Minuten auf 249,1 nm nach 240 Minuten. Bei diesen Mahlkörpern scheint demnach der Einfluss der Mahldauer stärker zu sein als bei den anderen Mahlkörpertypen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Keramik-Mahlkörper mit einer hohen Dichte am Boden der Mahlkammer verbleiben und vom Mahlrotor nur leicht bewegt werden können, was zu einer schlechteren Zerkleinerung der Partikel zwischen den Mahlkörpern führt. Bei dem verwendeten Mahlrotor handelt es sich, wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, um einen glatten Zirkonoxid Rotor ohne Schikanen. Die Form des Rotors ermöglicht eine ausreichende Bewegung des Wirbelbettes und reduziert die Reibung zwischen Mahlmedium und Rotor-Oberfläche, was einen geringeren Abrieb zur Folge hat. Die Energie des Mahlrotors kann jedoch nicht ausreichend auf die Mahlkörper mit hoher Dichte übertragen werden. Bei Verwendung von Polymermahlkörpern mit einer geringeren Dichte ist der Energieübertrag deutlich besser. Die Mahlkörper werden durch den Rotor stärker bewegt und in der Mahlkammer verwirbelt. Dabei kommt es zu einer Prall- und Schlagwirkung der Wirkstoffpartikel zwischen den Mahlkörpern und unter den Partikeln selbst, da diese eine höhere Beschleunigung erfahren. Die Verwirbelung der Mahlkörper ist jedoch Dichteabhängig. Als weitere Auffälligkeit bei der Betrachtung der Partikelgrößen lässt sich eine untere Grenze für die Zerkleinerung erkennen. Die anfänglich starke Abnahme der Partikelgröße zeigt bei allen Mahlkörpertypen ab einer Mahldauer von 120 Minuten keine weitere nennenswerte Reduktion der Partikelgröße mehr. Diese Beobachtung lässt sich auch beim PDI-Wert

machen (Abbildung 5.8-2). Analog zur Partikelgröße zeigt sich nur noch bei der Mahlung mit Cer stabilisierten Zirkonoxid Mahlkörpern ein deutlicher Abfall des PDI-Wertes von 0,196 auf 0,157. Dies ist auch hier ein Anzeichen dafür, dass die Homogenität der Charge bei diesem Mahlkörpertyp eine zeitabhängige Größe ist.

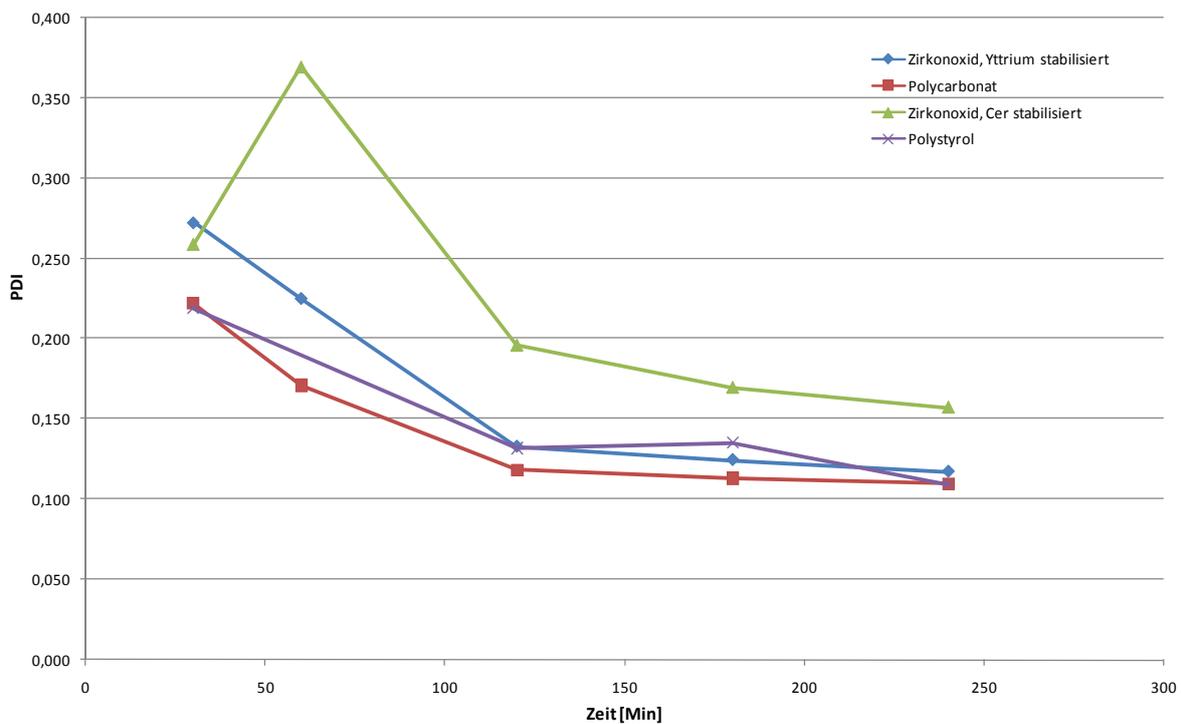


Abbildung 5.8-2: Einfluss des Mahlkörpertyps auf den PDI-Wert

Der beobachtete Anstieg des Z-Average und des PDI-Wertes der Charge mit Cer-stabilisierten Zirkonoxid-Mahlperlen nach 60 Minuten lässt auf einen präparativen Fehler bei der Vermessung schließen.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die verwendeten Polymer-Mahlkörper gegenüber den Keramik-Mahlkörpern eine bessere Zerkleinerungswirkung zeigen. Über den gesamten Verlauf der Mahlung liegen die Messergebnisse für die Partikelgrößen bei Verwendung der Polymer-Varianten bei ansonsten identischen Parametern deutlich niedriger. Auch die Homogenität der Proben ist in den ersten 120 Minuten deutlich verbessert. Ab 120 Minuten Mahldauer lassen sich keine großen Unterschiede mehr erkennen. Die besten PDI-Werte zeigt

die Probe, die mit den zylindrischen Polycarbonat Mahlkörpern vermahlen wurde. Bezüglich der Zerkleinerungswirkung hatte die zylindrische Form gegenüber der sphärischen Form der Mahlkörper keine Vorteile. Das beste Ergebnis brachte die Vermahlung mit sphärischen Polymer-Mahlkörpern.

5.9 Einfluss der Mahlkörpergröße auf das Mahlergebnis

Da die Mahlkörper aus Polystyrol in Abschnitt 5.8 ein sehr gutes Mahlergebnis zeigten, wurden die weiteren Mahlungen mit diesem Mahlkörpertyp durchgeführt.

Aufgrund der in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Mechanismen der Partikelzerkleinerung und dem zerkleinerungsaktiven Volumen der Mahlkörper, hat die Größe der Mahlkörper einen Einfluss auf die Reduktion der Partikelgröße. Dieser Einfluss der Mahlkörpergröße auf die Partikelzerkleinerung sollte daher ermittelt werden. Dazu wurden zwei Mahlperlenchargen mit unterschiedlichen Größenbereichen ausgewählt. Aus diesen beiden Chargen wurden über eine Siebung verschiedene Klassen herausgesiebt und diese Siebfractionen für die Mahlung verwendet. Die verwendeten Chargen sowie die Siebfractionen sind in Tabelle 5.9-1 aufgeführt.

Tabelle 5.9-1: Größenbereich der verwendeten Polystyrol – Mahlperlen und daraus erstellte Siebfractionen

Charge	Größenbereich [mm]
1	0,360 – 0,630
2	0,630 – 0,990

Tabelle 5.9-2: Verwendete Mahlperlenfraktionen

Mahlkörper	
Typ	Größe [μm]
Polystyrol	355-500
Polystyrol	500-710
Polystyrol	710-900
Polystyrol	>900

Die Siebungen wurden auf einem automatischen Siebturm (Retsch GmbH, Haan) durchgeführt. Als problematisch erwies sich dabei die Adhäsivität und Kohäsivität der Mahlperlen in Charge 1. Aufgrund eines hohen Anteils an freiem Styrol, das sich als Produktionsrückstand zwischen den Mahlperlen befindet, war die automatische Siebung nur schwer durchführbar. Die Siebung wurde daher noch mit jedem einzelnen Sieb per Hand durchgeführt, bis der Feinanteil weitestgehend minimiert war. Die so gewonnenen Siebfraktionen wurden jeweils in die Mahlkammer überführt und bei laufendem Mahlrotor mit ausreichend partikelfreiem Wasser gespült, um das freie Styrol auszuwaschen. Anschließend wurde das Spülwasser abgepumpt und das restliche Wasser mit Druckluft aus der Mahlkammer gedrückt. Als Suspension wurde eine bereits bekannte Rezeptur mit den in Tabelle 5.9-3 dargestellten Parametern verwendet.

Tabelle 5.9-3: Parameter zur Mahlung mit unterschiedlichen Größenfraktionen der Mahlperlen

Drehzahl [U/min]	Zeit [Min]	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff	
4000	240	5,0	Polysorbat 80	0,7 %

Wie aus Abbildung 5.9-1 ersichtlich ist, zeigt die Partikelgrößenmessung nach einer Mahldauer von 30 Minuten einen besseren Mahlerfolg bei Verwendung kleinerer Siebfraktionen. Die ermittelten Partikelgrößen der Fraktionen bis 710 μm liegen bei 258 nm. Die Zerkleinerungswirkung der

beiden größeren Fraktionen war im anfänglichen Vergleich mit Größen von 335 nm deutlich schlechter. Diese Differenz ließ sich bis zu einer Mahldauer von 120 Minuten weiter verfolgen. Nach 180 Minuten ergab die Messung für die ersten drei Fraktionen eine Partikelgröße von ca. 195 nm. Auch am Ende der Mahldauer von 240 Minuten lagen die Messwerte in diesem Größenbereich.

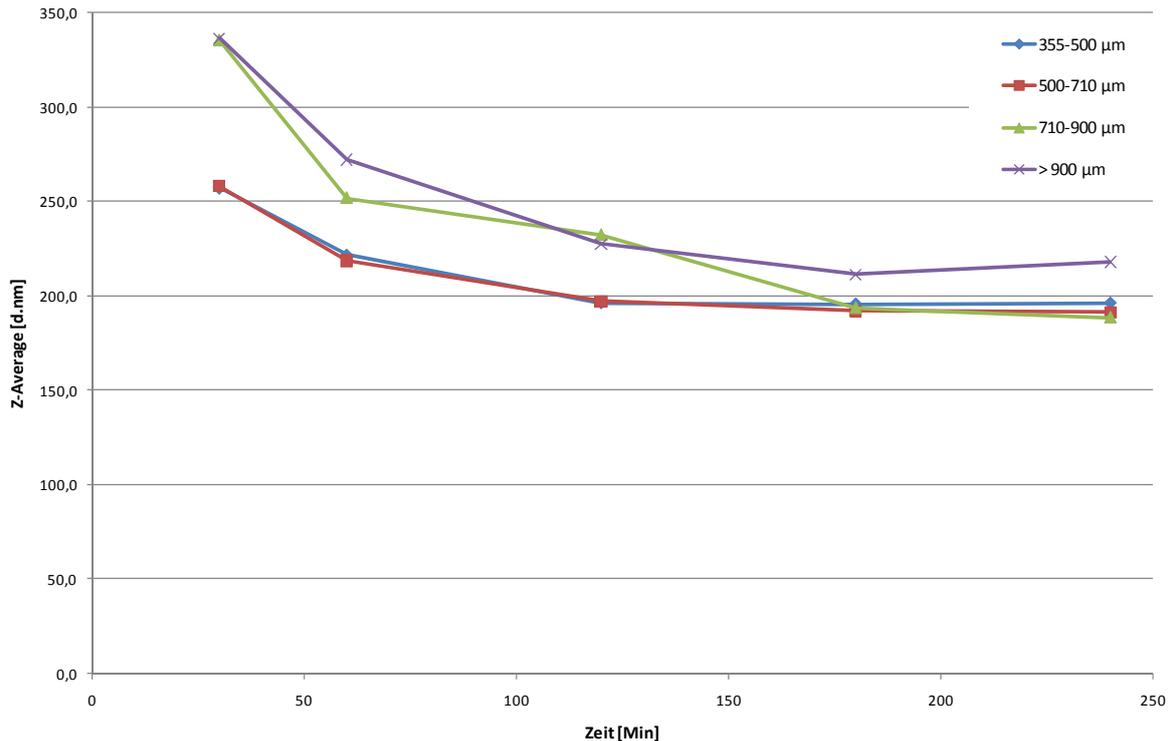


Abbildung 5.9-1: Ergebnisse der Partikelgrößenmessung bei Verwendung unterschiedlicher Größenfraktionen an Polystyrolmahlkörpern

Tabelle 5.9-4: Ergebnisse für Partikelgrößenmessung und PDI-Werte bei Verwendung unterschiedlicher Größenfraktionen an Polystyrol-Mahlkörpern

Zeit [Min]	355-500 µm		500-710 µm		710-900 µm		> 900 µm	
	Z-Avg.	PDI	Z-Avg.	PDI	Z-Avg.	PDI	Z-Avg.	PDI
30	257,3	0,194	258,3	0,225	335,4	0,357	336,4	0,322
60	221,8	0,148	218,6	0,171	251,9	0,233	272,3	0,244
120	196,2	0,144	196,9	0,137	232,3	0,249	227,6	0,192
180	195,8	0,182	192,0	0,127	193,6	0,157	211,5	0,164
240	196,3	0,133	191,4	0,109	188,6	0,143	218,2	0,209

Es lässt sich nach diesen Ergebnissen darauf schließen, dass die Größenfraktion der Mahlkörper im Bereich unter 710 μm keinen großen Einfluss auf den Mahlerfolg hat. Sowohl bei Verwendung der Chargen mit einer Größe von 355-500 μm als auch 500-710 μm ergaben die Messungen über den gesamten Zeitverlauf der Mahlung ähnliche Werte für die Partikelgröße. Die Mahlkörperfraktion 710-900 μm zeigte anfänglich keine analoge Zerkleinerung. Die Partikelgrößen lagen mit 232 nm nach 120 Minuten um ca 50 nm über denen der beiden kleineren Fraktionen. Ab einer Mahldauer von 180 Minuten zeigten sich jedoch keine Unterschiede mehr. Die Messwerte der größten Mahlperlenfraktion von über 900 μm zeigten hingegen einen deutlich schlechteren Mahlerfolg. Nach einer Partikelgröße von 335 nm nach 30 Minuten Mahldauer fiel der Wert auf ein Minimum von 211 nm nach 180 Minuten Mahldauer ab. Nach 240 Minuten Mahldauer zeigte sich wieder ein leichter Anstieg in der Partikelgröße auf 218 nm, was dafür spricht, dass keine weitere Zerkleinerung der Partikel erfolgt. Die Betrachtung der PDI-Werte zeigt ein ähnliches Ergebnis, wobei die niedrigsten Werte wiederum bei den beiden kleinsten Mahlperlenfraktionen ermittelt wurden. In Abbildung 5.9-2 sind die Messwerte für die Polydispersitätsindices dargestellt. Die Werte nach 30 Minuten Mahldauer deuten auf eine bessere Homogenität der Chargen bei kleineren Mahlperlen hin. Auch am Ende des Messzeitraums von 240 Minuten lässt sich diese Aussage bis auf den höheren PDI-Wert der kleinsten Mahlperlenfraktion gegenüber der nächst größeren von 500-710 μm treffen.

Die Mahlperlenfraktion von 710-900 μm zeigte nach 240 Minuten Mahldauer und einer Partikelgröße im Bereich der beiden kleineren Mahlkörperfraktionen einen mit 0,143 höheren PDI-Wert. Bei der größten Mahlperlenfraktion zeigte sich wiederum ein Anstieg des PDI-Wertes von

0,164 nach 180 Minuten Mahldauer auf 0,209 nach 240 Minuten. Da auch die anderen Werte Messwertschwankungen aufwiesen, ist nicht davon auszugehen, dass es sich um einen Effekt der großen Mahlperlen handelt. Die Messwerte der Polystyrolmahlperlen $>900\ \mu\text{m}$ lagen jedoch über die gesamte Messdauer deutlich über den Werten der kleineren Mahlperlenfraktionen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Mahlerfolg bei Mahlperlen $>900\ \mu\text{m}$ abnimmt. Insgesamt zeigte die Mahlperlenfraktion im Größenbereich von $500\text{-}710\ \mu\text{m}$ die besten Ergebnisse bei Partikelgröße und Homogenität. Zusammengenommen lassen die Ergebnisse der drei Fraktionen zwischen 355 und $900\ \mu\text{m}$ auf eine gute Reproduzierbarkeit der Mahlergebnisse bei vergleichbaren Mahlparametern schließen. Ein ähnliches Ergebnis lieferten auch die Untersuchungen von Inkyo et. al. (Inkyo et. al., 2006), der zudem beschreibt, dass Änderungen in der Kristallinität der Nanopartikel bei Verwendung kleinerer Mahlperlenfraktionen minimiert werden.

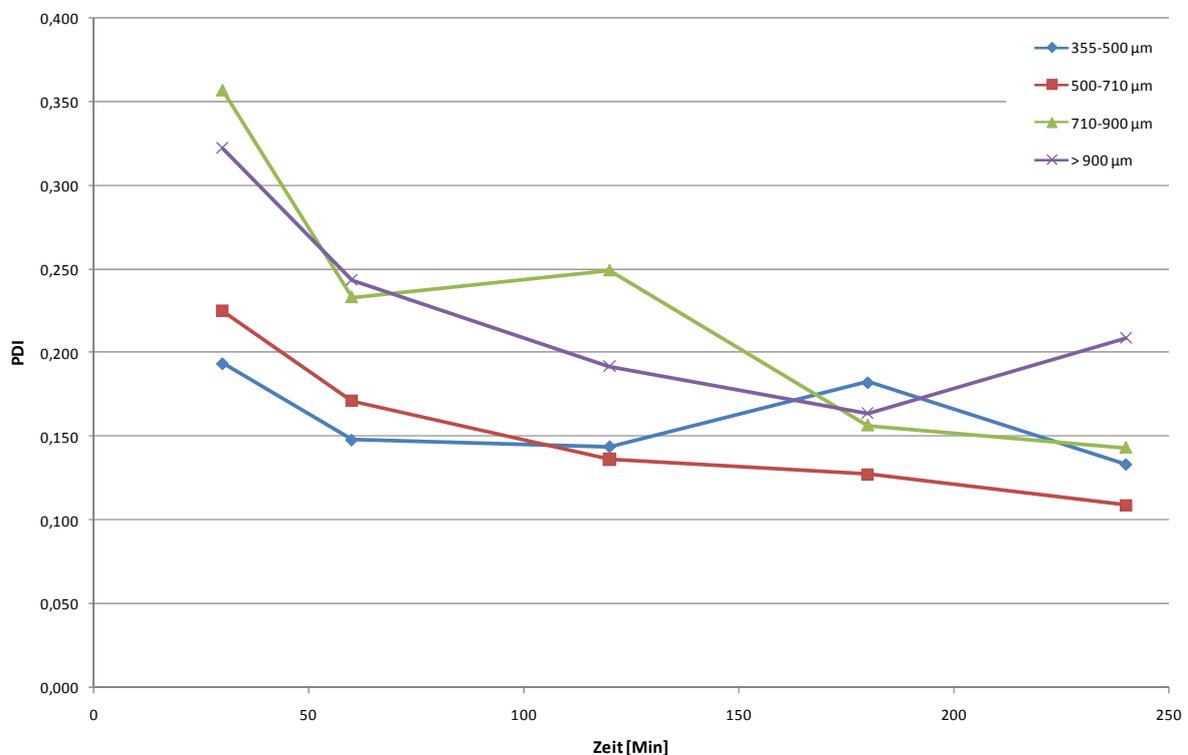


Abbildung 5.9-2: PDI-Werte der Mahlungen mit Mahlperlenfraktionen

5.10 Charakterisierung der Mahlkörper

Die verwendeten Mahlkörper unterliegen während des Mahlprozesses starken Belastungen in der Mahlkammer. Die Energie des Mahlrotors wird zu einem großen Teil auf die Mahlkörper übertragen, so dass diese in der Mahlkammer verwirbelt werden. Neben der Zerkleinerung der Feststoffpartikel kommt es dabei auch zu einem Materialabrieb an den Mahlkörpern selbst, der in das Produkt gelangt und dort eine Verunreinigung darstellt. Bei Verwendung von Polymermahlkörpern wird der Abrieb verringert (Merisko-Liversidge, et al., 2003). Die Oberflächen der verwendeten Mahlkörper wurden im Neuzustand und nach dem Einsatz im Mahlprozess unter einem Elektronenmikroskop untersucht, um optische Veränderungen der Oberfläche beurteilen zu können.

