

## 3 Methoden

### 3.1 Herstellung der Emulsionen und Nanosuspensionen

#### 3.1.1 Hochdruckhomogenisation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Emulsionen und Nanosuspensionen mittels der Technik der Hochdruckhomogenisation hergestellt. Das Prinzip dieses Verfahrens wird schon seit mehr als 100 Jahren zur Herstellung von Emulsionen angewendet. In der pharmazeutischen Industrie spielt das Verfahren mittlerweile eine große Rolle. Um eine hohe Bioverfügbarkeit und eine hohe Stabilität der Emulsionen zu erreichen, sind in vielen Fällen Tröpfchengrößen deutlich unter 1  $\mu\text{m}$  erforderlich. Zur Herstellung solcher Feinemulsionen sind Energiedichten nötig, die nur in Hochdrucksystemen, wie im Microfluidizer<sup>®</sup> oder im Kolben-Spalt-Hochdruckhomogenisator, erzeugt werden können.

Die Herstellung der Emulsionen und Nanosuspensionen im Kleinmaßstab erfolgte mit einem APV Micron LAB 40 (APV Systems, D-Unna). Die Betriebsdrücke liegen bei diesem Gerät zwischen 100 und 1500 bar. Das Volumen des Homogenisationsgutes liegt bei 40 mL und sollte mindestens 20 mL betragen. Das Totvolumen beträgt 2 mL. Das Gerät wurde für den Labormaßstab direkt durch „Scaling-down“ von Produktionsgeräten entwickelt, so dass mit diesem Gerät gewonnene Ergebnisse auf den Produktionsmaßstab übertragen werden können. Zusätzlich konnten diese Homogenisatoren mit einem angepassten Temperiererring ausgestattet werden, so dass es möglich war, Produktionen unter Temperaturkontrolle zu fahren.

Bei der Arbeitsweise der Strömungsdispargiermaschinen liegt das Prinzip nach Bernoulli zu Grunde (Stricker, 1987). Nach der Bernoulli-Gleichung ist die Summe aus dynamischem und statischem Druck in durchströmten Systemen immer konstant. Bei einem vorgegebenen Homogenisationsdruck fließt die Flüssigkeit aus der Vorkammer, deren Durchmesser ca. 3 cm beträgt, in das Ventil (Abb. 3-1: Kurvenabschnitt a). Im engen Spalt des Homogenisationsturms beträgt die Spaltgröße, abhängig vom angewandten Druck und der Viskosität des Dispersionsmediums, nur noch 3-25  $\mu\text{m}$  (Bushrab, 2005). Die Flüssigkeit wird sehr stark beschleunigt, so dass der dynamische Druck stark ansteigt und der statische Druck stark abfällt. Sinkt der statische Druck unter den Dampfdruck der Flüssigkeit, entstehen Dampfblasen, die so genannte Kavitation. Das System fängt an zu sieden, und es entsteht eine Flüssigkeits/Dampfströmung (Abb. 3-1: Kurvenabschnitt b). Durch die entstehenden Dampfblasen wird der Spalt noch weiter verengt. Die Strömungsgeschwindigkeit liegt

oberhalb der Schallgeschwindigkeit. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Verdichtungsstoß und plötzlichen Druckanstieg, so dass die Dampfblasen kollabieren und die Strömung sich verlangsamt (Abb. 3-1: Kurvenabschnitt c). Die zerkleinerungswirksame Energie entsteht bei der Bildung der Gasblasen und wird auch in Form von Stosswellen bei den Kollapsvorgängen freigesetzt. Beides führt zur Zerstörung der Tropfen/Partikel. Das Bilden und Implodieren der Gasblasen wird physikalisch als Kavitation bezeichnet. Nach Passieren des Spalts fällt der Druck wieder auf Umgebungsdruck ab.

Die Kavitationskräfte sind für das Zerkleinern von Arzneistoffkristallen oder Emulsionstropfen verantwortlich (Freudig et al., 2002; Jahnke, 1998; Schubert and Armbruster, 1989). Neben der Kavitation tragen auch die durch turbulente Strömung im Homogenisator entstehenden Scherkräfte zur Verkleinerung bei (Karbstein and Schubert, 1995). Zusätzlich kommt es zu Kollisionen der Partikel als weiteren Zerkleinerungsprozess.

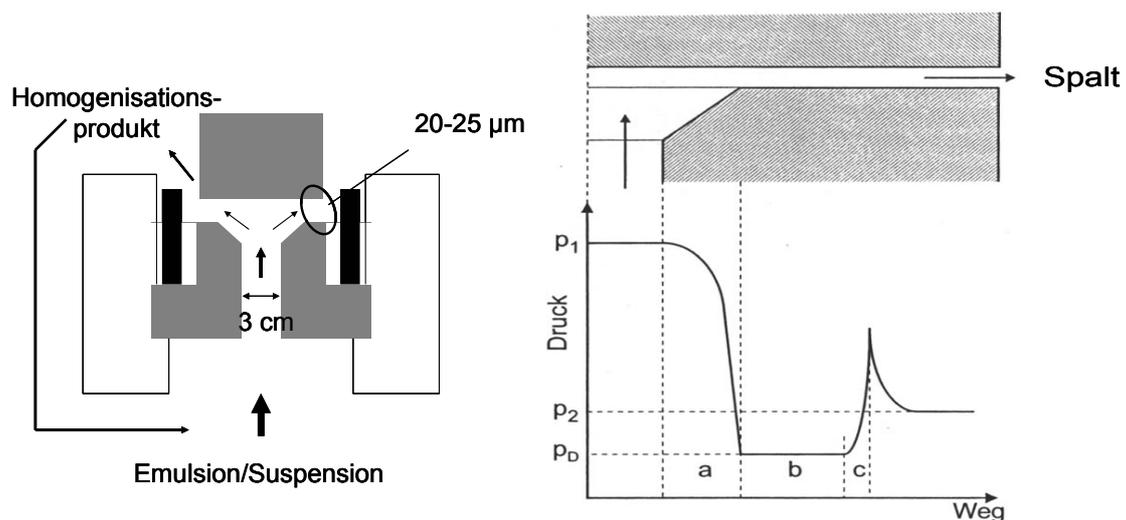


Abb. 3-1: Prinzip des Micron LAB 40 und der Druckverlauf im Ventil (Schultz et al., 2002)

Die nach dem mechanischen Energieeintrag durch Tropfenaufbruch entstandenen Tropfen müssen anschließend möglichst rasch gegen Koaleszenz stabilisiert werden. Die Effektivität des Schutzes hängt unter anderem davon ab, wie schnell die eingesetzten Emulgatoren die neuen Phasengrenzen besetzen. Für die Grenzflächenbesetzungskinetik sind drei Einzelschritte zu berücksichtigen (Schubert and Armbruster, 1989):

1. Desaggregation von Mizellen,
2. Transport der Emulgatormoleküle an die Phasengrenzfläche und
3. Adsorption der Moleküle an die Grenzfläche.

Daher sind häufig mehrere Homogenisationszyklen während eines Herstellungsvorgangs nötig. Diese unterstützen die oben erwähnten Vorgänge und führen zusätzlich durch wiederholte Einwirkung zu feinst möglicher Zerkleinerung des Systems. Weitere Einflussgrößen auf die Dispersität von Emulsionen und Suspensionen sind außer den Homogenisationsparametern die Volumenkonzentration der dispersen Phase, das Viskositätsverhältnis, die eingesetzte Tensidkonzentration und Art und Menge der festen Phase (z.B. Arzneistoff) (Jahnke, 1998; Kolb et al., 2001).

Die wesentlichen Homogenisationsparameter sind Betriebsdruck und Zyklenzahl. Über die Höhe des Betriebsdrucks und die Anzahl der eingesetzten Zyklen kann die Herstellung kleiner Partikel und die Reduktion des Anteils an Mikropartikeln gesteuert werden. Je höher der Druck und damit die Leistungsdichte, desto kleiner werden die Partikel, desto enger die Partikelverteilung und desto geringer die Anzahl der Mikropartikel über 5 µm. Hier sei an das geringe Mikropartikelvorkommen für parenterale Produkte erinnert. Durch die Wahl der Zyklenzahl kann sowohl die Dispersität als auch die Enge der Partikelgrößenverteilung variiert werden. Der Einsatz von hohen Produktionsdrücken oder hohen Zyklenzahlen erweist sich allerdings nicht immer als Vorteil. Ein zu hoher Energieeintrag kann zur Aggregation der Partikel oder zur vollständigen Instabilität der Emulsionen führen. Generell nähern sich die Ergebnisse bei Variation der Prozessparameter einer Grenzdispersität an. Bei einer Erhöhung der Zyklenzahl kommt es dann zu keiner weiteren Teilchengrößenreduktion; bei einer Erhöhung vom Druck kann es zu einer weiteren Teilchenreduktion kommen.

Bei einer Rezepturentwicklung spielen die Beschaffenheit der Ausgangsstoffe, die Einsatzmenge und Kombination und die Herstellungsbedingungen eine wichtige Rolle. Strategien und Hintergründe einer Rezepturentwicklung können der Literatur entnommen werden (Bock, 1994; Jahnke, 1998; Lucks, 1993; Peters, 1999).

### **3.1.2 Nanosuspensionen**

Im Gegensatz zu Öltröpfen können Feststoffsubstanzen die kleinen Blutkapillaren leichter verstopfen, da sie sich nicht verformen können. Um möglichst kleine Partikel mit einem geringen mikropartikulären Anteil zu erhalten, sollte bereits das Ausgangsmaterial möglichst fein sein. Mit zunehmender Feststoffkonzentration bis zu 65% konnte eine steigende Zerkleinerungseffektivität im Nassmahlverfahren beobachtet werden (Zheng et al., 1997). Da bei der Homogenisation auch Zerkleinerungsprozesse durch Kollision auftreten, muss der Arzneistoffkonzentration in der vorliegenden Suspension Beachtung geschenkt werden. Die

Häufigkeit der Zusammenstöße steigt mit zunehmender Partikelkonzentration. Daher sollte eine Arzneistoffkonzentration von 1-10% gewählt werden. Weitere Rezepturveränderungen, wie z.B. die Viskositätserhöhung der kontinuierlichen Phase, Tensidkonzentration und Tensidart und verschiedene Prozessparameter (Druck, Temperatur, Zyklenzahl), können gewählt werden.

Die in dieser Arbeit hergestellten Amphotericin B-Nanosuspensionen wurden nach den von Schmidt (2002) entwickelten Parametern gefertigt. Die Rezeptur enthielt folgende Zusammensetzung:

Arzneistoff (Amphotericin B)	2,5%
Emulgator (Eilecithin)	2,4%
Aqua	ad 100%

Der Arzneistoff wurde in einer Fantaschale vorgelegt, mit der Tensidlösung angerieben und mit einem Ultra-Turrax T 25 (Jahnke & Kunkel GmbH, D-Staufen) 5 min bei 9000 rpm vordispersiert. Weiteres Vordispersieren der Prä suspension erfolgte durch Hochdruckhomogenisation mit 2 Zyklen á 150 bar und 2 Zyklen á 500 bar. Anschließend erfolgte Hochdruckhomogenisation bei Raumtemperatur, 1500 bar Produktionsdruck und 15 Homogenisationszyklen.

Die ersten Produktionsschritte des Anrührens und der Vordispersierung dienen der vollständigen Benetzung der Arzneistoffpartikel und der Zerkleinerung größerer Aggregate, die den Homogenisationsspalt verstopfen könnten. Die Vorhomogenisation bei geringem Druck sorgt für weitere Benetzung und Zerkleinerung der Partikel. Da der Homogenisationsspalt druckabhängig eine Größe von ca. 25 µm einnimmt, sollte die resultierende Suspensionsgröße nach der Vorhomogenisation unter der Spaltgröße liegen. Ausführliche Hintergrundinformationen geben Müller, Benita und Böhm (Müller et al., 1998).

Die Nanosuspensionen dienten als Ausgangsmaterial, um Emulsionen mit Arzneistoff herzustellen. Im Falle einer Beladung von Emulsionen mit Omeprazol wurde zuvor eine Nanosuspension nach Möschwitzer et al. (2004) hergestellt. Diese enthielt zunächst:

Arzneistoff (Omeprazol)	10,0%
Emulgator (Poloxamer 188)	1,0%
0,001 N NaHCO <sub>3</sub> -Lösung	ad 100%

Nach der Vordispersierung erfolgte die Homogenisation bei 1500 bar mit 20 Zyklen. Um während der Produktion eine Zersetzung des Omeprazols zu vermeiden, erfolgte die

Produktion bei 0 °C. Da während jedes Zyklus ein gewisser, nicht vermeidbarer Verlust der Nanosuspension auftritt, wurde nach den ersten 20 Zyklen die Suspension 1:1 mit Tensid-NaHCO<sub>3</sub>-Lösung verdünnt, um wieder ein Homogenisationsvolumen von 40 mL zu erlangen. Es folgte erneute Homogenisation für weitere 20 Zyklen. Somit bestand eine Endkonzentration von 5% Arzneistoff in der Nanosuspension. Durch den Energieeintrag wird während des Homogenisationsprozesses Wärme auf das Gut übertragen. Bei 1500 bar kann sich unter Umständen das Gut innerhalb zweier Zyklen um 20 °C erwärmen. Daher war es durch die Hitzeempfindlichkeit beider Arzneistoffe (Amphotericin B und Omeprazol) erforderlich, nach jedem Zyklus das Homogenisationsgut auf Raumtemperatur bzw. 0 °C abzukühlen.

Durch das Herstellen einer Nanosuspension wird das Ausgangsmaterial zerkleinert. Dadurch wird ein schnelleres Lösen in der Lecithinschicht der Emulsionen ermöglicht (siehe Kap. 3.1.3). Im Folgenden stellen Nanosuspensionen das Ausgangsmaterial zur Herstellung der Emulsionen dar.

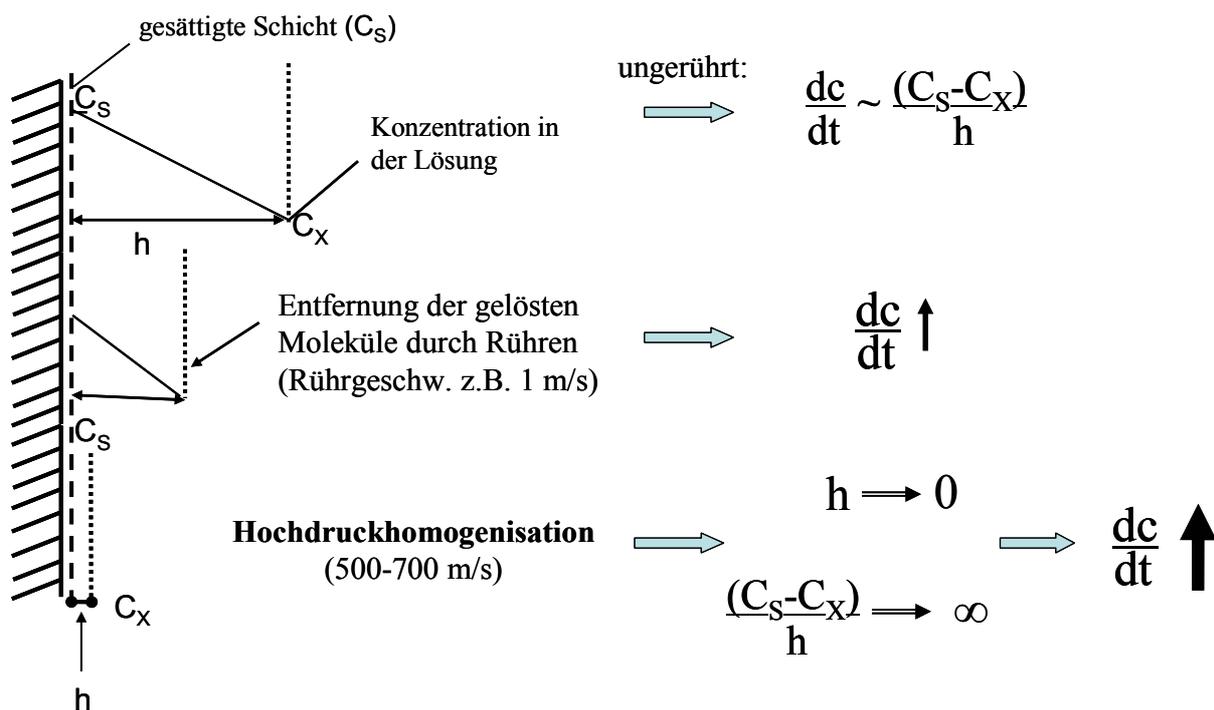
### **3.1.3 Lösungsverbesserung durch Hochdruckhomogenisation**

Durch die Zerkleinerung von Arzneistoffkristallen mittels der Hochdruckhomogenisation können die Sättigungslöslichkeit und - weitaus wichtiger - die Lösungsgeschwindigkeit des Arzneistoffs erhöht werden. Die Sättigungslöslichkeit stellt eine temperaturabhängige Größe dar. Unterhalb einer Partikelgröße von 1-2 µm wird sie allerdings auch von diesem Parameter bestimmt (Mosharraf, 1995). Bei abnehmender Partikelgröße und somit steigender Krümmung der Oberfläche steigt nach der Kelvin-Gleichung der Lösungsdruck der Substanz (Müller and Böhm, 1998; Simonelli, 1970). Nach der Ostwald-Freundlich-Gleichung ist die Sättigungslöslichkeit über kleinen Partikeln höher als über großen. Eine Erhöhung der Sättigungslöslichkeit ( $C_S$ ) führt nach Noyes und Whitney wiederum zu einer Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit, da diese direkt proportional zu  $(C_S - C_X)$  ist (Florence and Attwood, 1981):

