

**CHARAKTERISIERUNG VON SCHWERLÖSLICHEN
ARZNEISTOFF-NANOPARTIKELN HERGESTELLT DURCH
DAS RESS-VERFAHREN
ZUR VERBESSERUNG DER BIOVERFÜGBARKEIT**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2003

vorgelegt von

HANS-JÜRGEN MARTIN

Tag der mündlichen Prüfung

04. August 2003

Dekan

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter

Prof. Dr. M. A. Wahl

2. Berichterstatter

Prof. Dr. K.-A. Kovar

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. M. A. Wahl

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Zuallererst möchte ich meinem verehrten Lehrer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. A. Wahl, für die Überlassung des interessanten Themas, sein ständiges Interesse am Zustandekommen der Arbeit und die jederzeit gewährte Unterstützung sowie für seinen persönlichen und menschlichen Umgang danken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt für die zahlreichen wertvollen Hinweise und Diskussionen und die Schaffung optimaler Arbeitsbedingungen. Für die Möglichkeit zur Teilnahme an Weiterbildungsseminaren zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie, den Besuch von Kongressen und Seminaren und die Teilnahme an Exkursionen zu verschiedenen Firmen möchte ich mich ebenfalls bei Ihm bedanken.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. M. Türk, Herrn Peter Hils sowie Frau Britta Helfgen vom Institut für Technische Thermodynamik und Kältetechnik der Universität Karlsruhe bedanke ich mich neben der Herstellung der Nanopartikel für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen intensiven und fruchtbaren Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. S. Wartewig und Herrn Prof. Dr. R. Neubert vom Institut für Angewandte Dermatopharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für ihre große Hilfsbereitschaft beim Anfertigen der Ramanspektren.

Für die Herstellung und Hilfe bei der Charakterisierung der festen Lipidnanopartikel und der Lipidnanoemulsionen und die gute Zusammenarbeit danke ich Frau Katja Jores aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. K. Mäder, ganz herzlich.

Die Caco-2/TC-7-Zellkultur wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. K. W. Bock, Toxikologisches Institut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Dafür bedanke ich mich ganz herzlich.

Für die Mithilfe bei den Untersuchungen des Auflöseverhaltens und der Teilchengrößenbestimmung geht ein großes Dankeschön an Herrn Sebastian Kulow.

Der Firma Welding GmbH danke ich für die Überlassung des mikronisierten Griseofulvins.

Für das schnelle und sehr sorgfältige Korrekturlesen des Manuskriptes danke ich Frau Regula von Eggelkraut-Gottanka und Frau Claudia Kaiser.

Meinen Arbeitskolleginnen und –kollegen, den ehemaligen und den derzeitigen, danke ich ganz herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima.

Stellvertretend für alle Kollegen möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Bilal Awadallah, Frau Claudia Kaiser und Herrn Harald Römpf nicht nur für fachliche Hilfe, sondern auch für Ihre Freundschaft und Unterstützung außerhalb des Labors bedanken.

Bei Frau Martina Brenn bedanke ich mich für ihre Mithilfe bei der Pflege der Zellkulturen. Herrn Klaus Weyhing möchte ich danken für die Anfertigung diverser REM-Aufnahmen. Herrn Roland Walker und Frau Renate Beer danke ich für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei kleinen und großen Problemen.

Herrn Geiger und seinem Werkstatt-Team danke ich für die schnelle Hilfe bei vielen kleinen Reparaturen und bei der Herstellung diverser Kleinteile. Frau Söllinger und Herrn Walker in der Chemikalienausgabe danke ich für ihre unkomplizierte und schnelle Hilfe und die stets freundliche Art.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mir meine Ausbildung und Doktorarbeit ermöglicht haben und mich dabei so liebevoll begleitet und unterstützt haben.

*Für meine Eltern
in Liebe und Dankbarkeit*

Die Lebenszeit ist zu kostbar, um etwas durchzuziehen,
sondern dazu da, etwas entstehen zu lassen.

Herman van Veen

Wenn ich tief im Herzen der Angst eine befremdliche Absurdität leise wahrufe,
öffnet sich in der Mitte meines Schädels ein Auge.

Harald Schmidt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Bioverfügbarkeit von schwerlöslichen Arzneistoffen	1
1.1.1	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (BCS)	2
1.1.1.1	Löslichkeit und Auflösungsgeschwindigkeit	3
1.1.1.1.1	Verbesserung der Löslichkeit bzw. Auflösungsgeschwindigkeit	4
1.1.1.1.2	In-vitro Freisetzung	6
1.1.1.2	Resorption	7
1.1.1.2.1	Transportmechanismen	8
1.1.1.2.2	Transzellulärer Transport	9
1.1.1.2.3	Parazellulärer Transport	10
1.1.1.2.4	Resorptionsmodelle	11
1.1.1.2.5	Das Caco-2 Zellmodell (Subklon TC-7)	12
1.1.2	Griseofulvin als schwerlöslicher Arzneistoff	13
1.1.2.1	Einleitung	13
1.1.2.2	Physikalische Kenndaten	14
1.1.3	Ibuprofen als schwerlöslicher Arzneistoff	16
1.1.3.1	Einleitung	16
1.1.3.2	Physikalische Kenndaten	16
1.2	Mikronisierung von Partikeln mittels überkritischer Fluide	18
1.2.1	Überkritische Fluide und deren Anwendungsmöglichkeiten	18
1.2.2	Überkritisches Kohlendioxid	20
1.2.3	Verfahren zur Partikelherstellung mit überkritischen Fluiden	21
1.2.3.1	Fällung aus überkritischer Lösung (RESS-Verfahren)	21
1.2.3.2	Fällung mit überkritischen Fluiden als Antisolvens	24
1.2.3.3	Fällung aus einer gasgesättigten Lösung	26
1.3	Feste Lipidnanopartikel (SLN)	26
1.4	Zielsetzung	27
2	Materialien	29
2.1	Materialien	29
2.1.1	Reagenzien und Medien für die Zellkultur	29
2.1.2	Materialien und Geräte für die Zellkultur bzw. Resorptionsversuche	29
2.1.3	Wirkstoffe	30

2.1.4	Lösungsmittel und Chemikalien	30
2.1.5	Geräte zur allgemeinen Verwendung.....	32
2.2	Zellkultur	33
2.3	Datenverarbeitung	33
2.3.1	Einfaktorielle Varianzanalyse mit Hilfe der Analysen-Funktionen unter Verwendung von EXCEL	34
3	Methoden	35
3.1	Der RESS-Prozess	35
3.1.1	RESS-Anlage	35
3.1.2	Herstellung von RESS-Griseofulvin	36
3.1.3	Herstellung von RESS-Ibuprofen	37
3.1.4	On-Line Bestimmung der Partikelgröße	37
3.2	Umkristallisation von Griseofulvin.....	38
3.3	Mahlung von Ibuprofen	38
3.4	Charakterisierung der Griseofulvin- bzw. Ibuprofenpartikel	38
3.4.1	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM)	38
3.4.2	Partikelgrößenanalytik mittels Laserbeugungsspektroskopie	39
3.4.3	Spezifische Oberfläche mittels Stickstoffadsorptionsmethode nach Brunauer, Emmett und Teller (BET)	40
3.4.4	Dynamische Differenzkalorimetrie (DDK).....	41
3.4.5	FT-Raman-Spektroskopie	42
3.4.6	Löslichkeit	43
3.4.6.1	Vorgehensweise.....	44
3.4.6.2	Vergleich der Löslichkeit von mikronisiertem Griseofulvin und RESS Griseofulvin.....	45
3.4.6.3	Vergleich der Löslichkeit von Ibuprofen 50 und RESS-Ibuprofen	45
3.4.7	Auflöseverhalten	45
3.4.7.1	Auflösungsgeschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell.....	46
3.4.7.2	Auflösungskoeffizienten aus der Weibullfunktion	47
3.5	Caco-2 als in-vitro Permeationsmodell	47
3.5.1	Transportpuffer.....	47
3.5.2	Kultivierung	48
3.5.2.1	Präkultivierung	48
3.5.2.2	Subkultivierung / Passagieren.....	49
3.5.3	Untersuchung der Integrität des Zellmonolayers.....	50

3.5.3.1	Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)	50
3.5.3.2	Transport der hydrophilen Markersubstanz Fluorescein-Natrium	50
3.5.4	Durchführung der Permeationsuntersuchungen	50
3.5.4.1	Statische Bedingungen (Transwell-System®).....	50
3.5.4.2	Dynamische Bedingungen (Snapwell-System®)	51
3.5.4.3	Bestimmung des Permeationskoeffizienten	52
3.6	Griseofulvin Arzneistoffformulierung	53
3.6.1	Herstellung einer festen Dispersion	53
3.6.2	Herstellung fester Lipidnanopartikel (SLN) und Nanoemulsion.....	53
3.6.2.1	Charakterisierung der festen Lipidnanopartikel und Nanoemulsion..	54
3.6.2.1.1	Teilchenmorphologie	55
3.6.2.1.2	Teilchengröße	55
3.6.2.1.3	Resorption.....	55
3.7	Analytische Verfahren.....	56
3.7.1	UV-spektrophotometrische Gehaltsbestimmung von Griseofulvin	56
3.7.2	HPLC-Methode zur Bestimmung des Griseofulvingehalts für die Resorptionsversuche.....	57
3.7.2.1	Validierung der Methode	57
3.7.2.1.1	Spezifität	57
3.7.2.1.2	Linearität / Arbeitsbereich.....	58
3.7.2.1.3	Nachweis und Bestimmungsgrenze	58
3.7.2.1.4	Systempräzision und Richtigkeit	58
3.7.3	UV-Spektrophotometrische Gehaltsbestimmung von Ibuprofen	59
3.7.4	Fluoreszenzmessung zur Gehaltsbestimmung von Fluorescein- Natrium.....	59
4	Methodische Ergebnisse	60
4.1	Ergebnisse der analytischen Verfahren	60
4.1.1	UV-Analytik von Griseofulvin.....	60
4.1.2	HPLC-Analytik von Griseofulvin	61
4.1.2.1	Ergebnisse der Validierung	61
4.1.2.1.1	Spezifität	61
4.1.2.1.2	Linearität / Arbeitsbereich.....	62
4.1.2.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	63
4.1.2.1.4	Präzision und Richtigkeit.....	64
4.1.3	UV-Analytik von Ibuprofen.....	64

4.1.4	Fluoreszenz-Analytik von Fluorescein-Natrium.....	65
4.1.5	Qualifizierung bzw. Untersuchung der Integrität des Zellmonolayers	67
4.1.5.1	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)..	67
4.1.5.2	Transport der hydrophilen Markersubstanz Fluorescein-Natrium	68
5	Ergebnisse	69
5.1	Ergebnisse der Herstellung und Charakterisierung von RESS-Griseofulvin- Partikeln.....	69
5.1.1	Partikelgröße bei Expansion in die Gasphase	69
5.1.2	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.....	70
5.1.3	Partikelgrößenanalytik mittels Laserbeugungsspektroskopie	72
5.1.3.1	Teilchengröße von umkristallisiertem Griseofulvin.....	72
5.1.3.2	Teilchengröße von mikronisiertem Griseofulvin	72
5.1.3.3	Teilchengröße von RESS-Griseofulvin.....	74
5.1.4	Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Stickstoff- adsorption nach Brunauer, Emmett und Teller.....	78
5.1.5	Dynamische Differenzkalorimetrie.....	78
5.1.6	FT-Raman-Spektroskopie	80
5.1.7	Löslichkeit	80
5.1.7.1	Untersuchung der Löslichkeit von Griseofulvin in Abhängigkeit des pH-Wertes	81
5.1.7.2	Vergleich der Löslichkeit von mikronisiertem Griseofulvin und RESS- Griseofulvin	81
5.1.8	Auflöseverhalten	82
5.1.8.1	Partikel	82
5.1.8.1.1	Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell	83
5.1.8.1.2	Korrelation zwischen Auflösungsgeschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell und der spezifischen BET-Oberfläche.....	85
5.1.8.2	Feste Dispersion	86
5.1.9	In-vitro Resorptionsverhalten von Griseofulvin.....	89
5.1.9.1	Resorption von Griseofulvin in Abhängigkeit von der Auflösungsgeschwindigkeit	90
5.2	Ergebnisse der Herstellung und Charakterisierung der Ibuprofen-Partikel.....	93
5.2.1	Partikelgröße bei der Expansion in die Gasphase	93
5.2.2	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.....	93

5.2.3	Partikelgrößenanalytik mittels Laserbeugungsspektroskopie	95
5.2.4	Spezifische Oberfläche mittels Stickstoffadsorptionsmethode nach Brunauer, Emmett und Teller	96
5.2.5	Thermoanalytische Untersuchungen mittels dynamischer Differenzkalorimetrie	96
5.2.6	FT-Raman-Spektroskopie	98
5.2.7	Löslichkeit	99
5.2.7.1	Vergleich der Löslichkeit von Ibuprofen 50 und RESS-Ibuprofen	99
5.2.8	Auflöseverhalten der Ibuprofenpartikel.....	100
5.2.9	Resorption von Ibuprofen in Abhängigkeit des Auflöseverhaltens ..	102
5.3	Feste Lipidnanopartikel (SLN) und Nanoemulsion mit Griseofulvin	103
5.3.1	Charakterisierung der festen Lipidnanopartikel und Nanoemulsion	103
5.3.1.1	Morphologie	103
5.3.1.2	Teilchengröße	104
5.3.1.3	Permeationsverhalten von Griseofulvin in Nanoemulsionen und festen Lipidnanopartikeln (SLN).....	106
6	Diskussion	108
6.1	Das RESS-Verfahren.....	108
6.2	RESS-Griseofulvinpartikel	109
6.2.1	Herstellung der RESS-Griseofulvinpartikel	109
6.2.2	Morphologie der RESS-Griseofulvinpartikel.....	110
6.2.3	Korngrößenverteilung der RESS-Griseofulvinpartikel.....	110
6.2.4	BET-Oberfläche von RESS-Griseofulvin.....	111
6.2.5	Thermoanalytische Untersuchungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie	111
6.2.6	Ramanspektroskopische Untersuchungen.....	112
6.2.7	Sättigungslöslichkeit von RESS-Griseofulvin	112
6.2.8	Auflöseverhalten von Griseofulvin.....	113
6.2.9	Permeationsverhalten von Griseofulvin.....	114
6.3	RESS-Ibuprofenpartikel	115
6.3.1	Herstellung der RESS-Ibuprofenpartikel	115
6.3.2	Morphologie der RESS-Ibuprofenpartikel.....	116
6.3.3	Korngrößenverteilung der RESS-Ibuprofenpartikel.....	116
6.3.4	BET-Oberfläche von RESS-Ibuprofen.....	116

6.3.5	Thermoanalytische Untersuchungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie	117
6.3.6	FT-Raman-Spektroskopie	117
6.3.7	Sättigungslöslichkeit von Ibuprofen.....	117
6.3.8	Auflöseverhalten von Ibuprofen.....	118
6.3.9	Permeationsverhalten von Ibuprofen in Abhängigkeit des Auflöseverhaltens.....	118
6.4	Einsatz der RESS-Technik für die Mikronisierung von Arzneistoffen	119
6.5	Griseofulvin in festen Lipidnanopartikeln bzw. Nanoemulsionen.....	120
6.5.1	Herstellung	120
6.5.2	Morphologie und Teilchengröße.....	120
6.5.3	Griseofulvinpermeation aus SLN und Nanoemulsion.....	121
7	Zusammenfassung.....	122
8	Literaturverzeichnis	125
9	Anhang	144
10	Firmenverzeichnis.....	147

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
AUC	area under the curve
Aufl.	Auflage
BET-Methode	Adsorptionsmethode nach Brunauer, Emmet und Teller zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche
ca.	circa
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
CYP	Cytochrom-Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry, Dynamische Differenzkalorimetrie
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
Gl.	Gleichung
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Hrsg.	Herausgeber
MeOH	Methanol
M_r	relative Molmasse
PEG	Polyethylenglykol
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europea
relsdv	relative Standardabweichung
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
S.	Seite
SD	Standardabweichung
sog.	so genannt
S_y	Reststandardabweichung
Tab.	Tabelle
UV	ultravioletter Bereich des Spektrums
vgl.	vergleiche
V/V	Volumenanteile
y^*	Gleichgewichtslöslichkeit (Molenbruch in der Fluidphase)

Besondere Hinweise:

Falls nicht anders gekennzeichnet geben Fehlerbalken in den Abbildungen den 95 %-Vertrauensbereich des Mittelwertes an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht beziehungsweise vorgestellt:

Publikationen:

Martin, H.-J.; Türk, M.; Wartewig, S. und Wahl, M. A. – „Characterization and in vitro absorption of nanoparticulate griseofulvin obtained by rapid expansion of supercritical solutions (RESS-process) – eingereicht

Türk, M.; Hils, P.; Helfgen, B.; Schaber, K.; Martin, H.-J. und Wahl, M. A. – „Micronisation of pharmaceutical substances by Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS): A promising method to improve the bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents” – J. Supercrit. Fluids, 22, 1, (2002) 75-84

Kongressberichte:

Martin, H.-J.; Hils, P.; Türk, M. und Wahl, M. A. – „Nanosize particles of griseofulvin obtained by the RESS-process to improve drug absorption“ – Vortrag und Poster, DPhG Doktorandentagung Frankfurt 2002,
<http://www.biozentrum.uni-frankfurt.de/DPhG/EGSTM02/Abstracts/abs031.html>

Martin, H.-J.; Hils, P.; Türk, M. und Wahl, M. A. – „Nanoscale particles of griseofulvin by rapid expansion of supercritical solutions (RESS)“ – Vortrag, DPhG Jahrestagung Münster 2000, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 333, Suppl. 2, S. 16 (2000)

Hils, P.; Helfgen, B.; Türk, M.; Schaber, K. Martin, H.-J.; Schmidt, P. C. und Wahl, M. A. – „Nanoscale particles for pharmaceutical purpose by rapid expansion of supercritical solutions (RESS): Part I: Experiments and Modelling“ – Vortrag, 7th Meeting on Supercritical Fluids, Antibes, Frankreich 2000, Proc. 7th Meeting on Supercritical Fluids, S. 27-32 (2000)

Abstracts:

Wahl, M. A.; Martin, H.-J.; Hils, P. und Türk, M. – „Griseofulvin nanoparticles obtained by the RESS-process to improve drug absorption“ – Poster, AAPS Annual Meeting Toronto 2002, AAPSParmSci Vol. 4, No. 4, Abstract W5146 (2002)

Martin, H.-J.; Hils, P.; Türk, M. und Wahl, M. A. – „Micronization of griseofulvin by rapid expansion of supercritical solutions (RESS) to improve the solubility, the dissolution rate and the bioavailability” – Poster, APV Jahrestagung, Florenz, Italien 2002, Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, S. 499-500 (2002)

Martin, H.-J.; Schmidt, P. C.; Wahl, M. A.; Hils, P.; Helfgen, B.; Türk, M. und Schaber, K. – „Nanoscale particles for pharmaceutical purpose by rapid expansion of supercritical solutions (RESS): Part II: Characterization of the product and use?“ – Poster, 7th Meeting on Supercritical Fluids, Antibes, Frankreich 2000, Proc. 7th Meeting on Supercritical Fluids, S. 53-57 (2000)

Kapitel 1

Einleitung und Zielsetzung

1.1 Bioverfügbarkeit von schwerlöslichen Arzneistoffen

Der therapeutisch wirksame Bestandteil eines Arzneimittels muss in ausreichender Konzentration und über einen bestimmten Zeitraum am Wirkort vorliegen, um eine gewünschte Wirkung im Körper zu erzielen. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit mit der der therapeutisch wirksame Bestandteil aus der pharmazeutischen Formulierung am Wirkort verfügbar ist, bezeichnet man als Bioverfügbarkeit. Der erste, die Verfügbarkeit am Wirkort bestimmende Schritt nach Applikation einer Arzneiform, ist die Freigabe aus der Arzneiform. Bei festen Arzneiformen, zum Beispiel einer Tablette, setzt sich die Freigabe aus dem Zerfall der Tablette in kleine Partikel (Desintegration) und der Auflösung (Dissolution) des Arzneistoffes in der am Resorptionsort vorliegenden Flüssigkeit zusammen. Der nächste Schritt ist die Resorption, also der Weg des Arzneistoffes aus dem Gastrointestinaltrakt in den systemischen Kreislauf. Dazu muss der Arzneistoff die Zellmembranen durchdringen.

Bei Arzneistoffen mit einer geringen Wasserlöslichkeit spielt die Auflösungsgeschwindigkeit eine große Bedeutung. So kann beim Durchwandern des Arzneistoffes durch die Resorptionszone des Magen-Darm-Trakts die nur begrenzt zur Verfügung stehende Zeit zur gänzlichen Lösung und vollständigen Resorption des Arzneimittels nicht ausreichen. Als Faustregel lässt sich festhalten, dass bei einer Löslichkeit von weniger als 0,3 % die Auflösungsgeschwindigkeit zur geschwindigkeitsbestimmenden Größe für die Resorption und somit für die pharmakologische Wirkung wird (Ritschel 1973).

Die Bioverfügbarkeit wird im Wesentlichen durch die drei Kenngrößen Löslichkeit, Permeabilität sowie der in-vitro Freisetzung beeinflusst (Amidon et al. 1995). Vor diesem Hintergrund wurde das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (BCS) entwickelt (FDA Guidance for Industry 2000).

1.1.1 Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (BCS)

Das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem teilt Arzneistoffe nach ihrer Löslichkeit in wässrigen Medien bei physiologischen pH-Werten von 1 bis 7,5 und ihrem Permeabilitätsvermögen in vier Klassen ein (Tab. 1.1).

Die Löslichkeit wird dann als hoch, beziehungsweise gut eingestuft, wenn der Arzneistoff in seiner höchsten therapeutischen Einzeldosis in 250 ml Wasser des physiologischen pH-Bereichs von 1 bis 7,5 gelöst wird. Dieses Volumen entspricht der Flüssigkeitsmenge die für die Auflösung des Arzneistoffes im Gastrointestinaltrakt zur Verfügung steht, wenn ein Prüfpräparat im Rahmen einer in-vivo Studie zur Bioverfügbarkeit/Bioäquivalenz mit ca. 200 ml Flüssigkeit verabreicht wird. Ein biopharmazeutisches Maß für die Löslichkeit ist der Quotient aus der therapeutischen Dosis (mg) und der Löslichkeit (mg/ml). Ein Arzneistoff ist demnach gut löslich, wenn der Quotient Dosis dividiert durch Löslichkeit kleiner als 250 ml ist. Bei niedriger, beziehungsweise schlechter Löslichkeit ergibt sich ein Quotient größer als 250 ml. Eine mittlere Löslichkeit kann dann angenommen werden, wenn die maximale Einzeldosis innerhalb eines eingeschränkten pH-Bereichs in weniger als 250 ml gelöst wird.

Tab. 1.1 *Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (BCS)*

Klasse	Löslichkeit	Permeabilität	Resorption
I	Hoch	Hoch	Kontrolliert durch Magenentleerung
II	Niedrig	Hoch	Kontrolliert durch Auflösung
III	Hoch	Niedrig	Kontrolliert durch Permeation
IV	Niedrig	Niedrig	Von Fall zu Fall verschieden

Das Permeationsverhalten kann mit Hilfe von in-vivo-Tests direkt im Menschen oder im Tier bestimmt werden. Die FDA-Guidance for Industry (2000) "Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system" lässt alternativ auch in-vitro Zellkulturmethoden zu. So können zum Beispiel Caco-2 Zellkulturen verwendet werden. Aus den so erhaltenen Permeationsdaten wird ein Permeabilitätskoeffizient P_{app} (10^{-6} cm/s) bestimmt. Dieser Permeabilitätskoeffizient kann Aussagen über die Absorption eines Arzneistoffes machen (Yee 1997). Ist dieser kleiner als 1, ist eine schlechte Absorption (0-20 %) zu erwarten. Liegt der Permeabilitätskoeffizient zwischen 1 und 10 kann mit einer mittleren Absorption (20-70 %) gerechnet

werden. Auf eine gute Absorption (70-100 %) deutet ein Permeabilitätskoeffizient größer 10 hin.

Auf die biopharmazeutischen Kenngrößen Löslichkeit, Lösungsgeschwindigkeit und Resorption soll im Folgenden nochmals eingegangen werden.

1.1.1.1 Löslichkeit und Auflösungsgeschwindigkeit

Eine Lösung (Solution) ist ein System, in der ein fester Stoff (Solute) molekulardispers in einem Lösungsmittel vorliegt. Die treibende Kraft ist die Diffusion. Die Auflösung eines kristallinen Stoffes beinhaltet den Abbau des Kristallgitters - ähnlich dem Schmelzen - in die einzelnen Gitterbausteine und die Vermischung derselben mit dem Lösungsmittel. Die Auflösung von Arzneistoffen kann in 3 Schritte aufgeteilt werden: Der erste Schritt ist das Aufbrechen der Kristallstruktur des Arzneistoffes und das Entfernen eines Moleküls von der Kristalloberfläche. Der nächste Schritt ist die Bildung eines freien Raumes im Lösungsmittel. Daran schließt sich die Umhüllung des Moleküls mit Lösungsmittelmolekülen an.

Die Lösungsgeschwindigkeit lässt sich nach einer von Noyes und Whitney (1897) aufgestellten Gesetzmäßigkeit, unter Berücksichtigung des 1. Fick'schen Diffusionsgesetzes beschreiben (*Gleichung 1.1*).

$$\frac{dm}{dt} = \frac{D \cdot A}{h} (c_s - c_t) \quad \text{Gleichung 1.1}$$

dm/dt: Auflösungsgeschwindigkeit

D: Diffusionskoeffizient

A: Teilchenoberfläche des ungelösten Arzneistoffes

h: Dicke der Diffusionsschicht um ein Arzneistoffteilchen

c_s: Sättigungskonzentration (Löslichkeit)

c_t: Konzentration des Arzneistoffes zur Zeit t

Die Auflösungsgeschwindigkeit dm/dt ist demnach proportional zur Oberfläche A des Arzneistoffes, dem Diffusionskoeffizienten und dem Konzentrationsgefälle (c_s - c_t). Weiter ist die Auflösungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Dicke h der Diffusionsschicht.

1.1.1.1.1 Verbesserung der Löslichkeit bzw. Auflösungsgeschwindigkeit

Bei schwerlöslichen Arzneistoffen ist das Konzentrationsgefälle zwischen gesättigter Lösung und der Konzentration zum Zeitpunkt t sehr gering, was sich in einer niedrigen Auflösungsgeschwindigkeit zeigt. Eine Verbesserung der Auflösungsgeschwindigkeit lässt sich neben einer Erhöhung der Sättigungslöslichkeit c_s durch eine Vergrößerung der Oberfläche erzielen. Die Sättigungslöslichkeit ist ein Ergebnis des Gleichgewichts von „in Lösung gehenden Molekülen“ und von „an Partikeln rekristallisierenden Molekülen“ (Müller et al. 1999). Die Sättigungslöslichkeit steht nach der Kelvingleichung (*Gleichung 1.2*) in Korrelation zur Teilchengröße. Verallgemeinert kann man sagen, dass die Löslichkeit mit abnehmendem Teilchendurchmesser zunimmt (Rasenack und Müller 2002).

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = \frac{2 \cdot \gamma \cdot V}{R \cdot T \cdot r} \quad \text{Gleichung 1.2}$$

S/S_0 : Verhältnis der Löslichkeit von sehr kleinen (S) und sehr großen (S_0) Teilchen

γ : Grenzflächenspannung (fest-flüssig)

V : molares Volumen (Molekulargewicht / Dichte)

R : allgemeine Gaskonstante ($8,134 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T : absolute Temperatur

r : Teilchenradius

Daneben haben die Temperatur, das Vorliegen einer bestimmten polymorphen Form, das Lösungsmedium und der Lösungsdruck einen Einfluss auf die Sättigungslöslichkeit. Der Lösungsdruck ist gemäß Laplace (*Gleichung 1.3*) umgekehrt proportional zur Teilchengröße und proportional zur Grenzflächenspannung.

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{r} \quad \text{Gleichung 1.3}$$

p : Lösungsdruck

γ : Grenzflächenspannung (fest-flüssig)

r : Teilchenradius

Die Erhöhung der Sättigungslöslichkeit durch eine Verkleinerung der Partikelgröße wirkt sich allerdings erst im Bereich sehr kleiner Partikelgrößen signifikant aus.

Eine Vergrößerung der Oberfläche, die nach Noyes-Whitney (*Gleichung 1.1*) ebenfalls positiv die Lösungsgeschwindigkeit beeinflusst, kann durch eine Reduktion der Teilchengröße zum Beispiel durch Mikronisierung erzielt werden. Bei den klassischen Verfahren, den sogenannten abbauenden Verfahren, werden große Partikel durch mechanische Einwirkung (Druck, Reibung, Stoß, Schlag, Scherung) zerkleinert. Werden Teilchengrößen von $< 50 \mu\text{m}$ erzielt, so wird der Zerkleinerungsprozess als Feinstmahlung bezeichnet, bei der Mikronisierung erreicht man Teilchengrößen von $< 10 \mu\text{m}$ (Rasenack und Müller 2002). Eine Veränderung der Oberfläche kann aber auch mit einer Verschlechterung der Benetzung, mit elektrostatischer Aufladung oder Erhöhung der Kohäsivität einhergehen, was sich negativ auf die Auflösung auswirken kann.

Eine weitere Methode zur Vergrößerung der Teilchenoberfläche ist die Herstellung von festen Dispersionen (Solid Dispersions). Es handelt sich dabei um eine feindisperse Verteilung eines oder mehrerer Feststoffe in einem wasserlöslichen Träger (Carrier). Abhängig von der Herstellung entstehen Produkte wie zum Beispiel echte feste Lösungen, glasartige Lösungen oder Suspensionen, Kopräzipitate oder Komplexe. Die Herstellung kann mittels Schmelz- oder Löseverfahren erfolgen. Im Kapitel 1.1.2 werde ich am Beispiel Griseofulvin auf Möglichkeiten zur Herstellung fester Dispersionen eingehen. Chiou und Riegelman (1971 a), Serajuddin (1999) sowie Leuner und Dressman (2000) geben eine gute Übersicht über die Herstellung und Anwendung fester Dispersionen.

Arzneistoffe können bei gleicher chemischer Zusammensetzung in verschiedenen kristallinen Formen vorkommen. Diese Kristallformen werden auch als polymorphe Modifikationen bezeichnet. Auch kristalline Lösungsmitteladdukte unterscheiden sich ebenfalls in der Kristallstruktur von lösungsmittelfreien Kristallen. Da hier mindestens 2 Komponenten (Arzneistoff und Lösungsmittel) vorhanden sind spricht man von Pseudopolymorphie. Handelt es sich bei dem Lösungsmittel um Wasser, spricht man von Hydraten. Polymorphe Arzneistoffe unterscheiden sich in den physikalisch-chemischen Eigenschaften wie zum Beispiel Schmelzpunkt, Schmelzwärme, spezifische Wärme und Löslichkeit (Haleblian und McCrone 1969). Die thermodynamisch weniger stabile Form besitzt somit häufig eine bessere Wasserlöslichkeit und ergibt damit eine höhere Sättigungskonzentration, was sich in erhöhter Lösungsgeschwindigkeit und verbesserter Resorption zeigen kann. Da die polymorphen Modifikationen mit Veränderungen in der Kristallstruktur einhergehen, lassen sie sich mittels Thermoanalyse und Raman-Spektroskopie auseinanderhalten.

Liegen die Moleküle nicht in einem Kristallgitter, sondern zufällig angeordnet vor, spricht man von amorphen Festkörpern. Diese sind thermodynamisch instabil, dadurch muss weniger Energie für die Auflösung der Substanz verwendet werden. Diese Löslichkeitsdifferenzen zwischen amorphen und kristallinen Verbindungen können auch mit Unterschieden bezüglich der Bioverfügbarkeit einhergehen (Hancock und Parks 2000). Das Vorliegen amorpher Zustände kann neben Röntgendiffraktometrie auch mittels Thermoanalyse oder Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden (Frömmling et al. 1986, Wartewig und Neubert 2002).

1.1.1.1.2 In-vitro Freisetzung

In-vitro Freisetzungstests (Dissolutionstests) sollen die Abgabe des oder der wirksamen Bestandteile eines Arzneimittels unter standardisierten Bedingungen simulieren. Bei schwerlöslichen Arzneistoffen wird die Auflösungsgeschwindigkeit zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Bioverfügbarkeit. In diesen Fällen kommt der Bestimmung des Auflösungsverhaltens bzw. der Lösungsgeschwindigkeit besondere Bedeutung zu. Das Wissen über das Freisetzungsverhalten ermöglicht Aussagen über die Beeinflussungen der Wirkstofffreigabe durch physikalische Eigenschaften des Wirkstoffs, durch Hilfsstoffe und durch die Verfahrenstechnik bei der Arzneimittelentwicklung. Des Weiteren ist es ein Kriterium der pharmazeutischen Qualität, wird zur Überwachung der Chargeneinheitlichkeit herangezogen und kann auch Hinweise auf physikalische und chemische Veränderungen geben. Werden unterschiedliche Zubereitungen untereinander verglichen, können Hinweise auf die zu erwartende in-vivo Bioverfügbarkeit gewonnen werden.

Zur Durchführung von Auflösungs- und Freisetzungsversuchen sind in der Literatur eine Vielzahl an Methoden beschrieben worden. In den nationalen und internationalen Arzneibüchern wird zwischen geschlossenen (z. B. Drehkörbchen (Basket), Blattrührer (Paddle)) und offenen Systemen (z. B. Durchflusszelle, Stricker-Lösemodell (Stricker 1969)) unterschieden. Die Testgeräte der offiziellen Methoden sind exakt dimensioniert und die Untersuchungsparameter verbindlich festgelegt worden (Siewert et al. 2003). Die variablen Größen sind der Drehkörper, das FreisetzungsmEDIUM, die Rührgeschwindigkeit, Probenahmezeitpunkte und unter Umständen die Temperatur (Möller 2003). Da es sich bei der Freisetzungsprüfung um eine Konventionmethode handelt, müssen die Parameter genau eingehalten werden.

1.1.1.2 Resorption

Unter Resorption oder Absorption versteht man die Aufnahme eines Stoffes von einer Körperoberfläche (z. B. Haut, Schleimhäute, Magen-Darm-Trakt) oder aus einem Gewebe (z. B. Muskelgewebe) in die Blutbahn oder das Lymphgewebe. Die meisten Arzneistoffe werden, obwohl eine systemische Wirkung erwünscht ist, extravasal peroral verabreicht. So muss der Arzneistoff auf dem Weg in den Blutkreislauf durch die Membranen (Schleimhäute) des Gastrointestinaltrakts, analog den Nahrungsbestandteilen, diffundieren. Schleimhäute stellen - bedingt durch ihre Phospholipid-Doppelschicht (Abb. 1.1) mit nach innen gerichteten hydrophoben Enden - Lipidbarrieren dar. In die Membran reichen nach dem Fluid-Mosaik-Modell (Singer und Nicolson 1972) Proteinmoleküle, die die Funktion von Carriern wahrnehmen können. Der Hauptresorptionsort im Gastrointestinaltrakt für Arzneistoffe ist der Dünndarm.

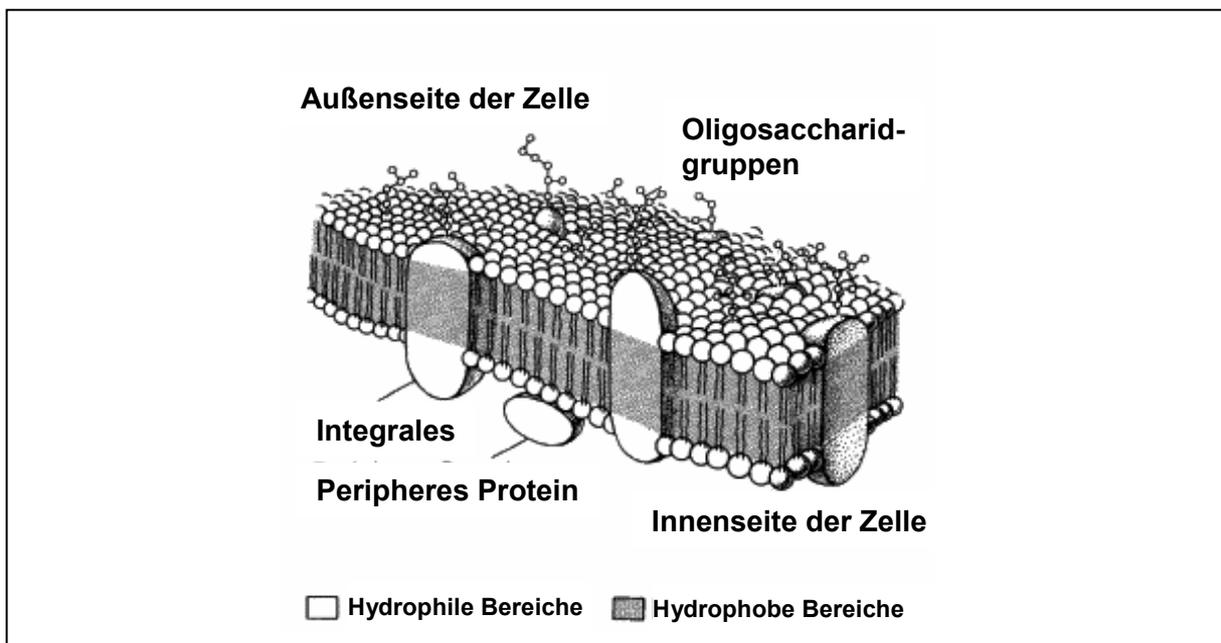


Abb. 1.1 Fluid-Mosaik-Modell

Der Magen spielt wegen seiner kleinen Resorptionsfläche von 0,1-0,2 m² nur eine untergeordnete Rolle. Nur schwach saure Arzneistoffe ($pK_a > 2$) werden zum Teil im Magen resorbiert. Voraussetzung ist eine gute Lipidlöslichkeit der nichtionisierten Form. Nachdem der Arzneistoff den Magen verlassen hat, das ist bei Flüssigkeiten und kleineren Partikel schneller der Fall als bei Tabletten, gelangt er über den Pylorus, in den 4-6 m langen Dünndarm. Dieser besteht aus dem Duodenum, dem Jejunum und dem Ileum. Charakteristisch für den Dünndarmbereich ist die außerordentlich große Oberfläche, die durch Faltung der Schleim-

haut (Kerckring'sche Falten) sowie Zotten und Mikrovilli erreicht wird. Durch diese speziellen morphologischen Strukturen beträgt die Resorptionsfläche etwa 200 m^2 , was nach Wilson (1962) einer Vergrößerung gegenüber einem einfachen Zylinder um den Faktor 600 entspricht (Abb. 1.2). Unter den Epithelzellen liegt ein engmaschiges Kapillarnetz, das neben der Versorgung der Zotten vor allem der Aufnahme der resorbierten Stoffe dient.

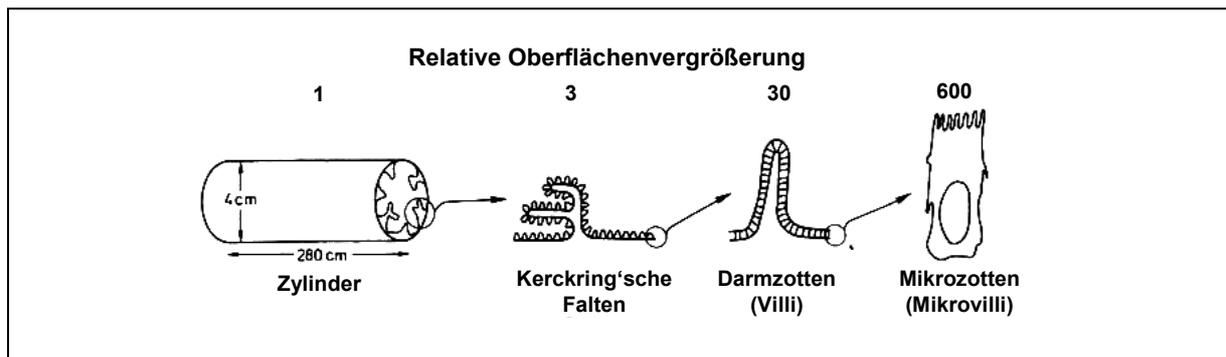


Abb. 1.2 Vergrößerung der Dünndarmoberfläche durch spezielle morphologische Strukturen (Wilson 1962)

1.1.1.2.1 Transportmechanismen

Der Transport von Arzneistoffen kann zum einen durch die Zelle hindurch (transzellulär) und zum anderen zwischen den Zellen hindurch (parazellulär) erfolgen. Der transzelluläre Transport wird wiederum in aktiven und passiven Transport unterteilt (Abb. 1.3).