5.10.1 Zirkonoxid-Mahlkörper

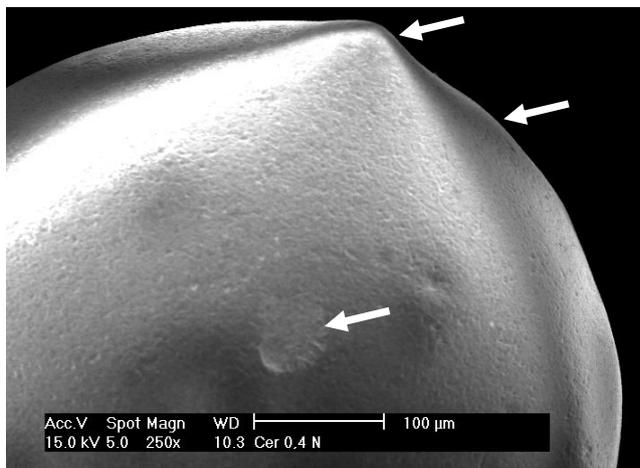


Abbildung 5.10-1: Cer-stabilisierte Zirkonoxid-Mahlperle in 250facher Vergrößerung

Wie in Abbildung 5.10-1 zu erkennen ist, sind die Mahlkörper nicht komplett sphärisch, sondern haben eine herstellungsbedingte Tropfnase. Diese Tropfenform der Mahlperlen war bei einem Großteil der betrachteten Mahlperlen zu beobachten und erhöht bei Beanspruchung der Mahlkörper während des Mahlprozesses die Abriebswahrscheinlichkeit. Bereits in der 250fachen Vergrößerung wird auch die Struktur der Oberfläche deutlich, die in Abbildung 5.10-2 bei 1000facher

Vergrößerung dargestellt ist. Im Vergleich der Oberflächen eines neuen Mahlkörpers (Bild A) wird gegenüber der Betrachtung eines Beanspruchten Mahlkörpers (Bild B) deutlich, dass die Rauheit abgenommen hat. Auf der Oberfläche der benutzten Mahlkörper sind Bereiche erkennbar, die abgeschliffen wirken. Allgemein hat die Rauheit der Oberfläche nach dem Mahlvorgang abgenommen.

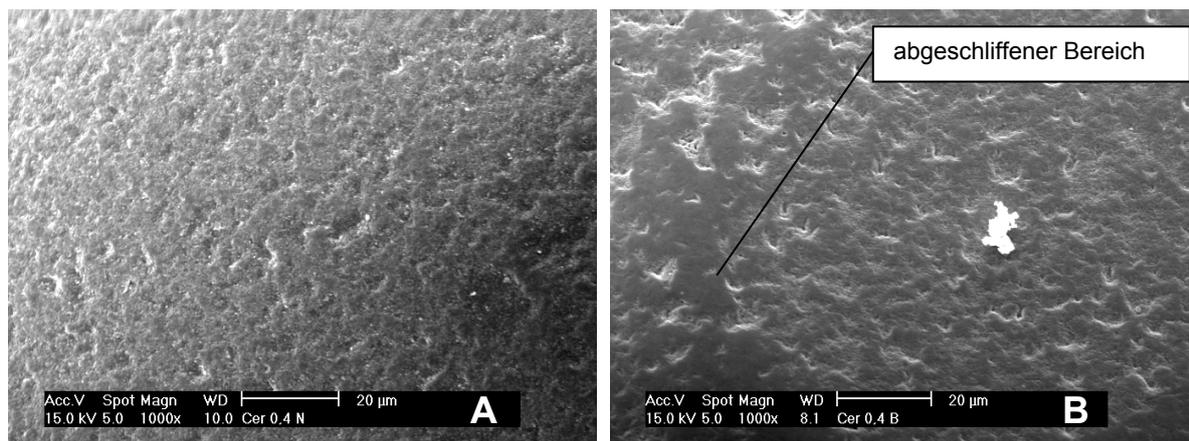


Abbildung 5.10-2: REM-Aufnahme der Oberfläche von Cer-stabilisierten Zirkonoxid Mahlkörpern im neuen Zustand (links) und nach Beanspruchung im Mahlprozess (rechts) in 1000facher Vergrößerung

In Abbildung 5.10-3 ist die Oberfläche und das Höhenprofil einer unbenutzten Cer-stabilisierten Zirkonoxid Mahlperle in 1000facher Vergrößerung abgebildet. Die Aufnahme wurde mit einem Digitalmikroskop (VHX-500, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) erstellt. Das Gerät fährt den Schärfebereich der gekrümmten Oberfläche in definierten Schritten ab und errechnet aus den kontrastreichen Bildelementen der Einzelbilder eine über den gesamten Bereich scharfe Abbildung. Somit ist es der Software möglich, über die Position der Schärfeebene ein Höhenprofil der Oberfläche zu errechnen. Sowohl auf der mikroskopischen Aufnahme als auch in dem dargestellten Höhenprofil ist die optisch beobachtete Oberflächenrauheit zu erkennen.

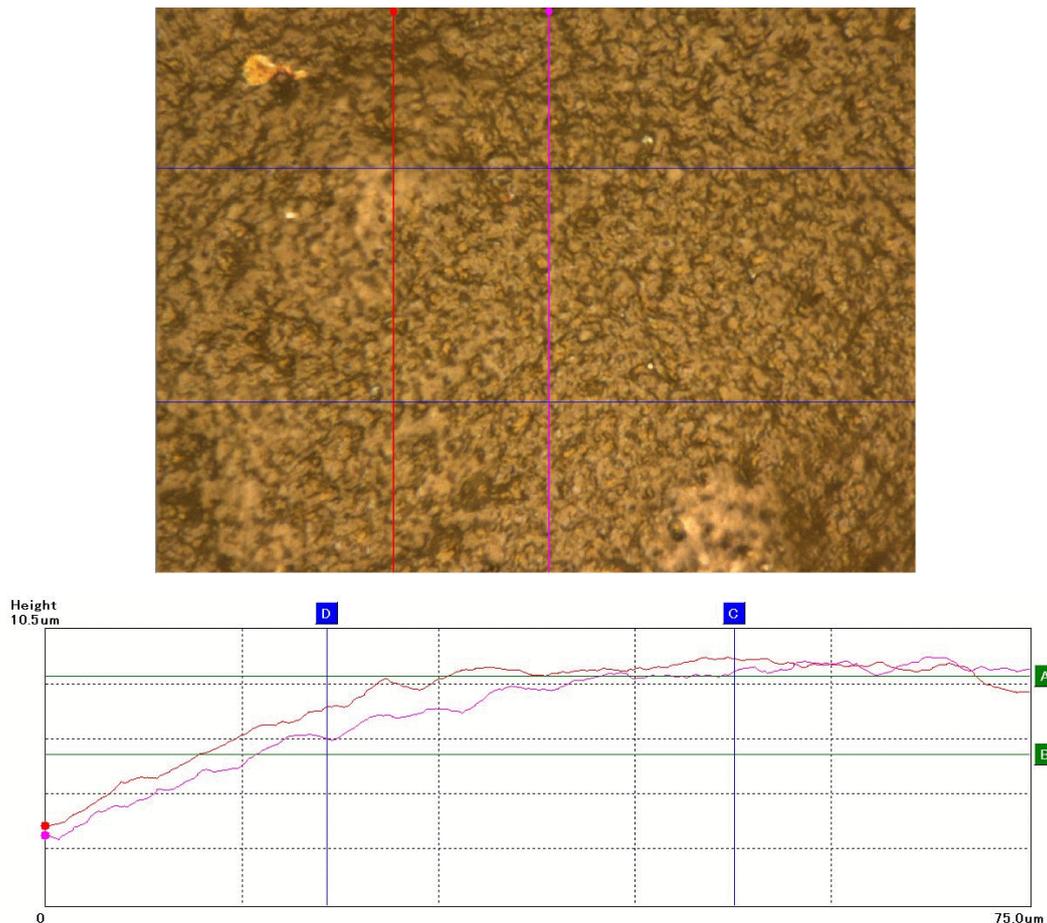


Abbildung 5.10-3: Mikroskopische Aufnahme und zugehöriges Oberflächenprofil einer Cer-stabilisierten Zirkonoxid-Mahlperle

Neben der Krümmung der Mahlperlenoberfläche ist in der Abbildung die Rauheit der Oberfläche erkennbar. Der Umfang der Ordinate zwischen den Punkten A und B beträgt $10,5\ \mu\text{m}$, so dass sich eine Oberflächenrauheit von 1 bis $3\ \mu\text{m}$ ergibt.

5.10.2 Polycarbonat-Mahlkörper

Es wurde eine Charge Polycarbonat-Mahlkörper (Norstone Inc., Wyncote, USA) mit den Abmessungen $380 * 380 * 540\ \mu\text{m}$ verwendet. Diese Mahlkörper waren die einzigen nicht sphärischen Mahlkörper, die untersucht wurden. Wie in Abbildung 5.10-4 zu sehen ist, handelt es sich um zylindrische Extrudate, an deren Enden Verformungen zu erkennen sind, die auf einen Schnitt des Extrudatstranges bei der Herstellung zurückzuführen sind. Aufgrund dieser Verformungen ergeben sich

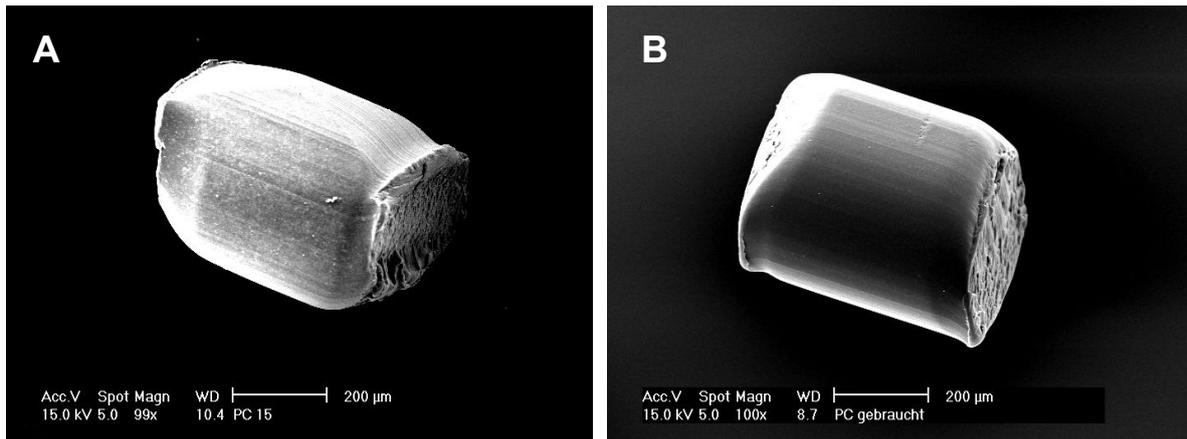


Abbildung 5.10-4: Unbenutzter (A) und abgeschliffener Polycarbonat-Mahlkörper nach Belastung im Mahlprozess (B). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, 100fach.

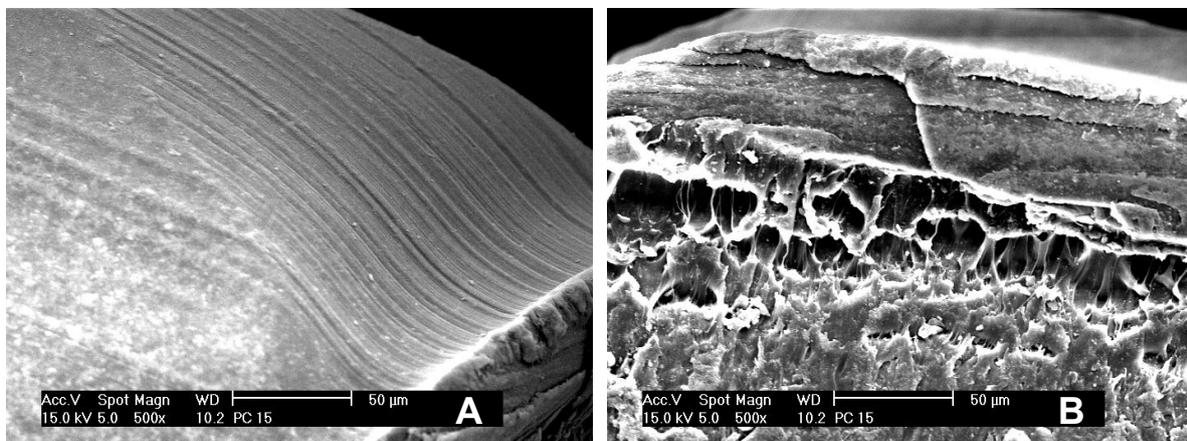


Abbildung 5.10-5: Oberfläche des Mahlkörpers mit Schnittkante (A) und Betrachtung der Schnittfläche (B). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, 500fach.

Kanten, die während des Mahlprozesses bruchgefährdet sind (Abbildung 5.10-5). Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung der Mahlkörperoberflächen zeigen sich Riefen in Längsrichtung auf der Oberfläche, die durch ihre Ausrichtung auf herstellungsbedingte Kratzspuren schließen lassen. Bei 500facher Vergrößerung der Schnittfläche zeigt sich außerdem die faserige Polymerstruktur des Polycarbonats. Durch die Extrusion und den Druck des Schnittes ist diese im oberen Bereich komprimiert. Unterhalb dieses Bereiches zeigen sich Hohlräume, in denen es während der Mahlung zur Einlagerung von Feststoff kommen kann. Nach Benutzung der Mahlkörper im Mahlprozess ist in

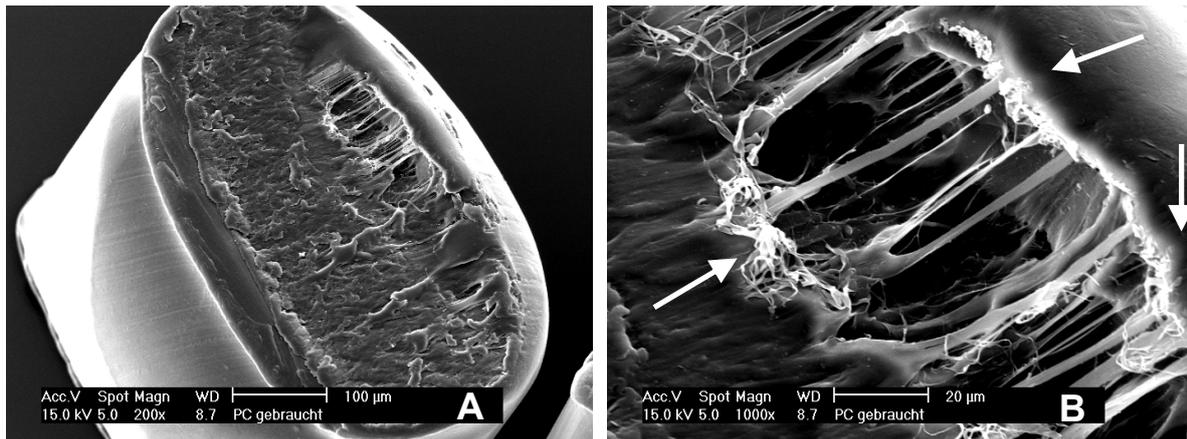


Abbildung 5.10-6: Benutzer Polycarbonat-Mahlkörper in Aufsicht. Die abgeschliffene Form ist in (A) gut zu erkennen. In (B) sind Ablagerungen des Arzneistoffes an den Kanten zu erkennen (Pfeile).

Abbildung 5.10-6 bei Aufsicht auf die Schnittfläche in 200facher Vergrößerung (Bild A) im Vergleich zu Abbildung 5.10-5 (Bild B) zu erkennen, dass die Mahlkörper an der Schnittfläche deutlich abgeschliffen sind. Bei 1000facher Vergrößerung der faserigen Struktur zeigen sich außerdem Ablagerungen von Arzneistoff an den Kanten. Eine Einlagerung von Feststoff in die Hohlräume des Mahlkörpers konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auf der Oberseite der Mahlkörper konnten außerdem in 1000facher Vergrößerung deutliche Kratzspuren festgestellt werden, die in Abbildung 5.10-7 kenntlich gemacht wurden. Insgesamt lassen die optischen Veränderungen der Mahlkörper darauf schließen, dass es zu einem deutlichen Abrieb der Mahlkörper während der Mahlung kommt. Dies kann zum einen auf das wenig elastische Polymer zurückzuführen sein, zum anderen hat die Form der Mahlkörper einen Einfluss auf den Abrieb. Diese schleifen sich an den Kanten gegenseitig ab. Aufgrund dieser Beobachtungen ist die Verwendung dieser Mahlkörper als eher kritisch zu beurteilen. Den Beobachtungen nach wird das Produkt deutlich mit Abrieb belastet.

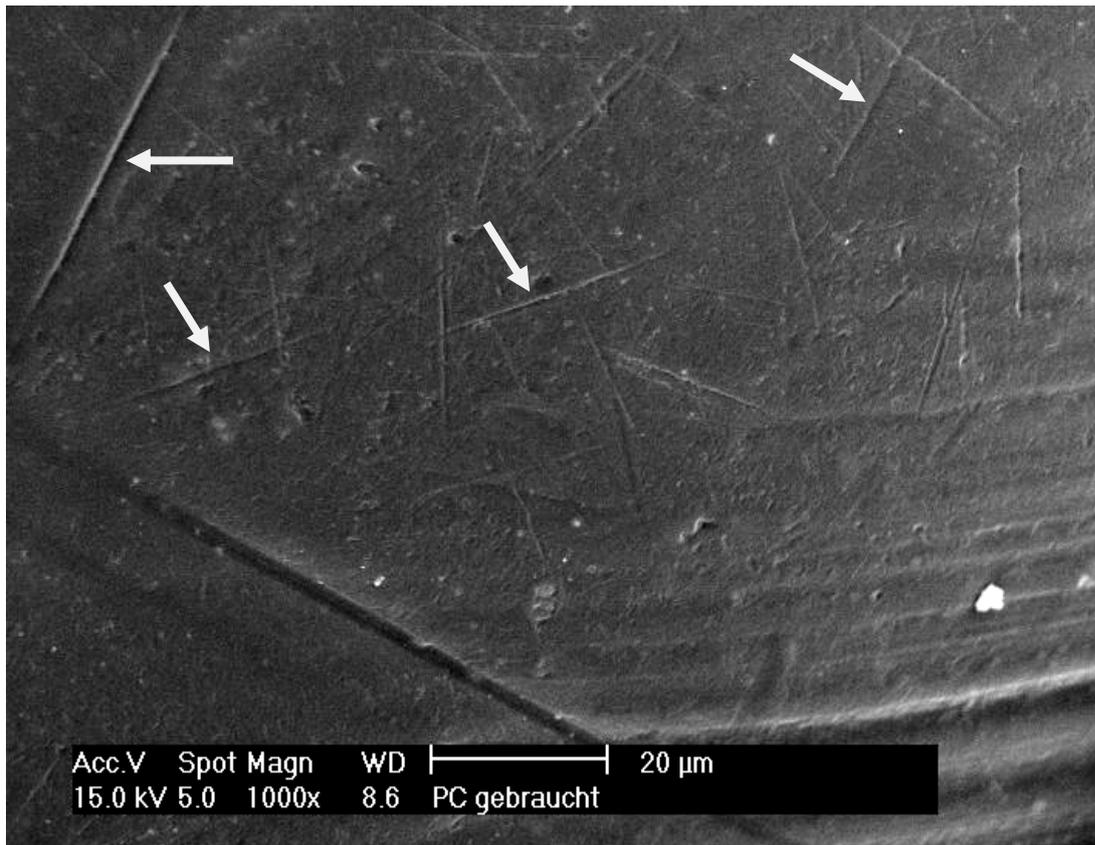


Abbildung 5.10-7: 1000fache Vergrößerung der Oberfläche eines Polycarbonat Mahlkörpers nach Belastung im Mahlprozess. Es sind deutliche Kratzspuren zu erkennen (Pfeile).

5.10.3 Polystyrol-Mahlkörper

Die verwendeten Polystyrol-Mahlkörper waren sphärisch. Sie wurden in zwei Chargen unterschiedlicher Mahlperlengröße von der Firma Norstone (Norstone Inc., Wyncote, USA) bezogen. Eine Betrachtung der Oberfläche bei 1000facher Vergrößerung (Abbildung 5.10-8) lässt eine sehr glatte und homogene Oberfläche mit leichten Blasen des Polymers erkennen. Nach der Beanspruchung der Mahlkörper im Mahlprozess zeigt sich kaum eine Veränderung der Oberfläche. Durch die Belastung sind die Blasen auf der Oberfläche abgetragen und die Rauheit der Oberfläche hat leicht zugenommen. Kratzspuren, wie bei den verwendeten Polycarbonat-Mahlkörpern, lassen sich nicht erkennen, was wahrscheinlich auf das elastischere Polymer Polystyrol

zurückzuführen ist. Allerdings sind kleine Löcher in der Oberfläche zu erkennen, in denen sich Arzneistoff abgelagert hat. Diese sind jedoch wahrscheinlich nicht auf die Belastung im Mahlprozess zurückzuführen, sondern werden herstellungsbedingte Hohlräume sein, die sich evtl. erst im Prozess geöffnet haben. Sie wurden bei den begutachteten Mahlkörpern jedoch nur ein einziges mal gefunden und stellen aufgrund der geringen Größe der Kavitäten kein Problem dar.