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A \cdot D (C_S - C_X)}{h}$$

- $dm/dt$ : Lösungsgeschwindigkeit (Masse der in Lösung gegangenen Substanz pro Zeit)  
 A: Oberfläche  
 D: Diffusionskonstante  
 $C_S$ : Sättigungskonzentration der zu lösenden Substanz  
 $C_X$ : Konzentration zu einer bestimmten Zeit X während des Auflöserns im Umgebungsmedium  
 h: Dicke der Diffusionsschicht

Durch intensives Rühren, z.B. durch Hochdruckhomogenisation, kann die Dicke der Diffusionsschicht (h) auf fast gegen Null reduziert werden. Die Arzneistoffmenge ( $C_X$ ) repräsentiert dabei die Konzentration in der umgebenden Lösung (sog. „bulk concentration“). Die Reduktion der Diffusionsschicht gegen Null während der Hochdruckhomogenisation führt zu einer ausgeprägten Zunahme der Lösungsgeschwindigkeit. Die theoretische Betrachtung ist in folgender Abbildung wiedergegeben:



**Abb. 3-2: Dicke der Diffusionsschicht h in Abhängigkeit von der Rührintensität: von einem ungerührten Zustand (oben) über leichtes Rühren (Mitte) bis hin zur Hochdruckhomogenisation als starkes Rühren (unten)**

Durch Behandlung der Arzneistoffe mit Hochdruckhomogenisation können folgende Effekte erreicht werden:

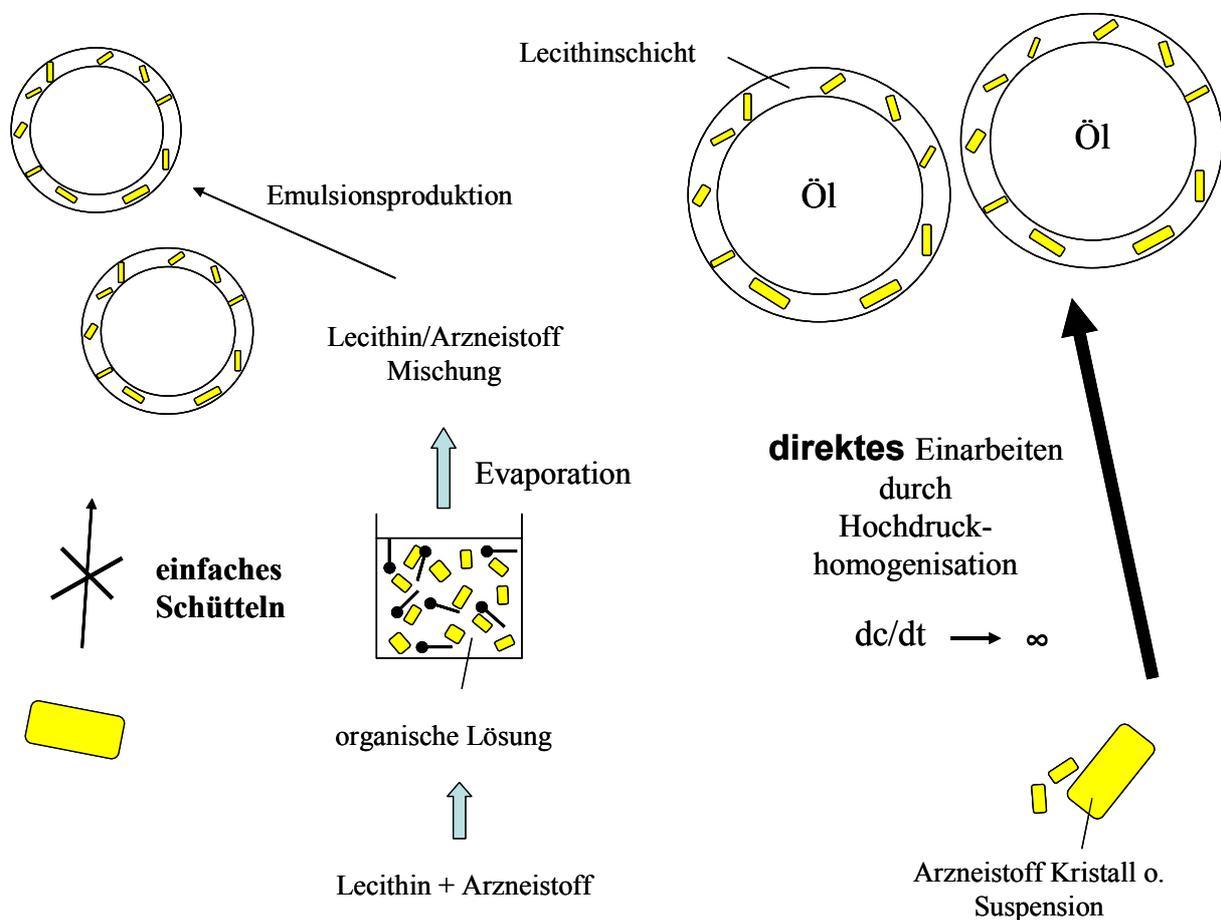
1. Der Arzneistoff wird, verglichen mit dem Ausgangsmaterial, deutlich zerkleinert und die Partikeloberfläche (A) somit vergrößert.
2. Die Sättigungslöslichkeit ( $C_S$ ) und die Lösungsgeschwindigkeit ( $dc/dt$ ) werden in besonderem Maß erhöht.
3. Diffusions- und Ausgleichsvorgänge werden beschleunigt.
4. Durch die Vorgänge bewegen sich die Arzneistoffmoleküle schnell zu den Grenzflächen zwischen Öl und Wasserphase und können sehr effektiv in die Tensidschicht (z.B. Amphotericin B in die Lecithinschicht) eingelagert werden.

Wie bereits in den vorigen Kapiteln erwähnt, ist das Inkorporieren von Amphotericin B in den Fettkern bzw. in die Phospholipidschicht von parenteralen Fettemulsionen sehr schwierig. Einfaches Schütteln reicht nicht aus, damit Amphotericin B von der wässrigen Phase in die Phospholipidschicht diffundiert. Es müssen Methoden gewählt werden, die effektiver sind und die den Arzneistoff chemisch und thermisch wenig beanspruchen. Eine bekannte Methode, den Arzneistoff mit Lecithin in organischen Lösungsmitteln zu lösen und daraus eine Emulsion zu erstellen (Davis and Washington, 1988), kommt aus Kosten- und insbesondere toxikologischen Gründen nicht in Frage. Der Lösungsmittelrestgehalt und die kostspielige Entfernung durch Evaporation stellen keine Alternative zu den bisherigen Lipidformulierungen (z.B. Abelcet<sup>®</sup> und AmBisome<sup>®</sup>) dar. Auch bei weiteren Lösungsansätzen über pH-Verschiebung und Einarbeitung in Fettemulsionen (Davis and Washington, 1995) muss mit der Zerstörung des Moleküls (Spaltung des Laktorrings durch Säuren und Basen) gerechnet werden. Zudem kommt es bei der Zumischung des Arzneistoffs zu parenteralen Emulsionen zum Auskristallisieren und Sedimentieren.

Im Falle von Amphotericin B erwies sich die Einlagerung in die Lecithinschicht durch hochenergetisches Dispergieren ohne toxisch bedenkliche Zusatzstoffe (sog. Ko-Homogenisation) als sehr erfolgreich, sowohl über ein direktes Zumischen des Pulvers zu handelsüblichen Emulsionen als auch über den Weg einer Arzneistoffnanosuspension (Muller et al., 2004; Schmidt, 2002). Diese Technologie wird unter dem Namen SolEmuls<sup>®</sup> geführt. Mittlerweile konnten so auch andere Arzneistoffe, wie Carbamazepin oder Itraconazol, erfolgreich in die Lecithinschicht von Emulsionen eingelagert werden (Akkar and Muller, 2003a; Akkar and Muller, 2003b; Muller et al., 2004). Die Abbildung 3-3 grenzt die Methode der direkten Einlagerung in die Lecithinschicht der Emulsionen von den anderen Wegen des

einfachen Zumischens und Schüttelns und den Umweg über organische Lösungsmittel (klassischer Weg) ab. Aus diesem direkten Prinzip ergeben sich mehrere Vorteile:

1. Industrielle Produktionsprozesse, wie sie sich für Emulsionen etabliert haben, können eingesetzt werden.
2. Es müssen keine weiteren Zusatzstoffe verarbeitet werden. Man greift auf etablierte, handelsübliche Emulsionen zurück.
3. Die Produkte können aseptisch verarbeitet oder anschließend autoklaviert werden.



**Abb. 3-3: Möglichkeiten der Arzneistoff-Inkorporation in die Lecithinschicht von Fettemulsionen: einfaches Schütteln von Arzneistoff und Emulsion ist ungenügend (links); in der Mitte ist der klassische Weg der Inkorporation über organische Lösungsmitteln dargestellt; die alternative Methode der Ko-Homogenisation (rechts) wurde für die Herstellung der Emulsionen in dieser Arbeit eingesetzt.**

Durch die Direkthomogenisation kann die unter normalen Bedingungen bestehende Beladungskapazität erhöht und somit das Applikationsvolumen von Formulierungen reduziert werden. Falls gewünscht kann der Wirkstoff allerdings auch in einer solchen Menge eingesetzt werden, dass am Ende des Produktionsprozesses noch ein Anteil des Wirkstoffes in ungelöster kristalliner Form vorliegt, der dann als Depot dient (Müller, 2001). Durch die SolEmuls<sup>®</sup>-Technologie entstehen ready-to-use-Produkte.

Bei den Arzneistoffen Omeprazol und Xenon wurde während dieser Arbeit untersucht, ob sie eine Affinität zur Lecithinschicht besitzen und ob sie sich durch Hochdruckhomogenisation stabil in Emulsionen einarbeiten lassen. Bei Amphotericin B wurde dieser Nachweis schon geführt (Schmidt, 2002). Durch Rezepturoptimierung sollte die Einlagerung noch verbessert werden.

### **3.1.4 O/W Emulsionen**

#### **3.1.4.1 De-Novo-Herstellung**

Bei einer De-Novo-Herstellung von Emulsionen wird zunächst eine Roh- oder Voremulsion hergestellt, indem der Emulgator in der wässrigen oder öligen Phase bei entsprechender Temperatur gelöst wird und die beiden Phasen mittels Mischern (z.B. einem Ultra-Turrax) vordispersiert werden. Die Voremulsion sollte eine Tröpfchengröße unter 20 µm vorweisen, da das Ergebnis der Hochdruckhomogenisation auch von der Qualität der Präemulsion abhängt (Collins-Gold et al., 1990). Die Homogenisation erfolgt dann mit Strömungsdispersiermaschinen, wie z.B. mit einem Kolben-Spalt-Homogenisator oder einem Microfluidizer<sup>®</sup>.

In dieser Arbeit wurde Lecithin im entsprechenden Öl bei 45 °C gelöst, die wässrige und ölige Phase bei gleicher Temperatur vereint und 1 min mit einem Ultra-Turrax T25 bei 9000 U/min vordispersiert. Die eigentliche Homogenisation erfolgte bei 500 bar und 45 °C für drei Zyklen.

Der Einfluß von Prozessparametern auf die Dispersität von Emulsionen ist von Lucks (1993) und Bock (1994) ausführlich untersucht worden.

### 3.1.4.2 Einarbeiten von Nanosuspensionen in handelsübliche parenterale Fetteemulsionen

Die Arzneistoffe können, wie am Beispiel Amphotericin B gezeigt wurde (Muller et al., 2004; Schmidt, 2002), ohne weitere Vorhomogenisation direkt in parenterale Emulsionen eingearbeitet werden. Diese hergestellten Amphotericin B-Emulsionen zeigten allerdings nur eine Stabilität über 14 Tage. Dies führte Schmidt (2002) auf eine unzureichende Integration des Amphotericin B zurück. Wie bereits beschrieben, kann eine vorherige Zerkleinerung die Effektivität des Verfahrens deutlich steigern. Nachdem Amphotericin B über eine Nanosuspension verarbeitet wurde, konnten die aufgetretenen Instabilitäten überwunden werden. Daher wurde in dieser Arbeit, soweit es möglich war, der zu inkorporierende Arzneistoff zunächst in eine Nanosuspension überführt, um ihn dann in verschiedene handelsübliche parenterale Fetteemulsionen mit variierender Zusammensetzung einzuarbeiten. Obwohl Fetteemulsionen schon stabile Emulsionssysteme darstellen, werden sie in dieser Arbeit auch als Ausgangs-, Basis- oder Rohemulsionen bezeichnet, da sie noch keinen Arzneistoff enthalten. Soweit nichts anderes in den einzelnen Kapiteln angegeben, erfolgte die Herstellung der Amphotericin B- und Omeprazol-Nanosuspension, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Die Amphotericin B-Nanosuspensionen wurden in einer Fantaschale in geeigneter Menge vorgelegt, mit der jeweiligen parenteralen O/W-Emulsion angerieben und weiter auf ein Endvolumen von 40 mL verdünnt. Somit entstand eine Hybrid-Dispersion aus dispergierten Öltröpfchen und dispergierten Wirkstoffkristallen in der wässrigen Phase. Nach Überführung in ein Becherglas wurde auf 45 °C temperiert. Anschließend erfolgte Hochdruckhomogenisation mit den von Schmidt (2002) erstellten Prozessparametern von 600 bar Druck, einer Produktionstemperatur von 45 °C und 10 Homogenisationszyklen. Die resultierenden Emulsionen hatten eine Konzentration von 1 mg/mL. Bei einer Tagesdosierung von 52-100 mg Amphotericin B für einen Erwachsenen von ca. 70 kg wird somit eine gemäßigte Volumenzufuhr von 52-100 mL Emulsion ermöglicht.

Zur Herstellung der Omeprazol-Emulsionen wurde den Emulsionen analog der Omeprazol-Nanosuspension Natriumhydrogencarbonat abzüglich der eingebrachten Menge durch die Arzneistoffsuspension mittels einer Pipette in Form einer Stammzubereitung hinzugefügt, d. h. 3,293 mg (bei 1 mg/mL Emulsionen), 3,226 mg (bei 2 mg/mL Emulsionen) und 3,158 mg (bei 3 mg/mL Emulsionen). Vor der Hochdruckhomogenisation wurden die Emulsionen mit einem Ultra-Turrax (9000 U/min) kurz gemischt, um daraufhin homogenisiert zu werden (1500 bar, 20 Zyklen). Aufgrund der Wärmeempfindlichkeit von Omeprazol erfolgte die

Homogenisation bei Raumtemperatur. Eine Herstellung bei höheren Temperaturen führte in Vorversuchen zu einer Abnahme des Gehalts um 75%. Durch den Homogenisationsprozess erwärmt sich die Mischung, so dass mit Eiswasser nach jedem Homogenisationsschritt wieder auf Raumtemperatur abgekühlt wurde.

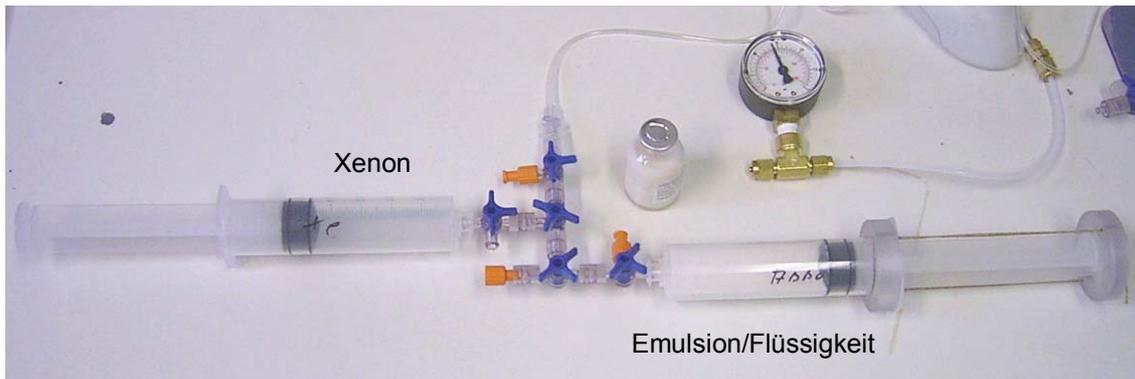
Nähere Ausführungen über eine Änderung der Rezeptur- und Prozessparameter sind in den einzelnen Kapiteln zur Rezepturentwicklung der Arzneistoffe zu entnehmen.

### **3.1.4.3 Herstellung der Xenon-beladenen Emulsionen oder Flüssigkeiten**

Da Xenon als Gas vorliegt, musste eine andere Vorgehensweise gewählt werden. Die Basisemulsionen wurden entweder über eine De-Novo-Produktion oder durch Hochdruckhomogenisation parenteraler Emulsionen (z.B. Abbolipid<sup>®</sup>) hergestellt. Gegebenenfalls wurden zusätzliche Emulgatoren zuvor in den Emulsionen bei 45 °C dispergiert oder gelöst und die Emulsionen dann der Homogenisation zugeführt. Prozessbedingungen waren hier 1500 bar und 15 Homogenisationszyklen bei einer Produktionstemperatur von 45 °C. Emulsionen, die für Tierversuche eingesetzt werden sollten, wurden gepoolt und sterilfiltriert (Minisart NML, 0,2 µm, Sartorius AG, D-Göttingen). Die Emulsionen wurden in silanisierte Glasvials (Volumen: 25 mL) abgefüllt. Extern wurden sie mit Xenon begast und den weiteren Untersuchungen unterzogen.

Zur Beladung der Proben mit Xenon wurden 15 mL Flüssigkeit in einer 50 mL Perfusorspritze mit Xenon gesättigt, indem der Gasraum der Spritze mit Xenon gefüllt wurde und die Spritze drucklos (1 bar) für ca. 1 min geschüttelt wurde. Nach Gasaustausch wurde erneut geschüttelt. Nach einer Ruhephase von 10 min erfolgte die Probenentnahme von 100 µL über ein Septum für die HPLC-Untersuchung.

