

4 Nanosuspensionen mit medizinischer Kohle zur Diagnostik

Nachdem im vorangegangenen Kapitel die Eigenschaften von kristallinen Nanosuspensionen untersucht wurden, sollte im Folgenden auf die Frage eingegangen werden, wie sich amorphe Substanzen während der Hochdruckhomogenisation verhalten. Es wäre denkbar, daß sich ein harter Kristall durch die einwirkenden Prallkräfte und Kavitation besser zerteilen läßt als ein amorphes Pulver, das keine klaren Bruchstellen liefert. Andererseits könnte auch im umgekehrten Fall eine problemlosere Zerteilung der ungeordneten Partikelstrukturen erfolgen.

Als Modellsubstanz wurden im Rahmen dieser Arbeit Kohlepartikel eingesetzt, da entsprechende Nanosuspensionen eine zusätzliche Verwendung im Bereich der Diagnostik erwarten lassen (vergleiche Kapitel 2.4.5.3). Somit könnte die Beantwortung grundlegender Fragen mit einem praktischen Nutzen verbunden werden.

4.1 Rezepturscreening

Im Rahmen dieses Rezepturscreenings sollte für eine weitgehend amorphe medizinische Kohle eine Formulierung zur Herstellung einer Nanosuspension entwickelt werden, bei der trotz der extremen Zerkleinerung der Partikel und der dadurch notwendigen Verwendung von amphiphilen Stabilisatoren die Sauerstoffempfindlichkeit und die ausgezeichneten ESR-Eigenschaften dieser Substanz erhalten bleiben.

4.1.1 Herstellung

Zuerst wurde die Kohle gemörsert und durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 200 µm gesiebt. Daraus wurden mehrere Stammsuspensionen hergestellt, wobei die sehr hydrophobe Kohle zur besseren Benetzung mit den verschiedenen Tensidlösungen angerieben und anschließend eine Minute mit dem Ultra-Turrax bei 9500 U/min dispergiert wurde. Jeder dieser Prämixe wurde nun zur Vorzerkleinerung mit dem Hochdruckhomogenisator Micron LAB 40 jeweils 2 Zyklen bei 150 bar und bei 500 bar homogenisiert, um zu verhindern, daß die bis zu 500 µm großen Kohlepartikel bei hohen Drücken sofort das Ventil blockieren. Nach dieser Vorhomogenisation waren die Partikel so weit aufgebrochen, daß sie jetzt, in der eigentlichen Homogenisation, bei 1500 bar über 10 Zyklen homogenisiert werden konnten.

4.1.2 Rezepturen

Zur Rezepturentwicklung wurden verschiedene Formulierungen mit unterschiedlichen Tensidkombinationen hergestellt. Dabei wurden sowohl binäre Mischungen aus ausschließlich sterisch stabilisierenden Tensiden verwendet als auch Kombinationen aus sterischen und elektrostatischen Stabilisatoren, um den Einfluß von deren chemischer Struktur auf die Sauerstoffempfindlichkeit der verwendeten Kohlepartikel zu untersuchen. Die Tabelle 4-1 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzungen der verschiedenen Rezepturen. Zum Vergleich wurde zusätzlich zu den in Tabelle 4-1 aufgeführten Rezepturen eine weitere Charge (oT) produziert, die lediglich reine Kohle in einer Konzentration von 2 % ohne den Zusatz jeglicher Stabilisatoren enthielt.

Tabelle 4-1: Zusammensetzung der verwendeten Screening-Rezepturen (alle Konzentrationen in % (m/m)).

Substanz	K3M 1	K3M 2	K3M 3	K3M4	K3M5	K3M6
med. Kohle	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Poloxamer 188				0,5	0,5	
Poloxamer 407						0,5
Polysorbat 80		0,5	0,5	0,5		0,5
Polyvinylalkohol	0,5		1,0			
SDS					0,5	
Kaliumoleat	0,5/1,0	1,0				

4.1.3 Partikelgrößen

Die einzelnen Partikelgrößen der verschiedenen Dispersionen wurden direkt nach der Produktion (d0) und sieben Tage später (d7) mittels Laserdiffraktometrie bestimmt.

