

2 Methoden

Im folgenden Kapitel werden die Herstellungs- und Charakterisierungsmethoden für die Nanosuspensionen und Nanosuspension-Hydrogel-Formulierungen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, beschrieben.

2.1 Allgemeine Herstellungsmethoden für Nanosuspensionen

Eine Möglichkeit beschreibt die Firma élan, die ihr Produkt NanoCrystal[®] mit Hilfe von Perlmühlen herstellt. Hierbei wird der zu zerkleinernde Arzneistoff in Tensidlösung über mehrere Stunden bis hin zu Tagen in einer mit kleinen Perlen befüllten Mühle gemahlen [Liversidge und Cundy, 1995, Liversidge und Conzentino 1995, Liversidge et al. 1992].

Eine andere Möglichkeit ist die hier nachfolgend beschriebene Hochdruckhomogenisation.

2.1.1 Hochdruckhomogenisation

Die Hochdruckhomogenisation wird bereits seit vielen Jahren in der Lebensmittelindustrie zur Stabilisierung von Milchprodukten, Säften etc. genutzt. In der kosmetischen Industrie wird sie für die Produktion von diversen kosmetischen Produkten, wie Körperlotionen, Cremes etc. eingesetzt. Die Hochdruckhomogenisation ist außerdem eine Methode, mit der Bakterien aufgeschlossen werden, um so z. B. deren Stoffwechselprodukte für weitere Analysen zu erhalten. Auch findet die Hochdruckhomogenisation in der pharmazeutischen Industrie Anwendung. Insbesondere bei der Herstellung von Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung [Schumann und Müller, 1994]. Emulsionen werden auf diese Art und Weise homogenisiert und sind somit physikalisch stabil.

Die Hochdruckhomogenisation macht sich das Prinzip nach BERNOULLI [Stricker, 1987] zu Nutze. Dieses Prinzip besagt, dass in einem durchströmten System die Summe aus dynamischem und statischem Druck konstant bleibt. Wird nun eine Flüssigkeit mit hohem Druck durch einen engen Spalt gepresst, steigt der dynamische Druck, und der statische Druck fällt ab. Sinkt der Druck unter den Dampfdruck der Flüssigkeit, so beginnt diese zu siedeln und Gasbläschen entstehen. Beim Austritt aus dem engen Spalt implodieren die entstandenen Gasbläschen. Hierbei werden starke Kräfte frei, die Emulsionströpfchen oder Feststoffpartikel zerreißen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Kavitation. Die Spaltbreite (z. B. bei einem

angewandten Druck von 1500 bar beim LAB 40), durch den die zu emulgierende Emulsion/Suspension gedrückt wird, reduziert sich von 3 cm auf 25 μm . Je nach Spalt und Einstellung [Jahnke, 1988] variiert der Druck und die Kraft. Tabelle 1-1 zeigt die Parameter, die Einfluß auf das Homogenisationsergebnis haben.

Tabelle 1-1: Einfluss verschiedener Parameter auf das Homogenisationsergebnis [Jahnke, 1998].

Einflußgröße	Symbol	Einheit
Physikalische Größe		
Viskosität disperse Phase	η_d	Pas
Viskosität kontinuierliche Phase	η_k	Pas
Dichte der Phasen	ρ_d, ρ_k	kg / m ³
Grenzflächenspannung	g	N / m
Tensidkonzentration	c_E	kg / kg
Besatzdichte Tensid	G	kg / m ²
Härtegrad disperse Phase	H_m	(1 bis 10 nach Mohs)
Konzentration disperse Phase	Φ_d	kg / kg
Dampfdruck kontinuierliche Phase	p_d	Pa
Partikelgröße Ausgangsmaterial	d r	m
Gasanteil gelöst / ungelöst	Φ_G	m ³ / kg (i.N.)
Geometrie des Homogenisatorventils		
Effektiver Durchmesser	d_{eff}	m
Radius Einlaß	r_e	m
Spaltgröße am Zerkleinerungsort	h	m
Bearing valve length	l_v	m
Impact distance	a_{pr}	m
Prozessparameter		
Homogenisierungsdruck	p_0	Pa
Druck nach Homogenisation	p_g	Pa
Temperatur	T	K
Kapazität	V	m ³ / s
Anzahl Druckniveaus	n_z	l

Hinzu kommen noch laminare und turbulente Strömungsvorgänge. Abhängig von der Art des Produktes (Suspension, Emulsion etc.) sind Strömungs- bzw. Scherkräfte sowie Kavitation die Hauptzerkleinerungsmechanismen bei der Hochdruckhomogenisation.

In dieser Arbeit wurde an drei unterschiedlichen Homogenisatoren gearbeitet. Hauptsächlich sind hierbei Nanosuspensionen mit dem APV Homogenisator LAB 40 (APV Systems, Deutschland) hergestellt worden. Zum Vergleich wurde ein Microfluidizer 110-Y (Microfluidics Ltd., USA), und ein Homogenisator der Firma Stansted Fluid Power Ltd. (Essex, U.K.) eingesetzt. Diese drei Homogenisatoren unterscheiden sich im Aufbau der Homogenisationsventile und in ihrem Vermögen Druck aufzubauen. Mit dem Microfluidizer MY110-Y können Drücke bis 700 bar aufgebaut werden. Hier werden pro Zyklus zwei Interaktionskammern hintereinander geschaltet. Der LAB 40 kann bis zu 1500 bar und der Stansted Homogeniser bis 2300 bar aufbauen.

2.1.2 Herstellung von Nanosuspensionen

Zunächst wird die Tensidlösung durch Lösen und/oder feines Dispergieren der Tenside im entsprechenden Dispersionsmedium (i.d.R. demineralisiertes Wasser) vorgenommen. Mit der Tensidlösung (oder Dispersion je nach Tensid und Dispersionsmedium) wird der zu zerkleinernde Arzneistoff angerieben und dann mit Hilfe eines Ultra Turrax' (Jahnke und Kunkel GmbH, D-Staufen) vorgemischt.

Da die Ausgangsmaterialien Partikelfractionen von $>25\ \mu\text{m}$ enthalten können, muss die Suspension bei 150 und 500 bar mit je 2 Zyklen vorhomogenisiert werden. Dadurch wird ein Verstopfen des Ventils vermieden.

Nach dieser Art der Vorhomogenisation wird, nach gewünschtem Zerkleinerungsgrad und nach Härte des zu zerkleinernden Stoffes, mit verschiedener Zyklenzahl mit 1500 bar homogenisiert.