Für die Beladung unter definiertem Druck wurde die Perfusorspritze über 3-Wege-Hähne mit einem Manometer und einer zweiten mit Xenon gefüllten Spritze oder einem Xenon gefüllten Beutel verbunden (Abb. 3-4). Nachdem sich der gewünschte Xenon-Partialdruck eingestellt hatte, wurde für 1 min geschüttelt.



**Abb. 3-4: Apparatur zum Begasen der Emulsionen mit Xenon**

## 3.2 Charakterisierung von Partikelgröße und –ladung

### 3.2.1 Laserdiffraktometrie (LD)

Die Laserdiffraktometrie (LD) ist ein Verfahren zur Bestimmung der Partikelgröße und wird ausführlich von Müller und Schuhmann (Müller, 1996b) beschrieben. Das Prinzip beruht auf der Beugung des Lichtes an dispergierten Teilchen. Die Beugungsmuster sind charakteristisch für die Größe der Partikel. Kleine Partikel führen aufgrund ihrer stark gekrümmten Oberfläche zu einem großen Beugungswinkel. Große Partikel hingegen beugen mit kleinen Winkeln.

Als Lichtquelle wird Laserlicht (in der vorliegenden Arbeit ein Halbleiterlaser, Wellenlänge: 750 nm) genutzt. Ein optisches System weitet das Laserlicht auf, welches durch die Probe geleitet wird. Trifft das Licht auf dispergierte Teilchen, kommt es zur Beugung: radialsymmetrische Beugungsmuster werden erzeugt (Fraunhofer-Beugung). Eine nachgeschaltete Fourierlinse bildet die Partikel unabhängig von ihrer Position in der Messzelle immer auf derselben Stelle des Multielement-Detektors ab. Die Intensität des gebeugten Lichtes wird an diesen ringförmig angebrachten Segmenten registriert und an einen Computer zur mathematischen Auswertung weitergeleitet. Das gebeugte Laserlicht kleiner Partikel trifft mit relativ größerer Intensität auf die äußeren Ringsegmente des Detektors, das einfallende Laserlicht großer Partikel mit relativ höherer Intensität hingegen auf die inneren Ringsegmente.

Die mathematischen Modelle zur Berechnung der Partikelgrößenverteilung legen sphärische Partikel zugrunde. Die meisten Systeme kommen sphärischen Teilchen sehr nahe, so dass die

Vereinfachung hinreichend genaue Ergebnisse liefert. Bei zu starken Abweichungen von der idealen Gestalt kann es zu Problemen in der Analyse und der Interpretation der Daten kommen. Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass mit der PIDS-Technik sinnvolle Daten nicht-sphärischer Submikron-Teilchen erhalten werden, trotz der Grenzen, die alle Streulichttechniken bei nicht-sphärischen Partikeln beeinhaltet (Beckmann Coulter, 2000).

Aufgrund zweier Fourierlinsen, der Verwendung von drei Detektoren (low-, mid- und high-angle-detector) und dem kombinierten Einsatz der PIDS-Technologie weist das LS 230 der Firma Coulter Electronics (D-Krefeld) einen Messbereich von 0,04 bis 2000  $\mu\text{m}$  auf. Dieser Messbereich kann in einer einzigen Messung abgedeckt werden. Die **Polarization Intensity Differential Scattering-Technologie (PIDS-Technologie)** ermöglicht die hochauflösende Bestimmung von Teilchen im Submikronbereich. Zusätzlich zur Beugung des Lichtes wird hier die gut untersuchte Mie-Theorie der Lichtstreuung von polarisiertem Licht genutzt (Beckmann Coulter, 2000). Eine Auswertung von Beugungsbildern ist in diesem Größenbereich schwierig. Kleine Teilchen hingegen geben unterschiedliche Streuungsmuster. Die Probe wird mit horizontal und vertikal polarisiertem Licht dreier verschiedener Wellenlängen (450 nm, 600 nm und 900 nm) bestrahlt. Die Detektion der Intensität des Streulichts erfolgt unter sechs Winkeln ( $60^\circ$ ,  $75^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $105^\circ$ ,  $120^\circ$  und  $146^\circ$ ) von so genannten PIDS-Detektoren. Somit wird der Messbereich zwischen 40 und 400 nm zugänglich. Die PIDS-Technologie wird stets in Kombination mit der Beugungsanalyse genutzt. Die gesammelten Rohdaten werden zusammen ausgewertet.

Die Anwendung der Laserdiffraktometrie hat eine große Bedeutung, da sie Partikelgrößen im Nanometer- und Mikrometerbereich erfasst. Für die Frage der Langzeitstabilität und der parenteralen Anwendbarkeit von Dispersionen hat das Verfahren einen hohen Stellenwert. Bei Messungen polydispenser Proben kommt es zur Überlagerung der Beugungsmuster der einzelnen Partikelgrößen. Die resultierende Gesamtverteilungskurve stellt eine Volumenverteilung dar. Die Ergebnisse werden in Prozent der Volumenverteilung angegeben; große Partikel werden infolgedessen übermäßig gewichtet. Der LD-Durchmesser  $d_{50\%}$  besagt, dass 50% aller Partikel gleich oder kleiner als die angegebenen Größe sind. In dieser Arbeit wurden vorwiegend der  $d_{50\%}$ ,  $d_{95\%}$  und der  $d_{99\%}$  als Kennzahl herangezogen. Der  $d_{50\%}$  repräsentiert die Hauptpopulation, der  $d_{95\%}$  erfasst vorwiegend größere Partikel bzw. gibt Informationen zur Aggregatbildung, und der  $d_{99\%}$ -Wert erfasst sensibel wenige Mikropartikel (Müller, 1996b). Um in dieser Arbeit die Chargen zu charakterisieren, wurde je Charge eine Probe gezogen und diese 3 mal hintereinander vermessen.

### 3.2.1.1 Einfluß der Fraunhofer- und der Mie-Theorie auf die Partikelgrößenverteilung von Nanosuspensionen

Für die Berechnung der Partikelgrößenverteilung aus den Beugungsspektren stehen verschiedene Rechenmodelle zur Verfügung. Bei der Fraunhofer Theorie werden die optischen Eigenschaften der Partikel nicht berücksichtigt und daher nur Partikelgrößen  $\geq 4\mu\text{m}$  korrekt berechnet (Rawle, 1995; Washington, 1992; Weiner, 1984). Der erforderliche Mindestdurchmesser wird mit unterschiedlichen Angaben beschrieben und reicht von  $4\cdot\lambda$  (Weiner, 1984) oder  $5\lambda$  (Rawle, 1995) bis  $d \gg \lambda$  (Zimmermann, 1995). Bei kleineren Partikeln kann es zusätzlich zur Beugung und zur Überlappung mit anderen Streulichtphänomenen kommen (Zimmermann, 1995). Eine Berechnung über die Fraunhofer Näherung ist somit unzulässig. Bei der Theorie nach Mie werden in die Berechnung auch der reale und der imaginäre Brechungsindex der Partikel einbezogen. Der imaginäre Brechungsindex ( $RI_{\text{imag}}$ ) steht für den Absorptionswert der dispergierten Teilchen. Kleinere Teilchen werden so korrekt berechnet.

Für wenige Arzneistoffe sind in der Literatur Angaben über den imaginären oder absorptiven Anteil am Brechungsindex zu finden. Dasselbe gilt für den realen Brechungsindex ( $RI_{\text{real}}$ ) von Teilchen, insbesondere, wenn sie mit Emulgatoren stabilisiert sind. Daher wurde in dieser Arbeit für die Charakterisierung der Nanosuspension das Fraunhofer-Rechenmodell gewählt. Den richtigen Messparametern für eine Mie-Auswertung nähert man sich gewöhnlich über ein Screening. Hierzu werden die Proben parallel mit unterschiedlichen Messverfahren charakterisiert, um das zutreffende Rechenmodul zu wählen. Die nähere Vorgehensweise hierzu kann Müller und Schuhmann (1996) entnommen werden.

Für die Charakterisierung der Nanosuspension in dieser Arbeit aber soll eine theoretische Überlegung reichen. Das Handbuch zum LS 230 (Coulter Electronics GmbH) gibt in einer Tabelle Hilfestellung zur Größenordnung des imaginären Brechungsindex in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Material. Für graue oder schwach pigmentierte Materialien, Metalloxide und stark gefärbte Materialien wird ein  $RI_{\text{imag}}$ -Bereich von 0,1-1,0 angegeben.

Eine Parameteroptimierung wird beispielhaft an zwei Nanosuspensionen, einer mit einer kleineren und einer mit einer größeren Partikelgrößenverteilung, durchgeführt. Die Nanosuspension 1 besitzt einen mittleren PCS-Durchmesser von 1886 nm und einen PI von 0,452 und weist somit eine breitere Verteilung auf. Die aggregierte Nanosuspension 2 wurde nicht mittels PCS vermessen, da sich die Größe der Partikel weit außerhalb des Messbereichs des PCS-Gerätes befand. Die Abbildung 3-5 zeigt die erhaltenen Verteilungskurven bei

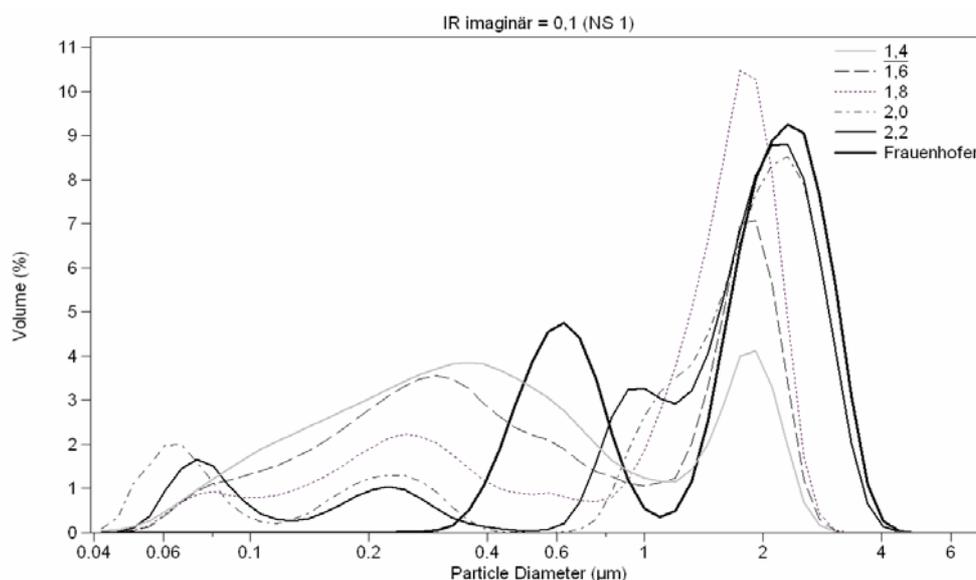
Variation des realen Brechungsindex von 1,4 bis 2,2 und konstantem Imaginäranteil von 0,1. Die Tabelle 3-1 gibt Auskunft über die entsprechend errechneten LD-Werte.

**Tab. 3-1: LD-Werte der Nanosuspension 1 mit einem imaginären Brechungsindex von 0,1 und unterschiedlichen realen Brechungsindices (BI), gemessen mit dem LS 230**

realer BI	1,4	1,6	1,8	2,0	2,2	Fraunhofer
Größe	[ $\mu\text{m}$ ]					
d 10%	0,118	0,132	0,166	0,088	0,175	0,539
d 50%	0,390	0,496	1,407	1,726	1,758	1,897
d 90%	1,842	2,031	2,136	2,797	2,793	2,923
d 95%	2,077	2,205	2,298	3,060	3,055	3,180
d 99%	2,407	2,527	2,586	3,491	3,489	3,639
d 100%	3,206	3,206	3,206	4,656	4,656	4,656

Die Volumenverteilung der Partikelpopulation wird durch den LD-Durchmesser in % angegeben. Da das Volumen und nicht die Anzahl der Partikel berücksichtigt wird, kann es zu einer Überbewertung einiger weniger großen Partikel kommen. Aber gerade deswegen hat sich die LD als eine sensible Methode, wenige Mikropartikel zu detektieren, erwiesen.

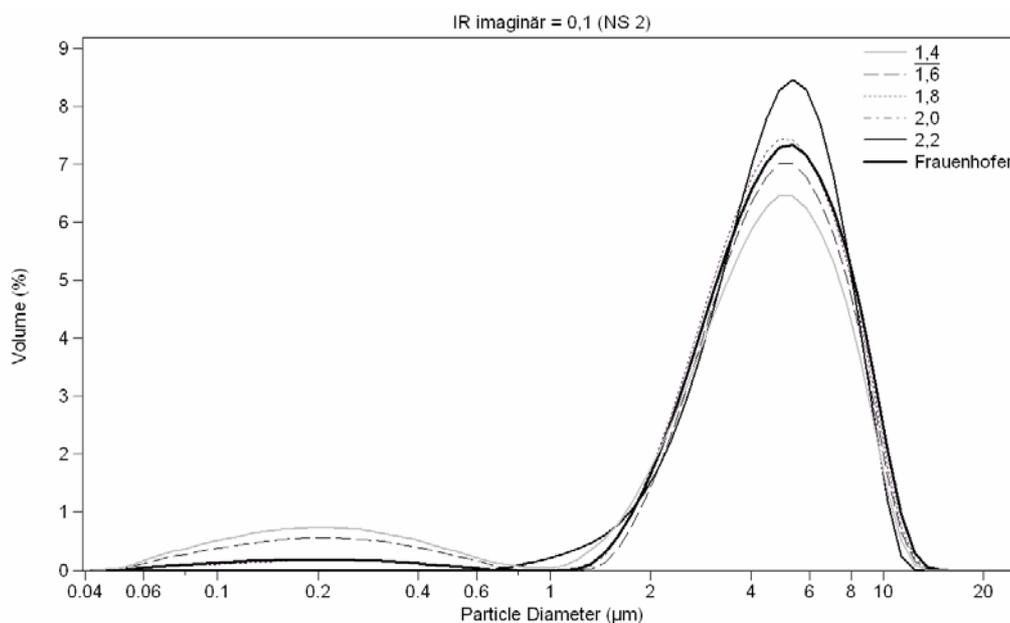
Die Berechnungen auf der Basis der Mie-Theorie bietet die Möglichkeit, Teilchen im Submikronbereich mathematisch zu erfassen. Dies ist eindeutig an der Abbildung 3-5 nachzuvollziehen. Die Partikel im Submikronbereich werden deutlich mehr gewichtet. Die Volumenverteilung wird sehr breit.



**Abb. 3-5: Volumenverteilung der Nanosuspension 1, berechnet mit einem imaginären Brechungsindex von 0,1 und unterschiedlichen realen Brechungsindices**

Die  $d_{50\%}$ -Werte für die Verteilungskurven mit einem  $RI_{\text{real}}$  von 1,4 und 1,6 liegen deutlich unter dem gemessenen PCS-Durchmesser (vgl. Tab. 3-1). Die  $d_{50\%}$ -Werte der Kurven mit einem  $RI_{\text{real}}$  von 1,8 bis 2,2 und nach Fraunhofer kommen dem PCS-Wert erheblich näher. Die Gewichtung der größeren Teilchen steigt mit zunehmendem  $RI_{\text{real}}$ . Durch die Auswertung nach Fraunhofer kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Verteilungskurven, da die Anwendbarkeit der Fraunhofer Theorie einen Minstdurchmesser der Partikel erfordert. Es entstehen zwei Populationen um 600 nm und 2,3  $\mu\text{m}$ . Partikel unter 300 nm werden nicht mehr detektiert.

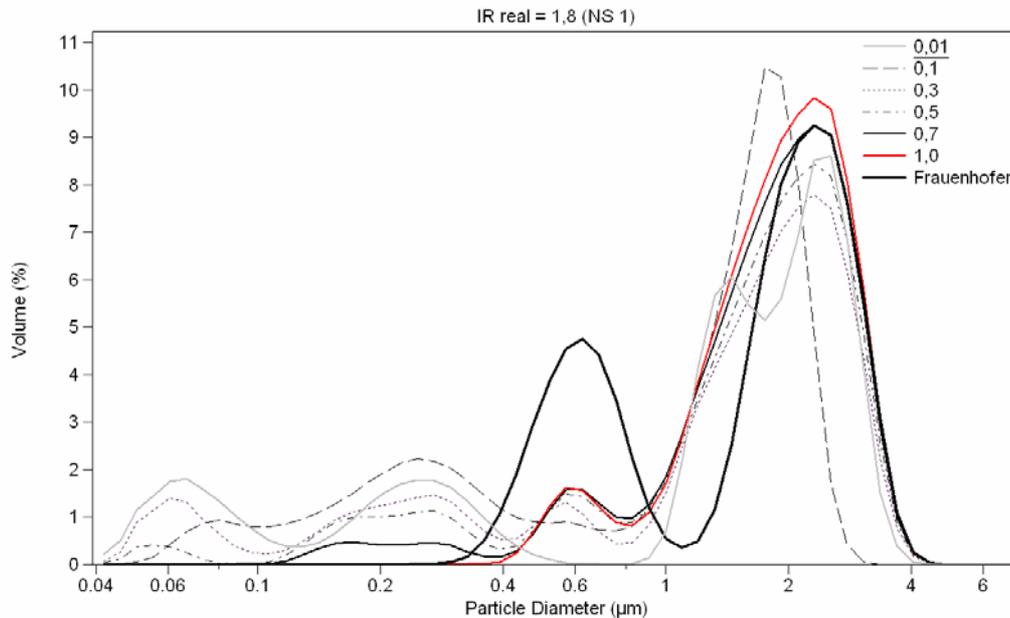
Die Fraunhofer Theorie ist bei Anwesenheit von Partikeln im Mikrometerbereich als zutreffend zu bezeichnen. Dies wird besonders deutlich bei der aggregierten Nanosuspension 2. Hier ist kein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Modellen zu erkennen (vgl. Abb. 3-6).



**Abb. 3-6: Volumenverteilung der Nanosuspension 2, berechnet mit einem imaginären Brechungsindex von 0,1 und unterschiedlichen realen Brechungsindices**

In einer weiteren Berechnung wurden die Nanosuspensionen mit einem festen imaginären Brechungsindex unter verschiedenen realen Brechungsindices analysiert.