Abbildung 4-1 zeigt die Ergebnisse der Messungen am Tag der Herstellung. Besonders auffällig war bei dieser Produktionsreihe das Ergebnis der Charge oT. Nach Behandlung mit dem Ultra-Turrax lagen 5 % der Partikel noch in einem Größenbereich von >120 µm, durch den Hochdruckhomogenisationsprozeß ließ sich dieser D95-Wert jedoch auf ca. ein Zehntel absenken. Daß sich die Kohlepartikel trotz der ausgeprägten Hydrophobie des Pulvers ohne Zusatz von Tensiden mittels Homogenisation in diesem Maße zerkleinern lassen, ohne bereits während der Produktion und Größenmessung zu aggregieren, war nicht zu erwarten gewesen. Die Instabilität dieses Zustandes deutete sich jedoch anhand des verhältnismäßig hohen LD-Durchmessers 99 % bereits an.

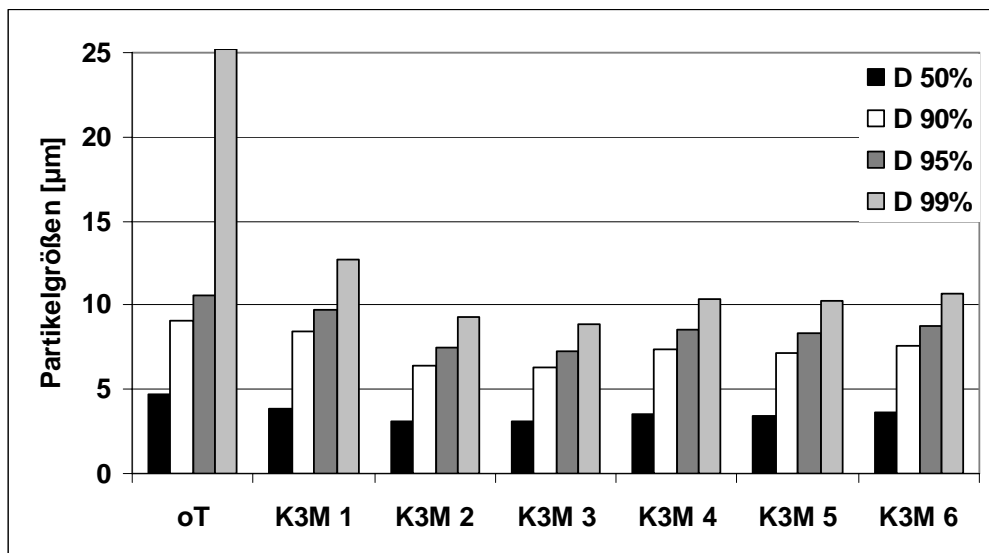


Abbildung 4-1: Partikelgrößen der verschiedenen Kohle-Rezepturen nach zehn Homogenisationszyklen bei 1500 bar, gemessen mittels Laserdiffraktometrie (LD) direkt nach der Produktion.

Er betrug für die Charge oT 25,3 µm, während der Durchschnitt bei allen anderen Rezepturen direkt nach der Produktion bei 10,2 µm lag, mit einem Maximalwert von 12,7 µm bei der Charge K3M 1 mit 0,5 % Kaliumoleat. Die erhöhte Aggregationsneigung dieser Formulierung war in einer zu geringen Tensidmenge begründet. Daher wurde eine weitere Charge produziert, bei welcher der Gehalt an Kaliumoleat auf 1 % angehoben wurde (vgl. Tabelle 4-1). Tatsächlich wurden mit der veränderten Rezeptur kleinere Partikelgrößen erreicht, so daß im weiteren Verlauf der Studie nur noch die höher konzentrierte Formulierung betrachtet wurde.

Es bleibt jedoch festzuhalten, daß bei keiner der untersuchten Dispersionen der mittlere Partikeldurchmesser durch 10 Zyklen bei 1500 bar in den Nanometerbereich abgesenkt werden konnte. Damit liegen diese Werte deutlich höher als die der Nifedipin- und ADA-Dispersionen nach der gleichen Behandlung. Diese Ergebnisse lassen folglich darauf schließen, daß sich eine amorphe Substanz nicht unbedingt besser zerkleinern läßt als diejenigen mit ausgeprägter Kristallstruktur.