2.1.3 Herstellung der Nanosuspensions-Hydrogel-Systeme

Zunächst wurden die Hydrogele hergestellt. Der Herstellungsweg ist für die Gele der Carbopol-Reihe und Noveon der Selbe. Polymerpulver wurde in einer Fantaschale vorgelegt, mit Wasser dispergiert, im Kühlschrank über Nacht zur vollständigen Hydratation ruhen gelassen und dann mit Triethanolamin neutralisiert. Die Überprüfung des pH-Wertes erfolgte mit pH-Papier. In Wasser gelöstes Chitosanchlorid bildet ein Gel. Chitosan löst sich nur in saurem Medium, deshalb wurde es in verdünnte Essigsäure gegeben, deren pH-Wert zuvor auf 4 eingestellt worden war. Je nach erforderlicher Buparvaquonkonzentration wurde eine entsprechende Menge an Nanosuspension in einer Fantaschale vorgelegt, sorgfältig mit dem Gel angerieben und bis auf das gewünschte Verhältnis gebracht.

2.2 Charakterisierung von Nanosuspensionen

Zur Partikelgrößenanalyse von Nanosuspensionen wurden in dieser Arbeit im wesentlichen zwei Partikelgrößenanalysemethoden herangezogen. Zum einen die Laserdiffraktometrie, zum anderen die Photonenkorrelationspektroskopie. Kombiniert man diese beiden Methoden, können Nanosuspensionen sehr gut charakterisiert werden.

2.2.1 Laserdiffraktometrie (LD)

Bei der Laserdiffraktometrie handelt es sich um ein Lichtbeugungsverfahren. Je nach Größe und Form eines Teilchens, gleichgültig ob fest oder flüssig, werden verschiedene Beugungsmuster erzeugt. Bei der Laserdiffraktometrie werden jedoch nur kugelförmige Partikel

berücksichtigt. Sie erzeugen ein radialsymmetrisches Beugungsbild. Als Lichtquelle zur Erzeugung der Beugungsbilder dient ein Helium-Neon-Laser (Wellenlänge $\lambda = 632 \text{ nm}$). Bei diesem Verfahren macht man sich zunutze, dass kleine Partikel Licht stärker brechen als Große. Nachdem der Laser auf das Partikel getroffen ist und gebrochen wurde, sorgt die nachgeschaltete Fourier-Linse dafür, dass die Beugungsbilder unabhängig von der Position des Teilchens in der Messprobe immer auf dieselbe Position des Detektors gebracht werden. Die Auswertung der Beugungsmuster erfolgt auf der Grundlage des Fraunhofer-Näherung. Zur Charakterisierung der Nanosuspensionen der vorliegenden Arbeit wurde das Gerät LS 230 der Firma Beckmann Coulter, USA, genutzt. Dieses Gerät weist einen Messbereich von $0,04 \text{ }\mu\text{m}$ bis $2000 \text{ }\mu\text{m}$ auf. In diesem Gerät ist die PIDS-Technologie (Polarization Intensity Differential Scattering-Technologie), die eine Erweiterung des Messbereichs in den Submikronbereich erreicht, implementiert. Diese Messerweiterung spielt für die Analyse von Nanosuspensionen jedoch keine große Rolle. Die Abbildung 2-1 zeigt den schematischen Aufbau eines Laserdiffraktometers.

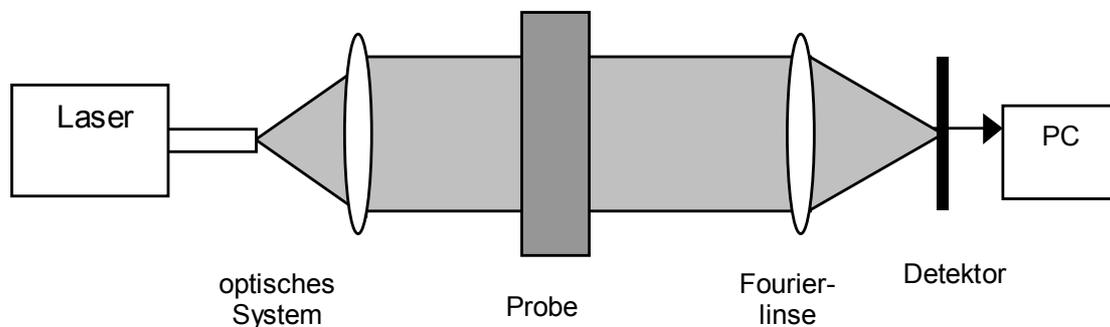


Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines Laserdiffraktometers.

Aufgrund der Anordnung der Detektorelemente werden kugelförmige Teilchen vorausgesetzt. Bei der Berechnung der Partikelgrößenverteilung geht die Auswertungssoftware von kugelförmigen Partikeln aus. Bei stark von der Kugelform abweichenden Partikeln könnte dieses problematisch sein. Geht man von einem ellipsenförmigen Teilchen aus ergäben sich theoretisch unterschiedlich Beugungsmuster für das gleiche Partikel, in Abhängigkeit von der Ausrichtung des Partikels im Messmedium. Somit könnte man für eine monomodale Dispersion mit ellipsenförmigen Partikeln keine monomodale Partikelgrößenverteilung erhalten, sondern würde eine Partikelgrößenverteilung zwischen den kürzesten und längsten Durchmessern erhalten. Letztendlich hat sich dieses auf die Auswertung von Nanosuspensionspartikeln nicht nachteilig ausgewirkt. Die Partikel sind zwar nicht absolut kugelförmig, jedoch wurden keine nadelförmigen Partikel vermessen, meistens lag eine annähernd rundliche Form vor (vgl. REM-Aufnahmen unter Kapitel 1.6, 6.1 und 3.3).

Für die Berechnung der Partikelgrößenverteilung stehen, je nach Art der Partikel, verschiedene Rechenmodelle zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich nach der FRAUNHOFER-Methode ausgewertet. Die FRAUNHOFER-Methode berücksichtigt die optischen Eigenschaften der Partikel nicht. Mit dieser Methode werden nur Partikel $> 4 \text{ }\mu\text{m}$ (Angaben in der Literatur sind nicht einheitlich vgl. Müller und Schumann, 1996) korrekt berechnet [Washington, 1992]. Die Ana-

lyse der Partikel im Submikronbereich ist mit der FRAUNHOFER-Methode kritisch, da es bei größeren Beugungswinkeln (je kleiner ein Teilchen, desto größer der Beugungswinkel) zu Überlagerung mit anderen Streulichtphänomenen kommen kann. Diese Überlagerung der verschiedenen Phänomene führt zu einer Berechnung die der wahren Teilchengröße nicht ganz entspricht. Wertet man die Partikelgrößenverteilung nach der MIE-Theorie aus werden die optischen Eigenschaften berücksichtigt. Es fließen der reale (Brechungsindex des Dispersionsmediums und Partikels) und imaginäre (Absorption der dispergierten Partikel) Brechungsindex in die Berechnungen mit ein. Mit dieser Methode können auch kleinere Partikel korrekt berechnet werden.

In dieser Arbeit wurde zur Charakterisierung der Partikel im Submikronbereich zusätzlich parallel eine PCS-Analyse (siehe Abschnitt 2.2) herangezogen. Partikel im Nanometerbereich werden von der PCS genauer gemessen. Eine Analyse der Nanosuspension mit oben genanntem Verfahren ergibt eine gute Charakterisierung der Probe im Mikrometerbereich.