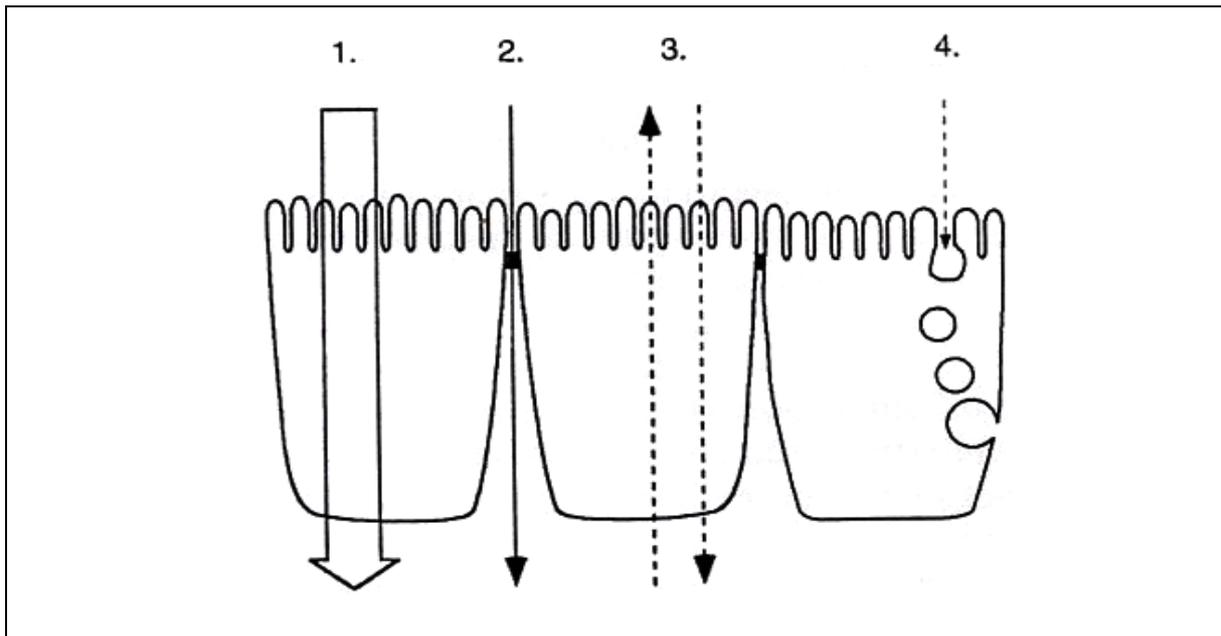


Abb. 1.3 Intestinale Transportmechanismen (Artursson et al. 1996)

1.: passiver, transzellulärer Transport

2.: passiver, parazellulärer Transport

3.: aktiver, transzellulärer Transport

4.: Endozytose

1.1.1.2.2 Transzellulärer Transport

a) Passiver Transport

Der passive Transport ist der am meisten verbreitete Transportmechanismus für Arzneistoffe. Die Verteilung von Wirkstoffen zwischen zwei Kompartimenten erfolgt ohne Energieaufwand entlang eines Konzentrationsgradienten bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes. Die treibende Kraft ist die Brown'sche Molekularbewegung. Dieser Vorgang kann durch das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz beschrieben werden (*Gleichung 1.4*). Voraussetzung für den passiven Transport ist, dass der Arzneistoff gelöst vorliegt. Eine Wasserlöslichkeit muss also vorhanden sein. Für den Transport durch die Membran muss der Arzneistoff aber eine gewisse Lipophilie aufweisen. Eine gute Resorption wird für Arzneistoffe angegeben, deren Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log\text{-P}$) zwischen 1 und 3 liegt. Die meisten Arzneistoffe sind schwache Säuren bzw. Basen; sie liegen im wässrigen Milieu zum größten Teil in neutraler (undissoziierter) Form vor (Koch und Ritschel 1986).

$$J = \frac{dn}{A \cdot dt} = -D \cdot \frac{dc}{dx}$$

Gleichung 1.4

J Flux (Teilchenstrom je Zeit- und Flächeneinheit)

dn/dt je Zeitintervall diffundierende Stoffmenge (Teilchen- bzw. Diffusionsstrom)

A Fläche (senkrecht zur x-Richtung)

dc/dx Konzentrationsgradient

D Diffusionskoeffizient

b) Erleichterte Diffusion

Unter erleichteter Diffusion ist ein passiver Transport in Richtung des Konzentrationsgefälles mit Hilfe eines Carriers unter Energieverbrauch zu verstehen. Er spielt vor allem beim Transport von Glucose in die Erythrozyten, Leber- und Muskelzellen und bei der Absorption des Komplexes Vitamin B12 + „intrinsic factor“ eine Rolle (Pfeifer et al. 1995).

c) Aktiver Transport

Beim aktiven Transport werden Stoffe gegen ein Konzentrationsgefälle mit Hilfe von Transportproteinen (Carrier) unter Verbrauch von Stoffwechselenergie durch die Membran transportiert. Der Transport lässt sich sättigen und ist hemmbar. Beta-Laktamantibiotika und Cephalosporine werden zum Beispiel mit Hilfe des H⁺/Peptid-Symporters (PEPT 1) resorbiert, der normalerweise Di- und Tripeptide transportiert (Barthe et al. 1999).

d) Endozytose

Bei der Endozytose werden Makromoleküle aktiv durch Einstülpungen der Membran aufgenommen und transportiert. Diese Transportprozesse spielen jedoch für Arzneimittel nur eine untergeordnete Rolle.

1.1.1.2.3 Parazellulärer Transport

Die Zellen des Darmepithels sind durch tight junctions miteinander verbunden. Diese netzwerkartige Verbindung dient als Barriere gegen das Hin- und Herdiffundieren von Substanzen zwischen der apikalen und basolateralen Membrandomäne. Hydrophile Substanzen und Moleküle mit einem Durchmesser kleiner als die Poren (7-10 Å), was bei kugelförmigen Molekülen einer Molmasse bis ca. 150 g/mol, bei langgestreckten Molekülen sogar einer Molmasse bis ca. 400 g/mol entspricht, können diese ungehindert passieren. Dazu gehören zum

Beispiel Wasser, Ethanol, Glycerol und Harnstoff. Treibende Kraft ist der hydrostatische und osmotische Druck. Es handelt sich also auch um einen passiven Transport, allerdings nicht für lipophile Stoffe, sondern für nicht-ionisierte, hydrophile Moleküle. Bei Cholera, kommt es ausgelöst durch das von *Vibrio cholerae* gebildete Cholera-toxin zu einer Hypersekretion von Cl⁻-Ionen und Wasser, was zu schwerem reiswasserähnlichem Durchfall u. Erbrechen führt.

Man sollte aber den parazellulären Transport nicht überschätzen, wenn man bedenkt, dass die tight junctions nur 0,1 % der Oberfläche des Darmepithels ausmachen (Nellans 1991). Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Erhöhung des parazellulären Transports durch Zugabe von Resorptionsverbesserern wie zum Beispiel Silikonpartikeln (Foraker et al. 2003) oder Phospholipide (Liu et al. 1999).

1.1.1.2.4 Resorptionsmodelle

Zur Bestimmung der Permeabilität von Arzneistoffen als Kenngröße der Resorption sind prinzipiell drei Methoden möglich. Generell gilt, je genauer eine Methode die in-vivo Bioverfügbarkeit beschreibt, umso komplexer ist sie. Eine gute Übersicht über mögliche Methoden und deren Vor- bzw. Nachteile geben Ungell (1997) und Barthe (1999). Ich möchte hier nur auf die in-vitro Untersuchungen mittels Zellkultur-Modellen näher eingehen. Diese werden in den letzten Jahren vermehrt zur Studie von Transportprozessen eingesetzt. Sie können zur Untersuchung der Permeation und des Metabolismus von Arzneistoffen verwendet werden. Zellmodelle sind schneller und billiger als in-vivo Untersuchungen. Sie bieten eine Reihe weitere Vorteile gegenüber den anderen Methoden. Dazu gehören die gute Reproduzierbarkeit, die Reduktion von Tierversuchen, das Einsetzen von menschlichem anstelle von tierischem Gewebe, die schnelle Untersuchung der Permeabilität und des Metabolismus an der jeweiligen biologischen Membran und das Studium von Transportmechanismen. Die Zellmodelle müssen für die jeweilige Fragestellung sorgfältig ausgewählt und charakterisiert werden. So sind die Passagezahl, die Fähigkeit zur Differenzierung, die Heterogenität der Zelllinie, aber auch Untergrundmaterial, Medienauswahl, Aussaatdichte und Wachstumsdauer Faktoren, die den Transport und physiologische Vorgänge beeinflussen.

Zur Untersuchung von Transportvorgängen von Arzneistoffen durch die intestinalen Enterozyten werden Caco-2-, HT-29- oder T84-Zelllinien, die alle aus menschlichen Adenokarzinomen isoliert wurden, in den letzten Jahren erfolgreich eingesetzt (Barthe et al. 1999). Im Folgenden möchte ich das Caco-2 Zellmodell genauer beschreiben.

1.1.1.2.5 Das Caco-2 Zellmodell (Subklon TC-7)

Die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurde aus einem primären Kolonrektaladenokarzinom kultiviert, das 1974 einem 72-jährigen Patienten entnommen wurde (Fogh 1977). Sie sind bei der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich. Die Eigenschaften der Caco-2 Zellen hinsichtlich Morphologie, Transport und Permeabilität sind denen der intestinalen Zellen sehr ähnlich (Grasset et al. 1985, Pinto et al. 1983, Hilgers et al. 1990). Am Ende der Proliferationsphase, diese dauert nach Pinto et al. (1983) bis zum 9. Tag nach der Aussaat, kommt es zu einer spontanen Differenzierung der Zellen (Chantret et al. 1988). Differenzierte Caco-2 Zellen zeigen die für Enterozyten typische morphologische Polarisation mit Bürstensaum, die Bildung von Enzymen und Transportern und die Ausbildung von Tight junctions (Pinto et al. 1983). So ist dieses Modell heute weit verbreitet und wird auch in der pharmazeutischen Industrie im Rahmen der Entwicklung neuer Arzneistoffe eingesetzt. Artursson et al. (1993) konnten durch eine vergleichende Ermittlung der Permeationskoeffizienten aus humanen in-vivo Experimenten mittels intestinaler Perfusionstechnik und aus Caco-2 Resorptionsversuchen zeigen, dass für passiv transzellulär transportierte Arzneistoffe eine gute Korrelation zwischen in-vivo und in-vitro Experimenten besteht.

Bei der Caco-2 Zelllinie handelt es sich um eine polyklonale Zellpopulation, die ihren Genotyp verändert, was auch zu phänotypischen Variationen führt (Wilson et al. 1990). So war man bestrebt, Klone aus Caco-2 Zellen zu gewinnen. Dies ist mehreren Arbeitsgruppen gelungen (Woodcock et al. 1991, Chantret et al. 1994)

An unserem Lehrstuhl wurde der TC-7 Subklon etabliert (Awadallah 2003), welcher aus der Passage 198 der Caco-2 Zelllinie (T wie Tardif = spät) stammt und von A. Zweibaum, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif (Frankreich)) isoliert wurde. Diese wurden unter anderem von Grès et al. (1998) und Caro et al. (1995) charakterisiert. Der TC-7 Klon ist bezüglich der morphologischen Eigenschaften den polyklonalen Caco-2 Zellen sehr ähnlich. Transportuntersuchungen von 20 Arzneistoffen haben sowohl für die Caco-2 als auch für den TC-7 Klon ähnliche Ergebnisse geliefert (Gres et al. 1998). Somit eignet sich das TC-7 Zellmodell zur Untersuchung des Arzneistofftransports. Caco-2 Zellmodelle kommen auch bei der Untersuchung von Metabolisierungsvorgängen zum Einsatz. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass sich die Expression der CYP3A mRNA in Caco-2 Zellen und TC-7 drastisch unterscheidet (Engman et al. 2001). So ist die CYP3A4 Expression im TC-7 Subklon um das 4 bis 14fache geringer als in den Caco-2 Zellen.

1.1.2 Griseofulvin als schwerlöslicher Arzneistoff

1.1.2.1 Einleitung

Griseofulvin gehört zu den am längsten bekannten antibiotischen Wirkstoffen. Es wurde erstmals von Oxford et al. (1939) aus dem Pilz *Penicillium griseofulvum* isoliert. Später wurde dann diese Substanz auch als Stoffwechselprodukt anderer *Penicillium*-Arten, wie zum Beispiel *Penicillium janczewskii* (Grove und McGovan 1947) oder *Penicillium patulum* (Brian et al. 1949) nachgewiesen. Brian (1949) konnte eine antibiotische Wirkung gegen Pilze zeigen. Griseofulvin wurde zunächst als Fungizid im Pflanzenschutz angewandt. Erst seit 1958 wurde Griseofulvin, nach den grundlegenden Versuchen von Gentles (1958) mit *Trichophyton*-infizierten Meerschweinchen, auch als Therapeutikum bei menschlichen Dermatophyten angewandt. Griseofulvin hat ein schmales, nur Dermatophyten (*Trichophyton*-, *Microsporum*- und *Epidermophyto*-Arten) umfassendes Wirkungsspektrum. Sie werden von Wirkstoffkonzentrationen zwischen 0,1 und 5 µg/ml gehemmt. Griseofulvin wird auch heute noch systemisch oder topisch bei Mykosen der Haut, der Haare und der Nägel angewendet. Die Therapie erstreckt sich in der Regel auf einen Zeitraum von 2 Wochen bis zu mehreren Monaten, je nach Dicke des Hornstoffs. Das gesamte pilzbefallene Keratin muss durch gesundes ersetzt werden. Griseofulvin hemmt als Spindelgift die Mitose und den zellulären Stofftransport, wobei die Zellwandsynthese durch eine gestörte Mikrotubulifunktion beeinträchtigt wird. Weiterhin besitzt Griseofulvin eine hohe Affinität zu Keratin und vermindert so dessen Abbau durch Keratinasen. So sinkt das Nährstoffangebot für den Pilz und seine Wachstumsgeschwindigkeit nimmt ab (Kerridge 1986). Obwohl einige Synthesen für Griseofulvin bekannt sind, ist es immer noch wirtschaftlicher die Substanz biosynthetisch aus Kulturen von *Penicillium patulum* zu gewinnen.

Griseofulvin wurde zunächst als „Grisovin“ (Fa. Glaxo) mit einer mittleren Partikelgröße von 10 µm auf den Markt gebracht. Bedingt durch eine Reihe von Therapieversagern wurden Untersuchungen unternommen, die gezeigt haben, dass eine Verkleinerung der Partikelgröße - und somit eine Vergrößerung der Partikeloberfläche - zu einem höheren Blutspiegel führt (Duncan et al. 1962, Atkinson et al. 1962). So besteht zwischen dem Logarithmus der spezifischen Oberfläche und der Bioverfügbarkeit ein direkter Zusammenhang. Die absorbierte Wirkstoffmenge kann auf das 2,5fache gesteigert werden, wenn man die spezifische Oberfläche von ungefähr 0,4 m²/g (Partikelgröße: 10 µm) auf 2,5 m²/g (Partikelgröße: 2,7 µm) vergrößert. Dies führte zur Einführung eines Präparates mit mikronisiertem Wirkstoff, dessen Dosis im Vergleich zur ursprünglichen Zubereitung auf die Hälfte von 1 g auf 500 mg verringert wurde; die Griseofulvinplasmaspiegel blieben jedoch gleich (Atkinson et al. 1962).

Griseofulvin gehört somit zu den ersten Arzneistoffen, für die eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit durch Mikronisierung gezeigt werden konnte. In den folgenden Jahren wurden weitere Möglichkeiten zur Vergrößerung der Teilchenoberfläche erforscht. So konnte die Herstellung von festen Dispersionen eine weitere Verbesserung der Auflösungs geschwindigkeit und eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit bringen. Sekiguchi et al. (1961 und 1964) konnten zeigen, dass durch die Bildung eines Eutektikums zwischen einem schwerlöslichen Arzneistoff und einem leichtlöslichen Carrier (z. B. Harnstoff) eine Verbesserung der Auflösungs geschwindigkeit erzielt werden kann. Goldberg et al. (1966) führten die höhere Auflösungs geschwindigkeit auf die Bildung einer festen Dispersion zurück und zeigten dieses Phänomen am Beispiel Griseofulvin und Bernsteinsäure. Dabei konnte nicht nur die Auflösungs geschwindigkeit, sondern auch die Löslichkeit erhöht werden. Mayersohn und Gibaldi (1966) gelang es durch die Bildung von Copräzipitaten die Auflösungs geschwindigkeit zu verbessern. Dabei werden aus einer Lösung von Griseofulvin und Polyvinylpyrrolidon in Chloroform nach Entfernen des Lösungsmittels Copräzipitate erhalten. In diesem Feststoffsystem liegt der Arzneistoff im makromolekularen Träger molekulardispers vor. Chiou und Riegelman (1969) untersuchten die Einbettung von Griseofulvin in Polyethylenglykol 6000 und konnten zuerst anhand von Versuchen an Hunden (Chiou und Riegelman 1970) und später an Probanden (Chiou und Riegelman 1971 b) zeigen, dass die Resorption durch Schaffung einer festen Dispersion erhöht werden kann. In den USA ist Griseofulvin in fester Dispersion unter dem Namen Fulvicin P/G in den Dosierungen 125 mg, 165 mg, 250 mg und 330 mg bis heute erhältlich. Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung einer festen Dispersion ist die Sprüheinbettung in Polyvinylpyrrolidon 30 (Junginger 1977). Frömming et al. (1986) konnten Arzneiformen durch Lyophilisation von Lösungen mit Griseofulvin bzw. Griseofulvin/Mannit-Gemischen in Dioxan oder Dioxan/Wasser (1+1) erhalten, die eine stark erhöhte Lösungsgeschwindigkeit zeigten. In den 90er Jahren wurden erfolgreiche Versuche unternommen, die Bioverfügbarkeit von Griseofulvin durch Zugabe von Polyacrylsäurederivaten als bioadhäsive Polymere (Tur et al. 1997) und durch Einbettung in Cyclodextrin (Veiga et al. 1998) zu erhöhen.

1.1.2.2 Physikalische Kenndaten

Griseofulvin ist ein ringgeschlossener, vinyloger Carbonsäuremethylester, dessen Strukturformel in Abb. 1.4 wiedergegeben ist. Es geht hierbei klar hervor, dass es sich bei Griseofulvin um eine neutrale Substanz handelt, die keine lösungsbegünstigenden polaren Gruppen besitzt. Griseofulvin gilt als praktisch wasserunlösliche Verbindung. Wichtige physikalisch-chemische Kenndaten sind in Tab. 1.2 dargestellt.

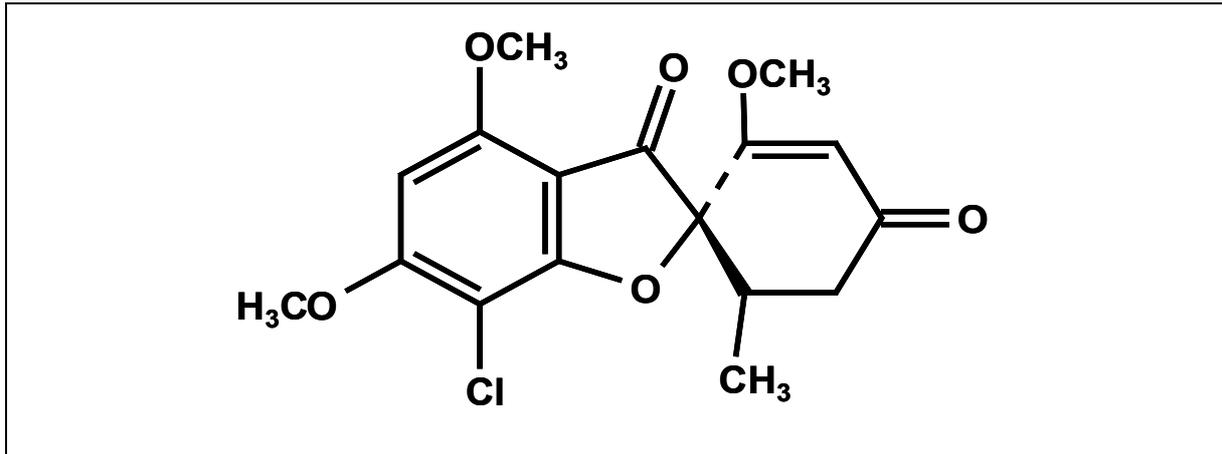


Abb. 1.4 Strukturformel von Griseofulvin

Tab. 1.2 Physikalisch-chemische Kenndaten von Griseofulvin

Griseofulvin Monographie¹	
Synonym	(1'S,6'R)-7-Chlor-2',4,6-trimethoxy-6'-methylspiro-[benzofuran-2(3H),1'-[2]-cyclohexen]-3,4'-dion
Indikation	Mykosen der Haut, Haare und Nägel
Formel	C ₁₇ H ₁₇ ClO ₆
CAS-Nr.	126-07-8
Molekularmasse	352,8
Eigenschaften	Weißes bis schwach gelbliches, sehr feines Pulver, im Allgemeinen mit einer Teilchengröße von höchstens 5 µm, gelegentlich jedoch über 30 µm, fast geschmacklos.
Löslichkeit	Leicht löslich in Dimethylformamid, Tetrachlorethan Löslich in Trichlormethan, Dimethylacetamid Wenig löslich in Aceton, Dioxan Schwer löslich in Tetrachlormethan, Propylenglykol Sehr schwer löslich in Methanol, Ethanol Praktisch unlöslich in Wasser
Schmelzpunkt	Etwa 220 °C

¹ Daten gemäß: Ph. Eur. 4., Ausgabe 2002; Merck Index (2001); Martindale (1999); Hager's Handbuch, Band 8 (Stoffe E-O), (1993)

1.1.3 Ibuprofen als schwerlöslicher Arzneistoff

1.1.3.1 Einleitung

Ibuprofen wurde 1968 in Großbritannien, in Deutschland dann ein Jahr später, als ein nicht steroidales Antirheumatikum in die Therapie eingeführt. Es wird in niedrigen Dosen zur Behandlung von leichten bis mäßig starken Schmerzen und Fieber eingesetzt, in höheren Dosen zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen bei akuten und chronischen Arthritiden, Arthrosen und anderen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen. Die Wirkung beruht auf der Fähigkeit die Cyclooxygenasen zu hemmen. Durch den Eingriff in die Prostaglandinsynthese kann es auch zu den bei nicht steroidal Analgetika bekannten unerwünschten Wirkungen kommen, die sich in erster Linie als gastrointestinale Störungen (Übelkeit, Durchfall, Ulzerationen bis zu Blutungen und Perforationen) kenntlich machen.

In den therapeutisch verwendeten Zubereitungen kommt Ibuprofen als Racemat zum Einsatz. Es wird nach peroraler Applikation vollständig im Dünndarm resorbiert, was auf einem passiven transzellulären Mechanismus beruht (Yee 1997). Maximale Wirkstoffkonzentrationen werden nach ein bis zwei Stunden im Plasma erreicht. Die Plasmahalbwertszeit beträgt ca. zwei Stunden. Danach wird Ibuprofen nach hepatischer Metabolisierung zu Carboxyibuprofen und Hydroxyibuprofen rasch und vollständig, hauptsächlich renal ausgeschieden. Die gute Verträglichkeit und große therapeutische Breite führte dazu, dass Ibuprofen in Deutschland seit 1989 in niedrigen Dosen als Analgetikum aus der Verschreibungspflicht entlassen wurde. Später wurden dann, nachdem durch Selbstmedikation nicht wesentlich mehr Nebenwirkungen aufgetreten sind, auch höhere Dosen (400 mg) und die Anwendung bei Kindern (ab dem 6. Monat) von der Verschreibungspflicht befreit (Morck 2002). Für Ibuprofen wurde auch der Nachweis zur Wirksamkeit bei leichten und mittelschweren Migräneattacken erbracht. Eine 2001 veröffentlichte randomisierte placebokontrollierte Studie mit 660 Patienten zeigte, dass sowohl bei 200 mg wie auch bei 400 mg Einzeldosis nach 2 Stunden mehr als 40 Prozent der Patienten schmerzfrei waren, verglichen mit lediglich 28,1 Prozent der Patienten in der Placebogruppe (Codispoti et al. 2001).

1.1.3.2 Physikalische Kenndaten

Ibuprofen ist ein Phenylpropionsäurederivat, dessen Strukturformel in Abb. 1.5 wiedergegeben ist. Wichtige physikalisch-chemische Kenndaten sind in Tab. 1.3 dargestellt.

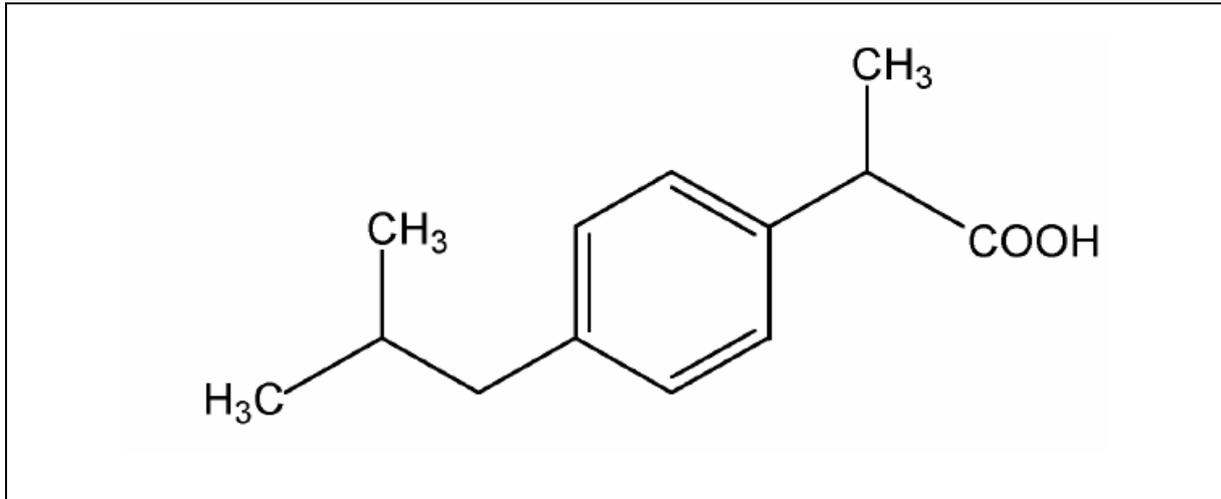


Abb. 1.5 Strukturformel von Ibuprofen

Tab. 1.3 Physikalisch-chemische Kenndaten von Ibuprofen

Ibuprofen Monographie²	
Synonym	(RS)-2-(4-Isobutylphenyl)propionsäure
Indikation	Arthrosen, Arthritiden, Migräne, Schwellungen u. Entzündungen
Formel	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
CAS-Nr.	15687-27-1
Molekularmasse	206,3
Eigenschaften	Weißes bis fast weißes, kristallines Pulver oder farblose Kristalle von charakteristischem Geruch und Geschmack
pk _A - Wert	4,4 bzw. 5,2
Löslichkeit	Leicht löslich in Chloroform, Methanol, Ethanol, Aceton, Dichlormethan Löslich in wässriger Alkalihydroxid- und Alkalicarbonat-Lösung Praktisch unlöslich in Wasser
Schmelzpunkt	75 bis 77 °C

² Daten gemäß: Ph. Eur. 4., Ausgabe 2002; Merck Index (2001); Martindale (1999); Hager's Handbuch, Band 8 (Stoffe E-O), (1993)

1.2 Mikronisierung von Partikeln mittels überkritischer Fluide

Lipophile Arzneistoffe müssen zur Verbesserung der Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit mikronisiert werden. Konventionell erfolgt die Mikronisierung durch eine Zerkleinerung von primär vorliegenden großen Wirkstoffteilchen in Mahlanlagen (Luftstrahl-, Kugelmühlen). Neben diesen abbauenden Verfahren werden zum Teil auch aufbauende Verfahren wie zum Beispiel die Ausfällung aus organischen Lösungsmitteln oder Sprühtrocknung angewandt. Viele Arzneistoffe sind jedoch empfindlich gegenüber der Temperaturbelastung, wie sie beim Vermahlen oder der Sprühtrocknung durchaus auftreten kann. Der große Nachteil der Ausfällung ist, dass zum Teil erhebliche Mengen Lösungsmittel verwendet werden, die vollständig vom Arzneistoff entfernt werden müssen. (Witschi und Doelker 1997).

Vielversprechende technische Verfahren zur schonenden Herstellung kleinster Partikeln ohne Temperaturbelastung oder Lösungsmittelverunreinigungen stellen Methoden dar, die mit überkritischen Fluiden arbeiten.

1.2.1 Überkritische Fluide und deren Anwendungsmöglichkeiten

Herrschen bei einem Stoff Drücke und Temperaturen, die oberhalb des für jede Substanz charakteristischen kritischen Punktes liegen, befindet sich dieser Stoff im überkritischen Zustand. Unter diesen Bedingungen wird auch von einem überkritischen Fluid (supercritical fluid) gesprochen. Die Abb. 1.6 zeigt schematisch das Phasendiagramm eines reinen Stoffes. Die drei durch die Kurven abgegrenzten Gebiete geben die Existenzbereiche der Phasen (fest, flüssig und gasförmig) in Abhängigkeit von Temperatur und Druck an. An jedem Punkt innerhalb dieser Flächen ist nur eine Phase beständig. Punkte auf den Kurven entsprechen Gleichgewichten zwischen den angrenzenden Phasen. Am Schnittpunkt der drei Kurven sind alle drei Phasen gleichzeitig beständig. Der Phasenübergang flüssig-gasförmig endet im kritischen Punkt, der durch den kritischen Druck p_c und die kritische Temperatur T_c definiert ist. Oberhalb dieses Punktes existiert eine einzige homogene Phase, die Fluidphase. Hier verschwindet die Phasengrenzfläche zwischen Flüssigkeits- und Gasphase. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften liegen zwischen denen von Gasen und Flüssigkeiten. So werden flüssigkeitsähnliche Dichten erreicht, was zu einem beträchtlichen Lösevermögen für viele organische Substanzen führt (Hannay und Hogart 1879). Die Werte für die Viskosität oder den Diffusionskoeffizienten liegen zwischen denen von Gasen und Flüssigkeiten. Durch geeignete Wahl von Druck und Temperatur können diese Eigenschaften in weiten Grenzen variiert werden. In Tab. 1.4 ist die Größenordnung der physikalisch-chemi-

schen Eigenschaften von Extraktionsmitteln in verschiedenen Aggregatzuständen dargestellt.

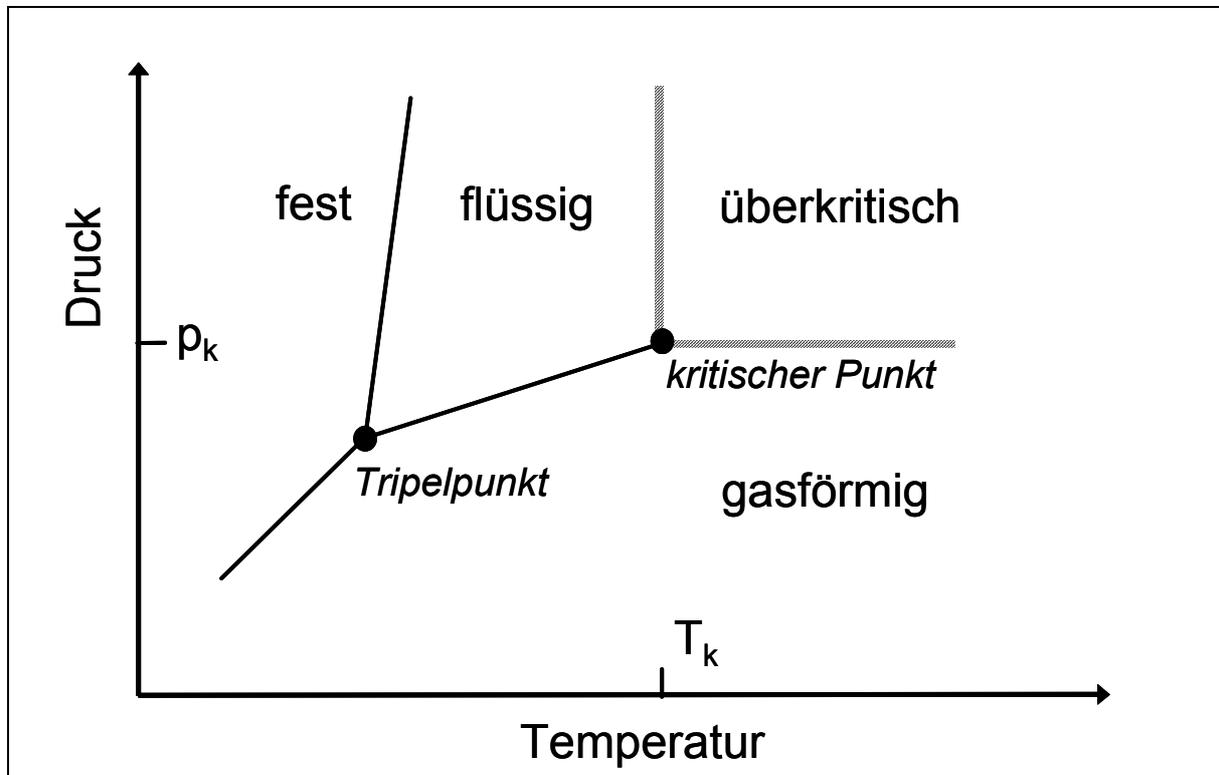


Abb. 1.6 Schematisches Phasendiagramm eines reinen Stoffes

Tab. 1.4 Größenordnungsvergleich physikalischer Daten von Gas, überkritischem Gas und Flüssigkeit

Eigenschaft	Aggregatzustand		
	Gasförmig	Überkritisch	Flüssig
Dichte (d) [g/cm ³]	10 ⁻³	3 * 10 ⁻¹	1
Diffusionskoeffizient (D) [cm ² /s]	10 ⁻¹	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
Dielektrizitätskonstante (ϵ) ³	1,089 (p = 60 bar)	1,371 (p = 78 bar)	
Dynamische Viskosität (η) [g/(cm s)]	10 ⁻⁴	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻²

³ (ϵ) für CO₂ bei T = 305,15 K aus: Moriyoshi et al. (1993)

Das gute Lösungsvermögen überkritischer Fluide und das verbesserte Massentransportverhalten, bedingt durch einen höheren Diffusionskoeffizienten, werden seit Jahren erfolgreich bei der Hochdruckextraktion pharmazeutisch wirksamer Bestandteile von Ölen oder Gewürzen aus Pflanzen angewendet. (Stahl et al. 1987, Kaiser et al. 2001). Die meisten der über 100 Anlagen weltweit, die mit überkritischen Fluiden arbeiten, beschäftigen sich mit diesem Bereich (Perrut 2000). Daneben wird überkritisches Fluid auch in der Chromatographie eingesetzt. Die Supercritical Fluid Chromatography (SFC) ist eine Trennmethode, mit deren Hilfe sowohl analytische als auch präparative Fragestellungen beantwortet werden können (Chester und Pinkston 2000). Während des letzten Jahrzehnts wurden neue Einsatzmöglichkeiten für überkritische Fluide erforscht. Dazu gehören Imprägnierung von porösen Materialien, die Reinigung von Textilien aber auch Präzisionsreinigung von komplexen Bauteilen etwa in der Elektronikindustrie (Jostan et al. 1995) und der Einsatz von überkritischen Fluiden als Lösungsmittel für chemische Reaktionen (Oakes et al. 2001). Einen großen Bereich nimmt die Forschung auf dem Gebiet der Partikelherstellung mit überkritischen Fluiden ein.

1.2.2 Überkritisches Kohlendioxid

Kohlendioxid hat sich aus verschiedenen Gründen als überkritisches Fluid sowohl für die Extraktion als auch für die Partikelherstellung erfolgreich durchgesetzt. So besitzt es mit 31,1 °C eine relativ geringe kritische Temperatur und mit 73,8 bar einen ebenfalls gut zu realisierenden kritischen Druck. Des Weiteren ist Kohlendioxid nicht brennbar oder explosiv, es wirkt bakteriostatisch und ist physiologisch unbedenklich. Im Vergleich zu den meisten anderen organischen Lösungsmitteln ist Kohlendioxid umweltfreundlich. Es fallen keine Abluft, keine Abwässer und keine verbrauchten Lösungsmittel an. Kohlendioxid ist in großen Mengen relativ günstig zu bekommen. Überkritisches Kohlendioxid ist ein lipophiles und schwaches Lösungsmittel. Dies bedarf größerer Lösungsmitteldurchsätze verglichen mit organischen Lösungsmitteln. Um weniger lipophile Stoffe noch ausreichend in überkritischen Fluiden zu lösen, können geringe Mengen eines geeigneten organischen Lösungsmittels, wie zum Beispiel Methanol, Ethanol oder Aceton als Cosolvens zugegeben werden. Gurdial et al. (1993) zeigten die Wichtigkeit dieser Cosolventien am Beispiel von Salicylsäure. So konnte die Löslichkeit in überkritischem Kohlendioxid bei 55 °C und 100 bar durch die Zugabe von 3,5 % Methanol um fast das 100fache gesteigert werden. Ein Nachteil hierbei ist, dass das Cosolvens wieder entfernt werden muss. Neben der Verwendung von überkritischem Kohlendioxid als Lösungsmittel kann es auch als Antisolvens dienen, was bei den verschiedenen Verfahren zur Herstellung von Partikeln auch zum Einsatz kommt (Subramaniam et al. 1997, Subra und Jestin. 1999, Tiwari und Udupa 1999, Tom und Debenedetti 1991 a).

1.2.3 Verfahren zur Partikelherstellung mit überkritischen Fluiden

In den letzten Jahren wurde die Partikelherstellung zu einer immer wichtigeren Anwendung für überkritische Fluide. Je nach Herstellungsmethode und -bedingungen lassen sich Partikel unterschiedlichster Formen und Größen erzeugen. Diese können bis zum Mikro- oder Nanometerbereich reichen. Das überkritische Fluid kann dabei je nach Verfahren als Lösungsmittel oder als Fällungsmittel verwendet werden. Die Verfahren, mit denen Partikel hergestellt werden können, lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen (Palakodaty und York 1999). Eine Literatur- und Patentübersicht über die Verfahren und die hergestellten Partikel geben Jung und Perrut (2001).

1.2.3.1 Fällung aus überkritischer Lösung (RESS-Verfahren)

RESS steht für die schnelle Entspannung überkritischer Lösungen (RESS = Rapid Expansion of Supercritical Solution). Hierbei wird das Lösevermögen überkritischer Fluide für bestimmte Substanzen ausgenutzt (Phillips und Stella 1992). Der zu mikronisierende Feststoff wird zunächst in einem überkritischen Fluid gelöst. Anschließend wird die überkritische Lösung durch eine Düse auf Umgebungsdruck entspannt, wobei die Dichte des Lösungsmittels abnimmt. Dabei nimmt das Lösevermögen des Feststoffes ab und es entstehen Mikro- bzw. Nanopartikel (Donsi und Reverchon 1991). Da auf organische Lösungsmittel verzichtet werden kann ist dieses Verfahren für die Herstellung von Arzneistoffen interessant. Des Weiteren geht das überkritische Fluid nach dem Entspannen wieder in den gasförmigen Zustand über, für das Produkt entfallen somit aufwändige Wasch- und Trocknungsschritte. Die produktschonende Mikronisierung temperaturempfindlicher Substanzen ist durch die Auswahl eines Fluides mit niedriger kritischer Temperatur möglich. Eine gute Übersicht geben Tom und Debenedetti (1991 b).

Die Partikelgröße wird neben der Düsengeometrie hauptsächlich durch die Parameter Druck, Temperatur und Massenfluss bestimmt. So führen eine Erniedrigung der Vorexpansionstemperatur und eine Erhöhung des Drucks zu kleineren Partikeln (Alessi et al. 1996, Türk et al. 2002 a). Grund dafür ist, dass eine Druckerhöhung mit einer Erhöhung der Dichte und somit mit einem höheren Massenfluss durch die Düse einhergeht. Dieser sorgt, wie im Übrigen auch eine Temperaturerniedrigung, für eine geringere Partikelkonzentration. Dabei ist das Partikelwachstum vermindert, was zu kleineren Partikeln führt.

Neben der Mikronisierung kann das RESS-Verfahren auch für die Herstellung von Polymerfilmen oder -fasern wie zum Beispiel Celluloseacetat (Aniedobe und Thies 1997), Polyethy-

lenglykol (Weidner et al. 1996), Polymilchsäure und Polyglykolsäure (Tom und Debenedetti 1991 a), Polymethylmethacrylat, Polyvinylchlorid, Polyesterol und Polypropylen (Matson et al. 1997, Petersen et al. 1987) und für die lösungsmittelfreie Herstellung von bioabbaubaren Mikropartikeln auf Basis von Polymilchsäure bzw. Polyglykolsäure eingesetzt werden (Kim et al. 1996). Neuere Untersuchungen zeigen, dass das RESS-Verfahren zur gezielten Gewinnung polymorpher Formen herangezogen werden kann. In Abhängigkeit der Betriebsbedingungen können verschiedene polymorphe Formen hergestellt werden, wie von Gosselin et al. (2003) für Carbamazepin und von Vemavarapu et al. (2002) für Chlorpropamid gezeigt werden konnte. Viele Stoffe sind jedoch nicht ausreichend im überkritischen Fluid löslich. Wenn die Löslichkeit kleiner als 0,01 % (m/m) beträgt, ist das Verfahren nicht praktikabel. In Tab. 1.5 ist dargestellt, welche Arzneistoffe schon erfolgreich mit Hilfe des RESS-Verfahrens mikronisiert bzw. in Mikropartikel eingebettet wurden.

Tab. 1.5 Literaturübersicht zu Arzneistoffen, die mit Hilfe des RESS-Verfahrens mikronisiert bzw. in Mikropartikel eingebettet wurden

Arzneistoff	SCF	Ergebnis	Literatur
Mikronisierung:			
ASS	CO ₂	Partikelgröße: 2-5 µm	Domingo et al. 1997
Benzoessäure	CO ₂	Partikelgröße: 2-8 µm	Domingo et al. 1997
Benzoessäure	CO ₂	Partikelgröße: 0,8-1,2 µm	Türk 1999
Benzoessäure	CO ₂	Partikelgröße: 0,2-0,5 µm	Türk et al. 2002 a
Carbamazepin	CO ₂	Gewinnung verschiedener polymorpher Formen Partikelgröße: 0,5-2,5 µm	Gosselin et al. 2003
Carotinoide	CO ₂ + EtOH	Partikelgröße in Dispersion: < 1 µm	Best et al. 1979
Celecoxib	CO ₂	Agglomerierte Nanopartikel	Perrut et al. 2002
Chlorpropamid	CO ₂	Gewinnung verschiedener polymorpher Formen	Vemavarapu et al. 2002
Cholesterol	CO ₂	Partikelgröße: D ₅₀ = 0,4 µm	Krüber et al. 2000
Cholesterol	CO ₂	Partikelgröße: < 0,35 µm	Türk 1999
Coffein	CO ₂	Partikelgröße: 1-10 µm	Subra und Debenedetti 1996

Arzneistoff	SCF	Ergebnis	Literatur
Cyclosporin	CO ₂	Partikelgröße in Dispersion: < 0,41-0,54 µm	Young et al. 2000
β-Estradiol	CO ₂	Partikelgröße: 1 µm	Krukonis 1984
Griseofulvin	CHF ₃	Partikelgröße: 0,2-0,5 µm	Türk et al. 2002 a
Griseofulvin	CHF ₃	Nadeln: 13,4-36,4 µm Kugelförmige Partikel: 0,9-1,4 µm	Reverchon et al. 1995
Ibuprofen	CO ₂	Partikelgröße: D ₅₀ = 2,5 µm	Charoenchaitrakool et al. 2000
Lecithin	CO ₂	Partikelgröße: < 1 µm	Krukonis 1984
Lovastatin	CO ₂ + 5 % MeOH	Partikelgröße: 10-50 µm	Larson und King 1986
Lovastatin	CO ₂	Partikelgröße: 0,1-1 µm	Mohamed et al. 1989
Medroxy- progesteron	CO ₂	Partikelgröße: D ₅₀ = 4-5 µm	Alessi et al. 1996
Nifedipin	CO ₂	Partikelgröße: 1-3 µm	Gerard und Quirin 1987
Phenacetin	CHF ₃	Partikelgröße: 10-30 µm	Loth und Hemgesberg 1986
Progesteron	CO ₂	Partikelgröße: D ₅₀ = 4-5 µm	Alessi et al. 1996
Progesteron	CO ₂	Partikelgröße: 2-5 µm	Coffey und Krukonis 1988
Salicylsäure	CO ₂	Partikelgröße: 1-10 µm	Subra und Debenedetti 1996
Salicylsäure	CO ₂	Partikelgröße: 1-5 µm (Nadeln: 1-170 µm)	Reverchon et al. 1993
Salicylsäure	CO ₂	Partikelgröße: 1-5 µm	Domingo et al. 1997
β-Sitosterol	CO ₂	Partikelgröße: 0,2-0,5 µm	Türk et al. 2002 a
Stigmasterol	CO ₂	Kugelförmige Partikel: 0,05-0,2 µm Fasern: Länge: 2-3 µm	Ohgaki et al. 1990
Testosteron	CO ₂	Partikelgröße: 2-5 µm	Coffey und Krukonis 1988
Theophyllin	CO ₂	Partikelgröße: 1-10 µm	Subra und Debenedetti 1996
α-Tocopherol	CO ₂	Tropfengröße: 0,7-3 µm	Hybertson et al. 1998

Arzneistoff	SCF	Ergebnis	Literatur
Mikropartikel:			
3-Hydroxyflavon + Eudragit E 100	CO ₂ + EtOH	Flavon mit Eudragitüberzug	Mishima et al. 1997
Flavone + PEG	CO ₂ + EtOH	Mikrosphärulen mit Flavonkern Partikelgröße: 10 µm	Mishima et al. 2000
Lidocain : PEG 8000 (20:80)	CO ₂	Solid Dispersion	Brodin et al. 2001
PLA : Lovastatin	CO ₂	Mikrosphärulen Partikelgröße: 10-100 µm	Tom et al. 1993
PLA : Naproxen	CO ₂	Mikrosphärulen Partikelgröße: 10-90 µm	Kim et al. 1996
PLA : Pyrene	CO ₂	Mikrosphärulen Partikelgröße: <100 µm	Tom et al. 1994

1.2.3.2 Fällung mit überkritischen Fluiden als Antisolvens

Die niedrige Löslichkeit vieler Substanzen in überkritischen Fluiden führte zur Entwicklung von Verfahren, bei denen das überkritische Fluid nicht als Lösungsmittel sondern als Antisolvens benutzt wird, welches die Ausfällung der Partikel aus einer Lösung erzeugt. Der gelöste Stoff kann durch zwei verschiedene Möglichkeiten ausgefällt werden: Ein Prinzip wird gas antisolvent (GAS) benannt. Dabei wird die zu mikronisierende Substanz in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Anschließend wird ein überkritisches Fluid dazugegeben, in welchem sich das organische Lösungsmittel, jedoch nicht die zu mikronisierende Substanz löst. Im überkritischen Fluid kommt es aufgrund der daraus resultierenden Volumenzunahme zu einer starken Verringerung der Dichte, was schließlich die Löslichkeit der Substanz verringert. Es kommt zu einer Ausfällung der Substanz. Für die zweite technische Umsetzung des Prinzips werden verschiedene Begriffe genannt: Precipitation from compressed antisolvents (PCA), aerosol spray extraction system (ASES) und supercritical antisolvent (SAS) Prozess. Hierbei wird die zu mikronisierende Substanz durch eine Düse in ein Druckgefäß versprüht, in dem sich ein überkritisches Fluid befindet. Dies führt zur Ausfällung der Substanz. Einen Sonderfall stellt das SEDS-Verfahren (solution enhanced dispersion by supercritical fluids) dar. Dabei werden die organische Lösung und das überkritische Antisolvens unmittelbar vor der Düse zusammengebracht (Palakodaty 1999). Der große Nachteil dieses Verfahrens ist, dass organische Lösungsmittel benötigt werden, deren vollständige Beseiti-

gung erforderlich ist. In der Literatur wird neben der Mikronisierung von Polymeren, Farbpigmenten, Katalysatoren und Supraleiter auch die Herstellung von Arzneistoffpartikel beschrieben. Mit Hilfe von überkritischen Fluiden als Antisolvens können auch reine polymorphe Formen kristallisiert werden, was von Edwards et al. (2001) beschrieben wurde. Eine Auswahl der mikronisierten Substanzen ist in Tab. 1.6 dargestellt. Eine Literaturübersicht über das Verfahren und mikronisierte Substanzen gibt Reverchon (1999).