Alle Formulierungen wurden nun über einen Zeitraum von sieben Tagen bei Raumtemperatur gelagert. Nach dieser Zeit zeigen sich zwischen den einzelnen Rezepturen deutliche Unterschiede (Abbildung 4-2).

Die Formulierung ohne Tenside war erwartungsgemäß vollständig aggregiert, so daß der Durchmesser der Hauptpopulation nun bei ca. 55 µm lag. Diese extreme Aggregationsneigung ist sicher in erster Linie durch die starke Hydrophobie der großen Partikeloberflächen zu erklären, die auf diesem Weg energetisch vorteilhaft verkleinert wird.

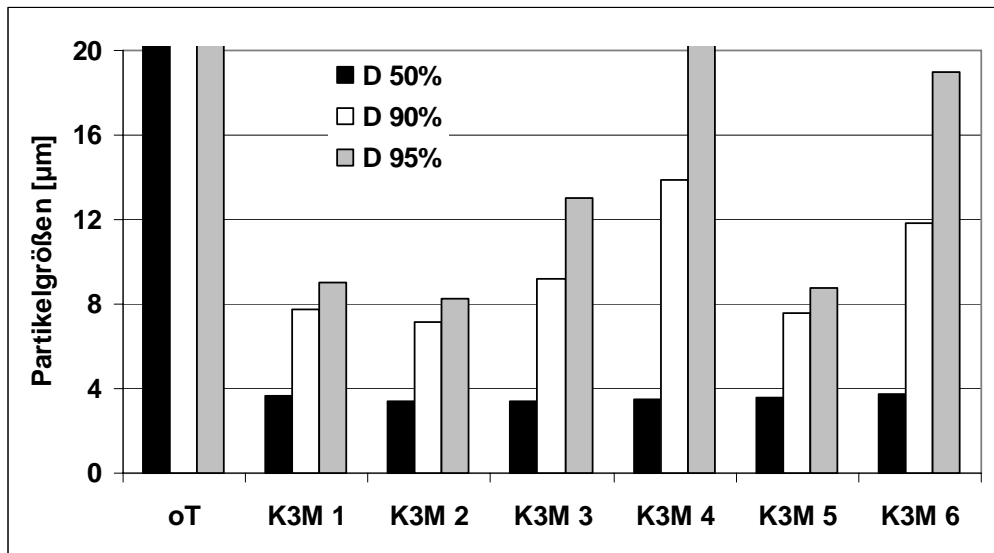


Abbildung 4-2: Partikelgrößen der verschiedenen Kohle-Rezepturen (Zyklus 10), gemessen mittels Laserdiffraktometrie (LD) nach 7 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur.

Aber auch die Rezepturen, die ausschließlich sterische Stabilisatoren enthielten (K3M 3, K3M 4, K3M 6) wiesen Stabilitätsprobleme auf. Zwei der drei Rezepturen (K3M 4, K3M 6) zeigten eine starke Aggregation der Partikel, bei der dritten (K3M 3) kam es lediglich zu einem leichten Anwachsen.

Im Gegensatz dazu traten bei den drei Rezepturen mit einer Mischung aus sterischen und elektrostatischen Stabilisatoren (K3M 1, K3M 2, K3M 5) nach der Lagerung lediglich geringfügige Veränderungen in der Partikelgröße im Vergleich zum Tag der Herstellung auf.

Eine mögliche Ursache für das Ergebnis dieses Rezepturscreenings ist die unterschiedliche Partikelladung der einzelnen Formulierungen. Um das zu untersuchen, wurde von allen Rezepturen das Zetapotential der Partikel in der jeweils verwendeten Tensidlösung bestimmt. Abbildung 4-3 zeigt, daß die ausschließlich sterisch stabilisierten Rezepturen mit der schlechtesten Stabilität auch das geringste Zetapotential besitzen. Der Wert der Charge K3M 3 liegt dagegen schon bei fast 30 mV, was auf eine mittlere Stabilität hindeutet. Die drei elektrostatisch stabilisierten Rezepturen weisen alle ein deutlich höheres Potential auf, so daß hier auch eine bessere Stabilität zu erwarten ist.