Zur Charakterisierung von Nanosuspensionen werden in dieser Arbeit die Durchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % der Volumenverteilung herangezogen. D 50 % besagt, dass 50 % der gemessenen Partikel unterhalb dieser Größe liegen. Der Wert D 50 % gibt demzufolge die Hauptpopulation der gemessenen Suspension an. Die Volumenverteilung gewichtet, im Gegensatz zur Anzahlverteilung, größere Partikel überproportional stärker als kleinere. D 95 % und D 99 % reagieren bereits sehr sensibel auf vorhandene Mikropartikel bzw. Aggregate. Andere Auswertungsmodelle wie beispielsweise Anzahlverteilung oder Oberflächenverteilung sowie die Angabe andere D % sind mit der Auswertungssoftware möglich.

Mit folgenden Messparametern wurden die Nanosuspensionen in dieser Arbeit untersucht:

Zeit einer Messung (run length) : 90 Sekunden

Optisches Modul (optical module): Fraunhofer

Small Volume Module, 3 aufeinander folgende Messungen

Zur Messung wurde die Nanosuspension mit demineralisiertem Wasser (Aqua dem.) auf eine geeignete Zählrate verdünnt.

2.2.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Photonen-Korrelations-Spektroskopie, kurz PCS, ist ein dynamisches Laser-Streulichtverfahren zur Partikelgrößenbestimmung.

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie handelt es sich um ein Streulichtverfahren, das Teilchen im Bereich von 5 nm bis 3 μ m erfassen kann. Das PCS-Gerät besteht aus einem Laser, einer temperaturkontrollierten Probenzelle und einem Photomultiplier (PM) zur Detektion der Intensitäten des gestreuten Laserlichtes unter einem bestimmten Winkel. In der vorliegenden Arbeit wurde unter einem Winkel von 90° gemessen. Das Signal vom PM wird zu einem Korrelator zur Berechnung der Korrelationsfunktion transferiert. Abbildung 2-2 zeigt den schematischen Aufbau eines PCS-Gerätes.

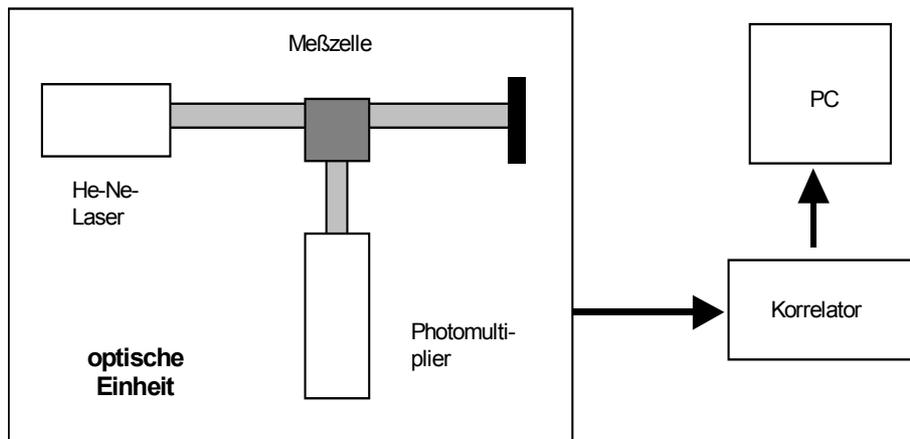


Abbildung 2-2: Schematischer Aufbau eines PCS-Gerätes.

Bedingt durch Diffusion der Partikel im Messmedium kommt es zu zeitabhängigen Schwankungen der Intensität des Streulichtes, wobei kleinere Teilchen eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit als größere besitzen. Oberhalb einer Partikelgröße von $3\ \mu\text{m}$ Größe setzt die Sedimentation ein. Die Bewegung der Teilchen ist dann nicht mehr allein diffusionskontrolliert. Die Geschwindigkeit der Sedimentation ist außerdem vom Dispersionsmedium abhängig (insbesondere Viskosität und Dichteunterschied von dispergierten Teilchen und Dispersionsmedium spielen eine Rolle).

Aus den zeitlichen Schwankungen der Streulichtintensität wird mit Hilfe des Korrelators eine Autokorrelationsfunktion berechnet, die dann an eine theoretische Korrelationsfunktion $g(\tau)$ angepasst wird:

$$g(\tau) = e^{-2DK^2\tau}$$

D: Diffusionskonstante

K: Betrag des Streulichtfaktors

τ : Verzögerungszeit

Die Verzögerungszeit τ und der Betrag des Streulichtvektors K sind abhängig von den Messbedingungen. τ hängt ab von der Anzahl der Kanäle und der Taktzeit, beide Parameter sind einzustellen und stehen im folgendem Zusammenhang:

$$\tau = n * \Delta t$$

n: Anzahl der Kanäle

Δt : Taktzeit

Der Streulichtvektor K kann folgendermaßen berechnet werden:

$$K = \frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \cdot \left(\frac{\theta}{2}\right)$$

n : Brechungsindex des Dispersionsmediums

λ : Wellenlänge des Laserlichtes

θ : Streulichtwinkel

Den Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Diffusionskoeffizient gibt die STOKES-EINSTEIN-Gleichung wieder:

$$r = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

r : Partikelradius

k : Boltzmannkonstante

T : absolute Temperatur

D : Diffusionskoeffizient

η : dynamische Viskosität

Als Messergebnis erhält man die mittlere Partikelgröße (angegeben vom Gerät als z-average) der gemessenen Probe und einen dazugehörigen Polydispersitätsindex (PI). Der PI beschreibt mathematisch den Unterschied zwischen der Autokorrelationsfunktion und der angepassten Korrelationsfunktion. Er stellt ein Maß für die Breite der Verteilung dar. Ein PI von 0 stellt eine praktisch monodisperse Probe dar, in diesem Falle würden sich beide Funktionen decken. In der Praxis existieren solche Proben nicht. Proben mit einem PI 0,03-0,06 (z. B. Latex-Dispersionen) bezeichnet man als monodispers. Fettemulsionen für die parenterale Ernährung haben Indices zwischen ca. 0,1 und 0,25, was relativ eng verteilt ist. Oberhalb von 0,5 ist das Messergebnis kaum mehr auswertbar, weil die Verteilung zu breit ist; man kann also nicht davon ausgehen, dass der angegebene Wert für die Partikelgröße der Mittlere ist [Müller und Schumann, 1996, Washington, C., 1992].

Die PCS-Messung der Nanosuspensionen wurden in demineralisiertem Wasser auf eine geeignete Konzentration verdünnt und danach sofort vermessen. Alle Suspensionen wurden mit dem ZetaSizer 4 der Firma Malvern Instruments (Malvern, U.K) vermessen.

Es wurden jeweils 3 Messungen, wobei die Gesamtmesszeit einer Messung 200s betrug (je 10 Einzelmessungen jeweils 20 s) im auto size estimation Modus mit multimodaler Analyse vorgenommen.