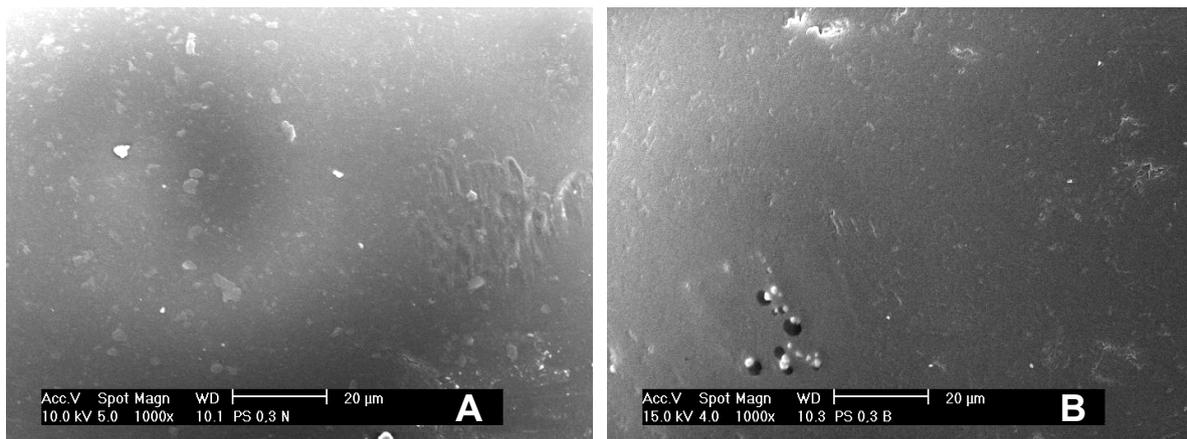


Abbildung 5.10-8: REM-Aufnahme der Oberfläche von Polystyrol Mahlkörpern im neuen Zustand (A) und nach Beanspruchung im Mahlprozess (B) in 1000facher Vergrößerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mit der Abnahme der Härte des verwendeten Materials auch eine Abnahme des Abriebs der Oberfläche erkennen ließ. Alle Oberflächen der Mahlkörper wiesen teilweise deutliche Spuren der Belastung im Mahlprozess auf und zeigten Veränderungen in ihrer Beschaffenheit. Die Polystyrol-Mahlkörper zeigten die geringsten visuell erkennbaren Oberflächenveränderungen. Der Abtrag der lose anhaftenden Polymerstücke lässt sich evtl. bereits durch einen Waschvorgang in der Mahlkammer bei niedrigen Drehzahlen erreichen, was eine Verunreinigung des Produktes weiter vermindern würde. Aufgrund der Beobachtungen ist davon auszugehen, dass die Polystyrol-Mahlperlen die geringsten Verunreinigungen in das Produkt eintragen. Sie wurden daher vorrangig für die Durchführung der Versuche verwendet.

5.11 Quantifizierung des Mahlabriebs

Da es sich beim Mahlprozess um einen Prozess mit einem hohen Energieeintrag handelt, kann es zu einem Abrieb der Mahlkörper sowie der produktberührenden Teile der Rührwerkskugelmühle kommen. Da dieser Abrieb eine Verunreinigung des Produktes darstellt, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, den Abrieb in der Suspension zu bestimmen. Aufgrund der geringen Mengen konnte eine Veraschung der Probe und gravimetrische Bestimmung ausgeschlossen werden. Die Proben wurden daher mit Hilfe einer ICP-OES (Inductively **C**oupled **P**lasma **O**ptical **E**mission **S**pectrometry), auf Spuren anorganischer Rückstände aus dem Mahlprozess untersucht. Die Methode beruht auf der Verwendung eines 6000-12000 K heißen Argonplasmas, mit dem die zu analysierenden Elemente zur optischen Emission angeregt werden. Die Detektion der Proben erfolgte mit einem CCD-Flächendetektor. Der Vorteil der ICP-OES gegenüber der Atom-Absorptions-Spektroskopie ist die wesentlich höhere Analysen Temperatur. Die angeregten Atome der zu bestimmenden Elemente werden zusätzlich ionisiert, was die Bestimmung unempfindlicher gegenüber störenden Einflüssen macht. Die Proben wurden vor der Analyse zum Aufschluss der organischen Bestandteile mit HNO_3 versetzt. Die Mischung wurde anschließend unter Verwendung eines Temperaturprogramms in einem Druckgefäß in einer Mikrowelle erhitzt. Die so vorbereiteten Proben wurden mit Hilfe der ICP (Varian Inc., Palo Alto, USA) analysiert. Wie aus Abbildung 5.11-1 ersichtlich ist, hat die Suspension während des Mahlprozesses in der Mühle Kontakt zu Bauteilen aus unterschiedlichen Materialien. Dies sind vor allem die Mahlraumauskleidung aus siliciuminfiltriertem Siliciumcarbid (SiSiC) und der Mahlrotor aus Zirkonoxid. Hinter dem Reibspalt und im Vorratsbehälter befinden sich außerdem Bauteile aus Edelstahl sowie

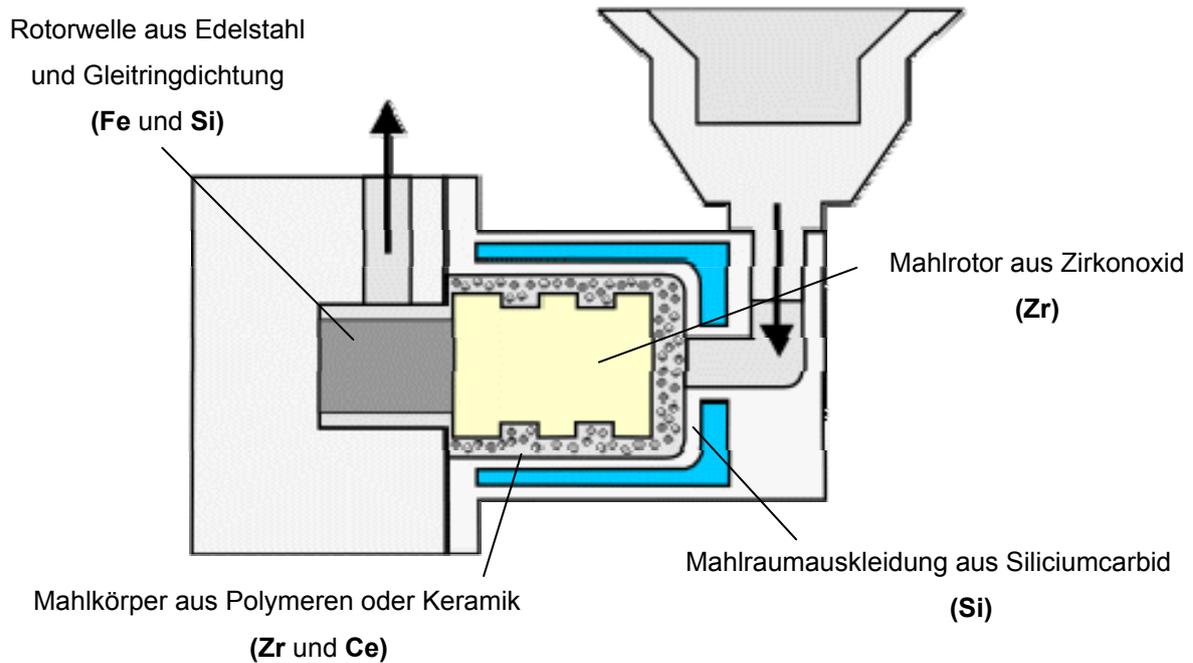


Abbildung 5.11-1: Mahlkammer mit Produktführung und während des Prozesses belasteter Bauteile

eine Gleitringdichtung, die der Trennung des Produktraumes von den Antriebsteilen der Mühle dient. Die Gleitringdichtung besteht, wie auch die Mahlraumauskleidung, aus SiSiC. Zur Abdichtung werden zwei plane Ringe aus dem Material gegeneinander gepresst. Der mühlenseitige Ring steht dabei fest, während der andere auf der Welle sitzt und mit dieser rotiert. Aufgrund der Reibung der Bauteile entsteht ebenfalls Abrieb, der jedoch durch die Härte des Materials gering ist. Auch alle anderen Bauteile sind während des Mahlprozesse einer Belastung ausgesetzt. Die größte Belastung erfahren während des Mahlprozesses jedoch die Mahlkörper. Je nach Beschaffenheit und Material zeigen sie einen unterschiedlich starken Abrieb (siehe Kapitel 5.10 Charakterisierung der Mahlkörper). Bei der Auswahl der zu analysierenden Elemente wurden alle produktberührenden Bauteile einbezogen, die während des Mahlprozesses beansprucht werden (siehe Abbildung 5.11-1). Außerdem wurde der Abrieb der Mahlkörper aus Cer-stabilisiertem Zirkonoxid ebenfalls untersucht, um eine Aussage

über die Belastung der Suspensionen mit anorganischen Materialien treffen zu können. Für die Untersuchungen wurden zwei Chargen an Suspension mit einem Feststoffanteil von 5% Itraconazol hergestellt. Der Unterschied zwischen beiden Chargen bestand in der Verwendung unterschiedlicher Mahlkörpertypen, um den Einfluss auf den Abrieb untersuchen zu können. Zum einen kam eine Charge Polystyrolmahlperlen zum Einsatz. Die zweite Charge wurde unter Verwendung von Zirkonoxid-Mahlperlen, die mit Cer stabilisiert waren, vermahlen. Die Parameter der beiden Chargen sind in Tabelle 5.11-1 aufgeführt.

Tabelle 5.11-1: Mahlparameter der Chargen zur Analyse auf Spurenelemente

Charge	Drehzahl [U/min]	Zeit [Min]	Mahlkörper	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff 1	
					Name	[%]
1	4000	240	Cer/Zirkonoxid	5,0	Polysorbat 80	0,7
2	4000	240	Polystyrol	5,0	Polysorbat 80	0,7

Die Suspensionen wurden nach der Herstellung aufgrund der beschriebenen Überlegungen und der verwendeten Mahlkörper auf Spuren folgender Elemente untersucht:

- Silizium (Si)
- Eisen (Fe)
- Cer (Ce)
- Zirkonium (Zr)

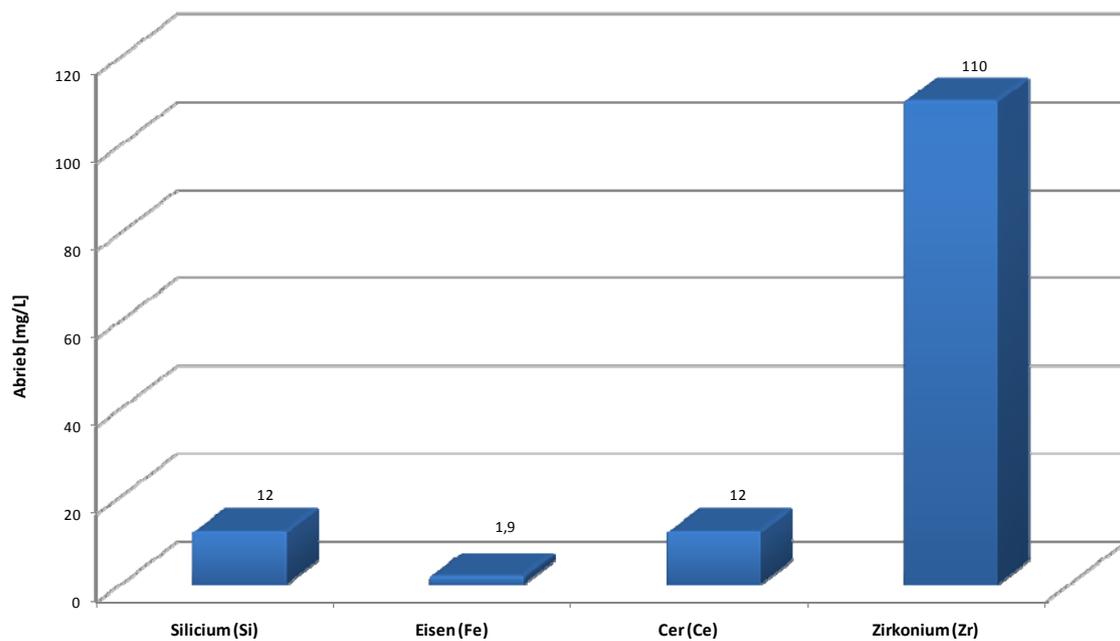


Abbildung 5.11-2: Ergebnisse der Spurenanalyse bei Verwendung von Cer-stabilisierten Zirkonoxid-Mahlperlen

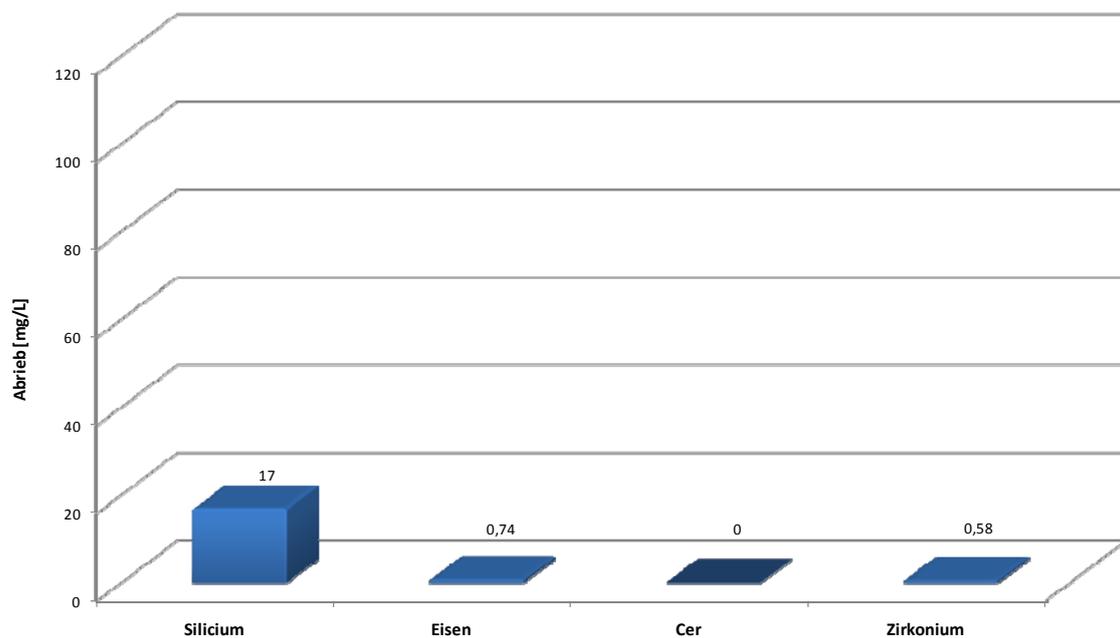


Abbildung 5.11-3: Ergebnisse der Spurenanalyse bei Verwendung von Polystyrol Mahlperlen

Die Angabe der Werte aus den Spurenanalysen erfolgt in mg/L Suspension. Abbildung 5.11-2 stellt die Ergebnisse der Spurenanalyse von Charge 1 dar. Die Untersuchung auf Spurenelemente bei Charge 1, die unter Verwendung von Cer stabilisierten Zirkonoxid-Mahlkörpern vermahlen worden war, ergab erwartungsgemäß einen hohen Anteil an Zirkonium in der Probe. Der Wert an Zirkonoxid betrug laut der Analyse 110 mg/L. Dieser hohe Wert ist zum einen mit der Belastung des Mahlrotors, zum anderen durch den Abrieb der Mahlperlen, die durch Schlag und Prall sowie durch Schleifen des Mahlkörperbettes am Mahlrotor zurückzuführen. Auch der Wert von 12 mg/L für Cer spricht für einen Abrieb der Mahlperlen. Der Wert von 1,9 mg/L Eisen ist wahrscheinlich auf die Edelstahlwelle des Mahlrotors zurückzuführen, die Berührung mit dem Produkt hat. Die ermittelte Menge von 12 mg/L Silizium deutet auf einen Abrieb der Kammerwandung aufgrund der Belastung durch die Mahlperlen während des Mahlprozesses hin. Der größere Anteil ist aber höchstwahrscheinlich auf einen Abrieb der Gleitringdichtung zurückzuführen. Für diese Vermutung spricht auch die Analyse der zweiten Charge, die mit 17 mg/L sogar einen höheren Siliciumwert ergab, obwohl die Belastung der Mahlraumauskleidung aufgrund der Polystyrolmahlperlen geringer ausfallen dürfte. Für die anderen Elemente ergaben sich hier jedoch niedrigere Werte, wie in Abbildung 5.11-3 dargestellt ist. Cer konnte erwartungsgemäß nicht in der Probe nachgewiesen werden. Auch der Wert des Eisennachweises lag jedoch mit nur 0,74 mg/L bei rund einem Drittel des Wertes von Charge 1. Am deutlichsten wird die geringere Belastung der Suspension durch die Verwendung von Polymermahlkörpern jedoch bei Betrachtung des Zirkonoxid-Wertes. Dieser lag im Gegensatz zu Charge 1 bei nur 0,58 mg/L, was eine über 206-fach niedrigere Abriebsmenge darstellt. Dieser deutlich tiefere Wert ist zum einen auf die geringere Dichte der

Polystyrolmahlkörper und damit eine geringere Belastung der Mahlraumauskleidung und des Mahlrotors zurückzuführen; zum anderen ist das Fehlen des Zirkonoxids in den Mahlkörpern selbst natürlich ein weiterer Faktor. Da der Anteil an Cer in den Mahlperlen nicht bekannt ist, kann nicht genau beurteilt werden, wie stark der Abrieb des Mahlrotors selbst ist. Insgesamt wird bei Betrachtung der Ergebnisse deutlich, dass die Polystyrol-Mahlkörper eine wesentlich geringere Belastung für das Produkt darstellen.

5.12 Untersuchungen zur Langzeitstabilität

Bei der Ermittlung des geeigneten Stabilisators und der weiteren Versuche zeigte sich eine Temperaturabhängigkeit der Partikelgröße. Daher sollte anhand einer Versuchsreihe die temperaturabhängige Stabilität der Proben untersucht werden. Es wurde eine ausreichend stabilisierte Suspension mit 10% Itraconazol und einem absoluten Zusatz von 1,4%(m/m) Polysorbat 80 hergestellt. Die Messung der Partikelgröße ergab nach der Mahlung einen Wert von 237 nm. Anschließend wurde die Charge zu gleichen Teilen auf 5 Gefäße aufgeteilt und bei 5 verschiedenen Temperaturen eingelagert. Vier der Proben wurden in elektronischen Wärmeschränken (Heraeus T6, Kendro Lab. Products GmbH, Hanau) bei Temperaturen von 20, 30, 40 und 50°C gelagert. Die Einlagerung der fünften Probe erfolgte bei 8°C im Kühlschrank. Die Temperaturen wurden regelmäßig mit Hilfe eines analogen Thermometers kontrolliert. Die Vermessung der Proben erfolgte nach 1, 7, 14 und 28 Tagen. Anschließend wurden die Proben alle 28 Tage bis zum 84. Tag vermessen, sofern sie noch vermessbar waren.