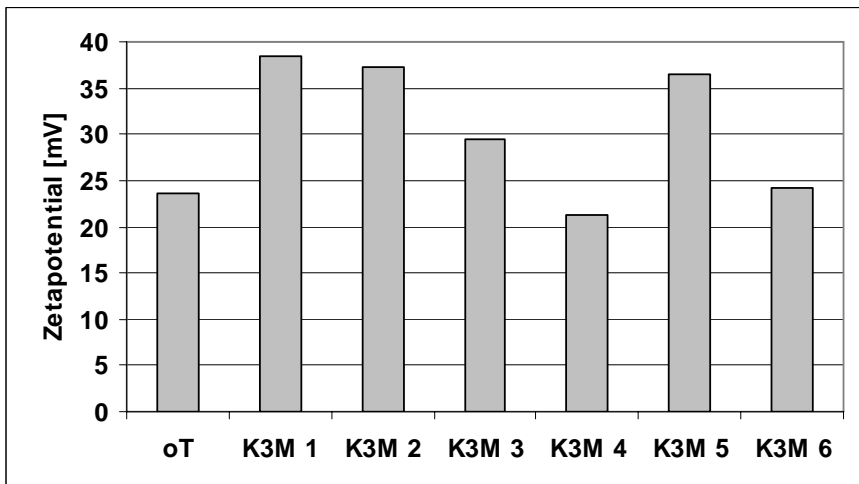


Abbildung 4-3: Betrag des Zetapotentials der verschiedenen Kohle-Rezepturen, gemessen im Dispersionsmedium mittels Laser-Doppler-Anemometrie (LDA).

4.2 Einfluß des Sauerstoffpartialdrucks auf das ESR-Signal

Eine weitere sehr wichtige Voraussetzung für die Verwendung der Kohlepartikel als ESR-Sensor zur Oximetrie ist neben der Partikelgröße und der physikalischen Stabilität der Dispersion die Empfindlichkeit der Zubereitung gegenüber Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes in ihrer Umgebung. Um diese zu ermitteln wurde von allen 7 Proben ein ESR-Spektrum unter normalen atmosphärischen Bedingungen aufgenommen. Um nun den Sauerstoffpartialdruck in den Dispersionen zu verringern, wurde über einen Zeitraum von 15 Minuten gasförmiger Stickstoff mit einer Flußrate von 50 ml/min durch die Proben geleitet und so ein Teil des im Dispersionsmedium gelösten Sauerstoffs verdrängt. Anschließend wurden die Vials sofort luftdicht verschlossen und erneut ein ESR-Spektrum der Proben aufgenommen.

Abbildung 4-4 zeigt, daß die Sauerstoffempfindlichkeit nicht bei allen Rezepturen gleich stark ausgeprägt war. Als Basis diente die Änderung der Linienbreite der oT-Charge, sie betrug 0,22 mT. Fast unbeeinflusst geblieben sind die Rezepturen K3M 2 (0,21 mT), K3M 3 (0,19 mT) und K3M 4 (0,21 mT). Bei den Chargen 3 und 4 handelt es sich um ausschließlich sterisch stabilisierte Dispersionen, Charge 2 enthält jedoch Kaliumoleat als ionisches Tensid. Ungefähr halbiert hat sich die Empfindlichkeit bei den Rezepturen K3M 1 (0,11 mT) und K3M 6 (0,09 mT), wobei es sich hier um eine gemischt stabilisierte und eine rein statisch stabilisierte Charge handelt. Ihre Sauer-

stoffempfindlichkeit fast gänzlich verloren hat Rezeptur K3M 5 (0,03 mT), bei der es sich auch wieder um eine gemischt stabilisierte Charge handelt.

