

Solemuls<sup>®</sup>-Technologie:  
Physikalische und chemische Stabilität  
wirkstoffbeladener Emulsionen zur i.v. Applikation



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des akademischen  
Grades des Doktors der  
Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Jens-Uwe A. H. Junghanns  
aus Vechta  
März 2011



1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller  
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Dittgen

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2012

für Nikolina und Anja

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Inhalte frei verfügt werden kann.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielstellung	9
2. Nanokristalle, Nanosuspensionen und parenterale Fettemulsionen	13
2.1 Grundlegende Formulierungsprinzipien	14
2.1.1 Aufbauende Verfahren (Präzipitations-Verfahren)	16
2.1.2 Abbauende Verfahren	16
2.1.2.1 Mahlen	16
2.1.2.2 Homogenisation	18
2.2 Eigenschaften von Nanokristallen	22
2.2.1 Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit durch Oberflächenvergrößerung	23
2.2.2 Erhöhung der Sättigungslöslichkeit	25
2.3 Parenterale Fettemulsionen	30
2.3.1 Definition	30
2.3.2 Physikalische Stabilität von Fettemulsionen	30
2.3.3 Teilchengröße	32
2.3.4 Metabolisierung im Organismus	32
2.3.5 Zusammensetzung	33
2.3.6 Verwendung	34
2.3.7 Zielsetzung	34
3. Materialien und Methoden	35
3.1 Materialien	35
3.1.1 Modellarzneistoffe	35
3.1.1.1 Amphotericin B	35
3.1.1.2 Itraconazol	39
3.1.1.3 Forschungssubstanz JM2005	39
3.1.2 Matrix	40
3.1.2.1 Lipofundin® MCT 10%	40
3.1.2.2 Lipovenös® MCT 20%	40
3.1.2.3 Lipofundin® MCT 10 und 20% für Langzeitstabilität	40

3.1.3 Tenside	41
3.1.3.1 Tween 80	41
3.1.3.2 Poloxamer 188	41
3.1.3.3 Natriumcholat	41
3.1.3.4 Natriumdodecylsulfat	42
3.1.3.5 Lecithin	42
3.1.4 Sonstige Rohstoffe und Reagenzien	42
3.2 Methoden	44
3.2.1 Hochdruckhomogenisation	44
3.2.2 Herstellung der SolEmuls <sup>®</sup> -Formulierungen	44
3.2.3 Bestimmung von Partikelgrößen und Oberflächenladung	46
3.2.3.1 Laserdiffraktometrie (LD)	46
3.2.3.2 Photonenkorrelationsspektroskopie	49
3.2.3.3 Lichtmikroskopie	52
3.2.3.4 Zetapotential (Laser-Doppler-Anemometrie)	52
3.2.4 HPLC-Analytik	55
3.2.4.1 Amphotericin B	55
3.2.4.2 Itraconazol	56
3.2.5 Sonstige Methoden	56
3.2.5.1 Sterilisation mit gespanntem Dampf	56
3.2.5.2 Bestimmung der Leitfähigkeit	57
3.2.5.3 Bestimmung von pH-Werten	57
3.2.5.4 Bestimmung der Säurezahl (SZ)	57
3.2.5.5 Bestimmung der Peroxidzahl (POZ)	58
3.2.5.5 Bestimmung des Gehaltes an freien Fettsäuren (FFA)	58
4. Ergebnisse	60
4.1. Amphotericin B-haltiges System	60
4.1.1 Ergebnisse der Vorversuche zu AmB-haltigen Formulierungen	60
4.1.2 In vitro Daten der Amphotericin B-haltigen Formulierung	64
4.2 Itraconazol-haltiges System	70
4.3 Forschungssubstanz JM2005	79

4.4 Langzeitstabilität von Lipofundin® über 18 Jahre	93
4.4.1 Einleitung	93
4.4.2 Physikalische Stabilität	93
4.4.2.1 Untersuchung der Teilchengröße mittels PCS	94
4.4.2.2 Untersuchung der Teilchengröße mittels LD	97
4.4.2.3 Untersuchung des Zetapotentials	100
4.4.3 Chemische Stabilität	101
4.4.4 Zusammenfassung	103
5. Zusammenfassung	104
5.1 Abstract	104
5.2 Zusammenfassung	105
6. Ausblick	106
7. Literaturverzeichnis	107
8. Publikationsverzeichnis	118
9. Danksagung	119
10. Curriculum Vitae	120
11. Abbildungsverzeichnis	122
12. Tabellenverzeichnis	126
13. Formelverzeichnis	129

# 1. Einleitung und Zielstellung

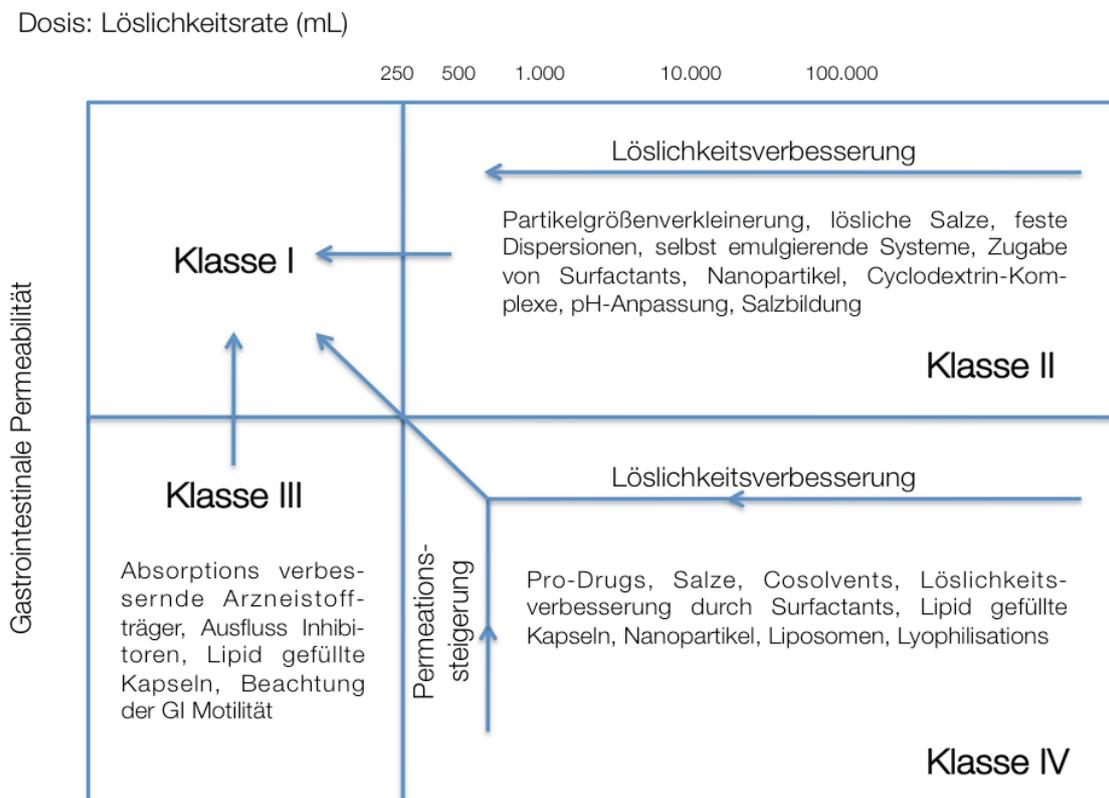
Nanotechnologie ist heute in aller Munde und begegnet uns überall im täglichen Leben, sei es in der Herstellung von Computerchips (wo der Bedarf an mehr integrierten Schaltkreisen pro Quadratmillimeter deutlich erkennbar ist, um Chips mit mehr Rechenleistung herstellen zu können [Moore, 2005]), auf dem wachsenden Gebiet der Biotechnologie (wo neue Werkzeuge zur einfacheren Manipulation von Proteinen in immer geringerer Größe benötigt werden [Merkle, 1999]) oder im Bereich der kosmetischen Forschung (in der nanonisierte Wirkstoffe eine ganze Reihe von positiven Effekten ermöglichen [Müller et al., 2006]).

All diese Gebiete haben den Bedarf an Verkleinerung gemeinsam. Die Nanonisierung von Produkten zur medizinischen Anwendung (z.B. Miniroboter zur Reinigung verstopfter Arterien [Kazimierski, 2005]), in der Lebensmittelindustrie (z.B. nanoverkapselte Vitamine für so genanntes „Functional Food“ [Velikov, 2006]) oder die Anwendung bei Wirkstoffen für den pharmazeutischen Einsatz sind ein wichtiger Faktor, sowohl von der wirtschaftlichen als auch von der pharmazeutischen bzw. medizinischen Seite her. Angefangen beim selbstdurchschreibenden Papier (in dem mikroverkapselte Tinte in einer dünnen Schicht auf der Rückseite des Papiers aufgebracht wird und durch das Auftreffen der Schreibmaschinentype diese auf das darunter liegende Blatt freigibt [Cinzia De Vita, 2004]) macht die Nanotechnologie Fortschritte in allen Bereichen möglich.

Die vorliegende Arbeit wird sich auf die Verwendung der Nanotechnologie in der medizinischen bzw. pharmazeutischen Anwendung beschränken. In der medizinischen Anwendung und der Löslichkeitsverbesserung wird die Technologie zur Nanonisierung (d.h. Zerkleinerung unterhalb von 1000 nm) in den nächsten Jahren eine Schlüsselstellung in den modernen Therapien einnehmen. In den letzten fünfzehn Jahren ist die Zahl der schwerlöslichen Wirkstoffe stetig gewachsen. Prognosen schätzen, dass bereits 40% aller Wirkstoffe in klinischer Entwicklung Löslichkeitsprobleme mit sich bringen [Speiser, 1998, Heimbach et al., 2007]. Verbesserte Techniken bei Screening Methoden führen zu einer stetig steigenden Zahl an entdeckten Wirkstoffen, die eine schlechte Löslichkeit in Wasser haben. In der Literatur finden sich Angaben, dass ungefähr 60% aller Wirkstoffe, die heute direkt aus der Synthese kommen, schwerlöslich sind [Merisko-Liversidge, 2002]. Eine schlechte Löslichkeit in Wasser korreliert in den meisten Fällen mit einer schlechten Bioverfügbarkeit. Wird kein Weg gefunden, den Wirkstoff löslich zu machen, so wird er nicht in den Blutkreislauf resorbiert und kann nicht zum Wirkort gelangen.

Um Wirkstoffe anhand ihrer Wasserlöslichkeit und intestinaler Permeabilität klassifizieren zu können, wurde ein Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (BCS) entwickelt

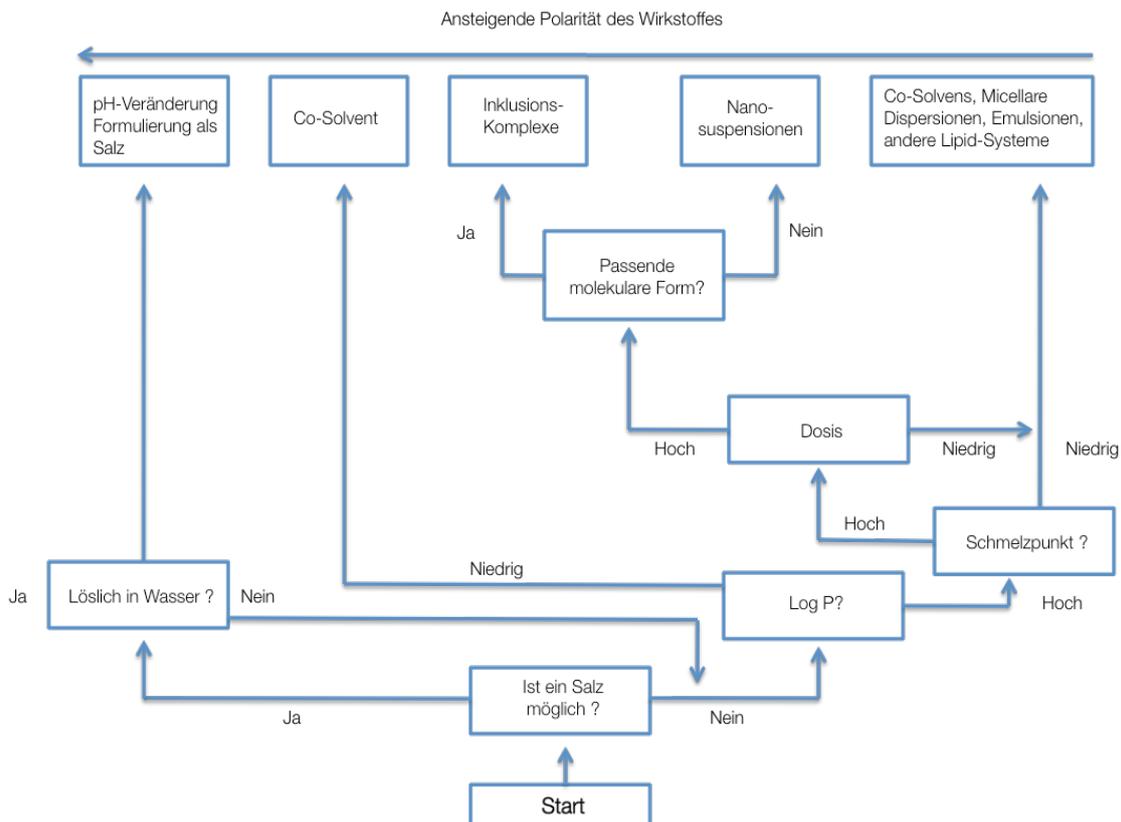
[FDA, 2000; Kanfer, 2002]. Innerhalb diese Systems werden Wirkstoffe in 4 Klassen eingeteilt. Schwerlösliche Wirkstoffe können entweder zu Klasse II oder IV gehören. Den Wirkstoffen in Klasse IV ist gemein, dass sie gleichzeitig sowohl eine schlechte Löslichkeit als auch eine geringe Permeabilität zeigen. Aus diesem Grund führt die Überwindung der Löslichkeitsproblematik von Stoffen aus Klasse IV nicht zwangsläufig zu einer besseren Bioverfügbarkeit. Wirkstoffe aus Klasse II sind jedoch geeignet, um mittels Methoden zur Löslichkeitsverbesserung in eine anwendbare Form überführt zu werden, da bei ihnen lediglich die schlechte Löslichkeit die Bioverfügbarkeit einschränkt. In diesem Zusammenhang bedeutet Löslichkeitsverbesserung die Anwendung beliebiger Methoden, die eine erhöhte Lösungsgeschwindigkeit und idealerweise eine erhöhte Sättigungslöslichkeit bewirken (vgl. Abb. 1) [Möschwitzer, 2005].



**Abb.1:** Ansatzpunkte zur Veränderung der Lösungseigenschaften von Wirkstoffen nach dem BCS System (modifiziert nach [Möschwitzer, 2005])

Es existieren verschiedene Wege, um schwer und sehr schwer lösliche Wirkstoffe leichter löslich zu machen: diese Methoden sind jedoch auf Stoffe mit bestimmten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Chemie (z.B. Löslichkeit in bestimmten organischen Medien) oder auch der molekularen Größe oder Konformation (z.B. Einbau des Moleküls in einen Cyclodextrinring [Grau, 2000]) beschränkt. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Ansatzpunkte, die je nach Eigenschaften des betrachteten Wirkstoffes zu

einer verbesserten Bioverfügbarkeit führen. Abgesehen hiervon ist der Einsatz von grenzflächenaktiven Substanzen (Tensiden) oder Lösungsverbesserern möglich, der jedoch zu erhöhtem Auftreten von Nebenwirkungen (Cremophor® EL verstärkt z.B. die Toxizität von Taxol; HP- $\beta$ -Cyclodextrin ist die Ursache für die Nephrotoxizität von Itraconazol in Sporanox® [Willems et al. 2001]) und zu weiteren Nachteilen (z.B. organischen Lösemittelrückständen) führen kann.



**Abb.2:** Entscheidungsbaum zur Auswahl eines Formulierungsweges (modifiziert nach [Rabinow, 2004])

Das Mikronisieren von Wirkstoffpulvern in Zielgrößen von 1 bis 10  $\mu\text{m}$  und die damit verbundene Vergrößerung der Oberfläche mit der Folge einer gesteigerten Lösungsgeschwindigkeit ist nicht ausreichend, um die Bioverfügbarkeitsprobleme von sehr schwer löslichen Wirkstoffen (bspw. Amphotericin B) zu überwinden. Der logische Schritt ist der Übergang von Mikronisierung zu Nanonisierung. Seit Anfang der 1990er Jahre propagierte die Firma Nanosystems/élan den Einsatz von Nanokristallen (statt Mikrokristallen) zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit und ebenfalls die Nutzung von in Wasser suspendierten Nanokristallen (Nanosuspensionen) für intravenöse und pulmonale Applikation. Die Herstellung dieser Nanokristalle beruht dabei auf dem Prinzip des Mahlens. Bereits kurz nach dem Erscheinen der Ergebnisse von Nanosystems/élan wurden weitere Technologien zur Erzeugung von Partikeln im Größenbereich deutlich unterhalb von 1  $\mu\text{m}$  entdeckt und die zu Grunde liegenden Prinzipien wissenschaftlich erforscht. Die grund-

genden Herstellungsprinzipien für diese Partikel werden im Abschnitt 2.1 umrissen.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der SolEmuls®-Technologie die Löslichkeit und damit auch die Bioverfügbarkeit von verschiedenen in Wasser schwer löslichen Modellarzneistoffen zu erhöhen. Bei der SolEmuls®-Technologie wird der schwer lösliche Arzneistoff direkt durch Zuhilfenahme der Hochdruckhomogenisation in die Lecithinschicht einer kommerziell erhältlichen Lipidemulsion eingelagert. [Akkar, 2004, Akkar and Müller, 2003a, Akkar and Müller, 2003b; Bock, 1994; Klang et al., 1998; Lucks, 1993; Mizushima et al., 1982; Müller et al., 2004; Schmidt, 2002; Singla et al., 2002] Er liegt dort stabil in nanonisierter, diskreter Form vor.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Langzeitstabilität der verwendeten Trägeremulsionen (Lipofundin®). Hierzu werden die von Heinemann und Schuhmann [Müller and Heinemann, 1992; Müller and Heinemann, 1993; Müller et al., 1992; Schuhmann, 1995 ] begonnenen Untersuchungen fortgesetzt und die Stabilität der von diesen erstmals untersuchten Emulsionen nach einer Lagerzeit von 18 Jahren bei Raumtemperatur untersucht.

Der eigentliche SolEmuls®-Herstellungsprozess ist einfach und unkompliziert. Der pulverförmige Arzneistoff wird in einer lecithinstabilisierten O/W Emulsion (z.B. Intralipid® oder Lipofundin®) dispergiert. Diese Dispersion wird dann mit Hilfe von Hochdruckhomogenisatoren homogenisiert. Der Prozess kann hier verbessert bzw. beschleunigt werden, wenn der Arzneistoff im Vorfeld in nanopartikulärer Form vorliegt. Als Produkt entsteht eine stabile Emulsion bzw. als Nanosuspension.

Zuerst muss jedoch untersucht werden, ob sich ein Arzneistoff für die Anwendung der SolEmuls®-Technologie eignet. Dazu wird zunächst eine entsprechende Nanosuspension formuliert. Das Vermögen eines Stoffes, eine stabile Nanosuspension zu bilden, gibt einen wertvollen Hinweis für seine Eignung, mit Hilfe der SolEmuls®-Technologie verarbeitet zu werden. Die entsprechende Nanosuspension kann als Vorstufe für die Anwendung der SolEmuls®-Technologie angesehen werden.

Um einen geeigneten Formulierungsweg für die für diese Arbeit gewählten Arzneistoffe auswählen zu können, ist es zunächst nötig, sich einen umfassenden Überblick im Bereich „Nanotechnologie“ und Herstellung von nanopartikulären Systemen für die pharmazeutische Anwendung zu verschaffen.

## 2. Nanokristalle, Nanosuspensionen und parenterale Fettemulsionen

Als Nanokristalle bezeichnet man im Allgemeinen Partikel mit einer Teilchengröße im Nanometerbereich, die vorwiegend über kristalline Eigenschaften verfügen. Dabei wird abhängig vom jeweilig betrachteten Forschungsgebiet diskutiert, ab welcher Größe ein Partikulum als Nanopartikel angesehen werden kann. Beispielsweise werden in der Kolloidchemie Partikel nur dann als Nanopartikel definiert, wenn sie eine Größe von 100 nm - in manchen Fällen von 20 nm - unterschreiten. In der pharmazeutischen Anwendung ist es sinnvoll, Nanopartikel in einem Größenbereich zwischen einigen Nanometern und 1 µm zu definieren. Mikropartikel sind demgemäß definiert in einem Bereich von 1 – 1000 µm.

Nanokristalle bestehen in der Regel zu 100 Prozent aus Wirkstoff; sie enthalten keinerlei Trägermaterialien. Das Dispergieren von Nanokristallen in flüssigen Medien ergibt die so genannte Nanosuspension. Mikro- und Makrosuspensionen enthalten im Gegensatz dazu entsprechend größere Teilchen. Dispergierte Nanopartikel müssen generell durch Zugabe von Tensiden oder Polymeren stabilisiert werden. Als Dispersionsmedien kommen Wasser, wässrige Lösungen oder nicht wässrige Medien wie zum Beispiel flüssiges Polyethylenglykol (PEG) oder Öle in Frage.

Als Nanopartikel formulierte Arzneistoffe besitzen gegenüber mikronisierten Arzneistoffen folgende positive Effekte [Liversidge, 1996; Liversidge and Cundy; 1995, Liversidge und Conzentino, 1995]:

- Schnelleres Einsetzen der Wirkung,
- Verbesserte Bioverfügbarkeit,
- Größere Wirksamkeit,
- Bessere Voraussage der therapeutischen Wirksamkeit,
- Verringerung der Effekte durch Nahrungsmittel,
- Verbesserte Dosisproportionalität und Gleichförmigkeit,
- Gezielte Arzneistoffabgabe,
- Formulierungen ohne toxische Trägersubstanzen.

## 2.1 Grundlegende Formulierungsprinzipien

Die Herstellung von Nanopartikeln kann grundsätzlich durch zwei Herstellungsarten erfolgen. Man unterscheidet dabei in aufbauende Verfahren (sog. Bottom-up-Technologien) und abbauende Verfahren (sog. Top-down-Technologien). Die verschiedenen Methoden lassen sich in Reihenfolge und Art beliebig kombinieren um den gewünschten Zerkleinerungseffekt zu erreichen. Dabei ist allen Methoden das Ziel gemein, eine möglichst enge Partikelgrößenverteilung zu erhalten, da diese sich günstig auf die Stabilität der Suspension auswirkt, weil die sog. Ostwald-Reifung vermieden werden kann. (Diese besagt, dass in einem Teilchengemisch, bei dem die Partikelgrößenverteilung nicht möglichst klein ist, sich die kleinen Partikel zugunsten der größeren auflösen, da die Sättigungslöslichkeit über kleinen Partikeln größer als über großen Partikeln ist und damit ein Konzentrationsgradient entsteht, der es ermöglicht, dass sich die kleinen Partikel auflösen und der nun gelöste Wirkstoff zu den größeren Partikeln diffundiert, dort rekristallisiert und die Partikel anwachsen.)

Die grundlegenden Prinzipien dabei stellen die Ostwald-Freundlich- und die Kelvin-Gleichung dar. Diese beschreiben die Erhöhung des Dampfdrucks bei Flüssigkeitströpfchen in Abhängigkeit von der Tröpfchengröße bzw. der Krümmung der Tröpfchenoberfläche. Dabei gilt, dass die Oberfläche umso gekrümmter ist, je kleiner der Tropfen ist.

$$\ln \frac{P}{P_0} = \frac{-\gamma * V_L * \cos \theta}{r_K * R * T}$$

**Formel 1:** Kelvin-Gleichung

P	Dampf-/ Lösedruck eines Partikulums mit dem Radius r
P <sub>0</sub>	Grenzdampfdruck einer glatten Flüssigkeitsoberfläche
γ	Grenzflächenspannung
V <sub>L</sub>	molares Volumen des Partikulums (berechnet als Molekulargewicht/ Dichte)
cosθ	Kontaktwinkel
r <sub>K</sub>	Radius des Partikulums
T	absolute Temperatur
R	allgemeine Gaskonstante

In der Ostwald-Freundlich-Gleichung wird die Abhängigkeit von Sättigungslöslichkeit und Partikelgröße beschrieben (Grant and Brittain, 1995; Florence, 1981)

$$\log \frac{c_{s,r}}{c_{s,unlimited}} = \frac{2 * \gamma * V_m}{2,303 * R * T * \rho * r}$$

**Formel 2:** Ostwald-Freundlich-Gleichung

$c_{s,r}$	Löslichkeit eines Partikulums mit dem Radius r
$c_{s,unlimited}$	Löslichkeit eines großen Partikulums
$\gamma$	Grenzflächenspannung
$V_m$	molares Volumen des Partikulums
$T$	absolute Temperatur
$R$	allgemeine Gaskonstante
$\rho$	Dichte des Feststoffes
$r$	Partikelradius

Eine Erhöhung der Sättigungslöslichkeit ( $c_s$ ) führt dabei also zu einer Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit gemäß ihrer Proportionalität zum Term  $(c_s - c_x)$ . Diese Gesetzmäßigkeit wurde in der Noyes-Whitney Gleichung beschrieben (Florence and Attwood 1981)

:

$$\frac{d_m}{d_t} = \frac{A * D * (c_s - c_x)}{h}$$

**Formel 3:** Noyes-Whitney-Gleichung

$dm/dt$	Lösungsgeschwindigkeit (gelöste Masse pro Zeiteinheit)
$A$	Oberfläche
$D$	Diffusionskonstante
$c_s$	Sättigungslöslichkeit
$c_x$	Löslichkeit am Punkt x = Stoffkonzentration am Punkt x
$h$	Dicke der diffusen Schicht

### 2.1.1 Aufbauende Verfahren (Präzipitations-Verfahren)

Bei dem Präzipitations-Verfahren handelt es sich im Grunde um einen klassischen Herstellungsvorgang, der als „via humida paratum“ (v.h.p.) („auf feuchtem Wege“) bekannt ist. Das v.h.p.-Verfahren wurde ursprünglich zur Herstellung von Salben verwendet, die den Wirkstoff in fein dispergierter, präzipitierter Form enthalten. Der Wirkstoff wird in einem geeigneten Lösungsmittel aufgelöst und anschließend zu einem Nicht-Löseemittel gegeben. Dies führt zur Ausfällung fein verteilter Nanokristalle. Diese müssen anschließend stabilisiert werden, damit sie nicht in den Mikrometerbereich wachsen. Der Wirkstoff muss darüber hinaus zumindest in einem Lösemittel löslich sein, was zu einem Problem bei neueren Wirkstoffen führt, die sowohl in wässrigen als auch in nicht wässrigen Medien unlöslich sind. Aus diesem Grund sind die aufbauenden Präzipitationsverfahren nur für eine Auswahl von Wirkstoffen geeignet und stellen keinen universellen Lösungsansatz dar.

Eine andere Präzipitationsmethode ist die Herstellung amorpher Wirkstoff-Nanopartikel, etwa von Carotin-Nanopartikeln in der Lebensmittelindustrie [Shackleford et al., 2003]. Eine Lösung von Carotin und einem Tensid in einem geeigneten Öl wird mit einem geeigneten Lösemittel bei einer spezifischen Temperatur vermenget. Um eine Lösung zu erhalten, wird ein Schutzkolloid zugesetzt. Dies führt zu einem zweiphasigen System. Das durch das Schutzkolloid stabilisierte Carotin reichert sich in der Ölphase an. Nach Lyophilisation zeigt das Pulver in der Röntgenanalyse, dass ca. 90 Prozent des Carotinoide amorph sind. Diese Technik wird von der Firma Soliqs (Ludwigshafen, Deutschland) für Pharmazeutika unter dem Namen NanoMorph® angewandt.

### 2.1.2 Abbauende Verfahren

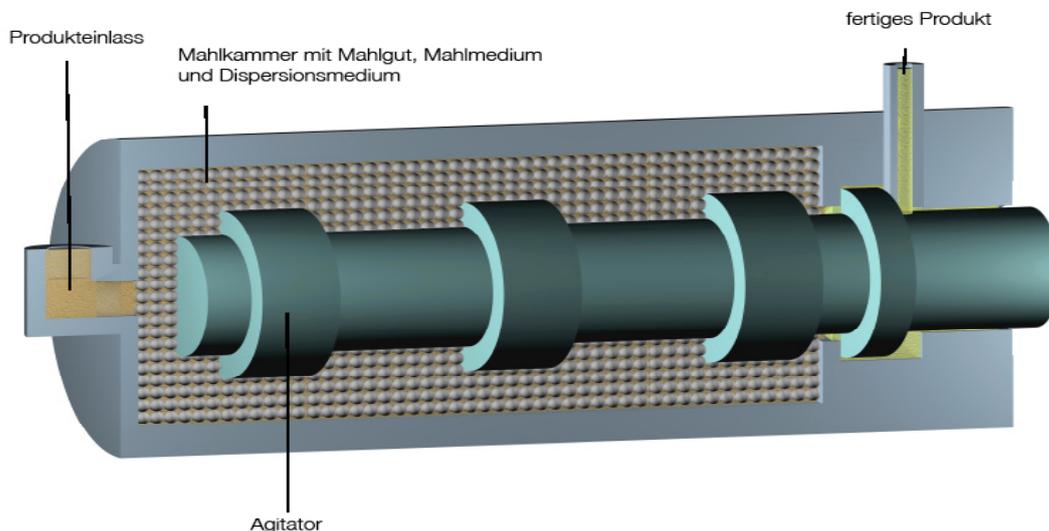
Bei den abbauenden Verfahren handelt es sich im Wesentlichen um Mahl- und/oder Homogenisationsprozesse. Auch hierbei lassen sich die unterschiedlichen Vorgänge miteinander kombinieren.

#### 2.1.2.1 Mahlen

Die klassische NanoCrystals®-Technologie verwendet Kugel- oder Perlmöhlen, um die Partikel zu zerkleinern. Bereits aus der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts sind Kugelmöhlen zur Produktion ultrafeiner Suspensionen bekannt [Pahl, 1991]. Mahlmedium, Dispersionsmedium (im Allgemeinen Wasser) Stabilisatoren und Wirkstoff werden in die

Mahlkammer geladen (siehe Abbildung 3). Durch ihre Bewegung kommen die Mahlmedien mit dem Wirkstoff in Kontakt. Es entstehen Scherkräfte und Kollisionskräfte, die zur Zerkleinerung des Mahlguts führen. Im Gegensatz zur Hochdruckhomogenisation handelt es sich um eine Niedrigenergie-Technik.

Die Bewegung kann prinzipiell auf zwei Wegen erzeugt werden: Entweder wird das Mahlmedium durch einen Agitator bewegt oder der Gesamtkontainer wird einer komplexen Bewegung unterworfen, was schlussendlich zu einer Bewegung des Mahlgutes führt. Bei maximaler Beladung sind etwa drei Viertel des Mahlkammervolumens mit Mahlgut befüllt. Große Chargen sind somit schwierig herzustellen, wenn der gesamte Behälter bewegt wird. Zur Produktion großer Chargen werden deshalb Mühlen mit Agitatoren genutzt. Die Mahldauer hängt von vielen Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Anteil an Tensid, der Härte des Wirkstoffes, der Viskosität, der Temperatur, dem Energieeintrag und der Größe des Mahlmediums. Die Mahldauer kann von 30 Minuten bis zu mehreren Tagen betragen [Merisko-Liversidge et al., 2003]. Es sind bereits mehrere mittels dieser Technologie hergestellte Arzneimittel von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen. Dazu gehören unter anderem Rapamune® (das Sirolimus in Tabletten enthält), Emend® (enthält Aprepitant als Pellets in Hartgelatinekapselform), Tricor® (enthält Fenofibrat in Tablettenform) und Megace ES® (enthält Megestrolacetat als Suspension).



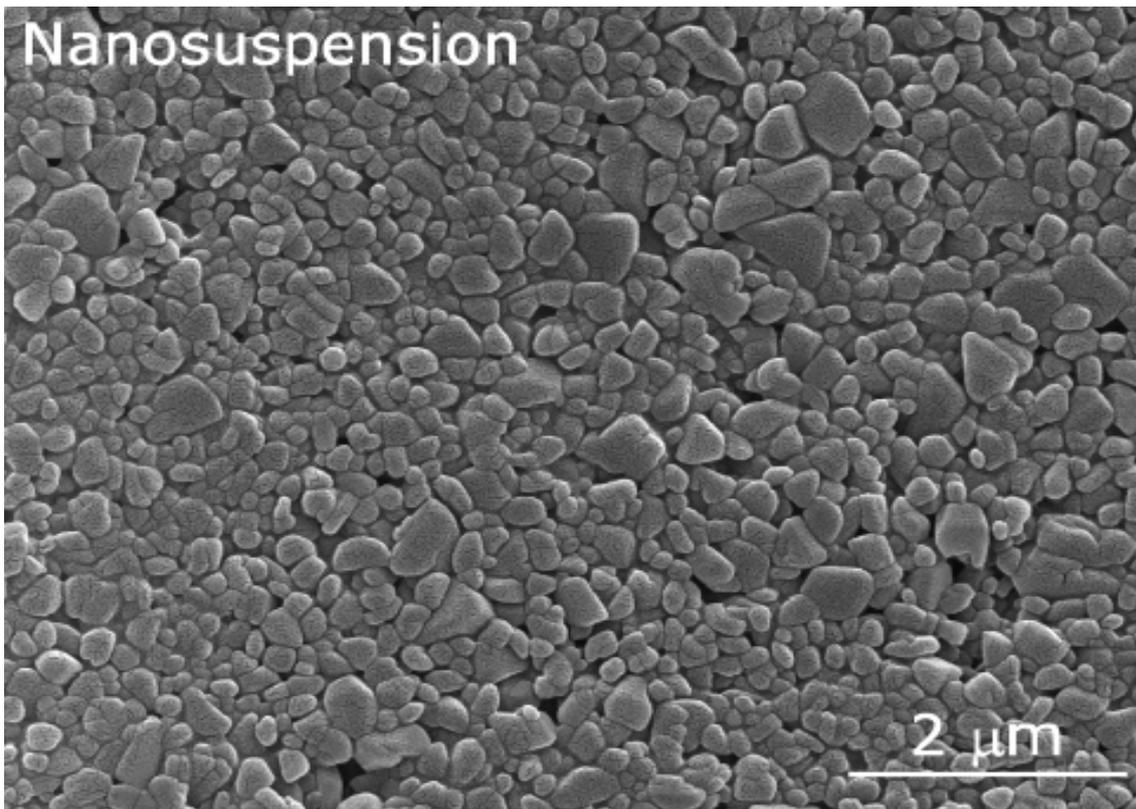
**Abb.3:** Schematischer Aufbau einer Kugelmühle

### 2.1.2.2 Homogenisation

Für die Herstellung von Nanokristallen mittels Homogenisation sind drei wichtige Verfahren zu nennen: die Microfluidizer-Technologie (IDD-P™-Technologie), die Kolben-Spalt-Homogenisation in Wasser (Dissocubes®-Technologie) und die Nanopure®-Technologie.

Mit der Microfluidizer-Technik lassen sich kleine Partikel durch Zusammenprall von zwei Flüssigkeitsströmen unter Drücken bis zu 1.700 bar herstellen [Bruno 1999]. Dies führt zur Kollision der Partikel, Scherkräften und Kavitationskräften und kann mit Jetstream-Homogenisatoren wie dem Microfluidizer® (Microfluidics Inc., Newton, MA, USA) geschehen [Tunick et al., 2002]. Um die gewünschte Teilchengröße zu stabilisieren, werden Tenside benötigt. Für eine ausreichende Zerkleinerung sind jedoch etwa 50 bis 100 Homogenisationszyklen nötig. Die Firma SkyePharma Inc. (Cambridge, MA, USA), früher RTP Inc., nutzt dieses Verfahren für ihre Insoluble Drug Delivery-Particles (IDD-P™) Technologie bei der Herstellung von Partikeln schwerlöslicher Wirkstoffe unterhalb des Mikrometerbereichs.

Im Gegensatz zur IDD-P™-Technologie verwendet die Dissocubes®-Technologie Kolben-Spalt-Homogenisatoren (Abbildung 5). Die Technik wurde 1994 von Müller et al. [Müller et al., 1999; Müller et al., 1995] entwickelt und später von SkyePharma PLC erworben. Es handelt sich dabei um die Herstellung von Nanopartikel-Suspensionen in Wasser bei Raumtemperatur (siehe Abbildung 5).



**Abb.4:** Raster-Elektronen-Mikroskop-Aufnahme einer Nanosuspension hergestellt mittels H42- Technologie nach 20 Zyklen (mit freundlicher Genehmigung: Möschwitzer 2005)

Ein Wirkstoffpulver wird in einer wässrigen Tensidlösung dispergiert und anschließend mittels eines Kolbens durch einen sehr kleinen Homogenisationsspalt mit Drücken bis zu 4.000 bar, typischerweise 1.500 bis 2.000 bar, gepresst. Die resultierende hohe Strömungsgeschwindigkeit bewirkt einen Anstieg des dynamischen Drucks, der durch einen Abfall des statischen Drucks unterhalb des Dampfdruckes der wässrigen Phase (siehe Bernoullis Gesetz) kompensiert wird. Es bilden sich Gasblasen und das Wasser beginnt bei Raumtemperatur zu siedeln. Die entstandenen Gasblasen kollabieren sofort, wenn die Flüssigkeit den Homogenisationsspalt verlässt. Die Entstehung und Implosion der Gasblasen bewirken durch die Kavitation ausgelöste Schockwellen. Hohe Scherkräfte, turbulenter Fluss und die enorme Kraft der Schockwellen reduzieren die Größe der Wirkstoffpartikel [Müller, Jacobs et al., 2001].

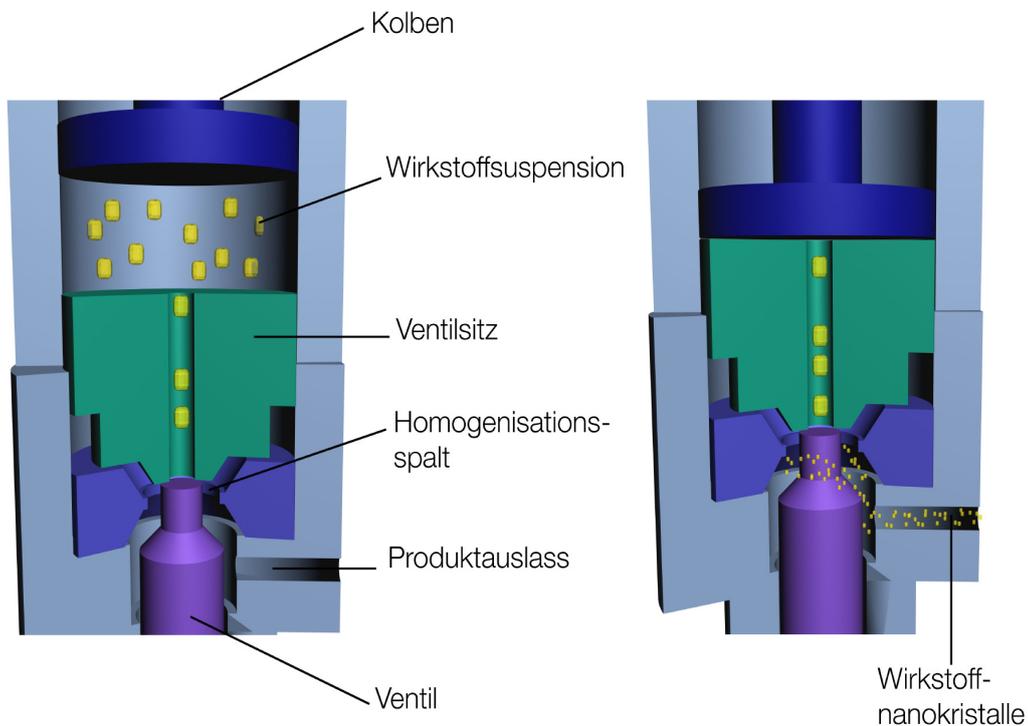
$$\rho \left( \frac{v^2}{2} \right) + pgh + p = \text{const.}$$

**Formel 4:** Bernoullis Gesetz

$p(v^2/2)$ : dynamischer Druck  
 $pgh$  : Schwereruck  
 $p$  : statischer Druck

Bernoullis Gesetz gibt an, dass die Summe aus dynamischem Druck, Schweredruck und statischem Druck konstant ist.