Tab. 1.6 Auswahl einiger Arzneistoffe, die durch Fällung mit überkritischen Fluiden als Antisolvens hergestellt wurden

Arzneistoff	Lösungsmittel + überkritisches Antisolvens	Literatur
Amoxicillin	DMSO + CO ₂	Reverchon und Della Porta 1999
Ampicillin-Na	DMSO + CO ₂	Reverchon und Della Porta 1999
Fluticason-17-propionat	Dichlormethan + CO ₂	Steckel und Müller 1998
Griseofulvin	Dichlormethan bzw. Tetrahydrofuran + CO ₂	Chattopadhyay und Gupta 2001
Griseofulvin	Dichlormethan bzw. N-Methyl-2-Pyrrolidon bzw. DMSO + CO ₂	Reverchon und Della Porta 1999
Insulin	HFIP ⁴ + CO ₂	Snaveley et al. 2002
Mikropartikel: Hydrocortison in Polymilchsäure	Aceton : Dichlormethan : Isopropanol +CO ₂	Ghaderi et al. 2000
Steroide zur inhalativen Asthmatherapie	Dichlormethan bzw. MeOH + CO ₂	Steckel et al. 1997
Tetracyclin	N-Methyl-2-Pyrrolidon bzw. DMSO + CO ₂	Reverchon und Della Porta 1999
Carbamazepin: PEG 4000	Aceton + CO ₂	Moneghini et al. 2001

⁴ HFIP: 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol

1.2.3.3 Fällung aus einer gasgesättigten Lösung

Bei dem PGSS-Verfahren (particles from gas saturated solution) wird die zu mikronisierende Substanz in einem Druckgefäß zur Schmelze erhitzt, anschließend wird Gas eingeleitet. Nach Erreichen eines Gleichgewichts wird diese gasgesättigte Lösung durch eine Düse expandiert, wobei das Gas verdampft und feine Partikel entstehen. Bei diesem Verfahren wird das Gas in der geschmolzenen Substanz gelöst und nicht wie beim RESS-Verfahren die Substanz im überkritischen Fluid. Kerc et al. (1999) und Sencar-Bozic (1997) beschreiben die Mikronisierung von Nifedipin, Felodipin und Fenofibrat mit diesem Verfahren.

1.3 Feste Lipidnanopartikel (SLN)

An Trägersystemen aus und für Nanopartikel werden in den letzten Jahren große Hoffnungen geknüpft. Aber bislang sind nur einfache Formulierungen in wenigen Handelspräparaten auf dem Markt verfügbar, zum Beispiel Mizellen, Mischmizellen, Lipoplexe, Novasomen oder Emulsionen. Sie werden vor allem dermal oder parenteral appliziert (Westesen 2000). Die Nanopartikel sollen wasserunlösliche Wirkstoffe solubilisieren und somit für die Therapie verfügbar machen, Nebenwirkungen von Arzneistoffen reduzieren, die Wirkstoff-Freisetzung kontrolliert verzögern und ein Drug Targeting ermöglichen.

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich in den letzten Jahren mit dem Gebiet der festen Lipidnanopartikel (engl.: **S**olid **L**ipid **N**anoparticles - SLN) als mögliche kolloidale Arzneistoffcarrier aus Nanopartikel (Lukowski und Pflugel (1997), Westesen und Siekmann (1997), Yang et al. (1999), Müller et al. (2000), Mehnert und Mäder (2001), Cavalli et al. (2003)). Vorteile dieser Zubereitungen sind die Möglichkeit zur industriellen Herstellung über Hochdruckhomogenisation und die verglichen mit Nanopartikel auf Polymerbasis geringe Toxizität der Hilfsstoffe.

Das Matrixmaterial besteht im Gegensatz zur Lipidemulsion aus einer bei Raumtemperatur festen Lipidphase, die in einer wässrigen Emulgatorphase dispergiert ist (Müller 1998). Als Lipide und Emulgatoren kommen physiologische, gut verträgliche Stoffe zum Einsatz. Die Partikelgröße ist abhängig vom Herstellungsverfahren und liegt im Bereich zwischen 50 nm und 1000 nm. Die Herstellung erfolgt mittels Hochdruckhomogenisation, einem Verfahren, dessen großtechnische Umsetzung gut realisierbar ist. Mehnert und Mäder (2001) geben einen umfangreichen Überblick über die bisherige Entwicklung und die Einsatzmöglichkeiten von SLN.

1.4 Zielsetzung

In den letzten Jahren werden einige Versuche unternommen, Griseofulvin mit einer Partikelgröße im Mikro- bzw. Nanometerbereich mittels überkritischen Fluiden herzustellen (Reverchon et al. 1995, Reverchon und Della Porta 1999, Chen et al. 2001, Chattopadhyay und Gupta 2001). Dabei kommen sowohl das RESS- als auch das SAS-Verfahren zum Einsatz. Reverchon et al. (1995) erhalten neben kugelförmigen Partikel auch lange (13,4 bis 36,4 μm), nadelförmige Griseofulvinkristalle. Auch das SAS-Verfahren liefert solche Nadeln, deren Länge im Millimeter-Bereich liegt (Reverchon und Della Porta 1999). Mit Hilfe der SAS-EM-Technik gelingt es Chattopadhyay und Gupta (2001), Griseofulvinpartikel unter Einwirkung von Ultraschall in einer Größenordnung von 130 nm zu erzeugen. Bei diesen Untersuchungen werden außer der Teilchenmorphologie keine weiteren Charakterisierungen bezüglich Teilchengrößenverteilung, Oberfläche, thermischer Eigenschaften, Kristallinität, Auflösungsverhalten und Resorptionsverhalten des Produkts durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die vom Lehrstuhl für Technische Thermodynamik und Kältetechnik der Universität Karlsruhe hergestellten Griseofulvinpartikel im Nanobereich umfassend zu charakterisieren. Es werden Parameter bestimmt, die für die pharmazeutisch-technologische Entwicklung wichtige Aussagen liefern. Dazu gehören die Korngrößenparameter aus der Teilchengrößenbestimmung mittels Laserbeugung, die spezifische Oberfläche nach Brunauer, Emmet und Teller (BET), die Schmelztemperatur und die Schmelzenthalpie aus der dynamischen Differenzkalorimetrie, die zusammen mit den gewonnenen Daten aus der Raman-spektroskopie Rückschlüsse auf den kristallinen Zustand des RESS-Produktes zulassen. Neben den Löslichkeitsparametern wird das Auflöseprofil mittels Auflösemodell nach Stricker einschließlich der dazugehörigen Geschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell bestimmt (Hixson und Crowell 1931). Zusätzlich zu den RESS-Partikeln und dem Ausgangsmaterial (mikronisiertes Griseofulvin, Ph. Eur.) wird noch das Auflöseverhalten dreier Fraktionen umkristallisierter Griseofulvin-Proben bestehend aus deutlich größeren Partikeln und somit einer wesentlich kleineren Oberfläche und Griseofulvin in festen Dispersionen aus Polyethylenglykol 6000 bestimmt. Um Aussagen über die Resorption machen zu können, werden in-vitro-Permeationsuntersuchungen durchgeführt. Dazu wird das Caco-2/TC-7-Zellmodell eingesetzt, dieses hat sich als ein geeignetes Modell der Resorption aus dem Dünndarm erwiesen.

Um Aussagen über die Resorption in Abhängigkeit der Löslichkeit machen zu können, wird eine dynamische Methode zur Messung der Resorption eingeführt und etabliert. Aus den drei

wesentlichen Kenngrößen (Löslichkeit, Permeabilität und in-vitro-Freisetzung) kann Griseofulvin gemäß BCS klassifiziert werden.

Um die Griseofulvinkonzentration aus den Caco-2/TC-7-Zellversuchen in der Akzeptorphase bestimmen zu können, muss eine geeignete Analysenmethode gefunden werden. Dafür kommt eine effektive HPLC-Methode und für höhere Konzentrationen aus der dynamischen Messung eine UV-spektroskopische Methode unter Verwendung einer Durchflussküvette zum Einsatz. Die HPLC-Methode wird bezüglich Spezifität, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Systempräzision und Richtigkeit validiert.

Charoenchaitrakool et al. (2000) stellen mikronisiertes Ibuprofen mit Hilfe des RESS-Verfahrens her. Dabei kann die mittlere Partikelgröße auf kleiner als 2,5 µm reduziert werden. In dieser Arbeit sollen die positiven Erfahrungen der Mikronisierung von Griseofulvin in den Nanometerbereich am Beispiel Ibuprofen bestätigen werden.

Mit den Solid Lipid Nanoparticles (SLN) findet in den letzten Jahren ein nanopartikulärer Arzneistoffcarrier reges Forschungsinteresse. Diese stellen eine interessante Arzneistoff-Formulierung für Nanopartikel aus dem RESS-Prozess dar. Bis heute gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen über das Freisetzungsverhalten von Arzneistoffen aus der festen Lipidmatrix und über die gastrointestinale Resorption. Die Caco-2/TC-7-Zelllinie dient dabei als Modell für die intestinale Arzneistoffresorption. Mit Hilfe der dynamischen Messung der Resorption kann die Resorption in Abhängigkeit von der Freisetzung erfasst werden.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Tab. 2.1 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Substanz	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMax-I (D-MEM)	Art.-Nr.: 32430-027	Fa. Invitrogen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	Art.-Nr.: 14190-094	Fa. Invitrogen
Einfriermedium (DMSO)	Art.-Nr.: 11101-011	Fa. Invitrogen
Fötales Kälberserum, Ursprung: Süd Amerika	Art.-Nr. 10270-106	Fa. Invitrogen
Gentamicin 50 mg/ml	Art.-Nr. 15750-037	Fa. Invitrogen
Nicht-Essentielle Aminosäuren	Art.-Nr. 11140-035	Fa. Invitrogen
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Art.-Nr. 25200-056	Fa. Invitrogen

2.1.2 Materialien und Geräte für die Zellkultur bzw. Resorptionsversuche

Tab. 2.2 Materialien für die Zellkultur bzw. Resorptionsversuche

Substanz	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Cryoröhrchen 1,8 ml	Art.-Nr.: 340711	Fa. Nunc
Microplatte (96-Well Platten)	Art.-Nr.: 650101	Fa. Greiner
Pipette mit Spitze, steril, 10 ml	Art.-Nr.: 607180	Fa. Greiner
Pipette mit Spitze, steril, 25 ml	Art.-Nr.: 760180	Fa. Greiner
PP-Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Art.-Nr.: 616201	Fa. Greiner
PP-Röhrchen, steril, 50 ml	Art.-Nr.: 227261	Fa. Greiner

Substanz	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
PP-Röhrchen, steril, 15 ml	Art.-Nr.: 188261	Fa. Greiner
Snapwellplatten	Art.-Nr.: 3407	Fa. Corning
Transwellplatten	Art.-Nr.: 3401	Fa. Corning
Zählkammer (Neubauer-improved: Kammertiefe 0,1 mm) gemäß: DIN-Norm 12 874	Art.-Nr. 0600000	Fa. Paul Marienfeld
Zellkulturflaschen Nunclon™ Flaschen mit Filterkappe	Art.-Nr. 178905	Fa. Nunc

2.1.3 Wirkstoffe

Tab. 2.3 Wirkstoffe

Substanz	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Griseofulvin mikronisiert ⁵	Ch.-B.: E990406 Ch.-B.: E20010906	Zhonghua Pharmaceutical Factory, Shanghai (China)
Ibuprofen 50	Ch.-B.: 460490	Knoll Pharmaceuticals

2.1.4 Lösungsmittel und Chemikalien

Tab. 2.4 Lösungsmittel und Chemikalien

Substanz	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
<i>Lösungsmittel für die HPLC</i>		
Acetonitril (gradient grade)	Art.-Nr.: A/0626/17	Fa. Fisher
Aqua ad injectabilia	RO mit anschließender Destillation	Pharm. Technol. Universität Tübingen
Eisessig	Art.-Nr.: 100056	Fa. Merck
<i>Pufferlösungen (Certipur®) zum Kalibrieren des pH-Meters</i>		
Pufferlösung gebrauchsfertig pH 4,00	Art.-Nr.: 199001	Fa. Merck

⁵ Für die Bereitstellung der Substanzen danke ich Fa. Welding, Hamburg

Substanz	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Pufferlösung gebrauchsfertig pH 7,00	Art.-Nr.: 199002	Fa. Merck
Pufferlösung gebrauchsfertig pH 9,00	Art.-Nr.: 199003	Fa. Merck
<i>Sonstige Chemikalien</i>		
Aceton	Art.-Nr.: 100014	Fa. Merck
Calciumchlorid	Art.-Nr.: 102378	Fa. Merck
D(+)-Glucose-Monohydrat	Art.-Nr.: 108346	Fa. Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Art.-Nr.: 106576	Fa. Merck
Fluorescein-Natrium	Art.-Nr.: 46960	Fa. Fluka
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)	Art.-Nr.: 54461	Fa. Fluka
Kaliumchlorid	Art.-Nr.: 104935	Fa. Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Art.-Nr.: 104871	Fa. Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Art.-Nr.: 105832	Fa. Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Art.-Nr.: 105882	Fa. Merck
Natriumchlorid krist.	Art.-Nr.: 106400	Fa. Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Art.-Nr.: 106345	Fa. Merck
Natriumhydroxid 0,1 M (Titrisol®)	Art.-Nr.: 109959	Fa. Merck
Natriumhydroxid 1 M (Titrisol®)	Art.-Nr.: 109956	Fa. Merck
Natriumhydroxid Plätzchen	Art.-Nr.: 106482	Fa. Merck
4-Phenylphenol	Art.-Nr.: 424625	Fa. Sigma-Aldrich
Ortho-Phosphorsäure 85 % (m/m)	Art.-Nr.: 100563	Fa. Merck
Polyethylenglykol 6000		Fa. BASF
Polysorbat 80 (Tween 80®)		Fa. Uniqema (ICI)
Salzsäure 37 %	Art.-Nr.: 113386	Fa. Merck

2.1.5 Geräte zur allgemeinen Verwendung

Tab. 2.5 Geräte zur allgemeinen Verwendung

Gerät	Hersteller/Lieferant
Analysensiebe 45, 125, 250, 500 µm	Fa. Retsch
CO ₂ -Brutschrank	Fa. WTN Binder Labor Technik
Diffusionskammer	Universität Tübingen
Durchflussküvette QS-1.000 (UV-Absorption)	Fa. Hellma
Eppendorf Easypet 4420 (Pipetierhilfe-Gerät)	Fa. Eppendorf
Halbmicrosmometer	Fa. Knauer
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Fa. Zeiss
Laborwaage Mettler AE200	Fa. Mettler Toledo
Laborwaage Mettler PC1616 Delta Range	Fa. Mettler Toledo
Laborwaage Mettler PM4600 Delta Range	Fa. Mettler Toledo
Laborwaage Mettler AT 261 Delta Range	Fa. Mettler Toledo
Lösemodell nach Stricker	Fa. Sartorius
Magnetrührer, IKA Combimag RCT (heizbar)	Fa. Jahnke & Kunkel, IKA-Labortechnik
Mikroprozessor-pH-Meter 761 Calimatic	Fa. Knick
RO-Anlage Hemo-RO	Fa. Millipore
Muldestor	Fa. Wagner & Munz
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 510 H	Fa. Bandelin
Gefriertruhe (-70 °C)	Fa. GFL
Gefrierschrank Siemens Öko Plus (-30 °C)	Fa. Siemens
Kühlschrank Liebherr Premium (+5 °C)	Fa. Liebherr
Resorptionsmodell nach Stricker	Fa. Sartorius
Sicherheitswerkbank HERAsafe, Klasse 2, Typ H	Fa. Heraeus

Gerät	Hersteller/Lieferant
Schlauchpumpe, Ismatec SA, MS-Reglo	Fa. Ismatec
Schüttelwasserbad	Fa. GFL
Stiftmühle 160Z	Fa. Hosokawa-Alpine
TECAN-SpectraFluor	Fa. Tecan
Trockenschränke	Fa. Heraeus
UV-VIS Spektrometer 550 S	Fa. Perkin Elmer
UV-VIS Spektrometer Lamda 16	Fa. Perkin Elmer
Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor-R	Fa. Büchi
Vortex-Gerät	Fa. Jahnke & Kunkel,
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Fa. Heraeus

2.2 Zellkultur

Caco-2/TC-7-Zellen

Die Caco-2-Zelllinie stammt aus dem ausdifferenzierten Adenokarzinom des Kolons eines 72 Jahre alten Patienten ab. Der Subklon TC-7 stammt von Passage 198 der Caco-2-Zelllinie ab (T wie Tardif = Spät) und wurde erstmals von A. Zweibaum, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif, Frankreich) isoliert.

Die Caco-2/TC-7-Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Bock, Toxikologisches Institut, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.3 Datenverarbeitung

IBM—kompatibler Rechner; (Professional Notebook; Fa. Medion), Intel-Pentium III, 700 MHz, 256 MB RAM, 20 GB Festplatte. Die verwendete Software ist in Tab. 2.6 aufgelistet.

Tab. 2.6 Software

Software	Hersteller/Lieferant
Microsoft Word XP	Fa. Microsoft
Microsoft Excel XP	Fa. Microsoft
Microsoft Power Point XP	Fa. Microsoft
VCH Biblio für Windows	VCH Verlagsgesellschaft
UVDM 1.16	Fa. Perkin Elmer

2.3.1 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Hilfe der Analysen-Funktionen unter Verwendung von EXCEL

Um die Hypothese zu testen, dass die Mittelwerte zweier oder mehrerer Stichproben gleich sind, wird eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Dazu wird die Prüfgröße F_{emp} aus den mittleren quadratischen Abweichungen zwischen und innerhalb den Gruppen berechnet. Diese wird mit einem tabellierten F-Wert verglichen. Ist die Prüfgröße kleiner als der kritische F-Wert, kann die Nullhypothese nicht widerlegt werden. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Chargen. EXCEL berechnet den dazugehörigen P-Wert.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Der RESS-Prozess

RESS steht für die schnelle Entspannung überkritischer Lösungen (Rapid Expansion of Supercritical Solutions). Bei diesem Verfahren wird die Eigenschaft verdichteter Gase ausgenutzt, Stoffe zu lösen. Ursache für dieses Phänomen ist, dass beim Überschreiten eines kritischen Punktes, der durch eine kritische Temperatur und eines kritischen Drucks definiert ist, sich die physikalischen Eigenschaften eines Gases ändern und bereits bei mäßigen Drücken (von 50 bis 300 bar) flüssigkeitsähnliche Dichten erreicht werden können, was die Löslichkeit von Stoffen erhöht.

3.1.1 RESS-Anlage

In Abb. 3.1 ist schematisch ein Fließbild der RESS-Anlage dargestellt, in der von unseren Kooperationspartnern vom Institut für Technische Thermodynamik und Kältetechnik der Universität Karlsruhe Griseofulvinnanopartikel hergestellt wurden. Diese Anlage ist für Temperaturen von 300 bis 600 K und Drücke bis zu 600 bar ausgelegt.

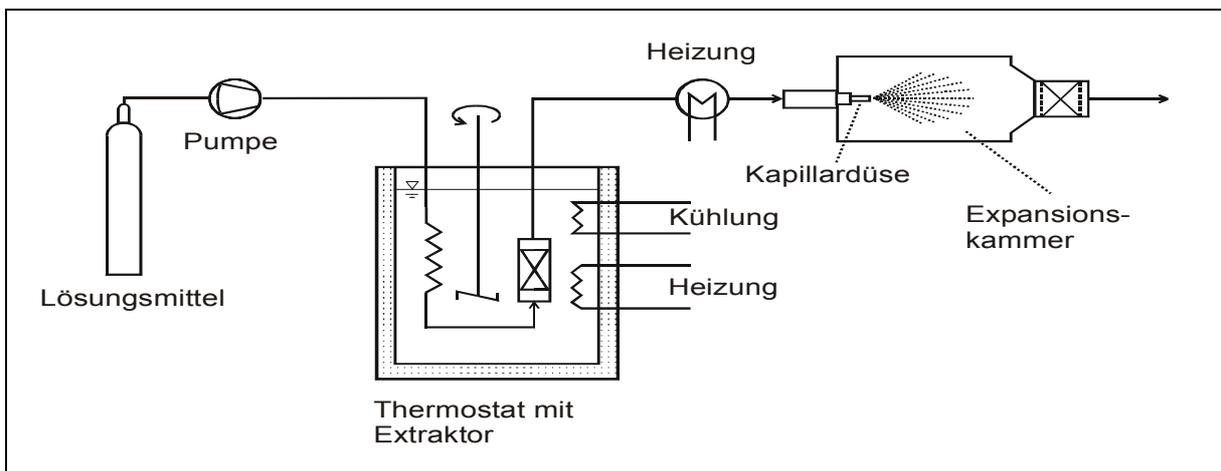


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des RESS-Verfahrens

Das gasförmige Lösungsmittel strömt zunächst über eine Trockenkolonne. Im ersten Teil der Kolonne wird das Lösungsmittel durch ein Aktivkohlebett geleitet, im zweiten Teil durch ein

Molekularsieb. Anschließend wird das gereinigte Gas mit Hilfe eines Wärmeaustauschers verflüssigt. Mittels einer Membranpumpe wird das flüssige Lösungsmittel auf den gewünschten überkritischen Extraktionsdruck p_E komprimiert. Anschließend wird das Lösungsmittel in einem Wasserbad auf die gewünschte Extraktionstemperatur T_E erhitzt und strömt dann durch den mit Arzneistoff gefüllten Extraktor mit einem Volumen von 400 cm^3 , wobei sich das überkritische Fluid mit Arzneistoff belädt. Die dabei entstandene überkritische Lösung wird durch eine beheizbare Kapillardüse mit einer Länge und einem Durchmesser von $50 \text{ }\mu\text{m}$ in eine Expansionskammer mit einer Länge von 300 mm und einem Innendurchmesser von 123 mm auf Atmosphärendruck (1 bar) entspannt. Dieser Phasenübergang von überkritisch nach gasförmig führt zu einer starken Übersättigung, wobei feinste Partikel im Nanometerbereich ausgefällt werden. Durch zwei gegenüberliegende Messfenster in der Expansionskammer kann die Partikelgröße der entstehenden Partikel mit Hilfe eines Drei-Wellenlängen-Extinktionsmessgeräts gemessen werden. Die Partikel werden auf einem mit PTFE-beschichtetem Nadelfilter abgeschieden.

3.1.2 Herstellung von RESS-Griseofulvin

Wegen der schlechten Löslichkeit von Griseofulvin in überkritischem CO_2 ($y^* = 1,6 \cdot 10^{-5}$ bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 200 bar) wurde gemäß den Untersuchungen von Reverchon (1995) das polare Lösungsmittel Trifluormethan ($y^* = 7,5 \cdot 10^{-5}$ bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 200 bar) verwendet. Die Löslichkeit ist in CHF_3 um fast das 5fache höher. Die kritischen Daten von Trifluormethan sind der Tab. 3.1 zu entnehmen.

Tab. 3.1 Kritische Daten von Trifluormethan

Gas	Summenformel	T_k (K)	P_k (bar)
Trifluormethan (R23)	CHF_3	299,5	48,7

Die Bedingungen für die Herstellung der RESS-Griseofulvinpartikel sind in Tab. 3.2 aufgelistet. In einer ersten Versuchsreihe wird die Vorexpanionstemperatur variiert um deren Einfluss auf die Partikelgröße und das thermische Verhalten zu studieren. Für die Dissolutions- und Resorptionsversuche werden die Partikel bei einer Expansionstemperatur von $115 \text{ }^\circ\text{C}$ hergestellt. Die Düsensstemperatur betrug für alle Versuche $115 \text{ }^\circ\text{C}$, um ein Verstopfen der Düse durch ausgefällte Partikel zu vermeiden.

Tab. 3.2 *Herstellungsbedingungen für RESS-Griseofulvin*

Extraktionsdruck (bar)	200
Extraktionstemperatur (°C)	50
Vorexpanstionstemperatur (°C):	(75), 115, (145)
Düsentemperatur (°C)	115
Massenstrom (g/min)	7 bis 12

3.1.3 Herstellung von RESS-Ibuprofen

Die Herstellung von RESS-Ibuprofen erfolgt gemäß Charoenchaitrakool (2000). Als Lösungsmittel wird CO₂ verwendet. Die Löslichkeit liegt bei 35 °C und einem Druck von 180 bar bei $y^* = 3,78 \cdot 10^{-3}$ (Charoenchaitrakool 2000). Die kritischen Daten von Kohlendioxid sind der Tab. 3.3 zu entnehmen.

Tab. 3.3 *Kritische Daten von Kohlendioxid*

Gas	Summenformel	T _k (K)	P _k (bar)
Kohlendioxid	CO ₂	304,2	73,8

Die Bedingungen für die Herstellung der RESS-Ibuprofenpartikel sind in Tab. 3.4 aufgelistet.

Tab. 3.4 *Herstellungsbedingungen für RESS-Ibuprofen*

Vorexpanstionstemperatur (°C):	35
Vorexpanstionsdruck (bar)	200
Extraktionstemperatur (°C)	35
Düsentemperatur (°C)	35

3.1.4 On-Line Bestimmung der Partikelgröße

Die Partikelgröße der bei der Expansion in die Gasphase entstandenen Partikel wird mit Hilfe eines Drei-Wellenlängen-Extinktionsmessgeräts (Wizard Zahoransky KG, Todtnau) unter-

sucht. Die Messung beruht auf der Extinktion dreier monochromatischer Laserstrahlen beim Durchgang durch ein Partikelkollektiv. Die Ausgangsintensität wird durch Absorption und Streuung abgeschwächt. Bei den Messungen werden sowohl die Intensitäten des transmittierten Lichts als auch die Ausgangsintensitäten der Laserstrahlen vor dem Eintritt in die Messfenster der Expansionskammer mittels Photodioden gemessen. Mittels der Lorentz-Mie-Theorie wird der anzahlvolumetrische Durchmesser d_{NV} berechnet.

3.2 Umkristallisation von Griseofulvin

Um Griseofulvinpartikel mit größeren Teilchengrößen für Vergleichsmessungen zu bekommen werden 30 g mikronisiertes Griseofulvin in 1000 ml Aceton unter leichtem Erwärmen gelöst. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fällt kristallines Griseofulvin aus. Das Lösungsmittel wird über Nacht abgezogen und anschließend bis zur Trocknungskonstanten im Trockenschrank bei 40 °C getrocknet. Die Kristalle werden im Mörser verrieben und mittels Siebung (Analysesiebe, Fa. Retsch) in 3 Partikelgrößenbereiche klassiert: klein (45-125 µm), mittel (125-250 µm) und groß (250-500 µm)

3.3 Mahlung von Ibuprofen

Zur Erzielung kleiner Partikel mittels eines abbauenden Verfahrens wird Ibuprofen 50 mit Hilfe einer Stiftmühle 160Z (Alpine) durch mechanische Einwirkung zerkleinert.

3.4 Charakterisierung der Griseofulvin- bzw. Ibuprofenpartikel

3.4.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM)

Auf ein erwärmtes, mit Tempfix bestrichenes Aluminiumplättchen wird das zu untersuchende Pulver aufgestäubt. Nicht haftende Anteile werden vorsichtig mit Hilfe eines Peleusballs heruntergeblasen. Der Probenträger wird anschließend auf Aluminiumnieten fixiert und in einem Sputtercoater (E 5100, Bio-Rad) mit Gold gesputtert. Die Parameter sind in Tab. 3.5 angegeben.

Tab. 3.5 Sputterbedingungen

Parameter	Einstellungen
Vakuum	0,02-0,03 mbar
Stromstärke	20 mA
Beschleunigungsspannung	2,1 kV
Sputterzeit	4 * 60 s

Die Proben werden in das Rasterelektronenmikroskop DSM 940 A (Carl-Zeiss) eingebracht und bei einem Vakuum von mindestens $4 \cdot 10^{-6}$ bar mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV für Ibuprofen und 10 kV für Griseofulvin bei 50-20000fachen Vergrößerungen betrachtet. Die Dokumentation erfolgt in digitaler Form mittels der Orion Digitalisierungseinheit und zugehöriger Software Version 5.25 (Orion Microscopy).

3.4.2 Partikelgrößenanalytik mittels Laserbeugungsspektroskopie

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung von Griseofulvin und Ibuprofen wird der Mastersizer 2000 S (Fa. Malvern) eingesetzt. Es hat einen Messbereich von 0,02-2000 μm . Dazu werden 2 Lichtquellen, ein Helium-Neon-Laser ($\lambda = 630 \text{ nm}$) und eine Halbleiterlichtquelle ($\lambda = 450 \text{ nm}$) eingesetzt. Aus den Streulichtanteilen des gebeugten Lichtes, das auf die Detektoren trifft, kann die Partikelgröße berechnet werden. Die Probe wird mittels Nassdispergierung (Hydro S) vermessen. Als Dispersionsmedium dient für sämtliche Griseofulvinproben demineralisiertes Wasser und für die Ibuprofenproben 0,1 N HCl. Zur Verbesserung der Benetzbarkeit wird dem Medium in beiden Fällen 0,001 % Polysorbat 80 zugegeben. Vor jeder Messung wird das Detektorsystem automatisch justiert. Dabei befindet sich das Medium in der Messkammer. Anschließend wird eine Referenzmessung ohne Probe durchgeführt und dabei die Basislinie des Systems ermittelt. Dann wird die Probe bis zu einer gewünschten optischen Konzentration (Obscuration) dazugegeben. Dazu wird das System für eine Minute mit Ultraschall (100 %) beaufschlagt. Nun erfolgt die Messung. Die Messparameter sind in Tab. 3.6 dargestellt. Die Auswertung der Korngrößenparameter (x_{10} , x_{20} , x_{50} , x_{80} , x_{90}) erfolgt mittels Mie-Theorie. Die dazu nötigen optischen Parameter sind in Tab. 3.7 aufgeführt.

Tab. 3.6 Messparameter für Partikelgrößenanalytik im Mastersizer 2000 S

Parameter	Einstellungen
Optische Konzentration	1 – 6 %
Rührergeschwindigkeit/Pumpe	2975
Ultraschall	60 %
Messung	Nach 4 min Ultraschall (n = 3; im Abstand von einer Minute)
Messzeit	10 s

Tab. 3.7 Optische Parameter für die Auswertung nach der Mie-Theorie

Substanz	Brechungsindex
Wasser	1,33
Griseofulvin	1,467
Ibuprofen	1,436

3.4.3 Spezifische Oberfläche mittels Stickstoffadsorptionsmethode nach Brunauer, Emmett und Teller (BET)

Die spezifische Oberfläche wird mit Hilfe der Stickstoffadsorptionsmethode nach Brunauer, Emmett und Teller mit einem Coulter SA 3100 (Fa. Beckman Coulter) durchgeführt. Dazu wird die zu vermessende Probe in ein Glasprobengefäß eingefüllt. Um das Totvolumen zu verringern, wird ein passender Glasstab in den Hals des Gefäßes gegeben. Anschließend wird die Probe unter Vakuum entgast, um das an den Partikeln adsorbierte Gas zu entfernen. Die Bedingungen für die Entgasung sind in Tab. 3.8 dargestellt. Zur Bestimmung der genauen Probenmasse wird die entgaste Probe auf einer Analysenwaage gewogen. Die entgaste Probe wird ebenso wie ein Referenzgefäß, das zur Bestimmung des Sättigungsdampfdrucks dient, an das Gerät angeschlossen und in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff eingetaucht. Das Totvolumen im Messgefäß wird mit Hilfe von Helium (Fa. Messer Griesheim, Reinheit: Klasse 4.6) bestimmt, als Adsorbens dient Stickstoff (Fa. Messer Griesheim, Reinheit: Klasse 5.0). Die Isothermen werden durch 10 diskrete Datenpunkte charakterisiert. Dazu wird das adsorbierte Gasvolumen gegen den Referenzdruck aufgetragen. Aus der Steigung und dem Achsenabschnitt wird die spezifische Oberfläche ermittelt. Alle Proben

werden dreimal mit unterschiedlichen Einwaagen vermessen, die Ergebnisse als Mittelwerte angegeben.

Tab. 3.8 Bedingungen für die Entgasung

Probe	Zeit	Temperatur
Griseofulvin	60 min	55 °C
Ibuprofen	360 min	25 °C

3.4.4 Dynamische Differenzkalorimetrie (DDK)

Zur Charakterisierung des thermischen Verhaltens werden die Parameter Schmelztemperatur - angegeben als Onsettemperatur - und Schmelzenthalpie bestimmt. Das verwendete Gerätesystem (Fa. Mettler Toledo) ist in Tab. 3.9 aufgeführt.

Tab. 3.9 Gerätesystem

Basissystem	Mettler TA 8000
Messzelle	DSC 820
Prozessor	TSA 811
Software	TA 8000 Thermoanalysesystem Version 4.01
Probentiegel	Standardaluminiumtiegel, 40 µl, mit gelochtem Deckel
Referenztiegel	Standardaluminiumtiegel, 40 µl, leer, mit gelochtem Deckel

Die Proben werden in ein tariertes Tiegelunterteil eingefüllt und mit einem teflonbeschichteten Metallstift leicht komprimiert, um einen besseren Wärmeübergang zu gewährleisten. Anschließend wird der Tiegel mit einem gelochten Deckel verschlossen. Nach der Bestimmung des Probengewichts auf einer Analysenwaage werden die Proben in die Messzelle eingebracht und analysiert. Die verwendete Methode ist in Tab. 3.10 beschrieben.

Zur Charakterisierung des thermischen Verhaltens werden der Schmelzpunkt und die Schmelzenthalpie aus den Thermogrammen bestimmt. Der Schmelzpunkt wird nach DIN 53 765 (1994) als Onsetpunkt bestimmt.

Tab. 3.10 DSC-Methode

	Tau-Lag (Gallium, Indium, Zinn)
Kalibrierung	Temperatur (Gallium 29,8 °C, Indium 156,6 °C, Zinn 231,9 °C, Zink 419,6 °C) Wärmestrom (Indium $\Delta H_S = 28,45 \text{ J/g}$)
Spülgas	Stickstoff Klasse 5.0, (Fa. Messer, Griesheim)
Spülrate	20 ml/min
Kühlmittel	Flüssiger Stickstoff
Temperaturbereich	25-250 °C für Griseofulvin und 25-90 °C für Ibuprofen
Heizrate	10 K/min
Einwaagen	2-8 mg

3.4.5 FT-Raman-Spektroskopie

Es ist bekannt, dass mit Hilfe des RESS-Verfahrens unterschiedliche polymorphe Formen hergestellt werden können (Vemavarapu et al. 2002, Gosselin 2003). Das RESS-Produkt kann auch amorph anfallen, was Perrut et al. (2002) für Celecoxib zeigen. Diese physikalisch-chemischen Modifikationen äußern sich zum Beispiel in einer Änderung des Raman-Spektrums (Bolton und Prasad 1981, Wartewig und Neubert 2002). Es soll nun mit Hilfe der Raman-Spektroskopie untersucht werden, ob das RESS-Griseofulvin bzw. -Ibuprofen in einer anderen kristallinen Modifikation wie die Ausgangssubstanzen vorliegen.

Die Raman-Spektroskopie liefert ähnlich der IR-Spektroskopie Informationen über Molekülschwingungen. Zur Messung wird auf die Probe eine intensive monochromatische Laserstrahlung gerichtet. Der größte Teil (99,99 %) des Laserlichtes durchstrahlt die Probe, ohne Änderung der Wellenzahl des verwendeten Lichtes. Ein sehr kleiner Anteil wird von der Substanz in alle Raumrichtungen, ohne Änderung der Wellenzahl gestreut (Rayleigh-Streuung). Ein noch viel geringerer Teil (ca. 10^{-6} %) wird dagegen unter Änderung der Wellenzahl gestreut (Raman-Streuung). Verantwortlich dafür ist die Deformierbarkeit der Elektronenhülle (Polarisierbarkeit) des Moleküls während des Schwingungsvorgangs. Die Wellenzahldifferenz zwischen den emittierten Raman-Linien und der eingestrahlten Anregungsstrahlung entspricht der zur Schwingungsanregung notwendigen Energie. Im Ramanspektrum wird diese Wellenzahldifferenz registriert und den angeregten Molekülschwingungen zugeordnet. Die Banden im Spektrum mit größeren Wellenzahlen als das Anregungslicht sind die Stokes-

Linien. Sie kommt dadurch zustande, dass das Molekül nach Abstrahlung des Lichtes noch schwingt. Die Energie der Schwingung fehlt dem Streulicht was sich in einer größeren Wellenlänge zeigt. Linien mit einer kleineren Wellenlänge und damit größerer Energie werden als anti-Stokes-Linien bezeichnet. Sie kommen dadurch zustande, dass Moleküle, bevor sie durch die Strahlung angeregt werden, schon schwingen. Dies kann zum Beispiel durch Zusammenstöße mit anderen Molekülen geschehen. Fällt ein solches schwingendes Molekül in den Grundzustand zurück, wird die Energie der Schwingung dem abgestrahlten Licht noch zusätzlich mitgegeben.

Die Spektren werden mit einem FT-Raman-Spektrometer (RFS 100/S, Fa. Bruker Optik, Ettlingen) aufgenommen. Als Anregungslichtquelle dient ein Nd:YAG Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm. Die Laserleistung an der Probe beträgt 250 mW. Weitere wichtige Parameter sind tabellarisch aufgeführt (Tab. 3.11).

Tab. 3.11 *Parameter der Ramanmessung*

Laserspot	1 mm
Wellenzahlbereich	100 cm ⁻¹ bis 3500 cm ⁻¹
Geometrie	Rückstreuung (180°)
Auflösung	4 cm ⁻¹
Gesamtmesszeit	100 s bei 64 Scans
Fourier-Transformation	Apodizationsfunktion: Blackman-Harris-4-Term Zerofilling-Faktor: 2 Phasenkorrektur: power spectrum

3.4.6 Löslichkeit

Um die Sättigungslöslichkeit von Griseofulvin und Ibuprofen zu bestimmen, werden Löslichkeitsuntersuchungen nach BCS durchgeführt. Dabei wird die Löslichkeit dann als hoch beziehungsweise gut eingestuft, wenn sich der Arzneistoff in seiner höchsten therapeutischen Einzeldosis innerhalb von 4 Stunden vollständig in 250 ml Wasser des physiologischen pH-Bereichs von 1 bis 7,5 löst. Eine niedrige Löslichkeit ist dann vorhanden, wenn die höchste therapeutische Einzeldosis nicht innerhalb von 4 Stunden vollständig in 250 ml Wasser des physiologischen pH-Bereichs von 1-7,5 in Lösung geht. Geht die höchste therapeutische Einzeldosis nur innerhalb eines eingeschränkten pH-Bereichs innerhalb von 4 Stunden in

250 ml Wasser in Lösung, kann man von einer mittleren Löslichkeit sprechen. Die höchste therapeutische Einzeldosis beträgt für Griseofulvin 500 mg und für Ibuprofen 800 mg.

3.4.6.1 Vorgehensweise

Die Löslichkeit von Griseofulvin und Ibuprofen wird in sechs Pufferlösungen mit folgenden pH-Werten untersucht: pH 1; pH 3; pH 4,5; pH 5,5; pH 6,8 und pH 7,5. Die Herstellung dieser Puffer ist aus Tab. 3.12 zu entnehmen.

Tab. 3.12 Pufferlösungen für die Löslichkeitsbestimmungen

pH-Wert	Pufferlösung	Herstellung
pH 1,0	0,1 N HCl	8,8 g NaCl; 10,04 ml HCl (37% (m/m)) in 1000 ml Wasser
pH 3,0	0,1 M Natriumphosphat-Puffer	8,8 g NaCl; 11,41 g o-H ₃ PO ₄ (85%) mit 1 N NaOH auf pH 3 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen
pH 4,5	0,1 M Natriumacetat-Puffer	8,8 g NaCl; 5,72 ml Eisessig mit 1 M NaOH auf pH 4,5 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen
pH 5,5	0,1 M Natriumphosphat-Puffer	8,8 g NaCl; 15,6 mg NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O mit 1 M NaOH auf pH 5,5 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen
pH 6,8	0,1 M Natriumphosphat-Puffer	8,8 g NaCl; 15,6 mg NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O mit 1 M NaOH auf pH 6,8 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen
pH 7,5	0,1 M Natriumphosphat-Puffer	8,8 g NaCl; 15,6 mg NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O mit 1 M NaOH auf pH 7,5 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen

Die Medien werden vor der Untersuchung auf 37 °C erhitzt. In einen 100 ml Jodzahlkolben werden 150 mg Griseofulvin eingewogen. Nach Zugabe von 75 ml des jeweiligen Lösungsmediums, wird eine Konzentration erzielt, die der höchsten therapeutischen Einzeldosis des Arzneistoffes pro 250 ml entspricht. Für Griseofulvin sind das 500 mg, für Ibuprofen 800 mg. Die Kolben werden in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad gestellt und mit einer Geschwindigkeit von 85 min⁻¹ geschüttelt. Nach Ablauf der Testdauer von 4 Stunden werden 4 ml aus den einzelnen Jodzahlkolben entnommen und bei 4500 rpm (3418 x g) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Gehalt der Proben wird in einer Dreifachbestimmung wie unter Punkt 3.7.1 bzw. 3.7.3 analysiert.