Abbildung 3-7 zeigt die Verteilungskurven der Nanosuspension 1 bei Variation des imaginären Brechungsindex. Zu diesem Zweck wurde ein realer Brechungsindex von 1,8 gewählt. Die Verteilungskurve mit einem realen Brechungsindex von 1,8 und einem imagi-

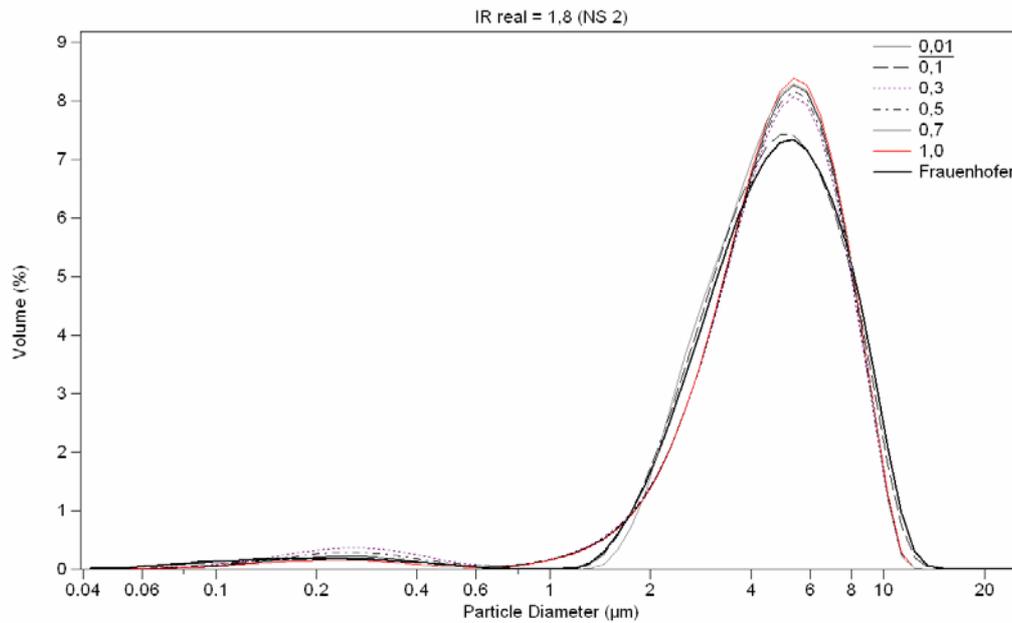


**Abb. 3-7: Volumenverteilung der Nanosuspension 1, berechnet mit einem realen Brechungsindex von 1,8 und unterschiedlichen imaginären Brechungsindices zwischen 0,01 und 1,0 und Berechnung nach Fraunhofer**

nären Wert von 0,1 weist zwar eine sehr breite Verteilung auf, zeigt jedoch ein Peakmaximum um 1,75 µm nahe dem PCS-Durchmesser.

Mit zunehmendem imaginären Brechungsindex verschieben sich die Verteilungskurve und die Peakmaxima nach rechts mit zunehmender Größe des rechten Peaks. Ab einem  $RI_{\text{imag}}$  von 1,0 werden kaum noch Partikel unter 500 nm detektiert. Die Vernachlässigung der kleinen Teilchen beginnt ab einem  $RI_{\text{imag}}$  von 0,7. Das Rechenmodell nach Fraunhofer detektiert vorwiegend die Partikel zwischen 300 nm und 5 µm. Der PCS-Durchmesser von 1886 nm zeigt eine recht gute Übereinstimmung mit dem LD 50%-Wert. Bei Nanosuspension 2 mit größeren Partikeln spielen die imaginären Brechungsindices eine untergeordnete Rolle. Die Teilchengrößenverteilungen sind fast identisch (vgl. Abb. 3-8).

Auf das Finden und Anwenden eines optimierten Rechenmoduls und die somit exakte Partikelgrößenbestimmung der Nanosuspensionen wurde in dieser Arbeit verzichtet. Vielmehr ging es um den Vergleich der einzelnen Rezepturen untereinander. Da die Nanosuspensionen zur Weiterverarbeitung gedacht waren und eine weitere Partikelbestimmung mittels PCS und Mikroskopie erfolgte, ist eine Anwendung der Theorie nach Fraunhofer ausreichend.



**Abb. 3-8: Volumenverteilung der Nanosuspension 2, berechnet mit einem realen Brechungsindex von 1,8 und unterschiedlichen imaginären Brechungsindices zwischen 0,01 und 1,0 und Berechnung nach Fraunhofer**

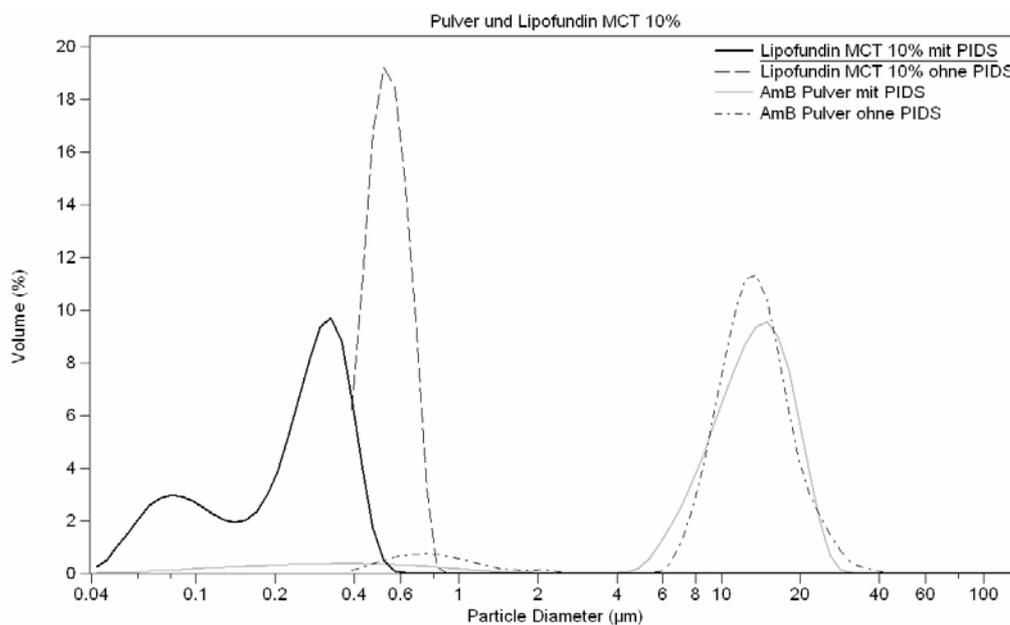
### 3.2.1.2 Charakterisierung der Emulsionen

Die Auswertung der Emulsionen erfolgte nach der Mie-Theorie mit PIDS ( $RI_{\text{real}}$ : 1,456;  $RI_{\text{imag}}$ : 0,01). Müller und Schuhmann (1996) erhielten für parenterale Fettemulsionen mit einzusetzenden Werten für den realen Brechungsindex von 1,46 und einen absorptiven Wert von 0,01 die besten Ergebnisse. Alle Messungen erfolgten nach geeigneter Probenverdünnung im wässrigen Dispersionsmedium (Brechungsindex 1,332). Mit einer Probe wurden drei aufeinander folgende Messungen durchgeführt.

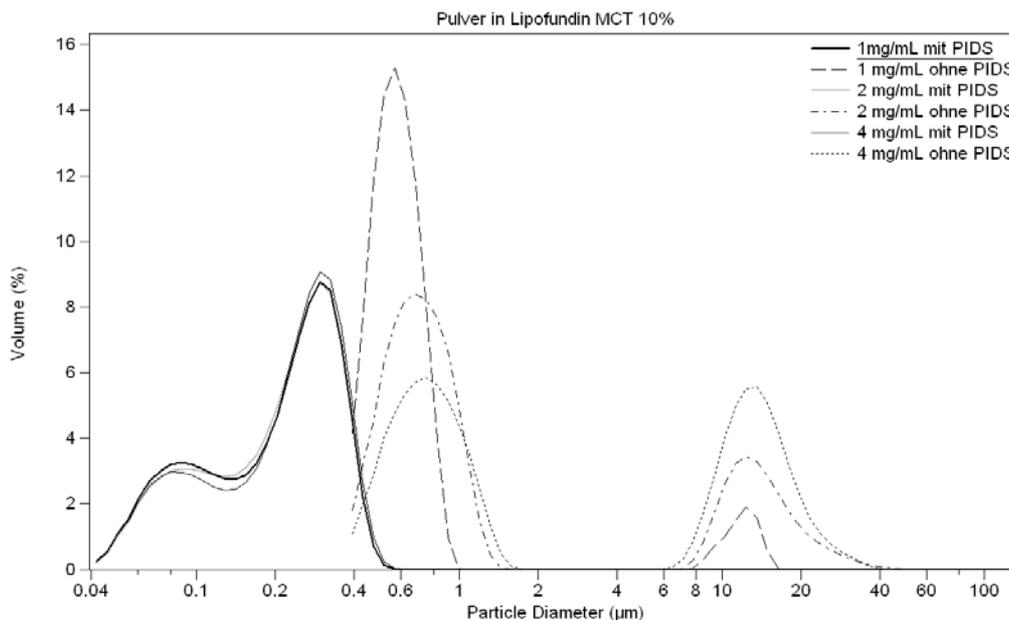
Für parenterale Emulsionen stellt die Laserdiffraktometrie ein wertvolles Messverfahren dar, da Mikropartikel  $>5 \mu\text{m}$  als problematisch bezüglich möglicher Kapillarblockade gesehen werden. Teilchengrößen bis ca.  $0,4 \mu\text{m}$  werden überwiegend durch die PIDS-Technologie erfasst. Die PIDS-Daten geben für Teilchen bis  $0,8 \mu\text{m}$  zusätzliche Informationen zu den Intensitätsverteilungen der Laserdiffraktometrie. Die Analytik wird somit in diesem Bereich genauer. Beim LS 230 und der entsprechenden Software (LS Particle Sizer Analyzer, Version 2.9.40.0) ist es möglich, mit und ohne PIDS zu messen und auszuwerten. Um die Charakterisierung der untersuchten Emulsionssysteme besser zu verstehen, aber auch um die

Grenzen aufzuweisen, wurden beispielhafte Untersuchungen mit Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10%, Amphotericin B-Pulver und 2,5%iger Amphotericin B-Nanosuspension durchgeführt.

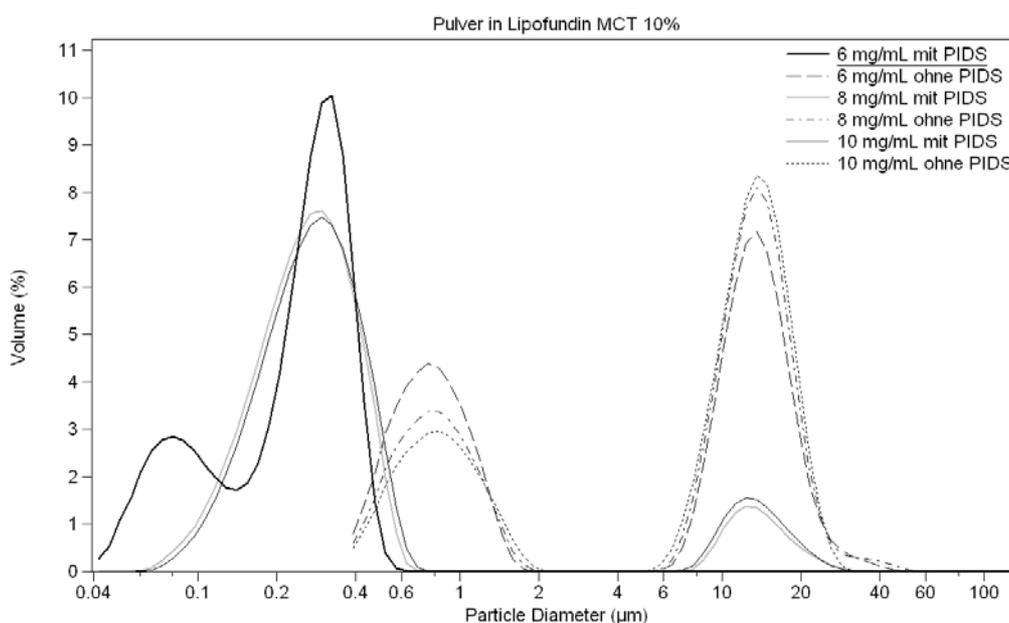
Zunächst wurde Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10% mit verschiedenen Konzentrationen des reinen Amphotericin B-Pulvers versetzt, durch Vortexen vermischt und umgehend mittels LD nach Mie vermessen ( $RI_{\text{real}}$ : 1,456;  $RI_{\text{imag}}$ : 0,01). Die Messung und Auswertung erfolgte sowohl mit PIDS als auch ohne PIDS. Die Abbildungen 3-9 charakterisiert die Lage der Peaks des reinen Pulvers und Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10%. Die Abbildung 3-10 zeigt die Ergebnisse der Zumischungen in den Konzentrationen 1-10 mg/mL (0,1-1%) Amphotericin B zur Emulsion. Die Konzentrationsangabe bezieht sich auf die Endkonzentration im Emulsionssystem, nicht auf die disperse Ölphase.



**Abb. 3-9: Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10% und Amphotericin B-Pulver mit PIDS (linke Kurven) und ohne PIDS (rechte Kurven)**



**Abb. 3-10a: 1-4 mg/mL Gehalt an Amphotericin B-Pulver**



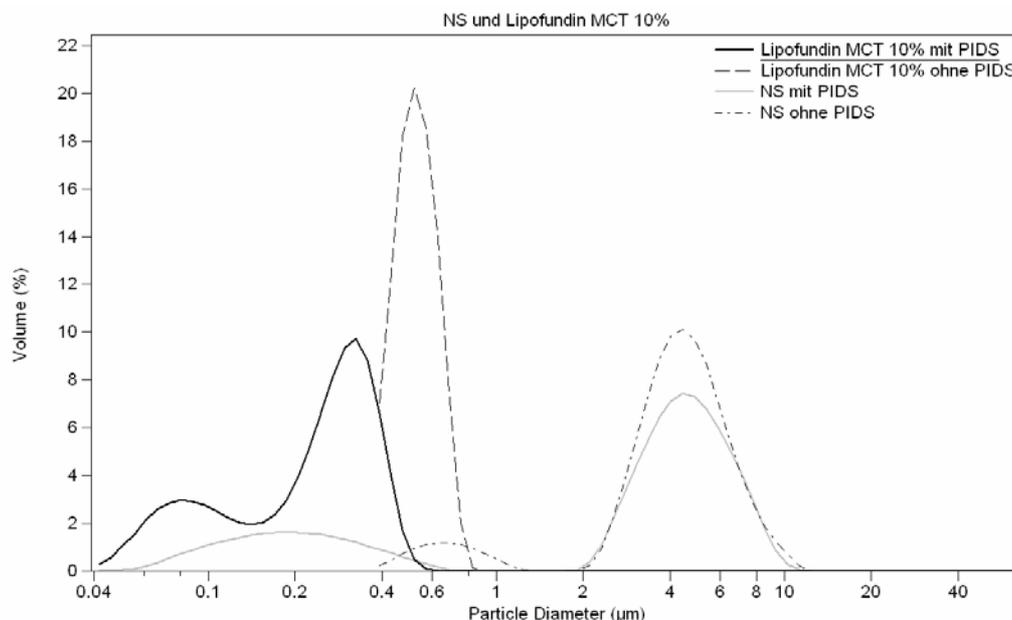
**Abb. 3-10b: 6-10 mg/mL Gehalt an Amphotericin B-Pulver**

**Abb. 3-10: Zumischung von Amphotericin B-Pulver zu Lipofundin® MCT 10%,  
Charakterisierung mit PIDS (linke Kurven) und ohne PIDS (rechte Kurven)**

Die Verteilungskurven zeigen deutlich eine Verschiebung zu kleineren Werten, wenn mit PIDS gemessen wurde. Bis zu einer Zumischung von 6 mg/mL liegt eine bimodale Verteilung im Submikronbereich vor. Die Zumischung der größeren Pulverpartikel wird allerdings nicht erkannt. Der Größenunterschied der kleinen Hauptpopulation der Emulsion zu den großen

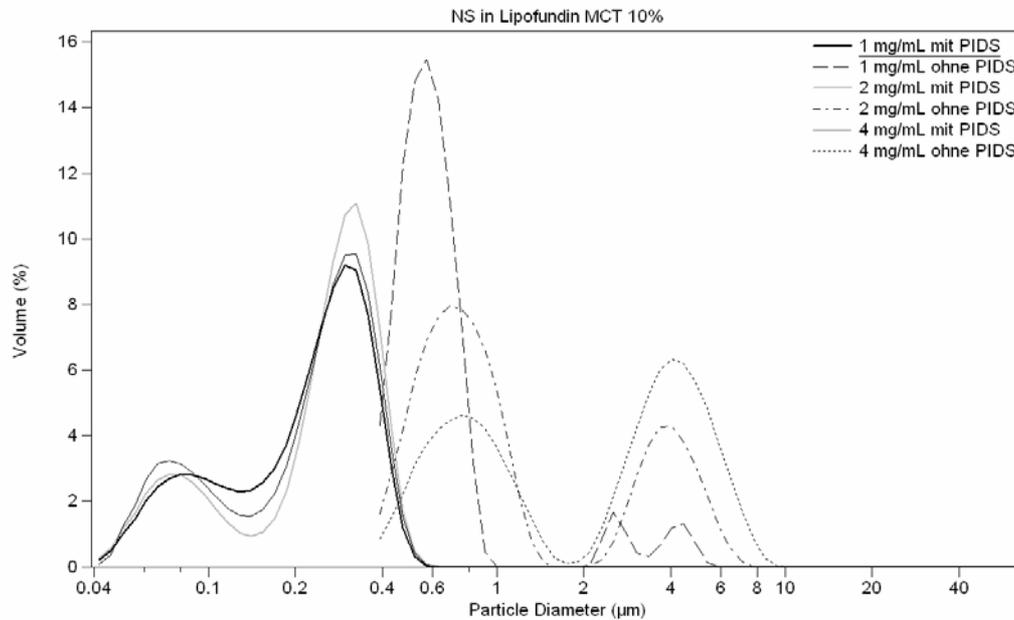
Amphotericin B-Teilchen und die Konzentrationsdifferenz ist zu groß. Das Pulver wird erst in einer Zumischung von 8-10 mg/mL wahrgenommen, also in einer 10fach höheren Menge, als in die Emulsionen normalerweise eingearbeitet wurde (Standardkonzentration: 1 mg/mL). Ohne PIDS fallen die Volumenverteilungen der Emulsionen deutlich größer aus. Ab der ersten Zumischung (1 mg/mL) entsteht eine bimodale Verteilung mit einer stetig größer werdenden Population um 12-15  $\mu\text{m}$ , die die Hauptpopulation des Amphotericin B-Pulver charakterisiert. Mit steigender Konzentration großer Partikel wird der Peak um 15  $\mu\text{m}$  immer größer. Der Grund liegt bei der stärkeren Gewichtung der größeren Partikel. Es ist somit sehr von der Fragestellung abhängig, ob mit oder ohne PIDS-Technologie gemessen werden sollte. Entscheidend bei parenteralen Emulsionen ist der Submikronbereich. Messungen mittels PCS und Mikroskopie bestätigen den Größenbereich der Hauptpopulation, der durch die PIDS-Analyse errechnet wurde. Die Versuche zeigen allerdings auch, dass eine Untersuchung auf eventuell vorhandene größere Partikel mittels Mikroskopie unerlässlich bleibt.