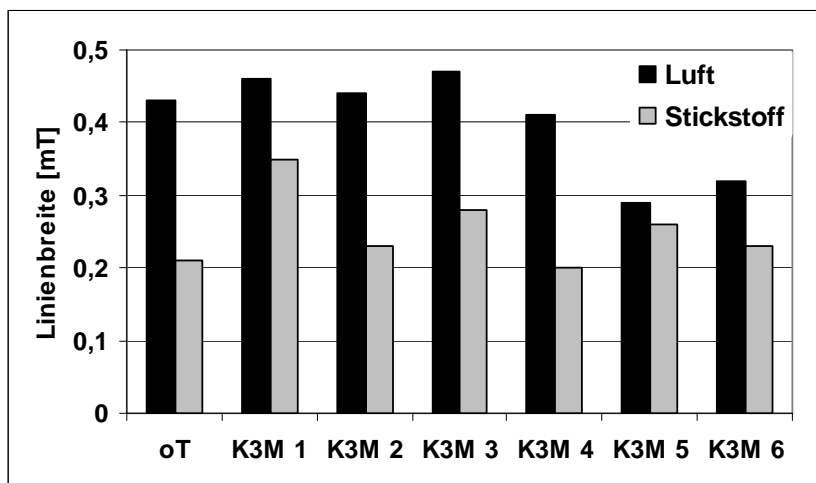


Abbildung 4-4: Vergleich der Linienbreite der ESR-Spektren der verschiedenen Rezepturen vor und nach Begasung mit Stickstoff über einen Zeitraum von 15 Minuten.

Wie bereits erwähnt, sind weder der Mechanismus der Reaktion des ESR-Signals auf den Sauerstoffpartialdruck noch die genauen Möglichkeiten ihrer Beeinflussung bisher genau bekannt. Anhand dieser Versuchsreihe wird klar, daß weder die Oberflächenladung noch die Partikelgröße dabei eine entscheidende Rolle spielen. Vergleicht man die Ergebnisse aus Abbildung 4-4 mit denen aus Abbildung 4-3 so läßt sich kein Zusammenhang zwischen dem Zetapotential der Dispersionen und der Sauerstoffempfindlichkeit erkennen. Das bedeutet allerdings auch, daß bei der Entwicklung von Rezepturen für Nanosuspensionen mit Kohlepartikeln die Möglichkeit der Stabilisierung auf elektrostatischem Wege nicht von vornherein ausgeschlossen werden muß. Der Einsatz der verschiedenen Tenside muß von Fall zu Fall geprüft werden.

Zur weiteren Untersuchung wurden aus den untersuchten Formulierungen zwei ausgewählt, nämlich K3M 2 und K3M 3, da sich diese beiden in der Kombination aus Stabilität und Sauerstoffempfindlichkeit als diejenigen mit dem größten Potential erwiesen haben.

Es sollte nun untersucht werden, ob sich durch eine Erhöhung der Zyklenzahl bei der Homogenisation der resultierende mittlere Partikeldurchmesser noch weiter verringern läßt. Dazu wurden von den ausgewählten Formulierungen neue Chargen gleicher Zusammensetzung hergestellt und nach entsprechender Vorbehandlung wie oben beschrieben nicht 10 sondern 20 Zyklen bei 1500 bar homogenisiert.

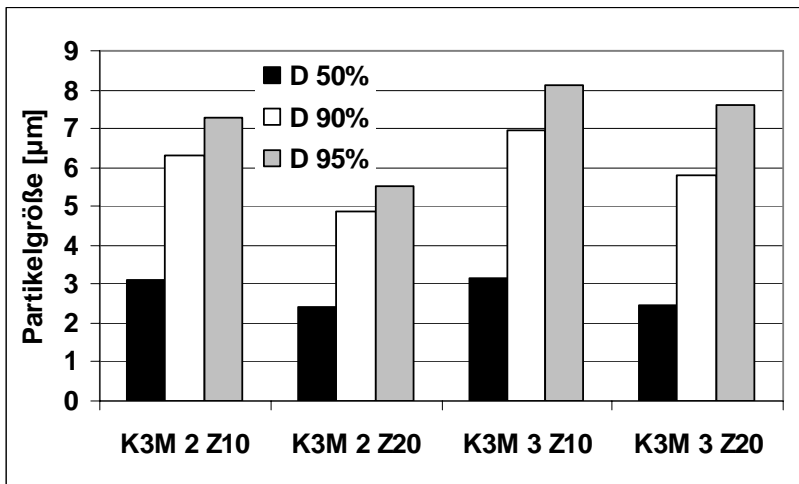


Abbildung 4-5: Vergleich der Partikelgrößen zweier Kohledispersionen nach jeweils 10 bzw. 20 Zyklen bei 1500 bar homogenisiert, gemessen mittels Laserdiffraktometrie (LD).