3.4.6.2 Vergleich der Löslichkeit von mikronisiertem Griseofulvin und RESS-Griseofulvin

Zur vergleichenden Bestimmung der Löslichkeit von mikronisiertem Griseofulvin und RESS-Griseofulvin werden 3 mg Griseofulvin gewogen, in einem 100 ml Jodzahlkolben in 50 ml Lösungsmedium suspendiert (entspricht 60 µg/ml) und in einem temperierten Wasserbad bei 37 °C mit 85 min⁻¹ geschüttelt. Als Lösungsmedium wird die Hanks'sche Lösung (HBSS: Hanks's Balanced Salt Solution pH = 7,4), ein gebräuchlicher Puffer für Zellkulturen, verwendet. Nach 24 Stunden werden 4 ml entnommen und bei 4500 rpm (3418 x g) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Griseofulvingehalt der Proben wird in einer Dreifachbestimmung wie unter Punkt 3.7.1 analysiert.

3.4.6.3 Vergleich der Löslichkeit von Ibuprofen 50 und RESS-Ibuprofen

Für Ibuprofen wird die Löslichkeit bei drei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Dazu werden 160 mg Ibuprofen 50 und RESS-Ibuprofen in einem 100 ml Jodzahlkolben in 50 ml Puffer pH 1, pH 5,5 und pH 7,5 (Tab. 3.12) suspendiert und in einem temperierten Wasserbad bei 37 °C mit 85 min⁻¹ geschüttelt. Die eingesetzte Ibuprofenmenge in 50 ml Puffer entspricht der maximalen Einzeldosis (800 mg) in 250 ml. Nach 4 Stunden werden 4 ml entnommen und bei 4500 rpm (3418 x g) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Griseofulvingehalt der Proben wird in einer Dreifachbestimmung wie unter Punkt 3.7.3 analysiert.

3.4.7 Auflöseverhalten

Das Auflöseverhalten von Griseofulvin und Ibuprofen wird mit Hilfe des Lösemodells nach Stricker (Fa. Sartorius AG, Göttingen) untersucht (Abb. 3.2). Es handelt sich hierbei um eine Art Durchflusszelle, mit deren Hilfe der zeitliche Verlauf der Arzneistoffauflösung im menschlichen Gastrointestinaltrakt simuliert werden kann. Dazu werden 3 mg Griseofulvin in eine auf 37 °C temperierte Lösungskammer, mit 100 ml isotonem Phosphatpuffer (pH 7,4) als künstlicher Darmsaft und 80 g Glaskugeln gegeben. Von Ibuprofen werden 25 mg in 100 ml isotone Hanks'sche Lösung pH 7,2 gegeben. Die Zusammensetzung des Puffers ist in Tab. 3.13 aufgeführt. Während der Arzneistoff in Lösung geht, werden alle 2 min 4 ml Probe entnommen, filtriert und in einem Fraktionssammler gesammelt. Gleichzeitig fließt aus einem Vorratsbehälter die gleiche Menge des Auflösungsmediums nach. So bleibt das Flüssigkeitsvolumen konstant. Bestimmt wird die aufgelöste Griseofulvinmenge in Prozent.

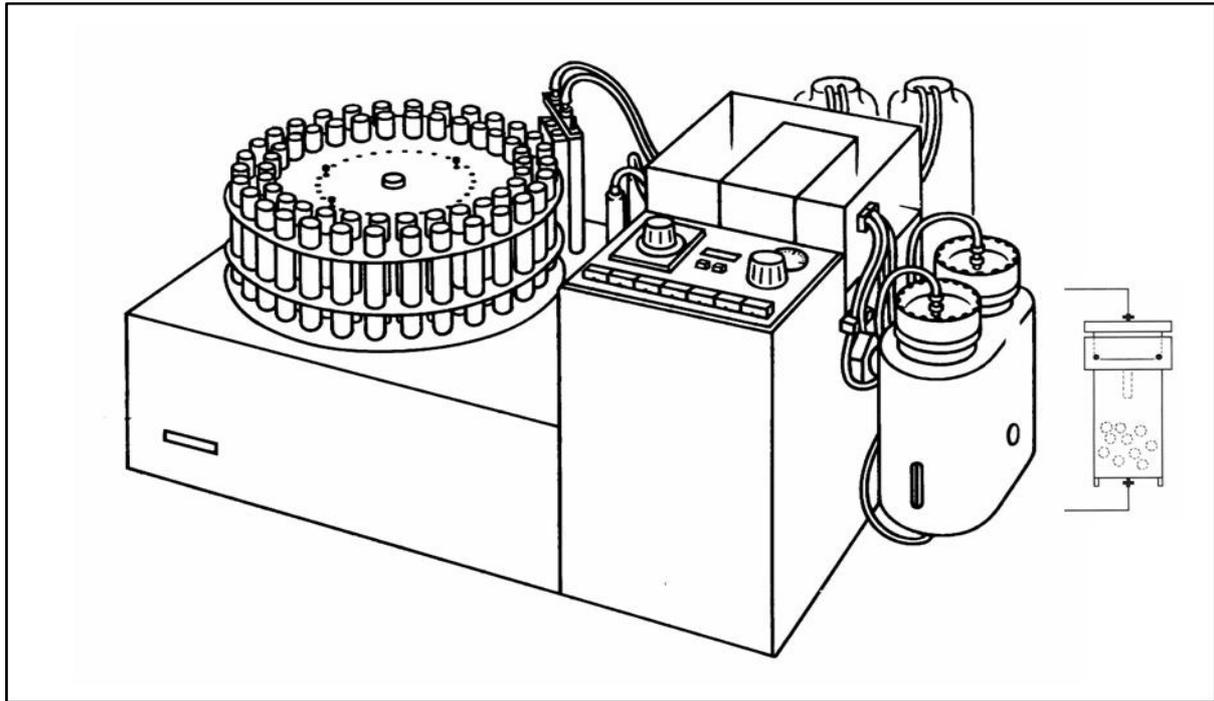


Abb. 3.2 Das Stricker-Lösemodell

Tab. 3.13 Zusammensetzung des Phosphatpuffers:

Die Substanzen werden in demineralisiertem Wasser gelöst. Anschließend wird die Lösung auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

Substanz	Mengen (g/l)	
	Phosphatpuffer pH 6,4	Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. 7,2
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat		1,19
Kaliumdihydrogenphosphat	6,81	0,19
Natriumchlorid		8,00
Natriumhydroxid	0,64	

3.4.7.1 Auflösungs geschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell

Zur Bestimmung der Auflösungs geschwindigkeitskonstanten wird die Beziehung nach Hixson-Crowell herangezogen (Gleichung 3.1).

$$M_i(t)^{\frac{1}{3}} = m_0^{\frac{1}{3}} - k \cdot t$$

Gleichung 3.1

$M_i(t)^{\frac{1}{3}}$ ungelöster Anteil zum Zeitpunkt t

$m_0^{\frac{1}{3}}$ Anfangsmasse

k Geschwindigkeitskonstante

3.4.7.2 Auflösungskoeffizienten aus der Weibullfunktion

Behr et al. (1973) konnten zeigen, dass mit Hilfe des doppelt logarithmischen Körnungsnetzes nach Rosin, Rammler, Sperling und Bennet (RRSB-Netz) Auflösungsfunktionen linearisiert werden können. Ein wichtiger Parameter dabei ist der $t_{63,2\%}$ -Wert. Dieser gibt die Zeit in Minuten an, die nötig ist, 63,2 % der eingesetzten Arzneistoffmenge aufzulösen. Nach Loth und Schäfer (1985) kann daraus der Auflösungskoeffizient $k_w = 1 / t_{63,2\%}$ berechnet werden. Dieser wurde von Loth und Hemgesberg (1986) zur Charakterisierung von mikronisiertem Phenacetin und von Charoenchaitrakool (2000) zur Charakterisierung von RESSLbuprofen eingesetzt.

3.5 Caco-2 als in-vitro Permeationsmodell

3.5.1 Transportpuffer

Für alle Permeationsversuche wird der Puffer nach Hanks verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tab. 3.14 aufgeführt. Die Substanzen werden in VE-Wasser gelöst. Nach der Herstellung wird die Lösung mit einer 0,1 N Natronlauge auf den benötigten pH-Wert eingestellt und die Osmolarität bestimmt. Diese beträgt 300 ± 25 mosmol/kg.

Tab. 3.14 Zusammensetzung des Hanks'schen Puffers:

Die Substanzen werden in demineralisiertem Wasser gelöst. Anschließend wird die Lösung auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

Substanz	Mengen (g/l)
Calciumchlorid	0,14
Kaliumchlorid	0,40
Kaliumdihydrogenphosphat	0,06
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,10
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,10
Natriumchlorid	8,00
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0,06
D-Glucose	1,00
HEPES	5,07

3.5.2 Kultivierung

Für die Permeabilitätsuntersuchungen wurden das Caco-2 Zellmodell, genauer gesagt der TC-7-Subklon, als in-vitro Permeationsmodell verwendet.

Die Kultivierung der Caco-2/TC-7 Zellen erfordert grundsätzlich aseptische Arbeitsbedingungen. Deswegen finden der Mediumwechsel und das Passagieren unter einer Sicherheitswerkbank statt. Die Zellen verbleiben die restliche Zeit in einem Brutschrank bei 37 °C, in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Vor der Durchführung von Resorptionsuntersuchungen müssen die folgenden Kultivierungsschritte unternommen werden.

3.5.2.1 Präkultivierung

Die Präkultivierung beginnt mit der Entnahme der Zellen aus flüssigem Stickstoff (-196 °C), in dem diese in Cryo-Röhrchen gelagert werden. Die auf 37 °C gebrachte Zellsuspension wird in eine 80 cm²-Kulturflasche überführt, die Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose unter Zusatz von 20 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 % nichtessentiellen

Aminosäuren und Gentamicin (50 µg/ml) als Kulturmedium enthält. Nach 24 h im Brutschrank erfolgt der erste Medienwechsel. Danach wird das Medium dreimal wöchentlich gewechselt. Das Wachstum der Zellen wird mit Hilfe eines Mikroskops überwacht. Nach Erreichen der Konfluenz (einheitlicher Zellmonolayer) würde die Differenzierung der Zellen einsetzen. Um dies zu verhindern müssen die Zellen passagiert (subkultiviert) werden.

3.5.2.2 Subkultivierung / Passagieren

Die Zellen müssen passagiert wenn, bevor eine etwa 90 %-ige Konfluenz erreicht ist. Dies ist nach ca. 5 – 7 Tagen der Fall. Dazu wird das Kulturmedium durch 5 ml Dulbecco's phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS) ersetzt, um die Zellen zu waschen. Anschließend wird zu den Zellen 3 ml einer 0,0095 % EDTA / 0,0625 % Trypsinlösung gegeben. Nach etwa 5 Minuten beginnen die Zellen sich voneinander und vom Untergrund zu lösen. Eventuell kann durch Klopfen an die Flaschenwand nachgeholfen werden. Die Zellen werden durch Zugabe von 12 ml Kulturmedium aus der Flasche gewaschen und 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellkonzentration (Anzahl der Zellen pro ml Medium) wird durch Zählen der Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Die Zellen können jetzt entweder für die Cryoeinlagerung separiert werden, mit einer Dichte 10^5 (Zellen/cm³) weiter in Kulturflaschen kultiviert werden oder mit einer Aussaatdichte von $5-6 \times 10^4$ (Zellen/cm³) für Resorptionsversuche auf Transwell- bzw. Snapwell-Inserts ausgesät werden. Für die Kultivierung von Zellmonolayern für Resorptionsversuche werden sogenannte Filter-Kammer-Systeme (Transwells® bzw. Snapwells®: 12 mm, mit einer Polycarbonatfilteroberfläche von 1 cm² und einer Porenweite von 0,4 µm) verwendet (Abb. 3.3).

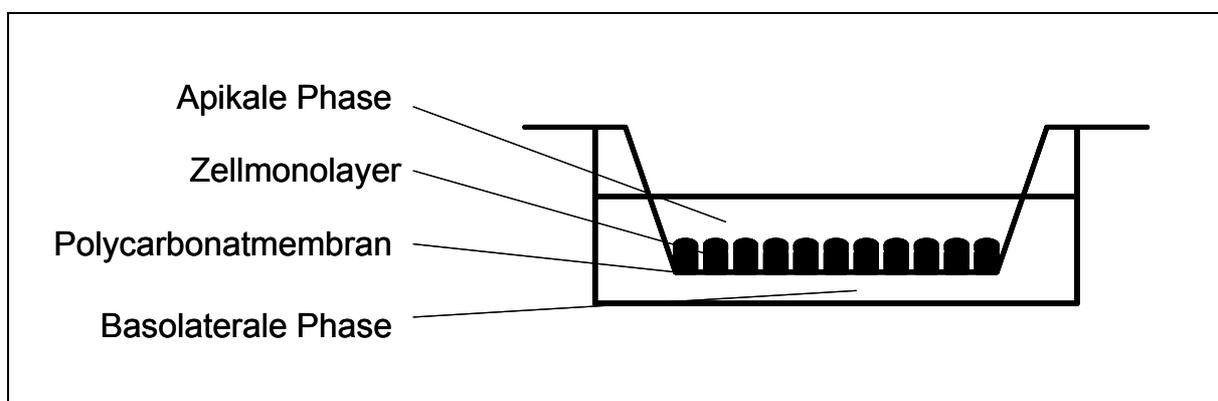


Abb. 3.3 Das Filter-Kammer-System

Das Volumen der apikalen Kammer beträgt 0,5 ml, das der basolateralen Kammer 1,5 ml Kulturmedium. Die Zellen werden über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen kultiviert. Danach haben die Zellen einen Monolayer gebildet und sind vollständig ausdifferenziert. Auch in dieser Zeit wird dreimal wöchentlich das Kulturmedium gewechselt. Die Untersuchungen werden dann mit 21 – 28 Tage alten Zellen durchgeführt.

3.5.3 Untersuchung der Integrität des Zellmonolayers

Vor der Durchführung von Transportuntersuchungen an Caco-2/TC-7-Zellen muss die Dichtigkeit des Zellmonolayers überprüft werden. Dazu kommen die folgenden zwei Methoden zur Anwendung.

3.5.3.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)

Der transepitheliale Widerstand (TEER) der Monolayer wird unter Berücksichtigung des Filterwiderstands mit Hilfe eines epithelialen Voltohmmeters (Fa. EVOM) direkt nach Mediumwechsel bestimmt.

3.5.3.2 Transport der hydrophilen Markersubstanz Fluorescein-Natrium

Fluorescein-Natrium liegt bei einem pH-Wert von 7,4 in der deprotonierten Form, also negativ geladen, vor. In dieser Form passiert der Farbstoff die Zellmembran ausschließlich passiv parazellulär, und wird somit die Dichtigkeit des Zell-Monolayers widerspiegeln. Dazu wird Fluorescein-Na in einer Konzentration von 100 µg/ml in Hanks'schem Puffer gelöst und 500 µl in das apikale Kompartiment gegeben. Der Transport wird analog der Permeationstudien (3.5.4) untersucht. Die auf der basolateralen Seite entnommenen Proben (200 µl) werden in 96-Well-Platten pipettiert und dann wie in Kapitel 3.7.4 beschrieben, analysiert.

3.5.4 Durchführung der Permeationsuntersuchungen

3.5.4.1 Statische Bedingungen (Transwell-System®)

Zunächst wird aus den Transwells® das Kulturmedium abgesaugt. Danach spült man die Kompartimente mit D-PBS-Lösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (37 °C) dreimal. Anschließend werden in das basolaterale Kompartiment 1,5 ml und in das apikale Kompartiment 0,5 ml temperierte Hanks'sche Lösung (physiologischer Transportpuffer) eingefüllt und 20 Minuten im Brutschrank äquilibriert. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit werden die

Lösungen auf beiden Seiten der Membran entfernt. Für die Versuche, in denen der Stofftransport von der apikalen zur basolateralen Seite untersucht werden soll, wird von der zuvor hergestellten Versuchslösung aus Arzneistoff in Hanks'scher Lösung (pH 7,4) 0,5 ml in das apikale Kompartiment (Donor) gegeben. In das basolaterale Kompartiment (Akzeptor) wird 1,5 ml temperierte Hanks'sche Lösung als Transportpuffer gegeben. Nun werden zeitabhängig Proben (200 µl) aus dem Akzeptorkompartiment (basolaterale Seite) entnommen. Zur Untersuchung des Fluxes von basolateraler in Richtung apikaler Seite werden 1,5 ml der vortemperierten Versuchslösungen in das basolaterale Kompartiment (Donor) gegeben. Die Entnahme erfolgt in diesem Fall aus dem apikalen Kompartiment (Akzeptor). Die entnommene Menge wird durch 200 µl vortemperierte Hanks'sche Lösung ersetzt. Während der gesamten Versuchszeit werden die Transwells® in einem auf 37 °C temperierten Schüttelwasserbad mit einer Geschwindigkeit von 85 min⁻¹ bewegt. Nach Versuchsende werden die Proben direkt analysiert oder bei – 20 °C bis zur Analyse eingefroren.

3.5.4.2 Dynamische Bedingungen (Snapwell-System®)

Bei der dynamischen Messung wird in das Donorkompartiment anstelle einer Arzneistofflösung der Arzneistoff als Feststoff gegeben. Dieser muss sich zunächst im Donormedium auflösen, bevor er die Membran passieren kann. Es wird also die Permeation in Abhängigkeit der Auflösungsgeschwindigkeit bestimmt. Dazu wurden Caco-2-Zellen, die auf einem Polycarbonatfilter (Snapwell®) mit 12 mm Durchmesser und einer Oberfläche von 1 cm² wachsen, zwischen 2 Kammern gesetzt. Die Dissolutionskammer enthält auf 37 °C temperierten Hanks'schen Puffer pH 7,4 als Auflösungsmedium. Zu Versuchsbeginn wird nun der Arzneistoff als Feststoff hinzugegeben. Dieser geht im Dissolutionsmedium in Lösung. Die aufgelöste Substanz passiert die Zellen und gelangt in die Akzeptorkammer, die 5 ml Hanks'sche Lösung pH 7,4 enthält und mit Hilfe einer Schlauchpumpe umgepumpt wird. Das Akzeptormedium passiert eine Durchflussküvette, die in einem Photometer steht. Alle 5 Minuten wird die UV-Absorption dieser Akzeptorlösung notiert und daraus der Arzneistoffgehalt bestimmt. In (Abb. 3.4) ist der Versuchsaufbau skizziert. Die temperierte Dissolutionskammer und die dazugehörige Schlauchpumpe sind aus einem Resorptionsmodell nach Stricker (Fa. Satorius) entnommen.

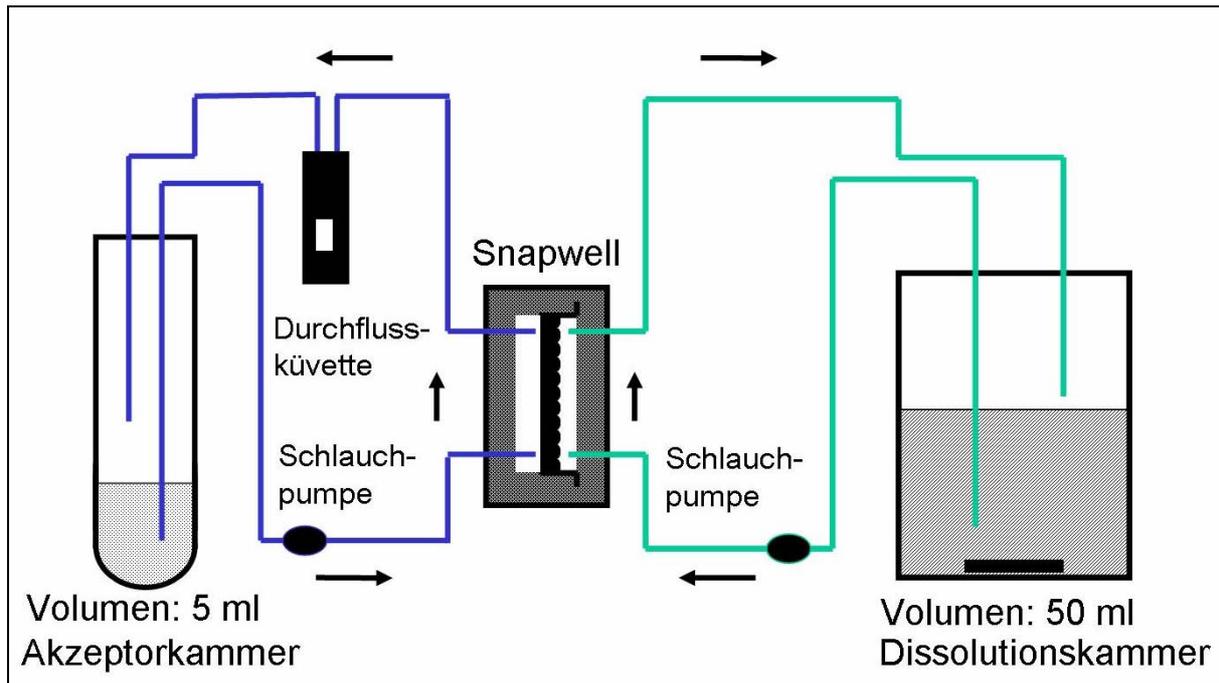


Abb. 3.4 Versuchsaufbau zur Untersuchung der Permeation in Abhängigkeit der Auflösungs-geschwindigkeit

3.5.4.3 Bestimmung des Permeationskoeffizienten

Aus der kumulativen Arzneistoffkonzentration im Akzeptorkompartiment kann der Permeationskoeffizient P als Kenngröße für die Resorption bestimmt werden (Artursson, 1990). Dazu wird die kumulative Arzneistoffkonzentration über der Zeit aufgetragen. Aus der Steigung der resultierenden Geraden kann der Arzneistofffluss durch den Monolayer dc/dt bestimmt werden. Der Permeationskoeffizient wird dann nach folgender Formel berechnet (Gleichung 3.2):

$$P = \frac{dc \cdot V}{dt \cdot A \cdot C_0}$$

Gleichung 3.2

dc/dt Substanzfluss durch den Monolayer ($\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{s})$)

V Volumen der Akzeptorkammer (ml)

A Oberfläche der Monolayer (cm^2)

C_0 Ausgangskonzentration im Donorkompartiment ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Die Kenntnis des Permeationskoeffizienten aus dem Caco-2 Zellmodell ermöglicht es, Aussagen darüber zu treffen, ob für den untersuchten Arzneistoff mit einer guten, mittleren oder schlechten intestinalen Absorption zu rechnen ist.

3.6 Griseofulvin Arzneistoffformulierung

3.6.1 Herstellung einer festen Dispersion

Die Herstellung der festen Dispersion erfolgt nach der „hot-melt“ Methode. Dazu werden 9 g PEG 6000 im Wasserbad bei 70 °C geschmolzen. 1 g Griseofulvin wird in der Schmelze homogen suspendiert. Nach dem Abkühlen wird die Mischung im Mörser zermahlen und anschließend gesiebt (125 µm).

3.6.2 Herstellung fester Lipidnanopartikel (SLN) und Nanoemulsion

Von unseren Kooperationspartnern (Katja Jores, AK Karsten Mäder, Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie, FU Berlin) werden je zwei Chargen fester Lipidnanopartikel und 2 Chargen der Nanoemulsion hergestellt, wobei die erste Charge jeweils mit mikronisiertem Griseofulvin, die zweite Charge mit RESS-Griseofulvin hergestellt wird. Die eingesetzten Komponenten sind in Tab. 3.15 aufgelistet. Bei Compritol 888 ATO handelt es sich um das Lipid Glyceroldibehenat (Ph. Eur. 4). Es besteht aus Mono-, Di- und Triglyceriden der Behensäure (C₂₂-Säure), wobei die Diesterfraktion mit einem Anteil von 40-60 % überwiegt. Dieses Lipid besitzt den GRAS (=generally recognized as safe)-Status (FDA-GRAS Notes 2003). Als Emulgator dient Poloxamer 188 (Ph. Eur. 4). Es ist ein synthetisches Blockcopolymer aus Ethylenoxid und Propylenoxid. Das Molekül besteht aus 75-85 Ethylenoxideinheiten und 25-30 Propylenoxideinheiten. Dieser Emulgator ist für die parenterale Anwendung zugelassen.

Die Herstellung der Griseofulvinzubereitungen erfolgt mittels Hochdruckhomogenisation (LAB 40, Fa. APV). Sie wird bei 85 °C, einer Temperatur über dem Schmelzpunkt des festen Lipids, und mit einem Druck von 500 bar durchgeführt. Abb. 3.5 zeigt schematisch die Herstellung der festen Lipidnanopartikel.

Tab. 3.15 Zusammensetzung fester Lipidnanopartikel und Nanoemulsion

	SLN	Nanoemulsion
Griseofulvin (Arzneistoff)	0,1 %	0,1 %
Compritol 888 ATO (Lipid fest)	10 %	
Miglyol (Lipid flüssig)		10 %
Poloxamer 188 (Emulgator)	2,5 %	2,5 %
Wasser (äußere Phase)	ad 100 %	ad 100 %

Analog dazu wird die Nanoemulsion hergestellt. Hier findet jedoch beim Abkühlen keine Rekristallisation statt.

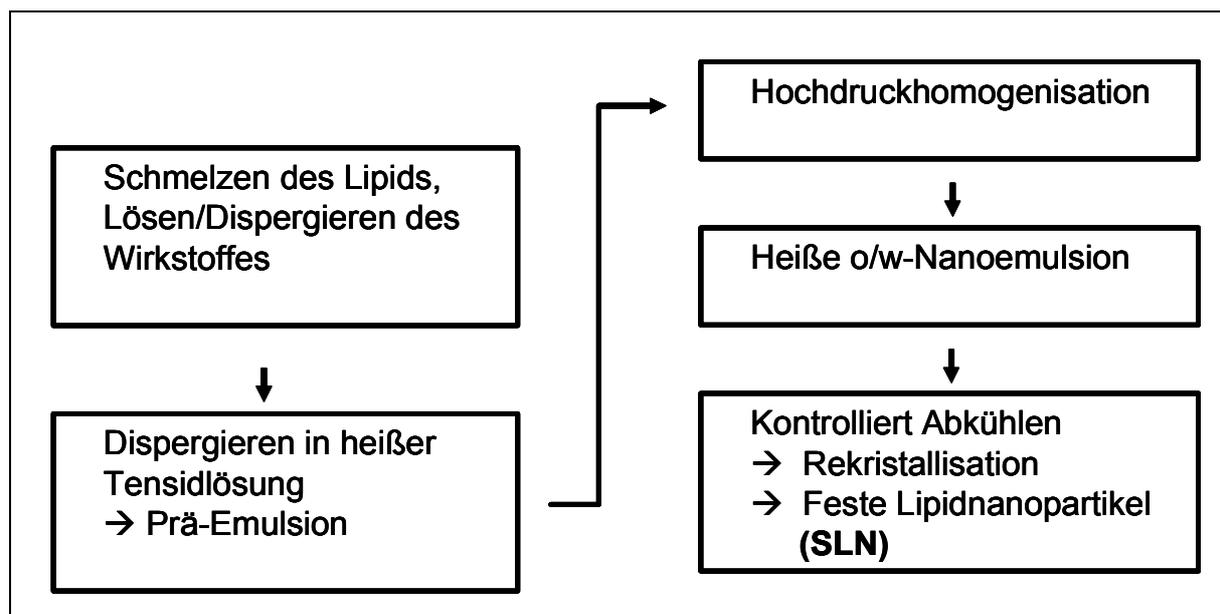


Abb. 3.5 Herstellung mittels Heißhomogenisation

3.6.2.1 Charakterisierung der festen Lipidnanopartikel und Nanoemulsion

Zur Charakterisierung der Griseofulvinzubereitungen wird die Teilchenmorphologie, die Teilchengröße und die Arzneistoffresorption am Caco-2 Zellmodell untersucht.

3.6.2.1.1 Teilchenmorphologie

Zur Bestimmung der Morphologie werden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von gefriergebrochenen Stücken (Transmission Electron Microscopy of Freeze-Fractured Specimens: FF-TEM) aufgenommen.

3.6.2.1.2 Teilchengröße

Die Korngrößenverteilung der Lipidnanopartikel wird zunächst mittels Laserbeugungsspektroskopie (LS 230, Fa. Coulter) bestimmt. Dazu werden die Proben in 120 ml Wasser dispergiert. Der Messbereich beträgt für die Laserbeugungsspektroskopie von 0,04-2000 μm . Die Auswertung der Laserbeugung erfolgt mit Hilfe der Mie-Theorie. Der Brechungsindex beträgt 1,4567. Da der Brechungsindex in diesem System sehr komplex ist und auch die hergestellten Partikel keine kugelförmige Gestalt haben, wird eine weitere Bestimmung der Teilchengröße mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (Zetasizer, Fa. Malvern) durchgeführt. Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie reicht der Messbereich von 3 nm bis 1 μm . Größere Partikel werden nicht erfasst. Neben der durchschnittlichen Partikelgröße x_{quer} wird der Polydispersitätsindex PI angegeben. Dieser erlaubt Rückschlüsse auf die Korngrößenverteilung (Tab. 3.16). Ist dieser kleiner als 0,06, so liegt beispielsweise eine monodisperse Verteilung vor.

Tab. 3.16 Polydispersitätsindex und Korngrößenverteilung

PI	Verteilung
< 0,06	monodisperse Verteilung
0,1 – 0,2	enge Verteilung
0,25 – 0,5	breite Verteilung
> 0,5	nicht auswertbar

3.6.2.1.3 Resorption

Die Bestimmung der Arzneistoffresorption erfolgt unter dynamischen Bedingungen wie in Punkt 3.5.4.2 beschrieben. Die Griseofulvinmenge in der Dissolutionskammer wird dabei so

gewählt, dass eine Dispersion mit einem Gehalt von 60 µg/ml erzielt wird. Es wird die Griseofulvinkonzentration auf der basolateralen Seite, sowie der Substanzfluss bestimmt.

3.7 Analytische Verfahren

3.7.1 UV-spektrophotometrische Gehaltsbestimmung von Griseofulvin

Der Griseofulvingehalt der Dissolutionsversuche wurde gemäß Ph. Eur. 4 über eine Messung der UV-Absorption bestimmt. Die Arzneibuchmethode wurde leicht modifiziert. Der Gehalt wurde direkt im jeweiligen Puffer bestimmt und nicht wie vorgeschrieben in wasserfreiem Ethanol. Unabhängig vom Puffer und von den jeweiligen Zubereitungen zeigt Griseofulvin ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 295$ nm, so dass jede Lösung bei dieser Wellenlänge vermessen wurde und nicht gemäß Arzneibuch bei 291 nm (Abb. 3.6). Zur Kalibrierung werden 20 Griseofulvinlösungen im Bereich von 0,50 – 11,00 µg/ml hergestellt. Jede Lösung wird dreimal bei einer Wellenlänge von 295 nm in einem Zweistrahlphotometer (S550 Fa. Perkin Elmer) gegen Puffer vermessen.

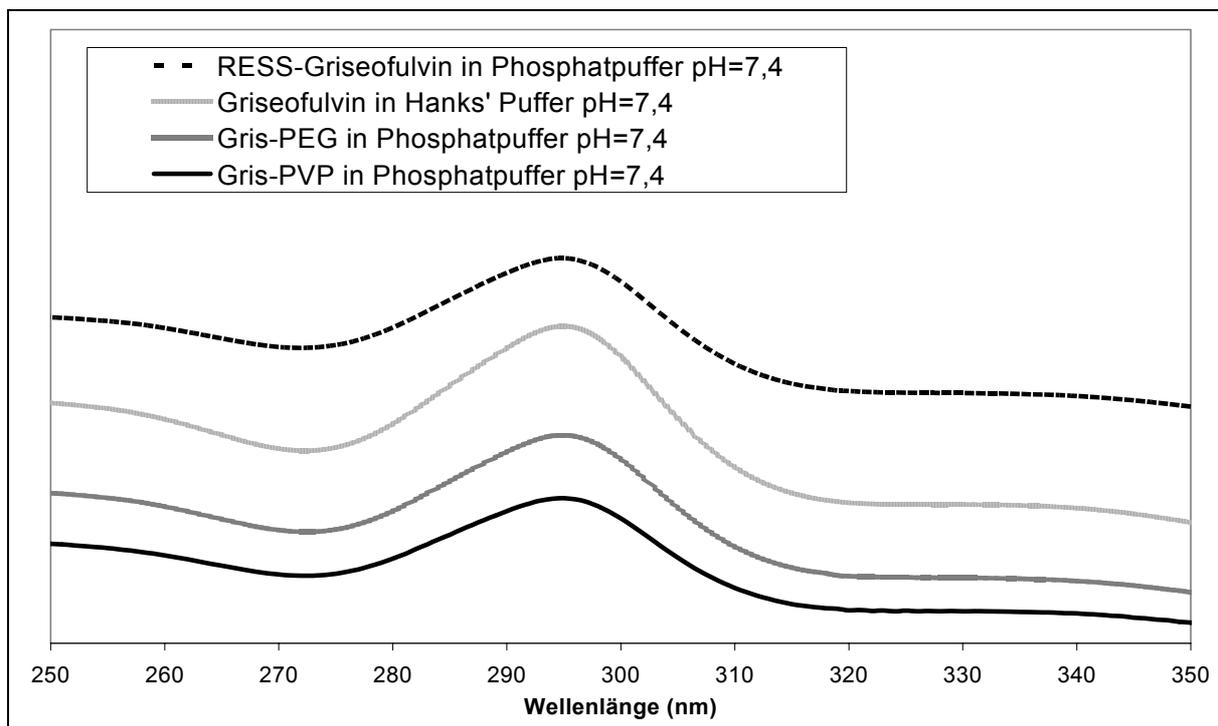


Abb. 3.6 UV-Absorptionsspektren von Griseofulvin im Bereich von 250-350 nm

3.7.2 HPLC-Methode zur Bestimmung des Griseofulvingehalts für die Resorptionsversuche

Die Griseofulvinkonzentration der Proben aus den Resorptionsversuchen in Hanks'scher Lösung als Transportpuffer wird in Anlehnung an Vudathala und Rogers (1992) mittels einer HPLC-UV-Methode bestimmt. (Tab. 3.17).

Tab. 3.17 Methodenbeschreibung

Mobile Phase	Acetonitril/Essigsäure (60 ml Eisessig ad 1l H ₂ O) (45:55 [V/V])
Interner Standard	p-Phenylphenol
Pumpe	Shimadzu LC-6A (Fa. Shimadzu Europa, Duisburg)
Flussrate	1,5 ml/min
Autosampler	AS-200A (Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt)
Injektionsvolumen	20 µl
Säule	Nucleosil 100-5 C18, 125 x 4 mm (Fa. Macherey-Nagel, Düren)
Detektor	Shimadzu SPD-6A (Fa. Shimadzu Europa, Duisburg)
Detektion	UV 295 nm (Absorbance: 0,02; Response: Slow)
Integrator	Shimadzu C-R6A (Fa. Shimadzu Europa, Duisburg)

3.7.2.1 Validierung der Methode

Die Validierung der Gehaltsmethode wurde nach den entsprechenden ICH-Guidelines (ICH Q2B 1996) zur Validierung von analytischen Methoden durchgeführt.

3.7.2.1.1 Spezifität

Die Spezifität der analytischen Methode wird durch den Vergleich der Chromatogramme der Blindproben mit den Chromatogrammen der mit Griseofulvin gespickten Proben bestimmt.

Folgende Lösungen wurden als Blindlösungen untersucht:

- Transportpuffer (Hanks balanced salt solution (HBSS))
- Interner Standard (P-Phenylphenol in Transportpuffer)

3.7.2.1.2 Linearität / Arbeitsbereich

Die Linearität eines analytischen Verfahrens ist seine Fähigkeit (innerhalb eines gewissen Bereiches) Testergebnisse zu erzielen, die der Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe direkt proportional sind. Der Arbeitsbereich eines analytischen Verfahrens ist das Intervall zwischen unterer und oberer Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, über das ein geeignetes Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität gezeigt wurde (ICH: Q2B 1996).

Zur Bestimmung der Linearität wurden aus einer Griseofulvin-Stammlösung, die aus 4,71 mg Griseofulvin in 500 ml HBBS pH 7,4 besteht, eine Verdünnungsreihe hergestellt. Daraus wurden 12 Griseofulvinlösungen mit folgenden Konzentrationen erhalten: 0,118; 0,236; 0,353; 0,471; 0,589; 0,707; 0,824; 0,942; 1,413; 1,884; 2,365; 2,836 µg/ml. 200 µl dieser Lösungen wurden mit 50 µl p-Phenylphenol-Lösung als internem Standard (18,43 µg/ml in Acetonitril) versetzt. Die nach Zusatz von 50 µl p-Phenylphenollösung resultierenden neuen Konzentrationen wurden nicht berücksichtigt, da die Analytik der Proben exakt derselben Prozedur unterzogen wurde. Das Analyseergebnis der HPLC gab somit den realen Griseofulvingehalt der Probe - also vor der Zugabe des internen Standards - an. Je Verdünnung wurden drei Einzelbestimmungen durchgeführt.

3.7.2.1.3 Nachweis und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD) eines Analyseverfahrens ist die geringste Analytmenge in einer Messprobe, die detektiert, aber nicht als quantitativer Wert bestimmt werden kann. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) eines Analyseverfahrens ist die geringste Analytmenge in einer Messprobe, die mit der notwendigen Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann. (ICH: Q2B 1996). Sie wurden aus der Kalibriergeraden mit der Reststandardabweichung der Regression und der Steigung der Kalibriergeraden gemäß ICH: Q2B (1996) berechnet.

3.7.2.1.4 Systempräzision und Richtigkeit

Die Systempräzision gibt die zufälligen Fehler des Meßsystems wieder, die bei wiederholter Analyse ein- und derselben Probe gefunden werden. Zur Bestimmung der Präzision werden

Proben mit 5 verschiedenen Griseofulvinkonzentrationen je drei- bzw. sechsfach vermessen. Die Präzision wird durch die relative Standardabweichung angegeben. Die Richtigkeit beschreibt den Grad der Übereinstimmung der gemessenen Werte mit den wahren Werten. Sie dient damit der Überprüfung systematischer Fehler beim jeweiligen Analyseverfahren. Der Nachweis der Richtigkeit der Methode wird durch die Bestimmung der Wiederfindungsrate auf sechs verschiedenen Konzentrationsniveaus erbracht.

3.7.3 UV-Spektrophotometrische Gehaltsbestimmung von Ibuprofen

Zur Kalibrierung von Ibuprofen werden 11 Ibuprofenlösungen im Bereich von 13,7 – 362,2 µg/ml hergestellt, indem in Hanks'scher Lösung pH 7,4 entsprechende Ibuprofenmenge in 100 ml Messkolben verdünnt werden. Jede Lösung wird sechsmal bei einer Wellenlänge von 264 nm in einem Zweistrahlphotometer (S550 Fa. Perkin Elmer) gegen Puffer vermessen.

3.7.4 Fluoreszenzmessung zur Gehaltsbestimmung von Fluorescein-Natrium

Der Fluorescein-Natrium-Gehalt wird mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Das Verfahren zur Gehaltsbestimmung ist in Tab. 3.18 beschrieben.

Tab. 3.18 Bestimmung des Fluorescein-Natrium-Gehalts

Verfahren	Spektrofluorimetrisch (TECAN-SpectraFluor)
Wellenlänge	Exzitation: 495 nm Emission: 535 nm
Messmodus	von oben
Schütteln der Probe	Intensität: Low Zeit: 10 s Modus: Orbital
Anzahl der Blitze	3
Integration	Start: 0 µs Zeit: 40 µs
Gain	60

Kapitel 4

Methodische Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der analytischen Verfahren

4.1.1 UV-Analytik von Griseofulvin

In der folgenden Abbildung (Abb. 4.1) ist die Kalibriergerade von Griseofulvin dargestellt. Die Methode wird im Konzentrationsbereich von 0,5 µg/ml bis 11,00 µg/ml kalibriert. Aus der Steigung der Geraden mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9993$ kann die spezifische Absorption zu $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 686$ bestimmt werden. Die Parameter der Kalibrierung sind in Tab. 4.1 angegeben.

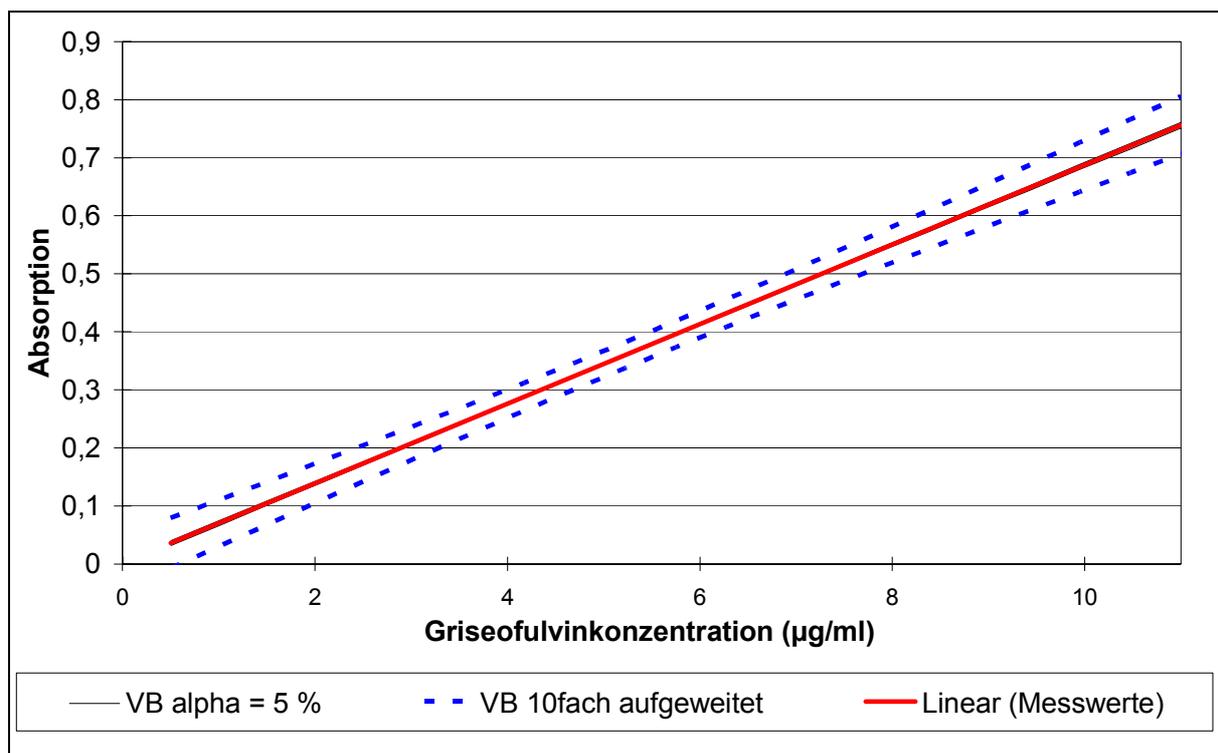


Abb. 4.1 Kalibriergerade von Griseofulvin für den linearen Bereich von 0,50 bis 11,00 µg/ml

Tab. 4.1 Kalibrierparameter von Griseofulvin (UV-Analytik)

Parameter	Griseofulvin
Messbereich [$\mu\text{g/ml}$]	0,50 – 11,00
Anzahl Kalibrierproben	60
Anzahl Freiheitsgrade	58
Steigung (Empfindlichkeit)	0,0686
Achsenabschnitt	0,001
Standardabweichung (Steigung)	0,0003
Kalibrierfunktion	$A = 0,0686 * c + 0,001$
Korrelationskoeffizient	0,9993

4.1.2 HPLC-Analytik von Griseofulvin

4.1.2.1 Ergebnisse der Validierung

Die Validierung zeigt, dass die analytische Methode in Bezug auf Spezifität, Linearität, Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Präzision und Richtigkeit wahre und richtige Werte liefert. Die Rohdaten der Validierung sind exemplarisch im Anhang zu finden.