Eine Zumischung von einer Amphotericin B-Nanosuspension zu Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10% bestätigt diese Beobachtung (Abb. 3-11 zeigt die Lage der Peaks der Nanosuspension und von Lipofundin<sup>®</sup> und Abb. 3-12 zeigt die Zumischungen). Es ist auch hier zu beachten, dass die prozentuale Angabe der Zumischung das Verhältnis zum Gesamtsystem wiedergibt und nicht auf die disperse Phase bezogen wurde.

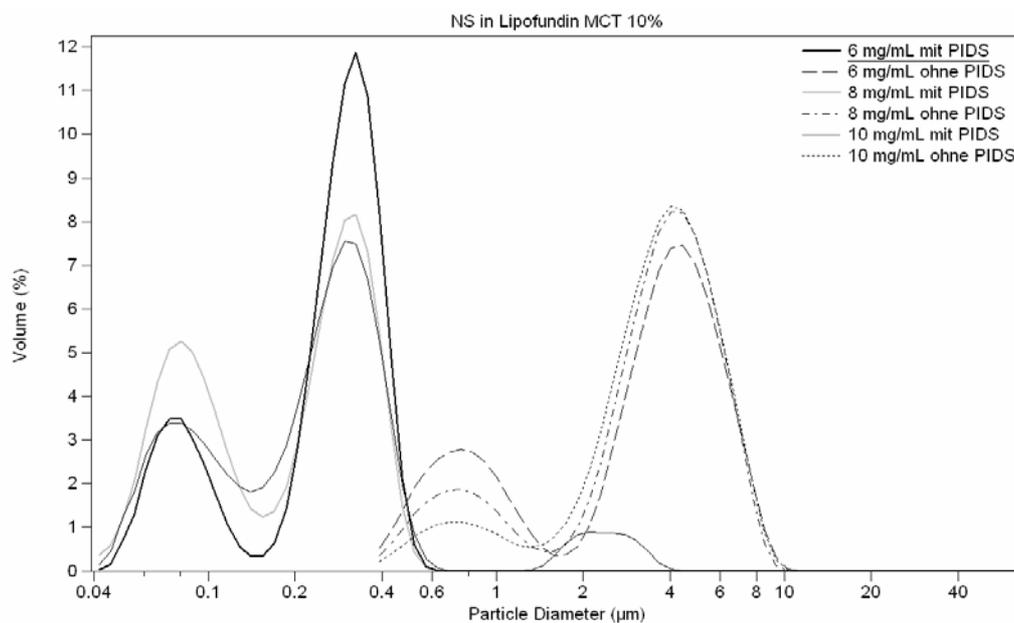


**Abb. 3-11: Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10% und Nanosuspension mit PIDS (linke Kurven) und ohne PIDS (rechte Kurven)**

Bei dieser Nanosuspension handelte es sich um eine agglomerierte Nanosuspension, mit einer deutlichen Partikelgrößenverschiebung zum Mikrometerbereich. Die Hauptpopulation wird von beiden Analysevarianten gleichermaßen erfasst, allerdings wird mit PIDS der Bereich unter einem Mikrometer deutlicher wahrgenommen.



**Abb. 3-12 a: 1-4mg/mL zugemischte Nanokristalle (berechnet als Feststoff)**



**Abb. 3-12 b: 1-6 mg/mL zugemischte Nanokristalle (berechnet als Feststoff)**

**Abb. 3-12: Zumischung von 1-10 mg/mL einer agglomerierten Nanosuspension zu Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10%, Charakterisierung mit PIDS (linke Kurven) und ohne PIDS (rechte Kurven)**

Fast alle Kurven zeigen eine bimodale Verteilung. Bei Auswertung mit PIDS beruht diese auf den Populationen der Emulsion. Außerdem geht aufgrund desselben Größenbereichs und der geringen Konzentration die Submikronpopulation der Nanosuspension im Rauschen der Emulsion unter. Ohne PIDS wird die Zumischung der Nanosuspension ab 1 mg/mL erkannt, auch wenn hier der auftauchende Doppelpeak zwischen 2 und 6  $\mu\text{m}$  von der wahren Größenverteilung entfernt ist. Es tauchen zwei Verteilungen auf, eine für die Population der Emulsion und eine für die Nanosuspension. Ab 2 mg/mL verschieben sich die Peaks zugunsten der Nanosuspensionspopulation. Der Peak der Emulsion wird fälschlicherweise nach rechts verschoben. Hier wird erneut deutlich, dass bei der Laserdiffraktometrie größere Teilchen übermäßig gewichtet werden. Ab einer Zumischung von 10 mg/mL werden auch mit PIDS die Teilchen der Nanosuspension anfänglich erfasst.

Die Untersuchungen machen deutlich, dass die Laserdiffraktometrie ein ausgezeichnetes Verfahren zur Charakterisierung von parenteralen Fettemulsionen und Nanosuspensionen darstellt. Zu beachten sind jedoch die vorangestellte Fragestellung und das Auswählen passender Messparameter. Durch das starke Verdünnen der Proben im Messmedium kann es zu Auflösungserscheinungen kommen, wenn die Sättigungslöslichkeit unterschritten wird. Obwohl bei den oben gezeigten Messungen die Sättigungslöslichkeit zum Teil unterschritten wurde, traten keine Auflösungserscheinungen im Messzeitraum auf.

Eine zusätzliche Charakterisierung mittels PCS und Mikroskopie ist unerlässlich, um einen vollständigen Überblick über die Systeme zu erlangen. Gerade im Falle der Einarbeitung von Pulver oder Nanosuspensionen in parenterale Emulsionen, im gezeigten Beispiel von Amphotericin B in Konzentrationen unter 8-10 mg/mL, ist das Einsetzen zusätzlicher Messmethoden, wie des Mikroskops, zum Detektieren einiger größerer Partikel in einer kleinen Gesamtpopulation von großer Bedeutung.

### **3.2.2 Photonkorrelationsspektroskopie (PCS)**

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) handelt es sich um ein mittlerweile weit verbreitetes Messverfahren kolloidaler Systeme, das in der Literatur bereits ausführlich beschrieben ist (Müller, 1983; Müller and Heinemann, 1992; Müller, 1996b). Bei dem Messverfahren handelt es sich aufgrund von Schwankungen in der detektierten Intensität des Laserlichts um ein dynamisches Streulichtverfahren. Die Intensitätsschwankung kann auf Grund der Diffusion der Partikel durch das Diffusionsmedium erklärt werden. Große Partikel haben eine größere Trägheit als kleine Partikel. Daher werden kleinere Partikel durch die

Brownsche Molekularbewegung der sie umgebenen Flüssigkeitsmoleküle des Messmediums zu einer schnelleren Bewegung angeregt als die trägeren Teilchen, die sich langsamer bewegen. Dadurch kommt es zu zeitabhängigen Intensitätsschwankungen des Laserlichts. Der Messbereich der PCS liegt zwischen ca. 3 nm und 5 µm. Die Detektion der Intensitätsschwankungen erfolgt normalerweise in einem Winkel von 90°; eine Mehrwinkelanalyse kann aber ebenfalls durchgeführt werden. Man erhält einen mittleren Teilchendurchmesser (Z-average) und den Polydispersitätsindex (PI) als ein Maß für die Breite der Verteilung. Der PI ist dimensionslos und liegt zwischen 0 und 1. In der Praxis wird ein PI bis 0,06 als monodispers bezeichnet. Bis 0,2 gilt er als Maß für eine enge Verteilung, und eine breite Verteilung liegt bei Werten zwischen 0,25 und 0,5 vor (Schuhmann, 1995).

Sind die Partikel zu groß oder weisen sie eine zu große (oder zu geringe) Dichte im Vergleich zum Messmedium auf, sedimentieren die Teilchen (oder sie rahmen auf) und das Ergebnis wird verfälscht, da diese Partikel nicht mehr korrekt erfasst werden. Es kommt zur Erfassung der Gesamtgeschwindigkeit, die sich aus der Diffusions- und Sedimentationsgeschwindigkeit zusammensetzt.

Die Intensitätsschwankungen werden durch einen Photomultiplier erfasst und mit Hilfe eines Korrelators ausgewertet. Dieser berechnet eine Autokorrelationsfunktion, die an eine theoretische Korrelationsfunktion  $g(\tau)$  angepasst wird. Die mathematische Abweichung zwischen der gemessenen und der theoretischen Korrelationsfunktion spiegelt sich im PI wieder. Der PI ist 0, wenn die beiden Funktionen identisch sind, und nimmt größere Werte an, je mehr die Funktionen voneinander abweichen.

Über die theoretische Korrelationsfunktion wird die Diffusionskonstante errechnet. Durch Einsetzen der Diffusionskonstante in die Stokes-Einstein-Gleichung kann der Radius (r) bzw. der Durchmesser der Teilchen errechnet werden, wobei von kugelförmigen Teilchen ausgegangen wird:

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

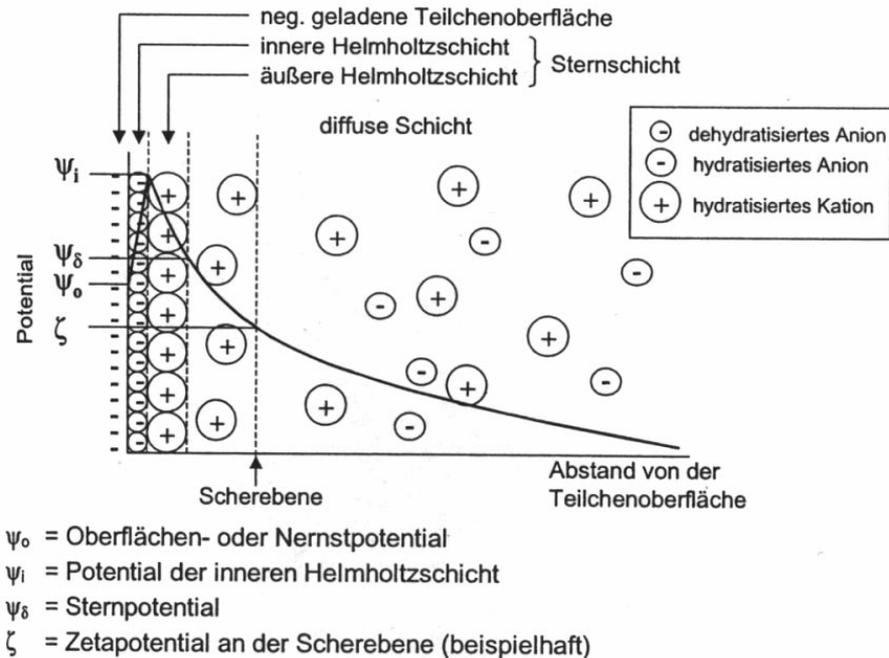
- r: mittlerer Teilchenradius
- k: Boltzmannkonstante
- T: absolute Temperatur
- $\eta$ : dynamische Viskosität
- D: Diffusionskonstante

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben mit einem Zetasizer 4 (Malvern Instruments, UK, Software Version Zetasizer 4 + 7032 (Advanced)) vermessen mit dem auch das Zetapotential bestimmt werden kann. Standardmäßig wurde im 90°-Winkel mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm gemessen. Die Proben wurden vor dem Vermessen mit Reinstwasser auf die erforderliche Konzentration zum Erreichen der vorgeschriebenen Streulichtintensität verdünnt. Somit wurde eine Mehrfachstreuung weitgehend vermieden. Es wurden 10 Einzelmessungen á 20 s durchgeführt. Die Taktzeit (sample time) wurde von der Software automatisch festgelegt und lag bei den Emulsionen gewöhnlich in einem Bereich zwischen 17 und 20  $\mu$ s.

### **3.2.3 Zetapotential und Laser-Doppler-Anemometrie**

Das Zetapotential dient als Maß für die Stabilität von dispersen Systemen. Es bestimmt den Grad der Abstoßung zwischen benachbarten und ähnlich geladenen Partikeln. Wird ein bestimmter Wert unterschritten, kann ein System aus elektrostatischer Sicht zu Aggregation oder Ausflockung neigen (Müller, 1996b).

Die meisten dispergierten Partikel besitzen eine negative Oberflächenladung (Nernst Potential). Auf diese Partikeloberfläche adsorbieren durch van-der-Waals-Wechselwirkungen negative Ionen, die dadurch ihre Hydrathülle verlieren. Diese Monoschicht aus fixierten negativen dehydratisierten Ionen wird innere Helmholtzschicht genannt. Die darauf folgende äußere Helmholtzschicht besteht aus fixierten hydratisierten positiven Ionen. Die beiden Helmholtzschichten zusammen bezeichnet man als Sternschicht. Die Sternschicht kann nicht abgeschert werden. Um die restliche Ladung der negativen Teilchenoberfläche und des negativen Ladungsüberschusses aus der inneren Helmholtzschicht zu kompensieren, umgeben frei bewegliche Gegenionen das Teilchen in der so genannten diffusen Schicht. Nahe an der Teilchenoberfläche ist zunächst die Konzentration an positiven Ionen hoch. Mit zunehmendem Abstand von der Partikeloberfläche steigt die Konzentration an negativen Ionen, bis ein Konzentrationsausgleich erfolgt ist (vgl. Abb.3-13). Eine genaue Beschreibung der Phänomene von abstoßenden und anziehenden Kräften liefert die DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek)-Theorie (Davis, 1982; Matthews and Rhodes, 1970; Müller, 1996a).



**Abb. 3-13: Schematische Darstellung der Ladungsverhältnisse eines dispergierten Teilchens mit negativer Oberfläche in Elektrolytlösung und der daraus resultierende Potentialverlauf nach dem Sternmodell (Müller, 1996a)**

Legt man nun an eine Dispersion mit diffundierenden Teilchen ein elektrisches Feld an, so erfahren die Teilchen eine Beschleunigung auf die entgegengesetzt geladene Elektrode. Es können nur Partikel beschleunigt werden, die durch die Feldeinwirkung eine Ladungsverschiebung erfahren, wodurch ein Dipoleffekt erzeugt wird, oder Partikel, bei denen ein Teil der diffusen Schicht durch Diffusionsbewegungen abgestreift wurde, womit ihre Neutralität verloren ging. Die Beschleunigung der Teilchen im elektrischen Feld führt zu einer zunehmenden Reibungskraft, wodurch die diffuse Schicht abgestreift wird. Ein ausreichend starkes Feld erzielt das komplette Abstreifen bis kurz vor die Sternschicht, die fixiert ist und somit nicht abgestreift werden kann. Das Potential an der Scherebene nach dem Abstreifen wird Zetapotential (ZP) genannt.