Abbildung 5 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Kolbenspalthomogenisators und den Ablauf eines Homogenisationszykluses. Dabei drückt ein Kolben mit einem Druck von bis zu 4000 bar auf das Homogenisationsgut und presst es durch den Homogenisationspalt. Das fertige Produkt verlässt den Homogenisator durch den Produktauslass.



**Abb.5:** Schematischer Aufbau der Homogenisationskammer eines Kolbenspalthomogenisators

Um eine enge Partikelgrößenverteilung zu erreichen, welche die Stabilität der Suspension erhöht, ist eine homogene Verteilung der Leistungsdichte erforderlich. Anderenfalls erfahren die Partikel an unterschiedlichen Positionen unterschiedliche Dispersionskräfte und der Grad der Partikelzerkleinerung variiert innerhalb des Dispersionsvolumens. Der Grad der Dispersion hängt dabei von der Leistungsdichte und der Leistungsverteilung im Dispersionsvolumen ab [Mehnert and Mäder, 2001]. Die Leistungsdichte ( $P_v$ ) ist definiert als Energie ( $W$ ) geteilt durch das Homogenisationsvolumen ( $V$ ) pro Zeiteinheit ( $t$ ), und kann mit Hilfe der folgenden Gleichung beschrieben werden:

$$P_v = W/tV$$

**Formel 5:** Berechnung der Leistungsdichte

Bei der Hochdruckhomogenisation sind die Faktoren, die die Leistungsdichte beschreiben, der Homogenisationsdruck und die Weite des Homogenisationsspalt. Die Breite des Spaltes - bei dem hier verwandten LAB 40 unter einem Druck von 1500 bar - durch den das zu homogenisierende Gemisch gedrückt wird, reduziert sich von 3 cm auf 25  $\mu\text{m}$ . Dabei variieren Druck und Kraft je nach Spalt und Einstellung [Jahnke, 1998].

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die relevanten Parameter:

**Tab.1:** Einfluss verschiedener Parameter auf das Homogenisationsergebnis [Jahnke, 1998]

Einflussgröße	Symbol	Einheit
Physikalische Größe		
Viskosität disperse Phase	$\eta_d$	Pas
Viskosität kontinuierliche Phase	$\eta_k$	Pas
Dichte der Phasen	$\rho_d, \rho_k$	$\text{kg/m}^3$
Grenzflächenspannung	$g$	N/m
Tensidkonzentration	$c_E$	kg/kg
Besatzdichte Tensid	$G$	$\text{kg/m}^2$
Härtegrad disperse Phase	$H_m$	(1 bis 10 nach Mohs)
Konzentration disperse Phase	$\Phi_d$	kg/kg
Dampfdruck kontinuierliche Phase	$P_d$	Pa
Partikelgröße Ausgangsmaterial	$d_r$	m
Gasanteil gelöst/ungelöst	$\Phi_G$	$\text{m}^3/\text{kg}$ (i.N.)

<b>Geometrie des Homogenisatorventils</b>		
Effektiver Durchmesser	$d_{\text{eff}}$	m
Radius Einlass	$r_e$	m
Spaltgröße am Zerkleinerungsort	$h$	m
Ventillänge	$l_v$	m
Aufschlagdistanz	$a_{\text{pr}}$	m
<b>Prozessparameter</b>		
Homogenisationsdruck	$p_0$	Pa
Temperatur nach Homogenisation	$p_g$	Pa
Temperatur	$T$	K
Kapazität	$V$	$\text{m}^3/\text{s}$
Anzahl Druckniveaus	$n_z$	l

Eine Leistungsdichte von  $10^{12} - 10^{13} \text{ W/m}^3$  ist bei der Hochdruckhomogenisation keine Seltenheit. Einen anderen Ansatz verfolgt die Nanopure<sup>®</sup>-Technologie, die von der Firma Pharmasol GmbH (Berlin, Deutschland) entwickelt und vermarktet wird. Hier werden Dispersionsmedien mit geringem Dampfdruck oder optional eine Homogenisation bei niedrigen Temperaturen genutzt. Deshalb ist das Auftreten von Kavitation im Homogenisationsspalt gering oder nicht vorhanden. Selbst ohne Kavitation ist die Zerkleinerung ausreichend [Bushrab and Müller, 2003]. Die verbleibenden Scherkräfte, Partikelkollisionen und Turbulenzen sind für eine Zerkleinerung des Wirkstoffes zu Nanopartikeln ausreichend. Da eine Homogenisation bei niedrigen Temperaturen möglich ist, können auch thermolabile Wirkstoffe verarbeitet werden [Müller, 2002]. Der gesamte Vorgang kann ebenfalls in nicht-wässrigen Medien durchgeführt werden, um eine Hydrolyse zu vermeiden. Werden Öle, flüssiges oder heiß-schmelzendes Polyethylenglycol (PEG) verwendet, kann das Produkt direkt in Gelatine- oder HPMC-Kapseln verfüllt werden [Keck et al., 2004].

Die Firma Baxter (Unterschleißheim, Deutschland) nutzt für ihre NanoEdge<sup>®</sup>-Technologie einen Präzipitationsschritt mit anschließendem Tempersschritt durch Einwirken hoher Energien, beispielsweise hoher Scherkräfte oder thermischer Energie [Kipp et al., 2003]. Pharmasol verwendet in seiner Nanopure<sup>®</sup>-XP-Technologie einen Vorbehandlungsschritt mit anschließender Homogenisation, um Partikel weit unterhalb von 200 nm zu produzieren (siehe Abbildung 4) [Müller and Möschwitzer, 2005].

## 2.2 Eigenschaften von Nanokristallen

Nanokristalline Formen von schwer wasserlöslichen Substanzen zeigen fast immer eine erhöhte Lösungsgeschwindigkeit gegenüber der ursprünglichen Form. Hauptgründe dafür sind eine erhöhte Lösungsgeschwindigkeit durch Oberflächenvergrößerung und Erhöhung der Sättigungslöslichkeit.

### 2.2.1 Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit durch Oberflächenvergrößerung

Mit der Verkleinerung eines Stoffes geht eine Vergrößerung der Oberfläche und damit nach dem Gesetz von Noyes-Whitney (Stricker, 1987; Mosharraf und Nyström, 1995) eine erhöhte Lösungsgeschwindigkeit einher.

Die Lösungsgeschwindigkeit wird dabei maßgeblich von drei Faktoren beeinflusst:

1. Oberfläche des Feststoffes
2. Diffusionstransport des gelösten Stoffes
3. Sättigungslöslichkeit (siehe 2.2.2)

$$\frac{d_m}{d_t} = \frac{D * A}{h * (c_s - c_x)}$$

**Formel 6:** Noyes-Whitney-Gleichung

$d_m/d_t$  : Auflösungsgeschwindigkeit

D: Diffusionskoeffizient

h : Dicke der Diffusionsschicht

A: Oberfläche des Feststoffes

$c_s - c_x$  : Differenz zwischen Grenzkonzentration an der Oberfläche ( $c_s$ ) und der Grenzkonzentration nach Diffusionstrecke ( $c_x$ )

Daraus folgt, dass die benetzbare Oberfläche des Feststoffes entscheidend für die Auflösung ist.

$$\Delta p \sim \frac{1}{r}$$

**Formel 7:** Vereinfachung aus der Kelvin-Gleichung

p: Dampf- bzw. Lösedruck  
r: Radius (Partikulum)

Nimmt man nun die Kelvin-Gleichung in einer vereinfachten Form hinzu, so erkennt man, dass der Dampfdruck außerdem von der Partikelkrümmung (diese steigt mit abnehmendem Partikelradius) abhängt, je kleiner der Partikelradius, desto höher ist sein Dampf- bzw. Lösedruck.

Aus der Prandtl-Gleichung [Mosharraf and Nyström, 1995] ergibt sich, dass durch Verminderung der Dicke der Diffusionsschicht ( $h_H$ , hydrodynamische Schicht) die Lösungsgeschwindigkeit ebenfalls erhöht werden kann:

$$h_H = k * \frac{L^2}{v^3}$$

**Formel 8:** Prandtl-Gleichung

$h_H$ : hydrodynamische Schicht (entspricht der Dicke der Diffusionsschicht)  
k: Konstante  
L: Länge der Oberfläche in Flussrichtung  
v: relative Geschwindigkeit der Flüssigkeit

Ein in einer Flüssigkeit dispergiertes Partikulum ist von einer dünnen Schicht einer gesättigten Lösung umgeben, die als Diffusionsschicht bezeichnet wird; die Dicke dieser Schicht entspricht der hydrodynamischen Schicht  $h_H$  der Prandtl-Gleichung. Ist die Partikelgröße unterhalb von 2  $\mu\text{m}$ , so ist die Dicke dieser Schicht sehr viel geringer und der Konzentrationsgradient im Vergleich zu größeren Partikeln erhöht.

Aus dem Vorstehenden ergibt sich, dass Mikronisieren ein gangbarer Weg ist, um die Bioverfügbarkeit von Stoffen zu erhöhen, bei denen die Lösungsgeschwindigkeit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für den Wirkungseintritt darstellt. Beim Übergang vom Mikronisieren zum Nanonisieren wird die Partikeloberfläche weiter vergrößert und die Lösungsgeschwindigkeit steigt weiter an.

### 2.2.2 Erhöhung der Sättigungslöslichkeit

Die Sättigungslöslichkeit  $c_s$  ist definiert als die maximale Masse eines Stoffes, die bei einer bestimmten Temperatur und einem bestimmten Lösungsmittel gelöst werden kann (Hunnius, 1993; Stricker, 1987). Wird die Sättigungslöslichkeit erreicht, so wird bei weiterer Zugabe des Stoffes dieser als Bodensatz niedergeschlagen und steht mit dem gelösten Stoff in einem ständigen Gleichgewicht. Ph. Eur. und USP unterteilen die Löslichkeit folgendermaßen (siehe Tabelle):

**Tab.2:** Einteilung der Löslichkeit nach Ph.Eur. bzw. USP

Bezeichnung	Ungefähre Anzahl Volumenteile Lösungsmittel für 1 Massenteil Substanz
sehr leicht löslich	weniger als 1 Teil
leicht löslich	von 1 Teil bis 10 Teile
löslich	über 10 Teile bis 30 Teile
wenig löslich	über 30 Teile bis 100 Teile
schwer löslich	über 100 bis 1.000 Teile
sehr schwer löslich	über 1.000 bis 10.000 Teile
praktisch unlöslich	über 10.000 Teile

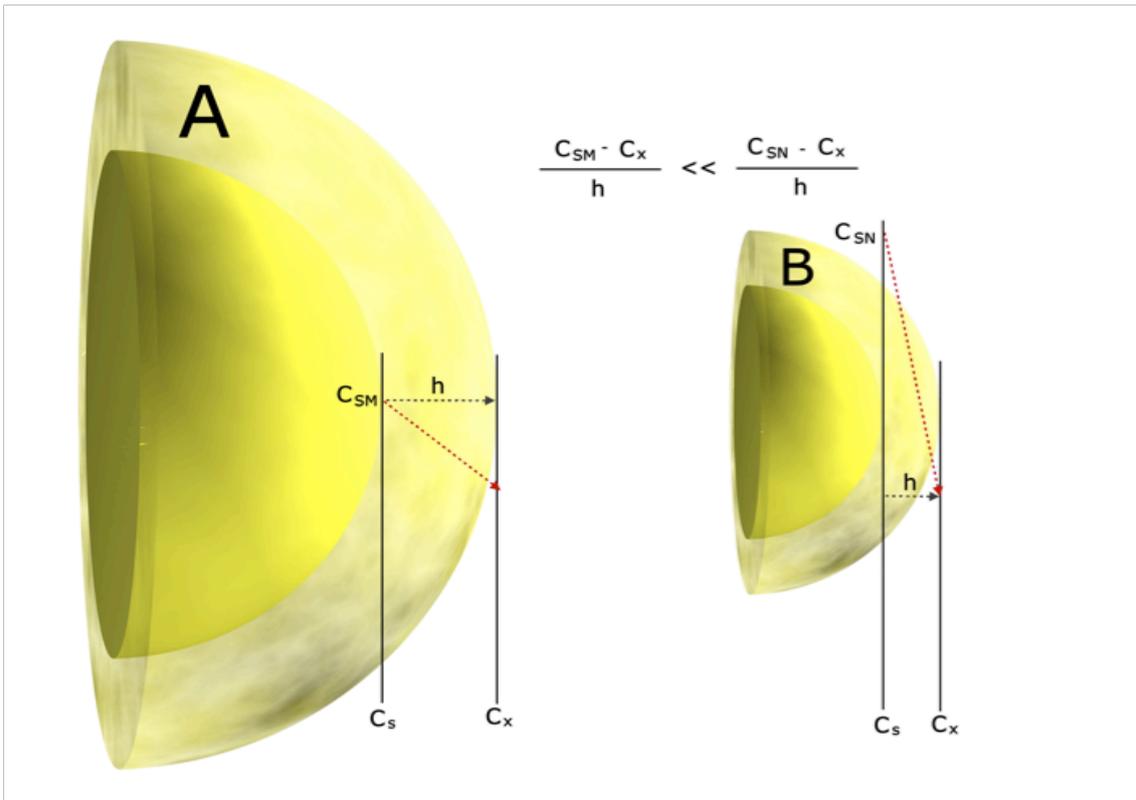
Diese ungefähren Angaben beziehen sich in den Arzneibüchern auf eine Temperatur von 15 – 25 °C und falls nicht anders angegeben handelt es sich bei dem verwandten Lösungsmittel um gereinigtes Wasser.

Nach allgemeiner Lehrmeinung ist die Sättigungslöslichkeit  $c_s$  eine Konstante, die abhängig ist von der Art des Wirkstoffes, dem Lösungsmittel und der Temperatur. Diese Aussage ist für alle Pulver und Puder des täglichen Lebens mit einer Größe im Mikrometerbereich oder größer gültig. Unterhalb einer kritischen Größe von 1-2  $\mu\text{m}$  ist die Sättigungslöslichkeit jedoch auch abhängig von der Partikelgröße. Sie steigt mit abnehmender Größe der Partikel unterhalb von 1  $\mu\text{m}$  an. Deshalb besitzen Wirkstoffnanokristalle eine erhöhte Sättigungslöslichkeit.

Dies hat zwei Vorteile:

1. nach Noyes-Whitney ist die Lösungsgeschwindigkeit weiter erhöht, weil  $dc/dt$  proportional zum Konzentrationsgradienten  $(c_s - c_x) / h$  ( $c_s$  – Sättigungslöslichkeit,  $c_x$  – Gesamtkonzentration,  $h$  – Diffusionsstrecke) ist,

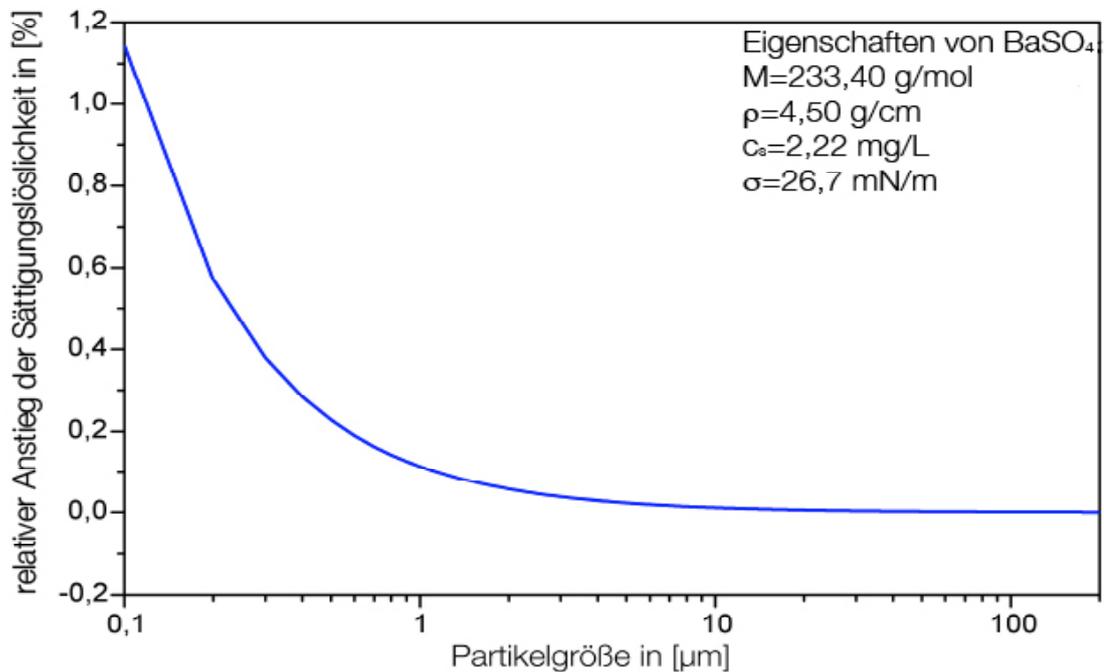
2. durch die erhöhte Sättigungslöslichkeit ist der Konzentrationsgradient zwischen Gastrointestinaltrakt und Blutbahn ebenfalls erhöht und damit auch die Absorption durch passive Diffusion.



**Abb.6:** Vergleich eines Mikrokrystalls (A) und eines Nanokrystalls (B) und ihrer Oberflächenkrümmung und des Konzentrationsgradienten über die Diffusionsstrecke ( $h$ ), ( $c_s$  = Grenzkonzentration an der Oberfläche (A = Mikrokrystall, B=Nanokrystall),  $c_x$  Grenzkonzentration nach Diffusionsstrecke,  $h$  = Diffusionsstrecke)  $dc / dt \sim (c_s - c_x) / h$ .

Der Dampfdruck steigt mit größer werdender Krümmung der Oberfläche, also mit sinkender Partikelgröße (siehe Abbildung 6). Jede Flüssigkeit hat ihren stoffeigenen Dampfdruck, deshalb wird der erhöhte Dampfdruck durch den umgebenden stoffspezifischen Dampfdruck beeinflusst. Die Gegebenheiten beim Übergang eines Moleküls von der flüssigen Phase (Tropfen) in die Gasphase sind prinzipiell identisch mit dem Übergang von der festen Phase (Nanokrystall) in die flüssige Phase (Dispersionsmedium). Der Dampfdruck ist dem Lösungsdruck äquivalent.

Zum Zeitpunkt der erreichten Sättigungskonzentration herrscht ein Gleichgewicht an Molekülen, die in Lösung gehen und rekristallisieren. Dieses Gleichgewicht kann verschoben werden, wenn der Lösungsdruck steigt und sich damit die Sättigungslöslichkeit erhöht. Genau wie bei Flüssigkeiten mit verschiedenen Dampfdrücken unter Normalbedingungen (Tropfengröße im Mikrometerbereich) hat jeder Wirkstoff-Kristall (Kristallgröße im Mikrometerbereich) einen spezifischen Lösungsdruck. Abbildung 7 zeigt den Anstieg der Sättigungslöslichkeit berechnet mittels der Kelvin-Gleichung am Beispiel des schwerlöslichen Salzes  $\text{BaSO}_4$ .



**Abb.7:** Anstieg der Sättigungslöslichkeit berechnet mittels der Kelvin-Gleichung am Beispiel des schwerlöslichen Salzes  $\text{BaSO}_4$  (mit Genehmigung nach [Anger, 2005]).

Überträgt man diese Tatsache auf Wirkstoff-Nanokristalle, so heißt das, dass optimale Kristalle mit dem höchsten Anstieg der Sättigungslöslichkeit eine Größe von 50 nm oder optimal 20-30 nm haben sollten. Daraus lässt sich ableiten, dass die Größe von entscheidender Bedeutung ist, insbesondere hinsichtlich der Sättigungslöslichkeit und deshalb auch dem Anstieg der Lösungsgeschwindigkeit durch eine höhere Sättigungslöslichkeit  $c_s$ .

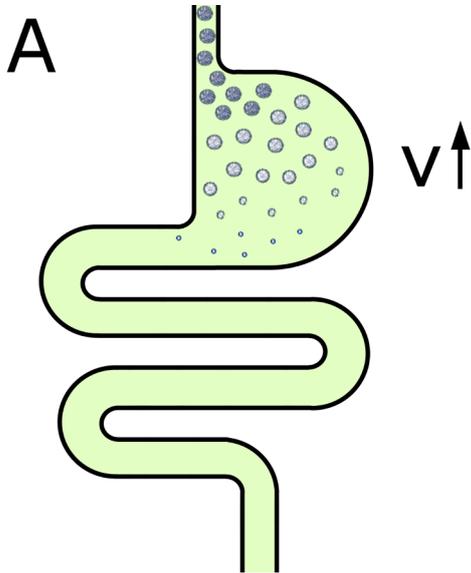
Bei der Übertragung dieser Erkenntnisse in die Praxis muss beachtet werden, welches pharmakokinetische Wirkprofil Blutprofil bei einem Wirkstoff angestrebt wird. In vielen Fällen ist eine zu schnelle Auflösung nicht erwünscht (hohe Plasmaspiegel, geringere  $t_{\max}$  ( $t_{\max}$  ist der Zeitpunkt der maximalen Wirkstoffkonzentration)). Für viele Anwendungen besteht die Anforderung, Nanokristalle mit bewährten Techniken zur kontrollierten Freisetzung zu kombinieren (z.B. überzogene Pellets) um eine zu schnelle Auflösung, zu hohe Plasmaspiegel und eine zu frühe  $t_{\max}$  zu verhindern und länger andauernde Wirkkonzentrationen zu erhalten. [Junghanns, 2008]

Tabelle 3 gibt einen Überblick, welche in vivo Effekte sich durch die Verwendung von Nanokristallen erreichen bzw. ausnutzen lassen. So werden diese bei bereits erwähnten, kommerziell erhältlichen Arzneimitteln ausgenutzt. In Rapamune<sup>®</sup> werden Sirolimus Nanokristalle eingesetzt, um die Charakteristika einer Lösung durch die hohe Lösungsgeschwindigkeit der Nanokristalle zu immitieren (vergl. Tabelle 3 A). Bei Emend<sup>®</sup> nutzt man die hohe Lösungsgeschwindigkeit aus, um den kompletten Wirkstoff Aprepitant in einem sehr engen Absorptionsfenster freizusetzen (vergl. Tabelle 3 B). Bei Tricor<sup>®</sup> wird Fenofibrat durch die Verwendung von Nanokristallen zum Einen in Wasser (durch die geringe Teilchengröße) genauso löslich wie sonst in Fetten und zum Anderen haften die Nanokristalle verbessert an der Wand des Verdauungstraktes an und es werden Einflüsse auf die Bioverfügbarkeit durch Nahrungsmittel vermieden (vergl. Tabelle 3 C und D).

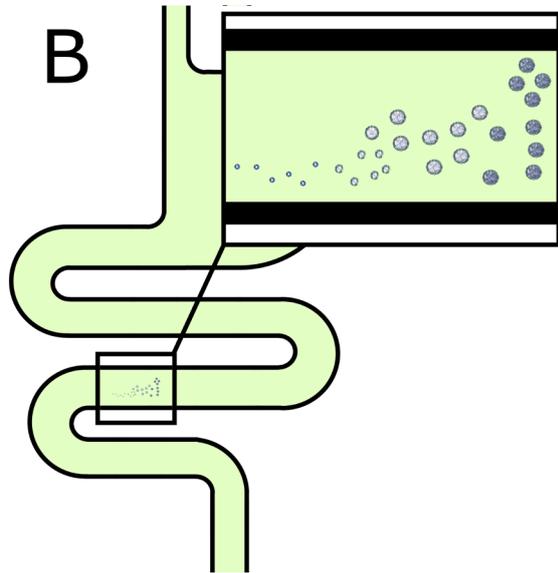
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die optimale Größe der Nanokristalle abhängt vom angestrebten Verteilungsprofil im Blut und dem Applikationsweg. Im Fall der i.v. injizierten Nanokristalle sollte die Größe so gering wie möglich sein, wenn die Pharmakokinetik einer Lösung simuliert werden soll. Im Fall eines gewünschten Targetings (z.B. ins Gehirn mittels der PathFinder<sup>™</sup> Technologie [Müller 1998] oder anderer Organe), sollten die Nanokristalle eine bestimmte Größe haben, um die Auflösung zu verzögern und somit die Möglichkeit zu besitzen, die Bluthirnschranke (BBB) zu erreichen, um dort durch die Endothelzellen der BBB internalisiert werden zu können [Kreuter et al., 1995].

**Tab.3:** In-Vivo Effekte von Nanokristallen

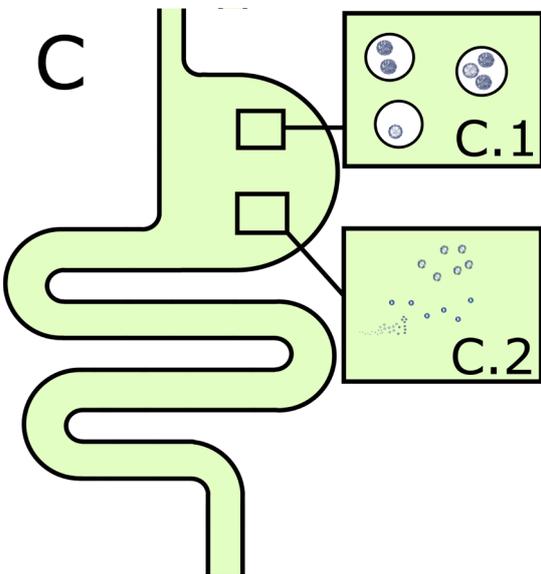
**In vivo Effekte von Nanokristallen (NC)**



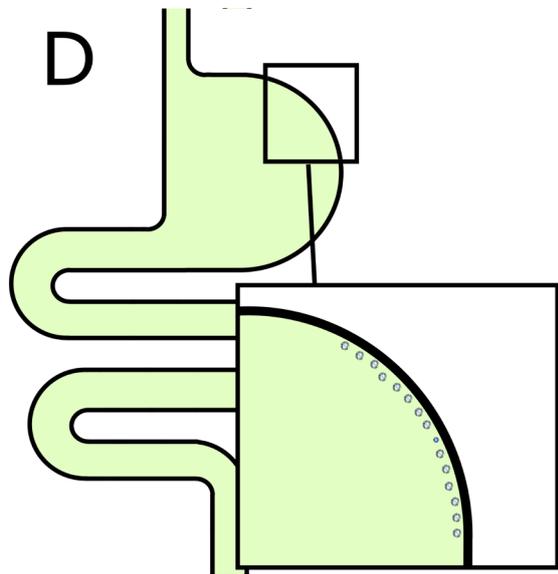
Auflösung sehr schnell, Lösung wird simuliert (z.B. Rapamune®)



Komplette/schnelle Auflösung in einem engen Absorptionsfenster (z.B. Emend®)



Sättigungslöslichkeit von schwer löslichen Wirkstoffen in Wasser (aber löslich in Lipiden als NC) genau so hoch wie Wirkstoff in Nahrung (Fett)(z.B. Tricor®)  
 C.1=Fett-/Öltropfen in Wasser  
 C.2=NC Wirkstoff in Wasser



Anhaftung an der Wand des Verdauungstraktes, kaum Einfluss in Nahrungsmitteln (keine Unterschiede in der Bioverfügbarkeit (z.B. Tricor®)

## 2.3 Parenterale Fettemulsionen

### 2.3.1 Definition

Im Allgemeinen sind Emulsionen als Dispersionen von Flüssigkeiten oder Flüssigkristallen (als innere oder disperse Phase) in einer nicht mischbaren anderen Flüssigkeit (der äußeren Phase oder dem Dispersionsmedium) definiert. Abhängig von der Art der äußeren Phase unterscheidet man Öl-in-Wasser-Emulsionen (O/W-Emulsionen) und Wasser-in-Öl-Emulsionen (W/O-Emulsionen), bzw. auch multiple Emulsionen so z.B. O/W/O-Emulsionen, wenn die disperse Phase an sich schon ein Emulsionssystem darstellt. Das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen der dispersen Phase bezeichnet man als den sogenannten Dispersitätsgrad, welcher beschreibt, inwieweit die disperse Phase im Dispersionsmedium verteilt ist.

Bei parenteralen Fettemulsionen handelt es sich in der Regel um O/W-Emulsionen zur intravenösen Applikation (z.B. Lipofundin® oder Lipovenös®). Dies stellt besondere Anforderungen an die Emulsion. Enthaltene Stoffe müssen zum Einen toxikologisch unbedenklich und zum Anderen für den physiologischen Fettstoffwechsel verkräftbar sein, bzw. diesen nicht zu sehr beeinflussen. Außerdem gibt die Applikationsart zwingend eine gewisse maximale Teilchengröße vor, um nicht zu Embolien bzw. Thromben zu führen. [Davis, 1974]

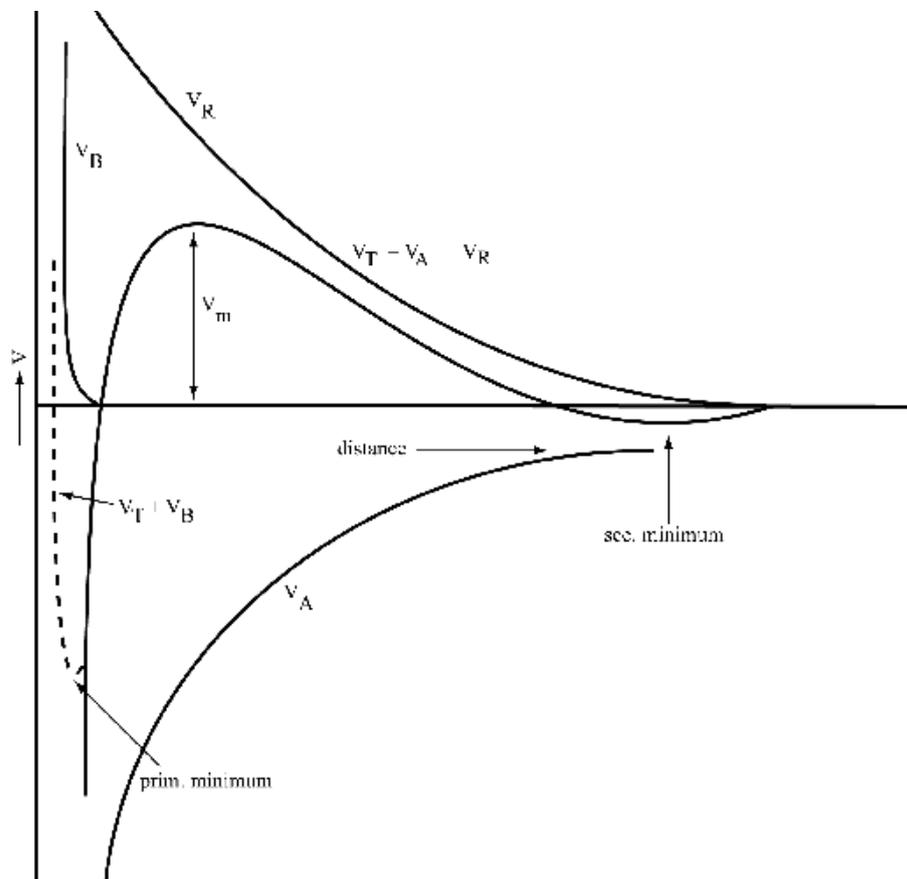
### 2.3.2 Physikalische Stabilität von Fettemulsionen

Die Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen einer Emulsion und der daraus resultierenden Grenzflächenenergie (abhängig vom Dispersitätsgrad) bewirkt, dass es sich bei Emulsionen um thermodynamisch instabile Systeme handelt. Die Grenzflächenenergie lässt sich zur Stabilisierung der Dispersion durch Zusatz von Emulgatoren (grenzflächenaktiven Substanzen) zum Teil deutlich herabsetzen. Ungeachtet dessen bleiben Emulsionen aus thermodynamischer Sicht instabil, da das System bemüht ist die Grenzfläche der dispersen Phase zu verkleinern. Verschiedene Prozesse wie Flocculation, Aufrahmen und Koaleszenz oder Sedimentation lassen sich dabei unterscheiden [Dobias, 1978] und werden durch die unterschiedliche physikalische Größe beeinflusst.

Unter Flocculation versteht man die Neigung der dispergierten Teilchen zu einer reversiblen Zusammenlagerung [Bauer, 1997] bedingt durch das Wechselwirken von elektrostatischen Abstoßungskräften, van-der-Waals-Anziehungskräften und Hydratationskräften (Bornsche Abstoßungskräfte) [Lagaly, 1984; Washington, 1990]. Die resultierende Ge-

samtwechselwirkungskraft wird entscheidend durch das Zetapotential der dispergierten Teilchen beeinflusst (siehe Kapitel 3.2.3.4). Mit Hilfe der sogenannten DLVO-Theorie (Theorie von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek, siehe auch Abbildung 8) können die elektrostatischen Abstoßungskräfte und die van-der-Waals-Anziehungskräfte beschrieben werden [Stricker, 1987].

Geht die Zusammenlagerung der dispergierten Teilchen soweit, das die Individualität der einzelnen Teilchen durch Zusammenfließen verloren geht, spricht man von Koaleszenz. Dieser kann zum Beispiel die Stabilität des Emulgatorfilms (oder auch Mikroviskosität genannt) entgegenwirken. Gemäß dem Stokesschen Gesetz kann es abhängig von der Größe der dispergierten Teilchen, der Viskosität des Dispersionsmediums und dem Dichtunterschied der beiden Phasen zum Aufrahmen oder zur Sedimentation kommen. Treten mehrere oder alle dieser Prozesse auf, kommt es letztendlich zum Brechen der instabilen Emulsion (Phasentrennung).



**Abb.8:**  $V_T$  als Summe der van der Waals Anziehungskräfte  $V_A$  und der elektrostatischen Abstoßung  $V_R$ , aufgetragen gegen den interpartikulären Abstand  $H$ . Wegen der Hydratationsabstoßung findet sich ein primäres Minimum dicht an der Partikeloberfläche (Punkt der irreversiblen Flocculation = Aggregation). Tritt ein sekundäres Minimum auf, können sich Partikel bis auf die entsprechende Distanz annähern und Agglomerate formen (reversible Flocculation;  $V_B$  - Hydratationsabstoßung/ Born Abstoßung;  $V_m$  - Energiebarriere), modifiziert nach [Lagaly, 1982]

### 2.3.3 Teilchengröße

Parenterale Fettemulsionen werden in der Regel mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt und sind durch eine enge Teilchengrößenverteilung zwischen 200 und 400 nm gekennzeichnet, wobei Teilchen von mehr als 2  $\mu\text{m}$  anzahl- und volumenmäßig nur sehr gering vorhanden sind. Es lassen sich trotz dieses hohen Dispersitätsgrades stabile parenterale Fettemulsionen herstellen.

Diese Teilchengrößenverteilung ist insgesamt typisch für Parenteralia zur intravenösen Applikation. Zur Vermeidung von Embolien bzw. Thromben müssen die Teilchen in einer Größe von unter 5 besser noch unter 4  $\mu\text{m}$  liegen, wobei dies nicht zwangsläufig für alle Arten von Parenteralia gilt, da es z.B. bei solchen zur subkutanen oder intramuskulären Anwendung als Kristallsuspensionen vorgesehenen Parenteralia vorteilhaft ist, durch eine erhöhte Teilchengröße einen Depoteffekt zu erreichen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Kenntnis der Teilchengrößenverteilung von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung der Verwendbarkeit einer parenteralen Fettemulsion zur intravenösen Applikation ist. Diese kann mittels mehrerer, routinemäßig anwendbarer Verfahren bestimmt werden, so zum Beispiel Laserdiffraktometrie (siehe Kap. 3.2.3.1), Photonenkorrelationsspektroskopie (siehe Kap. 3.2.3.2) oder Lichtmikroskopie (siehe Kap. 3.2.3.3). Zu beachten ist, dass jedes dieser Meßverfahren mit spezifischen Vor- und Nachteilen behaftet ist. Nur die sinnvolle Kombination dieser Verfahren führt zu einer ausreichenden Information hinsichtlich der intravenösen Applizierbarkeit [Burnham, 1983].

### 2.3.4 Metabolisierung im Organismus

Fette, die durch die Nahrung aufgenommen werden, werden überwiegend im Duodenum und im oberen Teil des Jejunums zu Fettsäuren und Glycerin gespalten um dann in die Enterozyten aufgenommen zu werden. In diesen werden die Spaltprodukte erneut zu Triglyceriden umgewandelt und dann als Chylomikronen über die Lymphbahnen durch den Ductus thoracicus ins Blut abgeben zu werden [Thews et al., 1989]. Durch auf der Oberfläche von Endothelzellen befindliche Lipoprotein-Lipasen werden die Triglyceride erneut gespalten und gelangen so in die Zellen des Fett- bzw. Muskelgewebes oder die Leber [Karlson, 2005].

Die auch als primäre Transportform von Triglyceriden aus der Nahrung bezeichneten Chylomikronen bestehen zu 86-95% aus Triglyceriden, 2-7% aus Phospholipiden, 3-7% aus Cholesterin bzw. Cholesterinestern und 1-2% aus Proteinen [Karlson, 2005] und haben eine Größe von 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  [Heinemann, 1991; Washington, 1990]. Für die Zwecke

der parenteralen Ernährung können diese auch sehr gut durch lecithinstabilisierte Soja-ölemulsionen nachgeahmt werden. Der strukturell ähnliche Aufbau von Chylomikronen und lecithinstabilisierten, künstlichen Öltröpfchen (z.B. Lipofundin®) konnte mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen nachgewiesen werden [Dunn, 1968]. So bietet zum Beispiel die Verwendung von Sojaöl ebenfalls den Vorteil einer ähnlich schnellen Hydrolyse des Öls durch die Lipoprotein-Lipase wie bei den Triglyceriden der Chylomikronen.

### 2.3.5 Zusammensetzung

Generell werden sowohl 10 als auch 20%ige Fettemulsionen zur Verwendung als parenterale Fettemulsionen hergestellt. Aus den bereits unter 2.3.4 beschriebenen Gründen wird vorwiegend Sojaöl eingesetzt. Als Besonderheit wurde in dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lipofundin® MCT die Hälfte des verwandten Sojaöls durch mittelkettige Triglyceride ersetzt (MCT), welche einen anderen Metabolismus aufweisen. Sie werden im Vergleich zu den langkettigen Triglyceriden (LCT) schneller und vollständiger oxidiert, unter anderem deshalb, weil der menschliche Organismus die Fettsäuren der mittelkettigen Triglyceride nicht speichern kann [Bach, 1985; Bach et al., 1989; Eckart et al., 1980; Schrickler, 1993]. Eine ausschließliche Verwendung von mittelkettigen Triglyceriden bewirkt Nebenwirkungen, die unter anderem auf das Fehlen essentieller Fettsäuren zurückgeführt werden können [Niemann und Nehne, 1983; Karlson, 2005; Guisard und Debry, 1972], welche für eine parenterale Ernährung unabdingbar sind.

Als Emulgator wird für die Herstellung vornehmlich Lecithin, welches biochemisch ein Phosphatidylcholin darstellt und das insgesamt wichtigste Phospholipid ist, verwendet. Technologisch betrachtet ist Lecithin ein Gemisch verschiedener Phospholipide, das man in seiner Zusammensetzung anpassen kann, um verschiedene Eigenschaften für die Emulsionsherstellung und die resultierende Stabilität der Emulsionen zu erhalten [Rydhag, 1979; Washington et al., 1989, Hailer und Wolfram, 1986]. Lecithin wird in der Regel in einem Verhältnis von 1,2 % beigemischt, was bei der Herstellung von 10%igen Emulsionen nicht zwingend erforderlich ist [Sommermeier, 1993]. Zusätzlich werden noch Aqua ad injectabilia und Glycerol zur Isotonisierung verwendet.

### 2.3.6 Verwendung

Parenterale Emulsionen können neben ihrer Funktion als Energielieferant als Bestandteil einer parenteralen Ernährung auch als Arzneistoffträger eingesetzt werden und übernehmen in dieser Funktion die Aufgabe eines Hilfsstoffes. Die Verwendung als Arzneistoffträger hat sich in den letzten Jahren zu einer immer wichtigeren Aufgabe für Fettemulsionen entwickelt, da sie in der Regel gut verfügbar, preisgünstig, gut verträglich und über eine ausreichende Zeit lagerstabil sind [Buttle, 2004]. Die besonderen Eigenschaften der Fettemulsionen lassen sich z.B. für eine Arzneistoffeinlagerung in die Lecithinschicht (wie bei dem in dieser Arbeit untersuchten SolEmuls®-Verfahren) nutzen.