Die PCS und die LD sind unterschiedliche Messverfahren, die die Partikelgrößenberechnung auf der Basis unterschiedlicher Kalkulationen ausrechnen. Aus diesen Gründen werden die gemessenen Partikelgrößen, die von beiden Messmethoden überschritten werden, nicht den gleichen Messwert erhalten. Die mittleren Partikelgrößen der PCS (z-average) und der LD 50 % stimmen deshalb nicht exakt überein. Der LD 50 % ist in der Regel etwas höher. Zur Charakterisierung der Hauptpopulation diene in dieser Arbeit eben die PCS und zur Bestimmung des mikropartikulären Anteils die LD.

2.2.3 Laser-Doppler-Anemometrie zur Bestimmung des Zetapotenzials

Das Zetapotenzial ist für die Stabilisierung von dispersen Systemen eine wichtige Kenngröße. Denn Partikel sind meistens elektrostatisch aufgeladen. Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Frage wie z. B. Baufehler in Ionenkristallgittern, funktionelle Gruppen etc. [List, 1985, Müller, 1996]. Ein Partikel ist also nach aussen hin nicht neutral sondern besitzt eine Nettoladung. Diese Nettoladung wird als Zetapotenzial gemessen.

Ist ein Partikel beispielweise negativ geladen, werden sich Gegenionen aus dem Dispersionsmedium an die Partikeloberfläche anlagern. Je größer das Zetapotenzial ist, desto fester werden auch die Gegenionen festgehalten. Legt man ein elektrisches Feld an werden die Partikel zum Gegenpol wandern. Bei der Diffusionsbewegung eines Partikels kommt es aufgrund von Reibungskräften zum Abstreifen der „diffusen Schicht“. Dort wo die „diffuse Schicht“ der Gegenionen abgerissen werden kann, bestimmt man das Zetapotenzial. Das heißt, das Zetapotenzial ist das Potenzial an der Scherebene in der diffusen Schicht.

In wässriger Lösung adsorbieren in den meisten Fällen zunächst negativ geladenen Ionen an das ebenfalls negative Partikel. Während des Adsorptionsvorganges verlieren die negativen Ionen ihre Hydrathülle und werden fest an die Partikeloberfläche gebunden. Diese Schicht wird als innere Helmholtzschicht bezeichnet. Die Anziehung der negativ-Ionen auf eine negative Partikeloberfläche wird mit den van der Waals Wechselwirkungen erklärt. Negative Ionen besitzen meistens eine nicht ganz so stark ausgeprägte Hydrathülle wie positive Ionen. Deshalb sind sie weniger abgeschirmt als diese und van der Waals Wechselwirkungen bilden sich zwischen der negativen Oberfläche und den negativen Ionen. Der Einfluss der van der Waals Kräfte über die elektrostatischen Wechselwirkungen herrschen zwischen Abständen im Å-Bereich. Somit kommt es trotz gleichsinniger Ladung oftmals zur Anlagerung von negativen Ionen auf negativer Partikeloberfläche.

Das Zetapotenzial ist eine wichtige Kenngröße für die physikalische Stabilität von Emulsionen oder Suspensionen.

Um das Zetapotenzial von Partikeln zu messen, nutzt man die Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)[Thode et al., 2000]. Das Gerät (bspw. ein Zetasizer von Malvern Instruments der sowohl die PCS als auch die LDA Messtechnik vereint) besteht unter anderem aus einem

Laser und einem Strahlenteiler. Die Laserstrahlen werden geteilt und mit Hilfe von Spiegeln kreuzen sich wieder in der Probenzelle. In der Abbildung 2-3 ist das Gerät schematisch dargestellt.

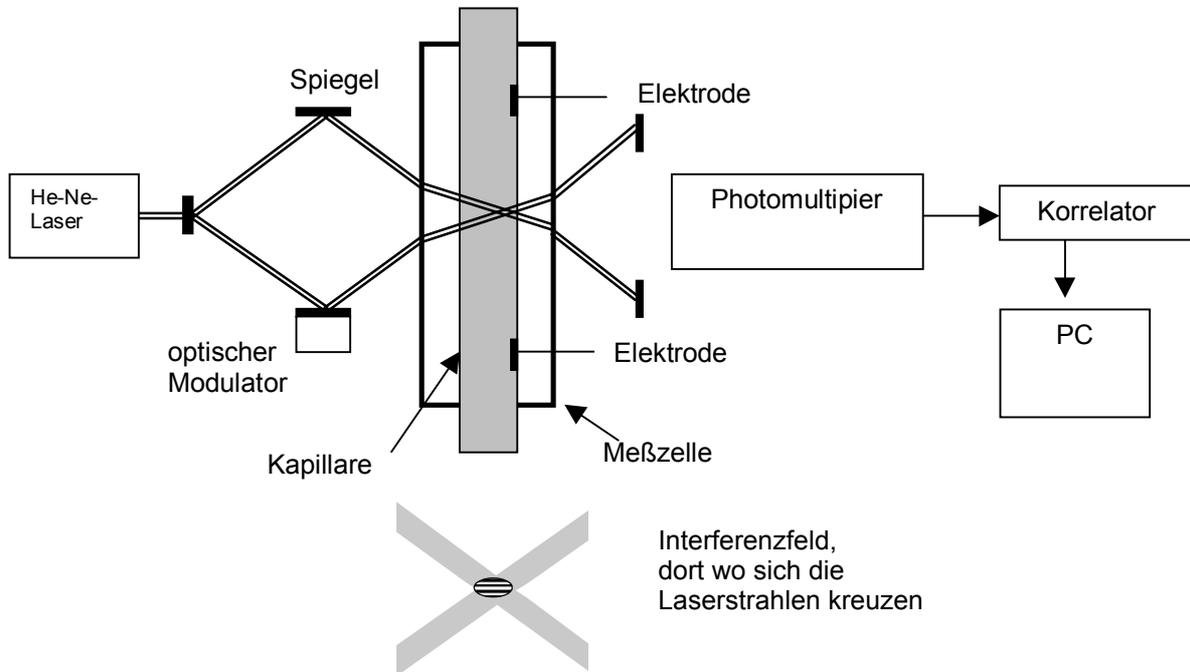


Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau einer LDA-Messanordnung.