Tabelle 5.12-1: Parameter der Charge zur Beurteilung der Lagerstabilität

Drehzahl [U/min]	Zeit [Min]	Wirkstoff [%]	Hilfsstoff [%]
4000	240	10,0	Polysorbat 80 1,4

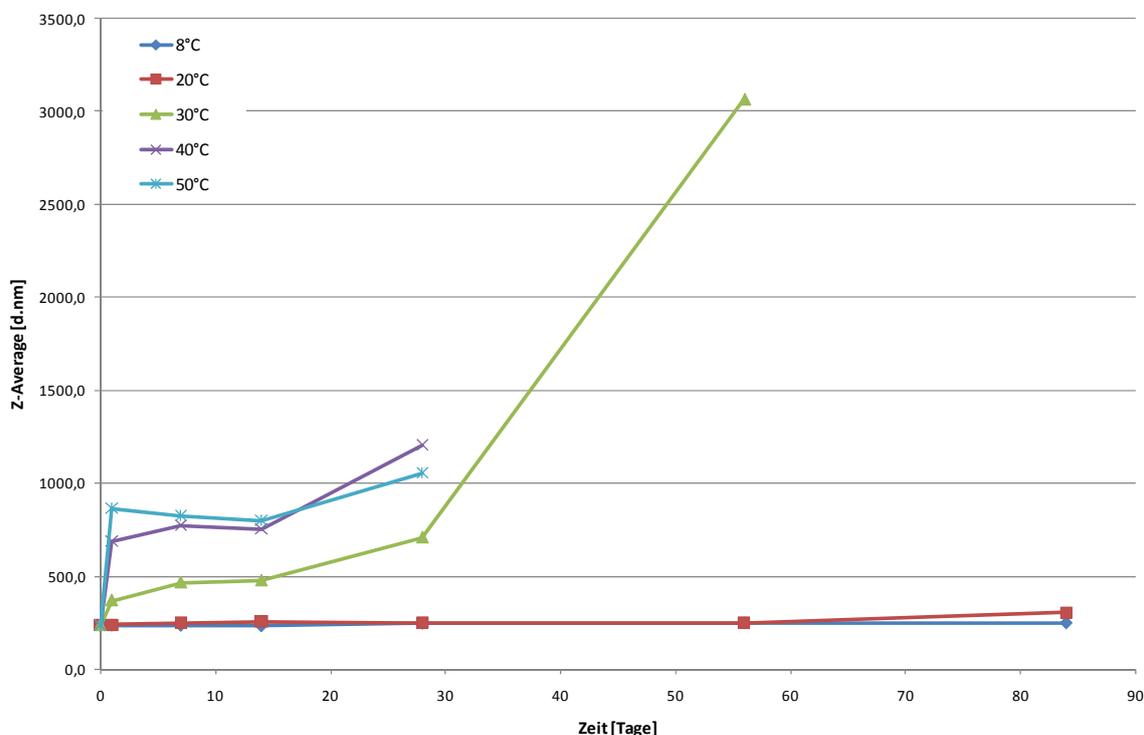


Abbildung 5.12-1: Partikelgrößenwachstum der Charge bei unterschiedlichen Einlagerungstemperaturen über einen Zeitraum von 84 Tagen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen in Abbildung 5.12-1 fällt auf, dass die Proben der beiden höchsten Temperaturen bereits nach dem ersten Tag der Einlagerung eine deutliche Partikelgrößenzunahme von 237 nm auf 689 nm bzw. 864 nm zeigen. Die Proben waren jedoch bereits nach dem ersten Tag so hoch viskos, dass ein repräsentativer Probenzug nicht mehr möglich war. Die Vermessung der Proben wurde daher nach 28 Tagen nicht fortgeführt. Gleiches gilt für die Probe bei 30°C nach 56 Tagen. Die Ergebnisse der Partikelgrößenmessung sind in Tabelle 5.12-2 aufgeführt.

Tabelle 5.12-2: Ergebnisse der Partikelgrößenmessung über einen Zeitraum von 84 Tagen

Tag	Z-Average [d.nm]				
	8°C	20°C	30°C	40°C	50°C
0	237,0	237,0	237,0	237,0	237,0
1	237,8	240,2	370,0	689,0	864,9
7	237,2	247,8	466,6	772,8	825,2
14	234,6	254,0	477,2	751,8	800,9
28	247,9	251,5	709,0	1205,3	1054,4
56	249,5	251,6	3069,0	-	-
84	250,5	304,7	-	-	-

Tabelle 5.12-3: Ergebnisse der PDI-Werte über einen Zeitraum von 84 Tagen

Tag	Polydispersitätsindex				
	8°C	20°C	30°C	40°C	50°C
0	0,131	0,131	0,131	0,131	0,131
1	0,134	0,127	0,188	0,185	0,253
7	0,117	0,149	0,183	0,255	0,177
14	0,128	0,148	0,191	0,238	0,159
28	0,129	0,160	0,206	0,440	0,321
56	0,127	0,165	0,720		
84	0,126	0,123			

Die Proben bei 8°C und 20°C zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum kein deutliches Partikelwachstum, was in Abbildung 5.12-2 noch einmal in anderem Maßstab dargestellt ist. Die Partikelgröße nimmt bei Kühlschranklagerung von 237 nm auf 250,5 nm nach einem Zeitraum von 84 Tagen zu. Auch die Probe, die bei 20°C eingelagert wurde weist eine hohe Konstanz der Partikelgröße auf. Nach einer anfänglichen Zunahme der Partikelgröße in den ersten 28 Tagen nach der Herstellung, kam es bis zum 56. Tag zu keinem weiteren Anstieg. Die Zunahme der Teilchengröße nach dem 56. Tag ist auf keine

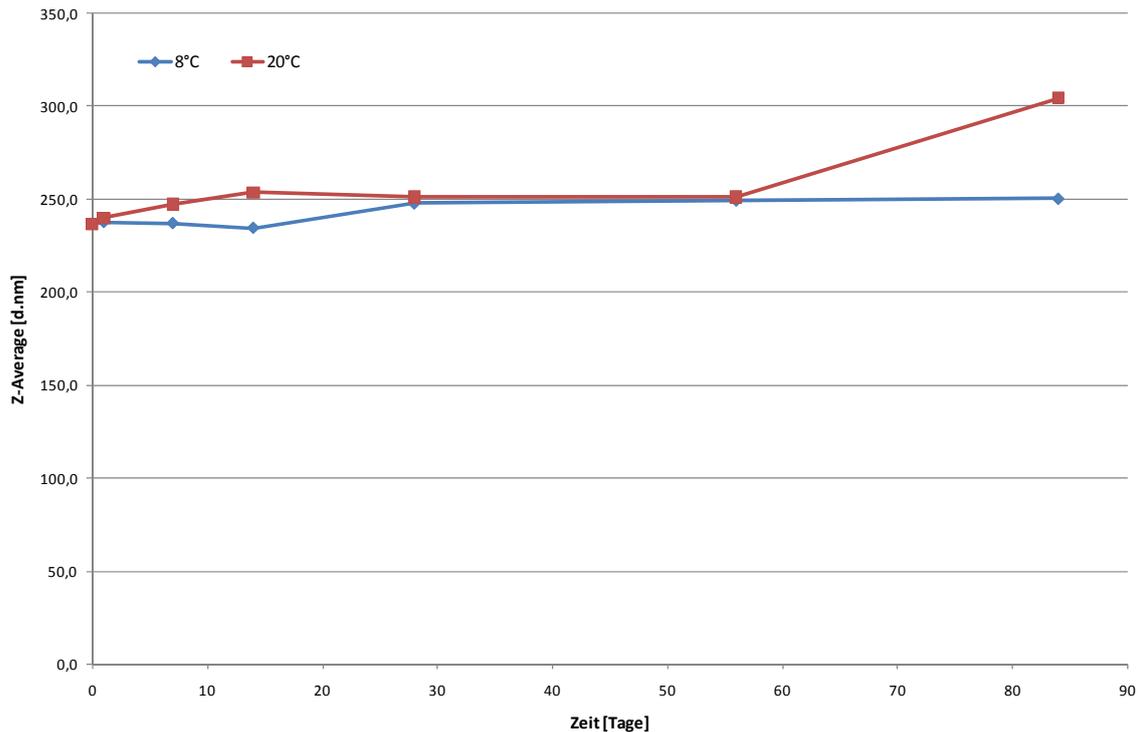


Abbildung 5.12-2: Partikelgrößenwachstum der Charge bei 8°C und 20°C über einen Zeitraum von 84 Tagen

äußeren Einflüsse zurückzuführen. Mit der Zunahme der Partikelgröße ging ein deutlicher Abfall des PDI-Wertes einher. Dieser nahm im Verlauf der letzten beobachteten 28 Tage von 0,165 auf 0,123 ab. Das Partikelgrößenwachstum kann mit einer Ostwaldreifung der Partikel erklärt werden (Lindfors et al., 2006), da aufgrund des gesteigerten Lösungsdrucks kleiner Partikel diese in Lösung gehen und an der Oberfläche größerer Partikel rekristallisieren, was zu einer Vergrößerung der Partikel bei verbesserter Homogenität der Suspension führt. Dies ist an den in Abbildung 5.12-3 dargestellten PDI-Werten zu sehen. Die Probe bei 8°C lässt hingegen eine leichte Abnahme des Wertes gegenüber dem Tag der Herstellung erkennen. Der PDI-Wert veränderte sich nach einer anfänglichen Schwankung kaum mehr und blieb mit Werten unter 0,129 sehr reproduzierbar.

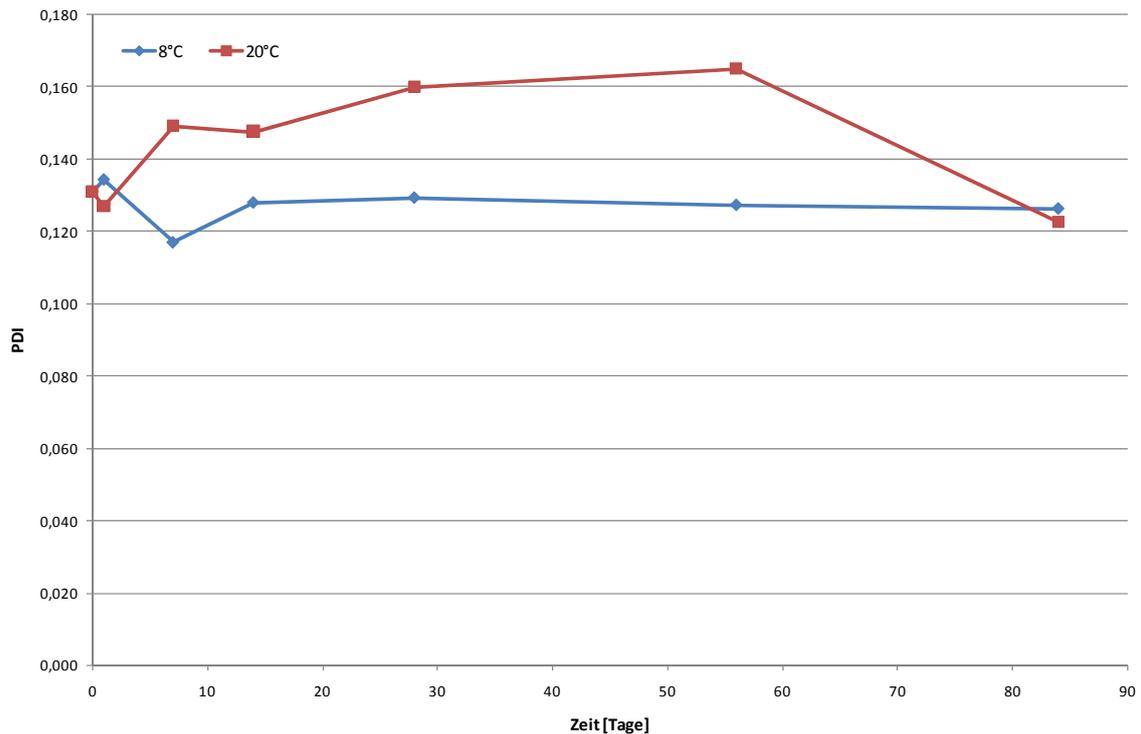


Abbildung 5.12-3: Polydispersitätsindex der Charge bei 8°C und 20°C über einen Zeitraum von 84 Tagen

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Formulierung mit einem absoluten Zusatz von 0,7% (m/m) Polysorbat 80 über einen längeren Zeitraum keine deutliche Zunahme der Partikelgröße zeigt und somit stabil ist. Die Lagerung der Suspensionen sollte jedoch im Kühlschrank erfolgen, da es bei Temperaturveränderungen zu einem Wachstum der Partikel kommen kann. Dies ist wahrscheinlich auf eine erhöhte Brownsche Molekularbewegung zurückzuführen. Aufgrund der höheren Beweglichkeit der Partikel bei höheren Temperaturen nähern sich diese stärker aneinander an und es kommt zur Agglomeration. Auch der Stabilisator Polysorbat 80 diffundiert bei erhöhten Temperaturen stärker und kann die sterische Stabilisierung der Partikel nicht gewährleisten.

5.13 Autoklavierbarkeit der Nanosuspensionen

Da die Nanosuspensionen zur Anwendung in der menschlichen Lunge bei Patienten mit geschwächter Immunabwehr vorgesehen sind, ist die Abwesenheit von Keimen in den Produkten eine wichtige Voraussetzung. Aus diesem Grund wurde versucht, die hergestellten Suspensionen im Dampfautoklaven zu sterilisieren. Zur Untersuchung der hergestellten Nanosuspensionsformulierungen wurden Chargen mit 5% und 20% Itraconazol hergestellt, die mit 100% Stabilisator (relativ zum Feststoff) ausreichend stabilisiert waren. Die Konzentration des Stabilisators entsprach somit einer absoluten Konzentration von 5% bzw. 20%. Als Hilfsstoffe kamen Polysorbat 80, Solutol HS 15 sowie Poloxamer 188 zum Einsatz. Zur Durchführung des Versuchs wurde jeweils ca. 5 ml der Probe in ein Vial pipettiert. Die Vials wurden anschließend mit einem teflonisierten Gummistopfen sowie einer Bördelkappe versehen und mit Hilfe einer Bördelzange vercrimpt, so dass sie fest verschlossen waren. Der Autoklavier-Prozess erfolgte im Tischautoklaven bei 121°C über einen Zeitraum von 15 Minuten. Um sicherzustellen, dass die Proben komplett erhitzt waren, wurde eine Ausgleichszeit von 15 Minuten vor Beginn der Sterilisationszeit berücksichtigt. Anschließend wurden die Proben über einen Zeitraum von 45 Minuten erkalten gelassen.

Die Begutachtung der Proben nach dem Abkühlen ergab, dass alle Suspensionen sedimentiert waren und sich teilweise ein festes Sediment gebildet hatte, das nicht redispergierbar war (Abbildung 5.13-1). Beim Versuch, die Sedimente zu redispergieren zeigte sich teilweise eine starke Verfestigung des Bodensatzes, so dass dieser sich nicht wieder aufschütteln ließ. Bei den Proben, die sich redispergieren ließen, wurde die Partikelgröße mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt.



Abbildung 5.13-1: Proben mit festem Sediment nach der Entnahme aus dem Autoklaven.

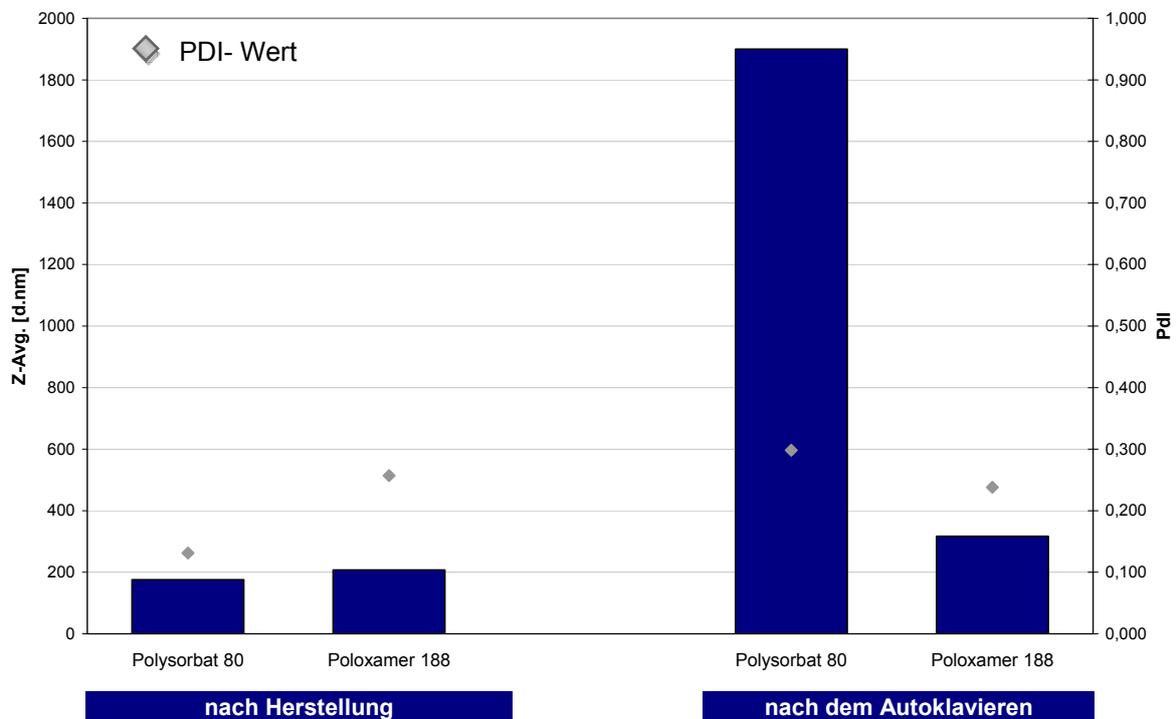


Abbildung 5.13-2: Partikelgrößen und PDI-Werte der Proben mit 5% Wirkstoff und einem Hilfsstoffzusatz von 100% (bezogen auf die Feststoffmenge) vor und nach dem Autoklavieren.

Die Ergebnisse der Partikelgrößenmessung und des PDI-Wertes vor und nach der Autoklavierung der Proben mit 5% Itraconazol sind in Abbildung 5.13-2 und Tabelle 5.13-1 dargestellt. Es zeigt sich für die Chargen eine Ausgangspartikelgröße von 176 nm für Polysorbat 80, bzw. 207 nm für Poloxamer 188. Die PDI-Werte liegen bei 0,131 für Polysorbat 80 und 0,257 für Poloxamer 188.

Tabelle 5.13-1: Ergebnisse der Partikelgrößenmessung vor und nach dem Autoklavierprozess

		5% Wirkstoff	
	Hilfsstoff	Z-Avg. [d.nm]	PDI
vor	Polysorbat 80	176,1	0,131
	Poloxamer 188	207,5	0,257
nach	Polysorbat 80	1900,0	0,298
	Poloxamer 188	316,8	0,238

Nach dem Autoklavieren zeigte sich, dass die Partikelgröße der Chargen deutlich gestiegen war. Für Polysorbat 80 lag der gemessene Wert für die Partikelgröße bei 1900 nm. Der Polydispersitätsindex hatte sich auf einen Wert von 0,298 verschlechtert. Dies ist überraschend, da aufgrund der Verfestigung der Charge während der Autoklavierung von einem deutlich schlechteren Ergebnis auszugehen war. Für Poloxamer 188 zeigte sich keine so starke Zunahme der Partikelgröße. Nach der Autoklavierung hatte der Wert nur um ca. 110 nm auf 316,8 nm zugenommen. Beim PDI-Wert zeigte sich eine Verringerung des Wertes von 0,257 nach der Herstellung auf 0,238 nach der Sterilisation. Da auch diese Probe nach dem Autoklavieren jedoch eine Verfestigung zeigte und redispergiert wurde, ist die Messung vorsichtig zu beurteilen.

Die Chargen mit höherem Feststoffgehalt von 20% und analogem Hilfsstoffanteil zeigten nach dem Autoklavieren ebenfalls einen Anstieg der Partikelgröße und des PDI-Wertes.

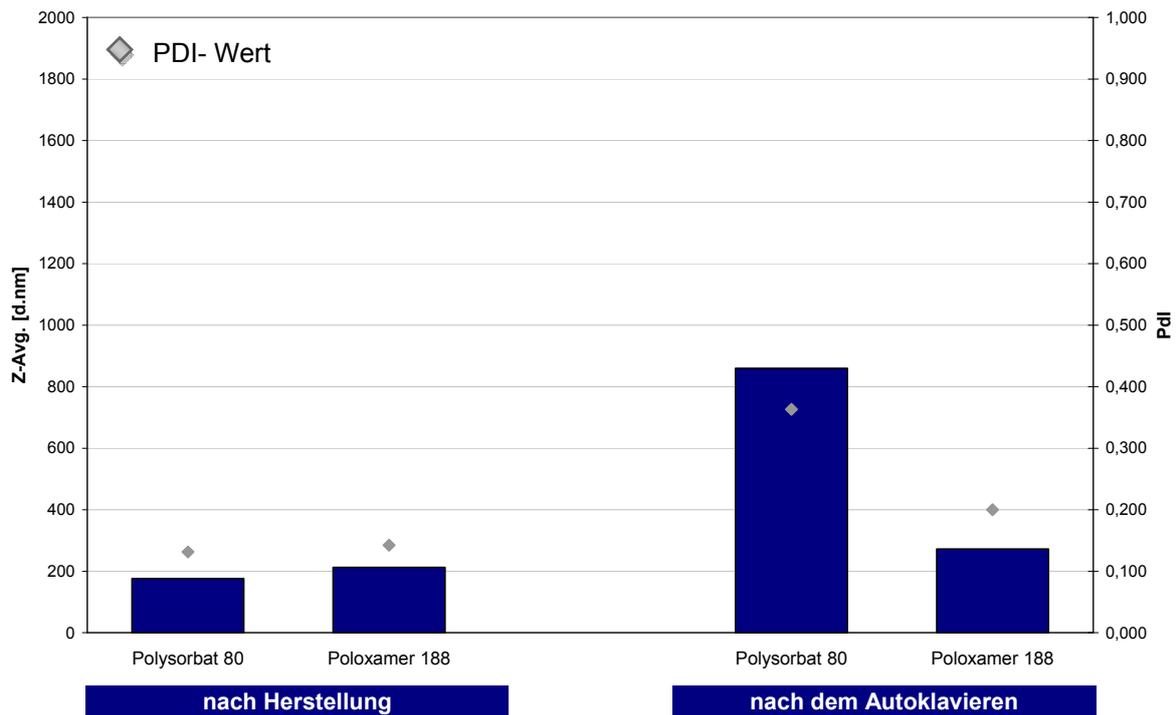


Abbildung 5.13-3: Partikelgrößen und PDI-Werte der Proben mit 20% Wirkstoff und einem Hilfsstoffzusatz von 100% (bezogen auf die Feststoffmenge) vor und nach dem Autoklavieren.