4.1.2.1.1 Spezifität

Die Spezifität der analytischen Methode wird unter Berücksichtigung des Transportpuffers (HBBS) bei pH 7,4 und mit p-Phenylphenol als internem Standard untersucht.

Der Vergleich der Chromatogramme der Blindproben und der mit Griseofulvin gespikten Proben zeigt eine eindeutige Abtrennung des Griseofulvin-Peaks von den Peaks der Pufferlösung und des internen Standards. Die Spezifität ist somit in allen untersuchten Medien gegeben (Abb. 4.2).

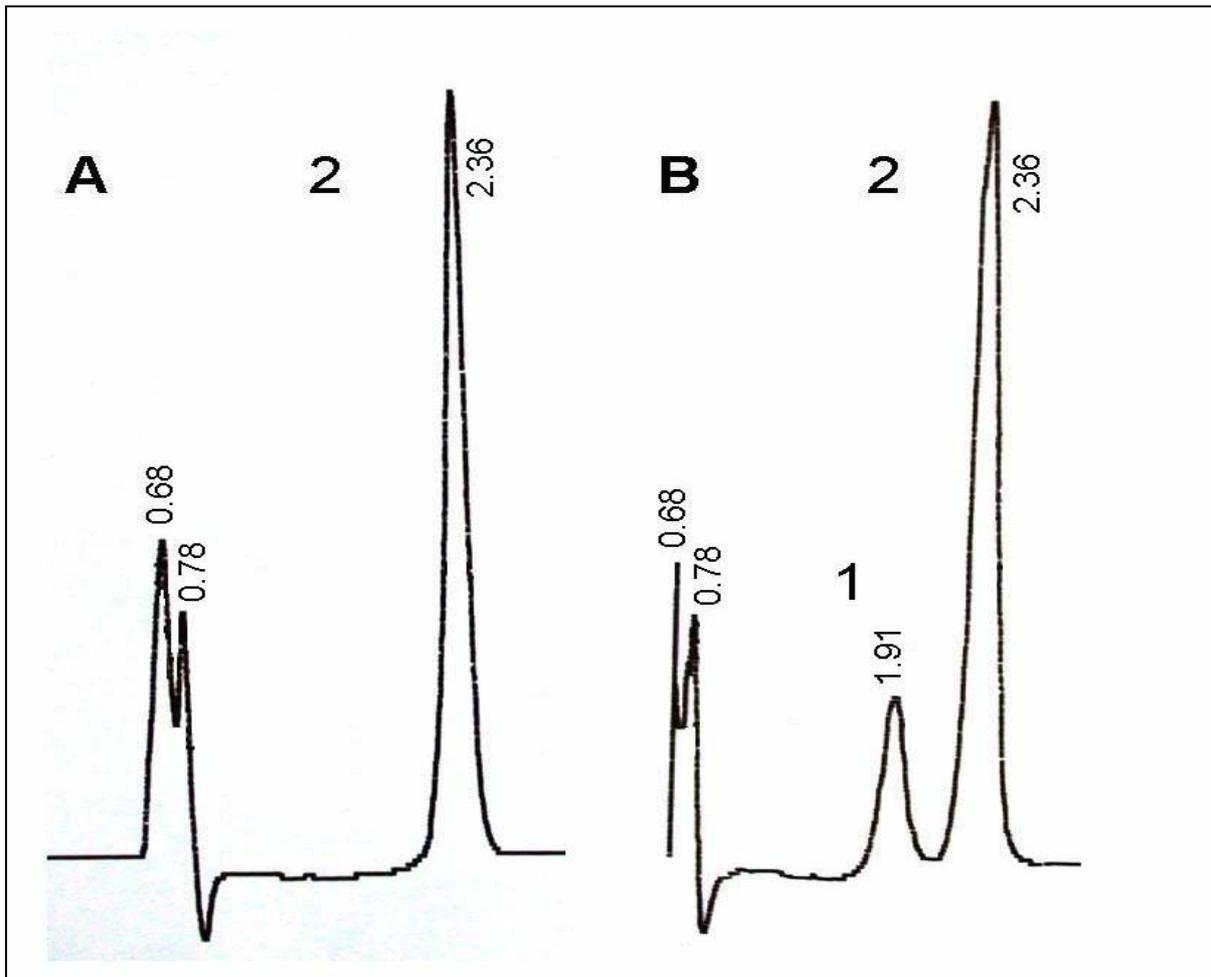


Abb. 4.2 HPLC-Chromatogramme: (A) Blindlösung: Transportpuffer (HBBS) mit *p*-Phenylphenol (2) als interner Standard (B) Blindlösung mit Griseofulvin (1) gespikt

4.1.2.1.2 Linearität / Arbeitsbereich

Die Linearität wird an 12 Konzentrationen zwischen 0,118 µg/ml und 2,826 µg/ml untersucht. Die Kalibriergerade ist in diesem Konzentrationsbereich linear. Die Linearität wird durch Auftragen des Quotienten der Fläche des Griseofulvinpeaks und der Fläche des *p*-Phenylphenolpeaks (interner Standard) gegen die Griseofulvinkonzentration mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9991$ belegt. Die Messdaten sind im Anhang (Tab. 9.1) aufgeführt. Die Unsicherheit der Datenpunkte in *y*-Richtung und die Unsicherheit der Steigung werden durch den 95 % Vertrauensbereich erfasst. Die Parameter der Kalibrierung sind in Abb. 4.3 zusammengestellt.

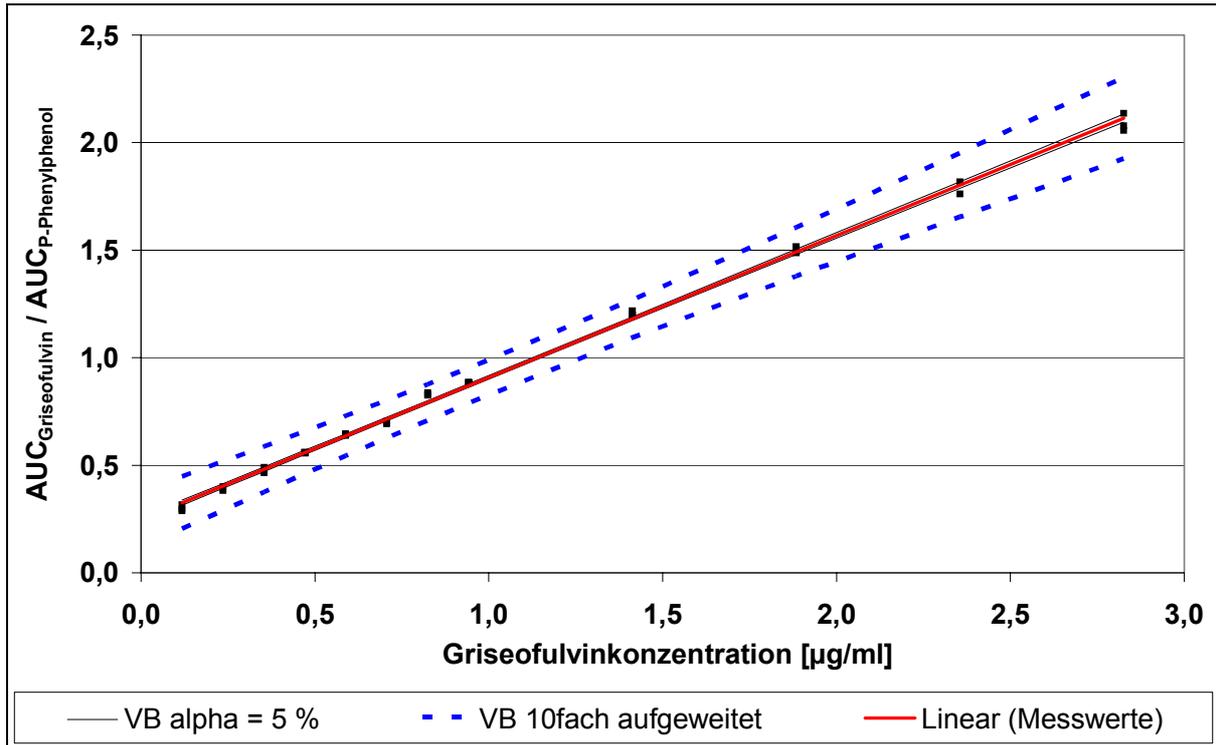


Abb. 4.3 Kalibriergerade für den linearen Bereich von 0,118 µg/ml bis 2,826 µg/ml

Tab. 4.2 Kalibrierparameter von Griseofulvin (HPLC-Analytik)

Parameter	Griseofulvin
Messbereich [µg/ml]	0,118 – 2,826
Anzahl Kalibrierproben	36
Anzahl Freiheitsgrade	34
Steigung (Empfindlichkeit)	0,6606
Achsenabschnitt	0,2474
Kalibrierfunktion	$y = 0,6606 x + 0,2474$
Korrelationskoeffizient	0,9991

4.1.2.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection) wird zu 0,119 µg/ml, die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification) zu 0,362 µg/ml bestimmt. Die Berechnung erfolgt aus der Kalibriergeraden

mit einer Reststandardabweichung der Regression von $S_y = 0,024$ und einer Steigung der Kalibriergeraden von $\beta = 0,661$ innerhalb des gewählten Konzentrationsbereiches berechnet. Die Rohdaten sind im Anhang (Tab. 9.1) aufgeführt.

4.1.2.1.4 Präzision und Richtigkeit

Im Bereich von $0,353 \mu\text{g/ml}$ bis $3,216 \mu\text{g/ml}$ wird die Präzision der Methode durch eine mittlere relative Standardabweichung von $2,0 \%$ belegt. Die Richtigkeit der Methode wird durch eine mittlere Wiederfindung von $100,8 \%$ nachgewiesen. Die Rohdaten können dem Anhang (Tab. 9.2) entnommen werden.

4.1.3 UV-Analytik von Ibuprofen

Die Abbildung (Abb. 4.4) zeigt die Kalibrierkurve von Ibuprofen in Hanks'schem Puffer (pH 7,4) bei einer Wellenlänge von 264 nm . Die Methode wird im Konzentrationsbereich von $1,37 \text{ g/100 ml}$ bis $36,22 \text{ g/100 ml}$ kalibriert. Aus der Steigung der Geraden mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,9998$ lässt sich folgender Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption bestimmen: $c \text{ (g/100 ml)} = 53,4759x + 0,1337$. Weitere Parameter der Kalibrierung sind in Tab. 4.3 dargestellt.

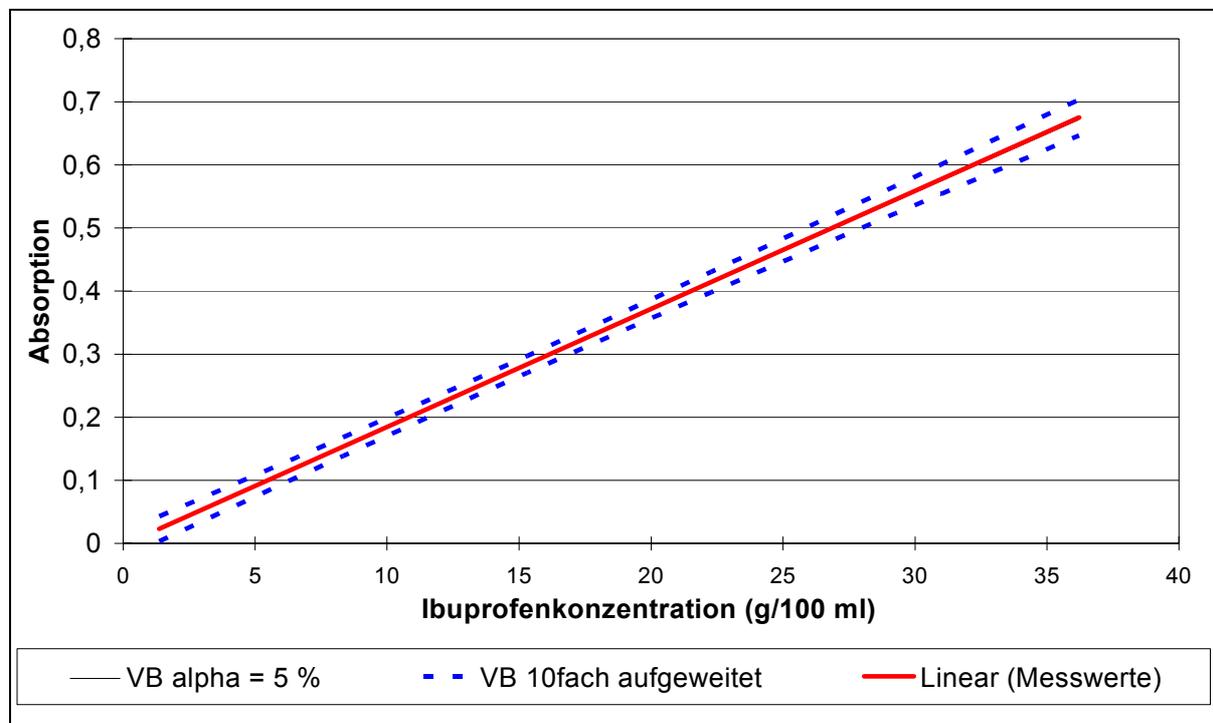


Abb. 4.4 Kalibriergerade für den linearen Bereich von 1,37 bis 36,22 g/100 ml

Tab. 4.3 Kalibrierparameter von Ibuprofen

Parameter	Ibuprofen
Messbereich [g/100 ml]	1,37– 36,22
Anzahl Kalibrierproben	66
Anzahl Freiheitsgrade	64
Steigung/Empfindlichkeit	0,0187
Achsenabschnitt	-0,0025
Standardabweichung (Steigung)	0,0001
Kalibrierfunktion	$A = 0,0187 * c - 0,0025$
Korrelationskoeffizient	0,9998

4.1.4 Fluoreszenz-Analytik von Fluorescein-Natrium

Die Fluorescein-Natrium-Proben werden fluorimetrisch mittels TECAN-SpectraFluor analysiert. Die Methode wird im Konzentrationsbereich von 0 bis 1 µg/ml kalibriert. Aus der Steigung der Geraden mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9998$ lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Fläche bestimmen (Abb. 4.5). Weitere Parameter der Kalibrierung sind in Tab. 4.4 dargestellt. Die Bestimmung der Fluorescein-Natrium-Permeation wird zur Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers nach jedem Resorptionsversuch durchgeführt.

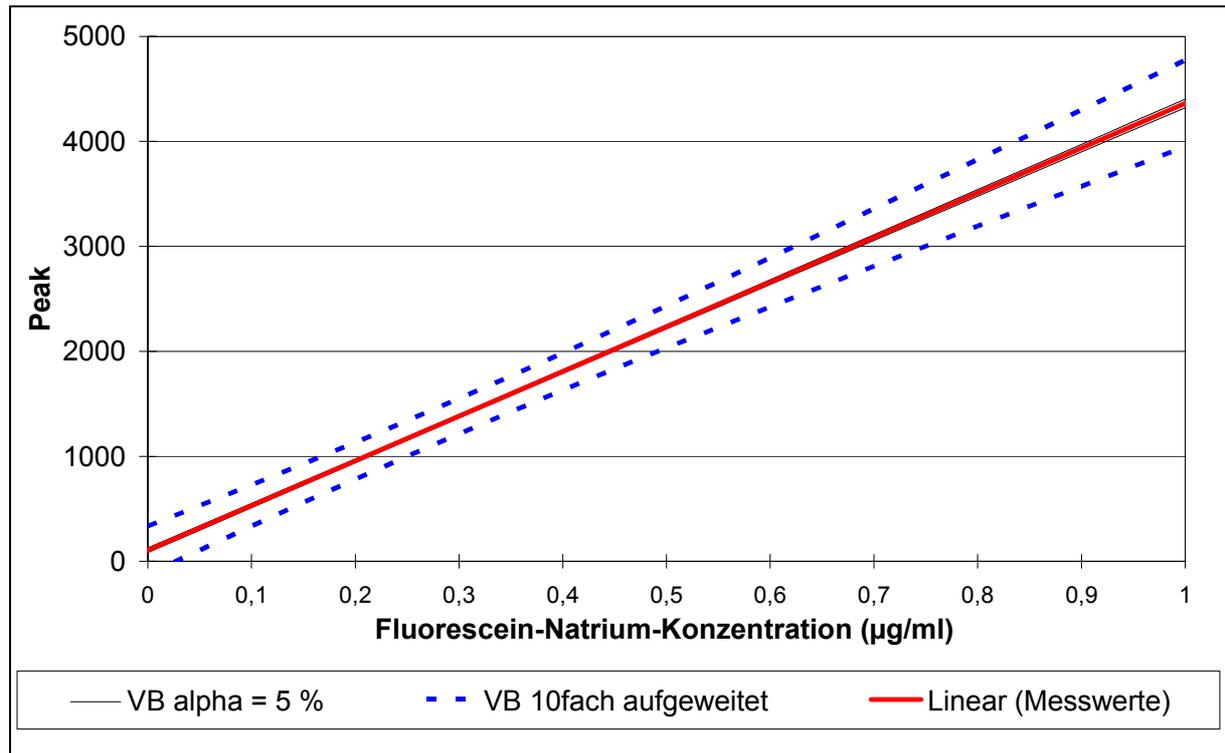


Abb. 4.5 Kalibriergerade von Fluorescein-Natrium für den linearen Bereich von 0 bis 1 µg/ml

Tab. 4.4 Kalibrierparameter von Fluorescein-Natrium

Parameter	Fluorescein-Natrium
Messbereich [µg/ml]	0 – 1
Anzahl Kalibrierproben	21
Anzahl Freiheitsgrade	19
Steigung/Empfindlichkeit	4255,2
Achsenabschnitt	105,68
Standardabweichung (Steigung)	21,7923
Kalibrierfunktion	Peakfläche = 4255,2 * c + 105,68
Korrelationskoeffizient	0,9998

4.1.5 Qualifizierung bzw. Untersuchung der Integrität des Zellmonolayers

Ein kritischer Punkt bei der Durchführung von Permeationsuntersuchungen ist die Dichtigkeit (Integrität) des Caco-2/TC-7 Monolayers. Sie muss überprüft werden, bevor die Zellen als intestinales in-vitro Transportmodell zum Einsatz kommen. Dazu werden der transepitheliale elektrische Widerstand und das Transportverhalten der hydrophilen Markersubstanz Fluorescein-Natrium bestimmt.

4.1.5.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Der transepitheliale elektrische Widerstand ist der Widerstand der Zellmonolayerschicht. Dieser nimmt in den ersten 14 Tagen zu und erreicht dann schließlich ein Plateau. Aus sechs aufeinander folgenden Passagen wird aus dem arithmetischen Mittelwert des Widerstandes für die Zeitspanne vom 20. bis zum 36. Tag ein Toleranzbereich bestimmt. (Abb. 4.6). Dieser berechnet sich aus dem Mittelwert $\pm 25\%$ (Awadallah 2003).

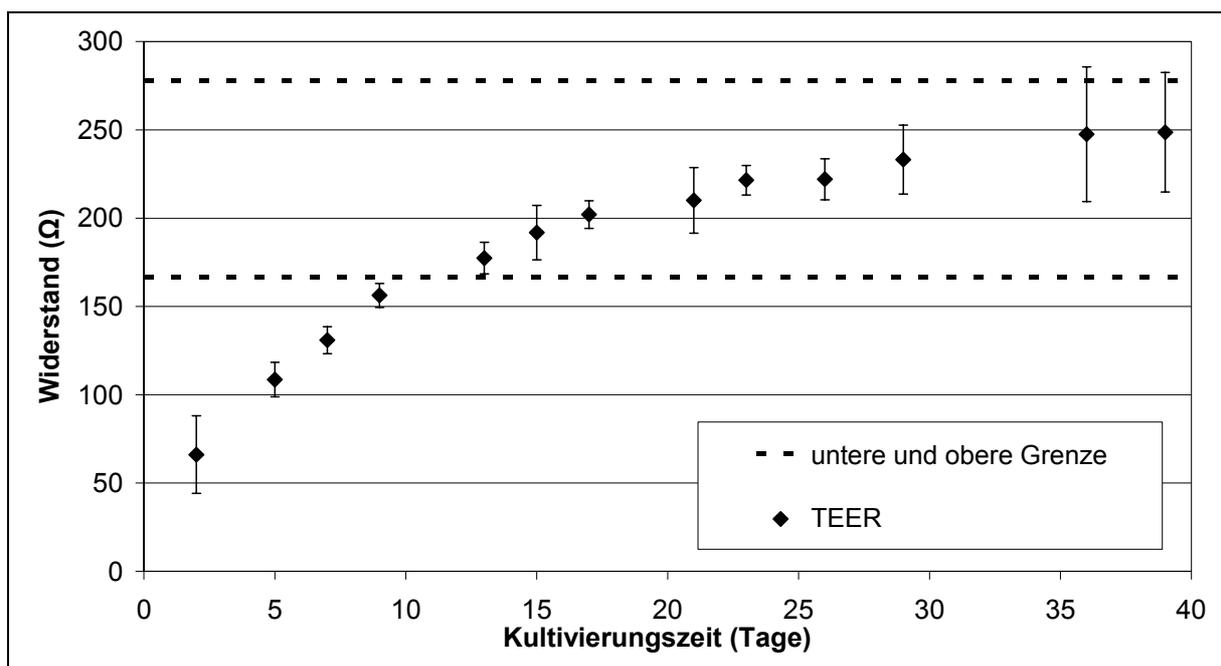


Abb. 4.6 Zeitlicher Verlauf des effektiven transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) (Awadallah 2003)

4.1.5.2 Transport der hydrophilen Markersubstanz Fluorescein-Natrium

Aus den Transportstudien der bei pH 7,4 hydrophilen Markersubstanz Fluorescein-Na wird der Permeationskoeffizient bestimmt. Dazu werden 47,72 μg Fluorescein-Na in 0,5 ml Hanks'scher Lösung (pH 7,4) auf die apikale Seite der Caco-2-Zellen gegeben. Abb. 4.7 zeigt die Zunahme der Fluorescein-Natriummenge auf der basolateralen Seite in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 100 min sind nur 1,15 % der eingesetzten Markermenge in die basolaterale Seite übergetreten.

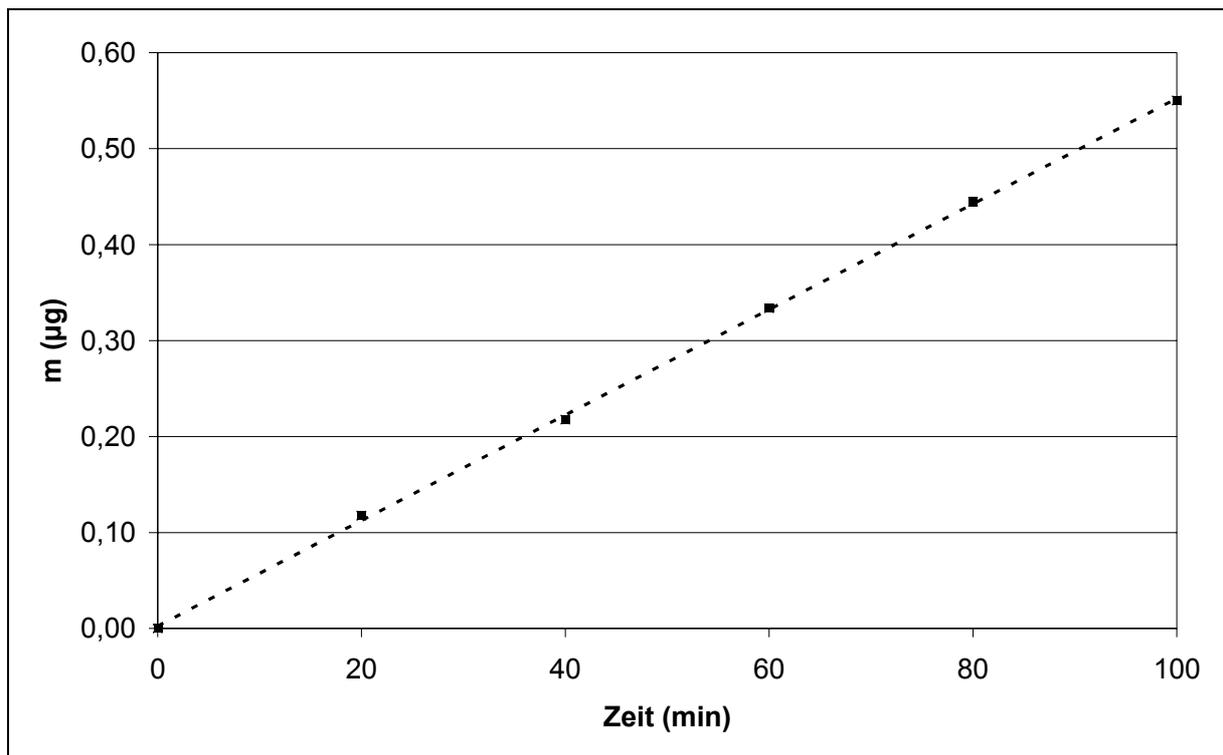


Abb. 4.7 Durch die Caco-2/TC-7-Zellschicht transportierte Menge an Fluorescein-Natrium in der basolateralen Phase bei der Integritätsprüfung

Aus den gewonnenen Daten lässt sich nach Gleichung 3.2 ein Permeationskoeffizient für die Markersubstanz bestimmen. Dieser beträgt $0,9 \pm 0,06 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$ ($n = 6$) und ist damit um ca. zwei Zehnerpotenzen niedriger als die Permeationskoeffizienten der Testsubstanzen.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Herstellung und Charakterisierung von RESS-Griseofulvin-Partikeln

RESS-Griseofulvin wird, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, bei verschiedenen Temperaturen durch Expansion in die Gasphase hergestellt. In der Expansionskammer wird die Partikelgröße des Produkts bestimmt, bevor die Partikel auf einem Filter abgeschieden werden. Die Ergebnisse sind in Kapitel 5.1.1 aufgeführt. Dabei wird deutlich, dass die Vorexpanсионstemperatur bei Griseofulvin keinen Einfluss auf die Teilchengröße hat (Türk et al. 2002 a).

5.1.1 Partikelgröße bei Expansion in die Gasphase

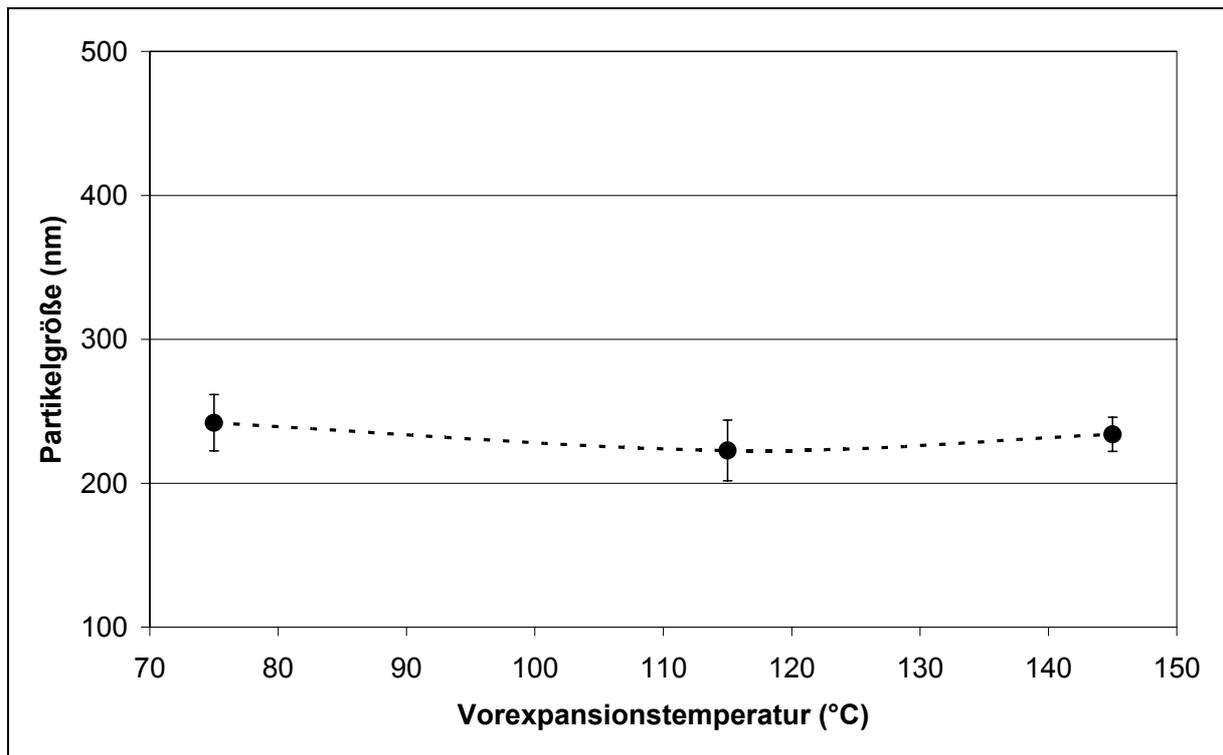


Abb. 5.1 Mittlere Partikelgröße von RESS-Griseofulvin bei verschiedenen Vorexpanсионstemperaturen und einem Vorexpanсионсdruck von 200 bar

Die mittlere Partikelgröße x_{50} der Griseofulvinteilchen wird von unseren Kooperationspartnern vom Institut der Technischen Thermodynamik und Kältetechnik der Uni Karlsruhe in der Expansionskammer online und in situ mit Hilfe eines Drei-Wellenlängen-Extinktionsmessgeräts gemessen werden. In Abb. 5.1 ist die mittlere Partikelgröße der Primärpartikel aus Versuchen mit Vorexpansttemperaturen von 75, 115 und 145 °C und einem Druck von 200 bar angegeben. Die mittlere Partikelgröße beträgt unabhängig von der Vorexpansttemperatur ungefähr 230 nm.

5.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Zur Bestimmung der Teilchenmorphologie werden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Das mikronisierte Griseofulvin (Abb. 5.2, Abb. 5.3, Abb. 5.4: links), welches als Ausgangsmaterial für den RESS-Prozess dient, besteht aus Partikeln mit einer Teilchengröße von ungefähr 1 μm , die an größeren Partikeln haften. Die Aufnahmen des RESS-Produktes (Abb. 5.2, Abb. 5.3, Abb. 5.4: rechts) zeigen auf den ersten Blick eine schwammartige Struktur. Bei genauerem Hinsehen fallen glatte, kleine Primärpartikel mit einer Teilchengröße von 200 bis 500 nm auf. Diese sind über Feststoffbrücken zu einer schwammartigen Struktur verbunden.

In Abb. 5.2 sind die jeweiligen Proben bei einer 1000fachen Vergrößerung dargestellt. Der angegebene Balken entspricht 10 μm .

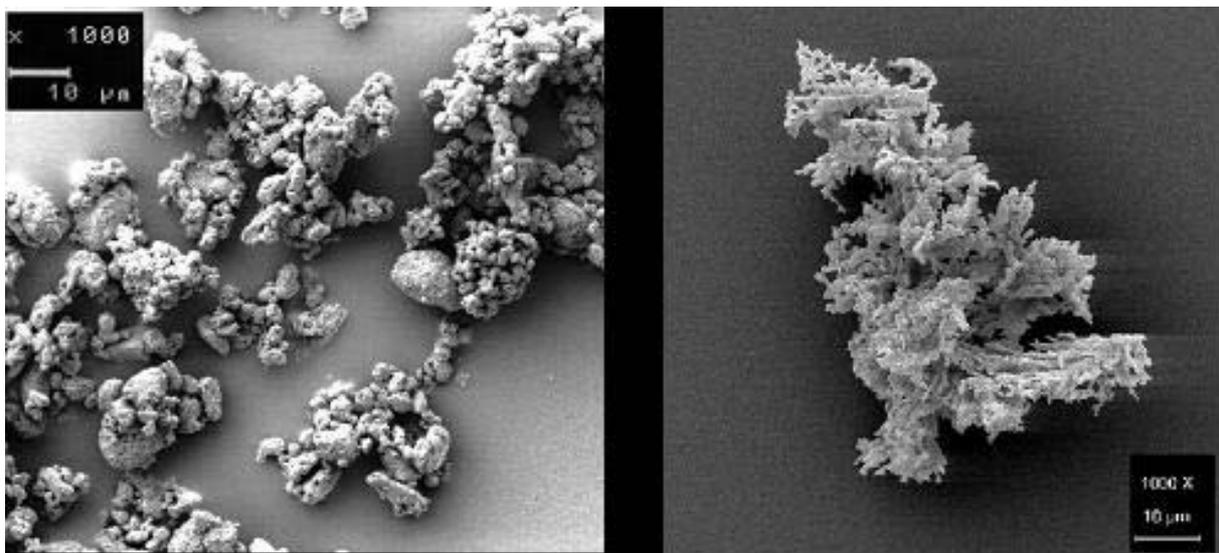


Abb. 5.2 links: Griseofulvin mikronisiert

rechts: RESS-Griseofulvin

In Abb. 5.3 sind die Partikel bei einer 5000fachen Vergrößerung zu sehen. Hier entsprechen die Balken 2 μm . Das mikronisierte Griseofulvin in Abb. 5.4 ist bei einer 10000fachen Vergrößerung, das RESS-Griseofulvin dagegen bei einer 20000fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Balken entsprechen in diesem Fall 1 μm bzw. 500 nm.

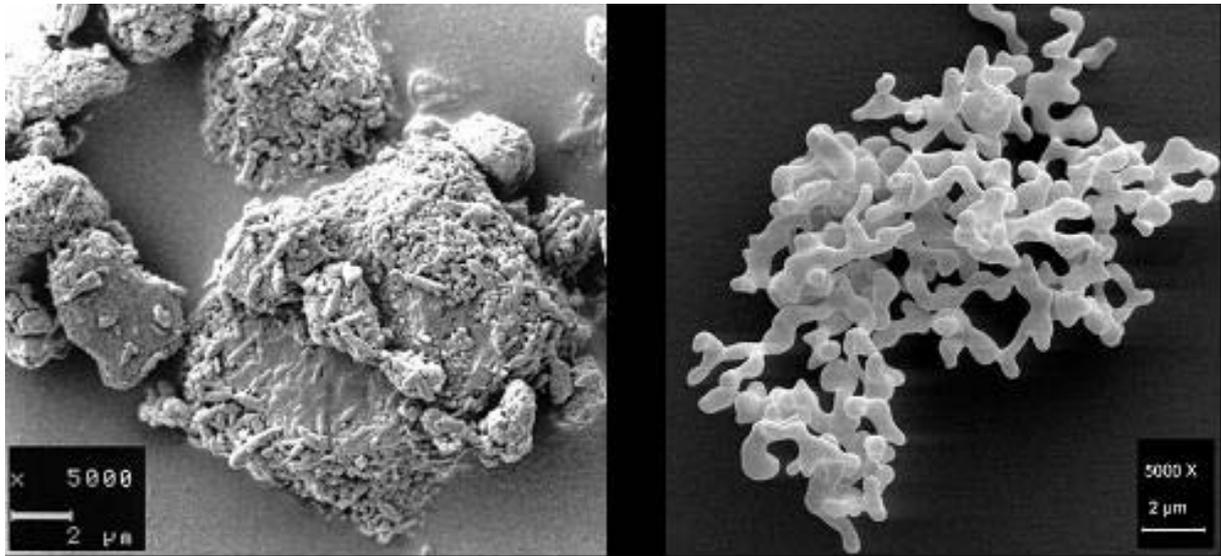


Abb. 5.3 links: Griseofulvin mikronisiert

rechts: RESS-Griseofulvin

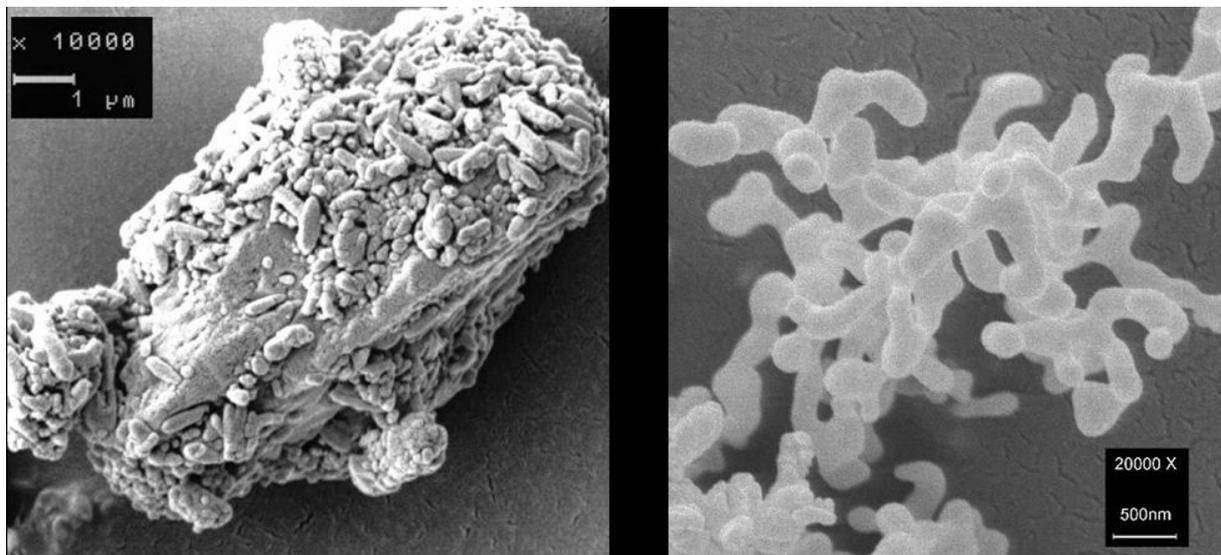


Abb. 5.4 links: Griseofulvin mikronisiert

rechts: RESS-Griseofulvin

5.1.3 Partikelgrößenanalytik mittels Laserbeugungsspektroskopie

Die Partikelgrößenanalyse wird mittels Laserbeugungsspektroskopie durchgeführt. Dazu werden das umkristallisierte, das mikronisierte und das RESS-Griseofulvin in einer wässrigen Dispersion vermessen.

5.1.3.1 Teilchengröße von umkristallisiertem Griseofulvin

Durch Umkristallisation und Klassierung erhält man 3 Griseofulvin-Fraktionen, mit einer deutlich höheren Partikelgröße im Vergleich zu dem mikronisierten Ausgangsmaterial. Die mittlere Teilchengröße x_{50} der in 3 Partikelgrößenbereiche klein, mittel und groß klassierten Proben sind in Tab. 5.1 dargestellt.

Tab. 5.1 Mittlere Teilchengröße x_{50} von umkristallisiertem Griseofulvin; angegeben sind jeweils Mittelwert und 95 % Vertrauensbereich ($n = 3$)

Probe	x_{50}
Klein (45-125 μm)	70,84 \pm 4,4
Mittel (125-250 μm)	177,18 \pm 5,6
Groß (250-500 μm)	356,90 \pm 1,5

5.1.3.2 Teilchengröße von mikronisiertem Griseofulvin

Die logarithmische Dichteverteilung von mikronisiertem Griseofulvin zeigt eine bimodale Verteilung (Abb. 5.5). Zur Charakterisierung der Korngrößenverteilung werden aus der Summenverteilungskurve $Q_3(x)$ die Korngrößenparameter (x_{10} , x_{20} , x_{50} , x_{80} , x_{90}) bestimmt (Abb. 5.6). Aus der Dichteverteilungskurve werden die Modalwerte bestimmt. Die Standardabweichung wird aus 4 Wiederholungen berechnet (Tab. 5.2).