Die Verwendung als Bestandteil einer totalen parenteralen Ernährung ist ein weiterer wichtiger Verwendungszweck, aber für die Betrachtungen in dieser Arbeit nur von untergeordneter Bedeutung und wird deshalb nicht gesondert ausgeführt.

### 2.3.7 Zielsetzung

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben von kommerziell erhältlichen parenteralen Fettemulsionen sollten über einen Lagerzeitraum, der weit über die normale Lagerzeit von Emulsionen hinausgeht, beobachtet werden. Dabei wurden sowohl chemische als auch physikalische Stabilität betrachtet (siehe hierzu auch Kap. 4.4). Die initialen Untersuchungen zu dieser Langzeitstudie über 216 Monate (18 Jahre) wurden in den Jahren 1-3, sowie 8 bereits von Heinemann (Ergebnisse publiziert [Heinemann, 1991]) und Schuhmann (Ergebnisse publiziert [Schuhmann, 1995]) begonnen und im Rahmen dieser Arbeit abgeschlossen. Dabei wurden nicht nur die generelle Verwendbarkeit als intravenös applizierbare Fettemulsion nach 18 Jahren untersucht, sondern auch die besonderen Einflüsse auf in die Emulsion inkorporierte Arzneistoffe.

## 3. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel soll ein genereller Überblick über die für diese Arbeit verwandten Modellarzneistoffe, Trägeremulsionen und die eingesetzten Charakterisierungsmethoden vermittelt werden.

### 3.1 Materialien

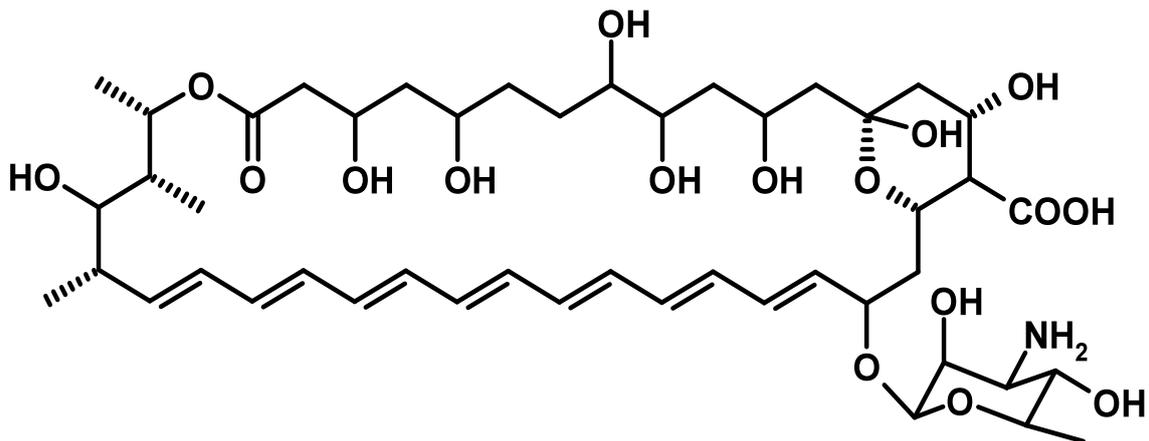
Bei den verwendeten Rohstoffen handelt es sich nur teilweise um chemisch definierte Einzelsubstanzen. Vor allem im Bereich der Lipide wurden komplexe Gemische eingesetzt, die sich herstellerabhängig unterscheiden können. Daher wurde in diesen Fällen aus Gründen einer eindeutigen Zuordnung die Handelsbezeichnung verwendet.

#### 3.1.1 Modellarzneistoffe

##### 3.1.1.1 Amphotericin B

Amphotericin B (AmB) (siehe Abbildung 9) gehört zur Gruppe der Polyen-Antibiotika. Es handelt sich dabei um ein gelb/orange farbenes Naturprodukt aus Kulturen des süd-amerikanischen Bakteriums *Streptomyces*. Zum ersten Mal wurde es 1948 aus Kulturen des Pilzes *Streptomyces nodosus* isoliert. [Gold et al., 1955/1956]. Bis heute wurden rund 200 Polyen-Antibiotika beschrieben; allen ist eine sehr geringe Wasserlöslichkeit gemein. Bei einem physiologischen pH-Wert (pH 6-7) liegt die Löslichkeit in Wasser unter 1 mg/L.

Diese sehr geringe Löslichkeit ist der Hauptgrund, weshalb AmB nahezu nicht gastrointestinal oder oral resorbiert wird [Bennett, 1995; Plumb, 1999]. Um nun eine Konzentration im Organismus zu erhalten, die hoch genug ist um systemische Pilzinfektionen zu bekämpfen, muss AmB konsequenterweise parenteral verabreicht werden [Plumb, 1999].

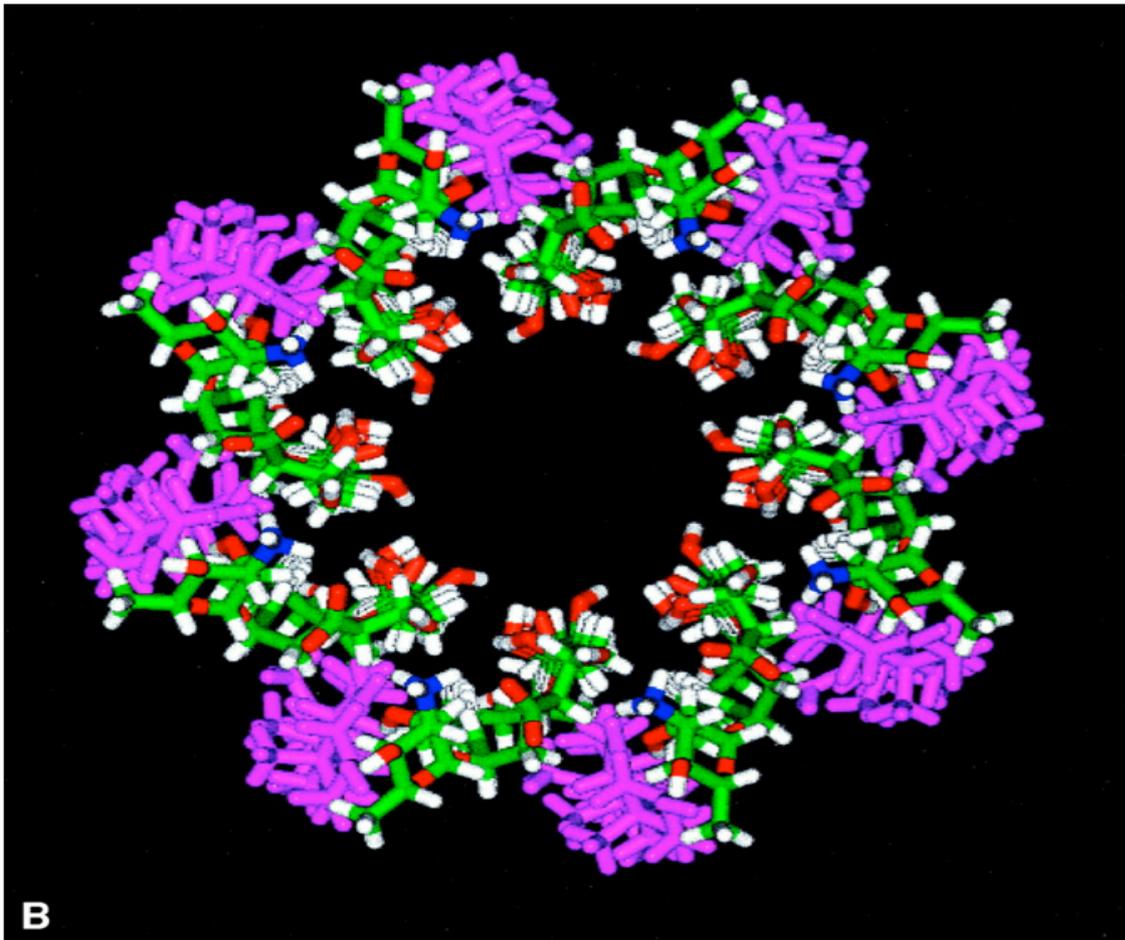


**Abb.9:** Amphotericin B Molekül

3-(4-Amino-3,5-dihydroxy- 6-methyl-oxan-2-yl)oxy-19,25,27,30,31,33,35,37-octahydroxy- 18,20,21-trimethyl-23-oxo- 22,39-dioxabicyclo[33.3.1]nonatriaconta- 4,6,8,10,12,14, 16-heptaen-38-carbonsäure

AmB zeigt nicht nur eine breite antimykotische Aktivität, es ist zusätzlich auch sehr aktiv gegen eine Vielzahl von einzelligen Parasiten. AmB ist nach wie vor das Mittel der ersten Wahl bei lebensbedrohlichen systemischen Pilzinfektionen, hervorgerufen zum Beispiel durch *Candida albicans* oder *Aspergillus fumigatus*.

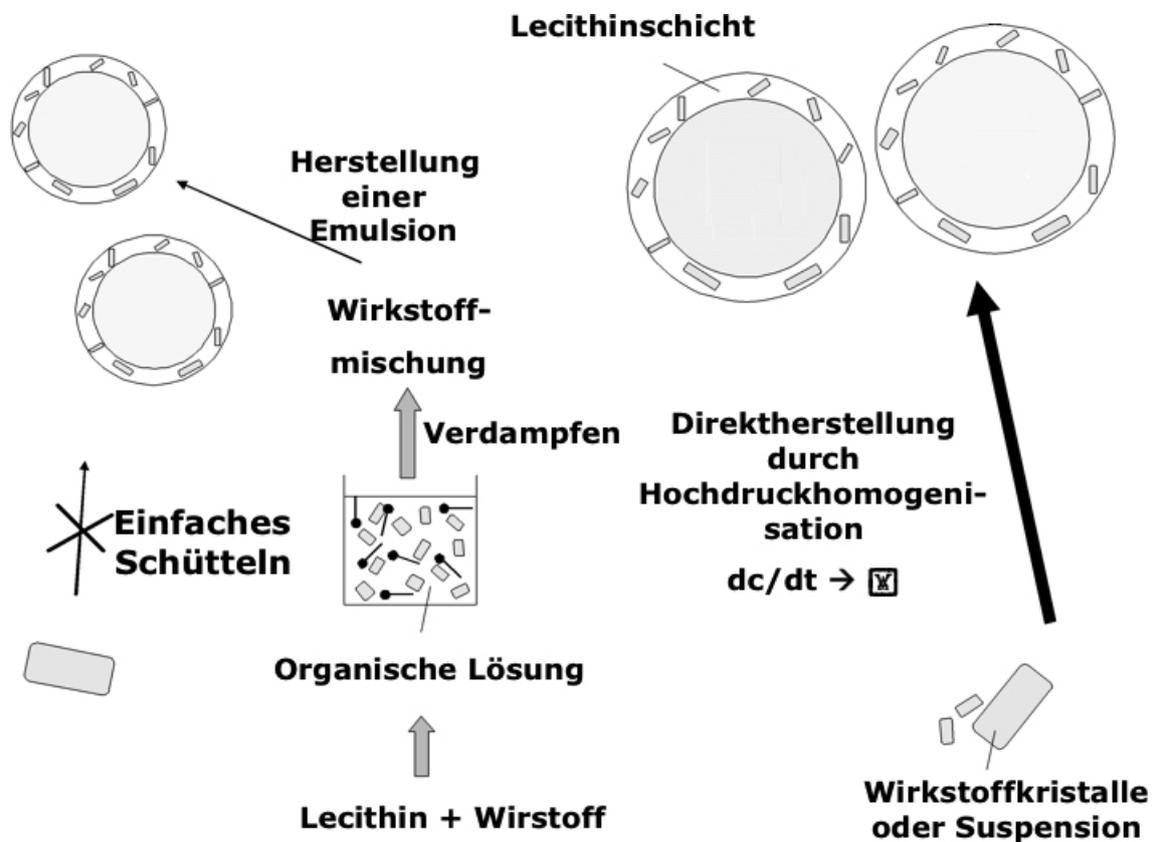
Der Wirkmechanismus von AmB beruht auf einer Störung der Fluidität von Zellmembranen. Es wird dabei angenommen, dass sieben bis acht AmB-Moleküle in der Zellmembran zusammen mit membraneigenen Ergosterol-Molekülen einen Kanal bilden, durch den die betroffene Zelle einen massiven Kaliumionenverlust erleidet (siehe Abbildung 10). Dieser Vorgang endet bei den meisten Zellen letal.



**Abb.10:** Modell eines AmB/Ergosterol-Kanals (AmB-Moleküle: grün=Kohlenstoff, blau=Stickstoff, rot=Sauerstoff, weiß=Wasserstoff; violett=Ergosterol-Molekül) (mit freundlicher Genehmigung: Bolard et al., 1991)

Trotz alledem bleibt der Einsatz von AmB durch die nicht unerheblichen, renalen Nebenwirkungen limitiert. Diese Nebenwirkungen können sich bis zum Nierenversagen steigern. Da die Intensität bzw. die Häufigkeit renaler Nebenwirkungen mit der Menge an freiem, ungebundenen AmB in Verbindung gebracht wurde, fehlte es nicht an wissenschaftlichen Anstrengungen, mittels neuer Darreichungsformen die Nebenwirkungsrate zu senken. AmB wurde beispielsweise in liposomale Formulierungen, Emulsionen oder zu nanopartikulären Systemen verarbeitet [Luke and Boyle, 1998; Bekersky et al., 1999]. All diese Bemühungen führten in den 1990igern zu innovativen Produkten wie zum Beispiel dem AmB/Lipid-Komplex Abelcet<sup>®</sup> (Nanosystems/élan), dem liposomalen Produkt Ambisome<sup>®</sup> (Astellas Pharma US. Inc., Deerfield, IL, USA), kolloidalen Suspensionen wie Amphocil<sup>®</sup>, Amphil<sup>®</sup>, und Amphotec<sup>®</sup> (alle: Three Rivers Pharmaceuticals, Cranberry Township, PA, USA), oder der Tensidlösung Fungizone<sup>®</sup> (BMS GmbH&Co. KG aA, München, Deutschland).

Abbildung 11 gibt einen kurzen Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten, einen Arzneistoff in eine Lecithinschicht zu inkorporieren.

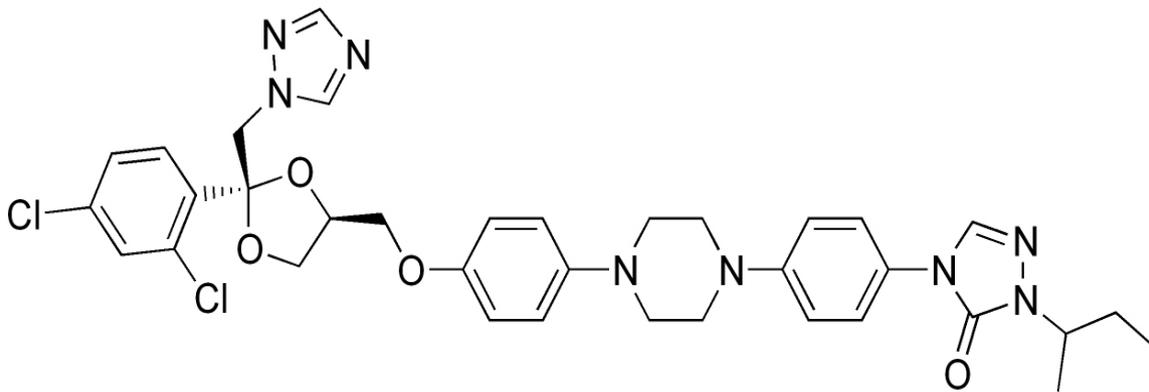


**Abb.11:** Vergleich unterschiedlicher Arzneistoffinkorporationen. Links: klassischer Ansatz mit Hilfe von Schütteln oder organischen Lösungsmitteln; Rechts: SolEmuls®-Prozess (mit freundlicher Genehmigung nach Buttle, 2004)

Amphotericin B wurde bezogen von der Firma Allpharma (Kopenhagen, Dänemark)

### 3.1.1.2 Itraconazol

Itraconazol (siehe Abbildung 12) ist ein synthetisches Breitspektrumantimykotikum. Es gehört zu der Familie der Triazole. Anders als Amphotericin B kann es auch über den Gastro-Intestinal-Trakt aufgenommen werden. Es wirkt, wie alle Azol-Antimykotika durch Hemmung der Biosynthese von Ergosterol, einem essentiellen Bestandteil der Zellmembran von Pilzen, fungistatisch. Der Angriff erfolgt an der Lanosterol-Demethylase (ERG11 bzw. CYP51). Die Einlagerung falscher Sterole stört die normale Membranfunktion erheblich, insbesondere wird die Funktion membranständiger Enzyme beeinträchtigt. Daraus resultiert eine letale Zerstörung der Zellwand von Pilzen [Mutschler et. al., 2001]. Itraconazol lässt sich intravenös verabreichen und besitzt eine durchschnittliche Halbwertszeit im Blut von 21 Stunden. Es ist trotz Risiko von Herzinsuffizienz und Leberschäden besser verträglich als andere Breitspektrumantimykotika, wie z.B. Amphotericin B.



**Abb. 12:**Itraconazol

(2R\*,4S\*)-1-sec-Butyl-4-{4-[4-(4- [[cis-2-(2,4-dichlorophenyl)- 2-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)- 1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl) piperazin-1-yl]phenyl}- 4,5-dihydro-1,2,4-triazol-5-on

### 3.1.1.3 Forschungssubstanz JM2005

Bei dieser Substanz handelt es sich um einen Stoff aus der Arzneistoffforschung. JM2005 ist eine gelbliche, pulverförmige, sehr schwer lösliche Substanz aus der Pharmaforschung. Da diese Substanz in ihren Eigenschaften, Stoffname, Synthese sowie ihrer Strukturformel patentgeschützt ist, wird sie hier nur kodiert benannt.

### 3.1.2 Matrix

Im Rahmen der Herstellung von Arzneistoffformulierungen mit Hilfe der SolEmuls<sup>®</sup>-Technologie wurde bevorzugt Lipofundin<sup>®</sup> als Matrix verwendet. Prinzipiell sind aber auch andere Lipidemulsionen als Trägermatrix verwendbar, zum Beispiel auch Intralipid<sup>®</sup>.

#### 3.1.2.1 Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10%

Lipofundin<sup>®</sup> 10% ist eine durch Lecithin stabilisierte O/W-Emulsion der Firma B. Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland). Sie findet häufig im Rahmen eines parenteralen Ernährungsregimes in Kliniken Verwendung. Außerdem ist sie auch bedingt als Träger für schwer wasserlösliche Arzneistoffe geeignet [Tibell and Norrlind, 1994; Pascual et al., 1995]. Die Zusammensetzung besteht aus einer 10%-igen Fettphase, zusammengesetzt aus mittel- und langkettigen Triglyceriden im Verhältnis 1:1, einem 0,8%-igen Anteil an Eilecithin, Glycerin und Wasser. Lipofundin<sup>®</sup> 10% ist als O/W-Emulsion mit Wasser verdünn- bzw. mischbar.

#### 3.1.2.2 Lipovenös<sup>®</sup> MCT 20%

Bei Lipovenös<sup>®</sup> MCT 20% handelt es sich wie bei Lipofundin um eine durch Lecithin stabilisierte O/W-Emulsion. Lipovenös<sup>®</sup> wird auf der Grundlage von fraktioniertem Sojabohnenöl unter Verwendung von Eilecithin und Natriumoleat als Emulgatoren hergestellt und besitzt eine 20%-ige Fettphase. Ebenso wie Lipofundin<sup>®</sup> wird Lipovenös<sup>®</sup> zur parenteralen Ernährung genutzt. Lipovenös<sup>®</sup> wurde von der Firma Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Deutschland) bezogen.

#### 3.1.2.3 Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10 und 20% für Langzeitstabilität

Für die Untersuchung der Langzeitstabilität von Lipofundin wurden jeweils 2 Flaschen einer Charge von Lipofundin 10 und 20% von Heinemann eingelagert und nach 3 Jahren untersucht [Müller und Heinemann, 1991]. Anschließend wurde die Untersuchung von Schuhmann nach 8 Jahren fortgesetzt [Schuhmann, 1995]. Die Emulsionen wurden für insgesamt 18 Jahre bei Raumtemperatur gelagert und im Rahmen dieser Arbeit vermessen.

Beide Chargen wurden von der Firma B. Braun (Melsungen, Deutschland) zur Verfügung gestellt und mit den internen Chargennummern 551281A, 604581A für Lipofundin 10%

und mit den Chargennummern 604582A und 606182A für Lipofundin 20% codiert. Die 10 %ige Emulsion enthielt 50,0 g Sojaöl, 50,0 g mittelkettige Triglyceride (MCT), 12,0 g 3-sn-Phosphatidylcholin (Ei-Lecithin, entsprechend 1,2% am Gesamtanteil der Emulsion), 25,0 g Glycerin (zur Isotonisierung) und Wasser für Injektionszwecke ad 1000 mL. Die 20 %ige Emulsion enthielt gleiche Anteile an Lecithin und Glycerol allerdings 100,0 g Sojaöl und 100,0 g mittelkettige Triglyceride (MCT) ad 1000 mL Wasser.

### 3.1.3 Tenside

#### 3.1.3.1 Tween 80

Bei Tween 80 handelt es sich chemisch um Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat, abgekürzt auch Polysorbat 80. Der HLB-Wert dieses nicht-ionischen, sterischen Emulgators und Lösungsvermittlers liegt bei 15 [Fiedler, 1996], er wurde von der Firma Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Tween 80 findet Anwendung bei zahlreichen kommerziellen Arzneimitteln.

#### 3.1.3.2 Poloxamer 188

Unter dem Namen Lutrol F68 wurde dieses Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymer von der Firma BASF (Ludwigshafen, Deutschland) bezogen. Auch hier sind sterische Effekte für die stabilisierende Wirkung verantwortlich, der HLB-Wert liegt bei 29 [Bauer et al., 1997].

#### 3.1.3.3 Natriumcholat

Natriumcholat ist ein Salz der Trihydroxygallensäure und wird als anionischer O/W-Emulgator eingesetzt. Physiologisch bilden Gallensalze vor allem mit peptidartig gebundenem Glycin oder Taurin einen wesentlichen Bestandteil des Gallensekrets. Die emulgierenden Eigenschaften liegen in der ausgeprägten räumlichen Trennung der koplanaren, lipophilen Ringe von den hydrophilen Partialstrukturen und der daraus resultierenden Amphiphilie begründet. Der HLB-Wert liegt laut Produktinformation bei ca. 18.

Gallensalze zeigen darüber hinaus die Tendenz, allein oder in Kombination mit anderen amphiphilen Molekülen flüssigkristalline Strukturen auszubilden [Marques et al., 2000]. Die Substanz wurde von der Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Natriumcholat diente als Emulgator in diversen Vorversuchen.

### 3.1.3.4 Natriumdodecylsulfat

Natriumdodecylsulfat (SDS, Natriumlaurylsulfat) wurde über die Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen und besitzt als anionisches Netzmittel und Tensid einen HLB-Wert (nach Davies) von ca. 40 [Bauer et al., 1997]. Der Gehalt an Natriumdodecylsulfat muss mindestens 85 % betragen, andere Natriumalkylsulfate sind aber ebenfalls enthalten.

SDS dient als Emulgator in Cremes und Salben, sowie als Netzmittel in festen Arzneiformen. Der Einsatz in parenteralen Präparaten ist aufgrund hepatotoxischer und hämolytischer Eigenschaften der Substanz von der FDA nicht zugelassen.

Eine SDS-Lösung diente im Rahmen der Versuche zu dieser Arbeit zur Reinigung/Spülung der LD- und PCS-Anlage nach den Messungen

### 3.1.3.5 Lecithin

Lecithin ist eine Bezeichnung für Fettbegleitstoffe, die in allen tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Organismen vorkommen [Nasner und Kraus 1982]. Lecithine gehören zur Gruppe der Phospholipide. Sie liegen in der Regel als polares Zwitterion vor und unterscheiden sich zum Teil stark in ihrer Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzung (vor allem im Sättigungsgrad der Fettsäuren). Das für diese Arbeit eingesetzte Eilecithin wurde von der Firma B. Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland) bezogen.

## 3.1.4 Sonstige Rohstoffe und Reagenzien

Alle sonstigen Rohstoffe und Reagenzien entsprachen den Herstellerspezifikationen oder offiziellen Monographien. Sie sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tab.4:** Sonstige Rohstoffe und Reagenzien

Substanz	Hersteller/Lieferant	Beschreibung und Verwendung
Acetonitril (HPLC-Qualität)	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)	Bestandteil des Verwendeten HPLC-Fließmittels
Tetrahydrofuran	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)	Bestandteil des Verwendeten HPLC-Fließmittels

Substanz	Hersteller/Lieferant	Beschreibung und Verwendung
Methanol (HPLC-Qualität)	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)	Bestandteil des Verwendeten HPLC-Fließmittels
Dimethylsulfoxid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)	Bestandteil der Probenaufbereitung während der HPLC
2-Propanol	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)	Bestandteil der Probenaufbereitung während der HPLC
Wasser	Millipore (Schwalbach, Deutschland)	Hergestellt durch Umkehrosmose und anschließende Aufreinigung in einer MilliQ-plus-Anlage, entspricht Arzneibuchmonographie „Aqua purificata“

## **3.2 Methoden**

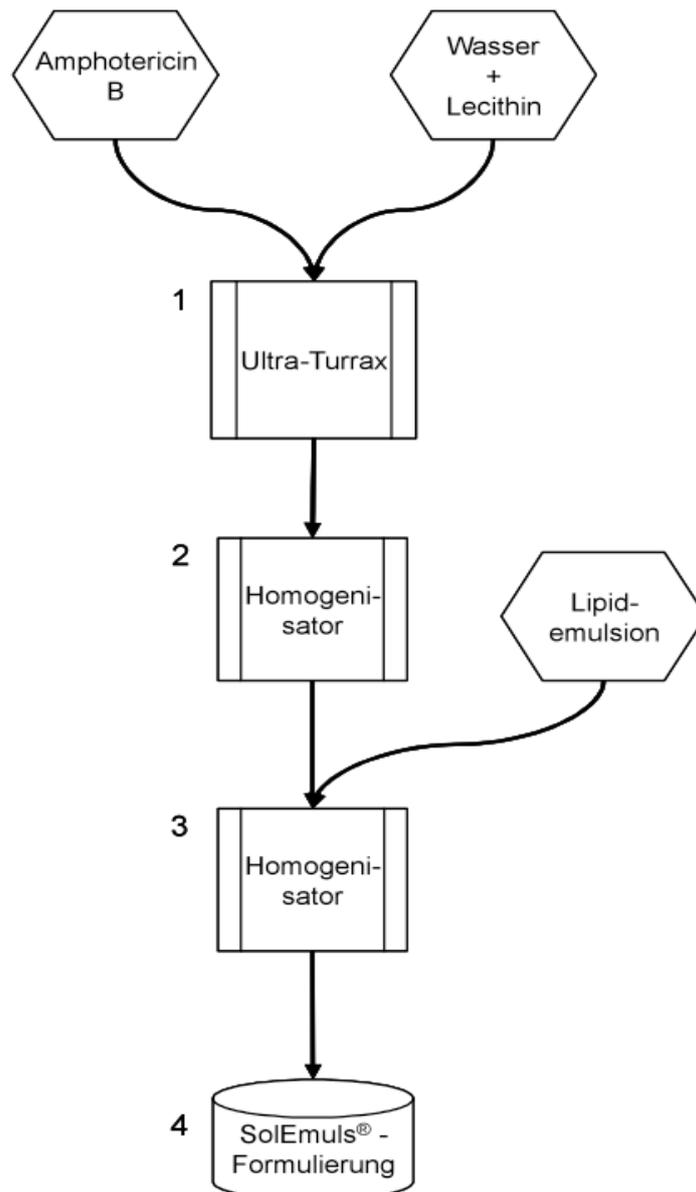
### **3.2.1 Hochdruckhomogenisation**

Zum theoretischen Hintergrund der Hochdruckhomogenisation sei auf das Kapitel 2.1 dieser Arbeit verwiesen.

Für die Herstellung der nanopartikulären Wirkstoffsysteme wurden im Rahmen dieser Arbeit Hochdruckhomogenisatoren der Firma APV Gaulin (Unna, Deutschland) und Avestin Europe GmbH (Mannheim, Deutschland) verwendet. Dabei handelte es sich genauer um den APV Micron LAB40 und den Avestin B3.

### **3.2.2 Herstellung der SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierungen**

Der allgemeine Herstellungsprozess wird in folgender Abbildung (siehe Abbildung 13) aufgezeigt.



**Abb.13:** Allgemeiner Herstellungsprozess SolEmuls®-Formulierungen

Zunächst wird der pulverförmige Arzneistoff (z.B. Amphotericin B), Lecithin und Wasser mit Hilfe eines Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) in eine Prä suspension überführt (1). Anschließend erfolgt eine schrittweise Homogenisation mittels eines Hochdruckhomogenisators, Micron LAB 40 (APV Systems GmbH, Unna, Deutschland), bei einem Druck von 1500 bar über einen Zeitraum von 20 Homogenisationszyklen bei Raumtemperatur (2). Dabei wird eine Nanosuspension mit einem Arzneistoffanteil von 2,5% erzeugt. Danach wird die Nanosuspension mit Hilfe eines Ultra-Turrax mit der lecithinhaltigen Emulsion (Lipofundin®) vermischt und es erfolgt anschließend eine schrittweise Homogenisation vermittels eines Hochdruckhomogenisators. Alternativ wird die Prä suspension sofort mittels Homogenisator in eine lecithinhaltige Emulsion eingearbeitet (3). Die Prozessparameter dieser zweiten Hochdruckhomogenisation liegt bei einem

Druck von 600 bar, 5 bis 20 Zyklen und einer Temperatur von 45°C [Akkar and Müller, 2004]. Als finales Produkt wird eine Arzneistoffemulsion mit einem Gehalt von 1 mg Arzneistoff pro 1 mL Emulsion erhalten (4). Dieses geschützte Verfahren der Formulierung schwer wasserlöslicher Arzneistoffe wird SolEmuls®-Technologie genannt.

### 3.2.3 Bestimmung von Partikelgrößen und Oberflächenladung

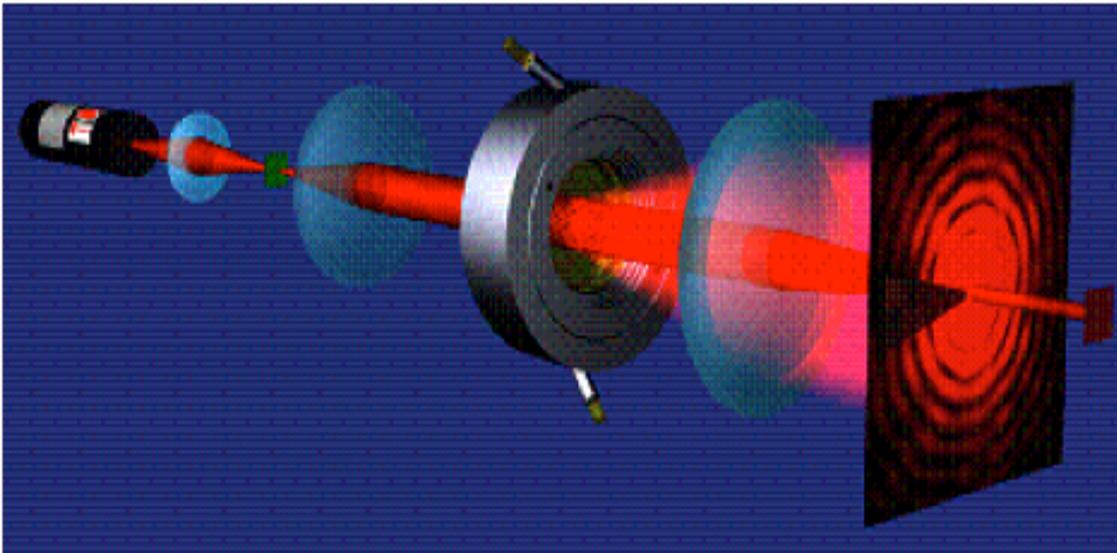
Prinzipiell lassen sich zur Größencharakterisierung von Partikeln oder Emulsionstropfen im Nanometer- und unteren Mikrometerbereich verschiedene Verfahren wie z.B. die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), die Laserdiffraktometrie (LD), die Elektronenmikroskopie oder der Coulter Counter heranziehen [Müller and Schuhmann, 1996; Müller and Mehnert, 1997]. (Jedes dieser Verfahren ist dabei mit Vor- und Nachteilen behaftet, die für die jeweilige Methode im Folgenden näher betrachtet werden.) Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kombination von PCS und LD zur Partikelgrößenanalytik gewählt. Beiden Verfahren ist die Annahme kugelförmiger Partikel gemein.

Die Präsenz von Partikeln oder Aggregaten im Mikrometerbereich wurde darüber hinaus durch lichtmikroskopische Studien überprüft und abgesichert.

Die Kenntnis der Partikelladung ermöglicht oft Vorraussagen über die Stabilität des Systems gegenüber Lagerung und äußeren Einflüssen [Müller 1996]. Daher wurde das Zeta-potential der hergestellten Formulierungen durch Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt. Da die Formulierungen zum Teil durch sterische Stabilisatoren stabilisiert wurden, wird die Bedeutung der ermittelten Werte eingeschränkt. Eine geringe Partikelladung muss so nicht notgedrungen zu instabilen Systemen führen.

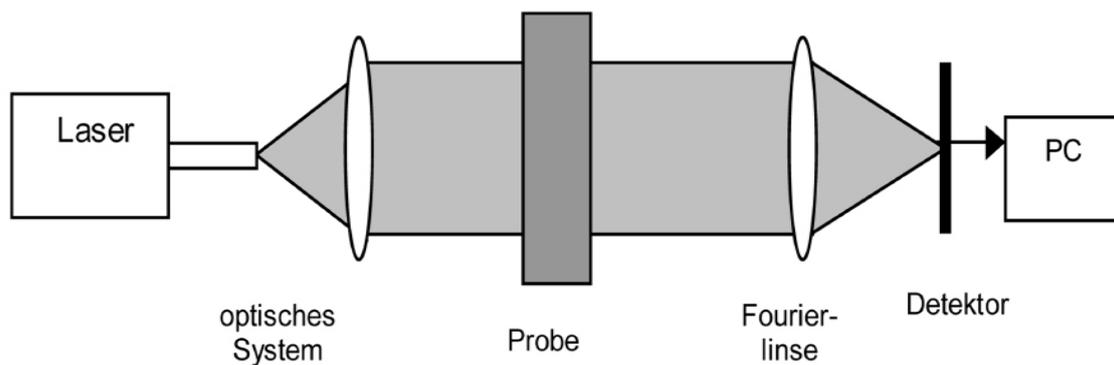
#### 3.2.3.1 Laserdiffraktometrie (LD)

Die Laserdiffraktometrie (LD) ist ein Verfahren zur Bestimmung von Partikelgrößen. Sie beruht auf dem Prinzip der unterschiedlichen Beugung von Laserlicht an unterschiedlich stark gekrümmten Partikeloberflächen. Die dabei entstehenden Beugungsbilder sind charakteristisch für den Partikeldurchmesser – je kleiner das Partikulum desto größer der Beugungswinkel – und können mittels mathematischer Analyse zur Ermittlung der vorliegenden Partikelgrößenverteilung herangezogen werden [Müller and Schuhmann, 1996; Bott and Hart, 1991].



**Abb.14:** Messprinzip eines Laserdiffraktometers; mit freundlicher Genehmigung von Malvern Instruments Ltd.(Worcestershire, Großbritannien)

In Praxis handelt es sich dabei um ein so genanntes Vorwärtsmessverfahren. Der zur Messung genutzte Laserstrahl wird durch ein optisches System aufgeweitet. Durch eine der Probe nachgeschaltete Fourier-Linse wird dafür gesorgt, dass die Beugungsbilder unabhängig von der Lage der Partikel im Messvolumen an einer Stelle des aus Ringsegmenten aufgebauten Multielementdetektors fokussiert werden (siehe Abbildungen 14 und 15).



**Abb.15:** Schematischer Aufbau eines Laserdiffraktometers

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Laserdiffraktometrie ein LS230 der Firma Coulter Electronics GmbH (Krefeld, Deutschland) verwendet, dessen Meßbereich aufgrund der Verwendung zweier Fourier-Linsen und dreier Detektoren (low-, mid- und high-angle-Detector) sowie der kombiniert eingesetzten PIDS-Technologie zwischen 40 nm und 2000 µm liegt. Die Abkürzung PIDS steht hierbei für Polarization Intensity Differential Scattering und ermöglicht die exakte Bestimmung von Partikelgrößen im Submikronbereich anhand der unterschiedlichen Streuung polarisierten Lichtes durch diese Teilchen. Durch ein Filterrad wird für die Messung jeweils nur das Licht einer Polarisationssebene (senkrecht oder parallel zur Streuebene) und einer Wellenlänge (450 nm, 600 nm oder 900 nm) aus der Laserlichtquelle herausgefiltert. Das bei der Messung entstehende Streumuster wird von sechs so genannten PIDS-Detektoren im Winkel von 60°, 75°, 90°, 105°, 120° und 146°erfaßt.

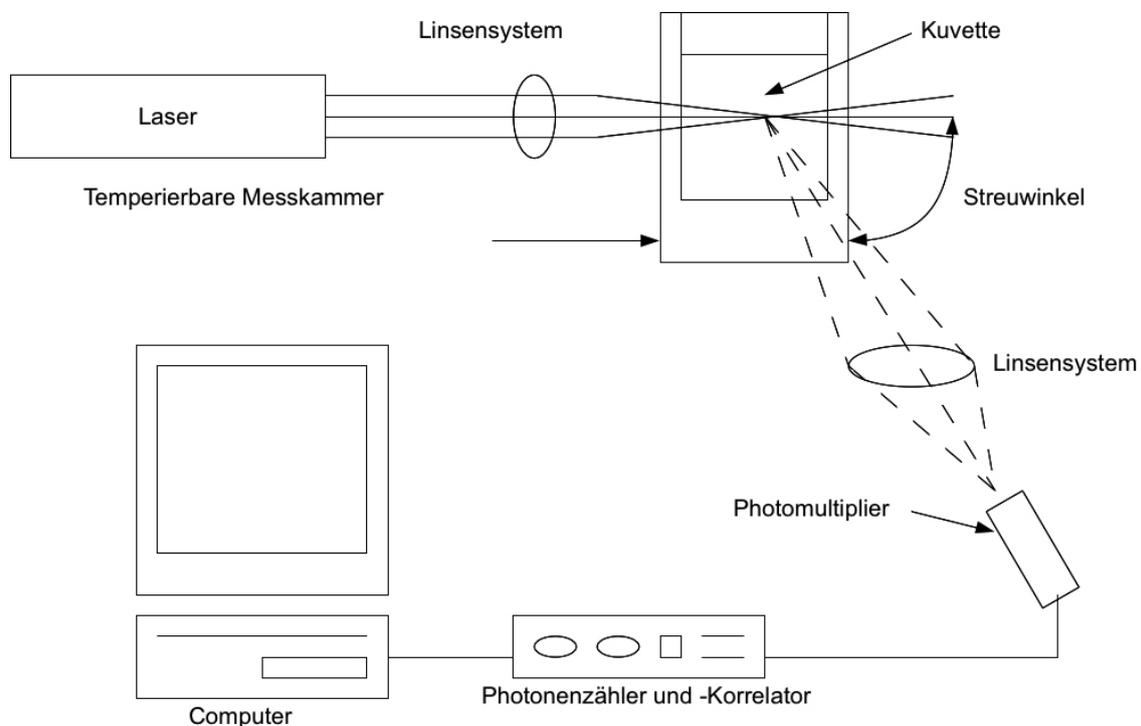
Die Auswertung der Beugungsbilder kann unter anderem nach der Fraunhofer- oder der Mie-Theorie erfolgen. Die Fraunhofer-Näherung eignet sich dabei eher für Partikel, deren Größe deutlich über der Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle liegt (hier Halbleiterlaser mit ca. 750 nm). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mie-Theorie zur Berechnung herangezogen; diese besitzt Gültigkeit im Submicronbereich. Ihre Anwendung setzt jedoch unter anderem die Kenntnis des realen Brechungsindex der Partikel sowie des durch diese absorbierten Anteils des Laserlichtes (imaginärer Teil) voraus. Da diese Werte aber selten bekannt sind, wurden als Vereinfachung die berechneten Werte einer milchigen Lipidemulsion herangezogen. Als Brechungsindex der Partikel wurde 1,45635 und als Lichtabsorption 0,01 festgelegt.