Abbildung 4-5 zeigt nebeneinander die beiden ausgewählten Formulierungen K3M 2 und K3M 3 jeweils nach 10 Zyklen und nach 20 Zyklen bei 1500 bar homogenisiert. Man kann erkennen, daß die Größe der Hauptpopulation der Partikel (LD 50 %) bei beiden Rezepturen gleich ist (2,4 µm) wohingegen der aggregatsensible Parameter D 95 % bei der Dispersion K3M 2 ca. 2 µm kleiner ist, als bei K3M 3. Geht man eine Stufe weiter und betrachtet den D 99 %, so ist der Unterschied noch größer, denn K3M 3 ist mit 12,3 µm fast doppelt so groß wie K3M 2 mit 6,6 µm. Es ist jedoch auch zu erkennen, daß sich der mittlere Partikeldurchmesser selbst durch Homogenisation mit 20 Zyklen nur noch geringfügig absenken ließ und eine Nanosuspension im eigentlichen Sinne nicht erhalten werden konnte.

Als Ergebnis der Rezepturentwicklung einer 2 %igen Kohledispersion hat folgende Formulierung mit einer Kombination aus einem sterischen und einem elektrostatisch stabilisierenden Tensid im Endeffekt das beste Ergebnis hinsichtlich Partikelgröße, Stabilität und Sauerstoffempfindlichkeit erzielt:

K3M-Kohle	2 %
Kaliumoleat	1 %
Polysorbat 80	0,5 %
Wasser	ad 100 %

Um weiteren Aufschluß über die Beschaffenheit dieser Kohlepartikel zu erhalten und die mittels Laserdiffraktometrie gemessenen Daten abzusichern, wurden mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops Aufnahmen der K3M-Formulierung gemacht. Dazu

wurde die Dispersion bei 60°C im Trockenschrank getrocknet und das erhaltene Pulver auf den Objektträger aufgebracht. Dieser wurde mit einem ca. 10 nm dicken Goldfilm bedampft und anschließend bei 15 keV mit Hilfe eines Mikroskops des Typs Stereoscan S 360 der Firma Cambridge Instruments betrachtet.

Abbildung 4-6 zeigt zwei Aufnahmen mit 1750facher Vergrößerung. Man erkennt deutlich viele Partikel im Bereich von 1-2 µm und einige größere mit ca. 6 µm Durchmesser.