Mittels der **Laser Doppler Anemometrie (LDA)** wird die Partikelgeschwindigkeit aufgrund der Streuung von Laserlicht erfasst. Passieren die Partikel einen Laserstrahl, wird das Licht gestreut. Aufgrund des Dopplereffekts kommt es zu einer Frequenzverschiebung. Aus der gemessenen Frequenzverschiebung kann die Partikelgröße wie folgt berechnet werden:

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

$f_d$ : Dopplerfrequenz

$\Theta/2$ : Winkel, unter dem das Streulicht detektiert wird

$\lambda$ : Wellenlänge des Laserlichts

$v$ : Partikelgeschwindigkeit

Die ermittelte Partikelgeschwindigkeit lässt sich in die Gleichung zum Errechnen der elektrophoretischen Mobilität (EM) einsetzen:

$$EM = \frac{v \text{ [cm / s]}}{E \text{ [esuV / cm]}}$$

E: Feldstärke

Die elektrische Mobilität lässt sich nun mittels der Gleichung nach Helmholtz-Smoluchowski in das Zetapotential (ZP [esu Volt]) konvertieren:

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

EM: Elektrophoretische Mobilität des Partikels in cm/s pro esu Volt/cm

$\eta$ : Viskosität des Dispersionsmediums in Poise bei der Messtemperatur

$\varepsilon$ : Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmediums bei Messtemperatur

$4\pi$ : Konstante

Die obige Formel gilt ausschließlich für die Verwendung von esu-Einheiten (electrostatic units). Unter Verwendung von SI-Einheiten kann die EM mit einem Faktor von 12,85 multipliziert werden, um das entsprechende Zetapotential in mV zu erhalten. Dieser Faktor gilt für eine Temperatur von 25 °C bei der Wasserviskosität von 0,894 mPas und einer Dielektrizitätskonstante von 78,54:

$$ZP [mV] = 12,85 \cdot EM \frac{[\mu m / s]}{V / cm}$$

Die Messung des Zetapotentials im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mit dem Zetasizer 4 in der Messzelle ZET 5104 (Firma Malvern Instruments, UK-Malvern). Beim Zetasizer wird der von einem Helium-Neon-Laser erzeugte Strahl durch einen Strahlenteiler in zwei Strahlen aufgeteilt, die durch zwei Spiegel in der Messzelle an der stationären Schicht zum Schnitt gebracht werden. Einer der Teilstrahlen wird dabei um eine Frequenz von 250 Hz verschoben, so dass im Schnittpunkt ein durchlaufendes Interferenzstreifenmuster entsteht. So kann zusätzlich Aufschluss über die Bewegungsrichtung der Partikel und damit das Vorzeichen des Potentials gewonnen werden. Der Schnittwinkel der beiden Laserstrahlen ( $\Theta$ ) geht in die Berechnungsformel der Dopplerfrequenz ( $f_d$ ) ein. Das eigentliche Messvolumen ist das Schnittvolumen der beiden Strahlen. Das gestreute Licht der sich in Vorwärtsrichtung bewegenden Partikel wird beim Passieren des Schnittvolumens von einem Photomultiplier detektiert. Dieses Intensitätssignal wird von einem Korrelator in eine Korrelationsfunktion (Intensität in Abhängigkeit zur Zeit) gewandelt und diese mittels Fouriertransformation in eine Anzahlverteilung als Funktion der Frequenz umgeformt. Detaillierte Beschreibungen des Zetapotentials und der Vorgehensweise zum Vermessen von Proben können (Müller, 1996a) entnommen werden.

Als Medium wurde in der Regel destilliertes Wasser verwendet, das mit Kochsalzlösung auf eine Leitfähigkeit von 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  eingestellt wurde, oder Originaldispersion. Bei ausgewählten Proben wurde zusätzlich das Zetapotential in Wasser gemessen, das zuvor auf die Leitfähigkeit und den pH-Wert der Emulsion eingestellt wurde, um die Stabilität in der Emulsionsgrundlage abschätzen zu können. Bei dem Messmedium Wasser werden die Viskosität und die Dielektrizitätskonstante in einem Auto-Modus der gegebenen Messtemperatur angepasst. Wird das Messmedium geändert, so müssen diese Parameter ebenfalls manuell angepasst werden. Die Feldstärke betrug 20 V/cm. Jede Probe wurde mindestens dreimal vermessen. Der pH-Wert der Messlösung wurde mit einem pH-Meter CG840 mit Glaselektrode (Mettler-Toledo, D-Steinbach) bestimmt. Die Leitfähigkeitsmessungen erfolgten mit einem Konduktometer InoLab<sup>®</sup> Cond Level 1 mit der Standard-Leitfähigkeitsmesszelle TetraCon<sup>®</sup> 325 (WTW GmbH, D-. Weilheim).

Leitfähigkeitsbedingte Änderungen des Zetapotentials, die als Unterschiede in der Oberflächenladungsdichte fehlinterpretiert werden können, werden beim Messen in Leitfähigkeitswasser (50  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) ausgeschlossen, da dort ein Plateau des Zetapotentials

erreicht wird. Maßgeblich für die Stabilität einer Formulierung ist die Ausdehnung der diffusen Schicht im Medium der Originaldispersion, der dort vorherrschenden Elektrolytart und -menge. Aus den erhaltenen Messwerten kann dann bezüglich der elektrostatischen Stabilisierung eine Stabilitätsabschätzung nach Ney, ursprünglich für Suspensionen im Originaldispersionsmedium ausgelegt, vorgenommen werden. Vereinfacht kann man bei Emulsionen mit einem wasserunlöslichen Tensid das Dispersionsmedium nachahmen, indem man das zur Isotonisierung verwendete Glycerol, meist 2,5%ig, mit Wasser versetzt (Müller, 1996a).

Bei Emulsionen ist neben der elektrostatischen Abstoßung die Festigkeit des Tensidfilms ein wichtiges Kriterium für die physikalische Stabilität. Beim Aufeinanderprallen zweier Tropfen muss der Tensidfilm ausreichend stabil sein, damit sie voneinander abprallen und nicht koaleszieren. Diese Filmfestigkeit ist in den üblichen Fettemulsionen gewährleistet. Erfahrungswerte mit Lecithin-stabilisierten Emulsionen zur parenteralen Ernährung zeigen, dass ein Minimum von betragsmäßig 30 mV für stabile Emulsionen benötigt wird (Müller, 1996a). Emulsionen in einem Bereich von 15-20 mV sind über einige Wochen bis wenige Monate stabil. Mit einem Potential von ca. 5 bleiben Emulsionen gewöhnlich nur für wenige Tage stabil. Kommt ein anderer Stabilisierungsmechanismus hinzu, z.B. der Einsatz von sterischen Stabilisatoren, können wenige mV für eine gute physikalische Stabilität ausreichend sein.

Es sei darauf hingewiesen, dass für die Stabilitätsabschätzung unerheblich ist, ob eine positive oder negative Ladung vorliegt. Nur der absolute Wert ist massgeblich.

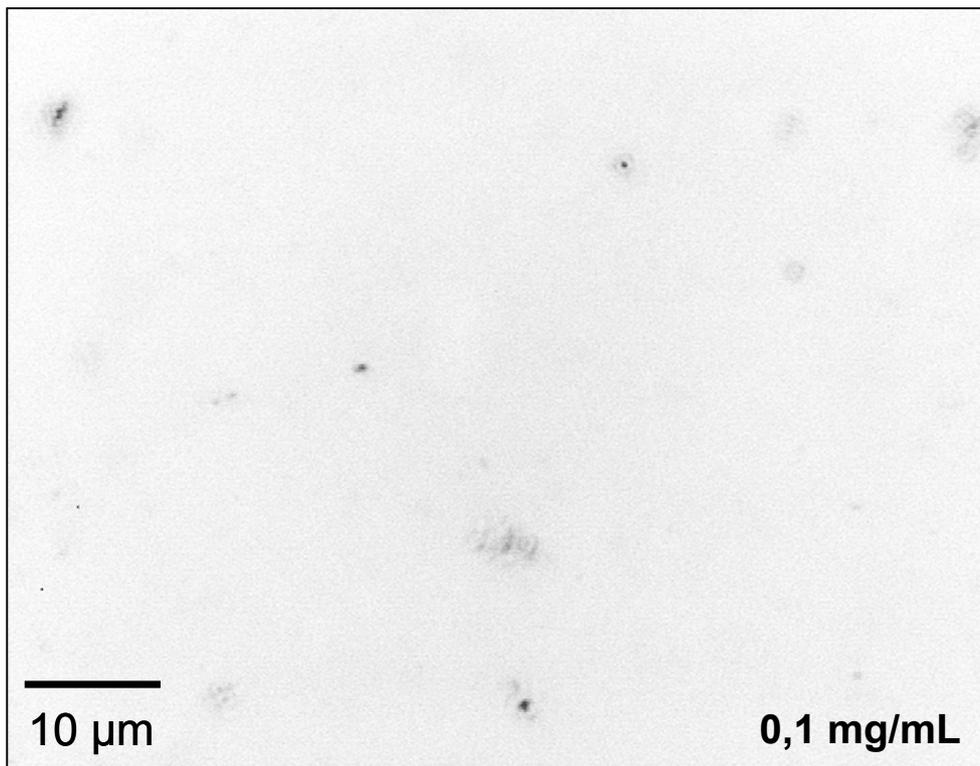
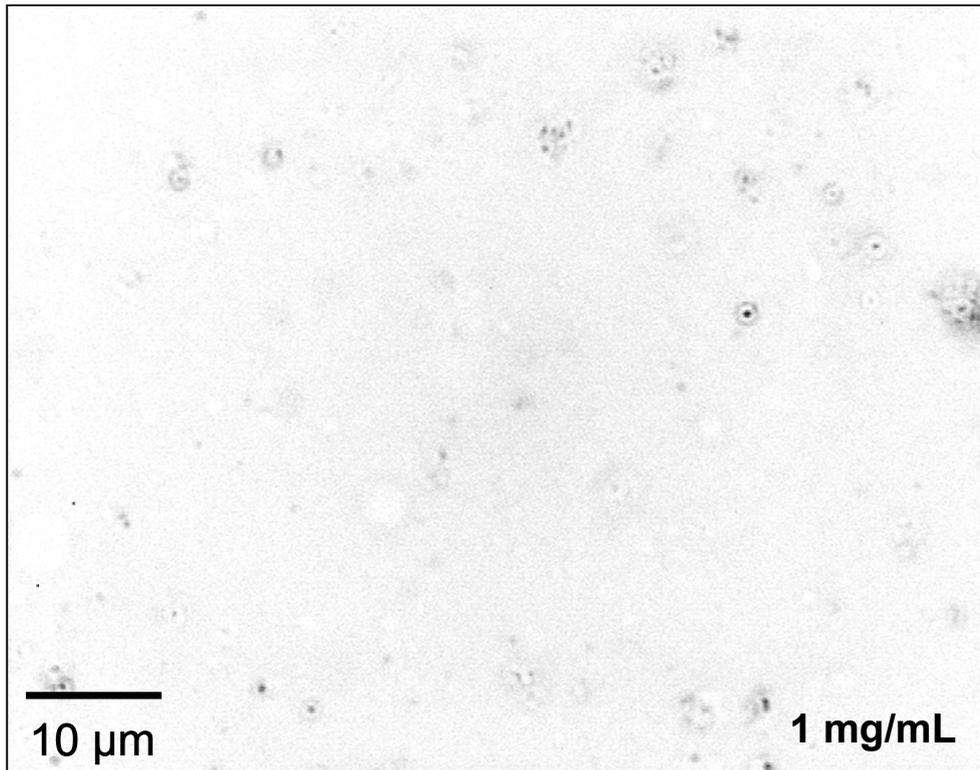
Die Art und Anzahl der Gegenionen beeinflusst die Stabilität der Emulsionssysteme. Eine hohe Konzentration an Gegenionen oder schon eine geringe Anzahl mehrwertiger Ionen in der diffusen Schicht erreichen einen schnellen Ladungsausgleich und erniedrigen somit das Zetapotential zum Teil erheblich. Als Beispiel ist hier die Zumischung von Elektrolytlösungen, citrat- und phosphathaltigen Pufferlösungen zu parenteralen Fettemulsionen genannt, die zu Instabilitäten führt. Der pH-Wert des Dispersionsmediums kann ebenso Einfluss auf das Zetapotential und somit die Stabilität der Emulsionen nehmen. Der Ionisierungsgrad des emulgierenden Agens auf der Tröpfchenoberfläche kann stark mit dem vorhandenen pH-Wert durch Assoziation oder Dissoziation der funktionellen Gruppen variieren (Davis, 1982). Somit ist beim Vorliegen solcher Systeme, z.B. bei Stabilisierung durch Lecithin, die Angabe des pH-Werts des Messmediums ein wichtiges Kriterium zur

Beurteilung des gemessenen Zetapotentials und für die daraus folgende Stabilitätsabschätzung.

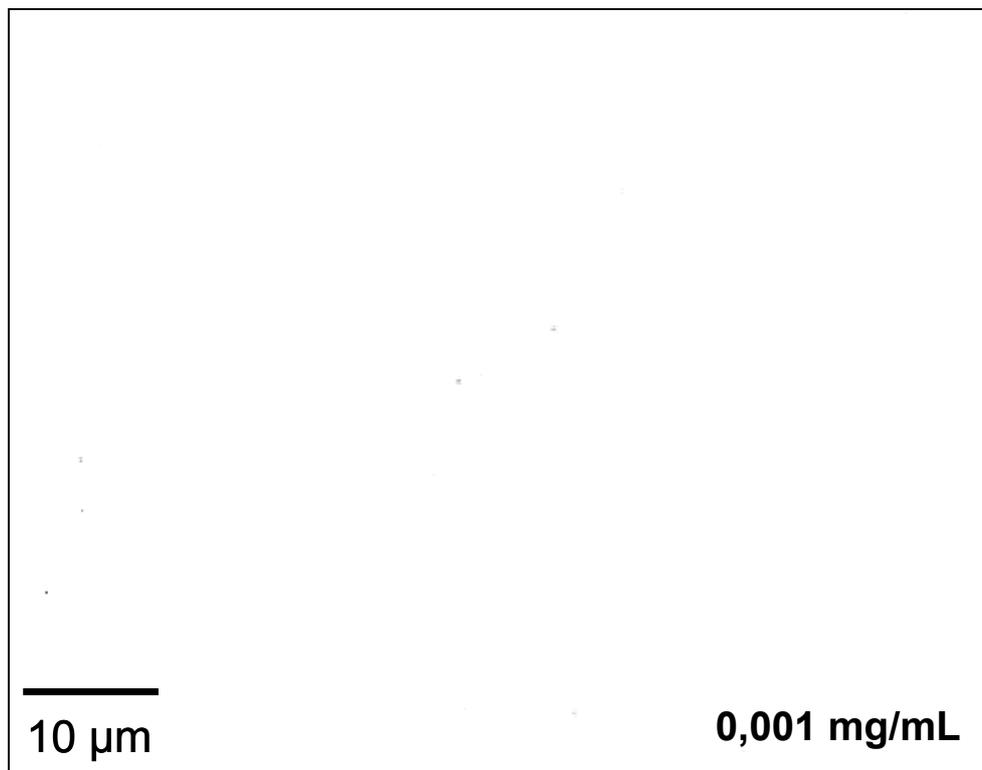
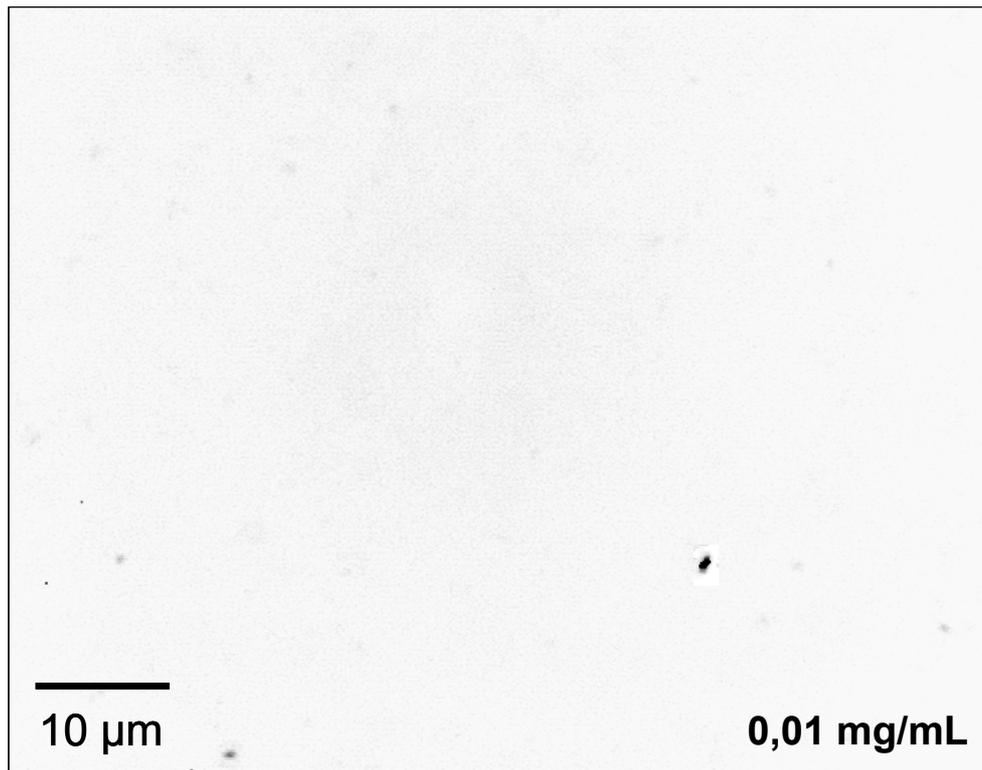
### 3.3 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie gibt nicht nur einen Überblick über die Partikelgröße der zu untersuchenden Dispersionen (Emulsionen und Nanosuspensionen), sondern erleichtert auch das Detektieren von nicht gelösten Arzneistoffkristallen oder wenigen Mikropartikeln neben einer Hauptpopulation mit geringerer Größe. Diese Mikropartikel oder Arzneistoffkristalle gehen im Grundrauschen der ebenfalls feinen Dispersionstropfen der Emulsionen bei Charakterisierung mittels LD und PCS unter oder lassen sich im Falle einer geringen Konzentration nicht mehr nachweisen (s. Kapitel 3.2.1.2).

Für die Untersuchung der Emulsionen, in welche die Arzneistoffe z.B. über eine Nanosuspension eingearbeitet werden, ist es wichtig zu wissen, bis zu welcher Konzentration vorhandene Arzneistoffkristalle detektiert werden können (Nachweisgrenze). Hierzu wurde einer frisch hergestellte, mit Amphotericin B gesättigte Emulsion in abfallenden Mengen eine Amphotericin B-Nanosuspension (2,5%ig) zugemischt und mittels Lichtmikroskopie untersucht. Die gesättigte Emulsion sollte das Auflösen der hinzukommenden Kristalle verhindern. Zunächst wurde die Nanosuspension direkt der gesättigten Emulsion zugemischt, später durch weiteres Verdünnen einer Stammischung. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Lichtmikroskop Orthoplan der Firma Leitz (D-Wetzlar) bei 1000facher Vergrößerung mit Immersionsöl, um eine bessere Auflösung zu erzielen. Als Kamera diente eine CF20DX (Kappa). Die Betrachtung erfolgte unter polarisiertem Licht, um die Kristalle deutlicher erkennen zu können. Zur einfacheren Betrachtung sind die Aufnahmen als Negative dargestellt (lichtbrechende Strukturen erscheinen schwarz, vgl. Abb. 3-14 a und b).