Als charakteristische Parameter wurden in erster Linie die Durchmesser LD 50, LD 90, LD 95 und LD 99 festgelegt. Dabei ist es möglich, die Messergebnisse als Anzahl oder als Volumenverteilung auswerten zu lassen. Für die vorliegende Arbeit wurden die Werte der Volumenverteilung benutzt, wohlwissentlich, dass bei dieser Verteilung größere Partikel stärker gewichtet werden. Der Wert LD 50 besagt dabei, dass 50 % der detektierten Teilchen einen kleineren Durchmesser aufweisen als der genannte.

### 3.2.3.2 Photonenkorrelationsspektroskopie

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), auch DLS (dynamic light scattering) bezeichnet, handelt es sich um ein dynamisches Laserstreulichtverfahren. Die Theorie und das Messprinzip wurden bereits ausgiebig in der Literatur beschrieben [Müller and Schuhmann 1996; Müller 1983]. Grundlage des Meßverfahrens ist die unterschiedliche Streuung von Licht an Partikeloberflächen. Als Ergebnis erhält man den mittleren Partikeldurchmesser sowie die in Form des Polydispersitätsindex (PI) angegebene Breite der Verteilung.

Der prinzipielle Aufbau der PCS-Geräte ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abb.16:** Prinzipieller Aufbau einer PCS-Anlage

Der Messbereich der Geräte liegt in der Regel zwischen 3 nm und 3-5  $\mu\text{m}$ . Bei der Messung werden die durch Diffusion der Teilchen hervorgerufenen Schwankungen der Streulichtintensität erfasst, wobei die Detektion in der Regel in einem Winkel von  $90^\circ$  erfolgt. Kleinere Teilchen besitzen aufgrund ihrer geringeren Masse eine geringere Trägheit und werden deshalb durch die Brownsche Molekularbewegung der sie umgebenden Flüssigkeitsmoleküle zu einer schnelleren Bewegung angeregt als große Partikel. Oberhalb 5  $\mu\text{m}$  tritt zusätzlich eine das Messergebnis verfälschende Sedimentation der Partikel auf, wodurch sich die obere Begrenzung des Messbereiches erklärt.

Die Intensitätsschwankungen werden durch einen Photomultiplier erfasst. Mit Hilfe eines Korrelators wird eine Autokorrelationsfunktion berechnet und diese an eine theoretische Korrelationsfunktion  $g(\tau)$  angepasst. Der Polydispersitätsindex (PI) beschreibt dabei die mathematische Abweichung zwischen der gemessenen und der theoretischen Korrelationsfunktion. Bei einer monomodalen Partikelpopulation wären diese identisch, der PI nähme den Wert 0 an. In der Praxis spricht man bei Werten unter 0,06 von Monodispersität, bei einem PI zwischen 0,1 und 0,25 kann die Verteilung noch als eng bezeichnet werden.

Die vom Gerät gemessenen zeitlichen Schwankungen der Streulichtintensität werden mit Hilfe eines Korrelators zu einer Autokorrelationsfunktion umgerechnet, die anschließend der theoretischen Korrelationsfunktion  $g(\tau)$  angepasst wird.

$$g(\tau) = e^{-2 * D * K^3 * \tau}$$

**Formel 9:** theoretische Korrelationsfunktion

D	Diffusionskonstante
K	Betrag des Streulichtfaktors
$\tau$	Verzögerungszeit

Der Betrag des Streulichtvektors K und die Verzögerungszeit  $\tau$  sind abhängig von den Messbedingungen. Dabei hängt  $\tau$  von der Anzahl der Kanäle und Taktzeit ab, diese Parameter sind einstellbar und stehen im folgenden Zusammenhang:

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

**Formel 10:** Abhängigkeit der Verzögerung der Kanäle und Taktzeit

n	Anzahl der Kanäle
$\Delta t$	Taktzeit

Anschließend kann der Streulichtvektor  $K$  folgendermaßen berechnet werden:

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

**Formel 11:** Berechnung des Streulichtvektors ( $K$ )

$n$	Brechungsindex des Dispersionsmediums
$\lambda$	Wellenlänge des Laserlichtes
$\Theta$	Streuwinkel

Über die theoretische Korrelationsfunktion wird die Diffusionskonstante  $D$  ermittelt, welche wiederum in die Einstein-Gleichung eingesetzt werden kann. Der Radius der Hauptpopulation kann anschließend über diese wie folgt errechnet werden:

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

**Formel 12:** Einstein-Gleichung

$r$	mittlerer Teilchenradius
$k$	Boltzmann-Konstante
$\eta$	dynamische Viskosität des Meßmediums
$T$	absolute Temperatur

Wie auch aus der Gleichung ersichtlich ist, gelten die erläuterten Zusammenhänge im Prinzip nur für kugelförmige Partikel. Sowohl die Temperatur als auch insbesondere die Viskosität des Meßmediums sind ebenfalls von entscheidender Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit kam ein Zetasizer 4 (Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien) zum Einsatz. Das Gerät verwendet einen Laser der Wellenlänge 632,4 nm und misst standardmäßig in einem Winkel von 90°. Die Proben wurden mit Reinstwasser auf die empfohlene Streulichtintensität verdünnt, um Mehrfachstreuungen zu vermeiden. Die Messzeit betrug 200 s (10 Einzelmessungen zu 20 s), die Meßzeit  $\Delta t$  wurde vom Gerät automatisch festgelegt.

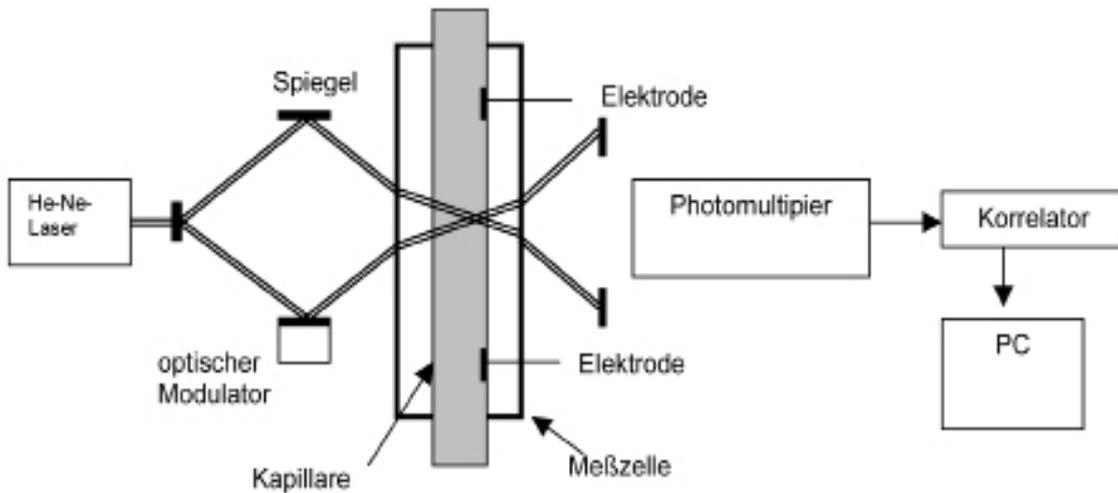
### **3.2.3.3 Lichtmikroskopie**

Wie zuvor beschrieben, lassen sich mit Hilfe der Laserdiffraktometrie und der Photonenkorrelationsspektroskopie zwar sehr präzise Partikelgrößenbestimmungen im unteren Mikrometer- bzw. Nanometerbereich durchführen, die beiden Methoden führen jedoch zu gewissen Ungenauigkeiten im oberen Mikrometerbereich. Mittels PCS ist die genaue Bestimmung von Teilchengrößen im oberen Mikrometerbereich nahezu ausgeschlossen. Mögliche Partikel aus diesem Bereich können unbeachtet bleiben und bei Lagerung oder Anwendung zu Problemen führen. Um die Präsenz solcher Partikel oder auch Agglomerate auszuschließen, empfiehlt sich eine Kontrolle des dispersen Systems mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Leitz Orthoplan Mikroskop (Wetzlar, Deutschland) mit bis zu 1000-facher Vergrößerung und gekreuzten Polarisatoren verwendet.

### **3.2.3.4 Zetapotential (Laser-Doppler-Anemometrie)**

Auf Emulsionen basierende Arzneiformen zeigen häufig Probleme in ihrer Langzeitstabilität, da die dispergierte Phase oft zum Zusammenfließen neigt. Ein grobes Maß zur Vorhersage von Stabilitätsproblemen bietet die Bestimmung des Zetapotentials der dispergierten Teilchen. Als Zetapotential wird das Potential zwischen der Scherebene und einem Punkt in unendlicher Entfernung vom Teilchen im Dispersionsmedium bezeichnet. In Medien mit geringer Leitfähigkeit kann es näherungsweise mit der Oberflächenladung gleichgesetzt werden. Je größer der Betrag des Zetapotentials, desto größer ist die elektrostatische Abstoßung zwischen den dispergierten Teilchen. Das vorliegende System ist also stabiler. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass es sich dabei um ein negatives oder auch ein positives Potential handeln kann. Aus Erfahrungswerten im Umgang mit Fettemulsionen ist bekannt, dass Systeme mit einem Zetapotential von betragsmäßig  $>30$  mV als stabil bezeichnet werden können [Müller, 1996]. Systeme mit einem geringeren Zetapotential müssen jedoch nicht zwangsläufig instabil sein. Durch zusätzliche sterische Stabilisierung kann auch bei geringeren Werten eine Aggregation bzw. Koaleszenz verhindert werden.

Um das Zetapotential zu bestimmen, wird häufig die so genannte Laser-Doppler-Anemometrie verwendet. Die Laser-Doppler-Anemometrie erfasst die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel im elektrischen Feld indirekt über die Frequenzverschiebung von an den Partikeln gestreutem Laserlicht (Doppler-Effekt).



**Abb.17:** Schematischer Aufbau einer LDA-Messanordnung

Hierzu wird ein kohärenter Laserstrahl aufgespalten, umgelenkt und über ein Spiegel-system in einer Küvette zum Schnitt gebracht. Einer der Teilstrahlen wird dabei um eine Frequenz von 250 Hz verschoben, sodass im Schnittpunkt ein durchlaufendes Interferenzstreifenmuster entsteht. Auf diese Weise kann zusätzlicher Aufschluss über die Bewegungsrichtung der Partikel und damit das Vorzeichen des Potentials gewonnen werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der angelegten Feldstärke. Setzt man beide Werte ins Verhältnis, resultiert die elektrophoretische Mobilität, die wiederum nach Helmholtz-Smoluchowski [Müller, 1996] ins Zetapotential konvertiert werden kann.

Diese Umrechnung erfolgt ausgehend von der Streuung des Lichtes an den Partikeln, die sich durch das elektrische Feld bewegen. Dabei bedingt der Dopplereffekt, dass die Frequenz des gestreuten Laserlichtes ungleich der Frequenz des ursprünglichen Laserstrahls ist. Aus dieser gemessenen Frequenzverschiebung lässt sich die Partikelgeschwindigkeit wie folgt berechnen:

$$f_d = \frac{2 * \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda}$$

**Formel 13:** Berechnung der Frequenzverschiebung aus der Partikelgeschwindigkeit

$f_d$	Dopplerfrequenz
$\Theta$	Detektionswinkel des Streulichts
$\lambda$	Wellenlänge des Laserlichts
$v$	Partikelgeschwindigkeit

In diesem Fall wird anstelle der Partikelgeschwindigkeit die elektrophoretische Mobilität  $EM$  zur Umrechnung ins Zetapotential eingesetzt.

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

**Formel 14:** Berechnung der elektrophoretischen Mobilität

$v$	Geschwindigkeit des Partikulums (cm/s)
$E$	Feldstärke (esu Volt/cm)

Mittels der oben erwähnten Helmholtz-Smolouchowski-Gleichung lässt sich das Zetapotential errechnen:

$$ZP = \frac{EM * 4 * \pi * \eta}{\epsilon}$$

**Formel 15:** Helmholtz-Smolouchowski-Gleichung

$ZP$	Zetapotential des Partikels in elektrostatischen Volt (esu)
$EM$	Elektrophoretische Mobilität
$\eta$	Viskosität des Dispersionsmediums
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmedium
$4\pi$	Konstante

Für eine detaillierte Beschreibung des Zetapotentials wird auf Müller [Müller, 1996] verwiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen an einem Zetasizer 4 der Firma Malvern Instruments (Worcestershire, Großbritannien) durchgeführt. Da das Zetapotential erheblich von dem eingesetzten Meßmedium beeinflusst wird, wurden alle Messungen in bidestilliertem Wasser durchgeführt, das mit NaCl-Lösung auf eine Leitfähigkeit von 50  $\mu\text{S/cm}$  eingestellt wurde. Die Feldstärke betrug durchgängig 20 V/cm. Der pH-Wert der Meßlösung wurde mit einem pH-Meter CG840 mit Glaselektrode (Mettler-Toledo, Steinbach, Deutschland) bestimmt.

### 3.2.4 HPLC-Analytik

#### 3.2.4.1 Amphotericin B

Die Bestimmung des Gehaltes der Amphotericin-B-haltigen SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierungen erfolgte mit Hilfe der HPLC-Analytik.

Die Analytik erfolgte an einem Kontron 560 HPLC System (Kontron Inst., Neufahrn, Deutschland) bestehend aus einer Kontron 525 Pumpe, einem Kontron UV Detektor 430, einem Auto-sampler T360 und einem Kontron column heater. Die Daten wurden mit Hilfe der Kroma 2000 Software (Kontron Inst., Neufahrn, Deutschland) ausgewertet.

Die Probenaufbereitung erfolgte nach folgendem Verfahren: Um eine Formulierung wie unter 4.1.1 beschrieben (AmB-Gehalt 1 mg/mL) zu vermessen, wurden 2,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem 5 mL-Maßkolben mit ca. 2 mL 2-Propanol versetzt. Dazu wurden 100 µL Formulierung gegeben, gelöst und mit 2-Propanol auf 5 mL aufgefüllt. Es schloß sich eine 5-minütige Behandlung in einem Ultraschallbad an. Als Standard diente eine Lösung von 50 mg AmB gelöst in 10 mL DMSO und aufgefüllt auf 50 mL mit Methanol. Es wurde somit eine 1 mg/mL-Stammlösung hergestellt. Diese Stammlösung diente als Kontrolle der gemessenen Werte der Formulierung. Vor der Messreihe der zu untersuchenden Formulierungen wurde mit Hilfe von exakten Verdünnungen der Stammlösung das System auf seine Linearität hin überprüft. Der Regressionskoeffizient (R) der dabei erhaltenen Kalibriergerade betrug  $R=0,998$ . Auf eine Darstellung der Kalibriergerade wird an dieser Stelle verzichtet.

Die Gehaltsanalytik erfolgte analog der HPLC-Methode von Buttle et al. [Buttle et al. 2002]. Dabei kam als Trennungssäule eine Nucleosil 120 C18, 3 µm, 125 x 4.6 mm Hauptsäule mit einer Nucleosil 120 C18, 3 µm, 10 x 4,6 Vorsäule und einem Injektionsvolumen von 20 µL zum Einsatz. Die mobile Phase bestand aus Methanol, Acetonitril und 0,00125 mol/L EDTA in Teilen von 500 zu 350 zu 300 (Eluent A) und Tetrahydrofuran 100% (Eluent B). Der Gradient betrug von 0-3 min 100% Eluent A, 3-3,1 min Wechsel auf Eluent B, 3,1-7 min 100% Eluent B, 7-7,1 min Wechsel auf Eluent A und abschließend, zur Regeneration der Säule, 7,1-12,5 min 100% Eluent A.

Die Flußrate wurde auf 1,2 mL pro Minute eingestellt. Die chromatografische Auftrennung erfolgte bei einer Säulentemperatur von 40°C über 14,5 Minuten. Dabei hatte Amphotericin B eine Retentionszeit von 2.8 bis zu 3.1 Minuten. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 407 nm.

### 3.2.4.2 Itraconazol

Die Bestimmung des Itraconazol-Gehaltes der durch SolEmuls®-Verfahren hergestellten Formulierungen erfolgt analog der AmB-Bestimmung mittels eines Kontron HPLC-Systems.

Die Proben wurden folgendermaßen aufbereitet: Die analog der Herstellungsmethode unter 4.2 hergestellte Emulsionsformulierung (100 µL) (Itraconazol-Gehalt 1;2,5;5;10 mg/mL) wurde in einem 5 mL-Maßkolben mit 2,5 mL DMSO und 2-Propanol versetzt und auf 5 mL aufgefüllt. Die Mischung wurde anschließend für 10 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Als Standard dient eine Lösung von 50 mg Itraconazol in 10 ml DMSO, die auf 50 mL mit Methanol aufgefüllt wurde. Diese Stammlösung mit einem Gehalt von 1 mg/mL diente anschließend zur Kontrolle der gemessenen Werte. Vor Beginn der Probenvermessung wurde eine Kalibriergrade aus der Stammlösung hergestellt. Der Regressionskoeffizient R beträgt  $R = 0,997$ ; auf die Darstellung der Kalibriergrade wird hier verzichtet.

Die Gehaltsanalytik erfolgte analog der HPLC-Methode nach Vanden Bossche et. al. (Vanden Bossche et. al., 1993). Als Trennsäule kam eine Zorbax-C<sub>18</sub>-Säule, 5 mycom, 250 x 4,6mm mit einer Nucleosil 120 C18. 3 mym, 10 x 4,6 mm Vorsäule zum Einsatz. Das Injektionsvolumen beträgt 20 µL.

Die mobile Phase bestand aus Acetonitril mit gefilterter 0,04 M Ammoniumdihydrogensulfat Pufferlösung die mit Ammoniak auf pH 6,0 eingestellt wurde im Verhältnis 50:50 (V/V). Die Flussrate wird auf 0,8 mL/min eingestellt, die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 255 nm. Die chromatografische Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur. Itraconazol zeigt dabei eine Retentionszeit von 3,8 bis 4,1 Minuten.

### 3.2.5 Sonstige Methoden

#### 3.2.5.1 Sterilisation mit gespanntem Dampf

Um mit gespanntem Wasserdampf eine Sterilisation durchführen zu können, wurde der Dampfsterilisator INS-S-A S 2000 (Durchreichesterilisator DRS 1) der Firma Medizin Technik GmbH (Planegg, Deutschland) verwendet. Als Steuereinheit diente ein Multi-

Mess-Grenzwert-Computer. Sofern nicht anders angegeben, fand hierbei ein Standardprogramm Anwendung: die Temperatur betrug 121°C, der Druck 2 bar; als Dauer für die Vorgänge wurde ein Zeitraum von 15 Minuten gewählt.

### **3.2.5.2 Bestimmung der Leitfähigkeit**

Für eine Einstellung der Elektrolytlösung zur Bestimmung des Zetapotentials war es erforderlich, die Leitfähigkeit (S/cm) zu bestimmen. Elektrolytlösungen leiten elektrischen Strom; dies liegt in der Anwesenheit der jeweiligen Ionen begründet. Der Grad der elektrischen Leitfähigkeit richtet sich nach der Art und Anzahl der anwesenden Ionen. Um die Leitfähigkeit einer Elektrolytlösung zu bestimmen wurde, soweit nicht anders vermerkt, bei Zimmertemperatur die Leitfähigkeitselektrode in die zu vermessene Lösung gehalten. Die jeweiligen Messungen der elektrischen Leitfähigkeit der Proben wurde mit dem Microprocessor Conductivity Meter LF537 der Firma WFT (Weilheim, Deutschland) vorgenommen.

### **3.2.5.3 Bestimmung von pH-Werten**

Unter dem Begriff pH-Wert wird allgemein der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität gefasst. Eine Bestimmung desselben kann entweder unter Zuhilfenahme von pH-Elektroden oder aber von Lackmuspapier durchgeführt werden. Für wässrige Proben erfolgte hier die Bestimmung des pH-Wertes unter Verwendung einer Einstabmesskette, des pH-Meters CG840 der Firma Schott (Hofheim, Deutschland). Bevor eine Messung durchgeführt wurde, wurde die pH-Elektrode mit Hilfe von Pufferlösungen kalibriert.

### **3.2.5.4 Bestimmung der Säurezahl (SZ)**

Zur genaueren Charakterisierung der chemischen Stabilität der verwandten Emulsionen wurde die Säurezahl (SZ) nach folgender Methode gemäß EuAB bestimmt:

10,00 g der zu untersuchenden Emulsion werden in 50 ml einer Mischung gleicher Volumenteile aus Ethanol 96% R und Petrolether R3 gelöst. Die Lösungsmittelmischung wird zuvor mit Kaliumhydroxidlösung (0,1 mol/L) unter Zusatz von 0,5 mL Phenolphthalein-Lösung R neutralisiert. Anschließend wird die zu untersuchenden Lösung mit 0,1 molarer Kaliumhydroxidlösung bis zu einer 15s andauernden Rosafärbung titriert.

Die Säurezahl berechnet sich nach folgender Formel :

$$SZ = 5,610 * n * 0,1$$

**Formel 16:** Berechnung der Säurezahl

n = Milliliter verbrauchte Kaliumhydroxidlösung

### 3.2.5.5 Bestimmung der Peroxidzahl (POZ)

Zur genaueren Charakterisierung der chemischen Stabilität der verwandten Emulsionen wurde die Peroxidzahl (POZ) nach folgender Methode gemäß EuAB bestimmt:

In einem 250 mL Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen werden 5,0 g Emulsion in einer Mischung von 2 Volumenteilen Chloroform R und einem Volumenteil Essigsäure 99% R unter Umschütteln gelöst. Die Lösung wird nach Zusatz von 0,5 mL gesättigter Kalium-Jodid-Lösung R genau 1 min lang geschüttelt, mit 30 ml Wasser R und dann unter kräftigem Umschütteln mit 0,01 molarer Natriumthiosulfat-Lösung titriert bis die Gelbfärbung fast verschwunden ist. Nach Zusatz von 5 mL Stärke-Lösung R bis zum Verschwinden der Blaufärbung fortgesetzt ( $n_1$ ). Unter den gleichen Bedingungen wird ein Blindversuch durchgeführt, bei dem höchstens 0,1 mL Titrationslösung verbraucht werden dürfen ( $n_2$ ).

Die Peroxidzahl berechnet sich nach folgender Formel:

$$POZ = 10 * (n_1 - n_2) / 5$$

**Formel 17:** Berechnung der Peroxidzahl

### 3.2.5.5 Bestimmung des Gehaltes an freien Fettsäuren (FFA)

Der Gehalt an freien Fettsäuren in den gelagerten parenteralen Fettemulsionen wurde analog Carneiro et. al. [Carneiro et al., 2002] bestimmt, da die Methode von Schuhmann [Schuhmann, 1995] nicht mehr nachzuvollziehen war.

5,0 g der zu untersuchenden Fettemulsion werden in einem trockenen Becherglas in 30 mL einer 1:1 Mischung aus Toluol und 2-Propanol gelöst. Zur Mischung werden ungefähr 0,5 bis 0,6 g Paraformaldehyd (ca. 1 Spatelspitze) gegeben. Die Mischung wird für 30 s geschüttelt und dann unter Rühren auf einem Magnetrührer mit 0,01 molarem Kaliumhydroxid Lösung in 2-Propanol solange titriert, bis auf einem in der Mischung befindlichen digitalen Thermometer ein Temperaturabfall sichtbar ist. (Dieser resultiert in der endothermen Depolymerisation des Paraformaldehyds nach vollständiger Titration der freien Fettsäuren.)

Parallel wird eine Bestimmung des Blindwertes durchgeführt. Dazu werden 2, 3, 5 und 7 g einer Charge nichtgelagerter Emulsion nach obiger Vorschrift titriert und mittels linearer Regression eine Gerade erstellt, mittels derer sich der Blindverbrauch der zu untersuchenden Emulsion mit geringem Gehalt an freien Fettsäuren bestimmen lässt.

## 4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene, schwer wasserlösliche Substanzen mit Hilfe der SolEmuls®-Technologie in nanopartikuläre Systeme überführt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die physikalischen Parameter der einzelnen Systeme gelegt. Im Rahmen einer Kooperationsarbeit konnten für das Amphotericin-B-haltige System Daten zur Toxizität und biologischen Aktivität gewonnen werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den Systemen beschrieben.

### 4.1. Amphotericin B-haltiges System

Amphotericin-B bot sich als Modellarzneistoff für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus mehreren Gründen an: Zum Einen weist es eine ausgesprochen geringe Löslichkeit sowohl in wässrigen als auch in öligen Medien auf, zum Anderen kommt es im Verlauf der Therapie mit Amphotericin-B zu zum Teil bedeutenden toxischen Nebenwirkungen. Darüber hinaus ist AmB auch aus gesundheitsökonomischen Aspekten ein interessanter Modellarzneistoff, da die vorhandenen AmB-Formulierungen teilweise zu Therapiekosten in großer Höhe führen, bzw. die Folgekosten durch Nebenwirkungen für preiswertere Formulierungen immens sein können (Hann I.M. and Prentice H.G., 2001, Lewis R., 2003).

Die physikochemischen Eigenschaften, Struktur, Herkunft und medizinische Bedeutung von Amphotericin B wurde bereits in Kapitel 3.1.1.1 dieser Arbeit erläutert.

#### 4.1.1 Ergebnisse der Vorversuche zu AmB-haltigen Formulierungen

Im Rahmen eines Vorversuches wurde eine Amphotericin-B-haltige Emulsion mit Hilfe der unter 3.2.2 beschriebenen SolEmuls®-Technologie hergestellt. Dabei wurde das mikronisierte Amphotericin-B-Pulver zu einer 1,0 %igen Ei-Lecithin haltigen, wässrigen Lösung gegeben. Diese Mischung wurde mit einem Ultra-Turrax 2 Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute vorhomogenisiert. Im Anschluss wurde die Prä suspension in einem APV LAB 40 Hochdruckhomogenisator nach folgender Routine homogenisiert. Um zunächst größere Kristallstrukturen und Agglomerate zu zerkleinern wird die Prä suspension für 2 Zyklen bei 150 bar und anschließend 2 Zyklen bei 500 bar homogenisiert. Anschließend wird die Suspension mittels 20 Zyklen bei 1500 bar fertiggestellt. Die dabei erhaltene Nanosuspension wies einen Wirkstoffanteil von 2,5% auf. Ein Aliquot dieser Nanosuspension wurde in einem finalen Schritt in eine Lipofundin®-MCT-10-

Emulsion mit dem gleichen Homogenisator durch 10 Zyklen bei 600 bar eingearbeitet. Das finale Produkt hatte einen Wirkstoffanteil von 1,0 mg/mL. Der Gehalt in der Formulierung wurde mit Hilfe der unter 3.2.4.1 beschriebenen HPLC-Methode überprüft. Die folgende Tabelle zeigt die Gehaltswerte von 3 nacheinander hergestellten AmB-haltigen SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierungen, welche exakt nach der gleichen Methode und dem gleichen AmB-Gehalt hergestellt wurden (siehe Tabelle 5). Die erste Spalte gibt dabei den rechnerisch zu erwartenden Gehalt, die Zweite den tatsächlich gemessenen Gehalt am Tag der Herstellung und die dritte Spalte den auf die rechnerische Einwaage bezogenen prozentualen Anteil an.

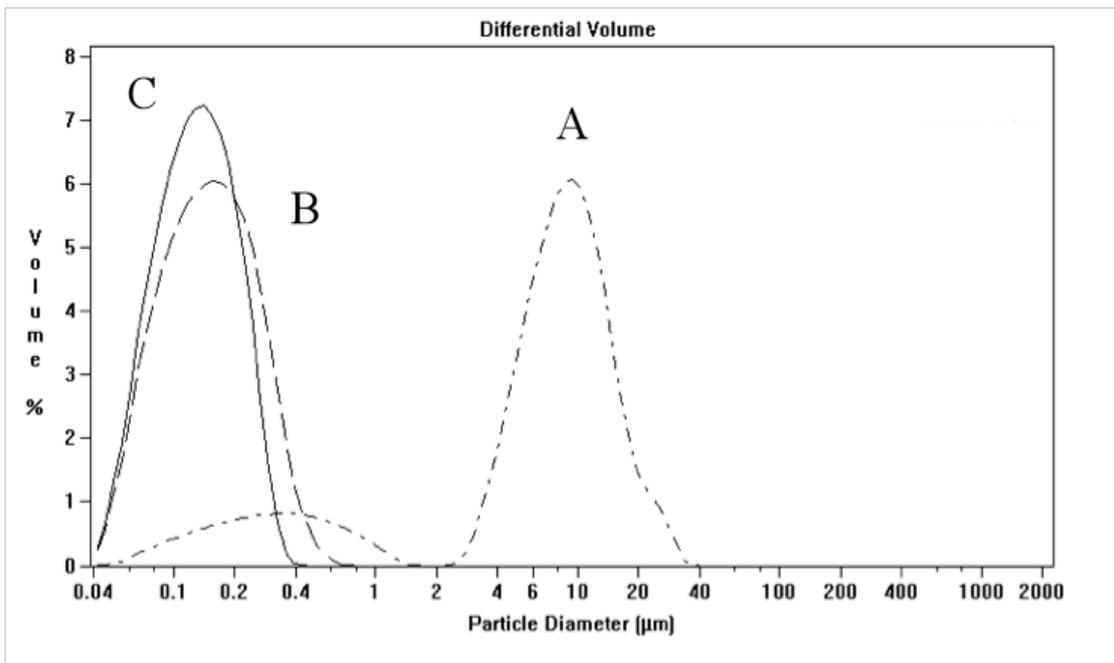
**Abb. 19a:** Gehaltbestimmung mit Hilfe der HPLC bei AmB-haltiger SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierung (Bestimmungen erfolgten durch Dreifachmessung, angegeben ist ein Mittelwert)

Einwaage	Gehalt	Anteil von Einwaage
0,9 mg/mL	0,73 mg/mL	81%
1,0 mg/mL	0,78 mg/mL	78%
1,0 mg/mL	0,81 mg/mL	81%

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Verarbeitung von Amphotericin B mit Hilfe der SolEmuls<sup>®</sup>-Technologie zu einer entsprechenden Formulierung führt, die einen ca. 80 %igen Gehalt bezogen auf die Einwaage besitzt. Die Verluste im Gehalt lassen sich, vorausgesetzt die Einwaage war exakt, durch Abbaureaktionen während der Herstellung erklären. Immerhin treten im Zuge der Hochdruckhomogenisation deutliche Erwärmungen der Formulierung auf, welche zu thermischen Belastungen und damit zu verstärkten Abbauprozessen von AmB führen können.

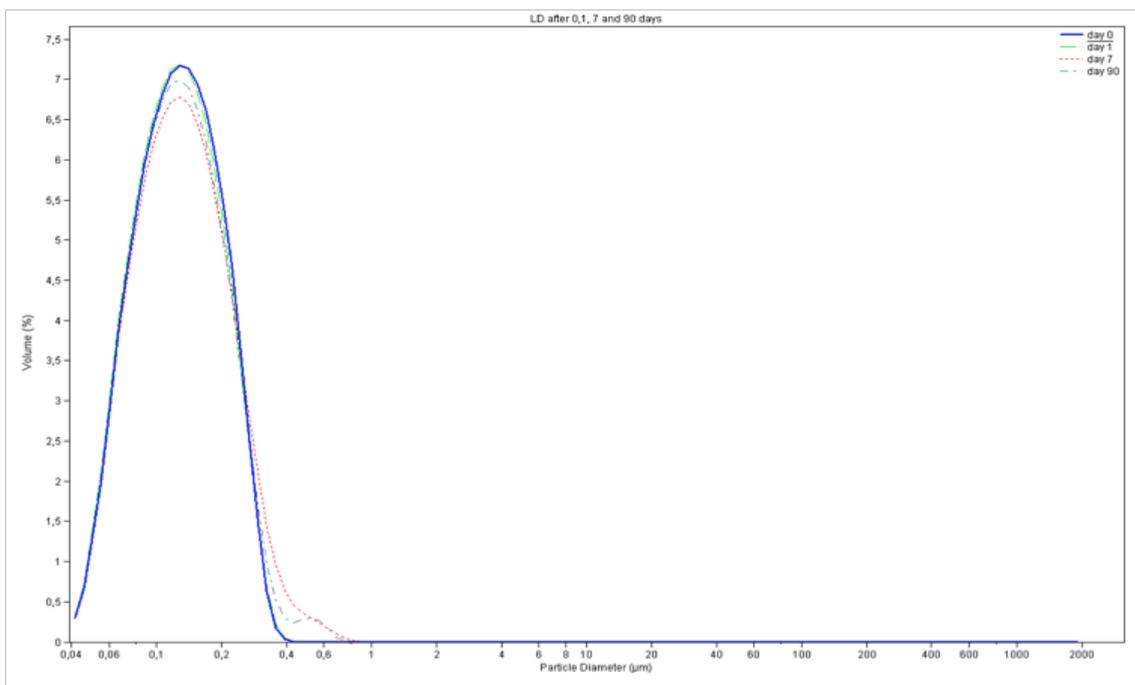
Ziel dieser Vorversuche war es, die Eignung von Amphotericin B, eine physikalisch stabile SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierung zu bilden, zu überprüfen. Als Indikator für die Stabilität wurde die Partikelgröße, die Partikelgrößenverteilung, das Zetapotential und die Veränderung dieser Werte über eine Zeitspanne von 90 Tagen betrachtet. Zusätzlich wurde der Wirkstoffgehalt nach 90 Tagen mittels HPLC überprüft. Dabei wurden die Proben bei 20°C gelagert.

Abbildung 18 zeigt zunächst die Partikelgrößenverteilung von Amphotericin B Pulver (Kurve A) und der SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierung nach 5 (Kurve B) und nach 20 Homogenisationszyklen (Kurve C). Es handelt sich dabei um den LD 50% (Volumenverteilung) gemessen mit dem zuvor beschriebenen Laserdiffraktometer.



**Abb.18:** Partikelgrößenverteilung, Amphotericin B Pulver (A), SolEmuls®-Formulierung nach 5 Homogenisationszyklen (B) und nach 20 Zyklen (C)

In Abbildung 19 wird die Veränderung der Partikelgrößenverteilung der SolEmuls®-Formulierung über einen Zeitraum von 90 Tagen aufgezeigt. Dabei wurde die zuvor beschriebene und unter Kurve C dargestellte Formulierung vermessen. Die Messungen wurden an den Tagen 0, 1, 7 und 90 vorgenommen. Wie zu erkennen ist, kam es nur zu geringen Veränderungen. Ein deutliches Partikelwachstum lag nicht vor.



**Abb.19:** Änderung der Partikelgröße über einen Zeitraum von 90 Tagen – LD50%

Die Ergebnisse ließen sich durch Messungen mit Hilfe der PCS bestätigen. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der PCS-Messungen. In der letzten Spalte ist der LD99% aus den LD-Messungen zum Vergleich aufgeführt.

**Tab.5:** Änderung der Partikelgröße über einen Zeitraum von 90 Tagen – PCS

1 mg/mL			
	PCS (in nm)	PI	LD99%
Tag 0	201	0,059	0,430
Tag 1	202	0,072	0,435
Tag 7	204	0,117	0,486
Tag 90	207	0,132	0,536

Der Polydispersitätsindex (PI), der ein Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung darstellt, steigt im Laufe der Zeit leicht an. Dieses Verhalten ist in emulsionsbasierenden Formulierungen nicht unüblich. Bei einem PI von unter 0,15 kann man das System aber noch weitgehend als monomodal betrachtet werden.

Zusätzlich wurde die Veränderung des Zetapotentials über die Zeit betrachtet. Dazu wurden die Proben bei einer Feldstärke von 20 V/cm und in einer Verdünnung welche eine Leitfähigkeit von 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  aufwies, vermessen. Der pH-Wert des zur Verdünnung genutzten Wassers wurde gemäß Müller [Müller, 1996] zwischen 5,0 und 5,5 eingestellt. Die gemessene elektrophoretische Beweglichkeit wurde mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung umgerechnet. Tabelle 7 zeigt die Werte des Zetapotentials im Verlaufe der 90-tägigen Lagerzeit.

**Tab.6:** Änderung des Zetapotentials über einen Zeitraum von 90 Tagen – Zetasizer 3

1 mg/mL		
	Zetapotential in mV	Standardabweichung in mV
Tag 0	-54,4	0,3
Tag 1	-53,6	0,4
Tag 7	-52,8	0,3
Tag 90	-51,4	0,2

Das Zetapotential zeigt nur geringfügige Veränderungen in Laufe der Lagerzeit. Dieses Verhalten spricht für eine langzeitstabile Formulierung.

Zur Absicherung der Abwesenheit von Agglomeraten oder Partikeln die zu groß für das

PCS oder LD sind, wurden parallel lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht. Dabei wurden keine Agglomerate oder größere Partikel festgestellt. Auf eine Abbildung wird hier verzichtet.

**Tab.7:** Gehaltsbestimmung mit Hilfe der HPLC... nach 90 Tagen Lagerung bei 20°C

Gehalt Tag 1	Gehalt Tag 90	Wiederfindungsrate in %
0,73 mg/mL	0,72 mg/mL	98,6
0,78 mg/mL	0,75 mg/mL	96,2
0,81 mg/mL	0,80 mg/mL	98,8

Aus den Ergebnissen der Gehaltsbestimmung lässt sich ableiten, dass, trotz eines anteiligen Verlustes von ca. 20% des Wirkstoffes bei der Herstellung, der Gehalt an Amphotericin-B über eine Lagerzeit von 90 Tagen sich nahezu nicht verändert hat. Dieses stellt einen ersten Hinweis dafür dar, dass eine Amphotericin-B-haltige Formulierung, die mit Hilfe des SolEmuls®-Verfahrens hergestellt wurde, zu einem stabilen System führt, bei dem sich der Wirkstoffgehalt über die Lagerzeit nicht signifikant ändert.

Nach dem erfolgreichen Verlauf der Vorversuche ist nun zu fragen, wie stark die biologische Aktivität und die Toxizität dieser Formulierung ist.

#### 4.1.2 In vitro Daten der Amphotericin B-haltigen Formulierung

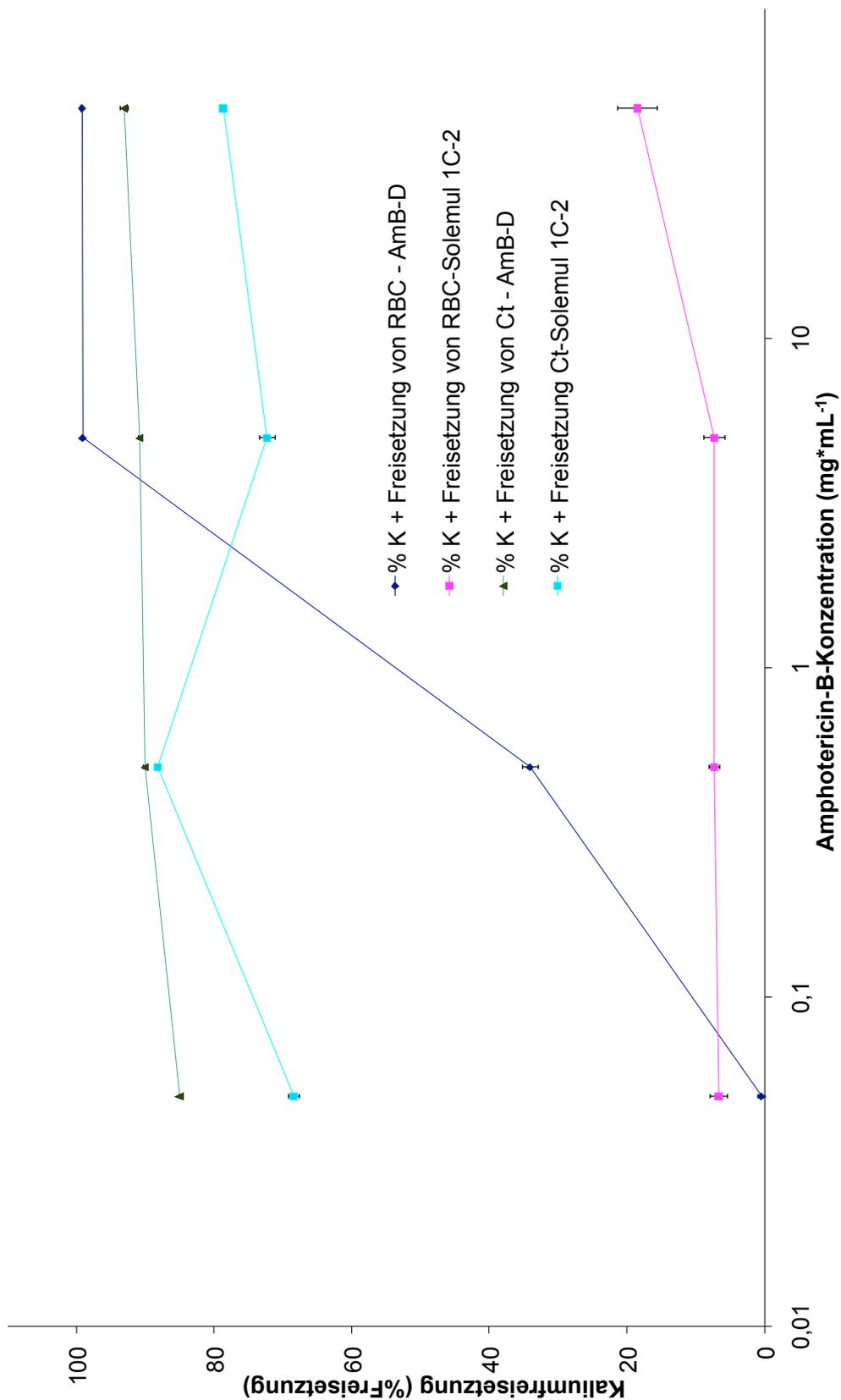
Für die sich anschließenden Versuche wurde eine Amphotericin-B-haltige Formulierung genutzt, die nach den gleichen Verfahren wie in den Vorversuchen hergestellt wurde.