Tabelle 5.13-2: Ergebnisse der Partikelgrößenmessung vor und nach dem Autoklavierenprozess

		20% Wirkstoff	
		Z-Avg. [d.nm]	PDI
vor	Polysorbat 80	176,1	0,131
	Poloxamer 188	212,2	0,142
nach	Polysorbat 80	859,9	0,363
	Poloxamer 188	272,4	0,200

Aufgrund der Ergebnisse aus den Autoklavierungsuntersuchungen der Proben wurde ermittelt, wie sich Tensidlösungen im Autoklavierprozess verhalten. Es wurden daher jeweils 0,5 g Poloxamer sowie Polysorbat 80 in 10 g Aqua bidest komplett gelöst, sodass sich eine 5%ige Lösung des Tensid ergab. Die Lösungen wurden anschließend autoklaviert. Nach dem Erkalten der Proben zeigte sich bei beiden Tensiden eine Phasentrennung. Bei Polysorbat 80 hatten sich zudem ein festes Sediment gebildet, das sich nicht redispergieren ließ, jedoch eine Schlierenbildung an der Oberfläche zeigte.

Zur näheren Charakterisierung des hauptsächlich verwendeten Stabilisators Polysorbat 80 wurde in einem weiteren Versuch eine Verdünnungsreihe mit dem Tensid hergestellt. Dazu wurden Polysorbat 80-Lösungen in Konzentrationen von 0,1% bis 1,0% und anschließender Steigerung in 0,5% Schritten bis 5% hergestellt. Diese wurden jeweils in ein Vial pipettiert, das dicht verschlossen wurde, und autoklaviert. Nachdem der Druck im Autoklaven auf Normaldruck gesunken war, wurde dieser noch warm geöffnet und die Proben begutachtet. Dabei zeigte sich eine Trübung der Proben bis zu einer Konzentration von 3%. Die beiden am niedrigsten Konzentrierten Polysorbat-Lösungen zeigten keine Trübung und waren komplett klar. Ab einer Konzentration von 3% zeigten die Proben Schlieren am Boden des Gefäßes, die sich teilweise durch starkes schütteln wieder in Lösung bringen ließen. Die getrübbten Lösungen waren nach dem Abkühlen wieder vollständig klar und zeigten keine Schlierenbildung.

Aufgrund dieser Versuche und der gemachten Beobachtungen kann gesagt werden, dass die Tensidkonzentration der untersuchten wirkstoffhaltigen Proben zu hoch war und es somit zu einer Verfestigung des Stabilisators in der Probe kam. Aufgrund der Beobachtungen an den reinen Tensidlösungen ist jedoch davon auszugehen, dass auch der

Einsatz einer geringeren Stabilisatorkonzentration Auswirkungen auf die Stabilität der Proben hat. Da der Trübungspunkt des Tensids beim Autoklavieren mit 121°C überschritten ist, wird das Tensid nicht mehr solubilisiert. Außerdem wird aufgrund der starken Brownschen Bewegung bei der hohen Temperatur die Agglomerationsneigung der Partikel erhöht sein und zu einer verstärkten Diffusion des Tensids führen. Beides erhöht die Agglomerationsneigung der Partikel, da eine ausreichende Stabilisierung nicht gewährleistet ist.

5.14 Keimzahlreduktion

Da eine Sterilisierung der Proben mit thermischen Verfahren nicht möglich war, wurde nach einer Alternative zur Reduktion der Keimzahl gesucht. Da der Mahlprozess ein sehr energiereicher Prozess ist und in der Literatur der Zellaufschluss mit Hilfe des Verfahrens beschrieben ist (White und Marcus, 1988), sollte untersucht werden, ob der hohe Energieeintrag ausreicht, um die Keimzahl der Probe zu minimieren. Zur Untersuchung, ob der Mahlprozess, oder die Probe einen Einfluss auf die Keimzahl haben, wurde ein Versuch mit definierter Keimzahl durchgeführt. Um eine zuverlässige Aussage treffen zu können, wurde *Brevundimonas diminuta* als Testkeim für die Versuche ausgewählt. Er ist mit einer Größe von 220 -250 nm einer der kleinsten ubiquitär vorkommenden Keime. Vor Durchführung des Versuches wurde er in Suspension kultiviert und anschließend auf eine Keimzahl von $1,69 \times 10^6$ KBE/ml eingestellt. Die Herstellung der Suspension für die Mahlung erfolgte wie üblich, wobei die Masse des Gesamtansatzes 75 g betrug. Für die Herstellung wurde ein Milliliter weniger an Aqua. purificata eingesetzt. Stattdessen wurde ein Milliliter der Impfsuspension zu der Suspension gegeben, wodurch sich eine Keimzahl von 22533 KBE je Milliliter im Gesamtansatz ergab. Die Mahlkammer war für die

<i>Itraconazol (5%)</i>	3,75g
<i>Polysorbat 80 (0,7%)</i>	0,525g
<i>Suspension mit Brevundimonas diminuta</i>	1,0g
<i>Aqua purificata</i>	ad 75,0g

Durchführung des Versuches mit Polystyrol Mahlperlen im Größenbereich von 360-630 µm befüllt. Nach Einwaage des Arzneistoffes wurde aus der frisch hergestellten Suspension umgehend ein Milliliter Probe gezogen, der sofort mikrobiologisch untersucht wurde. Nach dem Probenzug erfolgte die Dispergierung des Wirkstoffes mit Hilfe eines Ultra-Turrax. Um die Auswirkungen der Dispergierung auf die Keimzahl beurteilen zu können, wurde wiederum eine Probe gezogen, der restliche Ansatz in die Mahlkammer überführt und die Mahlung gestartet. Der Probenzug erfolgte nach den üblichen Zeitpunkten nach 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten Mahldauer. Die Proben wurden direkt nach dem Probenzug zur mikrobiologischen Untersuchung gegeben, um eine Erhöhung der Keimzahl durch Standzeiten auszuschließen.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen sind in Abbildung 5.14-1 dargestellt. Auffällig ist die Reduktion der Keimzahl vor der Dispergierung des Feststoffes von 22533 KBE je Milliliter als errechnetem Wert im Gesamtansatz auf 6250 KBE je Milliliter. Auch die Dispergierung des Wirkstoffes hat eine geringe keimzahlreduzierende Wirkung. Nach der Dispergierung konnte noch ein Wert von 4900 KBE/ml ermittelt werden. Nach Beginn der Mahlung nahm der Wert der keimbildenden Einheiten weiter ab. Nach einer Mahldauer von 30 Minuten war er von 4900 KBE/ml auf 1345 KBE/ml gesunken.

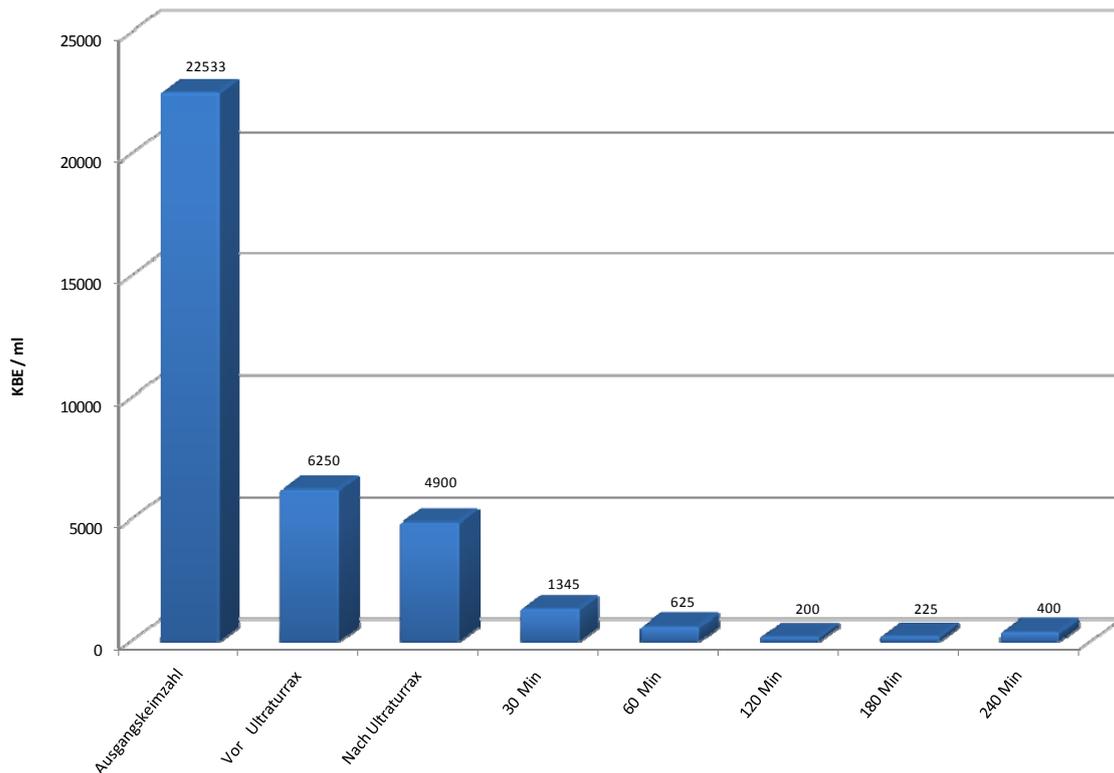


Abbildung 5.14-1: Auswirkungen der Mahlung auf die Keimzahl

Bis zu einer Mahldauer von 120 Minuten sank der Wert der keimbildenden Einheiten auf 200 KBE/ml ab. Die weiteren Messungen nach 180 und 240 Minuten zeigten wieder einen leichten Anstieg auf 225 bzw. 400 KBE/ml. Insgesamt lässt sich jedoch eine maximale Reduktion der Keimzahl um 1,39 Logstufen nachweisen. Außerdem zeigte sich bei der Auszählung der Keimzahl nach einer Mahldauer von 120 Minuten zwischen 5 und 10 % Fremdkeime auf den Platten. Diese können sowohl als Luftkeime beim Probenzug als auch während der Herstellung in die Probe gelangt sein.

Da die Untersuchungen eine Keimzahlreduktion zeigen konnten, der Einfluss der verschiedenen Parameter jedoch nicht geklärt werden konnte, wurde der Versuch mit differenzierteren Parametern erneut durchgeführt. Die Ansatzmenge der Polysorbatlösung wurde auf den dreifachen Ansatz vergrößert. Nach dem vollständigen Auflösen des Tensids, wurde eine auf $1,60 \times 10^6$ KBE/ml eingestellte Impfsuspension zugesetzt, so dass sich eine rechnerische Keimzahl von 21333 KBE/ml in der Polysorbatlösung ergab. Um den Einfluss des Tensids auf die Keimzahl untersuchen zu können, wurde ein Drittel des Ansatzes als Blindprobe A entnommen und umgehend mikrobiologisch untersucht. Mit den restlichen zwei Dritteln der Lösung wurde eine 5%ige Itraconazol-Suspension hergestellt. Zur Beurteilung des Arzneistoff-Einflusses auf die Keimzahl, wurde der Ansatz vor der Dispergierung des Arzneistoffes nochmals geteilt und eine Hälfte als Blindprobe B direkt mikrobiologisch untersucht. Die beiden Blindproben A & B wurden nicht in der Rührwerkskugelmühle vermahlen, sondern während der Mahldauer von Ansatz C in Ruhe stehen gelassen. Zu den Probenzugzeitpunkten von Ansatz C wurde aus beiden Ansätzen ebenfalls eine Probe entnommen

Ansatz A (Kontrolle 1):

Aqua purificata
0.7 % Polysorbat 80

Ansatz B (Kontrolle 2):

Aqua purificata
Polysorbat 80 *0,7%*
Itraconazol *5,0%*

Ansatz C:

Aqua purificata
Polysorbat 80 *0,7%*
Itraconazol *5,0%*

MAHLUNG:**NEIN****NEIN****JA**

und alle drei Proben mikrobiologisch untersucht. Zur Vermahlung wurde wie oben beschrieben vorgegangen. Vor Beginn der Mahlung wurde die Mahlkammer außerdem mit 70%igem Isopropanol über einen Zeitraum von 10 Minuten gespült, um die Mühle keimfrei zu machen und eine Kontamination mit Fremdkeimen zu vermeiden. Anschließend wurde mit partikelfreiem Wasser gespült, um Reste des Isopropanols zu entfernen.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen sind in Abbildung 5.14-2 grafisch dargestellt. Für Ansatz C, der dem Mahlprozess ausgesetzt war, zeigte sich über den Mahlverlauf eine deutliche Reduktion der Keimzahl. Nach einer Mahldauer von 30 Minuten ließen sich nur noch 610 KBE/ml in der Suspension nachweisen. Nach weiteren 30 Minuten sank dieser Wert auf 50 KBE/ml. Ab einer Mahldauer von 120 Minuten konnten keine Mikroorganismen mehr in der Probe nachgewiesen werden. Auch bei Ansatz B konnte eine deutliche Reduktion der Keimzahl beobachtet werden. Diese nahm ohne den Einfluss des Mahlprozesses im Verlauf von 240 Minuten von 14400 KBE/ml nach Herstellung auf einen Wert von 550 KBE/ml ab.

Die Werte der 0 Minuten Proben von Ansatz B & C zeigten gegenüber der Probe von Ansatz A bereits eine deutliche Reduktion der Keimzahl. Da der einzige Unterschied der Proben im Zusatz des Arzneistoffes bei B & C bestand, kann davon ausgegangen werden, dass Itraconazol eine keimreduzierende Wirkung hat. Allerdings zeigt sich auch bei Ansatz A über den zeitlichen Verlauf eine Abnahme der Keimzahl von 24100 KBE/ml auf einen Wert von 5500 KBE/ml nach 240 Minuten Standzeit. Da es sich bei der Probe nur um eine Polysorbat 80 Lösung handelt, hat auch das Tensid einen hemmenden Einfluss auf die Keimzahl der Suspension.

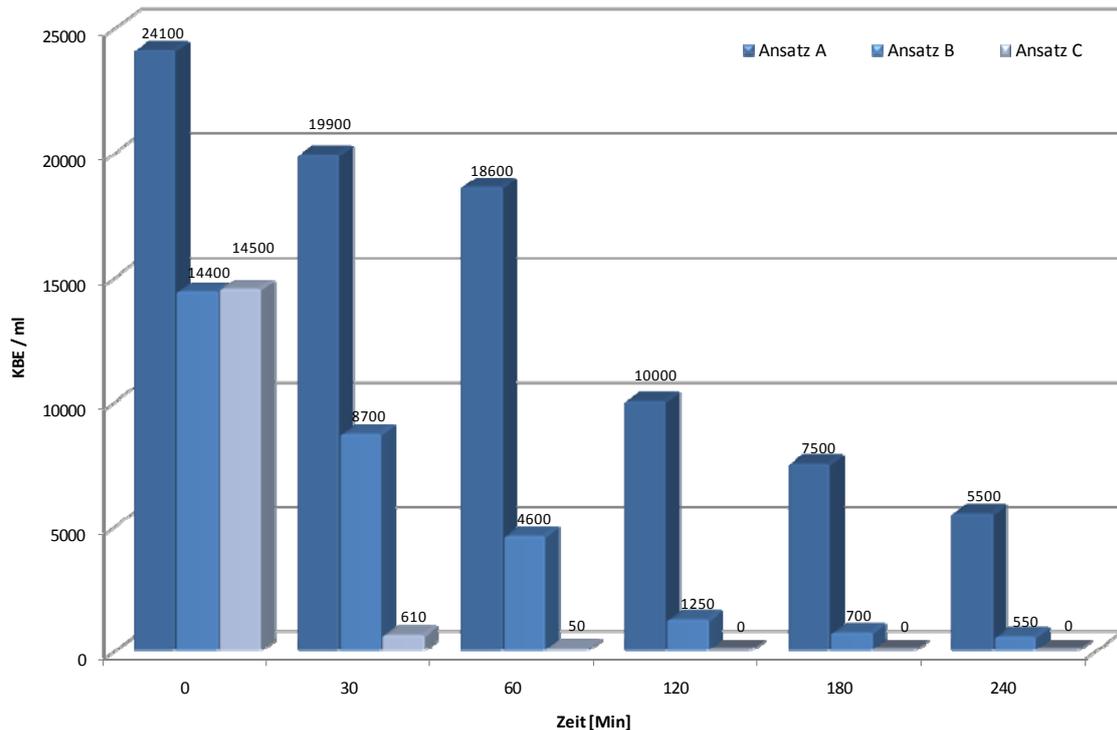


Abbildung 5.14-2: Einfluss von Polysorbat 80 (Ansatz A), Polysorbat 80 und Itraconazol (Ansatz B) sowie Polysorbat 80 und Itraconazol im Mahlprozess (Ansatz C) auf die Keimzahl

Die Ergebnisse der Untersuchungen können einen keimreduzierenden Einfluss des Mahlprozesses bestätigen. Bei der zweiten Durchführung der Mahlung wurde außerdem der Einfluss des Arzneistoffes sowie des verwendeten Tensids untersucht. Für beide Substanzen konnte ebenfalls eine keimreduzierende Wirkung nachgewiesen werden. Bei einer Durchführung im größeren Maßstab sollte vor Versuchsbeginn eine Sterilisation der Mühlenbauteile vorgenommen werden. Bei anschließender aseptischer Herstellung sollte sich die Keimzahl in der Suspension auf diesem Weg gut kontrollieren lassen.

Zu berücksichtigen ist bei der Beurteilung dieser Versuche allerdings, dass der Einfluss des Volumens auf die Abtötungsrate nicht näher untersucht wurde. Die Mahlung erfolgte mit einem relativ kleinen Volumen, das zirkulierend durch die Mahlkammer gepumpt wurde. Die Keime waren somit einer ständigen Belastung des Mahlprozesses

ausgesetzt. Die bei einer Vergrößerung des Mahlvolumens bei gleichem Mahlkammervolumen verlängerte „Ruhezeit“ der Suspension zwischen den Belastungen in der Mahlkammer kann bereits zu einem Wachstum der Mikroorganismen führen.

Nach Abschluss der Arbeiten zur Keimzahlreduktion wurde die Mühle mit einer 5%igen Formaldehydlösung gespült, um alle verbliebenen Mikroorganismen abzutöten. Anschließend wurde mit einer ausreichenden Menge partikelfreien Wassers gespült, die Mühle auseinandergelassen und gereinigt. Die verwendeten Mahlperlen wurden entsorgt.

5.14.1 Ermittlung der temperaturabhängigen Viskosität

Die Nanosuspensionen zeigten bei den Untersuchungen zur Langzeitstabilität einen Anstieg der Viskosität bei steigenden Temperaturen. Auch bei der Autoklavierbarkeit der Formulierungen (siehe Kapitel 5.13) zeigte sich neben der Instabilität bei höheren Temperaturen ebenfalls eine Viskositätserhöhung und Verfestigung. Anhand einer Versuchsreihe zur Viskositätsmessung sollte dieses Phänomen weiter untersucht werden. Um die beobachtete Verfestigung der Suspensionen zu verifizieren, wurden daher Viskositätsuntersuchungen mit einem Kapillarviskosimeter (Schott Instruments GmbH, Mainz) durchgeführt. Da die Suspensionen bei der Einlagerung bei Temperaturen von 8°C, 20°C, 30°C, 40°C und 50°C festgestellt wurden, wurden diese Temperaturen auch für die Temperierung des Wasserbades des Kapillarviskosimeters gewählt. Untersucht wurde eine Suspension mit einem hohen Wirkstoffanteil von 20% und 2,8% Polysorbat 80. Die mit der Probe gefüllte Kapillare wurde in das temperierte Wasserbad des Kapillarviskosimeters gestellt und die Probe für 15 Minuten unter Bewegung auf die Temperatur equilibriert.