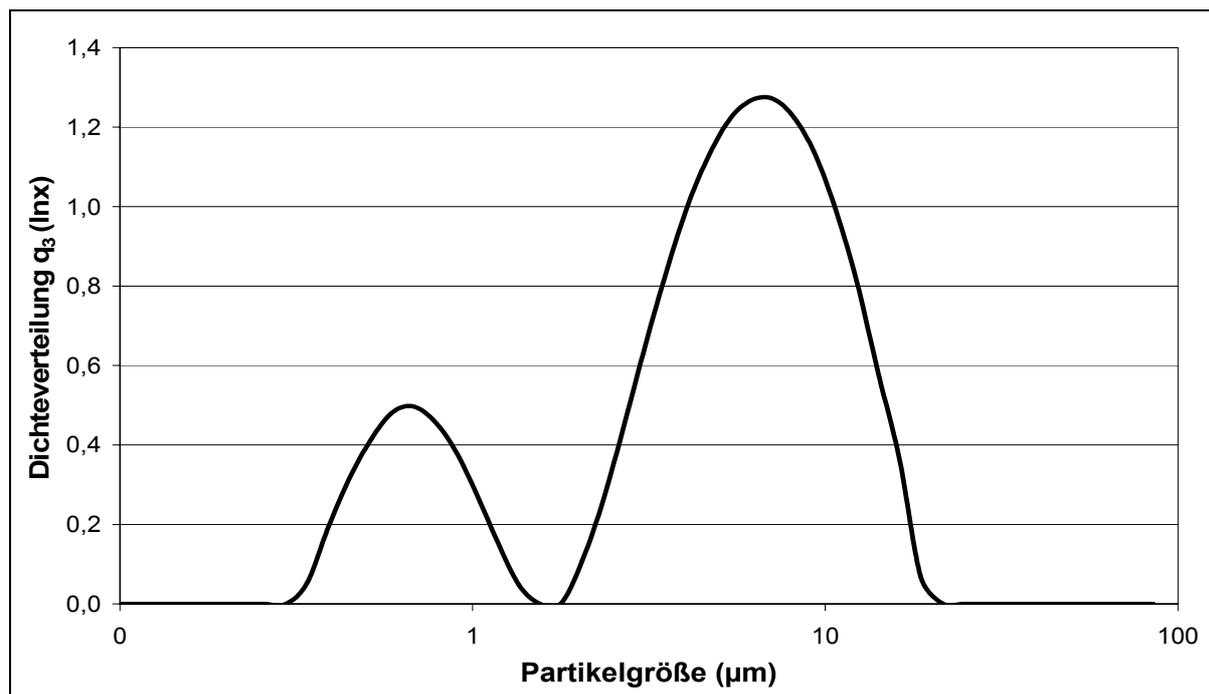


Abb. 5.5 Logarithmische Dichteverteilungskurve von mikronisiertem Griseofulvin

Tab. 5.2 Korngrößenparameter von mikronisiertem Griseofulvin; angegeben sind jeweils Mittelwert und 95 % Vertrauensbereich ($n = 4$)

Probe	x_{10} (μm)	x_{20} (μm)	x_{50} (μm)	x_{80} (μm)	x_{90} (μm)	Modalwert 1 (μm)	Modalwert 2 (μm)
Mikronisiertes Griseofulvin	0,681 \pm 0,05	2,199 \pm 0,60	5,274 \pm 0,28	9,133 \pm 0,54	11,526 \pm 0,80	0,654 \pm 0,01	6,167 \pm 0,23

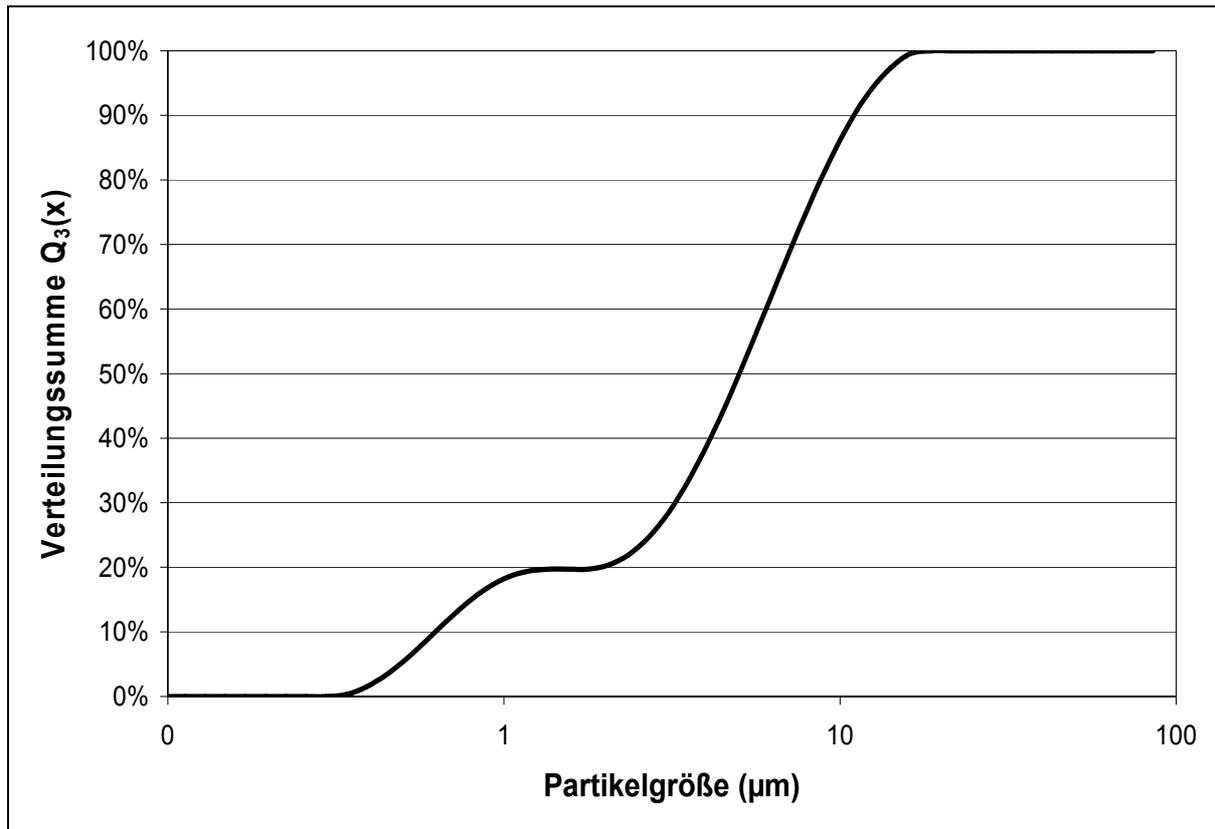


Abb. 5.6 Summenverteilungskurve von mikronisiertem Griseofulvin

5.1.3.3 Teilchengröße von RESS-Griseofulvin

Es werden die Teilchengrößenverteilung von RESS-Griseofulvin Chargen, die bei verschiedenen Vorexpanionstemperaturen (75 °C, 115 °C und 145 °C) und einem Druck von 200 bar hergestellt werden, bestimmt. Dazu werden 3 Chargen, die bei 75 °C, 5 Chargen, die bei 115 °C und 2 Chargen, die bei 145 °C Vorexpanionstemperatur hergestellt wurden, untersucht. Zur Charakterisierung der Korngrößenverteilung werden aus der Summenverteilungskurve die Korngrößenparameter (x_{10} , x_{20} , x_{50} , x_{80} , x_{90}) bestimmt. Die x_{10} -Werte der verschiedenen Chargen liegen bei ungefähr 0,1 µm, die x_{90} -Werte bei 7 µm (Tab. 5.3, Abb. 5.7).

Zur Prüfung, ob zwischen den verschiedenen Herstellungsbedingungen ein signifikanter Unterschied besteht, wird eine einseitige Varianzanalyse durchgeführt. Die Prüfgröße ist für alle Parameter kleiner als der tabellierte Wert. Es besteht also kein signifikanter Unterschied zwischen Chargen, die bei unterschiedlichen Vorexpanionstemperaturen hergestellt werden (Tab. 5.3). Dieses Ergebnis erlaubt für die weitere Betrachtung eine Zusammenfassung der Chargen.

Tab. 5.3 Korngrößenparameter von RESS-Griseofulvin hergestellt bei 200 bar und unterschiedlicher Vorexpanstempertur; angegeben sind jeweils Mittelwert und 95 % Vertrauensbereich des Mittelwerts

$T_{\text{Vorex.}}$	x_{10} (μm)	x_{20} (μm)	x_{50} (μm)	x_{80} (μm)	x_{90} (μm)
75 °C	0,115 ± 0,03	0,182 ± 0,06	1,327 ± 1,31	5,555 ± 1,38	7,323 ± 1,77
115 °C	0,156 ± 0,02	0,212 ± 0,02	0,429 ± 0,05	2,892 ± 1,15	6,816 ± 3,48
145 °C	0,116 ± 0,01	0,176 ± 0,01	0,900 ± 0,06	4,893 ± 0,42	6,657 ± 0,46
P-Wert	0,069	0,343	0,207	0,409	0,965

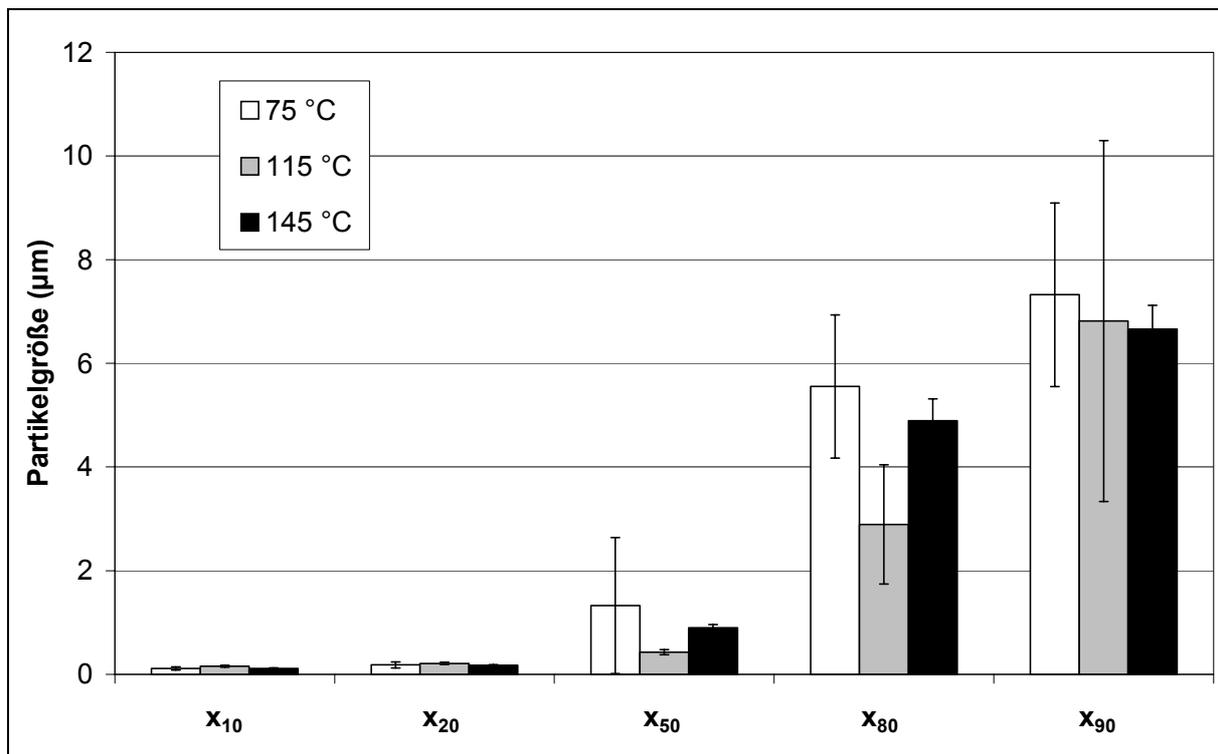


Abb. 5.7 Graphische Darstellung der Korngrößenparameter von RESS-Griseofulvin aus Tab. 5.3

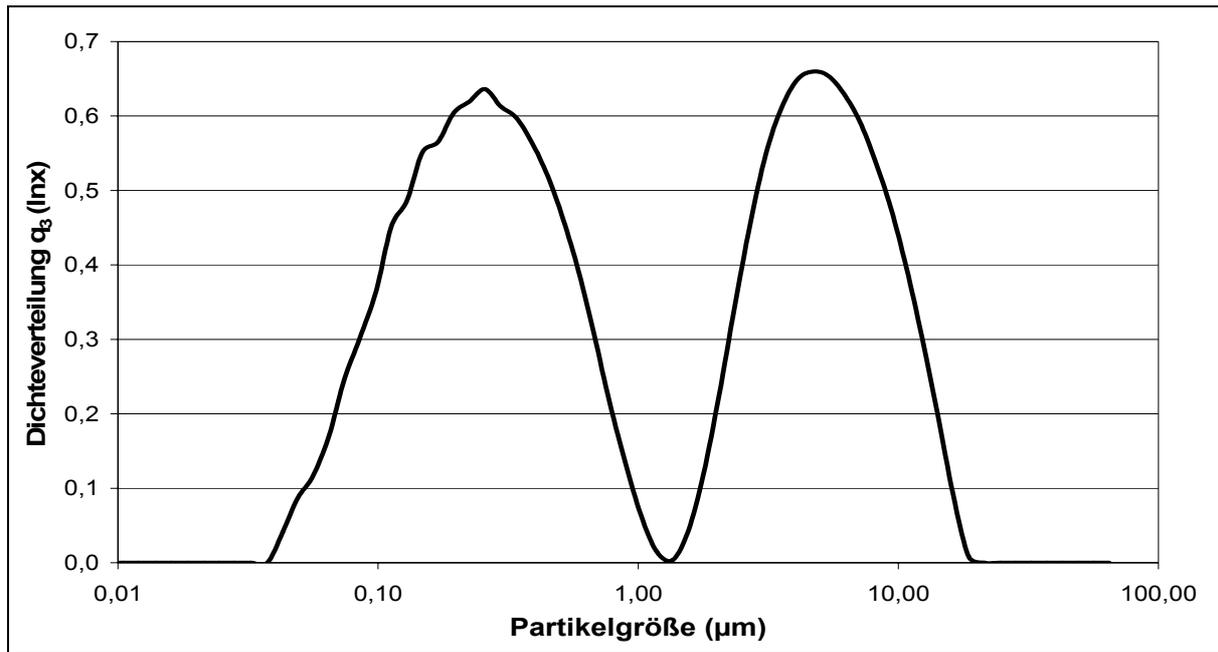


Abb. 5.8 Logarithmische Dichteverteilungskurve von RESS-Griseofulvin

Auch die Partikelgrößen von RESS-Griseofulvin besitzen eine bimodale Verteilung (Abb. 5.8 und Abb. 5.9). $60,6 \pm 8,2$ % der Partikel können zum ersten Peak gerechnet werden, für den sich ein Modalwert von $0,301 \pm 0,03$ μm bestimmen lässt. Zum zweiten Peak gehören $39,4 \pm 8,2$ % der Partikel, der Modalwert beträgt hier $4,672 \pm 0,58$ μm . Weitere Korngrößenparameter für RESS-Griseofulvin sind in Tab. 5.4 zusammengestellt.

Tab. 5.4 Korngrößenparameter von RESS-Griseofulvin; angegeben sind jeweils Mittelwert und 95 % Vertrauensbereich ($n = 10$)

Probe	x_{10} (μm)	x_{20} (μm)	x_{50} (μm)	x_{80} (μm)	x_{90} (μm)	Modalwert	
						1 (μm)	2 (μm)
RESS- Griseofulvin	$0,136$ \pm $0,02$	$0,196$ \pm $0,02$	$0,792$ \pm $0,43$	$4,091$ \pm $1,03$	$6,936$ \pm $1,71$	$0,301$ \pm $0,03$	$4,672$ \pm $0,58$

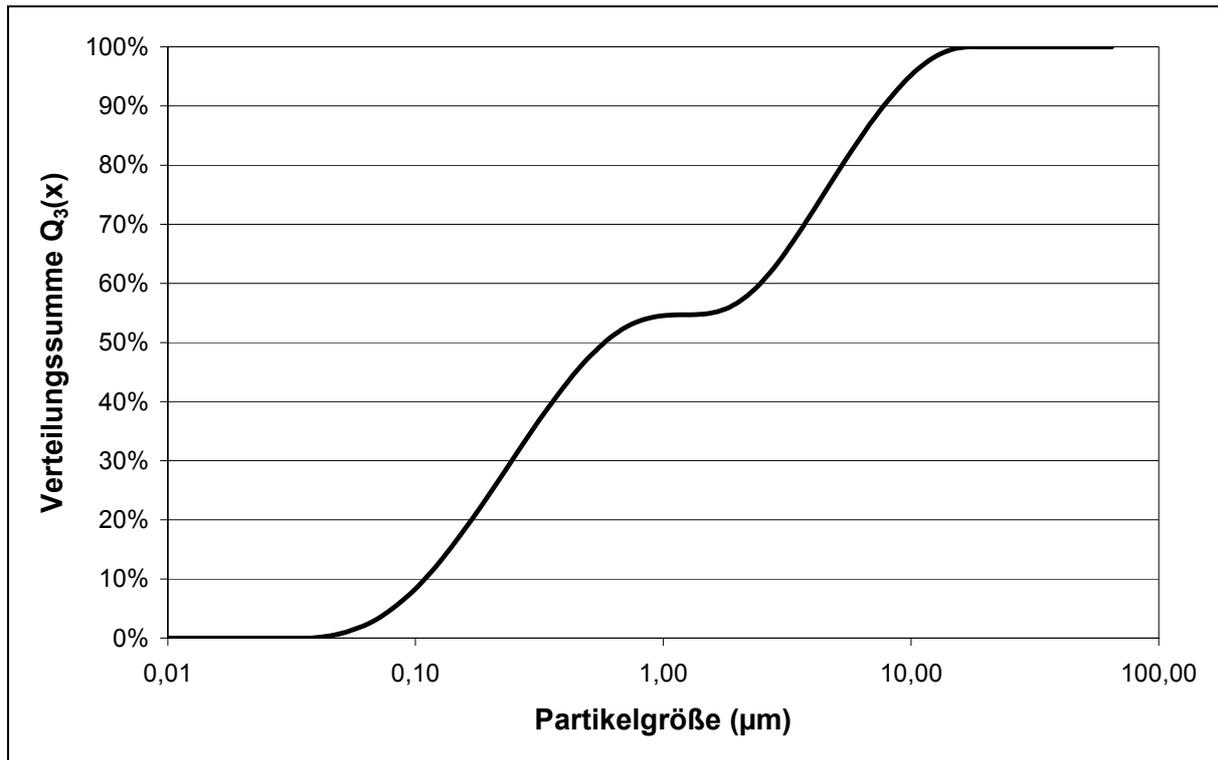


Abb. 5.9 Summenverteilungskurve von RESS-Griseofulvin

In Abb. 5.10 sind die Korngrößenparameter von RESS-Griseofulvin und von mikronisiertem Griseofulvin gegenübergestellt.

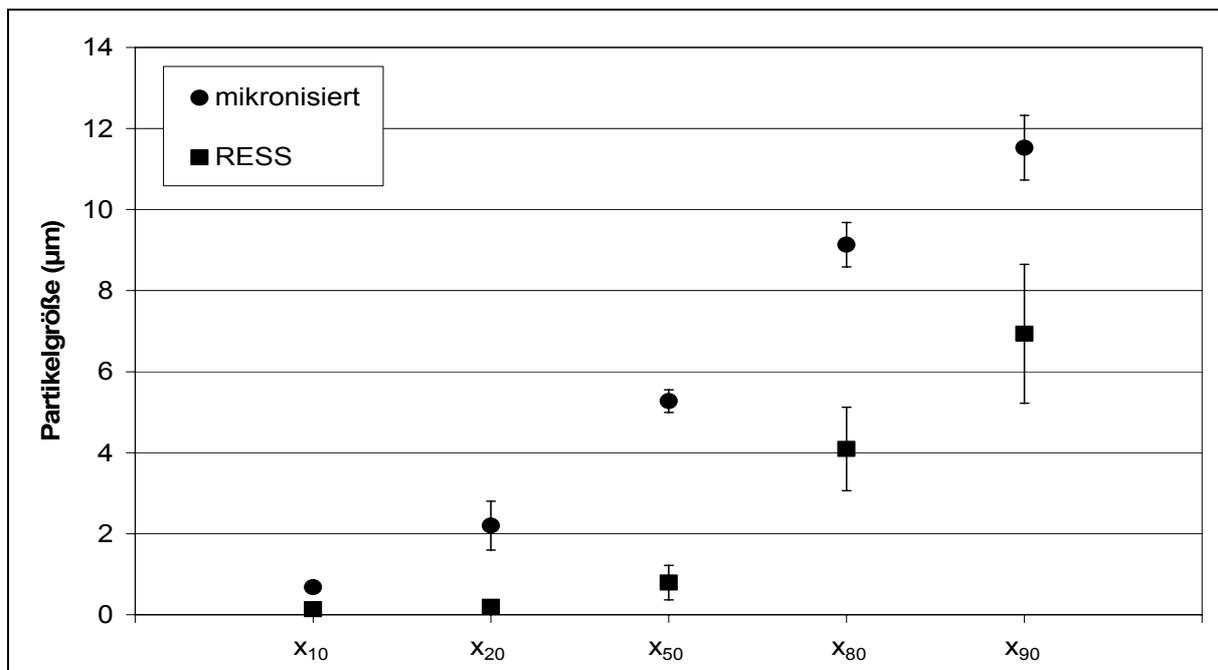


Abb. 5.10 Korngrößenparameter von mikronisiertem und RESS-Griseofulvin

5.1.4 Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Stickstoffadsorption nach Brunauer, Emmett und Teller

Es werden die spezifischen Oberflächen von umkristallisiertem Griseofulvin, von mikronisiertem und von RESS-Griseofulvin mittels der Stickstoffadsorptionsmethode nach BET bestimmt. Die gemessenen Werte sind in Abb. 5.11 graphisch dargestellt. Dazu wird jede Probe dreimal gemessen. Für die RESS-Probe ist der Mittelwert der spezifischen BET-Oberfläche aus drei Herstellungschargen, der je dreimal bestimmt wird, angegeben. Die umkristallisierten Chargen mit den größten mittleren Partikelgrößen zeigen die kleinsten spezifischen BET-Oberflächen (0,191 bis 0,592 m²/g). Die mikronisierte Probe besitzt eine spezifische Oberfläche von 4,375 m²/g. Die Oberfläche des RESS-Produktes ist mit 8,809 m²/g signifikant höher.

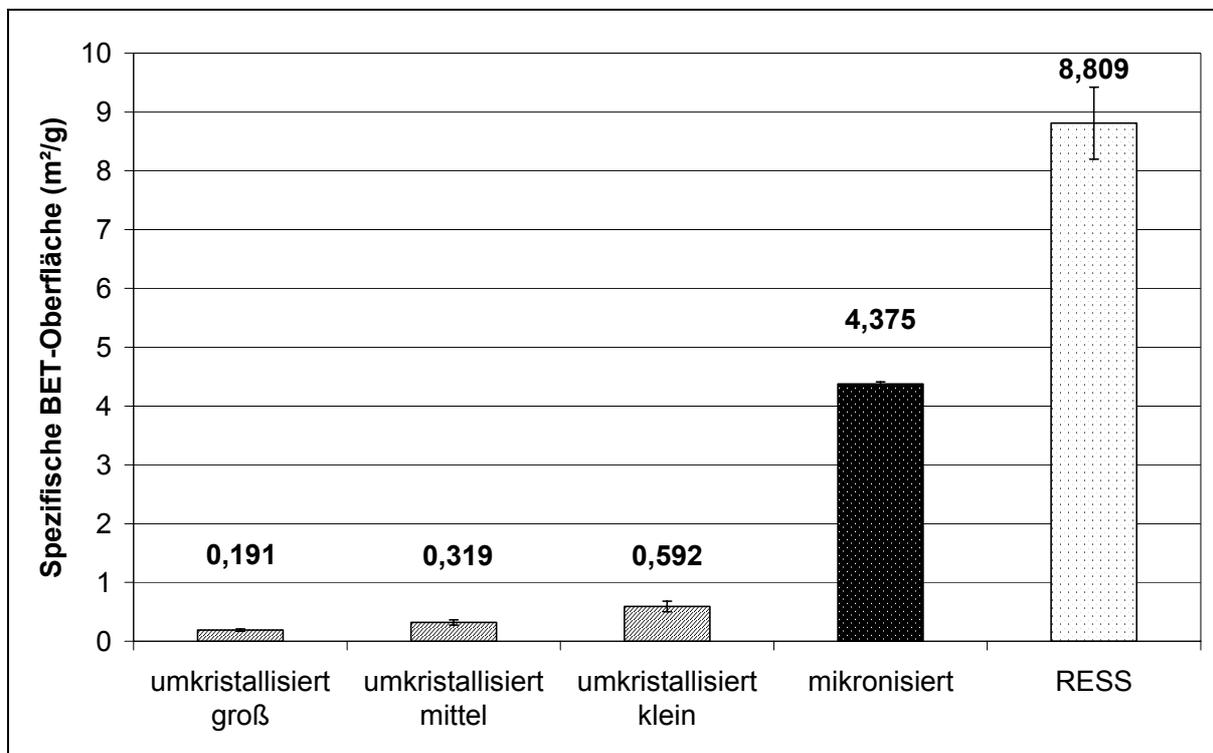


Abb. 5.11 Graphische Darstellung der BET-Oberfläche von Griseofulvin

5.1.5 Dynamische Differenzkalorimetrie

Abb. 5.12 zeigt die DSC-Thermogramme von umkristallisiertem, mikronisiertem und RESS-Griseofulvin. Sowohl für das Ausgangsmaterial wie auch für das RESS-Produkt ist ein endothermer Peak zu erkennen. Dabei handelt es sich um den Schmelzpeak von Griseofulvin.

Das Ausgangsmaterial (mikronisiertes Griseofulvin) schmilzt bei 218,8 °C und besitzt eine Schmelzenthalpie von 118,4 J/g. Der Schmelzpunkt und die Schmelzenthalpie des RESS-Produktes und auch der umkristallisierten Proben liegen in derselben Größenordnung (Tab. 5.5).

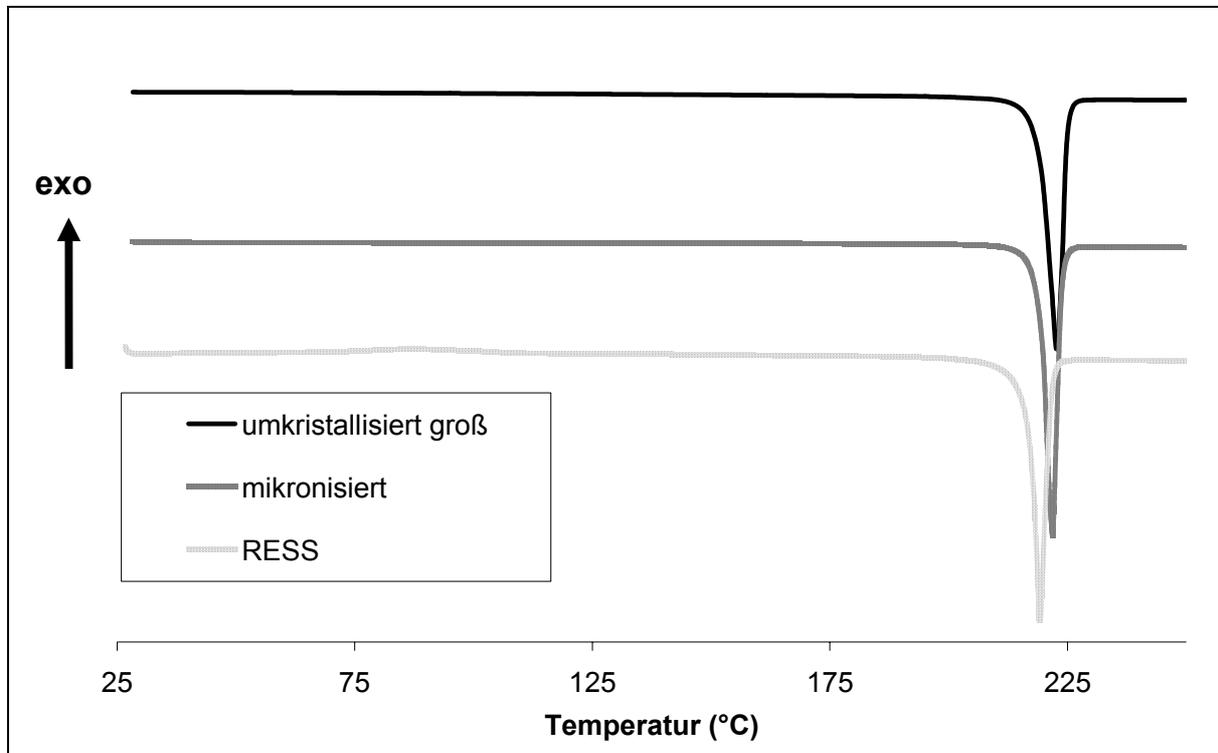


Abb. 5.12 DSC-Thermogramme von umkristallisiertem, mikronisiertem und RESS-Griseofulvin

Tab. 5.5 Schmelzpunkt und Schmelzenthalpie von Griseofulvin aus der dynamischen Differenzkalorimetrie; angegeben sind jeweils Mittelwert und 95 % Vertrauensbereich

Probe	Schmelzpunkt (°C)	Schmelzenthalpie (J/g)
Umkristallisiert (groß)	217,8 ± 0,1	122,0 ± 2,1
Umkristallisiert (mittel)	217,1 ± 0,4	120,0 ± 0,8
Umkristallisiert (klein)	215,9 ± 0,1	118,7 ± 1,6
Mikronisiert	218,8 ± 0,5	118,4 ± 2,6
RESS	216,1 ± 0,8	114,0 ± 2,6

5.1.6 FT-Raman-Spektroskopie

Zur vergleichenden Charakterisierung der kristallinen Eigenschaften von Ausgangsmaterial und RESS-Produkt wird neben der thermischen Analyse mittels DSC auch die FT-Raman-Spektroskopie eingesetzt. Dazu werden die Ramanspektren von umkristallisiertem, mikronisiertem und RESS-Griseofulvin aufgenommen (Abb. 5.13).

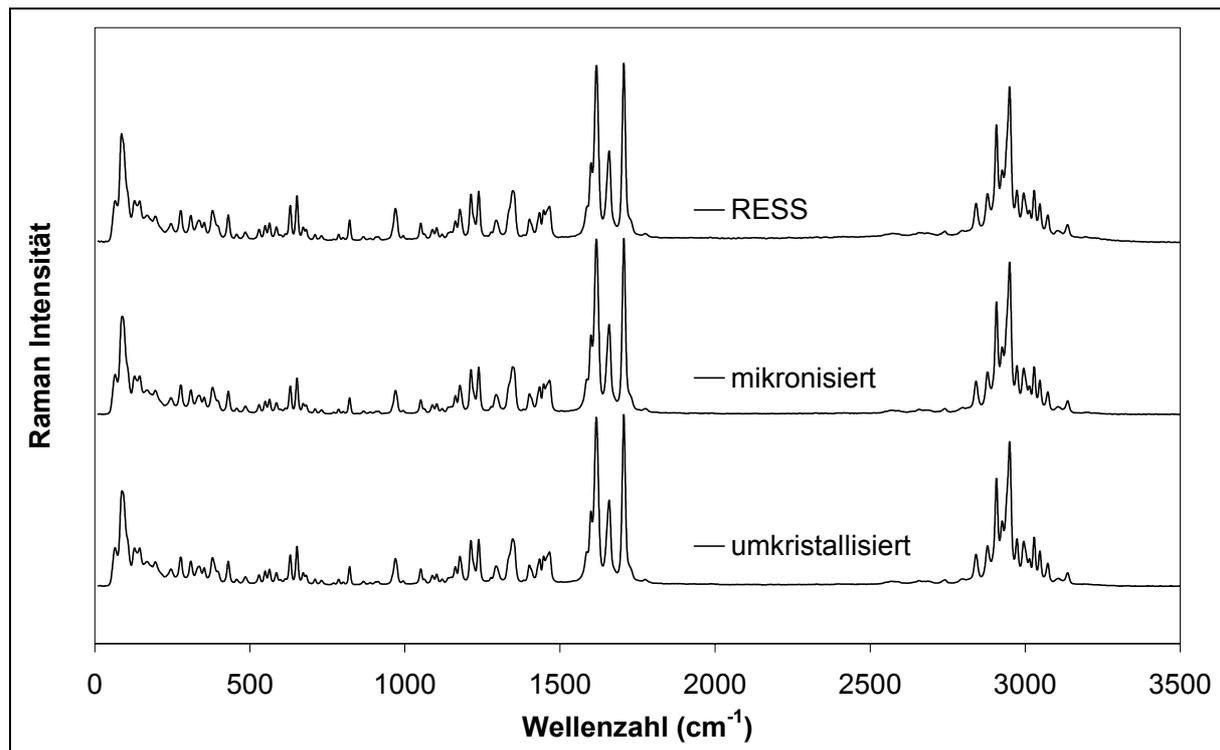


Abb. 5.13 Raman-Spektren von Griseofulvin

Zwischen dem mikronisierten (Ausgangsmaterial), dem umkristallisierten und dem RESS-Griseofulvin sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar, was des Vorliegen von Modifikationen bei RESS-Griseofulvin ausschließt.

5.1.7 Löslichkeit

Um die Sättigungslöslichkeit von Griseofulvin zu bestimmen, werden Löslichkeitsuntersuchungen nach BCS durchgeführt. Dazu wird in einem ersten Versuch die Löslichkeit von mikronisiertem Griseofulvin nach BCS in wässrigen Puffern mit verschiedenen pH-Werten untersucht. In einem zweiten Versuch wird die Löslichkeit von mikronisiertem Griseofulvin mit der von RESS-Griseofulvin in Hanks'scher Lösung bei einem pH-Wert von 7,4 verglichen.

5.1.7.1 Untersuchung der Löslichkeit von Griseofulvin in Abhängigkeit des pH-Wertes

In Puffern mit den pH-Werten 1,0; 4,5; 5,5; 6,8 und 7,5 besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Sättigungslöslichkeit c_s von mikronisiertem Griseofulvin (Abb. 5.14). In dem Puffer mit einem pH-Wert von 3,0 weist die Löslichkeit von Griseofulvin ein Minimum auf.

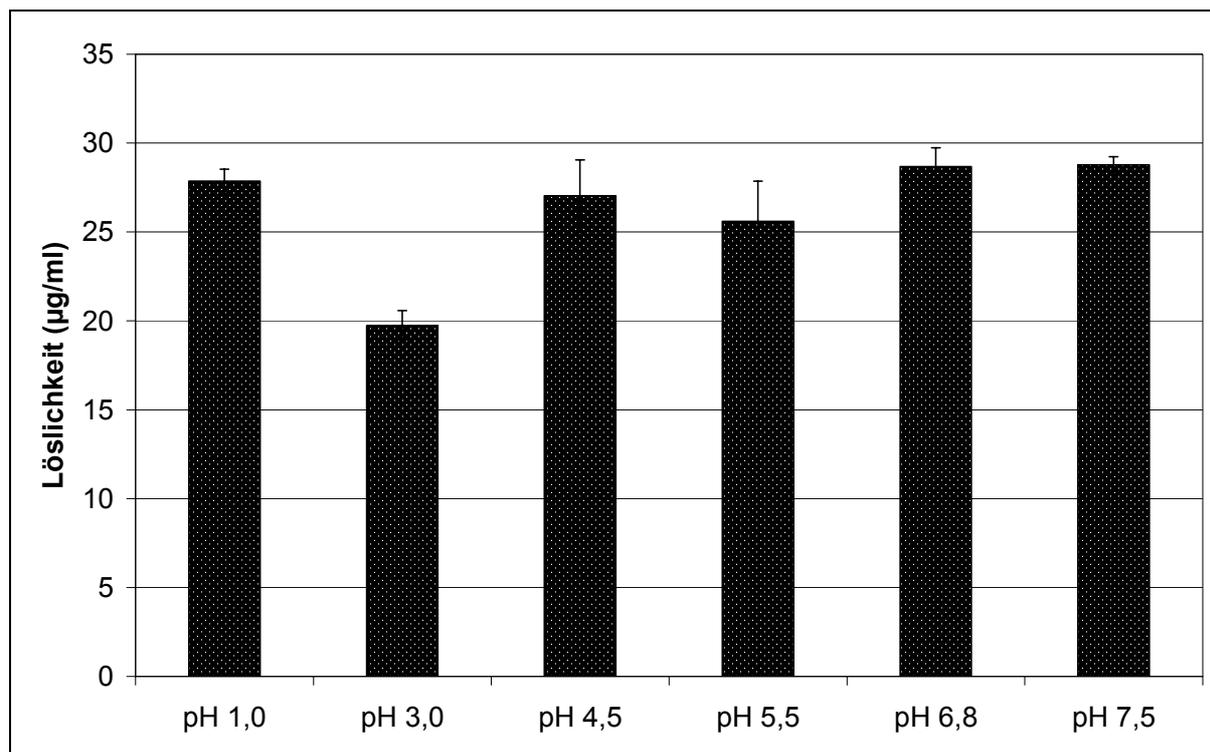


Abb. 5.14 Löslichkeit von Griseofulvin in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten nach BCS

5.1.7.2 Vergleich der Löslichkeit von mikronisiertem Griseofulvin und RESS-Griseofulvin

In Abb. 5.15 ist die Sättigungslöslichkeit c_s von RESS-Griseofulvin der von mikronisiertem Griseofulvin gegenübergestellt. Die Sättigungslöslichkeit des RESS-Produktes ist mit 12,72 µg/ml signifikant höher als die des mikronisierten Ausgangsmaterials, welche zu 11,07 µg/ml bestimmt wird.

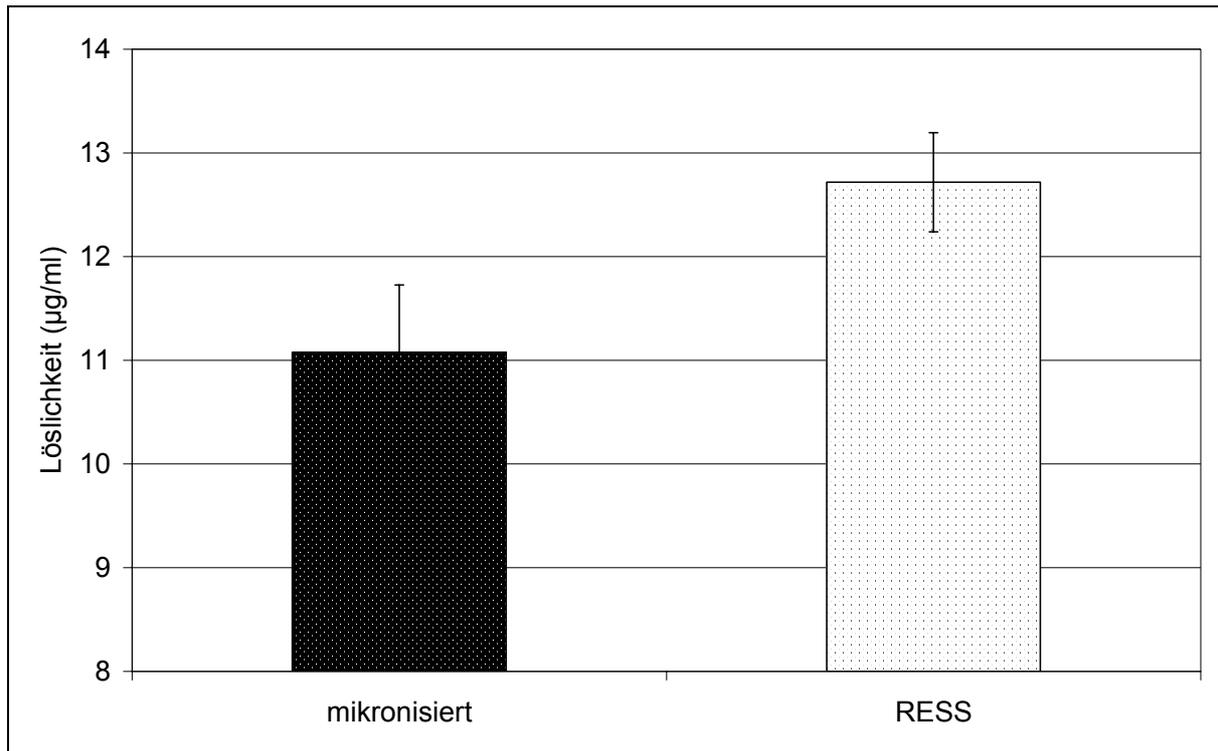


Abb. 5.15 Bestimmung der Löslichkeit von RESS-Griseofulvin im Vergleich zu mikronisiertem Griseofulvin in Hanks'scher Lösung pH 7,4

5.1.8 Auflöseverhalten

5.1.8.1 Partikel

Zur Bestimmung des Auflöseverhaltens werden 3 mg der jeweiligen Griseofulvinprobe in Phosphatpuffer pH 7,4 als künstlichem Darmsaft mit Hilfe des Lösemodells nach Stricker untersucht. Die Kurven in Abb. 5.16 zeigen das Auflöseverhalten folgender Proben: Mikronisiertes Griseofulvin, RESS-Griseofulvin und in Aceton umkristallisiertes Griseofulvin, welche Partikel mit einer größeren Teilchengröße, nämlich einem x_{50} von 70,8 (klein), 177,2 (mittel) und 356,9 µm (groß) repräsentieren. Die aufgelöste Griseofulvinmenge nach 60 min sowie die Geschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell werden als Kenngrößen zur Charakterisierung des Auflöseverhaltens herangezogen. Die freigesetzte Griseofulvinmenge der RESS-Zubereitung ist während der gesamten Versuchsdauer höher als die der anderen Proben.

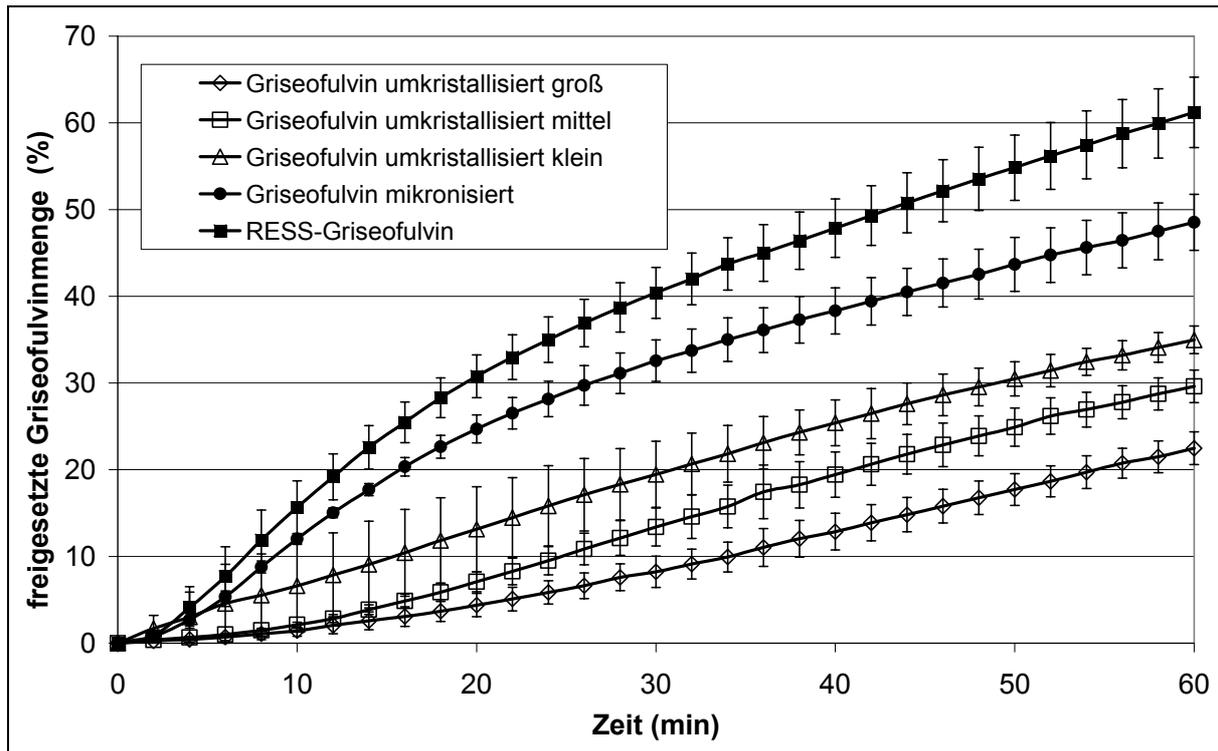


Abb. 5.16 Auflösungsverhalten von Griseofulvin in Phosphatpuffer pH 7,4

5.1.8.1.1 Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell

Zur Bestimmung der Auslösungsgeschwindigkeitskonstante wird gemäß dem Kubikwurzelgesetz von Hixson-Crowell (Gleichung 3.1) der gelöste Anteil in der dritten Wurzel also $m_0^{1/3} - m_i(t)^{1/3}$ über der Zeit aufgetragen (Abb. 5.17). Es werden für jede Kurve die Geschwindigkeitskonstanten für das Zeitintervall 0-20 min, 20-60 min und für den gesamten Bereich von 0 bis 60 min bestimmt. Die Dissolutionskonstante ist bei den großen umkristallisierten Partikeln am geringsten. Für die mikronisierte Probe nimmt sie dann einen höheren Wert an. Die höchste Auflösungsgeschwindigkeit besitzt die RESS-Probe. Diese Kenngrößen und die dazugehörigen Vertrauensbereiche sind in Tab. 5.6 zusammengefasst. Die für die drei Zeitintervalle berechneten Dissolutionskonstanten nach Hixson-Crowell sind in Abb. 5.18 graphisch dargestellt.