Die hergestellte Formulierung wurde mit einer kommerziell erhältlichen Formulierung verglichen. Dabei handelte es sich um Fungizone®, einem Arzneimittel der Firma Bristol Myers Squibb (New York, USA). Die fungizide und die toxikologische Aktivität wurden an zwei Zell-Modellen getestet. Dies waren zum einen *Candida tropicalis* (Ct-Modell), um die fungizide Wirkung zu untersuchen, und zum anderen Erythrocyten (RBC-Modell), um die toxischen Wirkungen zu bestimmen. Die Versuche wurden nach der von Egito et al. [Egito 1996b] beschriebenen Methode durchgeführt.

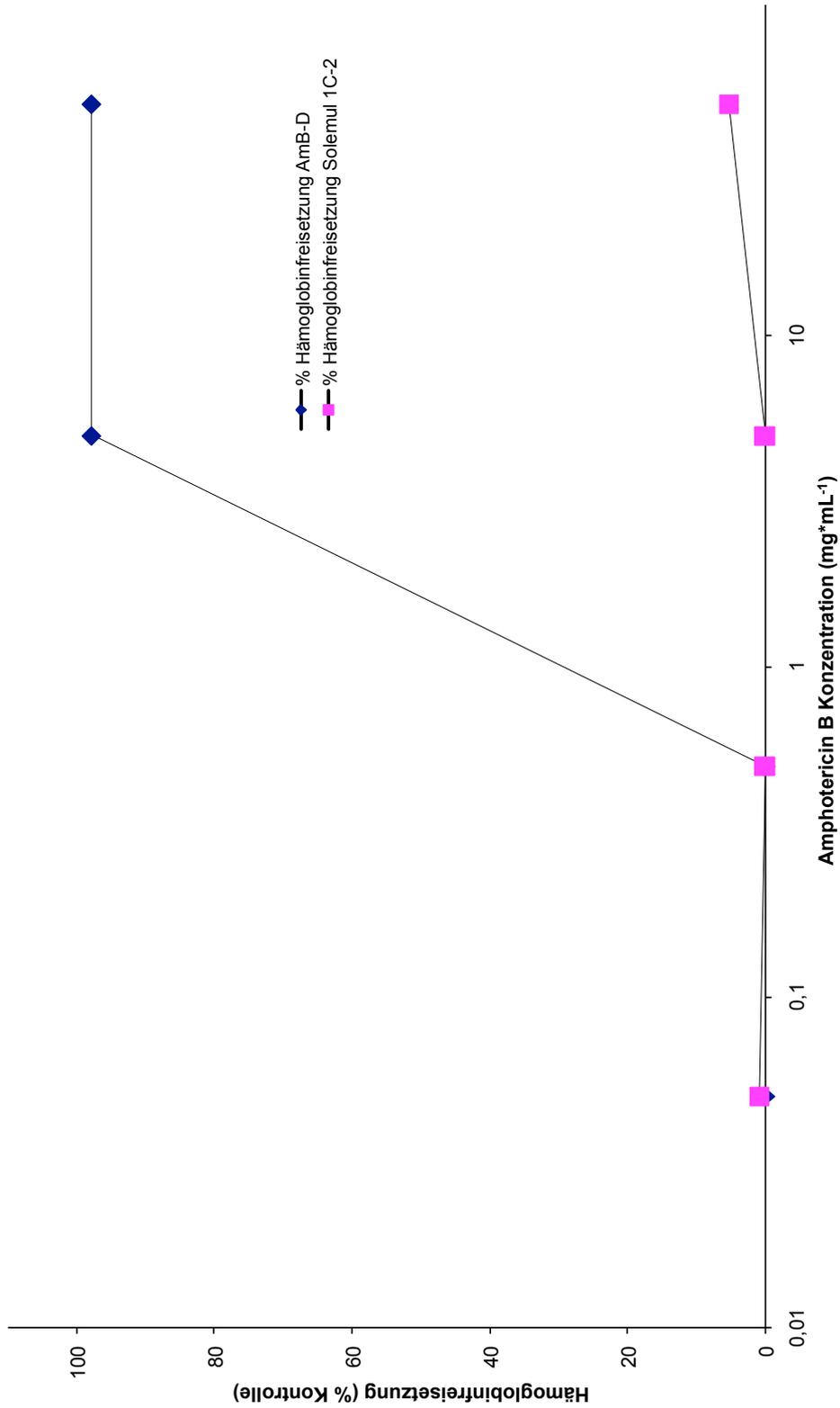
Die Toxizität der beiden AmB-Formulierungen (hergestellte Formulierung und Fungizone®) wurden wie zuvor erwähnt an Erythrozyten untersucht. Dazu wurden 4mL Erythrozyten ( $5 \times 10^7$  Zellen/mL) für 1 Stunde bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,05; 0,5; 5 und 50 mg/mL) der beiden Formulierungen inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Erythrozyten bei 1100 g für 5 Minuten zentrifugiert und dreimal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Um die Zellmembranen zu entfernen, wurde das erhaltene Erythrozytenpellet in 4mL destilliertem Wasser aufgelöst und die Lösung erneut bei 1100 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde im Überstand mittels Flammenphotometrie (Flame Photometer 7000 (Tecnow, São Paulo, SP, Brazil)) die Konzentration an Kalium-Ionen gegen eine Kalibrierreferenz von 5 mÄq/L bestimmt. Aufgrund des Wirkmechanismus von AmB (siehe 3.1.1) erlaubt die Konzentration der Kalium-Ionen Rückschlüsse auf eine akute Zelltoxizität der Formulierung.

Um den Hämolysefaktor zu bestimmen, wurde die Konzentration des Hämoglobins mit Hilfe eines Coleman Spectrophotometers des Modells SP395U (São Paulo, Brasilien) bei einer Absorptionswellenlänge von 540 nm bestimmt. Die Kalium und die Hämoglobin-freisetzung wurde als Differenz zwischen Kontrolle und behandelten Zellen berechnet und als Prozentwert vom Gesamtkalium bzw. -hämoglobin dargestellt. Alle Werte wurden jeweils mittels Dreifachmessung bestimmt.



**Abb.20:** Kalium-Freisetzung aus Erythrozyten vs. Amb Konzentration, Solemul 1C-2 = Formulierung nach SolEmuls®-Technologie, AmB-D = Fungizone®

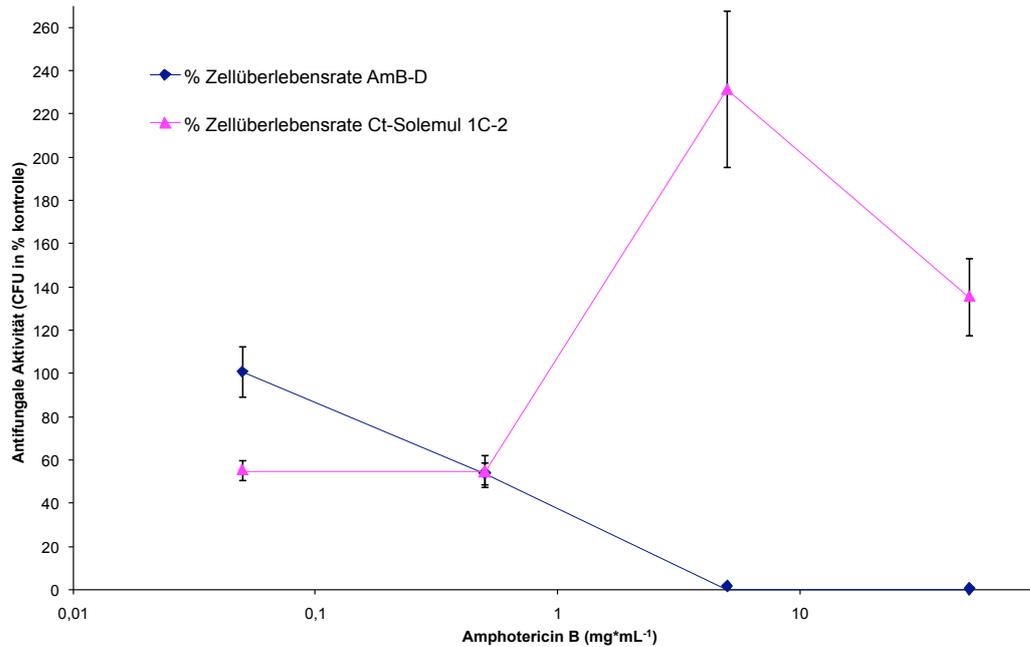


**Abb.21:** Hämoglobinfreisetzung aus Erythrozyten vs. AmB-Konzentration, Solemul 1C-2 = Formulierung nach SolEmuls<sup>®</sup>-Technologie, AmB-D = Fungizone<sup>®</sup>

Wie Abbildung 20 zu entnehmen ist, ist die Kalium-Freisetzung, induziert durch die SolEmuls<sup>®</sup>- Formulierung, beim RCB-Modell selbst bei hohen AmB-Konzentrationen sehr gering: Hier zeichnet sich ein mehr als deutlicher Unterschied zu der kommerziellen Formulierung Fungizone<sup>®</sup> ab. Ein ähnliches Bild bezogen auf die Hämoglobinfreisetzung zeigt Abbildung 21. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Formulierungen erkennbar. Im Bezug auf die akute Toxizität gegen Erythrozyten ist die SolEmuls<sup>®</sup>- Formulierung der kommerziellen Formulierung überlegen. Der Unterschied in der Kalium-Freisetzung beim Ct-Modell zwischen den beiden Formulierungen ist sehr viel weniger ausgeprägt. Hier lässt sich allerdings eine höhere Freisetzung bei Fungizone<sup>®</sup> erkennen (siehe Abbildung 20), was auf eine höhere fungizide Aktivität dieser Formulierung hindeutet.

Die fungizide Aktivität der beiden Formulierungen wurde an Zellen von *Candida tropicalis* (Ct-Modell) bestimmt und verglichen. Sie ist abhängig von der Konzentration an freien, ungebundenen AmB-Molekülen [Bolard 1986].

Dazu wurden 2mL Zellsuspension ( $5 \times 10^7$  cfu/mL) für 1 Stunde bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,05; 0,5; 5 und 50 mg/mL) der beiden Formulierungen inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen bei 2200 g für 10 Minuten zentrifugiert und dreimal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Ein Aliquot des erhaltenen Zellpellets wurde bei 100°C für 5 Minuten lysiert und anschließend zentrifugiert um die Zellmembranen zu entfernen. Anschließend wurde die Kaliumfreisetzung analog zum Erythrozytenmodell bestimmt (Ergebnis siehe Abbildung 20). Für die Bestimmung der Zell-Überlebensrate wurden ein 100 µL Aliquot des Zellpellets entsprechend verdünnt und als Triplikett auf Agarplatten aufgetragen und bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) nach 24 und 48 Stunden bestimmt und als prozentualer Wert gegen eine Kontrolle ohne AmB dargestellt. Alle Werte wurden jeweils mittels Dreifachmessung bestimmt.



**Abb.22:** Zell-Überlebensrate von *Candida tropicalis* vs. Konzentration SolEmuls®- Formulierung (Solemum 1C-2) und Fungizone® (AmB-D)

Wie oben ausgeführt lieferte die Bestimmung der Kaliumfreisetzung einen ersten Hinweis auf die Aktivität/Toxizität gegen *Candida*-Zellen (siehe Abbildung 20). Die höhere fungizide Wirkung des Fungizone® gegenüber der SolEmuls®- Formulierung konnte bei der Bestimmung der Zell-Überlebensrate im Ct-Modell bestätigt werden (siehe Abbildung 22).

Fungizone® zeigt eine erwartungsgemäß hohe fungizide Aktivität, die mit steigender Konzentration zunimmt. Auf den ersten Blick zeigt die SolEmuls®- Formulierung ein eher überraschendes Ergebnis. Die Zell-Überlebensrate steigt mit steigender Konzentration der Formulierung zunächst deutlich an. Dieses Phänomen wurde allerdings bereits von Bolard et al. beschrieben [Bolard et al., 1991 und 1986]. Dabei lässt sich der Anstieg im Zellwachstum durch den hohen Nahrungswert des Lipidträgers erklären. Die Lipidemulsion, die die Basis der SolEmuls®- Formulierung darstellt, kann in diesem Fall von den Pilzzellen als gutes Nährmedium verstoffwechselt werden. Neben dem „Nährmedium-Effekt“ des Lipidträgers ist es sehr wahrscheinlich, dass während der Inkubationszeit, die in diesem Fall eine Stunde betrug, eine zu geringe Konzentration an freiem AmB vorlag um eine fungizide Wirkung hervorzurufen. In diesem Fall bedeutet dies, dass AmB in der SolEmuls®- Formulierung langsam freigesetzt wird. Die geringe Konzentration an freiem AmB wiederum kann, wie bei Bolard beschrieben wurde [Bolard 1986], als Stimulus für das Pilzwachstum wirken.

Zusammenfassend lassen sich über die Ergebnisse der Vergleichsstudien zwischen der kommerziellen AmB Formulierung Fungizone<sup>®</sup> und der SolEmuls<sup>®</sup>- Formulierung folgende Aussagen treffen.

- Die SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierung ist bedeutend weniger toxisch gegenüber Erythrozyten. Dies stellt einen Fakt dar, der bei einer parenteralen Administration von großer Bedeutung ist.
- Die Kosten für Herstellung und Vermarktung/Einkauf der SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierung sind bzw. wären deutlich günstiger. Ein Faktor, der im Klinikalltag eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt.
- Die fungizide Wirkung der SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierung ist wesentlich geringer als die von Fungizone<sup>®</sup> bei gleicher Dosierung. Dieses Problem könnte sich entweder mit einer Anpassung der Dosierung oder mit einer Optimierung der Formulierung lösen lassen.

Nach diesen ersten, viel versprechenden Versuchen war der nächste konsequente Schritt, das SolEmuls<sup>®</sup>- Verfahren an weiteren Substanzen zu Testen. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich die folgenden SolEmuls<sup>®</sup>- Formulierungen analog zur AmB-Formulierung auf ihre Aktivitäten an Zellen zu testen.

## 4.2 Itraconazol-haltiges System

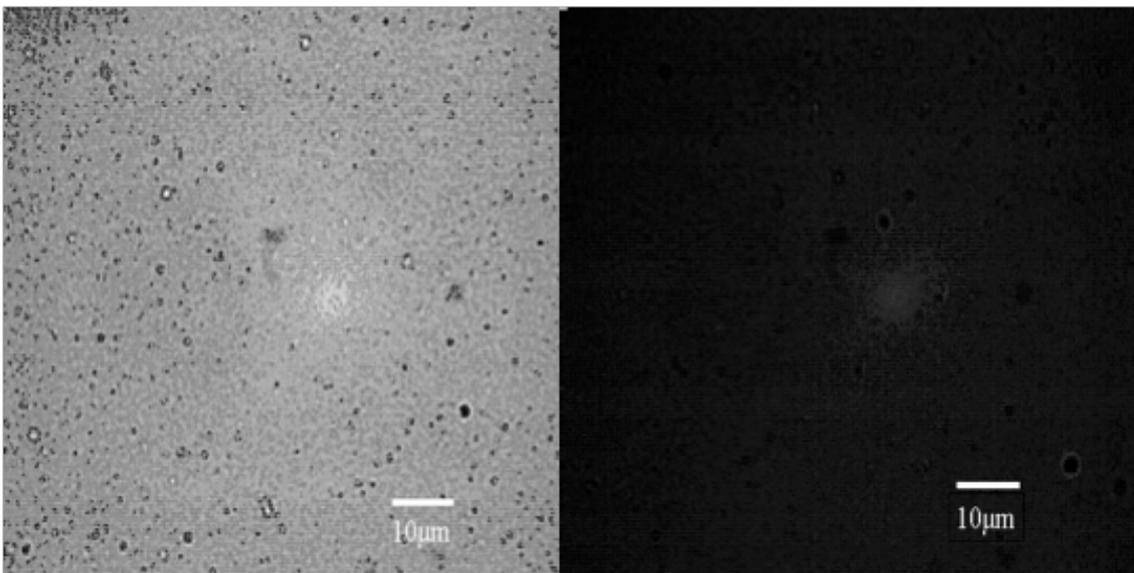
Als nächste Substanz die mit Hilfe des SolEmuls<sup>®</sup>- Verfahrens formuliert werden sollte, wurde der Arzneistoff Itraconazol ausgewählt. Itraconazol ist ähnlich wie Amphotericin B durch eine sehr geringe Löslichkeit in wässrigen und nichtwässrigen Medien gekennzeichnet. Es besitzt fungizide Wirkung und ist als injizierbare Lösung (10mg/mL) kommerziell unter dem Namen Sporanox<sup>®</sup> erhältlich. Itraconazol ist in kommerziellen Formulierungen nur durch den Einsatz von Tensiden oder Cyclodextrinen in eine injizierbare Form zu überführen. Diese Stoffe verursachen nicht selten unerwünschte Nebenwirkungen. Weitere chemisch-physikalische Eigenschaften wurden bereits unter 3.1. beschrieben.

Als Ausgangsstoff für die SolEmuls<sup>®</sup>- Formulierung wurde zunächst eine 10% Itraconazol Nanosuspension - wie unter 3.2.2 beschrieben - hergestellt, welche dann nach dem SolEmuls<sup>®</sup>- Verfahren in eine Lipofundin<sup>®</sup> MCT 20% Emulsion eingearbeitet wurde. Dabei wurden als Endprodukt Formulierungen mit einer Itraconazol-Konzentration von 1,0 bis 10 mg/mL hergestellt. Alle Formulierungen wurden als Triplikett hergestellt und mit

A bis C gekennzeichnet.

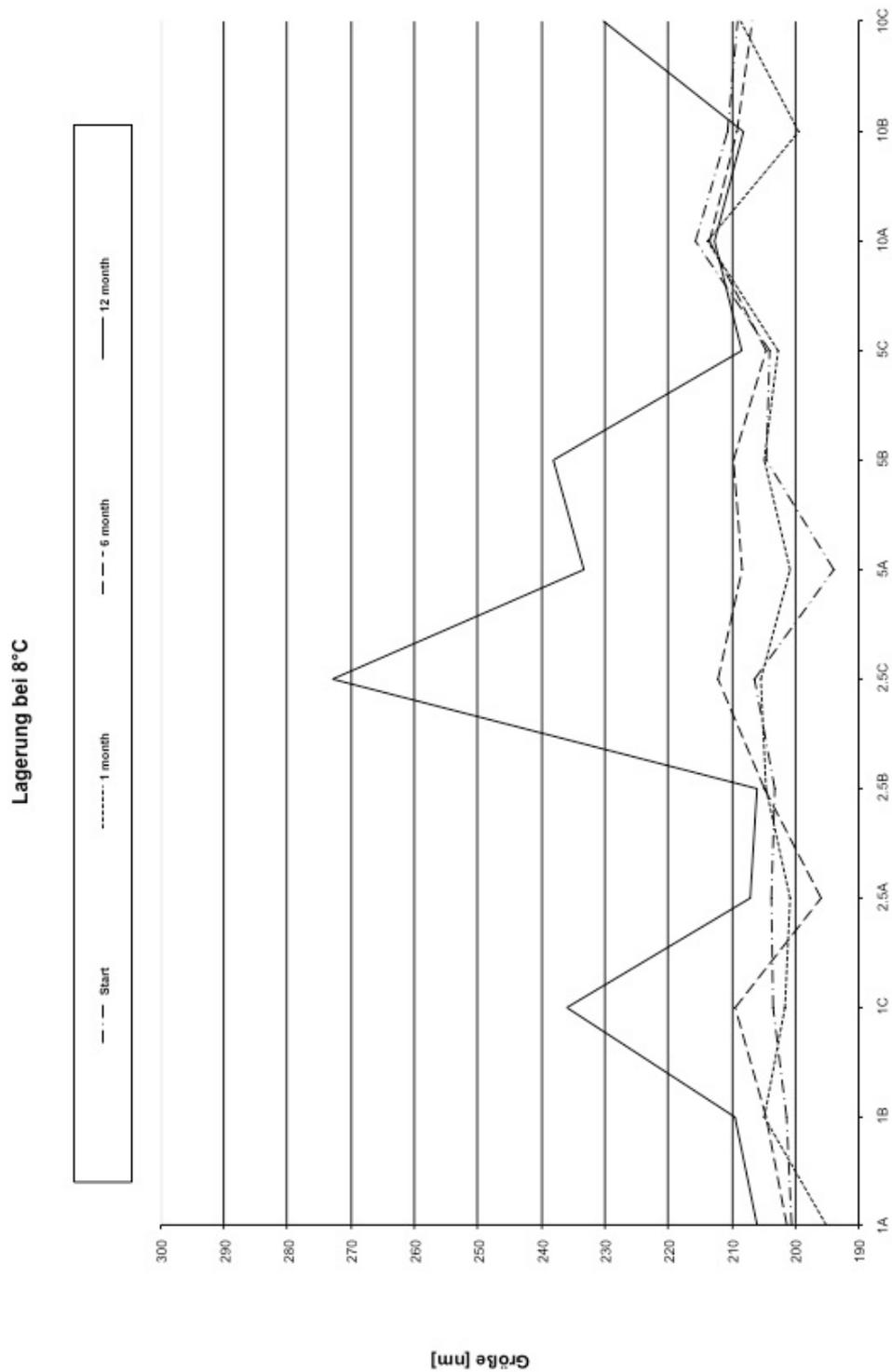
Ziel der anschließenden Versuche war es, eine Aussage über die Langzeitstabilität der Formulierungen zu erhalten. Hierzu wurden die Formulierungen über einen Zeitraum von 12 Monaten bei einer Lagerung bei 8, 20, 40 und 60°C betrachtet. Die Lagerung erfolgte kontrolliert in entsprechenden Klimaschränken.

Die Partikelgrößen der Formulierungen wurden mittels Laserdiffraktometrie (siehe 3.2.4) bestimmt und mit Hilfe von lichtmikroskopischen Aufnahmen überprüft. Die durchschnittliche Partikelgröße betrug 210 nm. Die LD-Messungen zeigten keine Partikel größer als 2µm. Dieses Ergebnis konnte mittels lichtmikroskopischer Aufnahme bestätigt werden (siehe Abbildung 23).

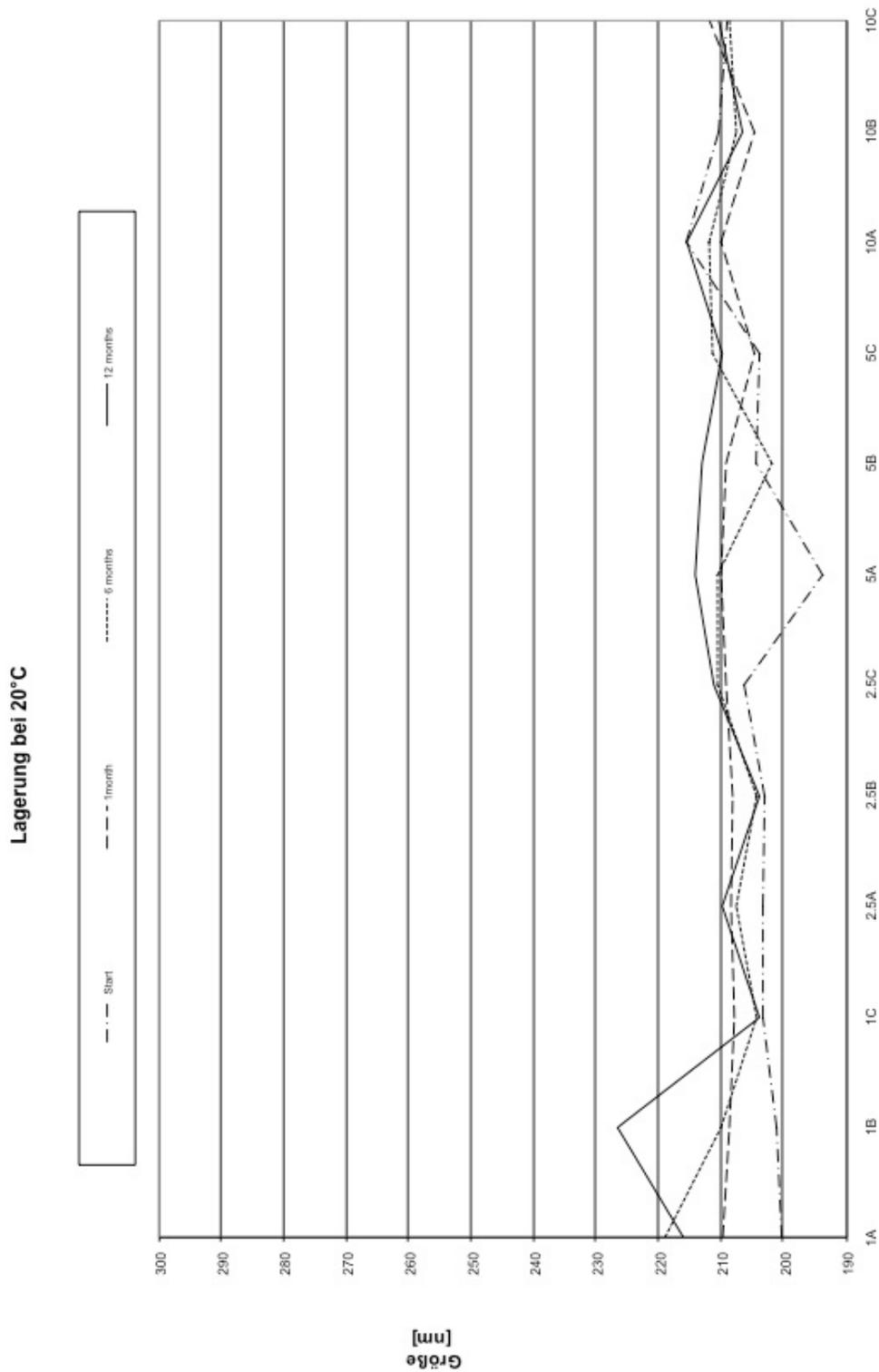


**Abb.23:** Itraconazolehaltige SolEmuls®- Formulierung (1,0mg/mL) – lichtmikroskopische Aufnahmen, links: normales Licht, rechts: polarisiertes Licht

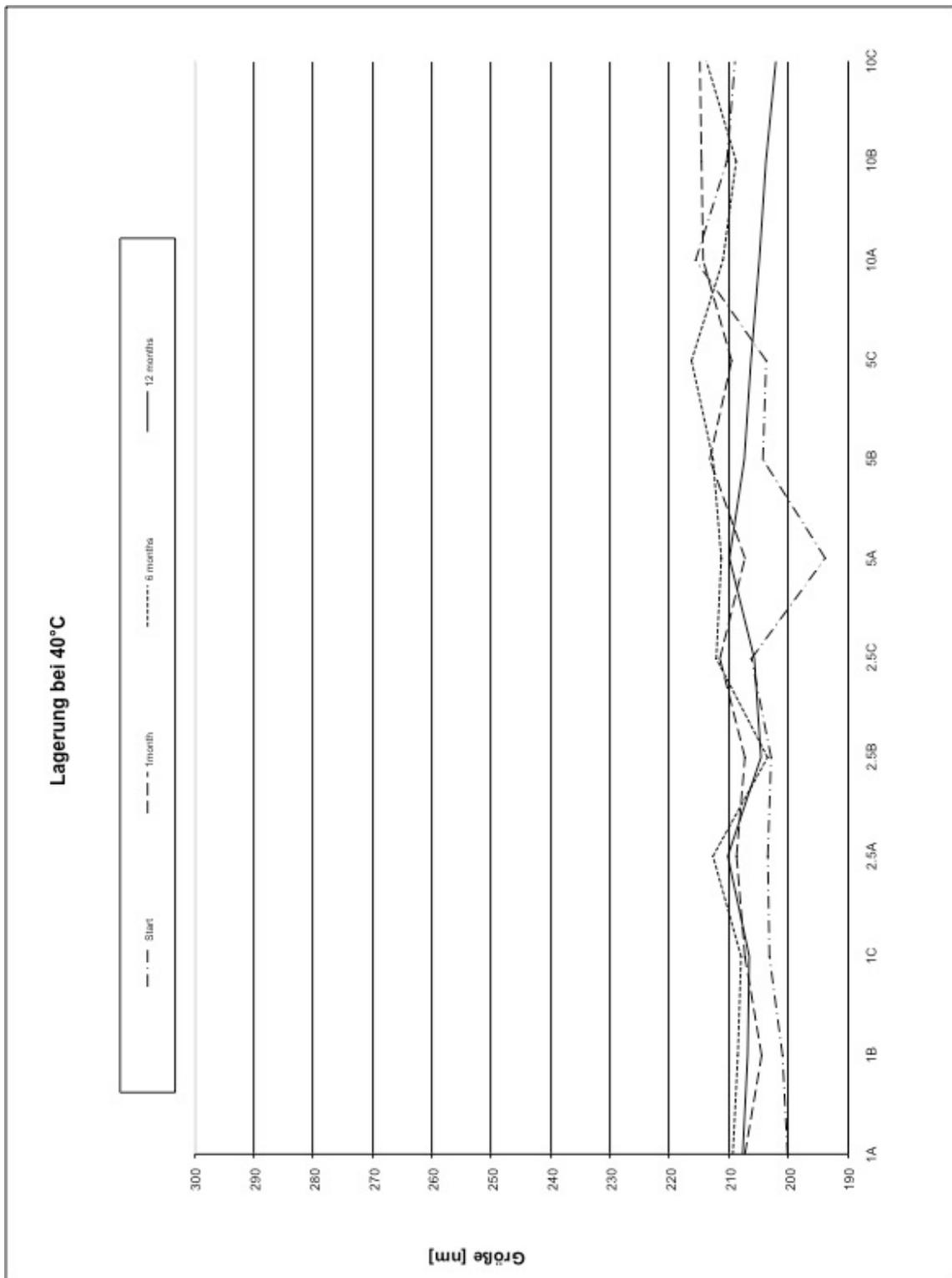
In den Abbildungen 24-27 sind die Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen zusammenfassend dargestellt.



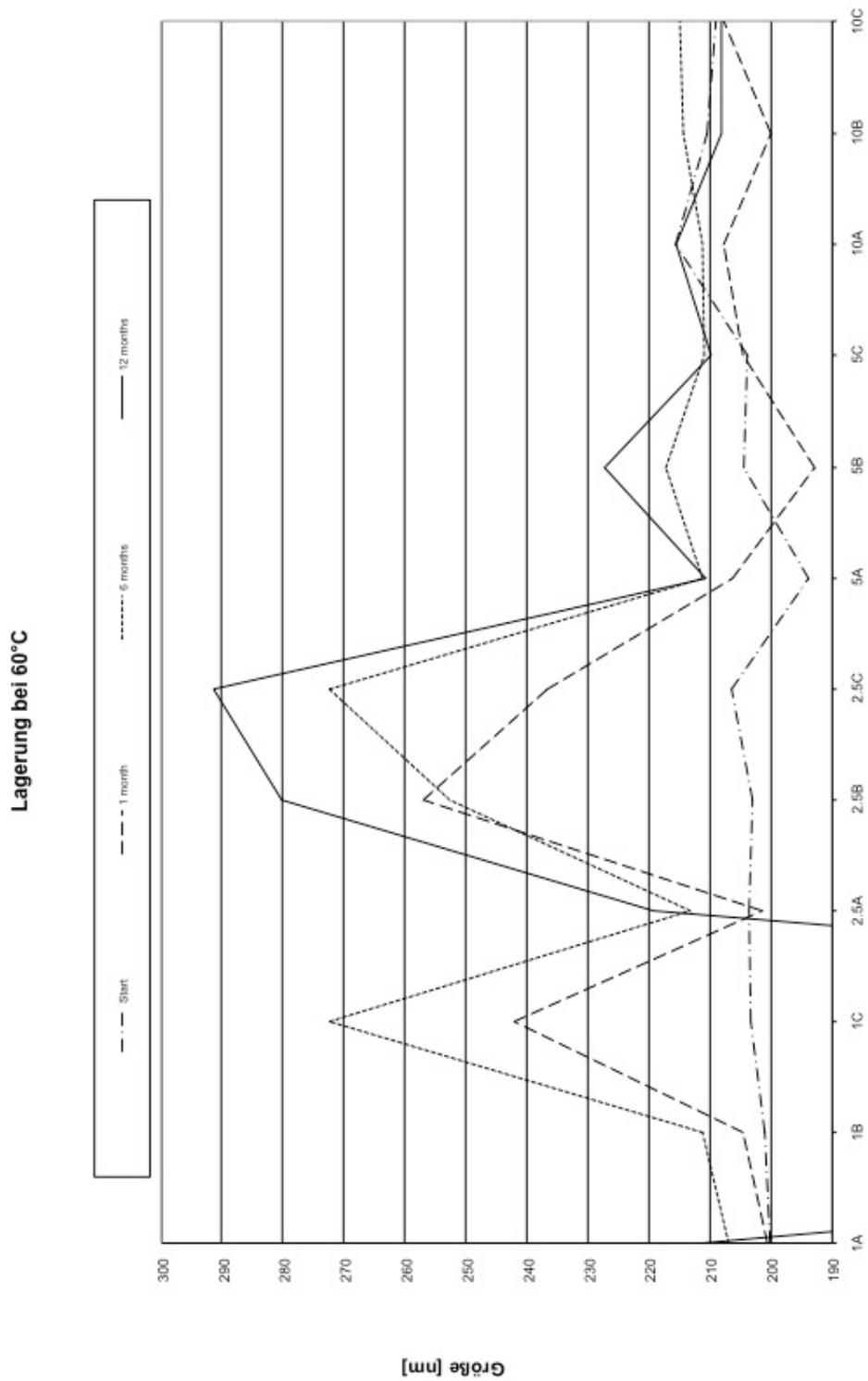
**Abb.24:** Stabilität von Itraconazolhaltigen SolEmuls®- Formulierung mit einem Konzentrationsspektrum von 1,0 bis 10,0 mg/mL gelagert bei 8°C (Teilchengröße in nm über den Lagerzeitraum der verschiedenen Emulsionen).



**Abb.25:** Stabilität von Itraconazolhaltigen SolEmuls®- Formulierung mit einem Konzentrationsspektrum von 1,0 bis 10,0 mg/mL gelagert bei 20°C (Teilchengröße in nm über den Lagerzeitraum der verschiedenen Emulsionen).



**Abb.26:** Stabilität von Itraconazolhaltigen SolEmuls®- Formulierung mit einem Konzentrationsspektrum von 1,0 bis 10,0 mg/mL gelagert bei 40°C (Teilchengröße in nm über den Lagerzeitraum der verschiedenen Emulsionen).



**Abb.27:** Stabilität von Itraconazolhaltigen SolEmuls®- Formulierung mit einem Konzentrationsspektrum von 1,0 bis 10,0 mg/mL gelagert bei 60°C (Teilchengröße in nm über den Lagerzeitraum der verschiedenen Emulsionen).

Wie aus den Abbildungen 24-27 erkennbar ist, liegt die beste Lagertemperatur bei 20°C bis 40°C. Die höchstmögliche, langzeitstabile Konzentration an Itraconazol lag bei diesen Studien bei 5,0mg/mL (siehe Abbildung 28). Rekristallisation trat bei dieser Konzentration nur in je einem Fall auf.