Anschließend wurde die automatische Messung gestartet und die Probe 5 mal vermessen. Die Automatik pumpt die Probe automatisch mit einem leichten Überdruck in das Ausgleichsgefäß der Ubbelohde-Kapillare. Aufgrund von Änderungen des Brechungsindices wird das Passieren zweier Lichtschranken detektiert, die als Messmarken dienen. Gemessen wird die Zeit, die die Suspension beim Ablaufen durch die Kapillare zwischen den beiden Messmarken benötigt.

Nach Beendigung der Messung wurde die Temperatur des Wasserbades auf die nächst höhere Temperatur eingestellt. Nach Erreichen des Temperaturwertes wurde mit den nächsten Messungen wie oben beschrieben verfahren. Sämtliche Parameter der Messung werden von der Software in einer Tabelle gespeichert, die mit einer Tabellenkalkulation ausgewertet wurde. Die Angabe der gemessenen Viskositäten erfolgt als kinematische Viskosität in mm^2/s , da die Dichten der Suspension bei den einzelnen Messtemperaturen nicht bekannt sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.14-1 dargestellt.

Tabelle 5.14-1: Angaben der Kinematischen Viskosität bei Temperaturen von

Badtemperatur [°C]	Kinematische Viskosität [mm^2/s]
8	2,14
20	1,59
30	1,47
40	1,64
50	nicht möglich

Bei einer Messtemperatur von 8°C zeigt sich mit $2,14 \text{ mm}^2/\text{s}$ die höchste Viskosität der Probe, die bei Erhöhung der Wasserbadtemperatur auf 20°C und 30°C bis auf $1,47 \text{ mm}^2/\text{s}$ abnimmt. Da die Viskosität eine temperaturabhängige Größe ist, waren diese Veränderungen zu erwarten. Bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur zeigt sich jedoch

ein erneuter Anstieg der Viskosität auf einen Wert von 1,64 mm²/s. Bei der Betrachtung der Messzeit ergibt dies bei Verwendung der gleichen Kapillare eine Verlängerung der Durchflusszeit um ca. 5 Sekunden. Die Ermittlung der Durchflusszeit bei einer Temperatur von 50°C war nicht mehr möglich, da die Viskosität trotz ausreichender Equilibrierung der Probe während der Messung stark anstieg. Der Anstieg der Durchflusszeiten ist in Tabelle 5.14-2 dargestellt. Die Messung des letzten Wertes wurde abgebrochen, da sich die Probe über die Fließgrenze verfestigt hatte.

Tabelle 5.14-2: Anstieg der Messzeiten aufgrund einer Viskositätserhöhung der Probe bei 50°C

Badtemperatur	Meßwert 1	Meßwert 2	Meßwert 3
50°C	171,82 s	431,35 s	5093,66 s

Auch bei einer Messung im Kapillarviskosimeter lässt sich demnach ein Anstieg der Viskosität der Nanosuspensionen beobachten. Der Anstieg ab einer Temperatur von 40°C kann jedoch mehrere Ursachen haben. Da ein Verdunstungseffekt ausgeschlossen werden kann ist denkbar, dass es aufgrund der erhöhten Temperatur und der damit einhergehenden vermehrten Brownschen Bewegung der Partikel zu einer Destabilisierung und anschließenden Agglomeration kommt. Ebenfalls denkbar, wenn auch weniger wahrscheinlich ist eine Quellung des Arzneistoffes in der Suspension. Ein thermoreversibles Sol-Gel-Verhalten des eingesetzten Tensids Polysorbat 80 ist ebenfalls möglich, erscheint allerdings in der eingesetzten Tensidkonzentration von 2,8% (m/m absolut) unwahrscheinlich.

5.15 Vernebelbarkeit der hergestellten Formulierungen

Da die entwickelte Formulierung zur Inhalation bestimmt war, sollte die Partikelgrößenverteilung der entstehenden Aerosole bei Verneblung mit drei handelsüblichen Geräten getestet werden. Es wurden dabei Suspensionen mit einem Feststoffanteil von 5%, 10% und 20% eingesetzt, die jeweils über einen Stabilisatorzusatz von 14% in Relation zum Arzneistoff verfügten, was einen Anteil bis zu 2,8% Polysorbat 80 bei der Suspension mit 20% Feststoffanteil ergab. Die Verneblung wurde mit drei Verneblern getestet, die nach unterschiedlichen Prinzipien arbeiten. Es kamen mit dem Pari LC Plus[®] ein Druckluftvernebler, dem Multisonic infra control[®] ein Ultraschallvernebler und dem Pari eFlow[®] ein Membranvernebler zum Einsatz (siehe Abschnitt 2.2.2).

Die Messungen wurden mit Hilfe der Laserdiffraktometrie durchgeführt. Das Reservoir des jeweiligen Verneblers wurde mit der Suspension befüllt und die Verneblung in einem festen Abstand von 12 cm zur Messoptik (Messbereich 0,45 bis 87,5 µm) gestartet. Die Vermessung jeder Rezeptur erfolgte drei mal. Aus den Messwerten wurde der Mittelwert der Einzelmessungen bestimmt und die Standardabweichung der Einzelmessungen ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen für die Nanosuspension mit 5% Wirkstoffanteil sind in Tabelle 5.15-1 aufgeführt. Die Ergebnisse für die Nanosuspension mit 10% Wirkstoffanteil finden sich in Tabelle 5.15-2 und in Tabelle 5.15-3 sind die Ergebnisse der Messungen für die Nanosuspension mit 20% Wirkstoffanteil angegeben. Alle Suspensionen ließen sich gut vernebeln. Auch die Formulierungen mit einem hohen Wirkstoffanteil und einem Anteil von 2,8% Polysorbat 80 ließen sich gut in ein Aerosol überführen, ohne dass Veränderungen gegenüber den niedriger konzentrierten Chargen erkennbar wurden. Bei dem Druckluftvernebler zeigte sich jedoch eine Schaumbildung aller drei Suspensions-Chargen im Reservoir.

Tabelle 5.15-1: Partikelgrößenverteilungen der Chargen mit 5% Wirkstoffanteil und 0,7% Polysorbat 80

	X₁₀	X₅₀	X₉₀
Pari eFlow Rapid[®] rapid	1,16 +/- 0,08 µm	4,66 +/- 0,19 µm	7,78 +/- 0,32 µm
Pari LC Plus[®]	1,46 +/- 0,10 µm	7,96 +/- 0,29 µm	15,18 +/- 0,40 µm
multisonic[®] infra control	1,18 +/- 0,01 µm	4,36 +/- 0,02 µm	8,58 +/- 0,11 µm

Tabelle 5.15-2: Partikelgrößenverteilungen der Chargen mit 10% Wirkstoffanteil und 1,4% Polysorbat 80

	X₁₀	X₅₀	X₉₀
Pari eFlow Rapid[®] rapid	1,03 +/- 0,12 µm	4,51 +/- 0,15 µm	7,83 +/- 0,29 µm
Pari LC Plus[®]	1,27 +/- 0,09 µm	7,14 +/- 0,24 µm	14,39 +/- 0,19 µm
multisonic[®] infra control	0,99 +/- 0,04 µm	3,40 +/- 0,22 µm	7,15 +/- 0,10 µm

Tabelle 5.15-3: Partikelgrößenverteilungen der Chargen mit 20% Wirkstoffanteil und 2,8% Polysorbat 80

	X₁₀	X₅₀	X₉₀
Pari eFlow Rapid[®] rapid	1,36 +/- 0,24 µm	5,08 +/- 0,08 µm	8,99 +/- 0,20 µm
Pari LC Plus[®]	1,21 +/- 0,05 µm	6,94 +/- 0,43 µm	14,34 +/- 0,47 µm
multisonic[®] infra control	1,46 +/- 0,08 µm	4,66 +/- 0,19 µm	9,33 +/- 0,30 µm

Vernebelbarkeit der hergestellten Formulierungen

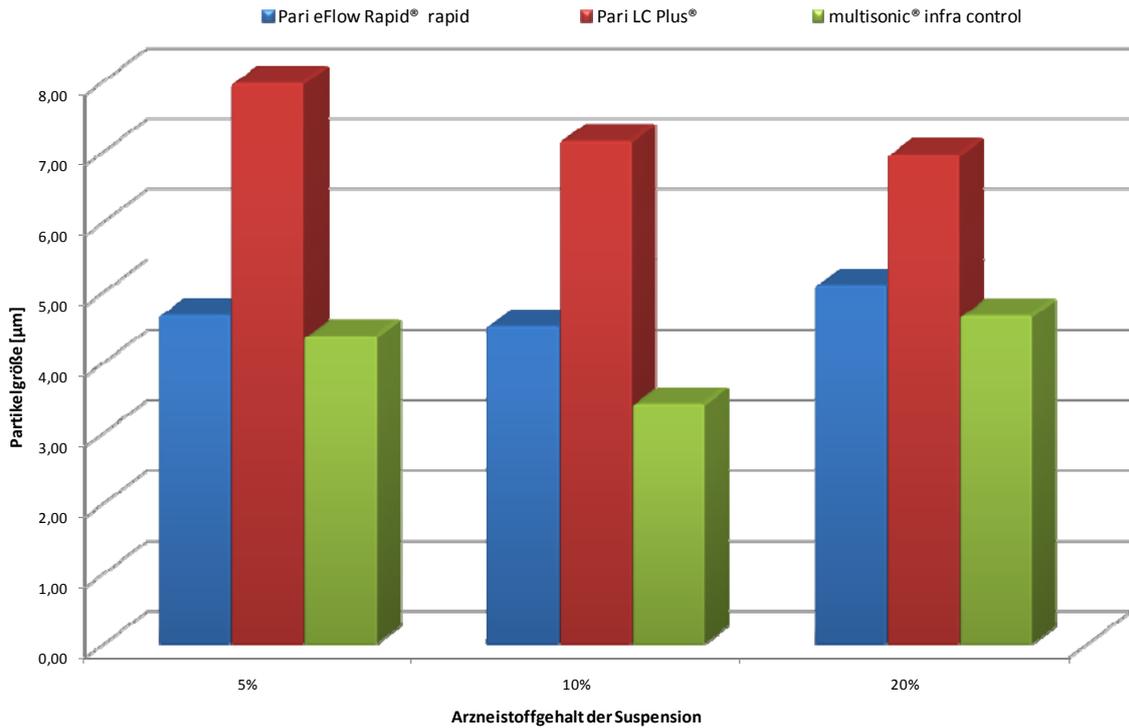


Abbildung 5.15-1: Vergleich der Partikelgröße der Suspensionen mit steigendem Wirkstoffgehalt. Angabe des Mittelwertes der x_{50} Wertes aus drei Messungen

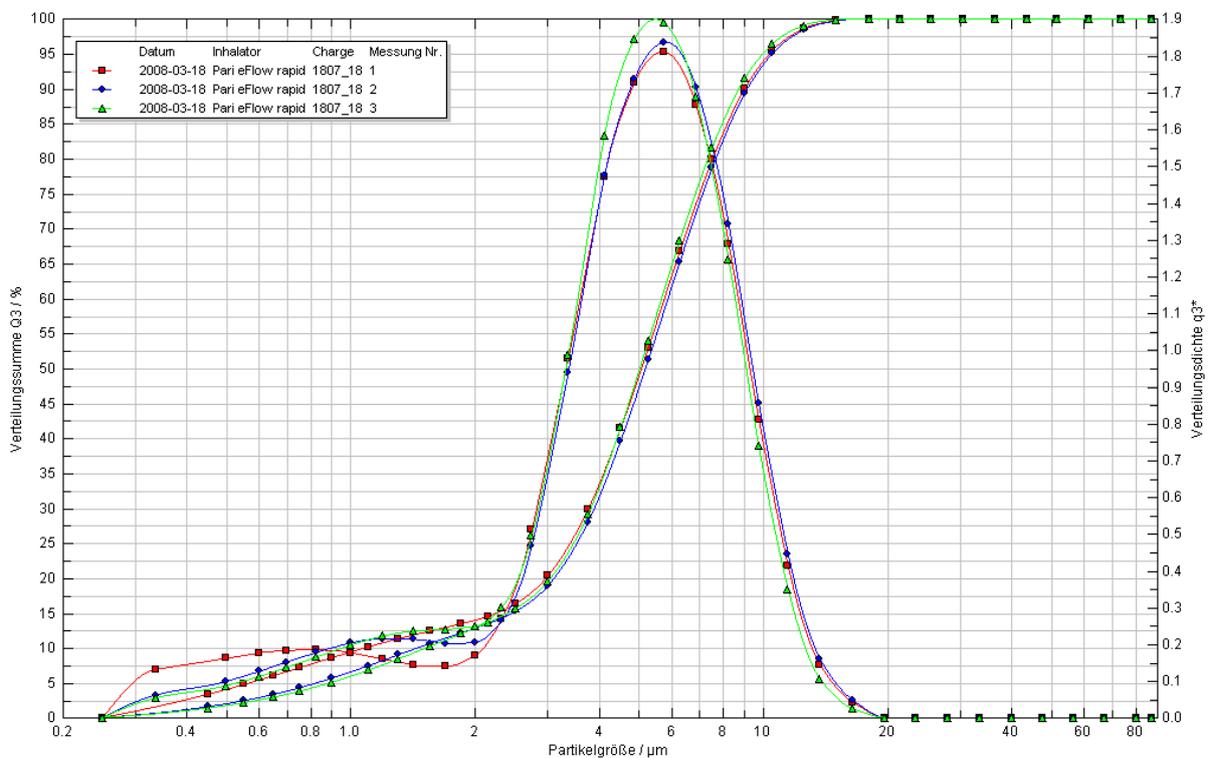


Abbildung 5.15-2: Verteilung der Tröpfchengrößen nach Verneblung einer Nanosuspension mit einem Feststoffanteil von 20% Itraconazol mit dem Pari eFlow Rapid®

Bei der Betrachtung der statistischen Partikelgrößenverteilung kommt den x_{50} -Werten im Allgemeinen die größte Bedeutung zu. Daher sind diese bei der Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 5.15-1 aufgeführt. Die Nanosuspensionen zeigten eine gute Vernebelbarkeit in den Geräten mit einer monomodalen Verteilung der Messwerte, wie in Abbildung 5.15-2 am Beispiel der Verneblung einer Suspension mit 20% Wirkstoffanteil mit dem Pari eFlow Rapid[®] gezeigt ist. Auch die Verwendung der unterschiedlichen Konzentrationen an Wirkstoff und Hilfsstoff ließ keine Veränderungen der Partikelgröße erkennen. Die Partikelgrößen lagen bei dem Membran- und dem Ultraschallvernebler im Bereich unter 5 μm . Die ermittelten mittleren Tröpfchengrößen für den Druckluftvernebler lagen hingegen mit bis zu 7,96 +/- 0,29 μm oberhalb des inhalierbaren Bereiches, was zu einer Impaktion der Tröpfchen in den oberen Atemwegen führen würde und für eine geringere Lungendeposition sorgt. Allerdings muss bei der Bewertung berücksichtigt werden, dass es sich um wässrige Aerosoltröpfchen handelt, die durch eine Verdunstung des Dispersionsmediums immer weiter an Größe abnehmen. Somit wird sich bei Inhalation eine höhere Lungendeposition ergeben, als die Ergebnisse vermuten lassen. Bei der Verneblung im Pari LC Plus[®] kam es zu einer Schaumbildung der Suspension im Reservoir des Verneblers, was die Suspension cremig werden ließ. Dieser Viskositätsanstieg der Suspensionen kommt als Grund für die höheren Partikelgrößen in Betracht. Offensichtlich wird durch das Verneblungsprinzip mit Zuführung von Druckluft das Schäumen der Suspension gefördert. Dementsprechend ist die Verneblung der tensidhaltigen Nanosuspensionen mit einem Druckluftvernebler schlecht möglich. Es sollte daher auf andere Verneblungsmechanismen, wie Ultraschall- oder Membranverneblung ausgewichen werden, die auch bei hohen Feststoffkonzentrationen gute

Ergebnisse lieferten (Hernandez-Trejo et al., 2005). Die Verneblung mit dem Ultraschallvernebler lieferte dabei die besten mittleren Partikelgrößenverteilungen. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass die für die Verneblung benötigte Zeit für die gleiche Masse an Suspension zwischen den Geräten stark variierte. Das hat zur Folge, dass die Dichte der entstehenden Aerosolwolken beim Pari eFlow rapid® deutlich höher war, was sich auch in der optischen Messkonzentration widerspiegelte. Bei dem Ultraschallvernebler kam es zudem zu einer Erwärmung der Suspension als Folge des Energieeintrags in die Suspension. Dieser Energieeintrag ist auch als kritisch im Bezug auf die Stabilität der Nanosuspension zu beurteilen. Insgesamt lässt sich daher sagen, dass die Aerosolerzeugung mit einem Membranvernebler das geeignetste Prinzip zur Verneblung der Nanosuspensionsformulierungen darstellt.

5.16 Testung der Suspensionen im Tierversuch

Da die Suspensionen zur Anwendung in der menschlichen Lunge bestimmt sind, spielt die Verträglichkeit der Formulierung, insbesondere auch der verwendeten Hilfsstoffe, am Applikationsort eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden die Nanosuspensionsformulierungen im Tierversuch untersucht. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die neu entwickelte Nanosuspension von den Tieren nach Inhalation vertragen wurde. Die Studie hatte dabei Versuchscharakter, um erste Erkenntnisse zu gewinnen. Aus diesem Grund wurden die GLP-Richtlinien bei Durchführung der Studie nicht eingehalten. Die Studie wurde jedoch unter Einhaltung der nationalen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

5.16.1 Durchführung der Versuche

Für die Versuche wurden zwei Chargen der entwickelten Nanosuspension verwendet. Die erste untersuchte Charge hatte einen Feststoffanteil von 10% Itraconazol und 1,4% Polysorbat 80. Bei der zweiten Charge wurde der Anteil von Polysorbat 80 bei gleichem Wirkstoffanteil auf 5% erhöht, um die Auswirkungen einer hohen Tensidbelastung auf das Lungenepithel untersuchen zu können. Des Weiteren wurden die Vehikel der Suspensionen ohne Arzneistoff ebenfalls untersucht, um Rückschlüsse auf den Einfluss des Arzneistoffes ziehen zu können. Die Chargen wurden unter Verwendung von Polystyrol-Mahlkörpern wie in Abschnitt 3.4 beschrieben hergestellt.

5.16.2 Inhalationsprozedur

Für die Inhalation wurde die Ratte in eine spezielle Inhalationskammer gesetzt (Abbildung 5.16-1). Diese besteht aus einer zylindrischen Kammer mit einem Durchmesser von 14 cm und einer Länge von 28 cm. Die Kammer verfügt über einen planen Boden und hat an den Enden

einen konischen Ein- und Auslass. Am Einlass der Kammer wurde ein Schlauch mit einem Durchmesser von 22 mm und einer Länge von 15 cm angeschlossen. An der anderen Seite des Schlauches erfolgte der Anschluss des Verneblers. Am Auslass der Kammer wurde ebenfalls ein Schlauch mit einem Durchmesser von 22 mm befestigt, der an eine Absaugung angeschlossen wurde, um eine Belastung des Arbeitsplatzes zu verhindern. Dies ermöglichte eine schnelle Füllung der Kammer nach Einschalten des Verneblers und eine gute Verteilung des Aerosols in der Kammer. Zur Inhalation wurde die zu vernebelnde Suspension oder Vehikel-Lösung in das Reservoir des Verneblers gefüllt. Für eine Verneblungszeit von 30 Minuten wurden 5 ml, bei einer Verneblungszeit von 45 Minuten 7,5 ml verwendet. Das Tier, oder in den meisten Fällen zwei Tiere, wurden vor Versuchsbeginn mit dem Kopf in Richtung des Einlasses in die Kammer gesetzt. Bevor mit der Verneblung begonnen wurde, wurde den Tieren eine Zeitspanne von 5 Minuten zur Akklimatisierung in der Kammer gegeben. Anschließend wurde die Verneblung begonnen und nach vollständiger Füllung der Inhalationskammer mit dem Aerosol die Zeitmessung gestartet. Die Tiere wurden während der gesamten Verneblungszeit beobachtet, um Änderungen des Verhaltens feststellen zu können. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Tiere dem Aerosol vollständig ausgesetzt waren und z.B. ihre Nase nicht im Fell versteckten. Nach Beendigung des Versuches wurden die Tiere nach 2, 4 und 24 Stunden erneut auf ihr Verhalten beobachtet.