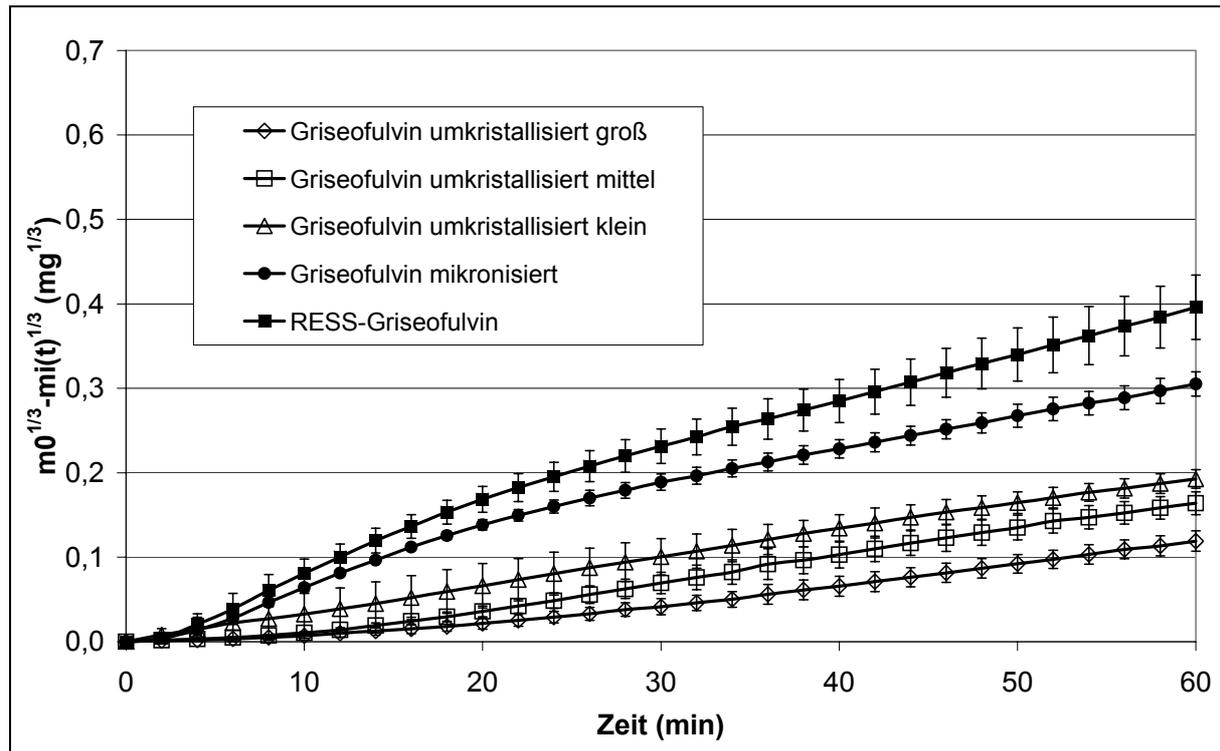


Abb. 5.17 Auftragung gemäß Kubikwurzelgesetz (nach Hixson-Crowell) für Griseofulvin zur Bestimmung der Dissolutionskonstanten

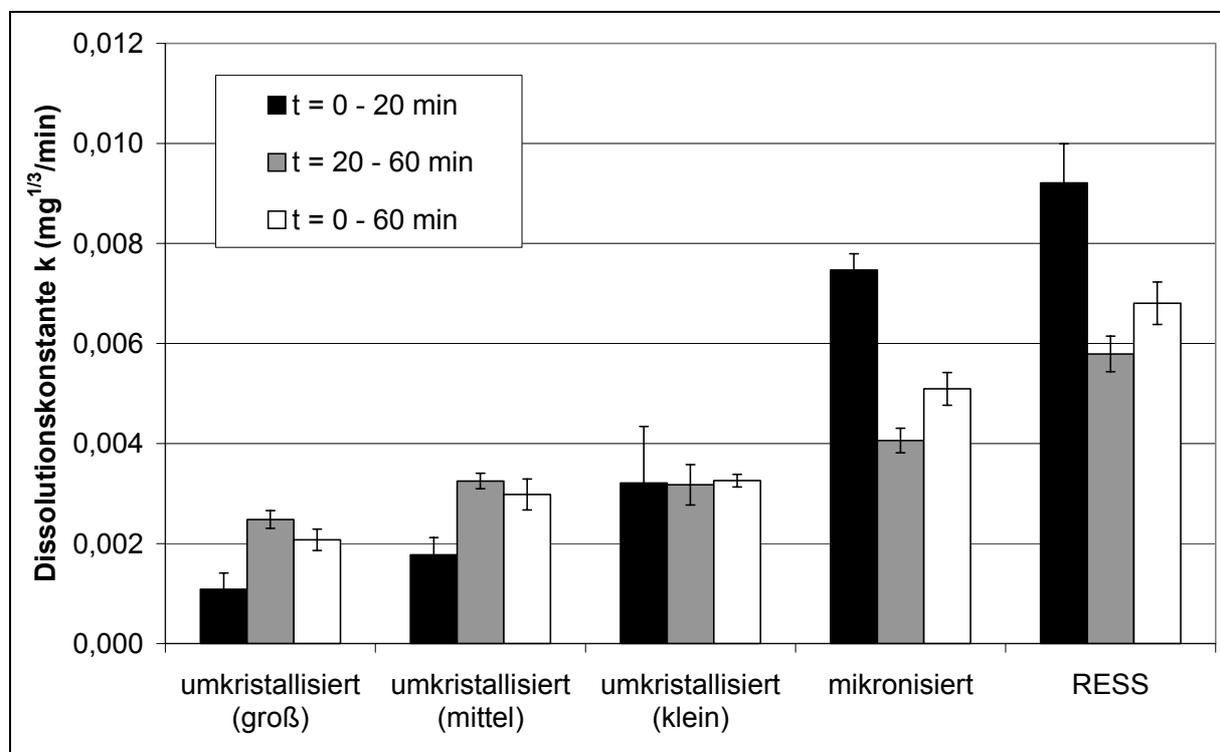


Abb. 5.18 Graphische Darstellung der Dissolutionskonstanten k von Griseofulvin

Tab. 5.6 *Aufgelöste Griseofulvinmenge (%) nach $t = 60$ min und Dissolutionskonstanten k ($\text{mg}^{1/3}/\text{min}$) von Griseofulvin nach Hixson-Crowell*

Probe	Aufgelöste Griseofulvinmenge (%) nach $t = 60$ min	k ($\text{mg}^{1/3}/\text{min}$) (0 – 20 min)	k ($\text{mg}^{1/3}/\text{min}$) (20 – 60 min)	k ($\text{mg}^{1/3}/\text{min}$) (0 – 60 min)
Umkristallisiert (groß)	22,49	0,00109	0,00248	0,00208
	± 1,9	± 0,0003	± 0,0002	± 0,0002
Umkristallisiert (mittel)	29,61	0,00177	0,00325	0,00298
	± 1,9	± 0,0003	± 0,0002	± 0,0003
Umkristallisiert (klein)	34,98	0,00321	0,00317	0,00326
	± 1,6	± 0,0011	± 0,0004	± 0,0001
Mikronisiert	48,52	0,00747	0,00406	0,00509
	± 3,2	± 0,0003	± 0,0002	± 0,0003
RESS	62,48	0,00921	0,00579	0,00681
	± 2,2	± 0,0008	± 0,0004	± 0,0004

5.1.8.1.2 *Korrelation zwischen Auflösungs geschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell und der spezifischen BET-Oberfläche*

Die Logarithmen der spezifischen BET-Oberflächen der fünf Griseofulvinzubereitungen sind direkt proportional zur den für den Zeitraum von 0-20 Minuten ermittelten Auflösungskonstanten nach Hixson-Crowell. Dieser Zusammenhang zwischen der Auflösungsgeschwindigkeit und der spezifischen BET-Oberfläche kann in Abb. 5.19 verdeutlicht werden.

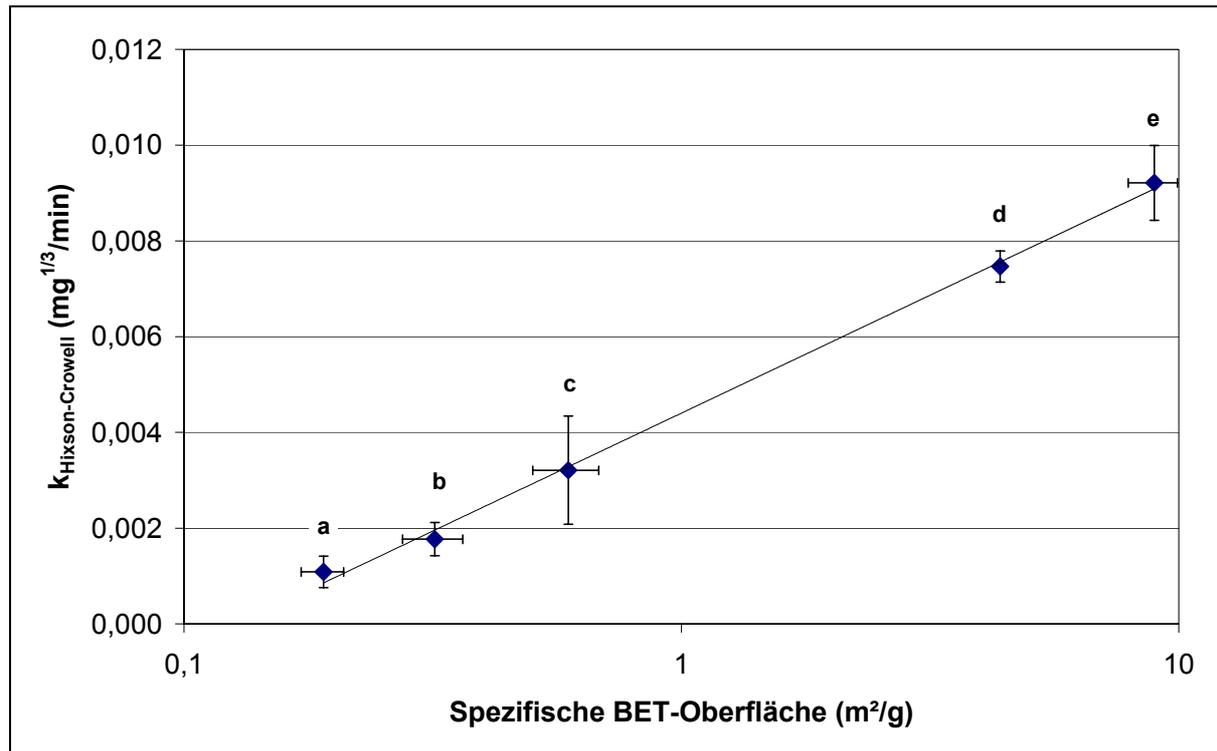


Abb. 5.19 Korrelation zwischen Dissolutionsgeschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell und dem Logarithmus der spezifischen BET-Oberfläche
 a: umkristallisiert (klein), b: umkristallisiert (mittel), c: umkristallisiert (groß),
 d: mikronisiert, e: RESS-Griseofulvin

5.1.8.2 Feste Dispersion

Die Vergrößerung der Teilchenoberfläche und die Behandlung von Griseofulvin mit überkritischem Kohlendioxid können zu einer Hydrophobisierung führen. Dies zeigt sich in einer schlechteren Benetzung der Partikel. Daneben kommt es zur Bildung von Agglomeraten. Abhilfe kann die Herstellung von festen Dispersionen schaffen.

Das UV-Spektrum einer Dispersion von Griseofulvin in PEG (10:90) ist dem Spektrum einer Lösung identisch. Das Auflösungsverhalten und die dazugehörige Auswertung nach Hixson-Crowell sind in den Abb. 5.20, Abb. 5.21 und Abb. 5.22 graphisch und in Tab. 5.7 tabellarisch dargestellt.

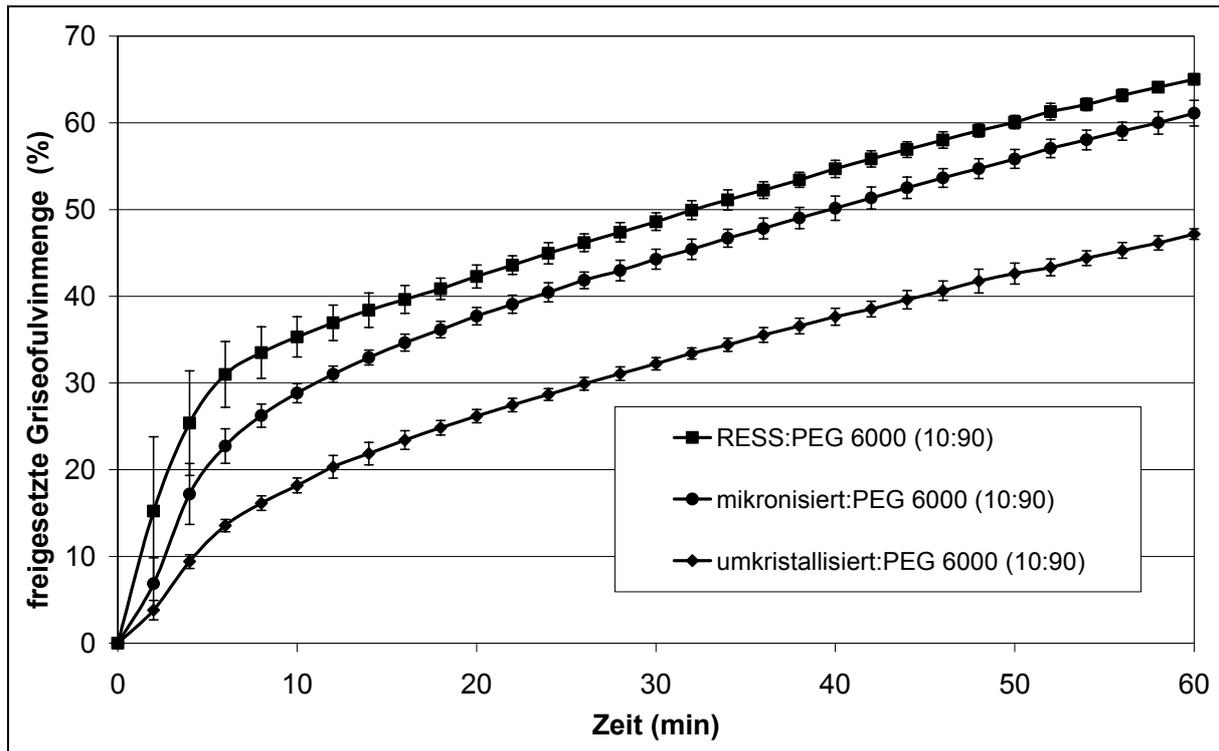


Abb. 5.20 Auflöseverhalten der festen Dispersionen in Phosphatpuffer pH 7,4

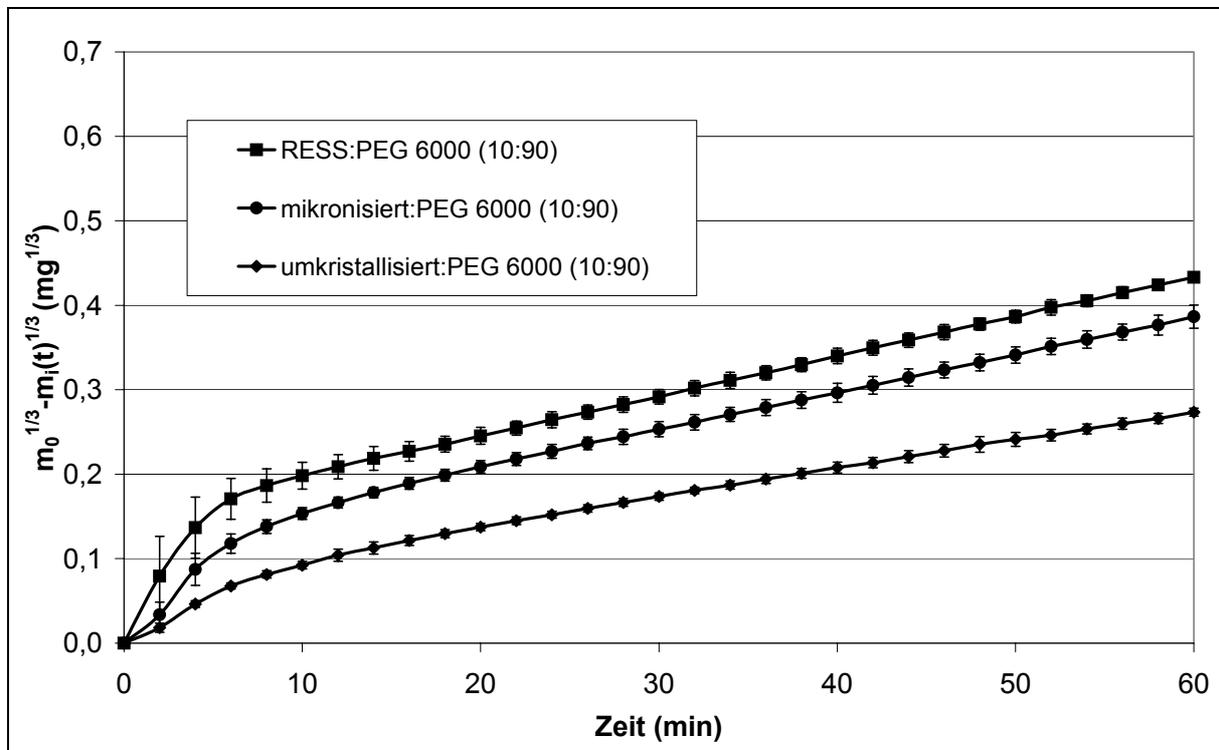


Abb. 5.21 Kubikwurzelgesetz (nach Hixson-Crowell) für Griseofulvin zur Bestimmung der Dissolutionskonstanten

Tab. 5.7 Aufgelöste Griseofulvinmenge (%) aus festen Dispersionen nach $t = 60$ min und Dissolutionskonstanten k ($\text{mg}^{1/3}/\text{min}$) nach Hixson-Crowell

Probe	Aufgelöste Griseofulvinmenge (%) nach $t = 60$ min	k ($\text{mg}^{1/3}/\text{min}$) (0 – 6 min)	k ($\text{mg}^{1/3}/\text{min}$) (10 – 60 min)	k ($\text{mg}^{1/3}/\text{min}$) (0 – 60 min)
Umkristallisiert : PEG 6000 (10:90)	47,17 \pm 0,6	0,01154 \pm 0,0005	0,00351 \pm 0,0002	0,00402 \pm 0,0002
Mikronisiert : PEG 6000 (10:90)	61,11 \pm 1,5	0,02038 \pm 0,0019	0,00452 \pm 0,0002	0,00534 \pm 0,0004
RESS : PEG 6000 (10:90)	65,02 \pm 0,6	0,02848 \pm 0,0031	0,00470 \pm 0,0002	0,00551 \pm 0,0004

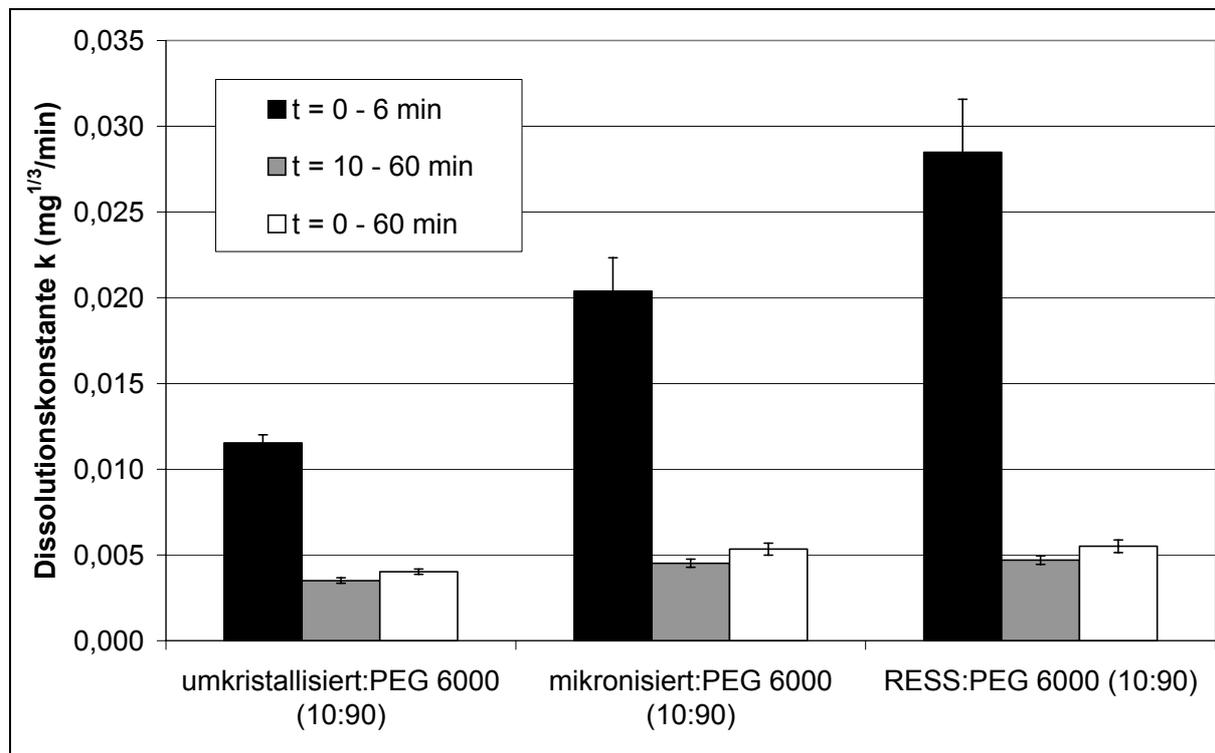


Abb. 5.22 Graphische Darstellung der Dissolutionskonstanten k von Griseofulvin in festen Dispersionen nach Hixson-Crowell

5.1.9 In-vitro Resorptionsverhalten von Griseofulvin

Für die Transportversuche von Griseofulvin werden Caco-2 Monolayer nach mindestens 21 Tagen Wachstum verwendet. In einem ersten Versuch werden 3 Griseofulvinlösungen mit den Konzentrationen 5,85; 10,26 und 11,70 $\mu\text{g/ml}$ in die Donorkammer gegeben. Dazu kommen sowohl Proben des mikronisierten als auch des RESS-Griseofulvins zum Einsatz. Diese werden in Hanks'schem Puffer gelöst. Bestimmt wird die Griseofulvinpermeation durch Messung der Griseofulvinkonzentration in der Akzeptorkammer (Abb. 5.23). Aus der Steigung der Geraden wird der Griseofulvinsubstanzfluss dc/dt bestimmt. Er beträgt für die niedrige Konzentration $0,036 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, für die mittlere $0,056 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ und für die hohe Konzentration $0,061 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$.

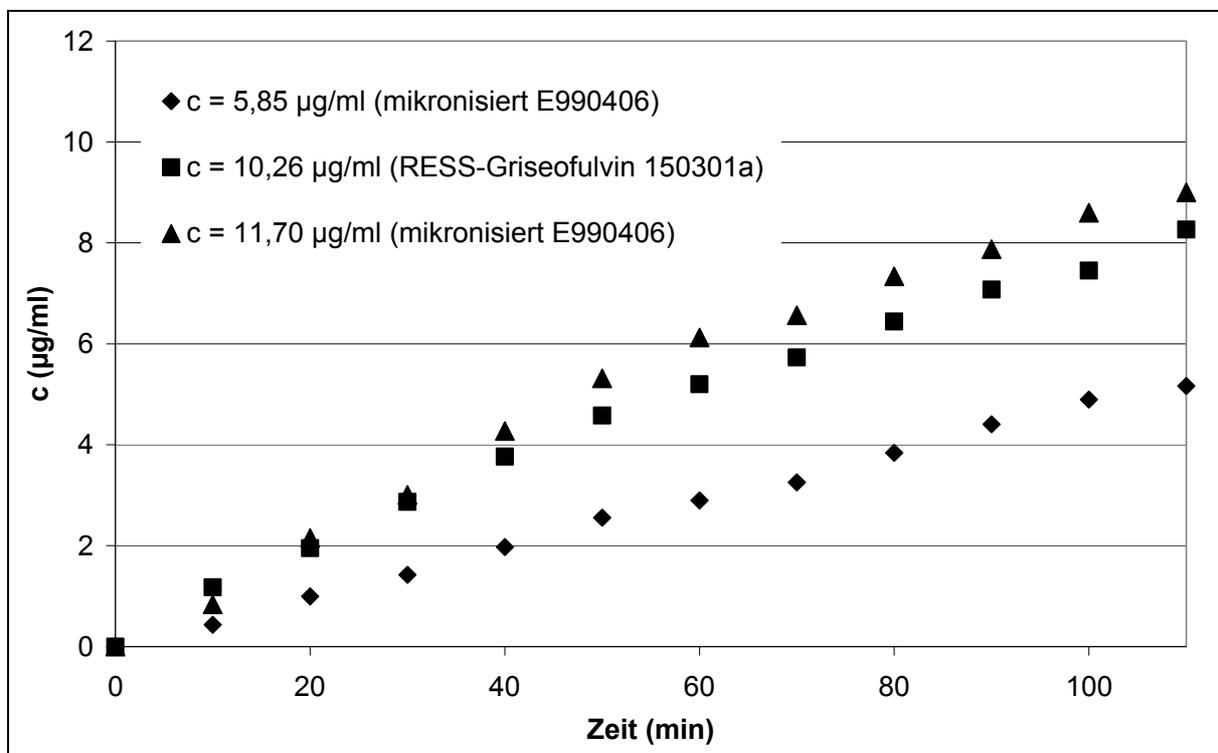


Abb. 5.23 Griseofulvinkonzentration auf der basolateralen Seite (kumulativ)

Trägt man den Substanzfluss über der eingesetzten Konzentration auf, ergibt sich ein linearer Zusammenhang (Abb. 5.24). Der Substanzfluss ist dabei umso größer, je höher die Konzentration ist.

Des Weiteren werden Transportuntersuchungen mit RESS-Griseofulvin und mikronisiertem Griseofulvin in den Transportrichtungen apikal nach basolateral und basolateral nach apikal durchgeführt. Zur Beurteilung der Permeation wird der Permeationskoeffizient (P) bestimmt.

Die Werte sind in Tab. 5.8 aufgeführt. Die Permeationskoeffizienten liegen zwischen 42,7 und $47,5 \cdot 10^{-6}$ cm/s.

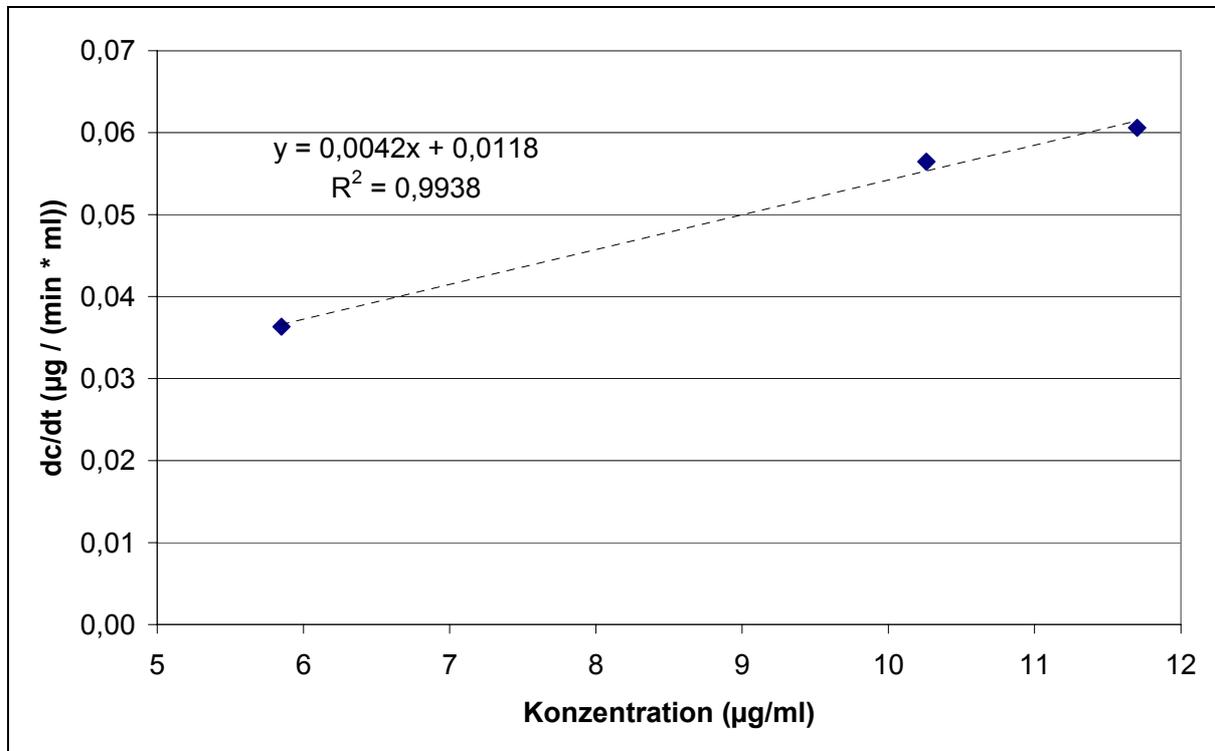


Abb. 5.24 Korrelation zwischen Griseofulvinkonzentration und Substanzfluss

Tab. 5.8 Permeationskoeffizienten von Griseofulvin

	RESS	mikronisiert
P (10^{-6} cm/s) apikal nach basolateral	44,9 ± 5,0	42,7 ± 4,6
P (10^{-6} cm/s) basolateral nach apikal	45,9 ± 6,1	47,5 ± 8,4
P (10^{-6} cm/s) dynamische Messung	45,7 ± 2,3	51,2 ± 5,3

5.1.9.1 Resorption von Griseofulvin in Abhängigkeit von der Auflösungsgeschwindigkeit

In dieser Versuchsreihe soll die Permeation von Griseofulvin in Abhängigkeit von der Löslichkeit untersucht werden. Bei dieser dynamischen Methode kommen Griseofulvinpartikel anstelle einer Griseofulvinlösung zum Einsatz. Die Partikel müssen sich zunächst im Dissolu-

tionsmedium (Hanks'scher Puffer) in der Dissolutionskammer auflösen, bevor sie die Zellen passieren können. Dazu werden 3 mg der jeweiligen Griseofulvinproben in 50 ml Dissolutionsmedium gegeben. In Abb. 5.25 ist die Griseofulvinkonzentration in der Akzeptorkammer für umkristallisiertes, mikronisiertes und RESS-Griseofulvin dargestellt.

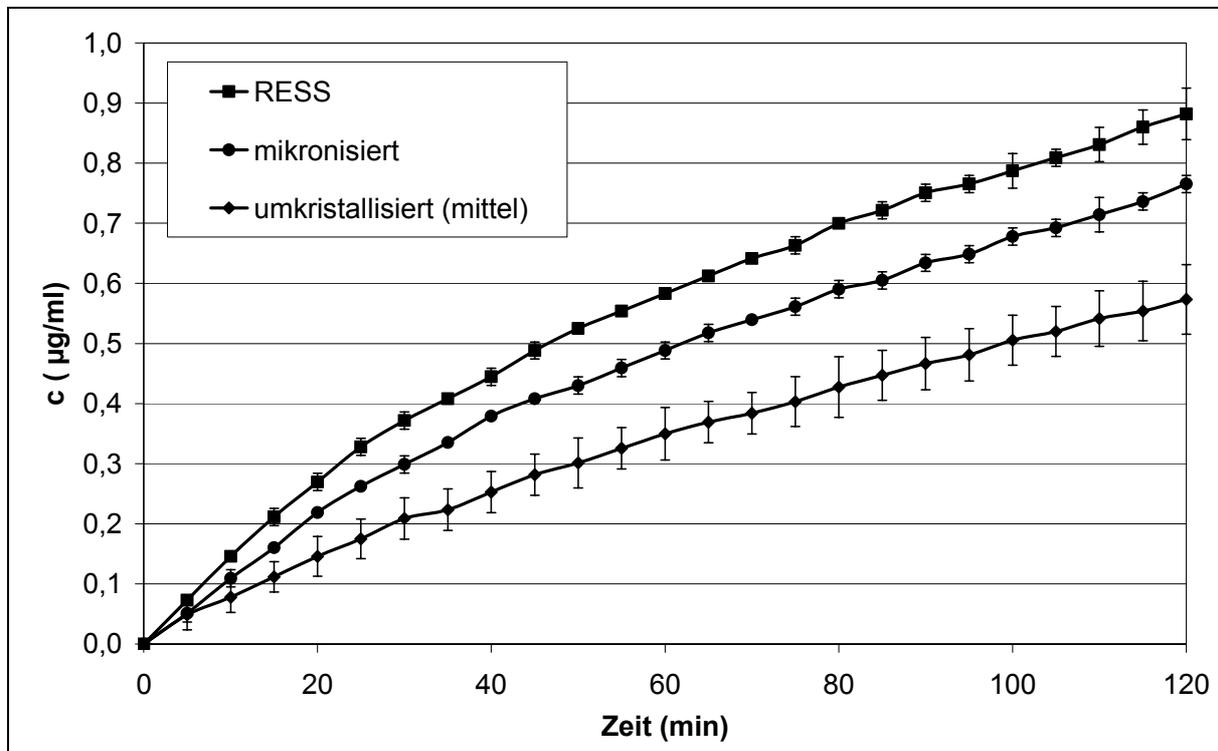


Abb. 5.25 Griseofulvinkonzentration in der Akzeptorkammer

Als Kenngröße der Permeation wird der Substanzfluss dc/dt herangezogen. Dieser ist für die 3 untersuchten Griseofulvin-Proben umkristallisiert (mittel), mikronisiert und RESS in Abb. 5.26 graphisch und in Tab. 5.9 tabellarisch dargestellt. Dabei zeigt RESS-Griseofulvin den höchsten Substanzfluss vor der mikronisierten und der umkristallisierten Probe.

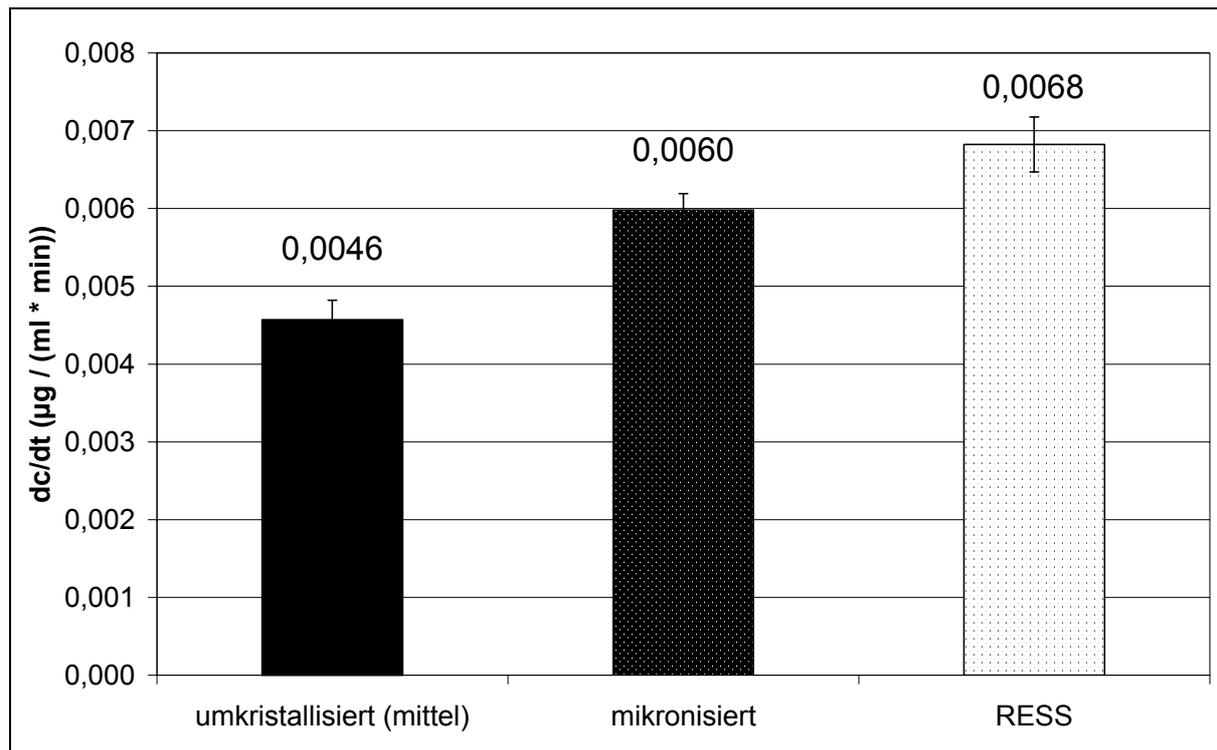


Abb. 5.26 Substanzfluss als Kenngröße der Permeation

Tab. 5.9 c nach 120 min auf der basolateralen Seite und Substanzfluss als Kenngrößen

	$c_{120 \text{ min}}$ (µg/ml)	dc/dt (µg / (ml*min))
Umkristallisiert	0,57 +/- 0,06	0,0046 +/- 0,0002
Mikronisiert	0,77 +/- 0,01	0,0060 +/- 0,0002
RESS	0,88 +/- 0,04	0,0068 +/- 0,0003

5.2 Ergebnisse der Herstellung und Charakterisierung der Ibuprofen-Partikel

5.2.1 Partikelgröße bei der Expansion in die Gasphase

Die mittlere Partikelgröße x_{50} der RESS-Ibuprofenpartikel werden online und in situ in der Expansionskammer mit Hilfe eines Drei-Wellenlängen-Extinktionsmessgeräts gemessen. Die mittlere Partikelgröße beträgt 240 ± 80 nm.

5.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

In Abb. 5.27 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Ibuprofen 50 und von mit der Stiftmühle bzw. mittels RESS-Prozess mikronisierten Ibuprofen abgebildet. In der ersten Reihe sind die Partikel mit 50-, in der zweiten Reihe mit 1000- und in der unteren Reihe mit 5000facher Vergrößerung aufgenommen.

Das Ibuprofen 50 besteht aus Kristallen mit einer länglichen, stäbchenartigen Struktur. Die Oberfläche ist aufgeraut.

Sowohl der RESS-Prozess als auch die Zerkleinerung der Partikel mittels Stiftmühle führt zu einer Reduktion der Teilchengröße gegenüber dem Ausgangsmaterial (Ibuprofen 50).

Dabei besitzt das Produkt der Stiftmühle noch deutlich größere Partikel im Vergleich zu dem RESS-Material. Die Oberfläche des RESS-Materials ist zerklüftet, was auf eine Besetzung der Oberfläche mit kleineren Partikeln mit einer Teilchengröße im Nanometerbereich hindeutet. Das RESS-Material zeigt im Gegensatz zum Produkt aus der Stiftmühle eine etwas größere Teilchengrößenreduktion.

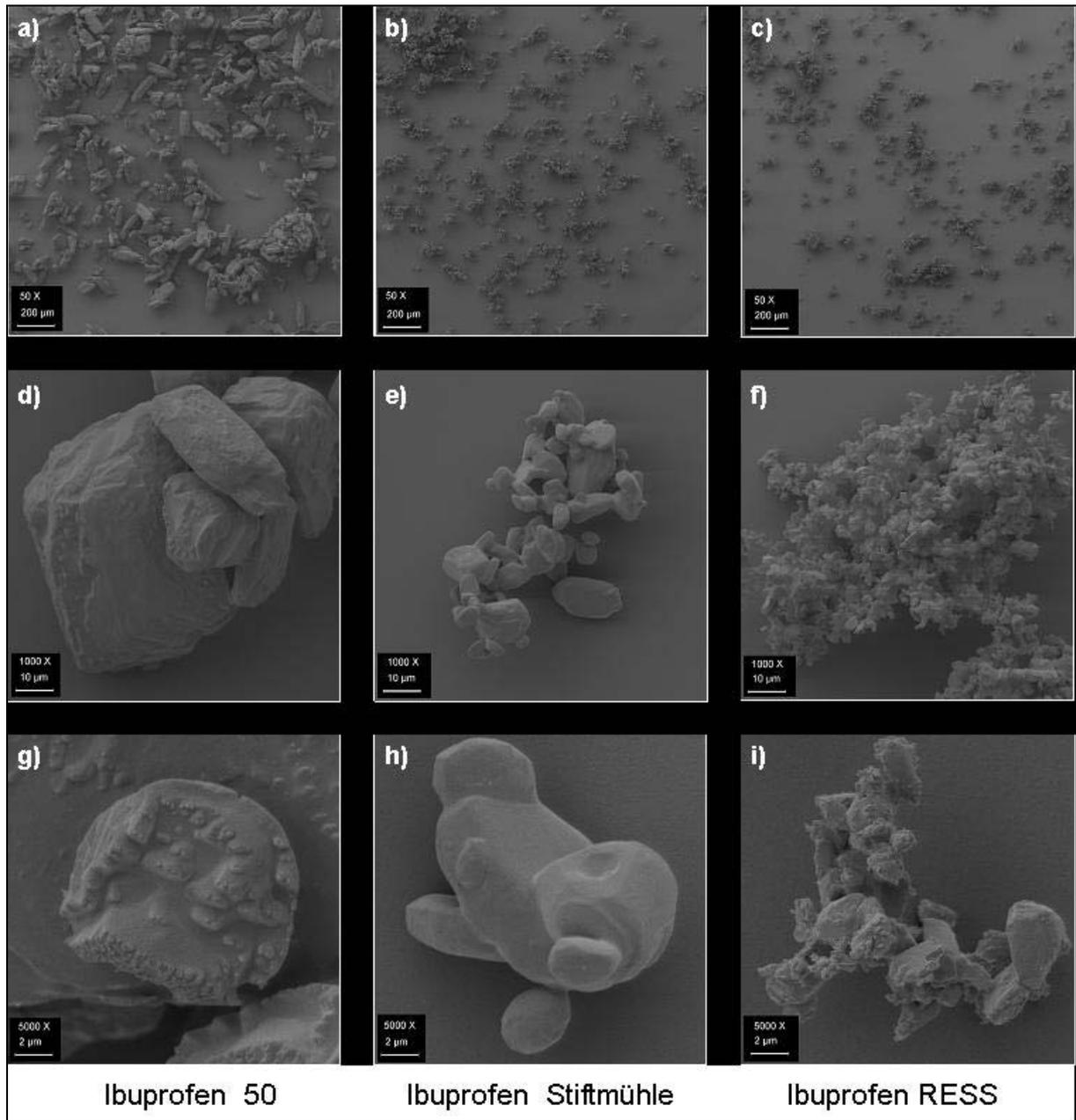


Abb. 5.27 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Ibuprofenproben bei 50-, 1000- und 5000facher Vergrößerung

5.2.3 Partikelgrößenanalytik mittels Laserbeugungsspektroskopie

Die Partikelgröße des Ausgangsmaterials Ibuprofen 50 reicht von $x_{10} = 26,1 \mu\text{m}$ bis $x_{90} = 86,8 \mu\text{m}$. Entsprechend der Spezifikation besitzt es eine mittlere Teilchengröße von $48,9 \mu\text{m}$. Die Mahlung mittels Stiftmühle führt zu einer Reduktion der mittleren Partikelgröße auf $11,6 \mu\text{m}$. Das RESS-Ibuprofen enthält Partikel im Nanometerbereich ($x_{10} = 0,8 \mu\text{m}$), aber auch größere Teilchen ($x_{90} = 12,2 \mu\text{m}$), so dass eine mittlere Partikelgröße von $5,7 \mu\text{m}$ resultiert. Der RESS-Prozess führt nochmals zu einer Halbierung der mittleren Partikelgröße im Vergleich zu Partikeln, die mittels Stiftmühle zerkleinert werden. Verglichen mit dem Ausgangsmaterial besitzt das RESS-Produkt eine um das 8,5fache reduzierte mittlere Teilchengröße (Abb. 5.28).