	8°C			20°C			40°C			60°C		
Konzentration	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1 mg/mL												
2.5 mg/mL												
5 mg/mL												
10 mg/mL												

**Abb.28:** Rekristallisationseffekte nach einer Lagerzeit von 12 Monaten – schwarze Rechtecke symbolisieren Rekristallisationen

**Tab.8:** Gehaltsbestimmung mittels HPLC der Itraconazol haltigen SolEmuls Formulierung (Bestimmung erfolgte an Tag 0, Tag 180, Tag 360 bei einer Lagerung bei 8°C)

		Tag 0			Tag 180			Tag 360	
Probe	Theoretischer Gehalt	tatsächlicher Gehalt	Bezogen auf Theorie	Gehalt mittels HPLC	Wiederfindungsrate bezogen auf Tag 0	Gehalt mittels HPLC	Wiederfindungsrate bezogen auf Tag 0		
1A	1,0	0,92	92,0	0,91	98,9	0,88	95,7		
1B	1,0	0,91	91,0	0,90	98,9	0,87	95,6		
1C	1,0	0,92	92,0	0,91	98,9	0,90	97,8		
2,5A	2,5	2,30	92,0	2,20	97,7	2,15	93,5		
2,5B	2,5	2,25	90,0	2,20	99,8	2,18	96,9		
2,5C	2,5	2,31	92,4	2,30	98,6	2,25	97,4		
5A	5,0	4,60	92,0	4,55	98,9	4,50	97,8		
5B	5,0	4,55	91,0	4,50	99,9	4,40	97,7		
5C	5,0	4,62	92,4	4,60	99,6	4,50	97,4		
10A	10,0	9,20	92,0	9,15	99,5	9,00	97,8		
10B	10,0	9,30	93,0	9,25	99,5	9,10	97,8		
10C	10,0	9,15	91,5	9,10	99,5	9,00	98,4		

**Tab.9:** Gehaltsbestimmung mittels HPLC der Itraconazol haltigen SolEmuls Formulierung (Bestimmung erfolgte an Tag 0, Tag 180, Tag 360 bei einer Lagerung bei 20°C)

		Tag 0		Tag 180		Tag 360	
Probe	Theoretischer Gehalt	tatsächlicher Gehalt	Bezogen auf Theorie	Gehalt mittels HPLC	Wiederfindungsrate bezogen auf Tag 0	Gehalt mittels HPLC	Wiederfindungsrate bezogen auf Tag 0
1A	1,0	0,92	92,0	0,89	96,7	0,80	87,0
1B	1,0	0,91	91,0	0,90	98,9	0,85	93,4
1C	1,0	0,92	92,0	0,88	95,7	0,83	90,2
2,5A	2,5	2,30	92,0	2,10	91,3	2,10	91,3
2,5B	2,5	2,25	90,0	2,20	97,8	2,15	95,6
2,5C	2,5	2,31	92,4	2,15	93,1	2,10	90,9
5A	5,0	4,60	92,0	4,40	95,7	4,30	93,5
5B	5,0	4,55	91,0	4,50	98,9	4,40	96,7
5C	5,0	4,62	92,4	4,50	97,4	4,40	95,2
10A	10,0	9,20	92,0	9,00	97,8	8,50	92,4
10B	10,0	9,30	93,0	8,90	95,7	8,60	92,5
10C	10,0	9,15	91,5	8,80	96,2	8,20	89,6

**Tab.10:** Gehaltsbestimmung mittels HPLC der Itraconazol haltigen SolEmuls Formulierung (Bestimmung erfolgte an Tag 0, Tag 180, Tag 360 bei einer Lagerung bei 40°C)

		Tag 0		Tag 180		Tag 360	
Probe	Theoretischer Gehalt	tatsächlicher Gehalt	Bezogen auf Theorie	Gehalt mittels HPLC	Wiederfindungsrate bezogen auf Tag 0	Gehalt mittels HPLC	Wiederfindungsrate bezogen auf Tag 0
1A	1,0	0,92	92,0	0,81	88,0	0,79	85,9
1B	1,0	0,91	91,0	0,80	87,9	0,70	76,9
1C	1,0	0,92	92,0	0,82	89,1	0,80	87,0
2,5A	2,5	2,30	92,0	2,00	87,1	1,95	84,8
2,5B	2,5	2,25	90,0	2,05	91,1	2,00	88,9
2,5C	2,5	2,31	92,4	2,10	90,9	2,05	88,7
5A	5,0	4,60	92,0	4,20	91,3	4,10	89,1
5B	5,0	4,55	91,0	4,25	93,4	4,15	91,2
5C	5,0	4,62	92,4	4,20	90,9	4,00	86,6
10A	10,0	9,20	92,0	8,80	95,7	8,20	89,1
10B	10,0	9,30	93,0	8,70	93,5	8,10	87,1
10C	10,0	9,15	91,5	8,20	89,6	8,00	87,4

**Tab.11:** Gehaltsbestimmung mittels HPLC der Itraconazol haltigen SolEmuls Formulierung (Bestimmung erfolgte an Tag 0, Tag 180, Tag 360 bei einer Lagerung bei 60°C)

		Tag 0		Tag 180		Tag 360	
Probe	Theoretischer Gehalt	tatsächlicher Gehalt	Bezogen auf Theorie	Gehalt mittels HPLC	Wiederfindungsrate bezogen auf Tag 0	Gehalt mittels HPLC	Wiederfindungsrate bezogen auf Tag 0
1A	1,0	0,92	92,0	0,70	76,1	0,45	48,9
1B	1,0	0,91	91,0	0,65	71,4	0,58	63,7
1C	1,0	0,92	92,0	0,91	77,2	0,51	55,4
2,5A	2,5	2,30	92,0	1,80	78,3	1,40	60,9
2,5B	2,5	2,25	90,0	1,70	75,6	1,20	53,3
2,5C	2,5	2,31	92,4	1,75	75,8	1,10	47,6
5A	5,0	4,60	92,0	3,50	76,1	2,50	54,3
5B	5,0	4,55	91,0	3,30	72,5	2,20	58,4
5C	5,0	4,62	92,4	3,25	70,3	2,40	51,9
10A	10,0	9,20	92,0	7,50	81,5	4,50	58,9
10B	10,0	9,30	93,0	7,20	77,4	4,80	51,6
10C	10,0	9,15	91,5	7,10	77,6	4,75	51,6

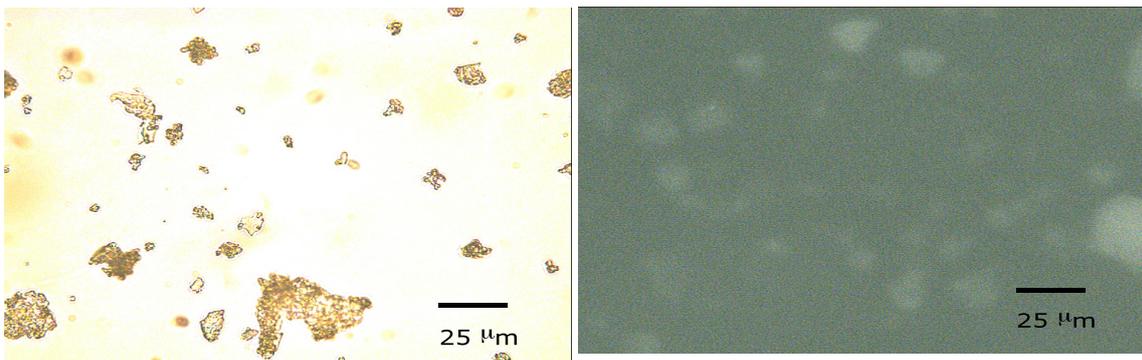
Diese Messergebnisse lassen eine optimale Lagertemperatur bezogen auf den Wirkstoffgehalt von 8 °C vermuten. Bei einer Lagerung bei 20°C ist die Formulierung allerdings noch immer sehr stabil, so dass eine Lagerung bei dieser Temperatur problemlos möglich ist. Erst ab einer Lagertemperatur von 40°C geht der Wirkstoffgehalt merklich nach unten und bei einer Lagerung bei 60°C ist nur noch ca. 50% des ursprünglichen Wirkstoffgehaltes nach 360 Tagen nachweisbar. Dies ist einmal durch Auskristallisationseffekte (vgl. Abbildung 28) sowie Zersetzung des Wirkstoffes bei zu hoher Lagertemperatur zu begründen.

Mit den durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des SolEmuls®- Verfahren eine langzeitstabile Formulierung von Itraconazol möglich ist. Diese Formulierung ist kosteneffizient und kann eine Wirkstoffkonzentration enthalten, die der Hälfte der kommerziellen Formulierung entspricht. Der Formulierungsträger besteht ausschließlich aus einer sehr gut verträglichen Emulsion.

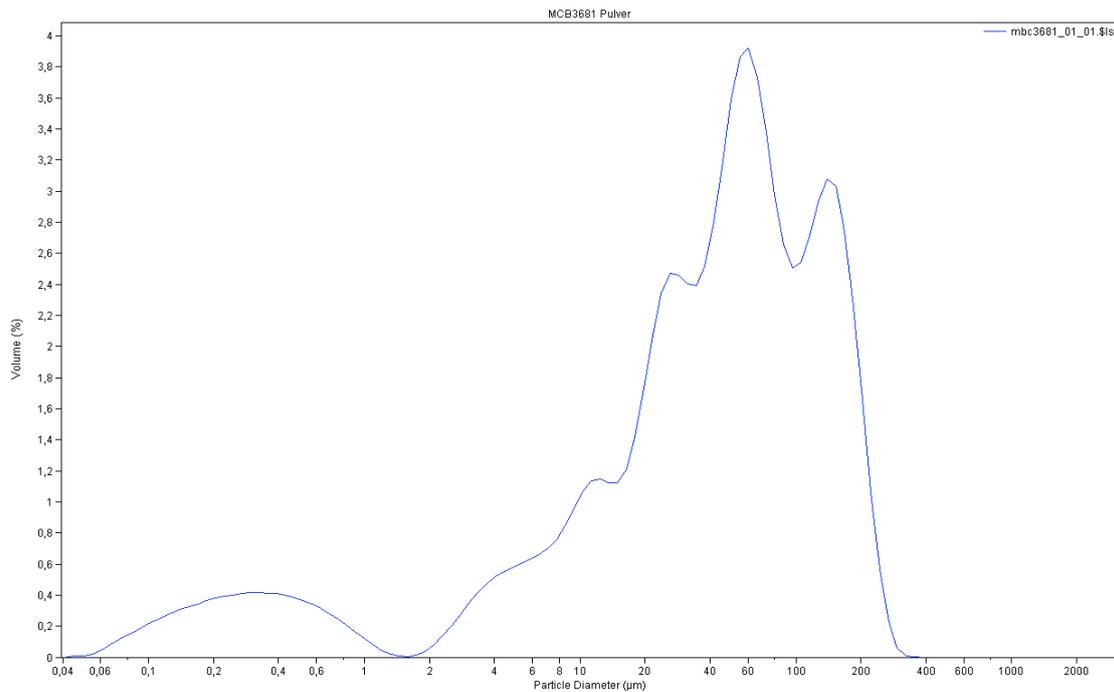
### 4.3 Forschungssubstanz JM2005

Bei der Forschungssubstanz JM2005 handelte es sich um eine Substanz aus der Arzneimittelforschung der Firma Morphochem. Sie lag als gelblich-weißes Pulver vor. Aus der Substanz JM2005 wurde mit Hilfe des SolEmuls<sup>®</sup>- Verfahrens versucht, eine i.v.-injizierbare Emulsion herzustellen. Die Herstellung erfolgte mittels eines Avestin B3 Homogenisators (Avestin Europe GmbH, Deutschland). Dieser Homogenisator ist dadurch gekennzeichnet, dass bereits sehr kleine Volumina (ab ca. 4 mL) verarbeitet werden können. Als Formulierungsbasis diente zunächst Lipovenös MCT 20%.

Als erstes wurde die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung des JM2005 Pulvers mittels Laserdiffraktometrie (LD) und Lichtmikroskopie bestimmt. Die folgenden Abbildungen und die folgende Tabelle (siehe Abbildungen 29 und 30 und Tabelle 13) zeigen die Ergebnisse dieser Vorversuche.



**Abb.29:** Forschungssubstanz JM2005 - lichtmikroskopische Aufnahmen, links: nicht polarisiertes Licht, rechts: polarisiertes Licht, beide 400 fache Vergrößerung



**Abb.30:** graphische Darstellung der Partikelgrößenverteilung (Volumenverteilung) Forschungssubstanz JM2005

Die Abszisse zeigt den Durchmesser der Partikel, während an der Ordinate das Volumen in % angetragen wurde.

**Tab.12:** Partikelgrößenverteilung (Volumenverteilung) Forschungssubstanz JM2005

LD 50%	47,28 µm
LD 90%	154,5 µm
LD 99%	231,5 µm
LD 100%	373,1 µm

Die Messungen der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung des unbehandelten pulverförmigen Ausgangsstoffs dienen der Ermittlung des Zerkleinerungsvermögens der angewendeten Homogenisationstechnologie.

Im weiteren Verlauf des Versuchsprogramms wurden die hergestellten Emulsionen an den Tagen 0, 1 und 7 mittels Laserdiffraktometrie, Photonenkorrelationsspektroskopie (sofern die Beschaffenheit der Emulsionen dies zuließ, d.h., dass die Teilchengröße innerhalb des messbaren Bereiches lag) und lichtmikroskopisch bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte in einem entsprechenden Kühlschrank, kontrolliert bei 8,0°C.

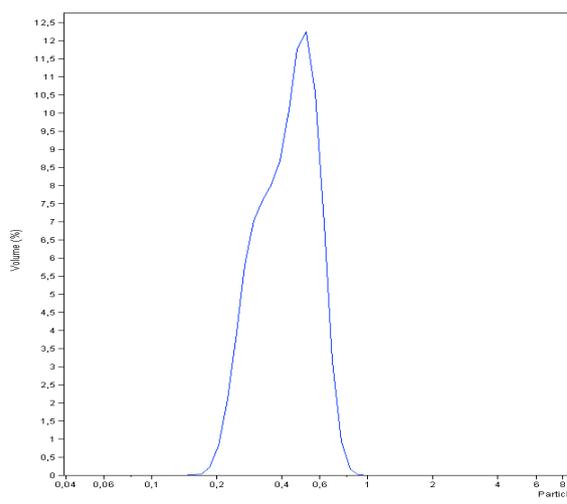
Bevor mit der Herstellung einer ersten JM2005 haltigen SolEmuls®- Formulierung be-

gonnen wurde, wurde zunächst der Formulierungsträger, die Lipovenös-MCT-20%-Emulsion mittels der anzuwendenden Homogenisationstechnologie behandelt. Dazu wurde die Emulsion zuerst 10 Minuten mit einem Ultra-Turrax bei 10.000 Umdrehungen behandelt. Anschließend wurde die Emulsion im Avestin B3 für 2 Zyklen bei 100kPa (circa 200bar) und für 20 Zyklen bei 700kPa (circa 1400bar) homogenisiert. Es wurden Proben nach Zyklus 0, 5, 10 und 20 genommen und mittels PCS und LD vermessen. Um eine mögliche Veränderung der Partikelgröße während einer Lagerung zu untersuchen, wurde selbige am Tag 1, Tag 7 und an Tag 28 bestimmt.

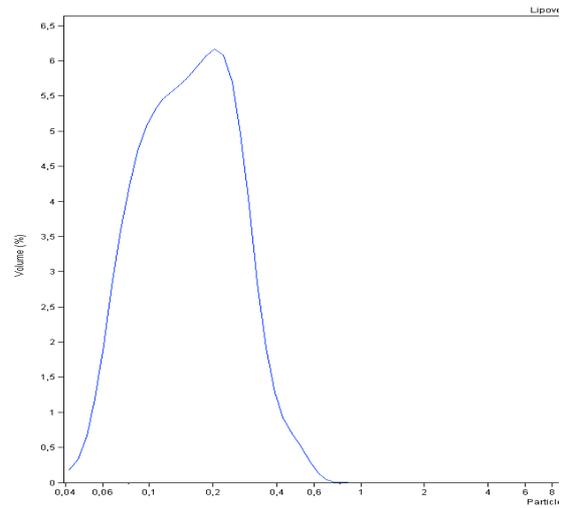
Die folgende Tabelle und die folgende Abbildung zeigen die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung dieser „Blanko-Formulierung“ (siehe Tabelle 14 und Abbildung 31).

**Tab.13:** Substanzfreie SolEmuls®- Formulierung, Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung mittels PCS und LD

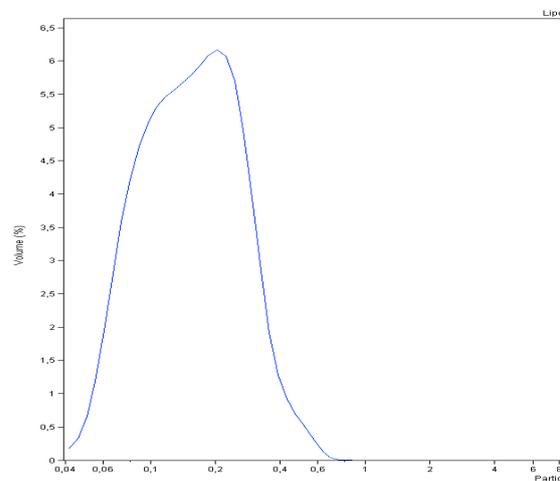
Charge	Empty I						
	Zyklus 0	Zyklus 5	Zyklus 10	Zyklus 20	Tag 1	Tag 7	Tag 28
PCS [nm]	295	218,3	205,5	210,6	211,2	174,2	176,4
PI	0,107	0131	0145	0,096	0,102	0,134	0,13
SAW PCS [nm]	5,5	4	4,4	2,9	2,8	2,6	4,7
SAW PI [nm]	0,039	0,048	0,049	0,053	0,052	0,032	0,053
LD 50% [nm]	439	156	132	60	-	121	116
LD 90% [nm]	613	302	288	243	-	215	214
LD 99% [nm]	735	540	472	376	-	299	298
LD 100% [nm]	953	868	827	721	-	452	452



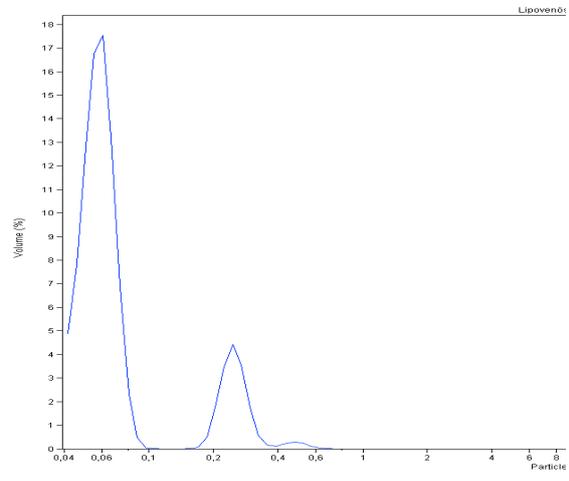
LD Zyklus 0



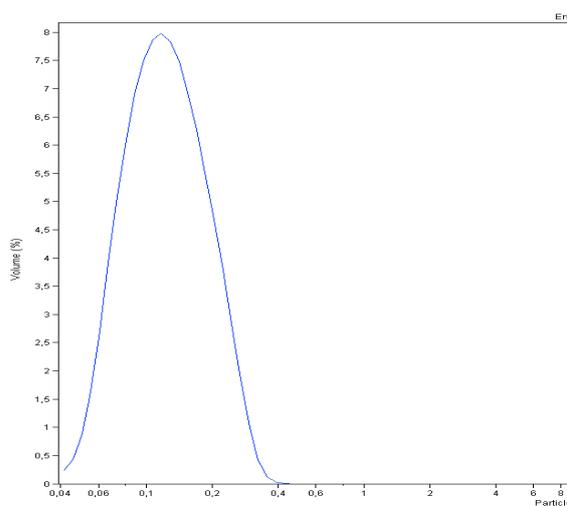
LD Zyklus 5



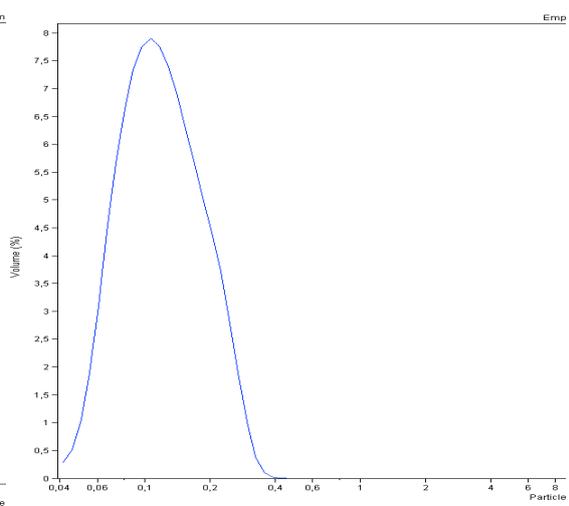
LD Zyklus 10



LD Zyklus 20



LD Tag 7



LD 4 Wochen

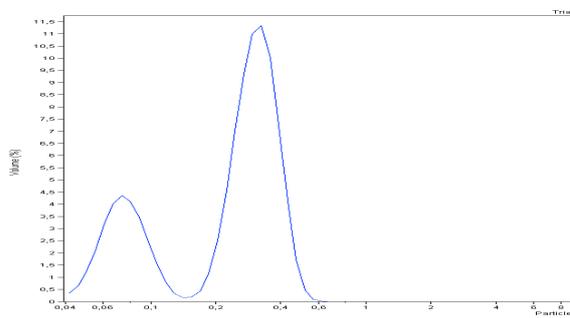
**Abb.31:** Veränderung der Partikelgrößenverteilung des Formulierungsträger über die Lagerzeit

Wie Abb. 31 zeigt, verändert sich weder die Partikelgröße noch die Partikelgrößenverteilung der homogenisierten Emulsion während der Lagerung.

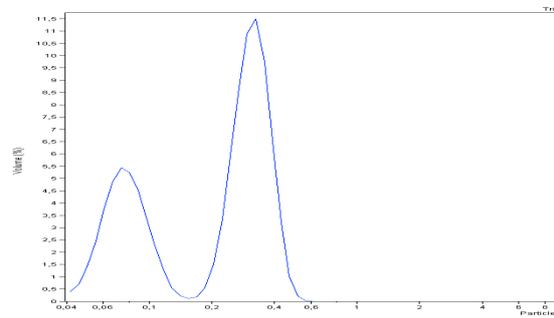
Als zweiter Versuch wurde eine JM2005-haltige Emulsion nach der gleichen Methode hergestellt wie bei der Blanko-Emulsion beschrieben. Die Substanz JM2005 wurde direkt zu Beginn des Herstellungsprozesses in einer solchen Menge unbehandelt zugegeben, dass eine finale Konzentration von 10mg/mL Emulsion erhalten wurde. Das finale Produkt war optisch einheitlich weiß. JM2005 war mit bloßem Auge nicht zu erkennen. Die folgenden Tabellen und die folgende Abbildung zeigen die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung dieser Formulierung (siehe Tabellen 15 und 16 und Abbildung 32).

**Tab.14:** JM2005-haltige Formulierung (10mg/mL): Einfluss der Lagerzeit, Vermessung mittels PCS

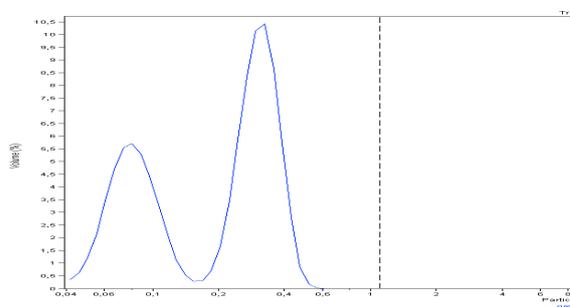
Versuch 2						
	Zyklus 5	Zyklus 10	Zyklus 20	Tag 1	Tag 7	Tag 28
PCS [nm]	271,5	245,8	246	248,8	242,2	246,4
PI	0,114	0,094	0,076	0,136	0,129	0,07
SAW PCS [nm]	6,7	5,9	2,7	6,3	7	5,1
SAW PI	0,037	0,06	0,047	0,061	0,083	0,044



LD Tag 0



LD Tag 7



LD 4 Wochen

**Abb.32:** Veränderung der Partikelgrößenverteilung JM2005-haltige Formulierung (10mg/mL), direkt homogenisiert, über die Lagerzeit

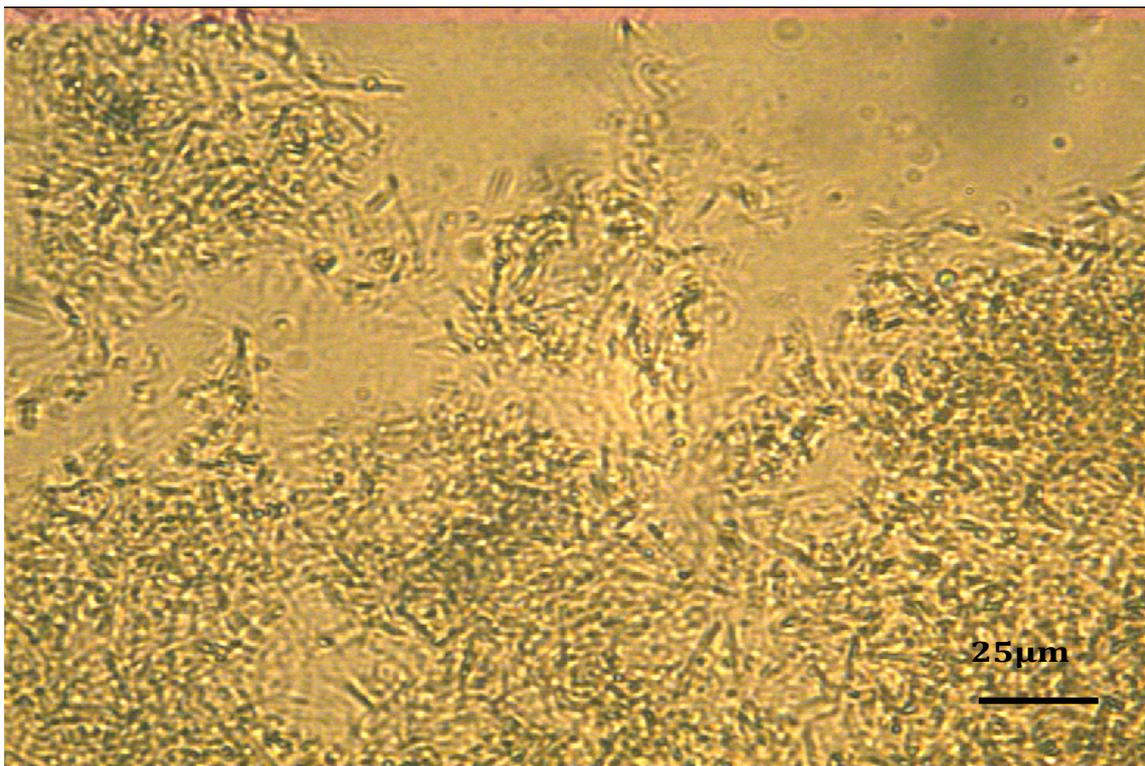
Die Partikelgrößenmessungen mit Hilfe des Laserdiffraktometers waren aufgrund zu ge-

ringer Streulichtaktivität nur bis zum Homogenisationszyklus 5 möglich.

**Tab.15:** Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige Formulierung (10mg/mL) – Einfluss Lagerzeit; Vermessung mittels LD (Probe: Zyklus 5)

	Tag 0	Tag 7	Tag 28
LD 50% [nm]	273	264	247
LD 90% [nm]	394	381	373
LD 99% [nm]	485	462	455
LD 100% [nm]	656	598	598

Legt man die Daten der Partikelgrößenbestimmungen mittels PCS und LD zugrunde, zeigt sich, dass sich die Partikelgröße im Verlauf der Lagerung nicht verändert. Auch die Partikelgrößenverteilung scheint konstant zu bleiben. Untersuchungen mit einem Lichtmikroskop ergaben aber, dass die Lagerprobe von Woche 4 deutlich, makroskopisch erkennbare Kristallstrukturen aufzeigte (siehe Abbildung 33).

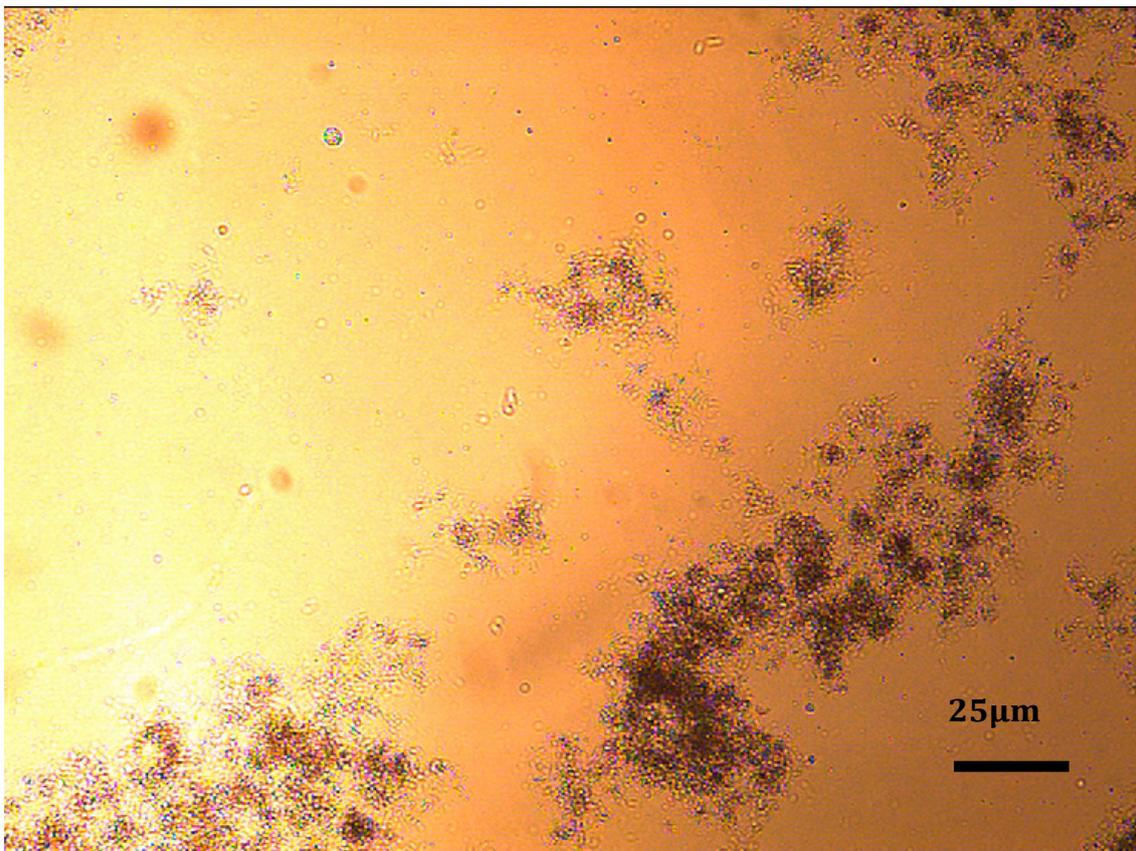


**Abb.33:** Lichtmikroskopische Aufnahme JM2005 haltige Formulierung (10mg/mL), direkt homogenisiert, nach Lagerzeit von 4 Wochen (400 fache Vergrößerung)

An diesem Beispiel trat der zuvor unter 3.2.3.2 beschriebene Effekt ein, dass vor allem die PCS ab einer bestimmten Partikelgröße nicht mehr zur Teilchengrößenbestimmung geeignet ist. Als Erklärung für diesen Effekt kommt bei diesem Beispiel eine schnelle Sedimentation der größeren Partikel in Betracht. Die Partikel verlassen dabei zu schnell

den Meßstrahl und werden somit auch nicht vermessen. Es ist also immer ratsam parallel zu den Vermessungen mit PCS oder LD lichtmikroskopische Aufnahmen durchzuführen.

Im dritten Versuch wurde getestet, ob sich JM2005 zu einer Nanosuspension formulieren lässt. Bei Erfolg sollte die erhaltene Nanosuspension in den Emulsionsträger eingearbeitet werden (Verfahrensweise analog zu AmB-haltiger Formulierung). Dazu wurden 90,4 mg JM2005 eingewogen und zu einer wässrigen Tensidlösung gegeben. Bei dem verwendeten Tensid handelte es sich um Polysorbat 80 (Tween 80). Die finale Suspension enthielt 30,0 mg/mL JM2005 und 0,2% Tween 80. Nach 10 minütiger Behandlung mittels Ultra-Turrax bei 10.000 U/min lag JM2005 zunächst optisch gleichmäßig verteilt vor. Es schlossen sich 2 Homogenisationszyklen bei 100kPa und danach 5 Zyklen bei 700kPa an. Eine sofortige Partikelgrößenmessung mittels LD war nicht möglich, da die Suspension im Probenraum des LD sofort ausflockte. Eine Erhöhung des Tween 80-Gehalts auf 2,0% und anschließender Homogenisation bei 500kPa für weitere 10 Zyklen brachte keine Veränderung im Partikelerscheinungsbild. Auch die Zugabe eines weiteren Tensids (Poloxamer 188) und anschließende Homogenisation änderte nichts an dem Erscheinungsbild der Suspension (siehe Abbildung 34).



**Abb.34:** Lichtmikroskopische Aufnahme JM2005-haltige Suspension (30mg/mL), 400 fache Vergrößerung

Der Ansatz, die Herstellung der JM2005 Formulierung analog der bei der AmB- und Itraconazol-Formulierung eingesetzten Verfahrensweise durchzuführen wurde daraufhin nicht weiter verfolgt.

In einem vierten Versuch wurde die gleiche Vorgehensweise der Emulsionsherstellung wie in Versuch 2 realisiert. Der Unterschied bestand aber in einer Erhöhung des JM2005-Gehalts auf 15,0 mg/mL. Nach 5 Homogenisationszyklen waren deutliche Sedimentationen von JM2005 zu erkennen, was durch eine Vermessung mit Hilfe des LD bestätigt werden konnte (siehe Tabelle 17).

**Tab.16:** Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige Formulierung (15mg/mL) Vermessung mittels LD (Probe: Zyklus 5)

LD 50% [nm]	322
LD 90% [nm]	479
LD 99% [nm]	1673
LD 100% [nm]	3205

Nach 20 Homogenisationszyklen lag eine einheitlich weiße Emulsion vor, welche allerdings während der Lagerung zum Partikelwachstum neigte (siehe Tabellen 18 und 19).

**Tab.17:** Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige Formulierung (15mg/mL) - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels LD (Probe: Zyklus 20)

	Tag 1	Tag 7	Tag 28
LD 50% [nm]	-	236	261
LD 90% [nm]	-	368	388
LD 99% [nm]	-	464	467
LD 100% [nm]	-	545	656

Eine Vermessung ab Tag 1 war aufgrund von Ausflockungen im Probenraum des LD nicht möglich.

**Tab.18:** Partikelgröße JM2005 haltige Formulierung (15mg/mL) - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels PCS

Versuch 4						
	Zyklus 5	Zyklus 10	Zyklus 20	Tag 1	Tag 7	Tag 28
PCS [nm]	267,4	242,7	259,6	251,9	251,8	261,5
PI	0,132	0,167	0,166	0,142	0,103	0,098
SAW PCS [nm]	4,1	4,9	5,6	6,3	4,8	4,8
SAW PI	0,049	0,047	0,065	0,069	0,065	0,47

(SAW = Standardabweichung)

Die Konzentration an JM2005 wurde in einem fünften Versuch auf 30 mg/mL erhöht. Dieser Versuch lief parallel zum vierten Versuch ab. Nach 20 Zyklen wurde eine einheitlich gelbliche Emulsion erhalten, die unmittelbar nach der Produktion nicht zur Sedimentation neigte. Die Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilungen sind in den folgenden Tabellen dargestellt (siehe Tabelle 20 und 21).

**Tab.19:** Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige Formulierung (30mg/mL) Vermessung mittels LD (Probe: Zyklus 5)

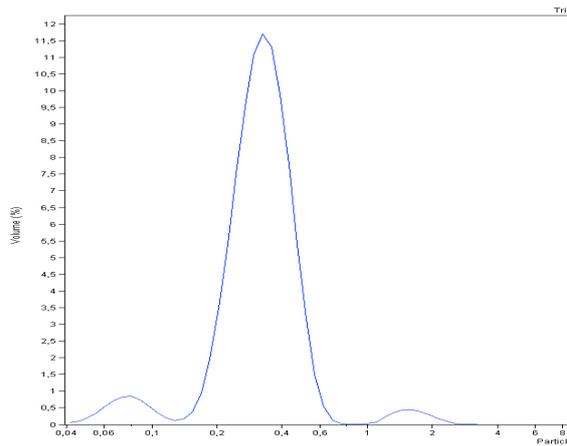
	Tag 0	Tag 7	4 Wochen
LD 50% [nm]	327	375	373
LD 90% [nm]	442	2235	2064
LD 99% [nm]	539	4961	4756
LD 100% [nm]	721	9818	8147

**Tab.20:** Partikelgröße JM2005 haltige Formulierung (30mg/mL) - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels PCS

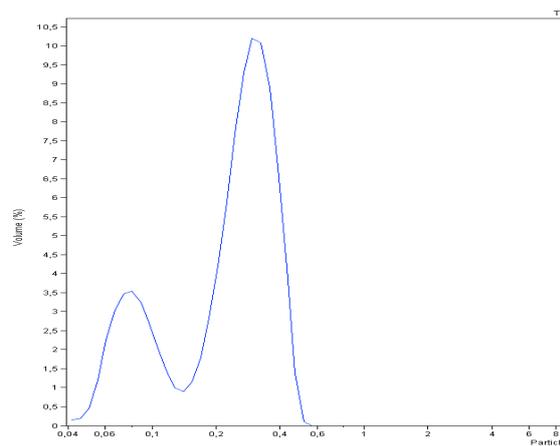
Charge	Versuch 5					
	Zyklus 5	Zyklus 10	Zyklus 20	Tag 1	Tag 7	4 Wochen
PCS [nm]	296,6	308,1	300,2	422,2	387,4	389,4
PI	0,188	0,0169	0,154	0,517	0,402	0,369
SAW PCS [nm]	4,4	6,2	7,4	25,1	37,4	9,3
SAW PI	0,036	0,052	0,061	0,027	0,164	0,049

(SAW = Standardabweichung)

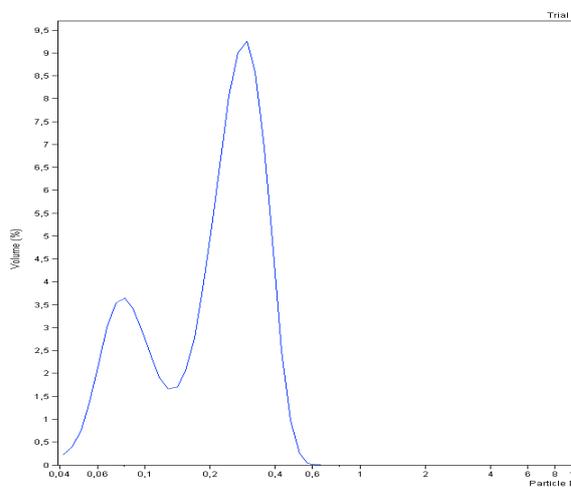
Die Abbildung 35 veranschaulicht die LD-Daten noch einmal in graphischer Form.



LD Tag 0



LD Tag 7



LD 4 Wochen

**Abb.35:** Veränderung der Partikelgrößenverteilung JM2005-haltige Formulierung (30mg/mL), direkt homogenisiert, über Lagerzeit

Der fünfte Versuch zeigte prinzipiell ähnliche Ergebnisse wie der vierte. Es war nicht möglich, die Konzentration an JM2005 so zu erhöhen, dass eine stabile Formulierung erhalten wurde.

Um diesen unbefriedigenden Zustand zu verbessern, wurde in einem sechsten und siebten Versuch der Formulierungsträger modifiziert. Die Konzentration an JM2005 wurde bei beiden Versuchen auf 15mg/mL eingestellt.

Im sechsten Versuch wurde der Lecithingehalt des Formulierungsträgers Lipovenös MCT 20% auf 10% erhöht und JM2005 wurde entsprechend der Verfahrensweise des zweiten Versuchs eingearbeitet. Nach 20 Homogenisationszyklen wurde eine homogene leicht gelbliche Emulsion erhalten. Diese Emulsion zeigte erst nach Tag 7 deutliche, unter dem

Mikroskop erkennbare Kristalle. Die folgenden Tabellen und Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmungen (siehe Tabellen 22 und 23 und Abbildung 36).

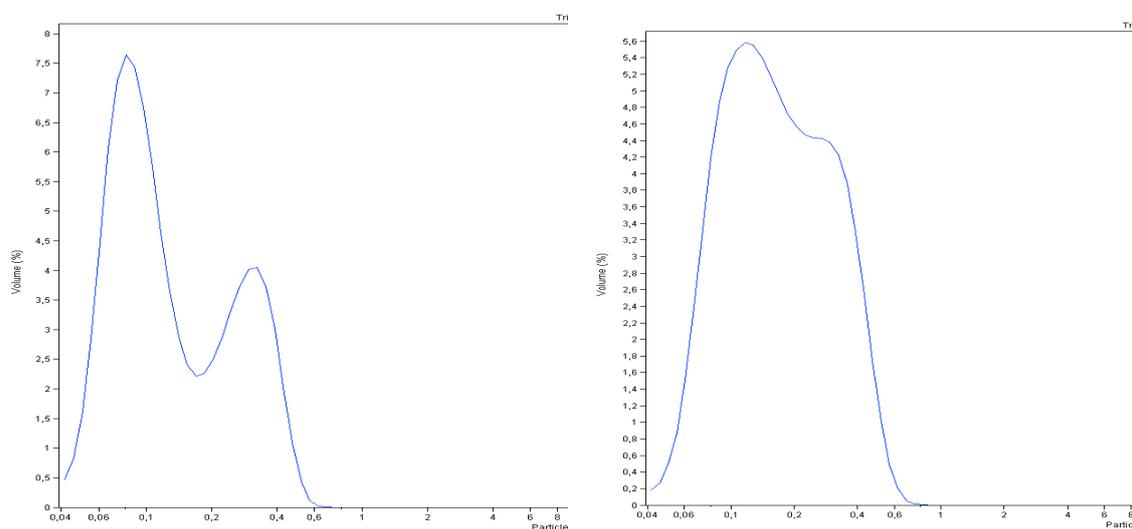
**Tab.21:** Partikelgröße JM2005-haltige Formulierung (15mg/mL) mit erhöhtem Lecithingehalt - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels PCS

Versuch 6				
	Tag 0	Tag 1	Tag 7	4 Wochen
PCS [nm]	223,6	218,8	219,2	236,8
PI	0,309	0,298	0,262	0,272
SAW PCS [nm]	4,5	6,4	5,9	4,3
Saw PI	0,062	0,046	0,038	0,061

**Tab.22:** Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005 haltige Formulierung (15mg/mL) mit erhöhtem Lecithingehalt, Vermessung mittels LD

		Tag 7	4 Wochen
LD 50% [nm]	-	110	160
LD 90% [nm]	-	346	369
LD 99% [nm]	-	479	532
LD 100% [nm]	-	721	868

Partikelgrößenmessungen mittels LD an den Tagen 0 und 7 waren aufgrund zu geringer Streulichtaktivität nicht möglich.



LD Tag 7

LD 4 Wochen

**Abb.36:** Veränderung der Partikelgrößenverteilung JM2005 haltige Formulierung (15mg/mL) mit erhöhtem Lecithingehalt, direkt homogenisiert, über Lagerzeit

Die Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen mit Hilfe der PCS und des LDs zeigen nur ein geringes Partikelwachstum über den Lagerzeitraum. Aber auch in diesem Fall konnte durch lichtmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass, wie bereits erwähnt, ab circa sieben Tagen Lagerzeit ein Kristallwachstum einsetzt.