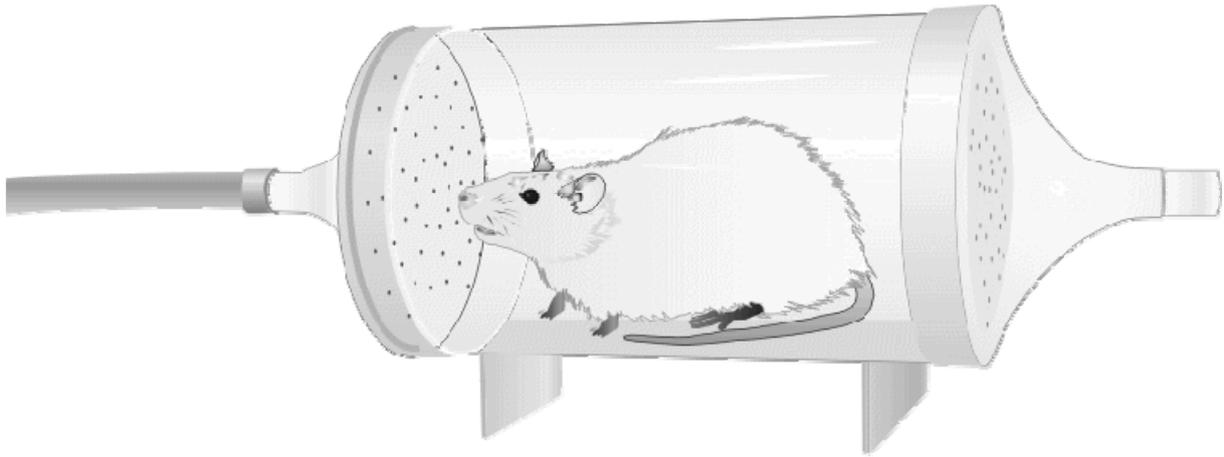


Abbildung 5.16-1: Darstellung der verwendeten Inhalationskammer mit Laborratte

5.16.3 Entnahme der Lungen und Pathohistologie

Um die Lungen der Tiere nach Durchführung der Versuche histologisch untersuchen zu können, wurden diese vorsichtig entnommen. Dazu wurden die Ratten mit Hilfe von 360 mg/kg i.p. Chloralhydrat in eine tiefe Narkose versetzt. Anschließend wurde die Bauchdecke geöffnet und die Ratten durch Öffnen der abdominalen Aorta ausbluten gelassen. Dann wurde der Brustkorb geöffnet und die Lungen vorsichtig heraus präpariert. Die entnommenen Lungen wurden umgehend unter Zuhilfenahme einer 5 ml Spritze mit aufgesetzter Injektionsnadel mit einer 4%igen Formaldehyd-Lösung in Phosphatpuffer befüllt. Anschließend wurden sie in derselben Lösung eingelegt. Nach 24 Stunden wurde die Formaldehyd-Lösung einmal ausgewechselt.

Zur histologischen Untersuchung wurden die ganzen Lungen zum Pathologen gegeben. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und es wurden mikrotome Schnitte verschiedener Bereiche der Lunge angefertigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Carina, die Trennung der Luftröhre in die beiden Hauptbronchien, der obere Respirationstrakt sowie alle Lungenlappen in den Untersuchungen berücksichtigt wurden. Die Schnitte wurden vor Ort vom Pathologen beurteilt. Außerdem

wurden Schnitte zur weiteren Untersuchung an die auf Lungentoxizitätsuntersuchungen spezialisierte Firma RCC Ltd. in der Schweiz geschickt.

5.16.4 Tolerabilität nach einmaliger Anwendung

Die Tiere dieser Gruppe wurden einer einmaligen Verneblung des Aerosols ausgesetzt. Die Beobachtungen, die für die einzelnen Versuchstiere gemacht wurden, sind in Tabelle 5.16-1 aufgeführt.

Ratte Nr. 1 wurde dem reinen Vehikel aus 1,4% Polysorbat 80 und Wasser über einen Zeitraum von 30 Minuten ausgesetzt. Die Ratten Nr. 4 & 5 wurden der reinen Vehikel-Lösung mit 10% Polysorbat 80 über einen Zeitraum von 45 Minuten ausgesetzt. Die Ratten Nr. 6 & 7 wurden dem Aerosol der Charge mit 1,4% Polysorbat 80 und 10% Itraconazol über einen Zeitraum von 30 Min. ausgesetzt.

Die Ratten Nr. 8 & 9 wurden dem Aerosol der Charge mit einer auf 5% erhöhten Konzentration von Polysorbat 80 und 10% Itraconazol über einen Zeitraum von 30 Min. ausgesetzt.

Alle Laborratten standen über einen Zeitraum von 22 bis 25 Stunden nach Durchführung des Versuches unter Beobachtung. Es konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden und die Tiere waren in guter Verfassung.

Tabelle 5.16-1: Parameter der Versuche bei einmaliger Inhalationsprozedur

Ratte Nr.	Körpergewicht	Polysorbat 80	Itraconazol	Inhalationszeitraum
1	178 g	1,4%	-	30 Minuten
4	176 g	5%	-	45 Minuten
5	176 g	5%	-	45 Minuten
6	177 g	1,4%	10%	30 Minuten
7	172 g	1,4%	10%	30 Minuten
8	167 g	5%	10%	30 Minuten
9	170 g	5%	10%	30 Minuten

Ratte Nr.	Beobachtungen während der Verneblung	Beobachtungen nach der Verneblung
1	Keine Abnormalität; lecken, sich putzen, das Fell säubern, Ablecken der Kammerwandung	Keine Abnormalitäten nach 2, 4, und 24 Stunden oder bei der Sektion
4	Keine Abnormalität, sich putzen, das Fell säubern (zeitweilig intensiv), nach 2,5 Min. ein Kopfzucken.	Keine Abnormalitäten nach 2, 4, and 24 Stunden oder bei der Sektion
5	Keine Abnormalität, nach 5 Min ein schütteln des Kopfes, sich putzen, ablecken, kauen, auf Ratte Nr. 4 steigen	Keine Abnormalitäten nach 2, 4, and 24 Stunden oder bei der Sektion
6	Die Ratte untersuchte die Kammer. Nach 6 min, wiederholtes schütteln des Kopfes, lecken des Mauls und intensives Putzen. Beim Herausnehmen, keine Abnormalität.	Keine Abnormalitäten nach 2, 4, and 24 Stunden oder bei der Sektion
7	Die Ratte sucht umher, anschließend ist sie ruhig und unauffällig. Keine Abnormalität beim Herausnehmen.	Keine Abnormalitäten nach 2, 4, and 24 Stunden oder bei der Sektion
8	Keine Abnormalität, sich Putzen, Herumsuchen, oder ruhiges Herumsitzen. Beim Herausnehmen, wurden weiße Arzneistoffrückstände rund um die Nase festgestellt.	Keine Abnormalitäten nach 2, 4, and 24 Stunden oder bei der Sektion
9	Die Ratte ist erst sehr ruhig, anschließendes Herumsuchen, nach 13 Min wurde eine rote Nase festgestellt (Chromodakryorrhoe), Ratte putzt sich. Beim Herausnehmen, wurden weiße Arzneistoffrückstände rund um die Nase festgestellt.	Keine Abnormalitäten nach 2, 4, and 24 Stunden oder bei der Sektion

5.16.5 Tolerabilität nach mehrmaliger Anwendung

Bei der zweiten Versuchsgruppe wurden die Tiere über einen Zeitraum von 7 Tagen einer täglichen Inhalation ausgesetzt. Der Zeitraum der Verneblung betrug dabei jeweils 30 Minuten. Die beiden Tiere Nr. 2 und 3 wurden der reinen Vehikel-Lösung mit 1,4% Polysorbat 80 über einen Zeitraum von 7 Tagen einmal täglich für eine Dauer von 30 Minuten ausgesetzt. Am ersten Tag wurde die Inhalationszeit auf 45 Minuten erhöht.

Die Ratten Nr. 10 und 11 wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen einmal täglich für 30 Minuten der vernebelten Nanosuspension mit 1,4% Polysorbat 80 und 10% Itraconazol ausgesetzt.

Die Ratten Nr. 12 und 13 dienten zur Luftkontrolle und wurden weder Arzneistoff- noch Vehikel-Lösung ausgesetzt.

Die Beobachtungen, die für die einzelnen Versuchstiere gemacht wurden, sind in Tabelle 5.16-2 aufgeführt.

Bei einigen Tieren wurde während der Verneblungsdauer eine Chromodakryorrhoe beobachtet, die auch als „Rote Träne“ bezeichnet wird. Bei einer schwachen Ausprägung sind im Bereich des Augenwinkels und der Nasenöffnungen Ablagerungen eines braunroten Sekretes festzustellen. Je nach Schwere kann es dabei zu schwer ablösbaren Verkrustungen und einem Verkleben der Augenlider kommen. Die Chromodakryorrhoe ist keine eigenständige Erkrankung, sondern kann bei Stress der Tiere, der durch die Haltung oder aufgrund der ungewohnten Situation in der Verneblungskammer hervorgerufen wird, sowie einigen anderen Ursachen auftreten. Die Symptome sind für die Tiere jedoch ungefährlich und hatten keine Auswirkungen auf die Versuchsdurchführung.

Tabelle 5.16-2: Parameter der Versuche bei mehrmaliger Inhalationsprozedur

Ratte Nr.	Körpergewicht	Polysorbat 80	Itraconazol	Inhalationszeit	
				1. Tag	2.-7. Tag
2	168	1,4%	-	45 Min.	30 Min.
3	176	1,4%	-	45 Min.	30 Min.
10	180	1,4%	10%	30 Min.	30 Min.
11	175	1,4%	10%	30 Min.	30 Min.
12		-	-		
13		-	-		

Ratte Nr.	Beobachtungen während der Verneblung	Beobachtungen nach Sektion
2	An 3 von 7 Tagen konnte eine Chromodakryorrhoe beobachtet werden.	keine Auffälligkeiten
3	An 6 von 7 Tagen konnte eine Chromodakryorrhoe beobachtet werden	keine Auffälligkeiten
10	An 6 von 7 Tagen konnte Chromodakryorrhoe beobachtet werden. Nach der Entnahme aus der Kammer konnten weiße Rückstände um die Nasenlöcher beobachtet werden	keine Auffälligkeiten
11	An 3 von 7 Tagen konnte Chromodakryorrhoe beobachtet werden. Nach der Entnahme aus der Kammer konnten weiße Rückstände um die Nasenlöcher beobachtet werden	keine Auffälligkeiten
12	keine Auffälligkeiten	keine Auffälligkeiten
13	keine Auffälligkeiten	keine Auffälligkeiten

5.16.6 Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchungen

Die Untersuchungen wurden durchgeführt, um einen ersten Einblick in die Tolerabilität von inhalativ appliziertem Itraconazol und dem verwendeten Hilfsstoff Polysorbat 80 zu gewinnen. In den Einzeldosis-Versuchen wurde die Verträglichkeit von zwei unterschiedlichen Formulierungen mit 1,4% und 5% Polysorbat 80 verglichen. Trotz der hohen Konzentration von 5% Polysorbat 80 konnten keine Unterschiede in der Verträglichkeit festgestellt werden.

Beim Verhalten der Tiere zeigten sich in allen Gruppen keine Auffälligkeiten. Auch bei der pathologischen Untersuchung des Lungengewebes wurden keine Besonderheiten festgestellt. Bei den histologischen Untersuchungen wurden alle drei Gruppen von Ratten untersucht. Dabei konnte in keiner Gruppe eine Schädigung der Schleimhaut festgestellt werden. Auch wurden keine Rückstände der Formulierungen in den Lungen gefunden und es konnten keine lokalen Reizungen des Gewebes und insbesondere keine Reizungen, die auf die inhalierte Formulierung zurückzuführen sind, festgestellt werden. Eine geringfügige Infiltration von Granulozyten und Lymphozyten wurde bei allen drei Versuchsgruppen gefunden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um normale Veränderungen handelt. Die beobachteten Veränderungen des Lungengewebes haben somit keine pathologische Relevanz und liegen innerhalb des normalen Spektrums für Ratten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die inhalative Applikation der Itraconazol Nanosuspensionsformulierungen von den Tieren gut vertragen wurde. Die verwendete Menge Polysorbat 80 von 1,4% absolut, bzw. 14% in Relation zur Feststoffmenge und auch die hohe Konzentration von 5% (absolut) hatten keinen Effekt auf die Schleimhäute oder das Gewebe in den Lungen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung einer Nanosuspensionsformulierung zur inhalativen Anwendung mit dem schwerlöslichen Antimykotikum Itraconazol untersucht. Viele der neu entwickelten pharmazeutischen Wirkstoffe sind nach der Arzneibuchdefinition als schwerlöslich, sehr schwer löslich oder gar praktisch unlöslich einzuteilen. Das bedingt in der Praxis häufig Probleme in der Bioverfügbarkeit und stellt eine große Herausforderung für die Galenik dar. Die Herstellung der Nanosuspensionen erfolgte dabei mit einem top-down Verfahren in einer Rührwerkskugelmühle. Mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung wurden in ersten Versuchen die Mühlenparameter evaluiert. Dabei konnte für die Feststoffe Cholesterol und Itraconazol gezeigt werden, dass sowohl die Partikelgröße als auch der Polydispersitätsindex eine signifikante Abhängigkeit von den Parametern Mahldauer und Drehzahl des Mahlrotors zeigen. Ein signifikanter Einfluss der untersuchten Konzentrationen des Feststoffes und des Hilfsstoffes Polysorbat 80 ließ sich hingegen nicht erkennen.

Da mit abnehmender Partikelgröße eine starke Oberflächenzunahme erfolgt und die Partikel zur Agglomeration neigen, muss der Suspension ein geeigneter Stabilisator zugesetzt werden. Daher wurde für eine Versuchsreihe mit Polysorbat 80, Solutol HS 15 und Poloxamer 188 drei geeignete Hilfsstoffe ausgewählt und der optimale Stabilisator für die Nanosuspensionsformulierung ermittelt. An den Ergebnissen wird die Abhängigkeit der Partikelgröße vom verwendeten Stabilisator deutlich. Polysorbat 80 erbrachte in allen verwendeten Konzentrationen eine ausreichende Stabilisierung der Partikel in der Suspension, was auf eine ausreichende Geschwindigkeit des Stabilisators bei der Besetzung der bei der Mahlung entstehenden neuen Grenzflächen schließen lässt. Für die weitere Durchführung der Versuche, wurde daher Polysorbat 80

verwendet. Um die optimale Konzentration des Stabilisators zu ermitteln, wurden weitere Untersuchungen mit Polysorbat 80 durchgeführt. Der Zusatz des Stabilisators wurde so weit verringert, dass es zu einer Agglomeration der Partikel kam und somit die Grenze des Stabilisatorzusatzes ermittelt werden konnte. Die Beobachtungen dieser Versuchsreihe zeigten deutlich, dass die untere Grenze bei einer Konzentration von 14% Polysorbat 80 bezogen auf den Feststoffanteil liegt. Dies entspricht bei einer Feststoffkonzentration von 5% einer absoluten Konzentration von 0,7% (m/m) und 1,4% (m/m) bei 10% Feststoff. Bei einer Erniedrigung des Stabilisatorzusatzes unter diese Grenze kam es zu einer deutlichen Agglomeration der Partikel. Des Weiteren wurde versucht, den Zusatz an Polysorbat 80 durch eine Kombination mit weiteren Hilfsstoffen weiter zu verringern. Dies zeigte jedoch weder bei Zusatz von Poloxamer 188, noch in Kombination mit PEG 400 einen Erfolg. Bei hohen Konzentrationen PEG 400 zeigte sich jedoch eine schlechtere Zerkleinerungswirkung der Partikel, was auf eine Besetzung der Partikeloberflächen durch das Makromolekül, bei der die Partikel an der Zerkleinerung gehindert werden, oder auf einen leichten Anstieg der Viskosität zurückzuführen sein kann.

Auch der Einfluss verschiedener Mahlkörper auf das Mahlergebnis wurde untersucht. Zum Einsatz kamen zwei Chargen Mahlperlen aus Zirkonoxid-Keramik, die mit Cer bzw. Yttrium stabilisiert waren und zwei Chargen Polymermahlkörper aus Polycarbonat bzw. Polystyrol. Die verwendeten Polymer-Mahlkörper zeigten gegenüber den Keramik-Mahlkörpern eine bessere Zerkleinerungswirkung, was auf eine bessere Verwirbelung der Mahlkörper in der Mahlkammer zurückzuführen ist. Vor allem bei den Mahlperlen aus Polystyrol zeigte sich eine sehr gute Zerkleinerungswirkung. Anhand dieser wurde auch der Einfluss der Größe der Mahlperlen auf die Zerkleinerungswirkung

untersucht. Dazu wurden aus den vorhandenen Mahlperlen vier Fraktionen zwischen 355 µm und >900 µm gebildet und diese im Mahlprozess auf ihre Zerkleinerungswirkung untersucht. Es zeigte sich eine Verschlechterung des Mahlerfolgs mit zunehmender Größe der Mahlperlen, wobei die Fraktionen bis zu einer Größe 900 µm vergleichbare Ergebnisse lieferten. Darüber zeigte sich jedoch eine deutlich geringere Zerkleinerungswirkung der Mahlperlen. Weiterhin wurden zwei Nanosuspensions-Chargen auf Verunreinigung durch Mahlabrieb untersucht. Dabei wurde der Einfluss bei Verwendung von Polystyrol-Mahlkörpern mit Zirkonoxid-Mahlkörpern verglichen, wobei für letztere ein deutlich höherer Abrieb festgestellt wurde.

Zur Untersuchung der Nanosuspensionen hinsichtlich ihrer Lagerstabilität konnte gezeigt werden, dass eine Lagerung bei Kühlschranktemperatur zu keinem deutlichen Anstieg der Partikelgröße führt und die Suspensionen somit als stabil zu bezeichnen waren. Zur Sterilisation der Nanosuspensionen war eine Autoklavierung nicht möglich, da es zu einer Sedimentation aller untersuchten Suspensionen kam. Die Sedimente waren teilweise stark verfestigt und konnten nicht redispergiert werden. Daher wurden die Formulierungen auch auf einen temperaturbedingten Anstieg der Viskosität hin untersucht. Es konnte eine Erhöhung der Viskosität bei steigenden Temperaturen nachgewiesen werden. Da die Suspensionen nicht autoklavierbar waren, wurde der Effekt einer Keimzahlreduktion des Mahlverfahrens untersucht. Dabei konnte anhand einer definierten Keimzahl gezeigt werden, dass es während des Mahlprozesses zu einer starken Reduktion der Keimzahl in der Suspension kommt. Schließlich wurden die Vernebelbarkeit der Nanosuspensionen unter Zuhilfenahme handelsüblicher Vernebler und die Verträglichkeit der Formulierung im Tierversuch getestet. Die Bestimmung der Aerosol-Tröpfchengröße

lieferte bei Nanosuspensionen bis zu 20% Feststoff sehr gute Ergebnisse. Ein Unterschied zu der Vernebelung wässriger Lösungen ließ sich nicht erkennen. Bei der histologischen Untersuchung des Lungengewebes bei den Tierversuchen konnten keine Veränderungen, die durch die Applikation der Nanosuspension hervorgerufen wurden, festgestellt werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Herstellung einer Nanosuspensionsformulierung im wässrigem Medium mit Hilfe einer Rührwerkskugelmühle möglich ist. Die untersuchten Suspensionen haben einen optimierten Stabilisatorzusatz von 14% in Relation zur Feststoffmenge und waren lagerstabil. Außerdem ließen sie sich auch bei hohen Feststoffkonzentrationen in ein Aerosol überführen und zeigten eine enge Tröpfchengrößenverteilung. Eine Verunreinigung der Suspensionen durch einen Abrieb der Mahlkörper und der Mühlenbauteile konnte durch die Verwendung von Polystyrol-Mahlkörpern zudem deutlich reduziert werden.

7 Abstract (english version)

In this work, the development of a nanosuspension formulation of the antifungal agent Itraconazole is described. The formulation should be developed for pulmonal administration. Many new active pharmaceutical ingredients have hardly soluble or insoluble in aqueous media according to the pharmacopoeia definition. In practice, this often results in huge variations in bioavailability and is a big challenge for formulation scientists. The formulation of poorly soluble drug substances as nanosuspension is regarded a promising alternative.