An die Messzelle wird ein elektrisches Feld angelegt und die Partikel bewegen sich durch einen Laserstrahl und streuen das Licht. Aufgrund des Dopplereffektes ist die Frequenz des einen gestreuten Laserlichtes ungleich der Frequenz des ursprünglichen Laserstrahls. Je nach Partikelgeschwindigkeit ist die Frequenzverschiebung anders. Aus der gemessenen Frequenzverschiebung kann die Partikelgeschwindigkeit wie folgt berechnet werden:

$$f_d = \frac{2 \sin(\Theta/2)}{\lambda} v$$

f_d : Dopplerfrequenz

Θ : Winkel, unter dem das Streulicht detektiert wird

λ : Wellenlänge des Laserlichtes

v : Partikelgeschwindigkeit

Die Partikelgeschwindigkeit, in diesem Falle die elektroforetische Mobilität EM , wird zur Umrechnung zum Zetapotential eingesetzt.

$$EM = \frac{v}{E}$$

v : Geschwindigkeit des Partikels (cm/s)

E : Feldstärke (esu Volt/cm)

Die Umrechnung von der elektroforetischen Mobilität zum Zetapotential erfolgt in dieser Arbeit mit der HELMHOLTZ-SMOLUCHOWSKI-Gleichung:

$$ZP = EM \cdot \frac{4\pi\eta}{\varepsilon}$$

ZP : Zetapotential des Partikels in elektrostatischen Volt (esu)

EM : elektroforetische Mobilität

η : Viskosität des Dispersionsmediums

ε : Dielektrizitätsmedium des Dispersionsmedium

4π : Konstante

Mit Hilfe eines optischen Modulators wird die Frequenz eines Laserstrahls im Vergleich zu einem anderen Laserstrahl um 250 Hz verschoben. Im Schnittpunkt der Laserstrahlen entsteht nunmehr ein wanderndes Interferenzfeld, mit einer bestimmten Geschwindigkeit. In Abhängigkeit von der Partikelladung bewegt sich das Teilchen nun entweder mit oder gegen das wandernde Interferenzfeld. Aufgrund der Addition bzw. Subtraktion der Dopplerfrequenzen kann so das Vorzeichen des Partikels ermittelt werden [Müller, 1996].

Zur Ermittlung der Oberflächenladung (Nernst-Potenzial) der Partikel wurde in demineralisiertem Wasser mit eingestellter Leitfähigkeit auf 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ gemessen. Die Leitfähigkeit wurde jeweils mit NaCl eingestellt. Die Messung des Zetapotenzials in der jeweils entsprechenden Tensidlösung erfolgte, um eine direkte Aussage über die Stabilität der Partikel im Umgebungsmedium zu erhalten. Der ZetaSizer 4 der Firma Malvern Instruments wurde zur Ermittlung der Zetapotenziale eingesetzt. Das Zetapotential wurde bei einer angelegten Feldstärke von 22 V/cm mit einer Dauer von 20 s gemessen (Zero field correction war jeweils eingestellt).

2.2.4 Röntgendiffraktometrie

Die Röntgendiffraktometrie wird zur Strukturaufklärung von Kristallen angewandt. Dabei macht man sich die elektromagnetische Röntgenstrahlung (Wellenlänge 30 nm - 2 pm) zu nutze. Die Strahlung wird mit Hilfe von Röntgenrohren erzeugt, in denen beschleunigte Elektronen auf die Materie prallen. Durch die Abbremsung entstehen kontinuierliche Bremsstrahlungen und diskontinuierliche Röntgenstrahlungen der bremsenden Materie. Diese wird durch die Anregung von Elektronen der bremsenden Materie erzeugt.

Röntgenstrahlen besitzen sehr gute Durchdringungseigenschaften, mit denen man die Struktur von Kristallen und deren atomaren Aufbau untersuchen kann.

Die Röntgenstrahlung wird an den Atomen, die im Kristallgitter regelmäßig angeordnet sind, gestreut. Diese Streustrahlung ergibt ein Interferenzmuster. In Abhängigkeit vom Streuwinkel verstärken oder vermindern sich die Streustrahlen. Zu Interferenzmaxima kommt es, wenn die BRAGG'SCHEN REFLEXIONSBEDINGUNGEN [Beyer und Maasz, 1987] erfüllt sind:

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \frac{\Theta}{2}$$

n: ganze Zahl

λ : Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung

d: Netzebenenabstand

Θ : Beugungswinkel

Im Modell von BRAGG wird die Beugung von Röntgenstrahlung als Reflexion an den Netzebenen der Kristalle erklärt. Es liegt hier jedoch keine echte Reflexion vor, sondern der wird der Röntgenstrahl durchdringt unter eigener Abschwächung sowie der Anregung der Elektronenhüllen des untersuchten Stoffes eine Netzebene nach der anderen. Dabei werden die angeregten Gitterpunkte des so durchdrungenen Stoffes zu sekundären Röntgenquellen und strahlen ihrerseits wieder Röntgenwellen ab.

Ein zweidimensionales Gerüst von Atomen im kristallinen Stoff wird als Netzebene bezeichnet. Der Netzebenenabstand d , ist die dritte Dimension in einem Gitter. Sind die Bedingungen in oben beschriebener Gleichung erfüllt, kann ein Reflexmaximum detektiert werden. Somit ist aus dem Beugungswinkel der Netzebenenabstand berechenbar.

Man kann mit der Röntgendiffraktometrie zum einen unterschiedliche Kristallmodifikationen detektieren, zum anderen auch chemische Veränderungen einer Substanz erfassen. Ab einem Anteil von ca. 5 % fremder Substanz (z. B. entstanden durch Zersetzung), kann dieser durch „fremde“ Reflexe detektiert werden.

Bei der Röntgendiffraktometrie unterscheidet man zwischen zwei Untersuchungsarten, nämlich der Weitwinkelstrukturanalyse (WAXS, wide angle x-ray scattering) und der Kleinwinkelanalyse (SAXS, small angle x-ray scattering). Mit der SAXS Methode werden eher flüssigkristalline- und halb feste Systeme mit Streuwinkel bei $< 1^\circ$ untersucht. Die WAXS Methode weist hingegen einen Streuwinkelbereich von 2° - 50° auf.

Die in dieser Arbeit untersuchten Nanosuspensionen wurden mit einem Philips x-ray Generator PW 1830 durchgeführt (Winkelbereich $2\Theta = 4-40^\circ$). Ca. 200 μ l der Nanosuspension wurden mit ca. 5 mg Xanthan vorsichtig verrührt und nach einer kurzer Quellzeit von ca.

1 min. auf den Probenhalter aufgebracht. Als alternative Methode wurde die Nanosuspension direkt auf den Probeträger aufgebracht, die Nanosuspension wurde im Eksikkator eingetrocknet und direkt vermessen.

Dieses Gerät hat eine Kupfer-Glühkatode (40 kV, 25 mA. Wellenlänge 0,15418 nm). Die Detektion erfolgte mit einem beweglichem Zählrohr (Goniometer PW 18120), jede Messung dauerte 2 Stunden.

2.2.5 Rheologische Untersuchung

Die „Rheologie“ ist die Lehre des Fließverhaltens von Flüssigkeiten und elastischen Körpern. Dieser Ausdruck wurde von Professor Bingham des Lafayette College Easton, PA geprägt [Kavanagh und Ross-Murphy, 1998]. Es wurde abgeleitet vom griechischen Wort rheos was soviel wie fließen oder strömen heißt. Fließen ist eine fortwährende Deformation eines Materials unter Einwirkung äußerer Kräfte. Wie ein Stoff auf eine bestimmte Deformation reagiert, wie man diese Reaktion beschreiben, erklären und messen kann, das sind Fragen der Rheologie.