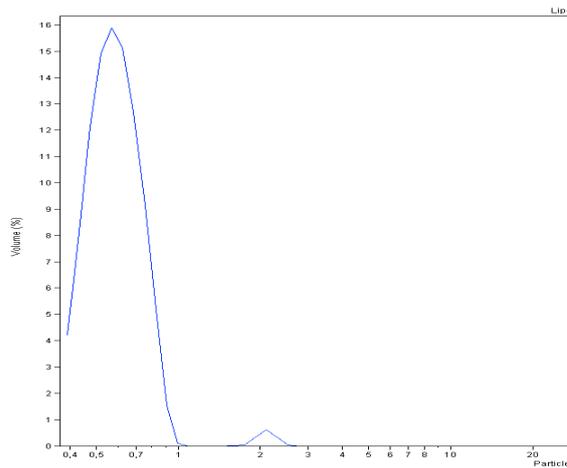
Im siebten und letzten Versuch aus dieser Versuchsreihe wurde ein gänzlich anderer Formulierungsträger benutzt. Dabei handelte es sich um Liposomen. Diese wurden aus Ei-Lecithin durch Rühren in Wasser mit Hilfe eines Ultra-Turrax und anschließender Homogenisation in einem LAB 40 bei 500bar hergestellt. Bei dieser Art der Liposomenherstellung bilden sich selbige spontan aus. Man erhält in der Regel multilaminare Liposomen [Schubert 1998]. Die dabei erhaltenen Liposomen wurden mit JM2005 auf eine Endkonzentration von 15mg/mL versetzt. Dabei ist auf Grund der schlechten Löslichkeit von JM2005 in Wasser davon auszugehen, dass sich JM2005 in die Liposomenmembran einlagert. Nach 20 Homogenisationszyklen zeigte sich das Produkt homogen und leicht gelblich. Bereits am Tag 1 nach der Herstellung waren allerdings deutlich unter dem Mikroskop erkennbare Kristalle vorhanden. Die folgende Tabellen und Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmungen.

**Tab.23:** Partikelgröße JM2005 haltige liposomale Formulierung (15mg/mL) - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels PCS

Versuch 7				
	Tag 0	Tag 1	Tag 7	4 Wochen
PCS [nm]	539,5	485,1	467,1	461,7
PI	0,379	0,393	0,403	0,399
SAW PCS [nm]	9,8	13,6	24,1	13,3
SAW PI	0,04	0,055	0,038	0,042

Auffallend war hier, wie auch bei den Versuchen 5 und 6 relativ hohe PI-Wert, welcher vor eine breite Partikelgrößenverteilung spricht. Dieses Ergebnis ließ sich auch durch die LD-Messungen (siehe vor allem die entsprechenden Abbildungen) bestätigen.

Zu Beginn der LD-Messungen wurden die leeren Liposomen ebenfalls vermessen (siehe Abbildung 37).



**Abb.37:** leere Liposomen zu Beginn der JM2005-Inkorporation

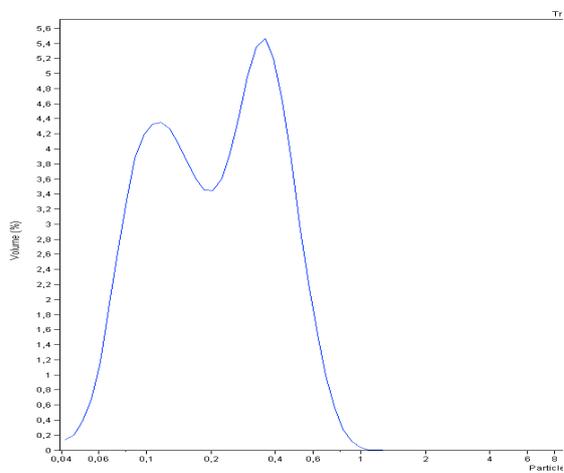
**Tab.24:** Partikelgrößen leere liposomale Formulierung, Vermessung mittels PCS

LD 50% [nm]	582
LD 90% [nm]	777
LD 99% [nm]	1995
LD 100% [nm]	2660

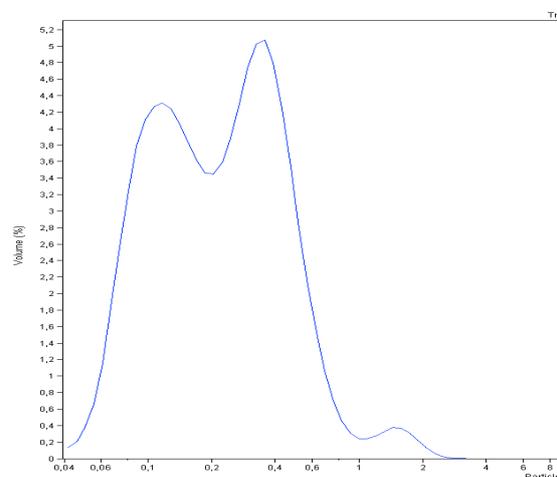
Im Folgenden werden die Partikelgrößendaten der beladenen Liposomen dargestellt.

**Tab.25:** Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige liposomale Formulierung (15mg/mL), Vermessung mittels LD

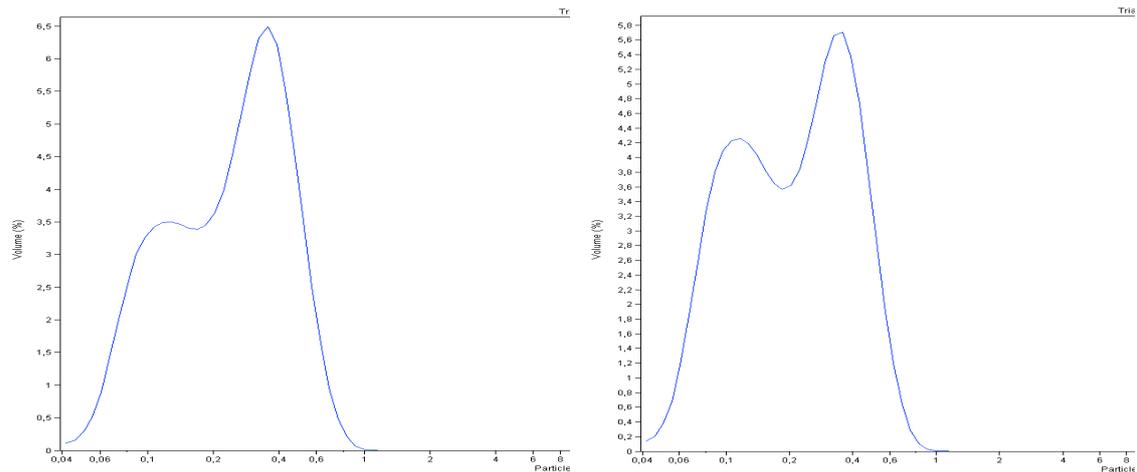
	Tag 0	Tag 1	Tag 7	4 Wochen
LD 50% [nm]	215	210	256	217
LD 90% [nm]	421	522	490	463
LD 99% [nm]	721	1557	705	661
LD 100% [nm]	1261	3205	1149	1149



LD Tag 0



LD Tag 1



LD Tag 7

LD 4 Wochen

**Abb.38:** Veränderung der Partikelgrößenverteilung JM2005 haltigen, liposomalen Formulierung (15mg/mL) über die Lagerzeit

Betrachtet man die Versuchsreihe in Gänze, lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Das SolEmuls<sup>®</sup>-Verfahren ist prinzipiell geeignet die Substanz JM2005 in eine Formulierung zu überführen, welche eine Gesamtpartikelgröße von unter 1µm aufweist.
- Der verwendete Formulierungsträger erlaubte im günstigsten Fall eine bis zu einer Woche stabile Formulierung bei einer JM2005 Konzentration von bis zu 15mg/mL.
- Die Versuche 6 und 7 zeigten im Bezug auf den Formulierungsträger mögliche Ansätze zur Optimierung desselbigen auf.

## 4.4 Langzeitstabilität von Lipofundin® über 18 Jahre

### 4.4.1 Einleitung

Industriell hergestellte parenterale Fettemulsionen sind in ihrer Laufzeit in der Regel auf 2 Jahre begrenzt [Schuhmann und Müller, 1994]. Im Gegensatz wird dazu bei anderen Infundibilia - wie zum Beispiel Glucose-Lösungen - eine Laufzeit von fünf Jahren garantiert. Gemäß Arzneibuch werden parenterale Fettemulsionen im Endbehältnis mit gespanntem Wasserdampf sterilisiert. Da sie das Primärpackmittel und die Sterilitätsanforderungen mit anderen Infundibilia gemein haben, kann auch bei parenteralen Fettemulsionen von einer ausreichenden Sterilität über mehrere Jahre ausgegangen werden. Die Ursachen für die deutlich verkürzte Lagerzeit von parenteralen Fettemulsionen muss also in der physikalischen oder chemischen Stabilität begründet sein.

Die Langzeitstabilität wurde an jeweils 3 Flaschen (um Chargenkonformität zu gewährleisten) von 2 Chargen einer 10%igen und einer 20%igen Fettemulsion über einen Zeitraum von 18 Jahren untersucht. Dabei wurden jeweils 3 Flaschen Lipofundin 10% der Chargen 551281A und 604581A sowie jeweils 3 Flaschen Lipofundin 20% der Chargen 604582A und 606182A untersucht. Während der üblichen Laufzeit von zwei Jahren wurden halbjährliche Messungen durchgeführt, anschließend wurde noch einmal nach 3 Jahren, 8 Jahren und 18 Jahren eine Untersuchung der Langzeitstabilität vorgenommen. Die Untersuchungen wurden bis einschließlich des 3 Jahreswertes von Heinemann publiziert [Heinemann, 1991; Müller und Heinemann, 1993; Müller et. al, 1992], die Ergebnisse nach 8 Jahren wurden von Schuhmann publiziert [Schuhmann, 1995].

### 4.4.2 Physikalische Stabilität

Die Teilchengröße der Hauptpopulation wurde hinsichtlich der physikalischen Stabilität mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und die Teilchengrößenverteilung mittels Laserdiffraktometrie bestimmt. Die Frage nach größeren Teilchen, die eine intravenöse Gabe aufgrund der möglichen Blockade von Blutkapillaren verhindern könnten, wurde nach 8-jähriger Lagerung mittels Coulter-Counter Analytik durchgeführt (Ergebnisse siehe [Schuhmann, 1995]). Darüberhinaus wurde außerdem das Zetapotential mittels Laser-Doppler-Anemometrie untersucht.

#### 4.4.2.1 Untersuchung der Teilchengröße mittels PCS

Die Vermessung der parenteralen Fettemulsionen wurde mittels unterschiedlicher Verfahren durchgeführt. Dies liegt vor allen Dingen darin begründet, dass die Untersuchungen sich über einen Zeitraum von 18 Jahren hinzog und die verwandten Meßgeräte und Methoden in der Zwischenzeit verbessert bzw. verändert wurden. Gleichwohl kann aber aus den Erfahrungen der Vergangenheit davon ausgegangen werden, dass die Meßergebnisse vergleichbar sind.

Bis zum Wert nach 24 Monaten Lagerung wurde ein Malvern Spectrometer RR102 und ein 4-bit Malvern K7025 Korrelator verwandt [Heinemann, 1991]. Der Wert nach 36 monatiger Lagerung wurde mit dem selben Gerätetyp, allerdings mit dem verbesserten 4-bit ALV-Korrelator ermittelt [Heinemann, 1993]. Zur Bestimmung der Werte nach 96 [Schumann, 1995] bzw. 216 Monaten kam ein Malvern Zetasizer 4 mit einem 8-bit Malvern 7032N/72C Korrelator zum Einsatz.

Die Emulsionen wurden dabei gemäß Kapitel 3.2.3.2 vermessen. Jede, der von den beiden zu untersuchenden Chargen eingelagerten drei Flaschen der Fettemulsion wurde dabei bis einschließlich des 36 Monatswertes nach der „Two-Time-Window-Analyse“ mit einer Taktzeit von jeweils 25  $\mu$ s bzw. 100  $\mu$ s vermessen, dabei ergaben sich jeweils 30 Messungen je Meßzeitpunkt und Charge. Die Meßzeitpunkte für den Wert nach 96 und 216 Monaten wurden vom Gerät automatisch selektiert, da gezeigt werden konnte, dass die Wahl der Taktzeit in sinnvollen Grenzen beim Zetasizer keinen Einfluß auf den gemessenen mittleren Teilchendurchmesser und den PI haben [Schuhmann, 1995]. Die Anzahl der Meßwerte je Meßzeitpunkt blieb unverändert. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit, der nach mittels verschiedener Verfahren (Two-Time-Window-Analyse und vorgegebene Taktzeit) und mittels verschiedener Geräte ermittelten Daten für 12, 24 und 36 Monate bzw. 96 Monate sei an dieser Stelle auf Schuhmann [Schuhmann, 1995] verwiesen. Zur weiteren Verwendung der Daten wurde zur Vereinfachung der Mittelwert aus den Werten der Two-Time-Window-Analyse nach 25 $\mu$ s und 100  $\mu$ s verwandt.

**Tab.26:** Durchschnittlicher Polydispersitätsindex der vermessenen 10%igen Fettemulsionen nach Lagerung von 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten im Vergleich

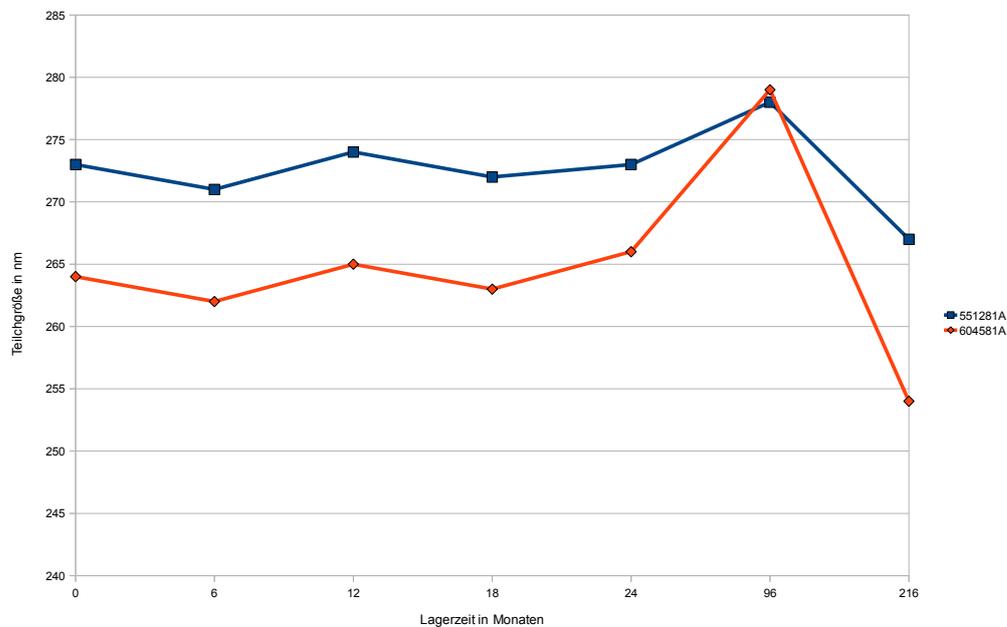
Charge	Lagerzeit in Monaten						
	0	6	12	18	24	96	216
551281A	0,119	0,088	0,104	0,103	0,104	0,12	0,082
604581A	0,119	0,096	0,098	0,098	0,109	0,11	0,049

**Tab.27:** Durchschnittlicher Polydispersitätsindex der vermessenen 20%igen Fettemulsionen nach Lagerung von 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten im Vergleich

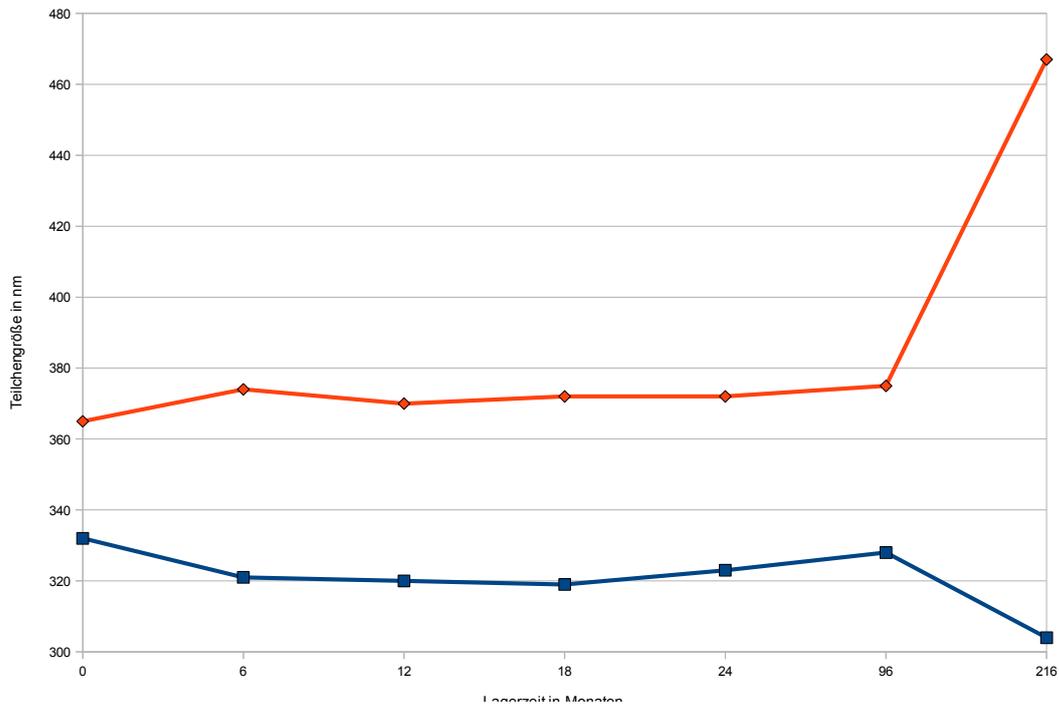
	Lagerzeit in Monaten						
Charge	0	6	12	18	24	96	216
604582A	0,136	0,136	0,126	0,130	0,143	0,143	0,115
606182A	0,212	0,180	0,181	0,183	0,184	0,186	0,145

**Tab.28:** PCS-Meßdaten (mittlerer Durchmesser in nm) der Chargen der 10%igen Fettemulsion nach einer Lagerzeit von 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten

	Lagerzeit in Monaten						
Charge	0	6	12	18	24	96	216
551281A	273	271	274	272	273	278	267
604581A	264	262	265	263	266	279	254

**Abb.39:** Veränderung der PCS-Meßdaten (mittlerer Durchmesser in nm) der Chargen der 10%igen Fettemulsionen über die Lagerzeit (Meßpunkte bei 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten)**Tab.29:** PCS-Meßdaten (mittlerer Durchmesser in nm) der Chargen der 20%igen Fettemulsion nach einer Lagerzeit von 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten

	Lagerzeit in Monaten						
Charge	0	6	12	18	24	96	216
604582A	332	321	320	319	323	328	304
606182A	365	374	370	372	372	375	467



**Abb.40:** Veränderung der PCS-Meßdaten (mittlerer Durchmesser in nm) der Chargen der 20%igen Fettemulsionen über die Lagerzeit (Meßpunkte bei 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten)

Betrachtet man die Veränderungen, die sich über die gesamte Lagerzeit ergeben, so kommt man nach einer Gesamtlagerzeit von 216 Monaten zu dem Ergebnis (vergl. Tabelle 27 - 30), dass sich sowohl der Polidispersitätsindex, als auch der mittlere Teilchendurchmesser nicht wesentlich verändert haben (vergl. Abbildungen 39 und 40). Hinsichtlich der Veränderung des PI kann bei allen vorliegenden Proben noch von einer Monodispersität ausgegangen werden kann. Die Teilchendurchmesser liegen ebenfalls noch in einem als akzeptabel (da unter 1  $\mu\text{m}$  gelegen) zu bezeichnenden Bereich.

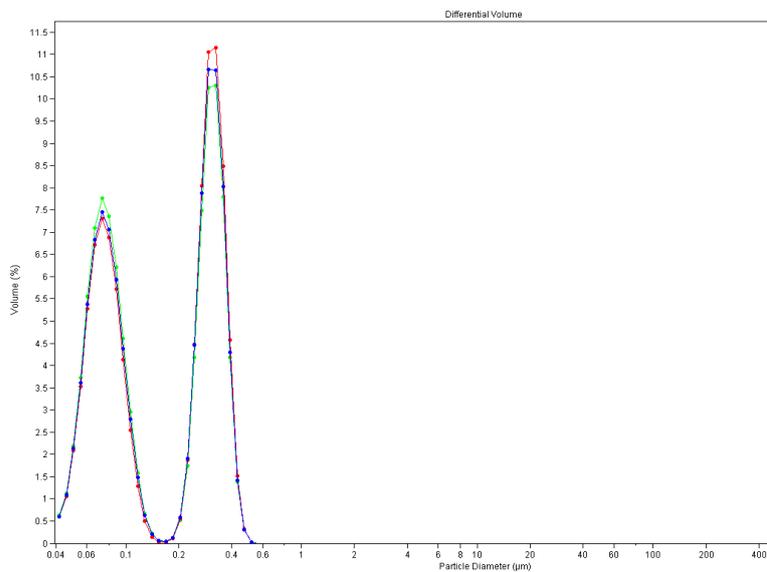
#### 4.4.2.2 Untersuchung der Teilchengröße mittels LD

Auch die Vermessung der gelagerten Proben mittels Laserdiffraktometrie wurde, bedingt durch die lange Lagerzeit, mittels verschiedener Geräte und daraus folgend mittels verschiedener Auswertungen der Meßwerte, ermittelt. Die Bestimmung bis einschließlich des 24-Monatswertes wurde mit einem Particle Sizer 2600 (Malvern Instruments, England) in einem Meßbereich von 0,5  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Zu beachten ist bei diesem Instrument, dass die detektierbare Teilchengrößenverteilung der untersuchten Fettemulsionen nur durch relativ wenige Datenpunkte charakterisiert wird, da beispielsweise im Bereich von 0,5  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$  trotz einer logarithmischen Skalierung nur in 5 Größenklassen unterteilt wird. Bei der Vermessung von Fettemulsionen wird die Hauptpopulation der Teilchen im Bereich unter 4  $\mu\text{m}$  erwartet, womit der Particle Sizer 2600 zur Untersuchung von parenteralen Fettemulsionen vergleichsweise ungeeignet ist. Gleichwiewohl wurde unter Berücksichtigung von Schwankungen der Meßwerte keine Veränderungen der Meßwerte in den ersten 24 Monaten beobachtet [Heinemann, 1991].

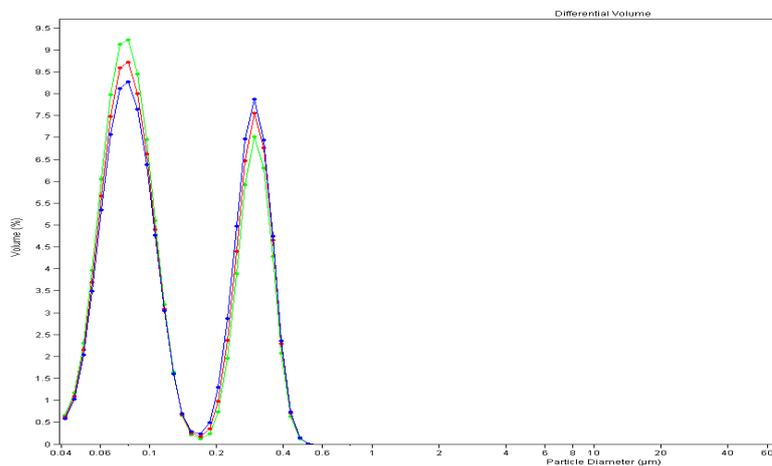
Im Anschluß an die 2-jährige Lagerung wurde die Vermessung der Chargen mit dem MasterSizer (Malvern Instruments, England) fortgesetzt. Es wurde dabei eine Linse mit der Brennweite von 45 mm und dem sich daraus ergebenden Meßbereich von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 80  $\mu\text{m}$  verwandt. Nach 96 Monaten wurde dann das Nachfolgemodell (MasterSizer E) genutzt. Abweichend davon wurden die Meßwerte nach einer Lagerung nach 36 Monaten zusätzlich mit einem HELOS Partikelgrößenanalysator (Sympatec, Deutschland) erhoben, dieser nutzte eine Linse mit einer Brennweite von 20 mm, aus der sich eine untere Erfassungsgrenze von 0,1  $\mu\text{m}$  ergibt. Die Auswertungen des HELOS können jedoch im Gegensatz zu den MasterSizer-Geräten nur nach der Fraunhofer-Theorie ausgewertet werden, nicht jedoch nach der Mie-Theorie [Bosquillon et. al., 2001; Shekunov et. al., 2007].

Hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Auswertungen und den direkten Auswirkungen auf die hier untersuchten Chargen sei auf Schuhmann verwiesen [Schuhmann, 1995].

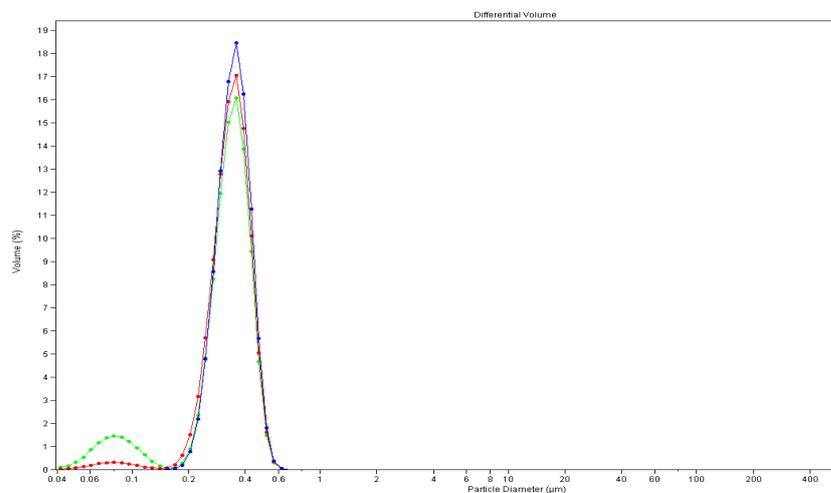
Die Meßwerte nach einer Lagerung von 216 Monaten wurden mittels eines LS230 der Firma Coulter Electronics GmbH (Krefeld, Deutschland) ermittelt und nach der Mie Theorie ausgewertet. Direkt verglichen wurden dabei die entsprechenden Messungen nach 96 monatiger und 216 monatiger Lagerung. Für die Veränderungen der Teilchengrößenverteilung in den Monaten 0 bis 96 sei auf Schuhmann [Schuhmann, 1995] verwiesen.



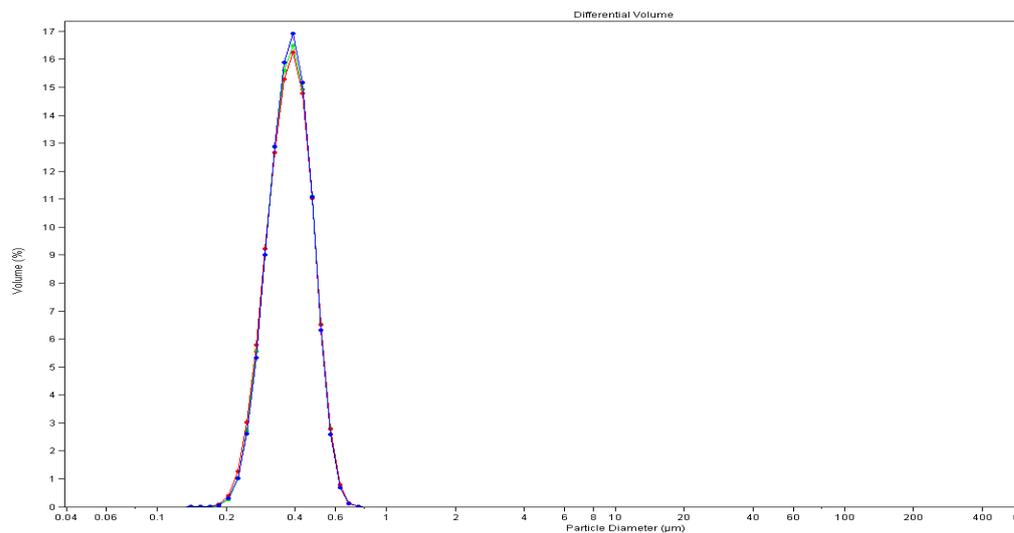
**Abb.41:** Volumenverteilung einer 10%igen Fettemulsion (Charge 551281A, jeweils 3 Proben) nach einer Lagerung von 216 Monaten (LS230, Auswertung nach Mie-Theorie)



**Abb.42:** Volumenverteilung einer 10%igen Fettemulsion (Charge 604581A , jeweils 3 Proben) nach einer Lagerung von 216 Monaten (LS230, Auswertung nach Mie-Theorie)



**Abb.43:** Volumenverteilung einer 20%igen Fettemulsion (Charge 604582A , jeweils 3 Proben) nach einer Lagerung von 216 Monaten (LS230, Auswertung nach Mie-Theorie)



**Abb.44:** Volumenverteilung einer 20%igen Fettemulsion (Charge 606182A, jeweils 3 Proben) nach einer Lagerung von 216 Monaten (LS230, Auswertung nach Mie-Theorie)

Vergleicht man jeweils die Volumenverteilungen der jeweils 10 und 20%igen Fettemulsionen (vergl. Abbildungen 41 bis 44), so unterscheiden sich diese nicht signifikant und es kann gesagt werden, dass der Großteil der betrachteten Teilchen innerhalb der Fettemulsionen sich unter einer kritischen Größe von 1 µm befindet. Die vorliegenden Messungen ergeben keine Hinweise auf das Vorhandensein größerer Teilchen.

#### 4.4.2.3 Untersuchung des Zetapotentials

Auch zur Bestimmung des Zetapotentials wurden, bedingt durch die lange Lagerzeit verschiedene Meßgeräte verwandt. Allerdings alle Geräte des Typs ZetaSizer (Malvern Instruments, England) die sich nur in ihrer Generation unterschieden. Für die Meßwerte von 0 bis 24 Monaten kam ein ZetaSizer II, ab 36 Monate ein ZetaSizer III und ab 96 Monaten ein ZetaSizer 4 zum Einsatz. Jede Probe der Charge wurde dabei fünfmal vermessen.

Zu berücksichtigen ist ebenfalls, dass die Bestimmung des Zetapotentials jeweils unter verschiedenen Meßbedingungen durchgeführt wurde, also der jeweilige pH-Wert und die Leitfähigkeit des jeweiligen Meßmediums unterschiedlich sind. So wurde beispielsweise zur Bestimmung der 0-Monatswerte lediglich mit destilliertem Wasser der pH-Werts 4,5 bis 6 verdünnt, die Leitfähigkeit blieb unbeachtet. Zur Bestimmung der Werte nach 36 Monaten wurde destilliertes Wasser, eingestellt auf einen pH-Wert zwischen 4,5 und 6 und eine Leitfähigkeit von 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , zur Verdünnung verwandt. Allerdings wurde während der Messungen kein konstanter pH-Wert eingestellt.

Die Untersuchung von Lucks et. al. hinsichtlich der Problematik der Leitfähigkeit und des pH-Wertes bei der Bestimmung des Zetapotentials [Lucks et. al., 1990; Lucks, 1993] führten zur Verwendung von standardisierten Meßlösungen bei der Bestimmung des Zetapotentials nach 96-monatiger und 216-monatiger Lagerung. Alle Meßlösungen wurde auf einen Leitfähigkeit von 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  mittels Natriumchloridlösung eingestellt. Da der pH-Wert durchgängig bei ca. 6,5 lag, wurde auf eine weitere Einstellung verzichtet.

**Tab.30:** Zetapotentiale (in mV) der 10%igen Fettemulsionen nach einer Lagerung von 0, 6, 12, 24, 96 und 216 Monaten im Vergleich

Charge	Lagerzeit in Monaten					
	0	6	12	24	96	216
551281A	-48,7	-54,8	-58,1	-47,7	-48,2	-46,1
604581A	-46,1	-51,8	-62	-46,2	-47	-45,3

**Tab.31:** Zetapotentiale (in mV) der 20%igen Fettemulsionen nach einer Lagerung von 0, 6, 12, 24, 96 und 216 Monaten im Vergleich

Charge	Lagerzeit in Monaten					
	0	6	12	24	96	216
604582A	-46,4	-51,1	-58,8	-47,9	-51	-50,2
606182A	-46,6	-48,0	-60,2	-48,4	-49	-47,4

Durch die unterschiedlichen Meßmedien unterscheiden sich die ermittelten Werte des Zetapotentials deutlich, es ist allerdings klar ersichtlich, dass auch nach einer Lagerzeit von 216 Monaten das Zetapotential immer noch über einem betragsmäßigen Wert von 40 mV liegt, und damit von einer stabilen Emulsion ausgegangen werden kann (vergl. Tabellen 31 und 32).

#### 4.4.3 Chemische Stabilität

Zur genauen Untersuchung der chemischen Stabilität wurde nach 216 Monaten der pH-Wert, die Säurezahl (SZ), die Peroxidzahl (POZ) und der Gehalt an freien Fettsäuren bestimmt. Der Gehalt freier Fettsäuren ist ein direkter Hinweis auf die Toxizität lange gelagerter parenteraler Fettemulsionen [Hakansson, 1966]. Peroxide konnten analog den Ergebnissen von Schuhmann [Schuhmann, 1995] in keiner der gelagerten Chargen nachgewiesen werden. In Tabelle 33 sind die jeweiligen Meßwerte der Säurezahl und des pH-Wertes nach 96 bzw. 216 monatiger Lagerung dargestellt.

**Tab.32:** pH-Wert und Säurezahl (SZ) der untersuchten Emulsionen nach einer Lagerung von 96 bzw. 216 Monaten und die jeweilige Veränderung

Charge	96 Monate		216 Monate		Differenz 96 zu 216	
	pH	SZ	pH	SZ	pH	SZ
551281A	5,4	1,65	4,8	2,3	0,6	0,65
604581A	5,3	1,82	4,9	2,1	0,4	2,8
604582A	5,6	1,34	5,1	2,1	0,5	0,76
606182A	5,4	1,53	5	2,4	0,4	0,87

**Tab.33:** Gehalt freier Fettsäuren (in mmol/L) nach einer Lagerung von 96 bzw. 216 Monaten bei Raumtemperatur

Charge	Lagerzeit in Monaten	
	96	216
551281A	14	33
604581A	23	37
604582A	25	41
606182A	27	51,5

Zusätzlich liegen für die Lipofundin Chargen die Meßwerte für pH-Wert und Säurezahl nach 0 und 24 Monaten vor. Die Veränderung dieser beiden Parameter korrelieren gut miteinander (vergl. Schuhmann). Die Erniedrigung des pH-Wertes während der Lagerung beruht auf einer temperaturabhängigen Entstehung von zusätzlichen freien Fettsäuren, welche die entsprechende Säurezahl erhöhen [Boberg und Hakansson, 1964; Hakansson, 1966; Washington und Davis, 1987 ].

Der Gehalt an freien Fettsäuren wurde leider nur nach 96 und nach 216 Monaten bestimmt. Ausgehend von den Qualitätsanforderungen an die Herstellung von parenteralen Fettemulsionen kann aber unmittelbar nach der Herstellung von einem sehr geringen Gehalt an freien Fettsäuren ausgegangen werden [Hakansson, 1966; Sommermeyer, 1986]. Nach Boberg und Hakansson wurde für Intralipid 10% eine nahezu lineare Zunahme der freien Fettsäuren von jährlich ca. 3,5 mmol/l bei 20°C über einen Zeitraum von 2 Jahren gefunden [Boberg und Hakansson, 1964]. Legt man nun eine lineare Zunahme zugrunde, dann erwartet man nach 8 Jahren einen Wert von ca. 28 mmol/L und nach 18 Jahren einen Wert von ca. 45,5 mmol/L. Damit liegt man auch in einem Größenbereich der entsprechend gefunden wurde (14 bis 32 mmol/L nach 8 Jahren und 32,5 bis 51,5 mmol/L nach 18 Jahren) (siehe Tabelle 34).

Der Toxizität überlegter bzw. lange gelagerter Fettemulsionen liegt der Gehalt an freien Fettsäuren zugrunde [Boberg und Hakansson, 1964]. In Experimenten mit weißen Kaninchen wurde die akute Toxizität untersucht. Diesen wurde jeweils 8 ml Fettemulsion pro kg Körpergewicht intravenös appliziert, was der täglichen Dosis bei Menschen entspricht. Die Hälfte der Tiere überlebte einen Gehalt von freien Fettsäuren von 26 mmol/l nicht ( $LD_{50}$ ). Unterhalb einer Konzentration von 15 mmol/l war die Sterblichkeit gleich Null. Die untersuchten Fettemulsionen kommen aufgrund des hohen Gehaltes von freien Fettsäuren für eine Infusion nicht mehr in Betracht. Gleichwohl könnte man sie als Arzneistoffträger für Injektionen verwenden, da dabei nur eine geringe Menge von wenigen ml appliziert wird und diese rasch durch das Blut verdünnt werden und somit eine möglicherweise gefährliche Konzentration an freien Fettsäuren rasch abgebaut wird. Da es sich um einen temperaturabhängigen Prozeß handelt, empfiehlt sich die Lagerung der Emulsionen bei niedrigeren Temperaturen.

#### 4.4.4 Zusammenfassung

Die industriell hergestellten parenteralen Fettemulsionen zeigen eine sehr gute physikalische Stabilität. Innerhalb des über 216 Monate gehenden Beobachtungszeitraums konnten keine signifikanten Veränderungen der Teilchengrößenverteilung beobachtet werden. Nach 8 Jahren wäre sogar noch eine parenterale Applikation möglich gewesen (vergl. Ergebnisse [Schumann, 1995]). Auch die Zetapotentiale zeigen eine ausreichend hohe elektrostatische Stabilität, die über die gesamte Lagerzeit erhalten blieb, obwohl die einzelnen Meßwerte aufgrund verschiedener Meßgeräte bzw. Meßparameter untereinander nicht vergleichbar waren.

Chemisch betrachtet ist die Stabilität der untersuchten Emulsionen nur begrenzt. Nach 96 bzw. 216 Monaten stieg der Gehalt an freien Fettsäuren nahezu linear an, so daß die Verwendung zur Infusion aufgrund der damit einhergehenden Toxizität nicht mehr möglich ist. Unabhängig davon ist die Verwendung als Arzneistoffträger für die Injektionstherapie durchaus noch denkbar. Die chemische Stabilität kann durch eine Lagerung bei niedrigeren Temperaturen noch verlängert werden.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Abstract

The goal of this dissertation to enhance the solubility of various poorly water soluble drugs and this enhancing the bioavailability through utilization of the SolEmuls®-technology has been achieved. It could be proven, that the SolEmuls®-technology is suited to transform a range of poorly water soluble drugs into biologically active and sufficiently long-term stable formulations. The advantages of the SolEmuls®-technology became obvious: easy formulation process, cost effective technology and easy scaling up ability. Apart from that, this work also showed the good usability for parenteral fat emulsions as drugcarriers, because of their extreme long-term stability (18 years). Even after a storage period of 18 years, the emulsions were still in general stable and of the appropriate particlesize. Although some of the emulsions showed signs of flocculation or sedimentation, which on the other hand could be easily taken out of the equation by filtering the emulsion, leaving a product still in the desired particle size range. Though the emulsions were no longer suitable for parenteral nutrition purposes, they remained well suited for use as drug carriers.