**Abb. 3-14a: Negativaufnahmen der Amphotericin B gesättigten Emulsion unter polarisiertem Licht nach Zumischung von 1 mg/mL (oben) und 0,1 mg/mL (unten) Amphotericin B-Suspension, 1000fache Vergrößerung**



**Abb. 3-14b: Negativaufnahmen der Amphotericin B gesättigten Emulsion unter polarisiertem Licht nach Zumischung von 0,01 mg/mL (oben) und 0,001 mg/mL (unten) Amphotericin B-Suspension, 1000fache Vergrößerung**

Die Aufnahmen zeigen, dass bis zu einer Zumischung von 0,1 mg/mL Amphotericin B-Nanosuspension (4% einer 2,5%igen Nanosuspension) die Kristalle sehr deutlich sichtbar sind. Nach einem weiteren Verdünnungsschritt (0,01 mg Amphotericin B-Kristalle/gesättigter Emulsion) sind nur noch einzelne Kristalle erkennbar. Nach weiterer Verdünnung konnten keine Amphotericin B-Kristalle mehr detektiert werden (0,001 mg Amphotericin B-Kristalle/gesättigter Emulsion). Somit liegt die Nachweisgrenze der Amphotericin B-Kristalle in gesättigter Lipofundin® MCT 10% zwischen einer Kristallkonzentration von 0,01 und 0,001 mg/mL.

Die Mikroskopie stellt ein ausgezeichnetes Verfahren zur Detektion geringer Mengen Arzneistoff-Kristalle dar. Sehr kleine Partikel, die von anderen feinen Öltröpfchen in der LD nicht zu unterscheiden sind, können mittels polarisierten Lichts sichtbar gemacht werden. Zusätzlich handelt es sich hier um ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung von Emulsionen und ihrer Langzeitstabilität (Müller and Heinemann, 1992; Müller and Heinemann, 1993). Zu beachten ist allerdings das Auflösungsvermögen des Mikroskops. Dieses liegt bei einem Lichtmikroskop zwischen 200 und 500 nm.

### **3.4 Gehaltsbestimmung**

#### **3.4.1 Amphotericin B**

##### **3.4.1.1 HPLC-Analytik**

Die HPLC-Analytik wurde an einer Kontron-Anlage (Kontron-Instruments, D-Neufahrn) durchgeführt; die Auswertung erfolgte mit der Software Kroma System 2000.

Zur Probenaufbereitung einer Emulsion mit 1 mg/mL wurden 2,5 mL DMSO (Dimethylsulfoxid) in einem Messkölbchen mit ca. 2 mL 2-Propanol versetzt, 100 µL bzw. 100 mg beladene Emulsion zugegeben, gelöst und mit 2-Propanol auf 5 mL aufgefüllt. Es folgte eine 5 minütige Behandlung im Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin, D-Berlin). Bei einer Amphotericin B-Beladung von 0,2 mg/mL wurden 250 µL bzw. 250 mg Emulsion für die Probenaufbereitung verwendet. Von der Nanosuspension wurden analog den Emulsionen 100 µL bzw. 100 mg mit DMSO und 2-Propanol auf 5 mL aufgefüllt und hiervon 125 µL auf 10 mL mit Methanol verdünnt. Bei den Nanosuspensionen kann es durch das Pipettieren oder nicht Pipettieren eines Agglomerats und durch weiteres Verdünnen zu Schwankungen in der Gehaltsbestimmung kommen. Alle Proben wurden jeweils zweimal aufbereitet und jede aufbereitete Lösung einmal vermessen. Als Standard wurden 50 mg Amphotericin B in 10 mL

DMSO gelöst, unterstützt von 5 minütiger Ultraschallbehandlung. Anschließend wurde die Lösung mit Methanol auf 50 mL aufgefüllt. 1 mL dieser 1 mg/mL-Stammlösung wurde auf 50 mL mit Methanol in einem weiteren Kolben versetzt, um eine Probenkonzentration von 0,02 mg/mL zu erreichen. Diese Verdünnungsstufe wurde vor, mitten im und nach dem Vermessen der Proben zur Kontrolle des Meßsystems jeweils dreimal vermessen. An jedem Messtag wurde eine „kleine“ Eichgerade mit 5 definierten Konzentrationen bestimmt. Die jeweiligen Verdünnungen wurden aus der Stammlösung hergestellt. Die Kalibrierung erfolgte aus drei Stammlösungen, aus denen definierte Verdünnungen hergestellt und die resultierende Peakfläche je dreimal bestimmt wurden. Die Überprüfung erfolgte in regelmäßigen Abständen. Alle erhaltenen Daten aus diesen und alle „kleinen“ Eichgeraden wurden regelmäßig zu einer Eichgerade vereint. Die Linearität wurde für den Konzentrationsbereich von 0,005 bis 0,04 mg/mL geprüft und belegt. Bei der gezeigten Kalibrationsgerade betrug der lineare Regressionskoeffizient R 0,9998 (s. Abb. 3-15). Die Spezifikationen der verwendeten HPLC-Analytik können Tabelle 3-2 entnommen werden.

**Tab. 3-2: Spezifikation der angewandten HPLC-Analytik**

Parameter	Spezifikation
Vorsäule	Nucleosil 120 C18, 3 µm, 10 x 4,6 mm
Hauptsäule	Nucleosil 120 C18, 3 µm, 125 x 4,6 mm
Injektionsvolumen	20 µL
Mobile Phase: Eluent A: Methanol Acetonitril EDTA-Lösung 0,00125 mol/L Eluent B: Tetrahydrofuran	500 T 350 T 300 T 100%
Gradient: 0-3 Min 3-3,1 Min 3,1-7 Min 7-7,1 Min 7,1-12,5 Min	100% Eluent A auf 100% Eluent B gehen 100% Eluent B (Rest der Emulsion wird von der Säule gewaschen) auf 100% Eluent A gehen 100% Eluent A (Regenerieren der Säule)
Flußrate	1,2 mL/min
Säulenofentemperatur	40 °C
UV-Detektion	407 nm
Laufzeit	14,5 min
Retentionszeit von Amphotericin B	2,7-3,1 min
Präzision (n = 6)	1,9%
Nachweisgrenze	< 0,1 µg/mL

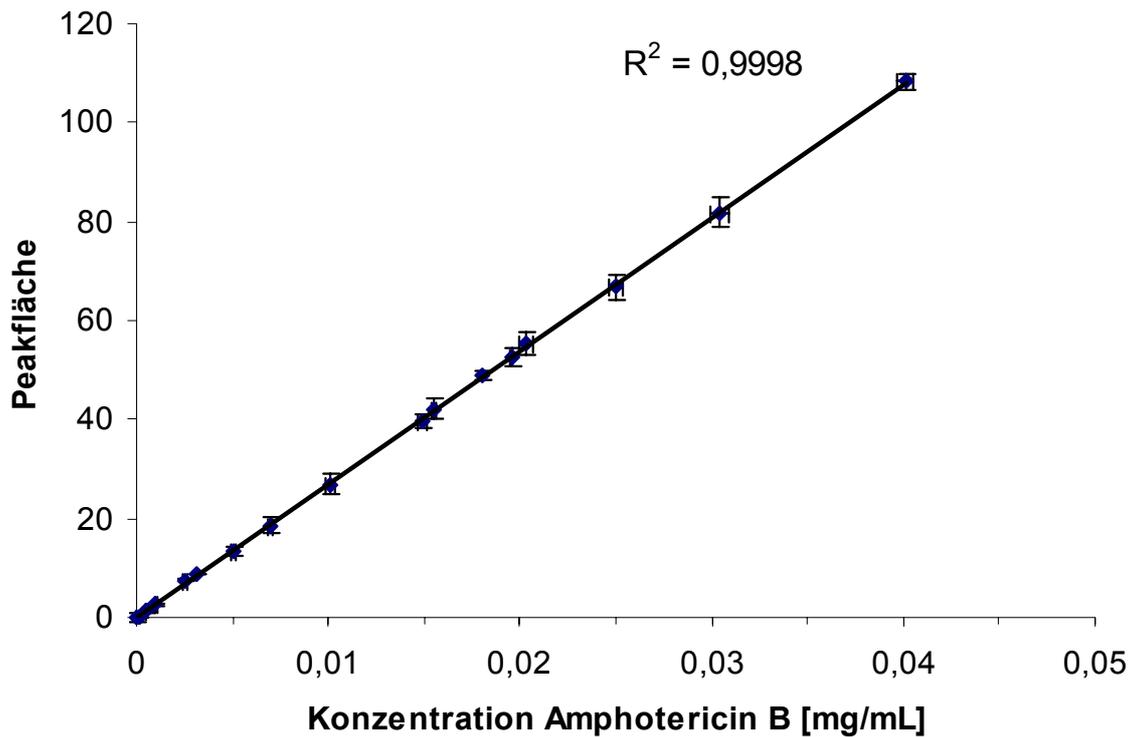


Abb. 3-15: HPLC-Kalibrationsgerade von Amphotericin B ( $n = 8$ ), Konzentrationen von 0,005 mg/mL, 0,01 mg/mL und 0,02 mg/mL:  $n = 20$

Zur Präzision ist die Wiederholstandardabweichung (Variationskoeffizient VK(%)) aus  $n = 6$  Messungen erfasst, die die Probenaufbereitung und quantitative Analyse einschließt. Die Nachweisgrenze entspricht der Konzentration, deren Signal-Rausch-Verhältnis 3:1 beträgt. Die Analytik erfasst nur Amphotericin B und nicht seine Abbauprodukte.

### 3.4.1.2 UV-VIS-Spektroskopie

Der Bereich der UV-Spektren erstreckt sich von 50 bis ca. 400 nm und der der VIS-Spektren von ca. 400 bis 900 nm. Für die Aufnahmen der Spektren wird die Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel in den Strahlengang des Photometers (Uvikon 940, Kontron Instruments, D-Neufahrn) gebracht. Der gewünschte Wellenlängenbereich wird mit monochromatischem Licht überstrichen und die Absorption relativ zur eingestrahlenen Lichtmenge gemessen. Nach dem Gesetz von Lambert und Beer gilt folgender Zusammenhang zwischen der Konzentration ( $c$ ) des gelösten Stoffes und der Absorption ( $A$ ):

$$A = \frac{\log I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

- I: nach dem Durchgang durch die Probe gemessene Lichtintensität
- $I_0$ : Intensität des eingestrahnten Lichtes
- $\varepsilon$ : molarer Absorptionskoeffizient, eine für die Substanz spezifische Naturkonstante
- c: Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in der Probelösung
- d: Schichtdicke der Lösung im Strahlengang

Zur Untersuchung wurde Amphotericin B in Methanol gelöst und so verdünnt, dass das Absorptionsmaximum zwischen 0,2 und 0,8 lag, da das Lambert-Beersche-Gesetz nur für verdünnte Lösungen gilt. Bei dem Absorptionsmaximum von 405 nm wurde der Gehalt der Lösungen gegen das reine Lösungsmittel bestimmt. Als Referenz wurde eine Kalibrationsgerade aus Fungizone<sup>®</sup> oder Amphotericin B-Pulver hergestellt.

### 3.4.2 Bestimmung der Xenon-Konzentration

Einem verschlossenen Probengefäß, das Xenon-freie Probe (z.B. Abbolipid<sup>®</sup>) und SF<sub>6</sub> (Schwefelhexafluorid) als internen Standard enthält, wird Xenon zugeführt. Nach einer Äquilibrierungsphase stellt sich bei vorgegebenen Temperatur- und Druckbedingungen (werden unter Laborbedingungen als konstant betrachtet) für die Gase Xenon und SF<sub>6</sub> ein bestimmtes Verteilungsverhältnis zwischen Flüssigkeit und Gasphase ein. Das in der Gasphase entstehende Xe/SF<sub>6</sub>-Verhältnis wird gaschromatographisch/massenspektrometrisch ermittelt. Es ist ein Maß für die Gesamtmenge an Xenon im Probengefäß, die mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt werden kann. Bei allen Kalibrations- und Messproben sind das Flüssigkeits- und Gasvolumen und die zugesetzte SF<sub>6</sub>-Menge im verschlossenen Vial gleich groß. Im Gasraum wird das Substanzverhältnis Xe/SF<sub>6</sub> daher nur durch die – bei den Kalibrationsproben definiert durch die unterschiedlichen und bei den Messproben zu bestimmenden - Xenongehalte, bestimmt. Bei den Kalibrationsproben wird reines Xenon mit einer gasdichten Spritze in das Vial dosiert, bei den Messproben ein Aliquot Xenon-gesättigter Emulsion (z.B. Abbolipid<sup>®</sup>). Damit ist gewährleistet, dass sich bei den Messproben der Xenon-Gehalt unterhalb der maximalen Löslichkeit für die Emulsion und somit im linearen Bereich der Kalibrierfunktion befindet. Bei den unbekanntem Proben entspricht die

bestimmte Gesamtmenge im Gefäß dem Xenon-Gehalt im zugeführten Abbolipid<sup>®</sup>-Aliquot. Daraus ergibt sich die Xenon-Löslichkeit.

### 3.4.2.1 Probenaufbereitung

**Lipid-Proben:** Ein 10 ml Headspace-Vial wurde mit 1,9 ml Wasser gefüllt und mit einem teflonbeschichteten Septum verschlossen. Mit einer gasdichten 100 µL Spritze wurden 100 µL xenonhaltige Emulsion, z.B. Abbolipid<sup>®</sup> 10%, durch das Septum ins Headspace-Vial injiziert. Das Vial wurde geschüttelt und auf den Kopf (Septum nach unten) gestellt. Als interner Standard wurden 40 µL SF<sub>6</sub> (Schwefelhexafluorid) zugegeben. Nach erneutem Schütteln und Auf-dem-Kopf-Lagern wurden zur GC/MS-Analyse aus dem Headspace (Gasraum über der Flüssigkeit) 5-6 µL Gas entnommen und manuell injiziert. Der Injektor sollte mit einem Liner mit geringem Innendurchmesser bestückt sein.

**Wässrige Proben:** Ein 10 ml Headspace-Vial wurde mit 1,5 mL Wasser gefüllt und mit einem teflonbeschichteten Septum verschlossen. Mit einer 1 mL Spritze wurden 500 µL xenonhaltige Probe durch das Septum ins Headspace-Vial injiziert. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Lipid-Proben.

### 3.4.2.2 Gaschromatographische-massenselektive Bestimmung

**Kalibration:** Die Kalibrationsproben wurden wie die oben beschriebenen Realproben hergestellt. Mit einer gasdichten 100 µL Spritze wurden 0, 10, 25, 50 und 100 µL Xenon in ein mit 2 mL Wasser gefülltes 10 mL Headspace-Vial gefüllt injiziert. Nach Schütteln wurden jeweils 40 µL SF<sub>6</sub> hinzugefügt. Nach erneutem Schütteln wurden aus dem Headspace-Vial 5 µL Gas für die GC/MS-Analyse entnommen.

Für wässrige und Lipid-Proben wurde dieselbe Kalibration verwendet. Bei beiden Probenarten befindet sich mehr als 95% der Gase in der Gasphase, so dass kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden kann.

**GC/MS-Analytik:** Aus dem Dampfraum eines Vials wurden 5-6 µL Gas entnommen und in das GC/MS-System (HP 5890 GC mit 5970 MSD) injiziert. Die Injektionstemperatur betrug 250 °C. Als Trägergas wurde Helium mit einem Säulenvordruck von 2 psi verwendet. Die Trennsäule war eine DB5-MS (15 m x 0,25 mm, df = 0,25 µm). Bei isothermen Bedingungen (40 °C) wurden die Gase nach 20 sec von der Säule eluiert. Die massenspektrometrische Analyse wurde im Selected Ion Monitoring (SIM) Modus mit den Ionen m/z 132 (Xe) und

127 (SF<sub>6</sub>) durchgeführt. Zur Erstellung von Eichkurven und für die Bestimmung der Konzentration der Proben wurde die Fläche unter den Signalkurven (automatische Integration) benutzt.

Diese Untersuchungen wurden extern von der Arbeitsgruppe um Prof. Georgieff an der Ulmer Universitätsklinik für Anästhesiologie durchgeführt.

### 3.4.3 HPLC-Trennsystem Omeprazol

Die HPLC-Analytik wurde an einer Kontron-Anlage (Kontron-Instruments, D-Neufahrn) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Kroma System 2000.