The production of the nanosuspension was performed as top-down-process with the use of a stirred media mill. The determination of basic milling parameters with cholesterol as model drug showed a significant dependency of particle size and polydispersity index on milling time and rotor speed and could be verified with the antifungal Itraconazole. As the particle surface increases dramatically with decreasing particle size and the particles tend to agglomerate, the addition of a suitable stabiliser is mandatory in nanosuspension formulations. For this purpose, three additives with low toxicity have been chosen for the determination of the ideal stabiliser. These were polysorbate 80, poloxamer 188 and Macrogol 15 hydroxystearate (solutol HS15). The best results were obtained with polysorbate 80 in preliminary experiments, therefore, this excipient was used for all further experiments. In order to limit the concentration of surfactant additive, experiments to determine the minimum concentration have been carried out, which showed a lower limit of 14% stabiliser calculated on the dry matter content. Furthermore, it has been tried to further minimise the amount by a combination of polysorbate 80 with another additive like PEG 400, but the results showed a decrease in milling efficiency due to the polymer covering the particle surface and with this protecting from milling wear. For milling in a

stirred media mill, different milling beads can be used, which have different characteristics. In this work, four different grinding media have used to determine their effect on milling success. These were two polymeric grinding media made from polystyrene and polycarbonate, respectively, and two batches of ceramic beads stabilised with Cerium or Yttrium, respectively. It could be shown, that the polymeric beads had a better comminution efficiency, which is believed to be due to the lower density resulting in a higher swirling of the beads in the milling chamber. A comparison of different bead sizes of polystyrene beads showed a better milling efficacy for smaller sieve fractions of these beads. Another important parameter apart from the milling effect is the pollution of the product with grinding wear/abrasion from the grinding beads and the mill parts. Therefore, the abrasion of two different batches has been analysed with inductive coupled plasma (ICP). One batch has been milled with ceramic beads stabilised with Cerium, whereas the other has been milled with polystyrene beads. The detected abrasion in the nanosuspension formulation was significantly higher with the use of ceramic beads, which thus do not seem to be useful for preparation of pharmaceutical nanosuspensions.

The developed nanosuspension does not show particle growth during 3 month storage in the refrigerator (8°C), whereas elevated temperatures are not well tolerated. Especially a sterilisation step like autoclaving resulted in a very heavy sedimentation, which is irreversible. Therefore, it has been tested, whether the preparation process itself can be used for reduction of the microbial count. For this, special batches with a predetermined number of germs have been prepared, which were milled subsequently. Over the milling time, samples were taken and tested microbially in order to follow the microbial count. It could be shown, that the milling process itself can diminish the microbial count significantly. In

order to verify a possible administration to the lung, the nanosuspension has been tested for its nebulisation ability. The formulations with a dry matter content up to 20% (w/w) can be nebulised with the use of ultrasonic or membrane nebulisers, the resulting aerosols show a fine particle distribution as needed for pulmonary delivery. A tolerability test has been performed with rats inhaling the Itraconazole nanosuspension as well as pure dispersion media with stabiliser. The formulation was well tolerated and the histo-pathological examination of the lung tissue showed no changes. In summary, it could be shown that the preparation of an aqueous nanosuspension of Intraconazole is possible with the use of a stirred media mill. The formulation may have a high dry matter content of up to 20% with a good stability and is capable of being nebulised.

8 Anhang

8.1 Geräte

Rührwerkskugelmühle

Labormühle Dispermat SL-C 5

VMA Getzmann GmbH, Reichshof, Deutschland

Kapillarviskosimeter Schott AVS 350

Wasserbad CT 1450

Temperiereinheit CK 100

Software WinVisco 2.0

Photonenkorrelationsspektroskopie & Zetapotential

Zetasizer Nano ZS

Malvern Instruments, Malvern, England

Digitales Lichtmikroskop Keyence VHX-500

Steuereinheit: VHX S 15

Optiken: VH-Z20 20-200fache Vergrößerung

 VH-Z500 500-5000fache Vergrößerung

Anhang

Analysenwaage	Sartorius A200S Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Mikrowaagen	Satorius 4501 micro Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Mettler AT106 comparator Mettler –Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
pH-Meter	pH 540 GLP WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
REM	XL 20 Philips Electronics, Eindhoven, Niederlande DSM 940 und S 240 Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Sputter Coater	SCD 005 Bal-Tec AG, Balzers, Lichtenstein
Trockenschrank	Heraeus T6 Kendro Lab. Products GmbH, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 106 Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Ultra-Turrax	Ultra Turrax T25 basic Ika-Werke GmbH & Co KG
Reinstwassersystem	SeralPur Delta Seral Reinstwassersysteme, Ransbach- Baumbach, Deutschland
Siebturm	Retsch Vibrotronic VE1 Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Schlauchpumpe	Watson Marlow W505Di Watson Marlow, Cheltenham, England

Laborschüttler	Typ A1 Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Glasvials	Aerosol Dome 15 ml Saint-Gobain Kipfenberg, Kipfenberg, Deutschland

8.2 verwendete Software

Die Erstellung der statistischen Versuchspläne erfolgte mit dem Programm Statistica 6.0 der Firma Statsoft (Statsoft Inc., Tulsa, USA)

8.3 Tierversuche

8.3.1 verwendete Materialien:

Chloralhydrat	POCH, Gliwice, Polen
Phosphatpuffer	Bestandteile von POCH, Gliwice, Polen
Formaldehyd	POCH, Gliwice, Polen

8.3.2 verwendete Tiere

Spezies:	Ratte
Art:	Wistar
Geschlecht	männlich
Gewicht:	160-180 g
Züchter:	Labortierzucht Gorzkowska, Warschau, Polen
Tierhaltung:	in Gruppen von 3-4 Tieren in Macrolon-Käfigen
Beleuchtung:	12 Stunden hell-dunkel Zyklus
Raum Temperatur	20 - 24°C
Raumfeuchte:	40 - 70%
Futter:	Pellets, (Agropol S.j., Motycz, Polen) Futter und Trinkwasser waren frei verfügbar.
Laborbedingungen:	kontrollierte Raumbedingungen

8.4 Verwendete Arznei- und Hilfsstoffe

Itraconazol	Revive Impex, Hyderabad, Indien
Cholesterol	Fagron GmbH, Barsbüttel
Poloxamer 188	Fagron GmbH, Barsbüttel
Polyethylenglykol 400	BASF AG, Ludwigshafen
Polysorbat 80	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Solutol HS 15	BASF AG, Ludwigshafen
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Holland

9 Literaturverzeichnis

Europäisches Arzneibuch - Monographien A - Z, 5. Ausg.; Europäisches Arzneibuch; Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart 2005, Bd. 2

Bauer, K. H., Frömming, K.-H., Führer, C., Engermann, H., Eds. Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie; WVG Stuttgart 1999

Bernhard, Frank, Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit von Laktose auf die Inhalationseigenschaften interaktiver Pulvermischungen; Christian-Albrechts-Universität Kiel (2006)

Beule, K. de und van Gestel, J., Pharmacology of Itraconazole. Drugs (2001), 61 Suppl 127–37

Bracher, F., Angriffspunkt Ergosterolbiosynthese. Wirkstoffe und Wirkprinzipien. Pharmazie in unserer Zeit (2003), 32 (2) 118–123

Neues Rezeptur-Formularium (NRF) Bd. 2. Deutscher Arzneimittel-Codex 1986, Bd. 5

Byron, P. R., Prediction of drug residence times in regions of the human respiratory tract following aerosol inhalation. J Pharm Sci (1986), 75 (5) 433–438

Chiller, T. M. und Stevens, D. A., Treatment strategies for Aspergillus infections. Drug Resist Updat (2000), 3 (2) 89–97

Conway, S. P., Etherington, C., Peckham, D. G., Brownlee, K. G., Whitehead, A. und Cunliffe, H., Pharmacokinetics and safety of itraconazole in patients with cystic fibrosis. The Journal of antimicrobial chemotherapy (2004), 53 (5) 841–847

Denning, David W., Homei, Aya und Worboys, Mick, Aspergillosis in USA, UK and Japan in the 20th century. In 2nd advances against aspergillosis, pp 22–23

Duro, R., Gomez-Amoza, J.L., Martinez-Pacheco, R, Souto, C. Concheiro, A., Adsorption of polysorbate 80 on pyrantel pamoate. Effects on suspension stability. *Int J Pharm* (1998) 165, 211-216

Folke Morén, Dosage forms and formulations for drug administration to the respiratory tract. *Drug Rev Ind Pharm* (1987) 13, 695-728

Gaumet, Marie, Vargas, Angelica, Gurny, Robert und Delie, Florence, Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* (2008), 69 (1) 1–9

Goetting, N., Fritz, H., Maler, M., von Stamm, J. und Bayer, E., Photonenkorrelationsspektroskopie als Verfahren zur Untersuchung der kolloidalen Stabilität von Nanopartikelsuspensionen - Die Verwendung kolloidaler Systeme im pharmazeutischen Bereich erfordert zuverlässige Informationen über deren kolloidale Stabilität in unterschiedlichen Medien. *G-I-T* (1998), 42 (3) 200–205

Hernandez-Trejo, N., Kayser, O., Steckel, H., Müller, R.H., Characterization of nebulized buparvaquone nanosuspensions – effect of nebulization technology. *J Drug Target* (2005) 13, 499-507

Horn, D. und Rieger, J., Organische Nanopartikel in wässriger Phase -- Theorie, Experiment und Anwendung. *Angewandte Chemie* (2001), 113 (23) 4460–4492

Hou, Tung-Hsu, Su, Chi-Hung und Liu, Wang-Lin, Parameters optimization of a nano-particle wet milling process using the Taguchi method, response surface method and genetic algorithm. *Powder technology* (2007), 173 (3) 153–162

Hu, J., Johnston, K. P.und Williams III, R. O., Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble

drugs. Drug development and industrial pharmacy (2004), 30 (3) 233–245

Huhn, Christof. Asthma und Bronchitis, 3.th ed.; Ärztlicher Ratgeber; Wort & Bild Verlag: 2001

Hunnius, C., Ammon, H. P. T., Eds.: Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch, 9. neu bearb. und erw. Aufl.; de Gruyter: Berlin 2004

Inkyo, M, Tahara, T., Iwaki, T., Iskandar, F., Hogan, C.rJ.J., Okuyama, K., Experimental investigation of nanoparticle dispersion by beads milling with centrifugal bead separation. J colloid and interface science (2006) 304, 535-540

Jander, Gerhart, Blasius, Ewald, Strähle, Joachim, Schwund Jander-Blasius. Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum, 14., neu bearb. Aufl.; Hirzel: Stuttgart 1995

Juhnke, M.und Weichert, R., Nanoparticles of soft materials by high-energy milling at low temperatures. 7th World Congress of Chemical Engineering, 10.-14. Juli 2005, Glasgow, Scotland

Juhnke, Michael und Weichert, Reiner, Zerkleinerung weicher Materialien ohne Verunreinigung der Produkte durch die Mahlkörper. Chemie-Ingenieur-Technik (2005), 7790–95

Keck, C. M. und Müller, Rainer H., Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. Eur J Pharm Biopharm (2006), 62 (1) 3–16

Kesisoglou, Filippos, Panmai, Santipharp und Wu, Yunhui, Nanosizing--oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. Advanced drug delivery reviews (2007), 59 (7) 631–644

Kumar, R., Chugh, T. und Gaur, S.N., Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis - A review. *Indian J Allergy Asthma Immunol* (2003) (17(2)) 55–66

Langguth, Peter, Fricker, Gert und Wunderli-Allenspach, Heidi. *Biopharmazie*; Wiley-VCH: Weinheim 2004

Latgé, Jean-Paul, REVIEWS - *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* (1999), 12 (2) 310–350

Lindfors, L., Skantze, P., Skantze, U., Rasmusson, M., Zackrisson, A, Olsson, U., Amorphous drug nanosuspensions. 1. Inhibition of Ostwald-ripening. *Langmuir: ACS journal of surfaces and colloids* (2006) 22, 906-910

Lipp, H. P., Klinischer Einsatz von Antimykotika. Galenische Herausforderungen. *Pharmazie in unserer Zeit* (2003), 32 (2) 144–152

Liversidge, G. G., Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *International journal of pharmaceutics* (1995), 125 (1) 91–98

Lucks, J.S., Müller, B.W., Müller, R.H., Inorganic suspensions – interaction with salts and ionic surfactants. *Int J Pharm* (1990) 58, 229-235

Meier, J. und Dettli, L. *Biopharmazie. Arbeitstechniken der pharmazeutischen Industrie*; Thieme: Stuttgart 1981, Vol. 2

Mende, Stefan, Mechanische Erzeugung von Nanopartikeln in Rührwerkskugelmöhlen. Dissertation, Braunschweig (2004)

Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G. G.und Cooper, E. R., Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci* (2003), 18 (2) 113–120

Müller, R. H., Benita, S., Böhm, B. H., [Ed.], Emulsions and Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs; medpharm: 1998a

Müller, R. H., Hildebrand, G. E., Bauer, K. H., Eds.: Pharmazeutische Technologie moderne Arzneiformen; WVG: Stuttgart 1998b

Müller, Rainer H., Nitzsche, Rolf und Paulke, Bernd-R. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Paperback APV; Wiss. Verl.-Ges.: Stuttgart 1996, Vol. 37

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. und Schaefer-Korting, M. Arzneimittelwirkungen. WVG Stuttgart, 2001

Nitzsche, R., Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) - Partikelgrößenmessung im Submikron-Bereich. CLB Chemie in Labor und Biotechnik (1997a), 10/1997, 422–427

Nitzsche, Rolf, Zetapotential determination from electrophoretic mobility measurements. Technisches Messen ATM (1997b), 64 (3) 106–113

Patravale, V.V.B., Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. Journal of pharmacy and pharmacology (2004), 56 (7) 827–840

Pfeifer, S., Pffegler, P., Borchert, H.-H., Eds.: Biopharmazie; Ullstein Mosby: Berlin 1995

Pschyrembel, Willibald und Dornblüth, Otto. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 260., neu bearb. Aufl; de Gruyter: Berlin 2004

Rawle, A. und Nitzsche, R., PCS in 30 Minuten, Malvern Instruments, Herrenberg

Reif, Karl. Prophylaxe der invasiven pulmonalen Aspergillose durch dezentrale Luftreiniger mit HEPA-Filter, Konferenz Onkologischer Kranken- und Kinderkrankenpflege (KOK). Bremen, 2004

- Speiser, P. P. Nanopartikel. In Pharmazeutische Technologie moderner Arzneiformen: Lehrbuch für Studierende der Pharmazie, Nachschlagewerk für Apotheker in Offizin, Krankenhaus und Forschung. Müller, R. H., Hildebrand, G. E., Bauer, K. H., Eds. WVG: Stuttgart, 1998
- Stenger, Frank. Nanomilling in stirred media mills. *Chemical engineering science* (2005), 60 (16) 4557–4566
- Thews, Gerhard, Mutschler, Ernst, Vaupel, Peter und Thews-Mutschler-Vaupel. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 5., völlig neu bearb. und erw. Aufl.; WVG: Stuttgart 1999
- Vaughn, J.M., McConville, J.T., Burgess, D., Peters, J.I., Johnston, K.P., Talbert, R.L., Williams III, R.O., Single dose and multiple dose studies of itraconazole nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* (2006) 63, 95-102
- White, M D und Marcus, D, Disintegration of microorganisms. *Advances in biotechnological processes* (1988), 851–96
- Wichert, Goetz von und Wichert, Peter von, Möglichkeiten und Probleme der Applikation von systemisch wirksamen, höhermolekularen Wirkstoffen mittels Inhalation. *Medizinische Klinik* (2006), 101, 718–723
- Wild, Claudia. *Aspergillose*. Wien, 2004
- Wilson, Leslie S, Reyes, Carolina M, Stolpman, Michelle, Speckman, Julie, Allen, Karoline und Beney, Johnny, The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value in health: the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research* (2002), 5 (1) 26–34
- Zaspel, Uta. ROC-Studie zur Bedeutung klinischer und radiologischer Befunde für die Diagnose von Patienten mit HIV-assoziierter invasiver Lungenaspergillose. 2003

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den vier Jahren am Institut begleitet haben.

An erster Stelle steht dabei vor allem mein Betreuer Prof. Dr. Hartwig Steckel, der mir dieses hoch aktuelle und interessante Thema zur Bearbeitung überlassen hat und dem ich dafür ganz herzlich danken möchte. Des Weiteren möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. Müller für seine Arbeit für die Pharmazeutische Technologie danken, die uns allen erst ermöglicht hat, an so einem hervorragend ausgestatteten Institut zu arbeiten. Außerdem danke ich ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine nette und unkomplizierte Art.

Bei Herrn Dr. Rundfeldt und Herrn Dr. Schlichthaar möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir das bearbeitete Projekt ermöglichten und das Voranschreiten immer interessiert begleitet haben. Frau Prof. Dr. Karin Schwarz danke ich für die Übernahme meines Korreferats.

Meinen Einstand im Arbeitskreis hatte ich bereits als Diplomand, als der ich bereits sehr gut in die Runde aufgenommen wurde. Von meinen Kollegen ist dabei als erster wohl Günter zu nennen, der mich während meiner Diplomzeit betreut hat. Ihm danke ich für viele Gespräche, Anregungen und seine Freundschaft. Auch den anderen "Altkollegen", in deren Runde ich mich sehr wohl gefühlt habe, danke ich für die vielen Gespräche und die nette Aufnahme in den Arbeitskreis.

Allerdings gehört man schneller als man meint selbst zu den "Alten". Daher gibt es viele jüngere Kollegen, denen ich an dieser Stelle ebenfalls danken möchte. Thorsten und Regina danke ich für die vielen Stunden am REM und hoffe, dass auch andere Euren Einsatz zu schätzen wissen. Außerdem bot sich bei Gesprächen mit Thorsten immer ein interessanter Einblick in den aktuellen Spiele- und

Konsolenmarkt. Du solltest nur endlich einsehen, welcher Prozessor der bessere ist ☺. Meinen Praktikumskollegen Malte, Lars, Franz und Regina danke ich für die schöne Zeit auf den Stationen. Auch den anderen Kollegen, mit denen ich das Praktikum betreut habe, danke ich für die Zusammenarbeit. Christian möchte ich für seine unkomplizierte und freundliche Art danken. Dein Anfang im Institut war begleitet von einer Reihe neuer Geräte, an denen wir viel Zeit miteinander verbracht haben. Aber nicht nur deshalb war Dein Eintritt in den Arbeitskreis ein Gewinn für das Institut. Allen Kolleginnen und Kollegen wünsche ich viel Erfolg beim Abschluss der Promotion und alles Gute für die Zukunft.

Ein besonderer Dank gilt auch den Festangestellten – allen voran Rüdiger Smal, dessen Tür immer für ein Gespräch offen stand und der zu so vielem etwas zu erzählen weiß. Außerdem sei Dir für Deine Zeichenkünste gedankt, die meiner Arbeit einen besonderen Glanz verliehen haben – Du bist echt ein "krasser Typ", Rüdi. Dirk Böhme möchte ich für die Anfertigung von Teilen und die Reparatur von allem, was so kaputt ging, danken. Die geniale bauliche Umsetzung mancher Idee hat mir die Arbeit sehr erleichtert. Unseren TAs Regina, Nora, Simone, Hanna und Maren danke ich für die Hilfe bei HPLC-Projekten, den Bestellungen und die nette gemeinsame Zeit.

Natürlich möchte ich auch noch die Studenten erwähnen, die mich als „HiWi“ oder im Wahlpflichtfach sehr unterstützt haben. Jane Djamil und Astrid Wolf, Jasmin Merker und Nadine Ruth danke ich für ihre Hilfe und die Versuche, die sie im Zuge der Projektarbeit gemacht haben. Susanne Krehan möchte ich für die sehr gute Durchführung der letzten Versuche danken. Deine Mithilfe beim Abschluss meiner praktischen Arbeiten hat mir sehr geholfen und Dir hoffentlich auch Spaß gemacht. Ich hoffe, Ihr alle konntet durch Eure Mitarbeit einen guten Eindruck in

die Pharmazeutische Technologie gewinnen, der auch Euer wissenschaftliches Interesse geweckt hat.

Zu guter letzt möchte ich meiner Familie für Ihre Unterstützung während der Promotionszeit danken. Dabei sind vor allem meine Eltern zu nennen, denen ich für den Rückhalt während der letzten Jahre danke. Auch meiner Schwester Iris, Ingo und Ben, die immer für mich da waren und meinen Weg interessiert verfolgt haben möchte ich meinen Dank aussprechen. Mein größter Dank gilt Regina für die Geduld, die sie mir entgegengebracht hat. Mit ihrer Hilfe und Unterstützung lief vieles besser. Vielen Dank auch für die Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts während der Endphase unserer Arbeit. Es ist nicht ganz einfach, gemeinsam zu promovieren – aber wir haben es geschafft!

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §10 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und wurde bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Holger Scherließ