## 5.2 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe der SolEmuls®-Technologie die Löslichkeit und damit auch die Bioverfügbarkeit von verschiedenen in Wasser schwer löslichen Modellarzneistoffen zu erhöhen wurde erreicht. Es konnte der Beweis erbracht werden, dass sich die SolEmuls®-Technologie dazu eignet, verschiedene in Wasser schwer lösliche Substanzen in biologisch aktive und hinreichend langzeitstabile Formulierungen zu überführen. Dabei zeigte die SolEmuls®-Technologie ihre offensichtlichen Stärken, einfacher Herstellprozess, kostengünstiges Verfahren und leichte scaling up Möglichkeit. Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit auch die prinzipielle Eignung von parenteralen Fettemulsionen noch einmal unterstrichen werden, da deren Lagerstabilität auch über extrem lange Zeiträume bestehen bleibt. Selbst nach 18 Jahren und abgesehen von makroskopisch teilweise wahrnehmbarer Aufrahmung zeigten die untersuchten Emulsionen immer noch eine passende Teilchengrößenverteilung. Diese Effekte konnten jedoch einfach durch Filtration beseitigt werden, nach der immernoch ein Produkt mit der geforderten Teilchengröße vorlag. Die beobachteten physikalischen Effekte auf die untersuchten Emulsionen führten zwar zu einem nicht länger für die parenterale Ernährungen geeigneten Produkt, ungeachtet dessen waren die Emulsionen immer noch grundsätzlich zur Verwendung als Arzneiträger geeignet.

## 6. Ausblick

Die SolEmuls<sup>®</sup>-Technologie zeigt in allen bisherigen Untersuchungen stets positive Eigenschaften hinsichtlich universeller Verwendbarkeit zur Lösungsverbesserung von schwer wasserlöslichen Substanzen und damit zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit. Außerdem stellt sie ein kostengünstiges Verfahren dar, mit dessen Hilfe auch leicht ein Scaling-Up durchgeführt werden kann. In der Zukunft sollte die universelle Anwendbarkeit dieser Technologie noch mit weiteren, ausgesuchten Arzneistoffen belegt werden. Außerdem ist auch die Betrachtung anderer Matrices interessant, bzw. die Verwendung individuell hergestellter Fettemulsionen, die die Möglichkeit bieten die Zusammensetzung der Lecithinschicht individuell verschieden zu gestalten und so weitere Untersuchungen zur genauen Art der Einlagerung des Arzneistoffes in die Lecithinschicht durchzuführen.

Für zukünftige Untersuchungen ist sicherlich auch die weitere Beobachtung der Langzeitstabilität der hier bereits nach 8 Jahren untersuchten Emulsionen. Da diese auch nach über 18 Jahren noch im Wesentlichen über die Ausgangseigenschaften verfügten, die sie für die Nutzung als Arzneistoffträger interessant machen. Die untersuchten Emulsionen sind aufgrund chemischer Instabilitäten nicht mehr zur Verwendung als parenterale Ernährung geeignet, können aber gleichwohl weiter als Arzneiträger genutzt werden, woraus sich ein Interesse für die Stabilität nach 20 bzw. 25 Jahren Lagerung ergibt.

Ein weiterer Ansatz, den sich zu verfolgen lohnt, wäre die Untersuchung der Langzeitstabilität von Wirkstoff beladenen Emulsionen über 5 bzw. 10 Jahre, um die Eigenschaften von durch die SolEmuls<sup>®</sup>-Technologie hergestellte Formulierungen noch weiter zu spezifizieren. Dabei ist auch die Durchführung weiterer Arrhenius-Tests mit den Wirkstoffen Itraconazol und Amphotericin B interessant.

Interessant ist ebenfalls die Untersuchung der Autoklavierstabilität von SolEmuls<sup>®</sup>-Formulierungen über einen längeren Zeitraum hinweg, um auch hier noch weitere Grundlagenforschung zu schaffen.

## 7. Literaturverzeichnis

Anger, S. Field-Flow Fractionation: Basic Theory, Instrument Design and Pharmaceutical Applications Dissertationen Pharmazeutische Technologie. Berlin, Freie Universität (2005)

Akkar, A., Müller, R.H., Formulation of intravenous Carbamazepine emulsions by SolEmuls Technology. Eur J Pharm Biopharm 55:305-12 (2003a)

Akkar, A., Müller, R.H., Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls technology. Eur J Pharm Biopharm 56:29-36 (2003b)

Akkar, A., Müller, R.H., Solubilisation by Emulsification. Pharm. Ind., 66(12): p. 1537-1544 (2004)

Akkar, A., Poorly soluble drugs: formulation by nanocrystals und SolEmuls technologies. Diss. Freie Universität Berlin (2004)

Bach, A.C., Stoffwechsel parenteral verabreichter mittelkettiger Triglyceride, S. 3-11 in Fett in der parenteralen Ernährung 3 - Mittelkettige Triglyceride, W. Zuckerschwerdt Verlag München (1985)

Bach, A.C., Frey, A., Lutz, O., Clinical and experimental effects of medium chain triglyceride based fat emulsions - a review, Clin. Nutr. 8, p. 223-235 (1989)

Bauer, K. H., Fömming, K.-H., Führer, C., Pharmazeutische Technologie, Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1997)

Bekersky, I., Fielding, R.M., Buell, D., Lawrence, I., Lipid-based amphotericin B formulations: from animals to man. Pharm. Sci. Technol. Today., 2(6): p. 230-236 (1999)

Bennett, J., Antimicrobial Agents: Antifungal Agents. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman J, Limbird L (eds). New York, McGraw-Hill: 1175-1790; (1995)

Boberg, J., Hakansson, I., Physical and Biological changes in an artificial fat emulsion during storage, J. Pharm. Pharmacol. 16, p. 641-646 (1964)

Bock, T.K., Emulsionen als parenterale Arzneistoffträgersysteme - Herstellung, Charakterisierung und Optimierung. Diss. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (1994)

Bolard, J., et al., One-Sided Action of Amphotericin-B on Cholesterol-Containing Membranes Is Determined by Its Self-Association in the Medium. *Biochemistry*. 30(23): p. 5707-5715 (1991)

Bolard, J., How Do the Polyene Macrolide Antibiotics Affect the Cellular Membrane-Properties. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 864(3-4): p. 257-304 (1986)

Bosquillon, C., Lombry, C., Preat, V., Vanbever, R., Comparison of particle sizing techniques in the case of inhalation dry powders, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 90, Issue 12, p. 2032-2041 (2001)

Bott, S., Hart, H., Charakterisierung kleinster Teilchen mit der neuen PIDS-Technologie - Partikelanalyse, *Chemie Technik* 5: p. 196-200 (1991)

Bruno, R. P. M., Microfluidizer Processor Technology for High Performance Particle Size Reduction, Mixing and Dispersion. *Microfluidizer Processor Technology*. (1999)

Burnham, W.R., Hansari, P.K., Knott, C.E., Cook, J.A., Davis, S.S., Stability of a fat emulsion based intravenous feeding mixture, *Int. J. Pharm.* 13, p. 9-22 (1983)

Bushrab, N., F.; Müller, R.H. Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs for Oral Administration. *NewDrugs* 5: p. 20-22. (2003)

Buttle, I., Schmidt, S., Müller, R.H., Production of amphotericin B emulsions based on So-IEuls technology. *Proceedings of the 4th World Meeting Pharm., Biopharm and Pharm Technology*, Florence, 1535-1536 (2002)

Carneiro, M. J. D., Feres Júnior, M. A., Godinko, O. E. S., Determination of the acidity of oils using paraformaldehyde as a thermometric end-point indicator, *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (5), p. 692-94 (2002)

Cinzia De Vita, V. C., Nanostructured Hybrid Materials from Aqueous Polymer Dispersions. *ADVANCES IN COLLOID AND INTERFACE SCIENCE* 108-109C: p. 167-185. (2004)

Davis, S.S., Pharmaceutical aspects of i.v. fat emulsions, *J. Hosp. Pharm.* 32, p. 149-170 (1974)

Dobias, B., Emulsionen (Teil1), *Tenside Surf. Deter.* 15, p. 225-232 (1978)

Dunn, V., The ultrastructure of chylomicra and of the particles in an artificial fat emulsion, *Proc. Roy. Soc. B.* 169, 147-152 (1981)

Eckart, J., Adolph, M., Mühlen, U., van der Naab, V., Fat emulsions containing medium chain triglycerides in parenteral nutrition of intensive care patients, *J. Parent. Ent. Nutr.* 4, p. 360-366 (1980)

Egito, E.S.T., et al., In-vitro and in-vivo evaluation of a new amphotericin B emulsion-based delivery system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38(3): p. 485-497 (1996)

FDA, Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System, 2000

Fiedler, H. P., *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete*, Editio Cantor Verlag Aulenhof (1996)

Florence AT, Attwood D. *Physico chemical principles of pharmacy*. Chapman and Hall, New York (1981)

Florence, A.T., *Drug Solubilization in Surfactant Systems*, In: *Techniques of Solubilization of Drugs*, Yalkowsky, S.L. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York (1981)

Gold, W., Stouth, A., Pagano, J.F., Donovic, R., Amphotericine A and B antifungal antibiotics produced by streptomycete. *Antibiotics Annual*: 579-586 (1955/1956)

Grant, D.J.W., Brittain, H.G., *Solubility of pharmaceutical solids*, In: *Physical characterization of pharmaceutical solids*, Brittain, H.G. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, 321-386 (1995)

Grau, M. J., *Untersuchungen zur Lösungsgeschwindigkeit, Sättigungslöslichkeit und Stabilität von hochdispersen Arzneistoffsuspensionen*. Dissertation Pharmazeutische

Technologie. Berlin, Freie Universität. (2000)

Guisard, D., Debry, G., Metabolic effects of a medium-chain triglyceride emulsion injected intravenously in man, *Horm. Metab. Res.* 4, 509 (1972)

Hailer S., Wolfram G., Influence of artificial fat emulsions on the composition of serum lipoproteins in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 43, P. 225-233 (1986)

Hakansson, I., Physico-chemical changes in artificial fat emulsions during storage - studies of the hydrolysis and its physiological effects, *Acta Chem. Scand.* 20, p. 2267-2281 (1966)

Heimbach, T. et al., Overcoming poor aqueous solubility of drugs for oral delivery. In: *Prodrugs*, p. 157-215 (2007)

Heinemann, S., Parenteral fat emulsions - Physical stability of emulsions for nutrition and drug delivery, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (1991)

Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. 7. Auflage, Walter de Gruyter Berlin New York (1993)

Jahnke, S., The theory of high pressure homogenization, In: *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of poorly soluble drugs*. Müller, R.H., Benita, S., Böhm, B.H.L. (Hrsg.), Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart (1998)

Junghanns, J.-U., Jacob, R., Müller, R. H., SolEmuls – a convenient way to overcome solubility problems, *NewDrugs* 3, 10-11, 2005

Junghanns, J.-U., Buttle, I., Müller, R. H., Araújo, I. B., Silva, A. K. A., Egito, E. S. T., Damasceno, B. P. G. L., SolEmuls technology: A way to overcome the drawback of parenteral administration of insoluble drugs, *Pharmaceutical Development and Technology* 12 (5), 437-445, 2007

Junghanns, J.-U., Müller, R. H., Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications, *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 3, 2008

Junghanns, J.-U., Müller, R. H., Herstellung und klinische Anwendung nanokristalliner

Wirkstoffe, PZ-Prisma 2, 101-110, 2008

Junghanns, J.-U., Müller, R. H., Physical Stability of Itraconazole Loaded Emulsions Produced by SolEmuls Technology, AAPS Annual Meeting, M1251, Nashville, 2005

Junghanns, J.-U., Müller, R.H., The Coming of Age of parenteral fatemulsions, physical and chemical stability after storage of 18 years, Int. J. Pharm. submitted

Kanfer, I., Report on the International Workshop on the Biopharmaceutics Classification System (BCS): scientific and regulatory aspects in practice, J. Pharm. Pharm. Sci., 2002, 5(1): p: 1-4

Karlson, P., Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart (2005)

Kazimierski, P., NANOTECHNOLOGY FOR MEDICINE, Alexander von Humboldt Foundation Conference 2005, Piotr, Alexander von Humboldt Foundation. (2005)

Keck, C. M., Bushrab, N.F., Müller R.H., Nanopure® Nanocrystals for oral delivery of poorly soluble drugs, Particles, Orlando. (2004)

Kipp, J. E., Wong, J.C.T., Doty, M.J.,Rebeck, C.L., Microprecipitation Method For Preparing Submicron Suspensions. United States Patent 6,607,784. USA, Baxter International Inc. (Deerfield, IL). (2003)

Klang, S.H., Parnas, M. and Benita , S., Emulsions as drug carriers - possibilities, limitations and future perspectives IN: Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of poorly Soluble Drugs (Müller, R.H., Benita, S., Böhm, B. Hrsg.) medpharm Scientific Publishers Stuttgart (1994)

Kreuter, J. A., R. N. Kharkevich, D. A. Ivanov, A. A. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). Brain Research 674(1): p. 171-174 (1995)

Lagaly, G., Energetische Wechselwirkungen in Dispersionen und Emulsionen, S. 32-61 in Asche, Essig und Schmidt, Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen, APV Paperback, Band 10, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1984)

Liversidge, G.G., Presentation of the Workshop of Particulate Drug Delivery Systems. 23rd International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Kyoto (1996)

Liversidge, G.G., Cundy, K.C., Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs, *Int. J. Pharm.*, 125, 91-97 (1995)

Liversidge, G.G., Conzentino, P., Drug particle size reduction for decreasing gastric irritation and enhancing absorption of naproxen in rats, *In J. Pharm.*, 125, 309-313 (1995)

Lucks, J.S., Müller, B.W., Müller, R.H., Polymeric and emulsion carriers - interaction with antiflocculants and ionic surfactants, *Int. J. Pharm.* 63, p. 183-188 (1990)

Lucks, J.S., Parenterale Fetteemulsionen als Arzneistoffträger - Herstellung, Charakterisierung und Stabilität. Diss. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (1993)

Luke, R.G., Boyle, J.A., Renal effects of amphotericin B lipid complex. *Am J Kidney Dis.* 31(5):780-5 (1998)

Marques, E. F., Edlund, H., La Mesa, C., Khan, A., Liquid crystals and phase equilibria binary bile salt-water systems, *Langmuir* 16: p. 5178-5186 (2000).

Mehnert, W., Mäder, K., Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 47(2-3):165-196 (2001)

Merisko-Liversidge, E., Nanocrystals: Resolving Pharmaceutical Formulation Issues associated with poorly water-soluble Compounds. *Particles*, Orlando, Marcel Dekker (2002)

Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G. G., Copper, E. R., Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 18: p. 113-120. (2003)

Merkle, R. C., Biotechnology as a route to nanotechnology. *Trends in Biotechnology* 17(7): p. 271-274 (1999).

Mizushima, Y., Hamano, T., Yokohama, K., Tissue Distribution and anti-inflammatory ac-

tivity of corticosteroids incorporated in lipid Emulsions. *Ann Rheumatic Dis* 41:263-267 (1982)

Moore, G., Moore says nanoelectronics face tough challenges. *M. Kanellos*. (2005).

Möschwitzer, J., Drug Nanocrystals Prepared by High Pressure Homogenization - the Universal Formulation Approach for Poorly Soluble Drugs. Diss. Freie Universität Berlin (2005)

Mosharraf, M., Nyström, C., The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of microsized practically insoluble drugs. *Int J Pharm*, 122:35-47 (1995)

Müller, B.W., Lucks, J.S., Stampa, B., Müller, R.H., Effect of anti-flocculants on suspension stability and size distribution, *Pharm. Ind.* 52, p. 789-793 (6/1990)

Müller, R. H., Polydispersität und elektrophoretische Beweglichkeit hochdispenser Systeme, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel (1983)

Müller, R. H., Peters, K., Becker, R., Kruss, B. Nanosuspensions - a novel formulation for the i.v. administration of poorly soluble drugs, 1st World Meeting of the International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology hosted by APGI/APV, Budapest (1995).

Müller, R. H., Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1996)

Müller, R. H., Schuhmann, R., Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1996)

Müller, R. H., Mehnert, W., Particle and surface characterisation methods, *medpharm Scientific Publishers* Stuttgart (1997)

Müller, R.H., Nanosuspensionen - eine neue Formulierung für schwerlösliche Arzneistoffe, In: *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen* (Müller, R.H., Hildebrand, G., Hrsg.) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1998)

Müller, R. H., Becker, R., Kruss, B., Peters, K. Pharmaceutical nanosuspensions for me-

dicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution. United States Patent 5, 858, 410. USA. (1999).

Müller, R. H., Jacobs, C., et al., Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47(1): p. 3-19 (2001)

Müller, R.H., Heinemann, S., Fat emulsions for parenteral nutrition I: Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability, *Clin. Nutr.* 11, p. 223-236 (1992)

Müller, R.H., Heinemann, S., Fat emulsions for parenteral nutrition II: Characterisation and physical long-term stability of Lipofundin MCT/LCT, *Clin. Nutr.* 12, p. 298-309 (1993)

Müller, R.H., Lucks, J.S., Diedrichs, J.E., Heinemann, S., Lecithin stabilized emulsions for parenteral nutrition, a three year stability study, *Proceed. 6th Int. Conf. on Technol. (APGI)*, 4, p. 351 -360 (1992)

Müller, R. H., Nanopure technology for the production of drug nanocrystals and polymeric particles. 4th World Meeting ADRITEL/APV/APGI, Florence. (2002).

Müller, R.H., Schmidt, S., Buttle, I., Akkar, A., Schmitt, J., Bromer, S., SolEmuls novel Technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 269:293-302 (2004)

Müller, R. H., Moeschwitzer, J.P., Method and apparatus for the production of ultrafine particles and coating of such particles. German patent application. (2005)

Müller, R. H., Pardeike, J., Hommoss, A. (2006), NANOPARTICLES IN THERAPEUTICS: DRUG NANOCRYSTALS AND LIPID NANOPARTICLES. MSTI-Congress, NanoTrends 2006. , Dorint Novotel Berlin-Potsdam Sanssouci.

Müller, R. H., Junghanns, J.-U., Drug nanocrystals/nanosuspensions for the delivery of poorly soluble drugs, in: *Nanoparticulates as Drug Carriers* (V. P. Torchilin, ed.), Imperial College Press, 307-328, 2006

Mutschler, E, Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Koorting, M., *Arzneimittelwir-*

kungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2001)

Nasner, A., Kraus, L., Neues aus der Lecithinforschung. Deutsche Apothekerzeitung 122: p. 2407-2415 (1982)

Niemann, W., Nehne, J., Fetteemulsionen für parenterale Ernährung, Offenlegungsschrift des Deutsche Patentamtes DE 3131460 A1 (1983)

Noyes, A., Whitney, W., The rate of solution of solid substances in their own solutions. J. Am. Chem. Soc. 19: p. 930-934 (1897)

Pahl, M. H., Zerkleinerungstechnik, Köln, TÜV Rheinland GmbH. (1991)

Pascual, B., Ayestaran, A., Montoro, J.B., Oliveras, J., Estibalez, A., Julia, A., Lopez, A., Administration of lipid-emulsion versus conventional amphotericin B in patients with neutropenia. Ann Pharmacother. 29(12): p. 1197-201 (1995)

Plumb, D., Veterinary Drug Handbook. White Bear Lake, PharmaVet Publishing (1999)

Rabinow, B.E., Nanosuspensions in drug delivery. Nat. Rev. Drug Discov, 2004. 3(9): p: 785-796

Rydhag, L., The importance of the phase behavior of phospholipids for emulsions stability, Fette Seifen Anstrichm. 81, p. 168 (1979)

Schmidt, S., Parenterale O/W-Emulsionen: Plasmaproteininteraktionen und Inkorporation von Arzneistoffen, Diss. Freie Universität Berlin (2002)

Schricker, Th., Bedeutung der Fette als Energieträger, Membranbaustein und Immunmodulatoren in der parenteralen Ernährung, Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 28, S. 240-243 (1993)

Schubert, R., Liposomen in Arzneimitteln. Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen. R. H. Müller, G. E. Hildebrand. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (1998)

Schuhmann, R., Physikalische Stabilität parenteraler Fettemulsionen, Entwicklung eines Untersuchungsschemas unter besonderem Aspekt der analytischen Möglichkeiten, Dissertation, Freie Universität Berlin, 1995

Schuhmann, R., Müller, R.H., Physical long term stability of Lipofundin fat emulsions for parenteral nutrition, Eur. J. Pharm. Sci. 2, p. 186 (1994)

Shackleford, D. M., W. A. Faassen, et al. Contribution of lymphatically transported testosterone undecanoate to the systemic exposure of testosterone after oral administration of two andriol formulations in conscious lymph duct-cannulated dogs. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics. 306(3): p. 925-33 (2003)

Shekunov, B.Y., Chattopadhyay, P., Tong, H.H.Y., Chow, A.H.L., Particle Size Analysis in Pharmaceutics: Principles, Methods and Applications, Pharmaceutical Research, Volume 24, Number 2, p. 203-207 (2007)

Singla, A.K., Garg, A., Aggerwal, D., Paclitaxel and its formulations. International Journal of Pharmaceutics, 235:179-92

Sommermeyer, K., Aspekte zur physikalisch-chemischen Charakterisierung, Herstellung, Kontrolle und Kompatibilitätsprüfung von Lipovenös, S. 1-18 in Tempel, G., Eckart, J. (Herausgeber), Erfahrungen mit Fettemulsionen - Metabolische Effekte und Verträglichkeit (Klinische Ernährung 21), W. Zuckerschwerdt Verlag, München (1986)

Sommermeyer, K., Pharmazeutische Entwicklung von Lipovenös 10% PLR, S. 3-9 in Carpentier, Y.A., Günther, H.-J., Schlotzer E. (Hrsg.), Erfahrungen mit einer modifizierten 10 %igen Fettemulsion (Klinische Ernährung 37), W. Zuckerschwerdt Verlag München (1993)

Speiser, P. P., „Poorly soluble drugs, a challenge in drug delivery.“ In: R. H. Müller, S. Benita, B. Böhm (eds.), Emulsions and Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs medpharm Scientific Publishers, Stuttgart: 15 - 28. (1998)

Stricker, H., Physikalische Pharmazie 3. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1987)

Tibell, A., Norrlind, B., Cyclosporin A in fat emulsion carriers: studies on the immunosup-

pressive potential, using the heterotopic heart transplant model in rats. *Transpl Int.* 7(6): p. 438-41 (1994)

Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P., *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1989)

Tunick, M. H. V. H., Diane, L.; Cooke, Peter H.; Malin, Edyth L. , *Asm O.R.G Transmission Electron Microscopy of Mozzarella Cheeses Made from Microfluidized Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (2002)

Vanden Bossche, H. et. al.. Effects of Itraconazole on Cytochrome P-450-Dependent Sterol 14 $\alpha$ -Demethylation and Reduction of 3-Ketosteroids in *Cryptococcus neoformans*. In: *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, American Society for Microbiology, p.2101-2105 (1993)

Velikov, K., *Colloidal Delivery Systems for Functional Food Design. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - Nanotech 2006 - 9th Annual Boston, Massachusetts.* (2006).

Washington C., Davis, S.S., Ageing effects in parenteral fat emulsions: the role of fatty acids, *Int. J. Pharm.* 39, P. 33-37 (1987)

Washington, C., Chawla, A., Christy, N., Davis, S.S., The electrokinetic properties of phospholipid-stabilized fat emulsions, *Int. J. Pharm.* 54, p. 191-197 (1989)

Washington, C. The electrokinetic properties of phospholipide-stabilised fat emulsions. III. Interdroplet potentials and stability ratios in monovalent electrolytes, *Int. J. Pharm.* 64, p. 67-73 (1990)

Willems, L., van der Geest, R., de Beule, K., Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Clin. Pharm. Ther.* 26: p. 159-161 (2001).

## 8. Publikationsverzeichnis

Die vorliegende Dissertation wurde in Teilen in folgenden Publikationen veröffentlicht:

### **Beguchachtete Publikationen**

J.-U. Junghanns, I. Buttle, R.H. Müller, I. B. Araújo, B. P. G. L. Damasceno, E. S. T. Egipto, SolEmuls® Amphotericin B emulsions : production, characterisation, toxicity and in vitro efficiency, in : Pharm. Dev. Technol., 2007;12(5): 437-45

J.-U. Junghanns, R.H. Müller, Herstellung und klinische Anwendung nanokristalliner Wirkstoffe, in: PZ Prisma, 15. Jahrgang, 2008 Nr. 2, Seite 101-110

J.-U. Junghanns, R.H. Müller, Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications, in: Int. J. Nanomedicine, Volume 2008:3(3), pages 295- 309

Jens-Uwe A.H. Junghanns, Robert Jacob, Rainer H. Müller, SolEmuls® – A convenient way to overcome solubility problems, in: New Drugs, 2005

J.-U. Junghanns, R. H. Müller, The Coming of Age of parenteral fatemulsions, physical and chemical stability after storage of 18 years, submitted

### **Proceedings**

Jens-Uwe A.H. Junghanns, Rainer H. Müller, Physical stability of itraconazole loaded emulsions produced by SolEmuls® technology, AAPS Congress 2005, Nashville Tennessee, Poster Presentation

### **Buchkapitel**

Müller, R. H., Junghanns, J.-U., Drug nanocrystals/nanosuspensions for the delivery of poorly soluble drugs, in: Nanoparticulates as Drug Carriers, Imperial College Press

## 9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. R. H. Müller durchgeführt.

Herrn Prof. Müller sei an dieser Stelle herzlich für die Überlassung des vielschichtigen Themas, seine Unterstützung und die Freiheit gedankt, eigene Ideen zu dessen Bearbeitung einzubringen und umzusetzen. Darüber hinaus danke ich ihm besonders für die Möglichkeit, die Ergebnisse meiner Arbeit auf internationalen Kongressen zu präsentieren und dort neue Einblicke und Anregungen zu erhalten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Socrates Egito, Brasilien für die Durchführung der In-vivo-Versuche für die Untersuchung der Solemuls Amphotericin B Formulierungen.

Den technischen Assistentinnen Frau Inge Volz und Frau Corinna Schmidt danke ich herzlich für ihr großes Engagement und die ständige Hilfsbereitschaft bei der analytischen Bearbeitung mancher „Probenberge“.

Bei allen anderen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises möchte ich mich an dieser Stelle ebenfalls für die besonders angenehme Arbeitsatmosphäre, unsere Mittagsausflüge und die weiteren Anlässe zum „Abschalten“ bedanken, die stark dazu beigetragen haben, daß meine Promotionsjahre mir immer als schöne Zeit in Erinnerung bleiben werden.

Meinen Eltern danke ich ganz herzlich für ihre vielseitige und motivierende Unterstützung in den letzten 33 Jahren. Ohne Sie wäre ich nicht der, der ich bin und diese Arbeit wahrscheinlich immer noch ein Haufen Zahlen und Zettel.

## 10. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten



# 11. Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Ansatzpunkte zur Veränderung der Lösungseigenschaften von Wirkstoffen nach dem BCS System (modifiziert nach [Möschwitzer, 2005])	10
Abb.2:	Entscheidungsbaum zur Auswahl eines Formulierungsweges (modifiziert nach [Rabinow, 2004])	11
Abb.3:	Schematischer Aufbau einer Kugelmühle	17
Abb.4:	Raster-Elektronen-Mikroskop-Aufnahme einer Nanosuspension hergestellt mittels H42- Technologie nach 20 Zyklen (mit freundlicher Genehmigung: Möschwitzer 2005)	19
Abb.5:	Schematischer Aufbau der Homogenisationskammer eines Kolbenspalthomogenisators	20
Abb.6:	Vergleich eines Mikrokristalls (A) und eines Nanokristalls (B) und ihrer Oberflächenkrümmung und des Konzentrationsgradienten über die Diffusionsstrecke (h), ( $c_s$ = Grenzkonzentration an der Oberfläche (A = Mikrokristall, B=Nanokristall), $C_x$ Grenzkonzentration nach Diffusionsstrecke, h = Diffusionsstrecke) $dc / dt \sim (c_s - c_x) / h$ .	26
Abb.7:	Anstieg der Sättigungslöslichkeit berechnet mittels der Kelvin-Gleichung am Beispiel des schwerlöslichen Salzes $BaSO_4$ (mit Genehmigung nach [Anger, 2005]).	27
Abb.8:	$V_T$ als Summe der van der Waals Anziehungskräfte $V_A$ und der elektrostatischen Abstoßung $V_R$ , aufgetragen gegen den interpartikulären Abstand H. Wegen der Hydratationsabstoßung findet sich ein primäres Minimum dicht an der Partikeloberfläche (Punkt der irreversiblen Flocculation = Aggregation). Tritt ein sekundäres Minimum auf, können sich Partikel bis auf die entsprechende Distanz annähern und Agglomerate formen (reversible Flocculation; $V_B$ - Hydratationabstoßung/ Born Abstoßung; $V_m$ - Energiebarriere), modifiziert nach [Lagaly, 1982]	31
Abb.9:	Amphotericin B Molekül	36

Abb.10:	Modell eines AmB/Cholesterol-Kanals (AmB-Moleküle: grün=Kohlenstoff, blau=Stickstoff, rot=Sauerstoff, weiß=Wasserstoff; violett=Cholesterol-Molekül) (mit freundlicher Genehmigung: Bolard et al., 1991)	37
Abb.11:	Vergleich unterschiedlicher Arzneistoffinkorporationen. Links: klassischer Ansatz mit Hilfe von Schütteln oder organischen Lösungsmitteln; Rechts: SolEmuls®-Prozess (mit freundlicher Genehmigung nach Buttle, 2004)	38
Abb.12:	Itraconazol	39
Abb.13:	Allgemeiner Herstellungsprozess SolEmuls®-Formulierungen	45
Abb.14:	Messprinzip eines Laserdiffraktometers; mit freundlicher Genehmigung von Malvern Instruments Ltd.(Worcestershire, Großbritannien)	47
Abb.15:	Schematischer Aufbau eines Laserdiffraktometers	47
Abb.16:	Prinzipieller Aufbau einer PCS-Anlage	49
Abb.17:	Schematischer Aufbau einer LDA-Messanordnung	53
Abb.18:	Partikelgrößenverteilung, Amphotericin B Pulver (A), SolEmuls®-Formulierung nach 5 Homogenisationszyklen (B) und nach 20 Zyklen (C)	62
Abb.19:	Änderung der Partikelgröße über einen Zeitraum von 90 Tagen – LD50%	62
Abb.20:	Kalium-Freisetzung aus Erythrozyten vs. Amb Konzentration, Solemul 1C-2 = Formulierung nach SolEmuls®-Technologie, AmB-D = Fungizone®	66
Abb.21:	Hämoglobinfreisetzung aus Erythrozythen vs. AmB-Konzentration, Solemul 1C-2 = Formulierung nach SolEmuls®-Technologie, AmB-D = Fungizone®	67
Abb.22:	Zell-Überlebensrate von Candida tropicalis vs. Konzentration Solemul®- Formulierung (Solemul 1C-2) und Fungizone® (AmB-D)	69
Abb.23:	Itraconazolehaltige SolEmuls®- Formulierung (1,0mg/mL) – lichtmikroskopische Aufnahmen, links: normales Licht, rechts: polarisiertes Licht	71
Abb.24:	Stabilität von Itraconazolhaltigen SolEmuls®- Formulierung mit einem Konzentrationsspektrum von 1,0 bis 10,0 mg/mL gelagert bei 8°C	

- (Teilchengröße in nm über den Lagerzeitraum der verschiedenen Emulsionen). 72
- Abb.25: Stabilität von Itraconazolhaltigen SolEmuls®- Formulierung mit einem Konzentrationsspektrum von 1,0 bis 10,0 mg/mL gelagert bei 20°C (Teilchengröße in nm über den Lagerzeitraum der verschiedenen Emulsionen). 73
- Abb.26: Stabilität von Itraconazolhaltigen SolEmuls®- Formulierung mit einem Konzentrationsspektrum von 1,0 bis 10,0 mg/mL gelagert bei 40°C (Teilchengröße in nm über den Lagerzeitraum der verschiedenen Emulsionen). 74
- Abb.27: Stabilität von Itraconazolhaltigen SolEmuls®- Formulierung mit einem Konzentrationsspektrum von 1,0 bis 10,0 mg/mL gelagert bei 60°C (Teilchengröße in nm über den Lagerzeitraum der verschiedenen Emulsionen). 75
- Abb.28: Rekristallisationseffekte nach einer Lagerzeit von 12 Monaten – schwarze Rechtecke symbolisieren Rekristallisationen 76
- Abb.29: Forschungssubstanz JM2005 - lichtmikroskopische Aufnahmen, links: nicht polarisiertes Licht, rechts: polarisiertes Licht, beide 400 fache Vergrößerung 79
- Abb.30: graphische Darstellung der Partikelgrößenverteilung (Volumenverteilung) Forschungssubstanz JM2005 80
- Abb.31: Veränderung der Partikelgrößenverteilung des Formulierungsträger über die Lagerzeit 82
- Abb.32: Veränderung der Partikelgrößenverteilung JM2005-haltige Formulierung (10mg/mL), direkt homogenisiert, über die Lagerzeit 83
- Abb.33: Lichtmikroskopische Aufnahme JM2005 haltige Formulierung (10mg/mL), direkt homogenisiert, nach Lagerzeit von 4 Wochen (400 fache Vergrößerung) 84
- Abb.34: Lichtmikroskopische Aufnahme JM2005-haltige Suspension (30mg/mL), 400 fache Vergrößerung 85
- Abb.35: Veränderung der Partikelgrößenverteilung JM2005-haltige Formulierung (30mg/mL), direkt homogenisiert, über Lagerzeit 88
- Abb.36: Veränderung der Partikelgrößenverteilung JM2005 haltige

Formulierung (15mg/mL) mit erhöhtem Lecithingehalt, direkt homogenisiert, über Lagerzeit	89
Abb.37: leere Liposomen zu Beginn der JM2005-Inkorporation	91
Abb.38: Veränderung der Partikelgrößenverteilung JM2005 haltigen, liposomalen Formulierung (15mg/mL) über die Lagerzeit	92
Abb.39: Veränderung der PCS-Meßdaten (mittlerer Durchmesser in nm) der Chargen der 10%igen Fettemulsionen über die Lagerzeit (Meßpunkte bei 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten)	95
Abb.40: Veränderung der PCS-Meßdaten (mittlerer Durchmesser in nm) der Chargen der 20%igen Fettemulsionen über die Lagerzeit (Meßpunkte bei 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten)	96
Abb.41: Volumenverteilung einer 10%igen Fettemulsion (Charge 551281A, jeweils 3 Proben) nach einer Lagerung von 216 Monaten (LS230, Auswertung nach Mie-Theorie)	98
Abb.42: Volumenverteilung einer 10%igen Fettemulsion (Charge 604581A, jeweils 3 Proben) nach einer Lagerung von 216 Monaten (LS230, Auswertung nach Mie-Theorie)	98
Abb.43: Volumenverteilung einer 20%igen Fettemulsion (Charge 604582A, jeweils 3 Proben) nach einer Lagerung von 216 Monaten (LS230, Auswertung nach Mie-Theorie)	98
Abb.44: Volumenverteilung einer 20%igen Fettemulsion (Charge 606182A, jeweils 3 Proben) nach einer Lagerung von 216 Monaten (LS230, Auswertung nach Mie-Theorie)	99

## 12. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Einfluss verschiedener Parameter auf das Homogenisationsergebnis [Jahnke, 1998]	21
Tab.2: Einteilung der Löslichkeit nach Ph.Eur. bzw. USP	25
Tab.3: In-Vivo Effekte von Nanokristallen	29
Tab.4: Sonstige Rohstoffe und Reagenzien	42
Tab.5: Änderung der Partikelgröße über einen Zeitraum von 90 Tagen – PCS	63
Tab.6: Änderung des Zetapotentials über einen Zeitraum von 90 Tagen – Zetasizer 3	63
Tab.7: Gehaltsbestimmung mit Hilfe der HPLC... nach 90 Tagen Lagerung bei 20°C	64
Tab.8: Gehaltsbestimmung mittels HPLC der Itraconazol haltigen SolEmuls Formulierung (Bestimmung erfolgte an Tag 0, Tag 180, Tag 360 bei einer Lagerung bei 8°C)	76
Tab.9: Gehaltsbestimmung mittels HPLC der Itraconazol haltigen SolEmuls Formulierung (Bestimmung erfolgte an Tag 0, Tag 180, Tag 360 bei einer Lagerung bei 20°C)	77
Tab.10: Gehaltsbestimmung mittels HPLC der Itraconazol haltigen SolEmuls Formulierung (Bestimmung erfolgte an Tag 0, Tag 180, Tag 360 bei einer Lagerung bei 40°C)	77
Tab.11: Gehaltsbestimmung mittels HPLC der Itraconazol haltigen SolEmuls Formulierung (Bestimmung erfolgte an Tag 0, Tag 180, Tag 360 bei einer Lagerung bei 60°C)	78
Tab.12: Partikelgrößenverteilung (Volumenverteilung) Forschungssubstanz JM2005	80
Tab.13: Substanzfreie SolEmuls®- Formulierung, Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung mittels PCS und LD	81
Tab.14: JM2005-haltige Formulierung (10mg/mL): Einfluss der Lagerzeit,	

Vermessung mittels PCS	83
Tab.15: Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige Formulierung (10mg/mL) – Einfluss Lagerzeit; Vermessung mittels LD (Probe: Zyklus 5)	84
Tab.16: Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige Formulierung (15mg/mL) Vermessung mittels LD (Probe: Zyklus 5)	86
Tab.17: Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige Formulierung (15mg/mL) - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels LD (Probe: Zyklus 20)	86
Tab.18: Partikelgröße JM2005 haltige Formulierung (15mg/mL) - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels PCS	87
Tab.19: Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige Formulierung (30mg/mL) Vermessung mittels LD (Probe: Zyklus 5)	87
Tab.20: Partikelgröße JM2005 haltige Formulierung (30mg/mL) - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels PCS	87
Tab.21: Partikelgröße JM2005-haltige Formulierung (15mg/mL) mit erhöhtem Lecithingehalt - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels PCS	89
Tab.22: Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005 haltige Formulierung (15mg/mL) mit erhöhtem Lecithingehalt, Vermessung mittels LD	89
Tab.23: Partikelgröße JM2005 haltige liposomale Formulierung (15mg/mL) - Einfluss Lagerzeit, Vermessung mittels PCS	90
Tab.24: Partikelgrößen leere liposomale Formulierung, Vermessung mittels PCS	91
Tab.25: Partikelgröße (Volumenverteilung) JM2005-haltige liposomale Formulierung (15mg/mL), Vermessung mittels LD	91
Tab.26: Durchschnittlicher Polydispersitätsindex der vermessenen 10%igen Fettemulsionen nach Lagerung von 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten im Vergleich	94
Tab.27: Durchschnittlicher Polydispersitätsindex der vermessenen 20%igen Fettemulsionen nach Lagerung von 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten im Vergleich	95
Tab.28: PCS-Meßdaten (mittlerer Durchmesser in nm) der Chargen der	

10%igen Fettemulsion nach einer Lagerzeit von 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten	95
Tab.29: PCS-Meßdaten (mittlerer Durchmesser in nm) der Chargen der 20%igen Fettemulsion nach einer Lagerzeit von 0, 6, 12, 18, 24, 96 und 216 Monaten	95
Tab.30: Zetapotentiale (in mV) der 10%igen Fettemulsionen nach einer Lagerung von 0, 6, 12, 24, 96 und 216 Monaten im Vergleich	100
Tab.31: Zetapotentiale (in mV) der 20%igen Fettemulsionen nach einer Lagerung von 0, 6, 12, 24, 96 und 216 Monaten im Vergleich	100
Tab.32: pH-Wert und Säurezahl (SZ) der untersuchten Emulsionen nach einer Lagerung von 96 bzw. 216 Monaten und die jeweilige Veränderung	101
Tab.33: Gehalt freier Fettsäuren (in mmol/L) nach einer Lagerung von 96 bzw. 216 Monaten bei Raumtemperatu	101

# 13. Formelverzeichnis

Formel 1: Kelvin-Gleichung	15
Formel 2: Ostwald-Freundlich-Gleichung	16
Formel 3: Noyes-Whitney-Gleichung	16
Formel 4: Bernoullis Gesetz	21
Formel 5: Berechnung der Leistungsdichte	22
Formel 6: Noyes-Whitney-Gleichung	24
Formel 7: Vereinfachung aus der Kelvin-Gleichung	25
Formel 8: Prandtl-Gleichung	25
Formel 9: theoretische Korrelationsfunktion	51
Formel 10: Abhängigkeit der Verzögerung der Kanäle und Taktzeit	51
Formel 11: Berechnung des Streulichtvektors (K)	52
Formel 12: Einstein-Gleichung	52
Formel 13: Berechnung der Frequenzverschiebung aus der Partikelgeschwindigkeit	55
Formel 14: Berechnung der elektrophoretischen Mobilität	55
Formel 15: Helmholtz-Smolouchowski-Gleichung	55
Formel 16: Berechnung der Säurezahl	59
Formel 17: Berechnung der Peroxidzahl	60