Die Deformation erfolgt beim Fließen (viskose Verformung) mit endlicher Geschwindigkeit. Damit unterscheidet sich das Fließen grundlegend vom elastischen Verhalten der Feststoffe, die auf eine Kraft sofort (unendliche hohe Deformationsgeschwindigkeit) reagieren. Auch erfolgt eine elastische Verformung unter Krafteinwirkung nur bis zu einem gewissen Grad. Ein viskoser Fließprozeß hält hingegen solange an, wie die Kraft wirkt. Der Unterschied zwischen diesen grundlegenden Verhaltensweisen wird anhand von Abbildung 2-4 und den dort dargestellten mechanischen Vertretern deutlich. Materialien können auch mehrere Verhalten aufzeigen, was insbesondere von Deformationsart- und -stärke sowie Zeitmaßstab der Deformation und Beobachtung abhängt.

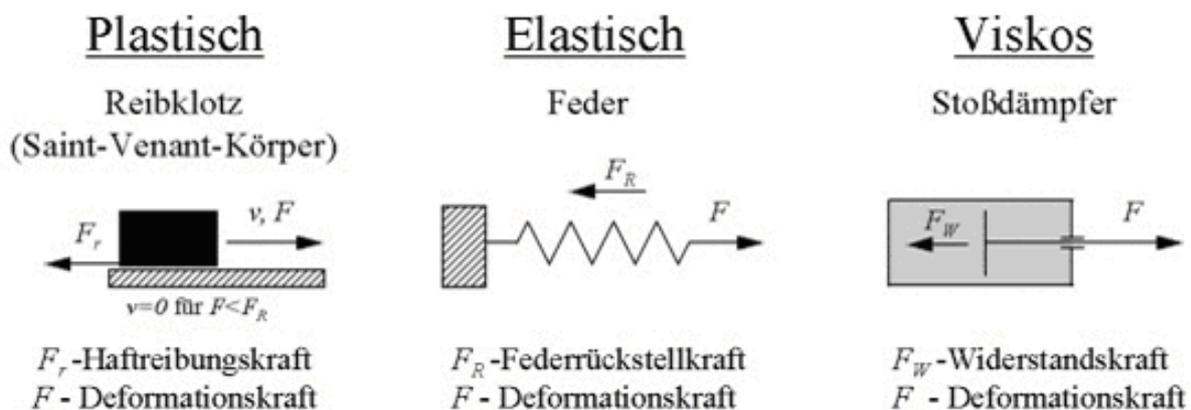


Abbildung 2-4: Mechanische Vertreter für die grundlegenden Deformationseigenschaften

Die meisten in der Pharmazie angewandten Zubereitungen haben sowohl elastischen als auch plastischen Charakter, sie sind viskoelastisch [Davis 1984; Reich, 1999]. Rheologische Untersuchungen von Salben, Gelen, Cremes und Suspensionen liefern wichtige Erkenntnis-

se hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus, ihrer Stabilität etc. Dabei werden verschiedene Verfahren eingesetzt, z. B. Messungen mit dem Kapillarviskosimeter, dem Rotationsviskosimeter und dem Kugelfallviskosimeter.

Materialien können neben viskosen auch mehr oder weniger starke elastische Eigenschaften zeigen. Beim Beginn einer Deformation (Scherung) wird der Widerstand des Materials durch elastische Kräfte bestimmt, die durch das HOOKSche Gesetz beschrieben werden:

$$\tau = G \cdot \gamma$$

In der Rheologie τ wird im allgemeinen als Schubspannung und als γ Scherung bezeichnet, G ist hier das Schubmodul. Das Verhalten der Materialien kann als Verschaltung einer Feder (elastische Eigenschaften) und einem Dämpfer (viskose Eigenschaften) aufgefasst werden. Man nehme eine Reihenschaltung von Feder und Dämpfer sowie eine plötzlich einsetzende Kraftwirkung an. Dann wird zunächst die Feder die Kraftwirkung aufnehmen. Erst nach und nach entspannt sich die Feder und die Dämpferbewegung setzt immer stärker ein. Bezogen auf die Dämpferbewegung erscheint diese Wirkung als eine Art Trägheit im Ansprechverhalten auf die Deformation. Der elastische Anteil kommt um so mehr zum Tragen, je kleiner die Deformationen sind und je schneller sie sich ändern. Bei langsamen Deformationen wird die Feder nur geringfügig ausgelenkt und der Dämpfer folgt schnell. Hier dominieren daher die viskosen Widerstände.

Die obige Kombination aus viskosem und elastischem Verhalten bezeichnet man als viskoelastisches Verhalten. Während der viskose Teil gut mit einfachen rheologischen Messungen (Fließkurven) beschrieben werden kann, sind für die Charakterisierung der elastischen Eigenschaften weitere Untersuchungen erforderlich.

Eine mögliche Art, viskose und elastische Eigenschaften eines Materials zu ermitteln, sind Messungen unter oszillierender Beanspruchung (sogenannte Schwingungsmessung). Dazu wird das Material meist einer sinusförmigen Deformation mit kleiner Amplitude ausgesetzt. Die kleine Amplitude garantiert dabei die Messung im linearen viskoelastischen Bereich. In Abbildung 2-5 ist das Messprinzip dargelegt. Die Probe wird ausgehend vom Ausgangszustand 1 bis zu einer maximalen Auslenkung s_{\max} entsprechend einer maximalen Deformation verschert (Punkt 2). Danach setzt die Gegenbewegung ein, wobei die höchste Geschwindigkeit am Punkt 3 erhalten wird. Am Punkt 4 erfolgt dann die erneute Umkehrung der Bewegung. Die Deformation wird durch eine Sinusfunktion beschrieben, die durch die zwei Parameter Amplitude und Kreisfrequenz ω charakterisiert ist. Die Kreisfrequenz ergibt sich dabei aus der Frequenz der Schwingung f nach $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$.