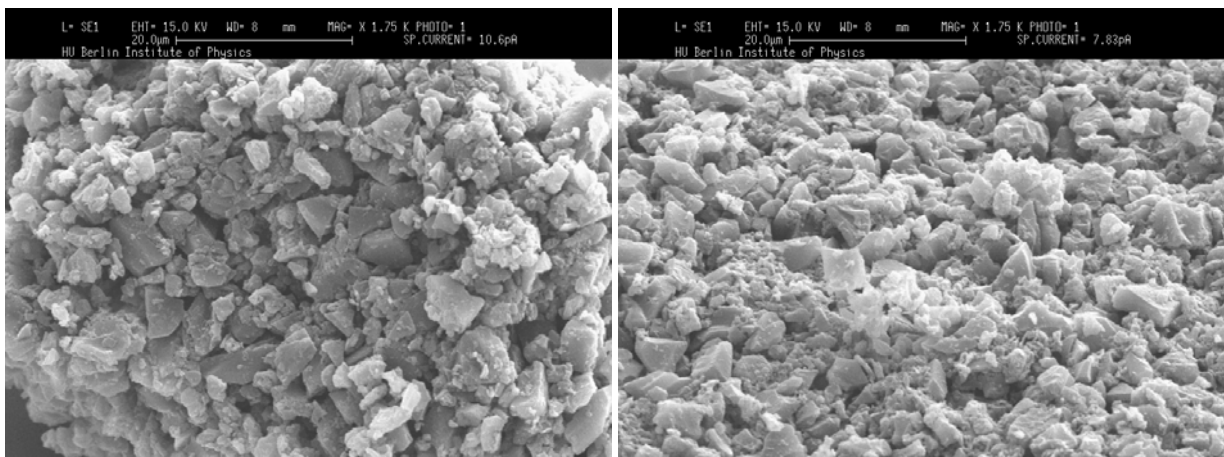


Abbildung 4-6: REM-Aufnahmen einer 2 %igen Kohle-Dispersion, die 20 Zyklen bei 1500 bar homogenisiert wurde. Vergrößerung 1750fach

Zum Abschluß dieser Studie wurde eine Charge der Formulierung K3M 3 noch einmal mittels ESR untersucht. Um nun die maximale Veränderung der Linienbreite in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks in der Umgebung zu ermitteln, wurde eine Probe von 15 ml erneut mit gasförmigem Stickstoff mit einer Flußrate von 50 ml/min durchströmt. Nach 15 min wurde der Vorgang alle 5 Minuten unterbrochen und ein Spektrum aufgezeichnet. Nach 30 Minuten war die maximale Veränderung erreicht. Eine weitere Verlängerung der Begasung brachte keine weitere Abnahme der Linienbreite. Abbildung 4-7 zeigt das ESR-Spektrum der Dispersion vor Beginn der Begasung unter normaler Luft und das Spektrum nach 30 Minuten Stickstoffbegasung. Man kann erkennen, daß die Linienweite von 0,42 mT unter normaler Luft auf 0,12 mT unter Stickstoff abgenommen hat.

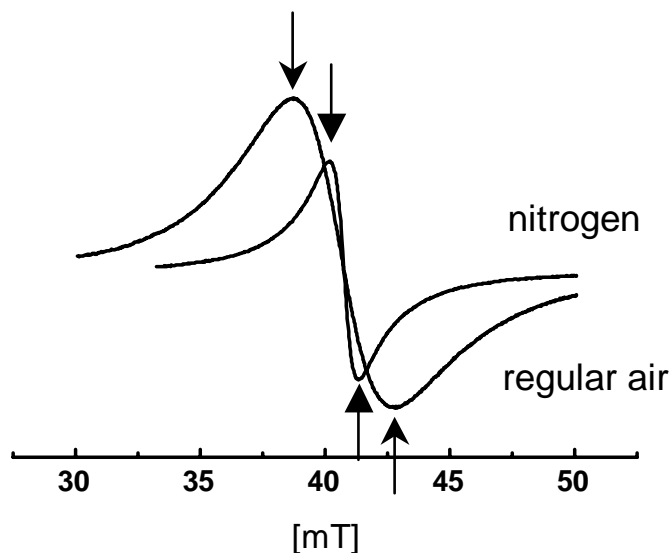


Abbildung 4-7: Vergleich zweier ESR-Spektren einer homogenisierten Kohlesuspension unter normalen atmosphärischen Bedingungen und nach 30 min Stickstoffbegasung.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es ist gelungen, eine Kohledispersion mittels Hochdruckhomogenisation herzustellen, die bei oximetrischen ESR-Messungen eine gute Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff zeigte, so daß die erhaltenen Kohledispersionen für den Einsatz in der Diagnostik vielversprechend erscheinen. Eine Korrelation zwischen der chemischen Beschaffenheit der eingesetzten Stabilisatoren beziehungsweise der Partikelgröße einerseits und der Sauerstoff-Empfindlichkeit andererseits war hierbei nicht gegeben. Der mittlere Partikeldurchmesser ließ sich jedoch selbst bei der geringeren Wirkstoffkonzentration (2 %) und durch 20 Homogenisationszyklen nicht in den Nanometerbereich absenken. Die Untersuchungen an medizinischer Kohle im Vergleich zu ADA und Nifedipin ergaben demnach, daß sich zumindest in diesem Fall eine amorphe Struktur als eher nachteilig für die Zerkleinerungseffizienz erwies.