Die Chromatographie erfolgte mit Anlehnung an die Angaben in der Ph.Eur. 2002. Zur Probenaufbereitung wurden 350 mg Emulsion in 5 mL 2-Propanol gelöst und nach Ultraschallbehandlung der HPLC-Analytik zugeführt. Die Spezifikationen der verwendeten HPLC-Analytik können der Tabelle 3-3 entnommen werden. Als Referenzlösung wurde eine 100 µg/mL Omeprazol-Lösung in 2-Propanol zubereitet und die Peakfläche vor und nach den zu messenden Proben bestimmt. Die Kalibrationsgerade wurde durch Messungen an drei verschiedenen Tagen durch Verdünnung der jeweils an dem Tag zubereiteten Referenzlösung bestimmt. Die Linearität war für einen Bereich von 2 bis 125 µg/mL gegeben. Der lineare Regressionskoeffizient R betrug 0,9994 (s. Abb. 3-16)

**Tab. 3-3: Spezifikation der verwendeten HPLC-Analytik von Omeprazol**

Parameter	Spezifikation
Hauptsäule	Eurospher 100 C 18, 5 µm, 240 x 4 mm
Injektionsvolumen	20 µL
Mobile Phase:	
Acetonitril	27 T
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung (1,4 g/L), die mit Phosphorsäure 85% auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt wurde	73 T
Flußrate	1,0 mL/min
Säulenofentemperatur	23 °C
UV-Detektion	280 nm
Laufzeit	28 min
Retentionszeit von Omeprazol	17-19 min

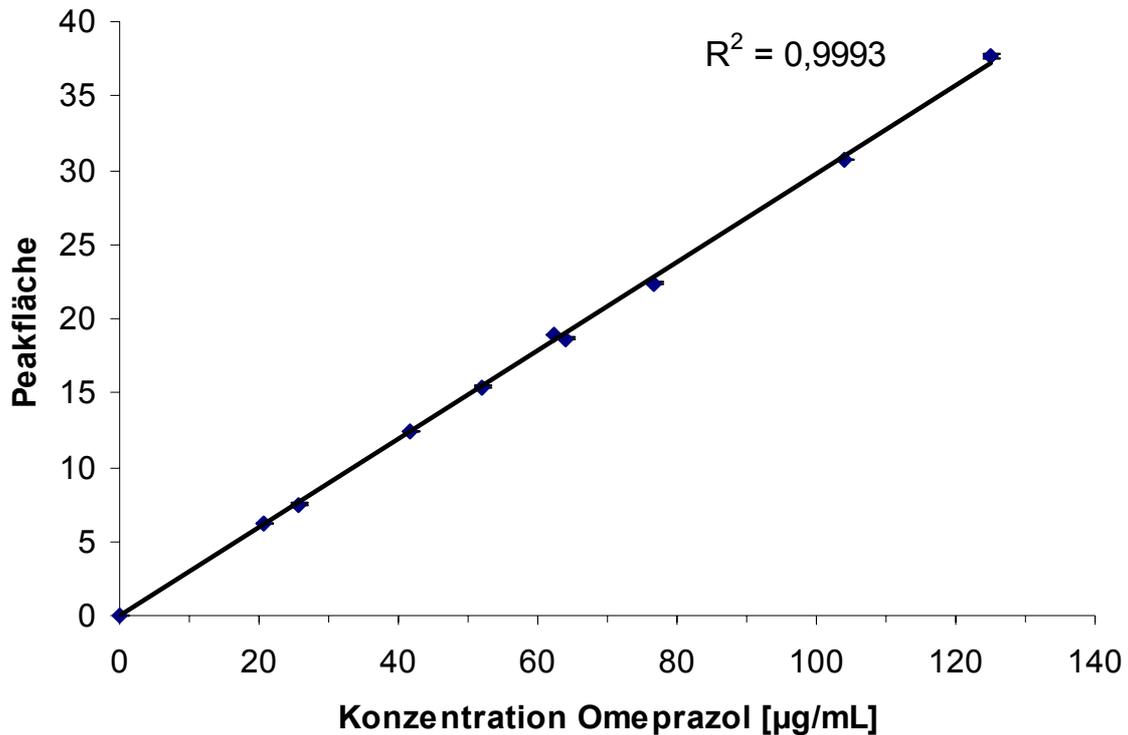


Abb. 3-16: HPLC-Kalibrationsgerade von Omeprazol in 2-Propanol

### 3.5 Zwei-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-D PAGE)

Die 2-D PAGE erlaubt das Auftrennen von Proteinen aus Medien wie Plasma und Serum. Die Proteingemische können aufgrund zweier voneinander unabhängiger Parameter voneinander getrennt werden. In der ersten Dimension erfolgt die Trennung aufgrund des isoelektrischen Punkts (IEP) der Proteine, in der 2. Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MW) getrennt. Dieses Verfahren wurde erstmals von Klose (1975) und (O'Farrel, 1975) kombiniert. Es teilt sich in folgende Teilprozesse: Probenaufbereitung, 1. Dimension, 2. Dimension, Silberfärbung und Auswertung.

### 3.5.1 Probenaufbereitung

**Inkubation:** Die Emulsionspartikel wurden 5 min lang bei 37 °C (Blunk, 1994) in Citrat-stabilisiertem Humanplasma in einem Volumenverhältnis von 3:1 zur Probe inkubiert. Innerhalb dieser Zeit muss sich das für die Körperverteilung verantwortliche Plasmaproteinmuster ausgebildet haben, da innerhalb der ersten 5 min eine weitgehende Elimination durch Makrophagen des MPS (Leber, Milz) stattfindet (O'Mullane et al. 1987). Untersuchungen zur Proteinadsorptionskinetik für Emulsionen sind bei Harnisch (1998) beschrieben.

**Separation, Waschen und Proteindesorption:** Zum Trennen der Emulsionssysteme wurde eine Stunde bei 22940 g (24 °C) mit einer Biofuge 22R (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Die abgegrenzte Ölschicht (Emulsionsschicht) mit einem klaren Unterstand an Plasma wurde mit einer Kanüle durchstoßen und das Plasma entfernt. Die Abtrennung des überschüssigen Plasmas erfolgte durch dreimaliges Waschen. Die Fettphase wurde dabei in 1,5 mL 20 mMol Phosphatpuffer pH 7,4 redispergiert und anschließend erneut 1 h zentrifugiert, um die wässrige Phase abzutrennen. Im Anschluss an die Partikelaufräumung wurden die Proteine mittels einer 10%igen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung unter Zusatz von 1,4-Dithioerythrit (DTE, reduzierende Komponente) durch 5 minütiges Erhitzen auf 95 °C von der Oberfläche der Fettpartikel abgelöst. Die Zuführung einer zweiten Lösung (Solubilisierungslösung) aus hochmolekularem Harnstoff (Dissoziation von Wasserstoffbrücken und Aufhebung elektrostatischer Wechselwirkungen), CHAPS (zwitterionisches Tensid zur Entfernung von SDS durch Mischmizellbildung), DTE und Ampholyt (Mischmizellbildung) erfolgte nach Abkühlung auf Raumtemperatur. Das SDS stört durch Überlagerung der Eigenladung der Proteine die isoelektrische Fokussierung und muss daher weitestgehend entfernt werden. Eine Trennung nach Ladung wird nun möglich. Eventuell vorhandene Emulsionsreste wurden durch erneutes 15 minütiges Zentrifugieren entfernt. 100 µL des Unterstandes wurden der 2-DE zugeführt. Die Durchführung basierte auf dem Protokoll von Bjellquist et al. (1993).

### **3.5.2 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Bei der IEF macht man sich den amphoteren Charakter der Proteine und Peptide zunutze. Im elektrischen Feld wandern diese bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (IEP), also bis zu dem pH-Wert, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Es handelt sich um eine Endpunktmethode. Die Trennung ist abgeschlossen, wenn jedes Protein seinen IEP erreicht hat.

Für die vorliegende Arbeit wurden immobilisierte pH-Gradienten (Immobiline DryStrips) mit einem nichtlinearen Gradienten von pH 3-10 verwendet. Der pH-Gradient verläuft im neutralen Bereich flacher, da die meisten physiologischen Proteine in diesem Bereich ihren isoelektrischen Punkt besitzen und so die Auflösung verbessert werden kann.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit einem Gesamtvoltstundenprodukt von 20 kVh in einer Multiphore II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Als Spannungsquelle kam ein Netzgerät der Firma Consort (Turnhout, Belgien) zum Einsatz.

### **3.5.3 2. Dimension: SDS-PAGE**

Während der 2. Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Hierbei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren. Die Proteine wandern während der Elektrophorese bis zu dem Punkt, an dem sie wegen ihrer Größe an den Poren hängen bleiben.

SDS bindet sich an die hydrophoben Bereiche der Proteine in einem Verhältnis 1,5:1 und überdeckt somit die Eigenladung der Proteine. Es bilden sich anionische Mischmizellen mit einer konstanten Nettoladung pro Masseneinheit. Somit ergibt sich eine lineare Funktion aus der elektrophoretischen Mobilität der Mischmizellen zu den Logarithmen der Molekulargewichte der Proteine.

Nach der 1. Dimension müssen die IPGs equilibriert werden, um die Proteinbruchstücke der SDS-PAGE zuführen zu können. 15 minütige Einwirkung einer Lösung aus SDS und DTE umhüllt die Proteine und führt zur Denaturierung durch Spalten der Wasserstoffbrückenbindungen (SDS) und Disulfidbrücken (DTE). Die zweite Äquibrierungslösung (Einwirkzeit 20 min) sorgt für Alkylierung der thiolischen Funktionen durch Iodoacetamid und schützt somit vor erneuter Oxidation. Außerdem wird dadurch überschüssiges DTE entfernt, da es die nachfolgende Färbung stören würde. Beide Äquibrierungslösungen enthalten den Farbstoff Bromphenolblau, um während der SDS-PAGE die Fließfront sichtbar zu machen. Die

äquilibrierten Gele der ersten Dimension werden auf Polyacrylamid-Plattengele (Größe: 16x16 cm, Dicke: 1,5 mm) für die zweite Dimension aufgelegt und fixiert (0,5%iges Agarosegel) (Hanash et al., 1987).

Die Gele wurden selbst gegossen. Sie weisen einen Porengradienten auf, der durch die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad eingestellt wird (Totalacrylamid-Konzentration: 8-16%, PDA-Konzentration: 2,6% (Quervernetzer) (Hochstrasser et al., 1988; Westermeier, 1990). Die Poren werden von oben nach unten (in Laufrichtung) immer kleiner und erhöhen dadurch die Trennschärfe (MG: 6kDa-250 kDa). Zusatz von Natriumthiosulfat verbessert die spätere Silberfärbung, indem es die Hintergrundfärbung verringert.

Je vier Gele wurden gleichzeitig in einer Elektrophoresekammer bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel entwickelt (Protean II Multi Cell, Bio-Rad, D-München).

### **3.5.4 Silberfärbung**

Das Sichtbarmachen der Proteine beruht auf der Reduktion der Silberionen zu metallischem Silber. Für Polyacrylamid-Gele wurde das Verfahren erstmals von Merrill et al. (1979) beschrieben. Silberionen besitzen eine hohe Affinität zu Proteinen. Sie binden sich an diese an und werden dann reduziert. Zunächst werden die Proteine in der Gelmatrix durch eine Ethanol/Essigsäure-Lösung gefällt. Durch das Imprägnieren mit Glutaraldehyd- und Naphtalinsulfonsäure-Lösung, die das Anlagern der Silberionen an die Proteine fördern, wird das Verfahren sensitiviert. Es folgen eine Zugabe von ammoniakalischer Silbernitratlösung (Oakley et al., 1980) und die Einleitung der Reduktion durch eine Entwicklerlösung aus Formaldehyd und Zitronensäure. Nach 5-10 min wird die Reaktion durch verd. Essigsäure gestoppt. Das Färbeprotokoll ist ausführlich bei Blunk (1994) und Lück (1997) beschrieben.

Jedes Protein besitzt eine individuelle Affinität zu Silberionen. Somit kann bei absolut gleicher Proteinmenge unterschiedliche Farbintensität vorliegen (Merrill et al., 1982; Poehling and Neuhoff, 1981). Ein direkter Vergleich der Spots unterschiedlicher Proteinspezies ist daher nicht möglich, allerdings ist eine semi-quantitative Beurteilung von homologen Spots zulässig.

### 3.5.5 Auswertung

Die Auswertung der 2D-Elektropherogramme erfolgt computergestützt. Die Gele werden nach der Entwicklung mit einem Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gescannt. Für die Auswertung der Gele kam die Software MELANIE III (**M**edical **E**lectrophoresis **A**nalysis **I**nteractive **E**xpert System, BioRad, D-München) zum Einsatz. Um auch überlappende Spots zweifelsfrei identifizieren zu können, werden komplexe Algorithmen angewendet. Die Software erlaubt weiterhin eine parametrische (für alle Spots wird eine Gaußform angenommen) oder eine nicht parametrische Auswertung (die Form der Spots fließt stärker in die Berechnung ein). Letztere kam in dieser Arbeit zur Anwendung (nähere Angaben bei Harnisch (1998)). Referenzkarten (Anderson and Anderson, 1991; Golaz et al., 1993) erleichtern das routinemäßige Identifizieren der Proteinspots.

## 3.6 Durchführung der In-vivo-Versuche mit inhalativem intravenösem Xenon

Diese Versuche wurden extern von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Georgieff an der Ulmer Universitätsklinik für Anästhesiologie durchgeführt.

### 3.6.1 Versuchstiere

Die Studie wurde von den Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm und vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Beim Versuch wurden Hausschweine (deutsche Landschweine) mit einem Körperdurchschnittsgewicht von 40 kg verwendet. Die Einschlusskriterien der Studie waren: gesunde Tiere, erfolgreiche Induktion einer Narkose mit Sevofluran und komplikationsloser Verlauf der chirurgischen Präparation.

### 3.6.2 Narkose

**Prämedikation:** Nach einer 24 stündigen Nahrungskarenz (Wassereinnahme ad libitum) erhielten die Versuchstiere im Tierforschungszentrum eine Stunde vor der Narkose (5 h vor Xenon-Gabe) eine intramuskuläre Prämedikation mit 4 mg/kg des Neuroleptikums Azaperon (Stresnil<sup>®</sup>, Janssen, D-Neuss) und 0,05 mg/kg Atropin (Atropinsulfat<sup>®</sup>, Braun-Melsungen, D-

Melungen). Anschließend wurden die Tiere schlafend in einer Transportkiste in den OP-Saal transportiert.

**Narkoseeinleitung:** Die Narkose wurde mit 0,01 mg/kg Atropin, 2 mg/kg Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, PharmaCOa & Upjohn, D-Erlangen), 8 mg/kg Pentobarbital-Natrium (Narkodorm<sup>®</sup>, Alvetra, D-Neumünster) und 0,03 mg/kg Buprenorphin (Temgesic<sup>®</sup>, Essex Pharma, D-München) intravenös eingeleitet. Die Tiere wurden in Rückenlage orotracheal intubiert. Anschließend wurden sie mit 30% Sauerstoff in Stickstoff volumen-kontrolliert mit einer Atemfrequenz von 10-12/min und einem Atemzugvolumen 15 ml/kg beatmet (Cicero EM, Draegerwerk AG, D-Lübeck). Es wurden eine Normoventilation mit einem endtidalen Kohlendioxid-Partialdruck (PaCO<sub>2</sub>) von 38-42 mmHg und eine transkutan gemessene arterielle Hämoglobin-Sauerstoff-Sättigung >90% angestrebt (transkutane Pulsoxymetrie, Hewlett Packard 66S Monitor, San Antonio, Texas, USA).

**Aufrechterhaltung der Narkose:** Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Sevofluran (1,8-2,3 Vol%, Sevorane<sup>®</sup> Abbott, D-Wiesbaden). Die Narkosetiefe wurde durch hämodynamische Größen (Herzfrequenz, arterieller Blutdruck) und EEG-Monitoring (Neurotrac, Interspec Inc., Cronshocken PA, USA) überwacht. Die spektrale Eckfrequenz lag immer unter 15 Hz. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch beatmet (FiO<sub>2</sub> 30-40%). Außerdem wurden das EKG und die Rektaltemperatur überwacht. Die Körpertemperatur wurde nach Bedarf mit einer Heizmatte konstant bei 37,5 °C-38,5 °C gehalten. Zur Flüssigkeitssubstitution wurde kontinuierlich Ringer-Lösung (10 ml/kg/h) infundiert.

### 3.6.3 Präparation der Tiere

Die Tiere wurden unter aseptischen Bedingungen präpariert. In die rechte Jugularvene wurde ein Pulmonalarterienkatheter eingelegt (Messung der gemischt venösen Xe-Konzentration). In die freigelegten Femoralarterien (Oberschenkschlagader, Messung der arteriellen Xe-Konzentration) wurde ein Katheter zur Blutabnahme und kontinuierlichen Messung des arteriellen Mitteldrucks (MAP) eingeführt. Um zerebral-venöses Blut entnehmen zu können, wurde im Schädel eine Bohrlochtrepanation durchgeführt und ein Katheter in den Sinus sagittalis gelegt.

### 3.6.4 Versuchsablauf

Nach Transport, Narkoseeinleitung und Intubation erfolgte innerhalb von 90 min die Präparation. Nach einer Erholungsphase von 120 min wurde die Baseline-Messung durchgeführt, anschließend die Xenonanästhesie eingeleitet. Hierzu wurde Xenon-gesättigte Lipidemulsion innerhalb von 30 s als Bolus injiziert. Gleichzeitig erfolgte nach ausreichender Sauerstoffbeatmung eine zweiminütige Apnoe, um den pulmonalen Xenon-Verlust während der Bolusinjektion so gering wie möglich zu halten. Die beladenen Emulsionen wurden kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 99 mL/h über 30 min infundiert. Vor der Xenon-Applikation wurde durch einen Zangentest der individuelle MAC-Wert für Sevofluran festgestellt (MAC = **m**inimale **a**lveoläre Konzentration). Hierzu wurde bei den Tieren zwischen den Zehen ein Schmerz-Stimulus durch maximale Kompression einer Zange erzeugt (Eger et al., 1988). Während der Xenon-Anästhesie wurde in zweiminütigen Abständen der Zangentest durchgeführt. Sofern keine Reaktion erfolgte (Herzfrequenz-, Blutdruckanstieg und Bewegung des Tieres), wurde Sevofluran reduziert. Außerdem erfolgte eine Bestimmung der Catecholamin-Plasmaspiegel am MAC-Level und zusätzlich bei Reaktion der Tiere nach Angaben von Dirks et al. (1988) als ein wichtiges Kriterium, den Stress der Tiere zu verfolgen. Als zusätzliche Parameter dienten die Herzfrequenz und der Blutdruck. Arteriell, gemischt- und sagittal-venöses Blut wurde nach 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 und 20 min gezogen und mittels GC/MS bestimmt (s. Kap. 3.4.2). Die Überwachung der Herzfrequenz und des arteriellen Blutdrucks wurde aufgezeichnet. Falls Tiere ein weiteres Mal zu den Versuchen eingesetzt wurden, wurde ihnen eine Erholungszeit von mindestens zwei Stunden eingeräumt. Nach dem letzten Messzeitpunkt wurden die Versuchstiere durch eine KCL- Injektion (20 mval) in Narkose getötet.