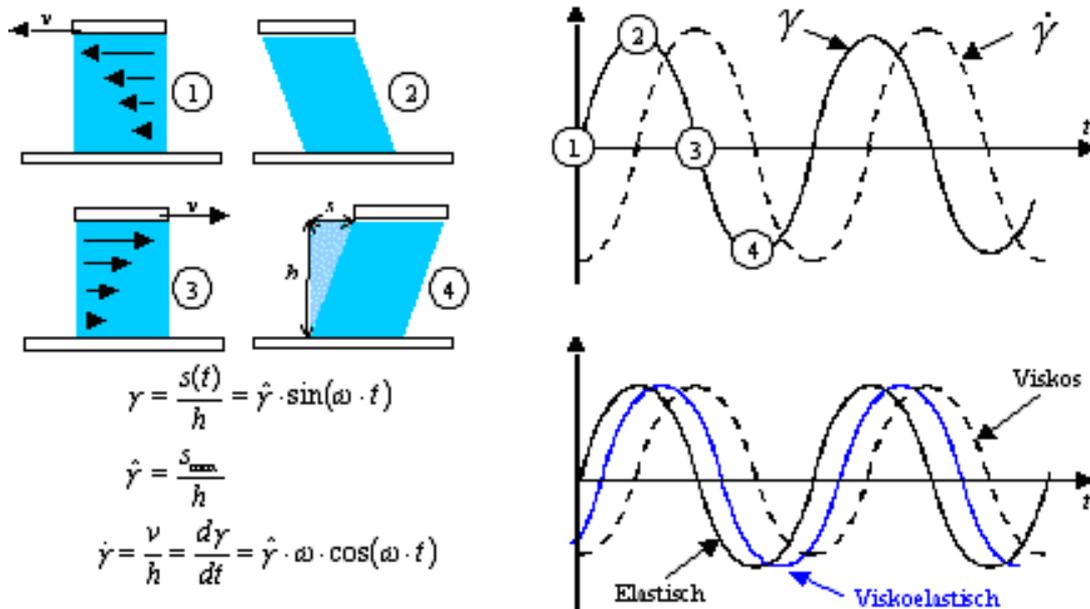


Abbildung 2-5: Rheologische Messung mit oszillierender Beanspruchung.

Der zeitliche Verlauf der Scherdeformation kann durch die dargestellte Sinus-Funktion beschrieben werden. Die Schergeschwindigkeit ergibt sich dann als Ableitung dieser Sinus-Funktion und zeigt einen um 90° phasenverschobenen Verlauf.

Ein ideal elastisches Material hat einen Widerstand proportional zur Scherung (HOOKE-sches Gesetz) mit dem Proportionalitätsfaktor Elastizitätsmodul G' . Seine Antwort auf eine sinusförmige Deformation ist entsprechend :

$$\tau(t) = G' \cdot \gamma(t) = G' \cdot \hat{\gamma} \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad \text{elastisch}$$

$$\tau(t) = \eta \cdot \dot{\gamma}(t) = \eta \cdot \omega \cdot \hat{\gamma} \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad \text{viskos}$$

$$\tau(t) = G' \cdot \hat{\gamma} \cdot \sin(\omega \cdot t) + G'' \cdot \hat{\gamma} \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad \text{viskoelastisch}$$

Hingegen hat ein ideal viskoses Material einen Widerstand proportional der Schergeschwindigkeit mit dem Proportionalitätsfaktor Viskosität. Der Term $\eta \cdot \omega$ wird auch als Verlustmodul G'' bezeichnet. Ein viskoelastisches Material mit sowohl elastischem als auch viskosem Verhalten zeigt entsprechend eine Kombination beider Anteile.

Ein elastisches Fluid hat einen Widerstand, der in Phase mit der Scherdeformation liegt, während bei einem viskosem Fluid der Widerstand um 90° phasenverschoben zur Scherdeformation verläuft. Ein viskoelastisches Fluid hat daher eine Phasenverschiebung δ , die zwischen 0 und 90° liegt und sich zu $\tan \delta = G''/G'$ ergibt. Sie ist ein Maß für die Anteile beider

Verhaltensweisen am Widerstand. Die Module G' und G'' sind keineswegs konstante Stoffgrößen. Sie verändern sich mit Amplitude und Frequenz der angelegten Deformationsfunktion.

Für die rheologischen Messungen in dieser Arbeit wurde ein Platte-Kegel-System eingesetzt. Bei einem Kegel-Platte-System rotiert ein Kegel über einer Platte. In dem entstehenden Spalt befindet sich die Messsubstanz. Der Messaufbau ist schematisch in Abbildung 2-6 dargestellt.

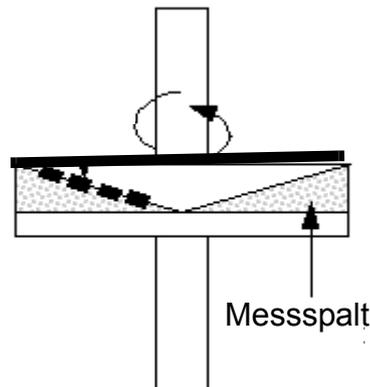


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Platte-Kegel-Messeinrichtung.

Die Umfangsgeschwindigkeit auf der Kegeloberfläche nimmt nach außen hin zu. Gleichzeitig wird durch die Kegelform die vertikale Spaltweite größer. Dies führt dazu, dass die Schergeschwindigkeit in vertikaler Richtung über dem Radius konstant bleibt. Damit der vertikale Schergradient dominiert, muß der Neigungswinkel des Kegels entsprechend klein sein (flache Kegelspitze).

Für die rheologischen Untersuchungen wurde das Platte Kegel Rheometer Rheo Stress RS100 (Haake, D-Karlsruhe) eingesetzt. Durchmesser der Platte 20 mm, Winkel des Kegels 4° . Vor jeder Messung wurden die Proben im Temperierbad auf $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ temperiert. Nach dem Aufbringen auf die Probenplatte wurde 5 min vor jeder Messung gewartet, damit sich das Gelgerüst wieder aufbauen konnte. Die Gele wurden mit 2 unterschiedlichen Programmen untersucht.

1.: Einfache Fließkurve (Auf- und Abwärtskurve), aufgenommen mit einer Scherrate 2 s^{-1} bis -200 s^{-1} und wieder zurück.

2.: Oszillatorischen Messungen, aufgenommen in einem Frequenzbereich von 0,01-10 Hz, das Drehmoment betrug $1350\text{ }\mu\text{N}\cdot\text{m}$ (angular displacement 10^{-4} rad), die Frequenz betrug 1Hz.

2.2.6 Sterilisationsmethoden

2.2.6.1 Sterilisation mit gespanntem Wasserdampf

Sterilisation mit gespanntem Wasserdampf wurde mit dem Dampfsterilisator INS-S-A S 2000 (Durchreichesterilisator DRS 1) der Firma Münchener Medizin Technik GmbH, Plannegg/München (BRD), mit einem Multi-Mess-Grenzwert-Computer als Steuereinheit, durchgeführt. Es wurde nach einem Standard Programm bei 121°C, 2 bar und 15 min (Ph. Eur.) verfahren, wenn nicht anders angegeben.

2.2.6.2 γ -Strahlensterilisation

Die γ -Strahlensterilisation wurde von der Willi Rüscher AG, D-Kernen i.R., durchgeführt. Die Vials wurden mit 5 ml Probe gefüllt und mit einer Strahlendosis von 25 kGy, erzeugt durch eine Kobaltbombe, behandelt.

2.2.7 Photometrische Bestimmungen

Die UV-VIS-Spektroskopie macht sich zu nutze, dass Energie des sichtbaren (VIS) und ultravioletten (UV) Lichtes teilweise von organischen Molekülen absorbiert wird und p- und n-Elektronen anregt. Die graphische Auftragung der Lichtabsorption (Absorption A) gegen die Wellenlängen ergibt ein für eine Substanz, oder ein Substanzgemisch ein charakteristisches Spektrum. Diese Spektren können für die qualitative und quantitative Analyse von Stoffen herangezogen werden.

Zur quantitativen Analyse von Budesonid wurden zunächst Budesonid-Lösungen für die Erstellung einer Eichgerade hergestellt. Die Absorptionswerte sollten zwischen 0,2 und 0,8 liegen. Dann wurde die zu untersuchende Budesonid-Lösung entsprechend verdünnt und sofort bei einer Wellenlänge von 250 nm vermessen. Es wurden jeweils 3 Wiederholungsmessungen vorgenommen und der daraus resultierende Mittelwert berechnet. n = 3 bedeutet, dass der Versuch mit 3 Proben vorgenommen wurde, die dann jeweils 3 mal vermessen wurden.

Die photometrischen Bestimmungen erfolgten mit dem Uvikon 940 Photometer der Firma Kontron Electronics GmbH. Mit diesem Zweistrahlphotometer kann das Spektrum von 190-590 nm detektiert werden. In der Vergleichsküvette befand sich das entsprechende Verdünnungsmedium.

2.2.8 Bestimmung der Leitfähigkeit

Für die Einstellung der Elektrolyt-Lösung zur Bestimmung des Zetapotenzial wurde die Leitfähigkeit (S/cm) bestimmt. Elektrolyt-Lösungen leiten elektrischen Strom. Diese Leitfähigkeit wird von den anwesenden Ionen getragen. Die Leitfähigkeit hängt von der ihrer Konzentration ab. Die Leitfähigkeitselektrode wird in die zu vermessene Lösung gehalten. Die Bestimmung der Leitfähigkeit wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Leitfähigkeitsmessungen der Proben wurde mit dem Microprocessor Conductivity Meter LF537 (WFT, Weilheim) durchgeführt.

2.2.9 Bestimmung von pH-Werten

Der pH-Wert ist definiert als der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität. Bestimmt werden kann er mit Hilfe von sogenannten pH-Elektroden oder mit Hilfe von Lackmuspapier. Die Bestimmung der pH-Werte von wässrigen Proben wurde mit dem pH-Meter CG840 (Schott, Hofheim) durchgeführt. Es handelt sich um eine Einstabmesskette. Vor jeder Messung wurde die pH-Elektrode mit Hilfe von Pufferlösungen kalibriert. Die pH-Werte der Hydrogele wurden mit pH-Papier (Satorius, D-Göttingen) überprüft.

2.2.10 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit und der Lösungsgeschwindigkeit

2.2.10.1 Sättigungslöslichkeit

Die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit erfolgte in 20 ml Vials, die in temperierten Schüttelschränken eingelagert wurden; nach entsprechenden Zeitabständen wurden Proben gezogen und photometrisch der Gehalt bestimmt. Vor der Vermessung des Überstandes der Suspension wurde der Feststoffanteil entweder mit einem 0,1 μm Filter abfiltriert oder mit der Biofuge 22R von der Firma Heraeus bei 17000 rpm (22936g) 2 x 1 h abzentrifugiert .

2.2.10.2 Lösungsgeschwindigkeit

Die Lösungsgeschwindigkeit von Budesonid wurde mit der Blattrührmethode in zwei unterschiedlichen Auflösungsmedien bestimmt (Aqua dem. mit Zusatz von Tween[®]80 0,033%, Phosphat-Puffer-Lösung pH 6,8: 552,0 g Natriummonohydrogenphosphat, 47,7 g Citronensäure Aqua dem. ad 10,0 L gelöst). Die Versuche wurden bei 25°C und 37°C in der Freisetzungsapparatur Erweka AR 400 (Erweka, D-Heustamm) durchgeführt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit des Rührers betrug 100 rpm. Bei der Ermittlung der Auflösungsgeschwindigkeit sollte das Verhältnis von c_s zu c_x möglichst groß sein. Entsprechend der Freisetzungsbestimmung nach Ph.Eur. und USP wird gefordert, dass der gelöste Anteil nur 10 % der Sättigungskonzentration betragen darf. Die sogenannten „Sink-Bedingungen“ konnten jedoch unter diesen Versuchsbedingungen (geschlossenes System) nicht eingehalten wer-

den, da die dabei erhaltenen Konzentrationen aufgrund der Nachweisgrenze des eingesetzten analytischen Verfahrens zur Bestimmung von Budesonid nicht mehr quantitativ erfasst werden konnten. Es wurden 900 ml (Puffer-) Lösung eingesetzt und 1,35 ml Nanosuspension zugesetzt, das entspricht 13,5 mg Budesonid. Die Sättigungslöslichkeit für Budesonid Nanokristalle bei 5 mg/100 ml liegt wurden hier unter non-sink Bedingungen gearbeitet

Zur Vermessung wurde die Probe zunächst durch einen 0,1 µm Cellulosenitratfilter (Sartorius, D-Göttingen) gegeben, um ungelöste Partikel abzutrennen. Um eine Verfälschung der Wiederfindungsraten nach der Filtration zu vermeiden, wurde der Filter vorher getestet. Weil das Filtermaterial oftmals Stoffe adsorbiert, wurde verdünnte Nanosuspension filtriert und die Wiederfindungsrate nach jeweils 2 ml gemessen. Nach 10 ml war die Sättigung des Filtermaterials mit Budesonid erreicht. Die Wiederfindungsrate lag bei 93,8 % (\pm 0,4 %). Danach wurde erneut reines Lösungsmittel in 2 ml Schritten hindurch gegeben, um festzustellen, ob und wieviel der Filter davon wieder abgibt. Der Wert der Wiederabgaberate nach Durchgabe von reinem Lösungsmittel schwankte um 10 %. Daraus könnten sich die relativ großen Standardabweichungen begründen, die im Gegensatz zum Abzentrifugieren auftreten. Nach der "Abzentrifugier-Methode" sind die Schwankungen um den Mittelwert sehr viel geringer ausgefallen.

2.2.11 Probenvorbereitung für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die zu untersuchende Probe wurde auf Tesafilm (Beiersdorf, D-Hamburg) aufgetragen und getrocknet. Die getrocknete Probe wurde dann auf den Stempelartigen Probenträger aufgebracht (ohne Tesafilm). Die Probe wurde dann mit einer Goldschicht überzogen. Die so vorbereitete Probe konnte dann rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden.

2.2.12 Vernebelung der Nanosuspension

Die Nanosuspension wurde mit Hilfe eines Pari-Boys vernebelt. Das Aerosol wurde in einem Becherglas aufgefangen. Dazu wurde das Mundstück des Pari-Boys während der Vernebelung in ein Becherglas gehalten. Die Aerosoltröpfchen mit der Nanosuspension wurden so in dem Becherglas aufgefangen.