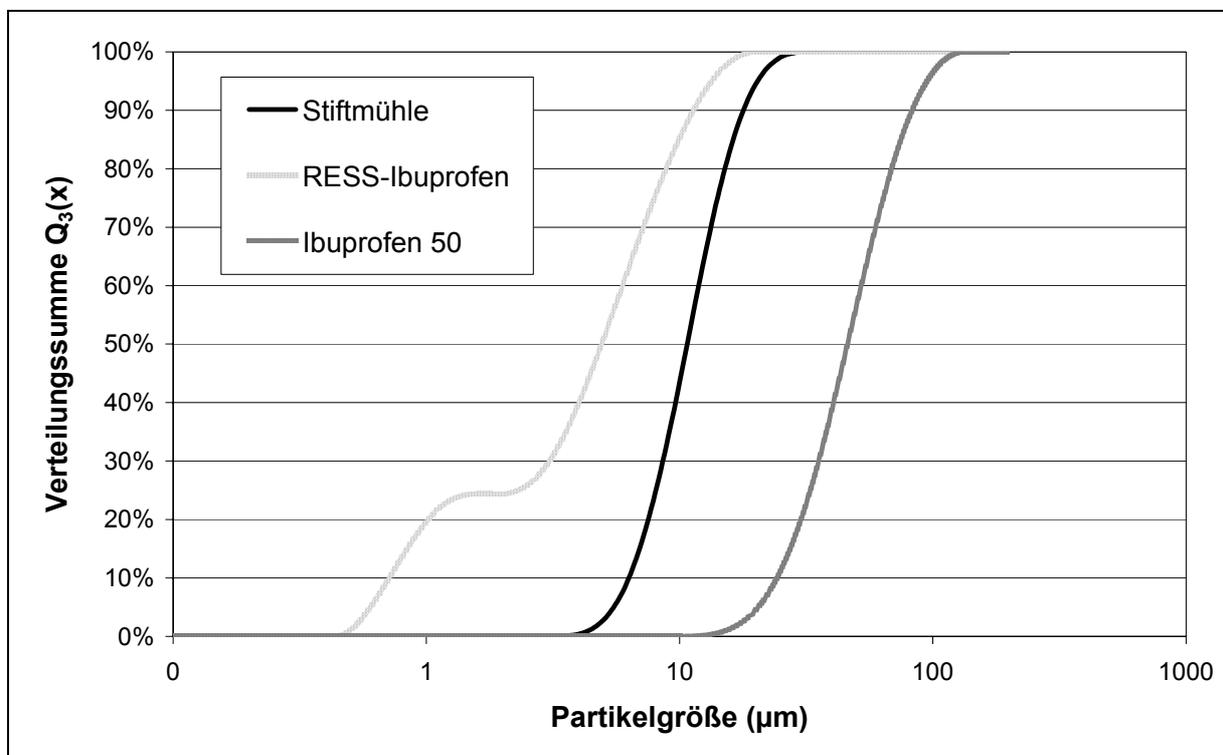


Abb. 5.28 Verteilungssummenkurve von Ibuprofen

In Tab. 5.10 sind die Mittelwerte und der 95 % Vertrauensbereich der Korngrößenparameter aufgelistet.

Tab. 5.10 Korngrößenparameter von Ibuprofen; angegeben sind jeweils Mittelwert und 95 % Vertrauensbereich ($n = 4$)

Probe	X_{10} (μm)	X_{20} (μm)	X_{50} (μm)	X_{80} (μm)	X_{90} (μm)
Ibuprofen 50	26,14 \pm 0,9	32,33 \pm 1,1	48,89 \pm 1,3	72,31 \pm 1,4	86,76 \pm 1,5
Ibuprofen Stiftmühle	6,78 \pm 0,2	8,12 \pm 0,1	11,61 \pm 0,3	16,46 \pm 1,0	19,53 \pm 1,4
RESS-Ibuprofen	0,78 \pm 0,1	1,45 \pm 0,6	5,74 \pm 1,4	9,74 \pm 3,2	12,19 \pm 4,6

5.2.4 Spezifische Oberfläche mittels Stickstoffadsorptionsmethode nach Brunauer, Emmett und Teller

Aus der Abb. 5.29 ist die spezifische BET-Oberfläche für Ibuprofen 50, für mit der Stiftmühle zerkleinertes Ibuprofen und für Ibuprofen aus dem RESS-Prozess zu entnehmen. Ibuprofen 50 besitzt mit $0,104 \text{ m}^2/\text{g}$ die geringste, das RESS-Produkt mit $1,644 \text{ m}^2/\text{g}$ die höchste spezifische BET-Oberfläche. Sowohl die Mahlung mittels Stiftmühle (spezifische BET-Oberfläche: $1,000 \text{ m}^2/\text{g}$) als auch das RESS-Verfahren führt zu einer starken Zunahme der BET-Oberfläche.

5.2.5 Thermoanalytische Untersuchungen mittels dynamischer Differenzkalorimetrie

Die DSC-Thermogramme aus der thermoanalytischen Untersuchung im Bereich von 25 bis $90 \text{ }^\circ\text{C}$ sind in Abb. 5.30 zu sehen. Alle Proben zeigen einen endothermen Peak. Es handelt sich hierbei um den Schmelzpeak von Ibuprofen. In Tab. 5.11 sind der Onsetpunkt ($^\circ\text{C}$) und die Schmelzenthalpie (J/g) als Kenngrößen des thermischen Verhaltens aufgelistet. Der Schmelzpunkt, dargestellt als Onsetpunkt fällt beim RESS-Produkt etwas geringer aus als beim Ausgangsmaterial Ibuprofen 50 und bei dem mit der Stiftmühle zerkleinerten Ibuprofen. Bezüglich der Schmelzenthalpie kann kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Proben festgestellt werden.

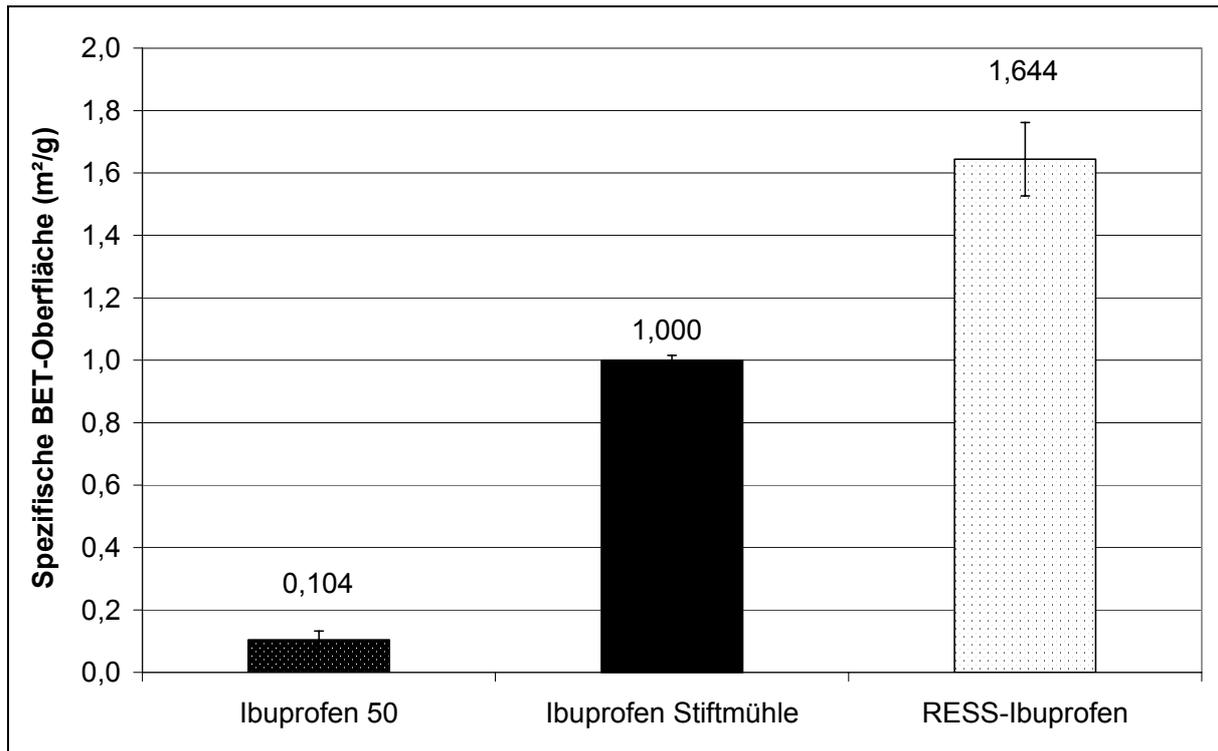


Abb. 5.29 Spezifische BET-Oberfläche von Ibuprofen

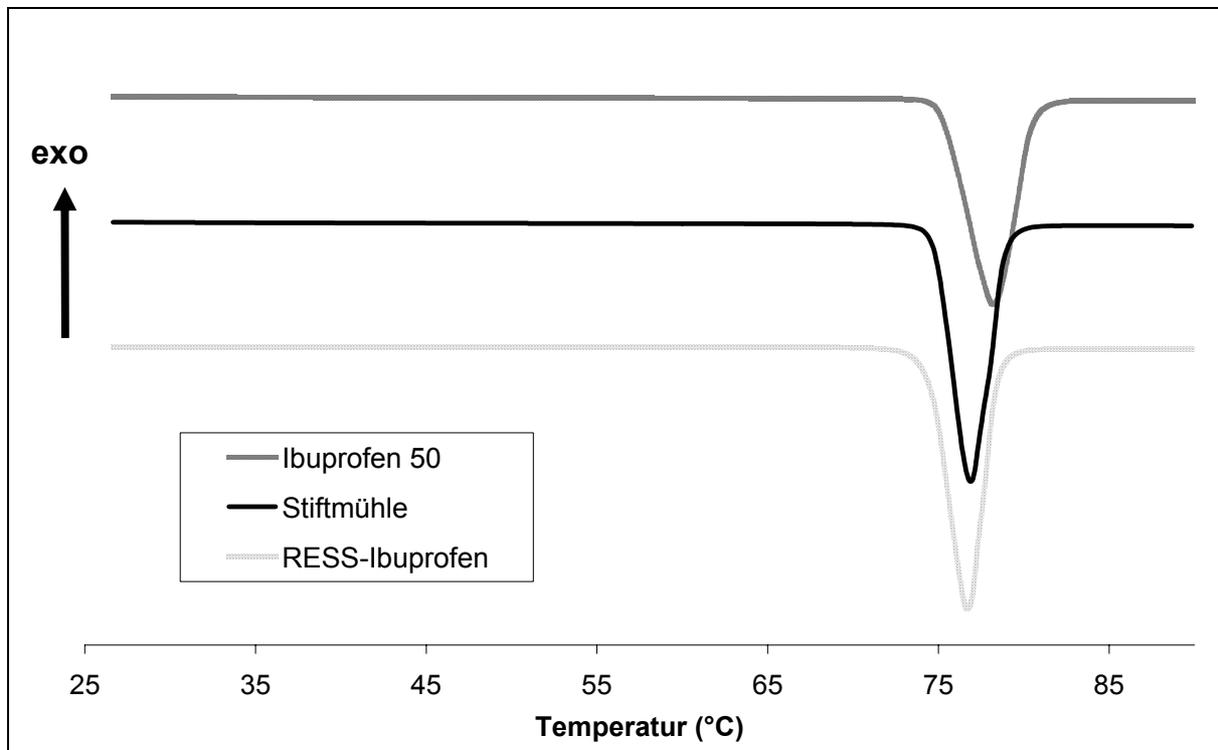


Abb. 5.30 DSC-Thermogramme von Ibuprofen 50, Ibuprofen aus der Stiftmühle und RESS-Ibuprofen

Tab. 5.11 Schmelzpunkt und Schmelzenthalpie von Ibuprofen aus der dynamischen Differenzkalorimetrie

Probe	Schmelzpunkt (°C)	Schmelzenthalpie (J/g)
Ibuprofen 50	74,8 ± 0,3	126,3 ± 1,0
Stiftmühle	74,6 ± 0,1	124,4 ± 1,8
RESS	74,2 ± 0,1	124,6 ± 1,9

5.2.6 FT-Raman-Spektroskopie

Abb. 5.31 zeigt die Raman-Spektren von Ibuprofen 50 und RESS-Ibuprofen. Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Banden nachgewiesen werden. Beide Spektren zeigen eine deutliche Bande bei ca. 1607 cm^{-1} , welche in der Abbildung durch einen Pfeil verdeutlicht ist (Pfeil). Es handelt sich dabei um eine charakteristische Bande für kristallines Ibuprofen.

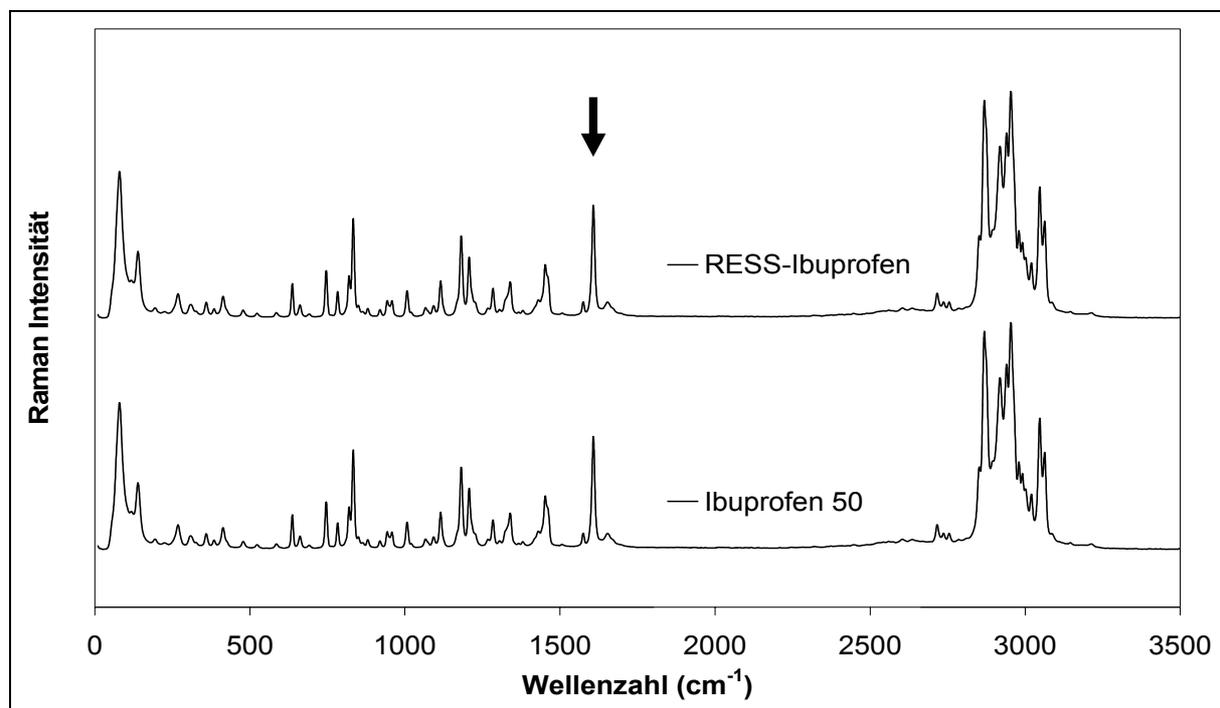


Abb. 5.31 Raman-Spektren von kristallinem Ibuprofen 50 und RESS-Ibuprofen

5.2.7 Löslichkeit

Nach dem Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem (BCS) muss für die Beurteilung der Löslichkeit eines Arzneistoffes eine Untersuchung in wässrigen Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt werden. In Abb. 5.32 ist eine pH-abhängige Löslichkeit von Ibuprofen 50 zu erkennen. Bei einem pH-Wert von 7,5 beträgt die Sättigungslöslichkeit zum Beispiel 3,14 mg/ml, dagegen bei einem pH-Wert von 1,0 nur noch 0,03 mg/ml.

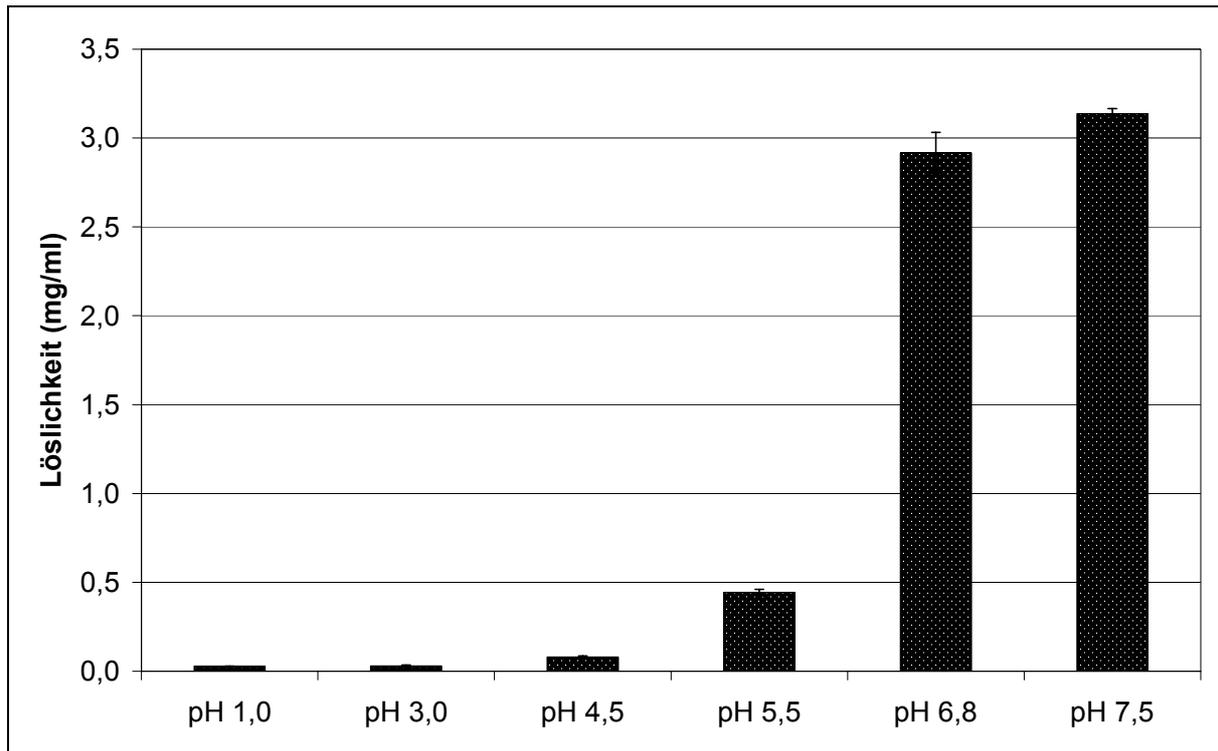


Abb. 5.32 Löslichkeit von Ibuprofen 50 in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten nach BCS

5.2.7.1 Vergleich der Löslichkeit von Ibuprofen 50 und RESS-Ibuprofen

In Abb. 5.33 ist die Sättigungslöslichkeit c_s von RESS-Ibuprofen der von Ibuprofen 50 für die drei pH-Niveaus 1,0; 5,5 und 7,5 gegenübergestellt. Für das RESS-Produkt ist für die einzelnen pH-Niveaus verglichen mit Ibuprofen 50 kein signifikanter Unterschied festzustellen.

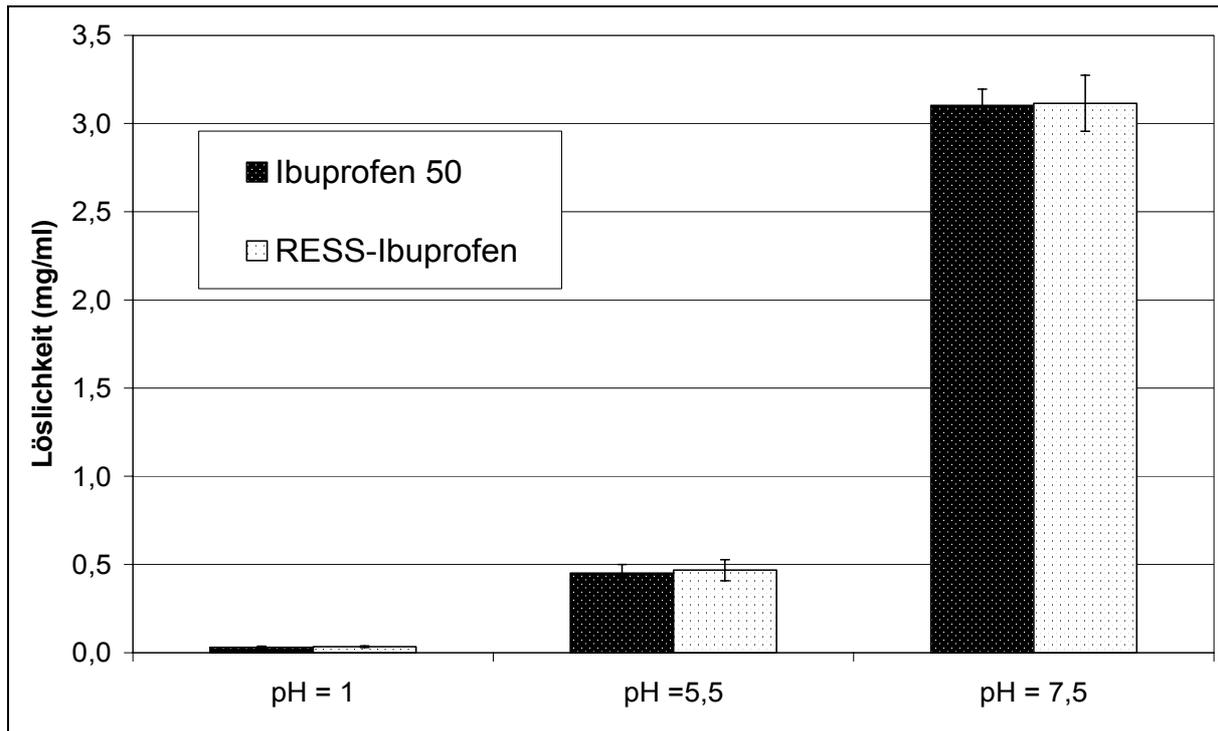


Abb. 5.33 Bestimmung der Löslichkeit von RESS-Ibuprofen im Vergleich zu mikronisiertem Ibuprofen auf drei pH Niveaus

5.2.8 Auflöseverhalten der Ibuprofenpartikel

Das Auflösungsprofil der verschiedenen Ibuprofenproben ist in Abb. 5.34 dargestellt. Interessanterweise ist hier das mit der Stiftmühle mikronisierte Ibuprofen trotz kleinerer Oberfläche und größerer Partikel dem RESS-Ibuprofen überlegen. Nach 30 Minuten sind jedoch bei allen Proben mehr als 80 % der eingesetzten Ibuprofenmenge in Lösung gegangen.

Als Kenngröße zur Beurteilung der Auflösungsgeschwindigkeit werden die Auflösungskoeffizienten k_w aus der Weibullfunktion herangezogen. Dabei besitzt das Ibuprofen 50 mit $0,0757 \text{ min}^{-1}$ den geringsten, das Ibuprofen-Stiftmühle dagegen den höchsten Auflösungskoeffizienten. Diese sind in Tab. 5.12 für die untersuchten Proben aufgelistet.

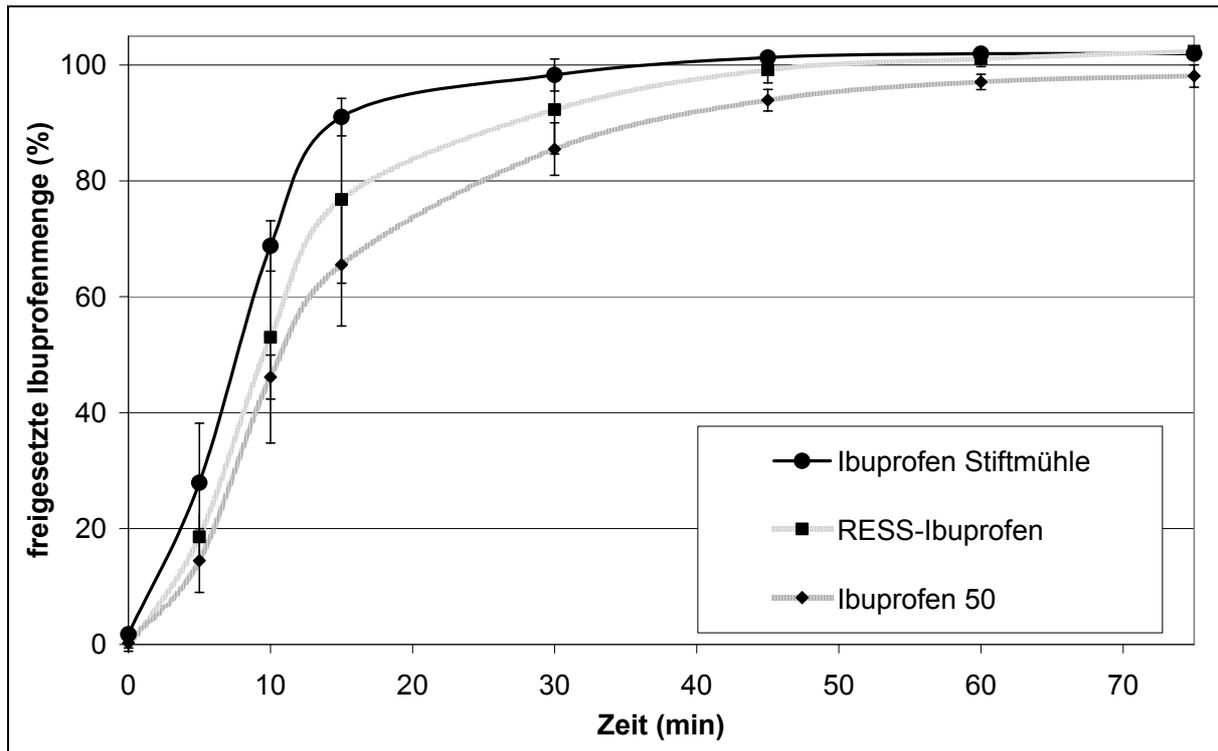


Abb. 5.34 Auflösungsverhalten von Ibuprofen in Hanks'schem Puffer bei pH 7,2

Tab. 5.12 Auflösungskoeffizienten k_w von Ibuprofen

	Ibuprofen 50	RESS-Ibuprofen	Ibuprofen-Stiftmühle
k_w (min^{-1})	$0,0757 \pm 0,002$	$0,0800 \pm 0,013$	$0,0974 \pm 0,011$

5.2.9 Resorption von Ibuprofen in Abhängigkeit des Auflöseverhaltens

In dieser Versuchsreihe soll die Permeation von Ibuprofen in Abhängigkeit von der Löslichkeit untersucht werden. Dazu werden 75 mg der Ibuprofenproben in 50 ml Hanks'scher Puffer als Dissolutionsmedium gegeben. In Abb. 5.35 ist die Ibuprofenkonzentration der Akzeptorkammer für Ibuprofen 50, Ibuprofen-Stiftmühle und RESS-Ibuprofen dargestellt. Als Kenngröße der Permeation wird der Substanzfluss dc/dt herangezogen. Dieser ist in Abb. 5.36 graphisch dargestellt. Zwischen den drei verschiedenen Proben ist hierbei kein Unterschied feststellbar.

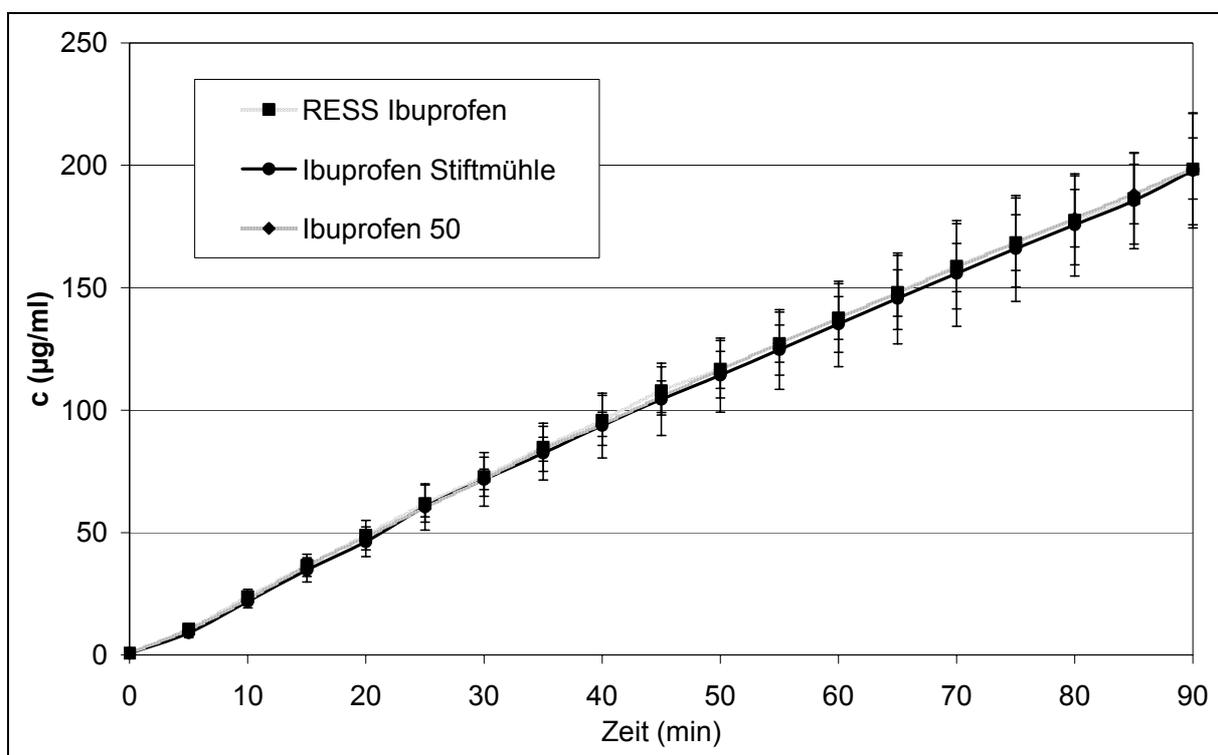


Abb. 5.35 Ibuprofen auf der basolateralen Seite

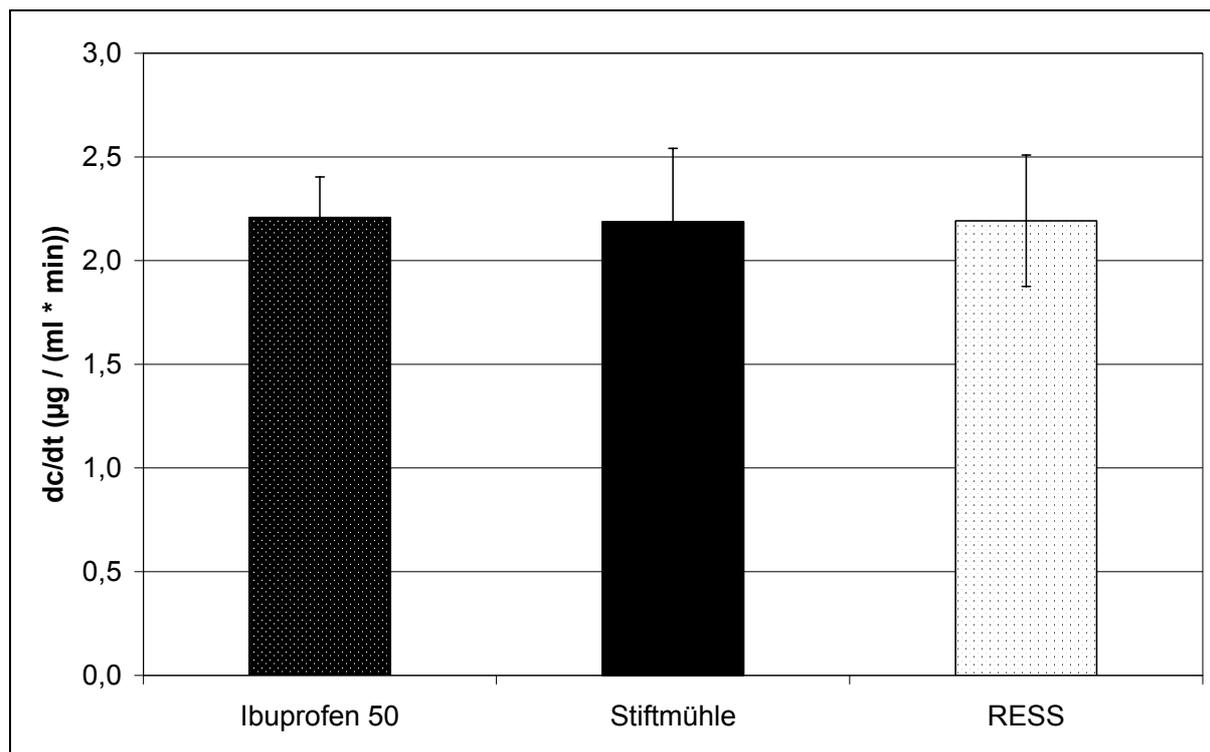


Abb. 5.36 Substanzfluss von Ibuprofen

5.3 Feste Lipidnanopartikel (SLN) und Nanoemulsion mit Griseofulvin

Zur Charakterisierung der Morphologie, Partikelgröße und des Permeationsverhaltens werden SLN und Nanoemulsionen von unseren Kooperationspartnern vom Institut für Pharmazie (Pharmazeutische Technologie) der FU Berlin hergestellt. Für die Zubereitung wird sowohl RESS-Griseofulvin als auch mikronisiertes Griseofulvin verwendet.

5.3.1 Charakterisierung der festen Lipidnanopartikel und Nanoemulsion

5.3.1.1 Morphologie

Die SLN liegen als diskusartige Plättchen vor. Abb. 5.37 (links) zeigt diese Plättchen sowohl in der Aufsicht (1.) als auch in der Seitenansicht (2.). In der Nanoemulsion liegt die Lipidphase als kugelförmige Tröpfchen vor. Die Plättchen und die Tröpfchen besitzen eine Partikelgröße im unteren Nanometerbereich.

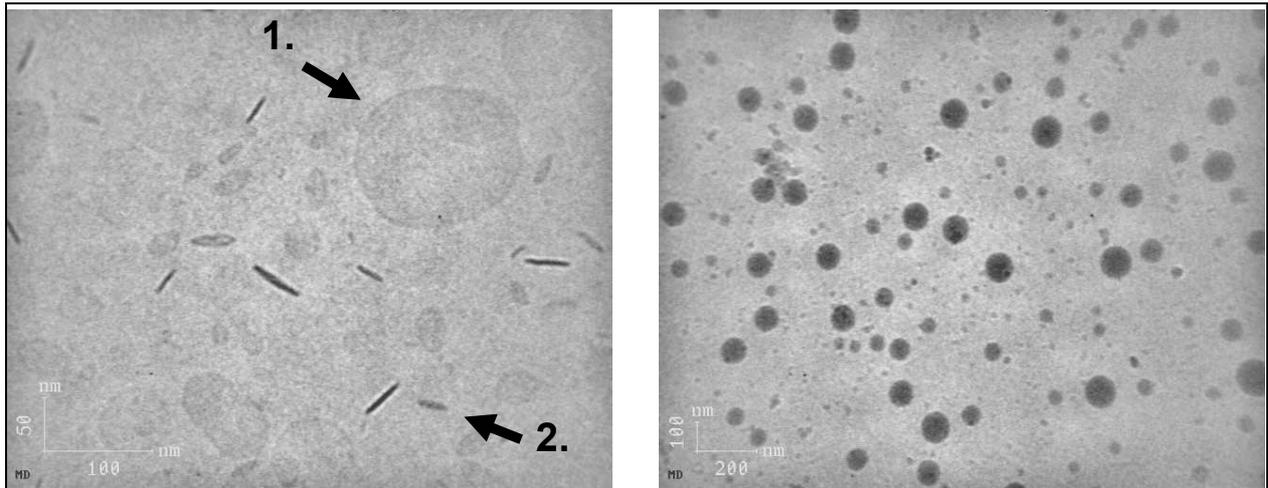


Abb. 5.37 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SLN (links) und Nanoemulsion (rechts)

5.3.1.2 Teilchengröße

Die Korngrößenverteilung der Zubereitungen wird mit Hilfe der Laserbeugung gemessen. Da es sich bei den SLN um komplex zusammengesetzte Systeme handelt, ist es sehr schwierig, aus der Beugung des Laserlichtes die Partikelgröße zu berechnen. Deshalb wird eine weitere Messung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie durchgeführt. Dabei wird die Beweglichkeit der Partikel gemessen. In Abb. 5.38 ist die Korngrößenverteilung aus der Laserbeugung dargestellt. Die Tröpfchen der Nanoemulsion und die Plättchen der SLN zeigen unabhängig vom eingesetzten Griseofulvinmaterial (RESS oder mikronisiert) eine vergleichbare Korngrößenverteilung. Die Nanoemulsion besitzt neben einer überwiegenden Anzahl an Tröpfchen im Nanometerbereich auch einige Tröpfchen im Mikrometerbereich. Daraus resultiert ein etwas höherer x_{90} -Wert (Tab. 5.13). Bei den SLN liegen sämtliche Partikel im Nanometerbereich. Die von Laserbeugung und PCS gelieferte mittlere Partikelgröße liegt in derselben Größenordnung (Tab. 5.13), und der Polydispersitätsindex (PI) deutet auf eine enge Verteilung hin.

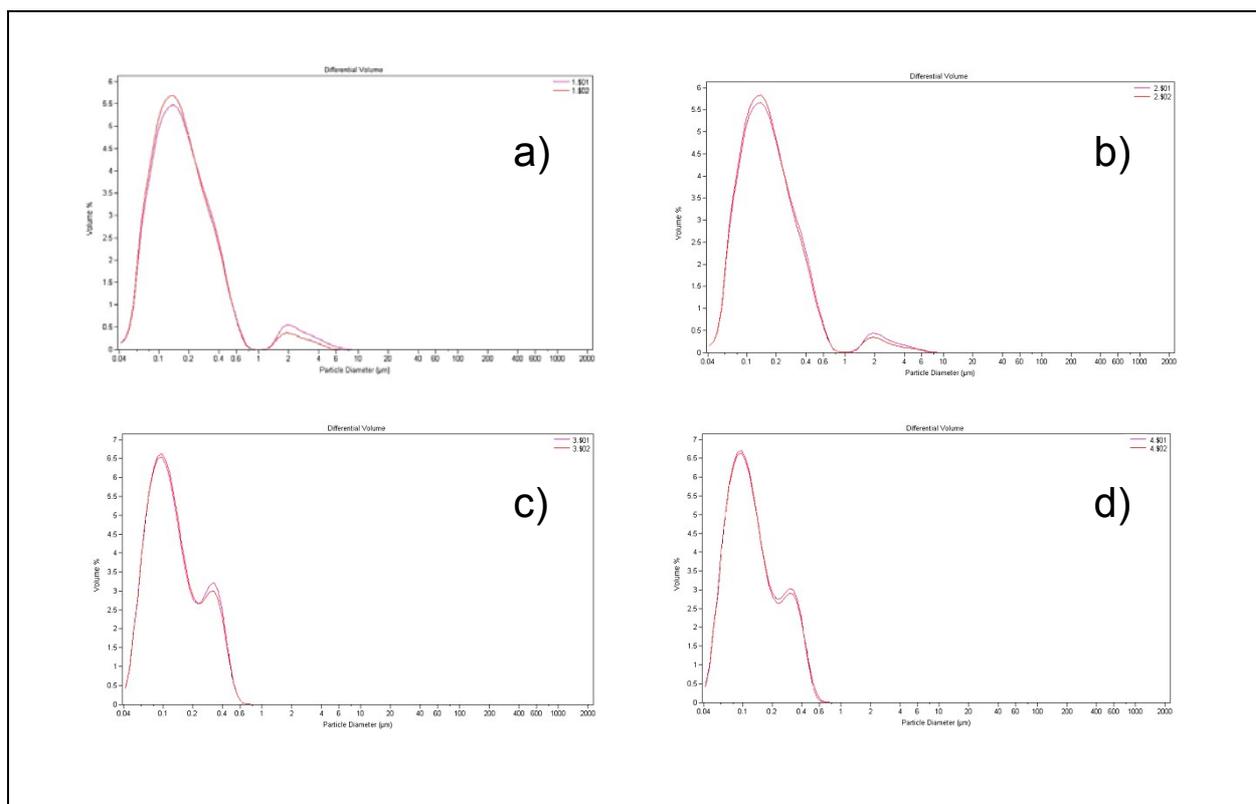


Abb. 5.38 Korngrößenverteilung der verschiedenen Zubereitungen:

a) Nanoemulsion mikronisiert,

b) Nanoemulsion RESS

c) SLN mikronisiert

d) SLN RESS

Tab. 5.13 Korngrößenparameter aus der Laserbeugung und Photonenkorrelationsspektroskopie

Probe	Laserbeugung			PCS	
	X ₁₀ (µm)	X ₅₀ (µm)	X ₉₀ (µm)	X _{quer} (µm)	PI
Nanoemulsion mikronisiert	0,078 ± 0,001	0,161 ± 0,006	0,535 ± 0,037	0,185	0,157
Nanoemulsion RESS	0,077 ± 0,001	0,156 ± 0,004	0,409 ± 0,021	0,177	0,174
SLN mikronisiert	0,064 ± 0,000	0,119 ± 0,001	0,333 ± 0,007	0,236	0,271
SLN RESS	0,064 ± 0,001	0,117 ± 0,001	0,323 ± 0,002	0,239	0,271

5.3.1.3 Permeationsverhalten von Griseofulvin in Nanoemulsionen und festen Lipidnanopartikeln (SLN)

Zur Bestimmung des Permeationsverhaltens von Griseofulvin in Nanoemulsionen und festen Lipidnanopartikeln werden Untersuchungen am Caco-2 Zellmodell durchgeführt. Dazu werden bei der dynamischen Methode 3 ml der Griseofulvinzubereitung (0,1 % (m/V)) zu 47 ml Hanks'scher Lösung gegeben. Der Griseofulvinanteil beträgt 60 µg/ml. In Abb. 5.39 ist die Griseofulvinkonzentration der Akzeptorkammer für Emulsion und die SLN aus mikronisiertem bzw. RESS-Griseofulvin dargestellt. Der mittlere Substanzfluss aus der Steigung des linearen Bereiches der Kurve ist in Tab. 5.14 angegeben. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem mittleren Substanzfluss der verschiedenen Proben gibt (P = 0,824).

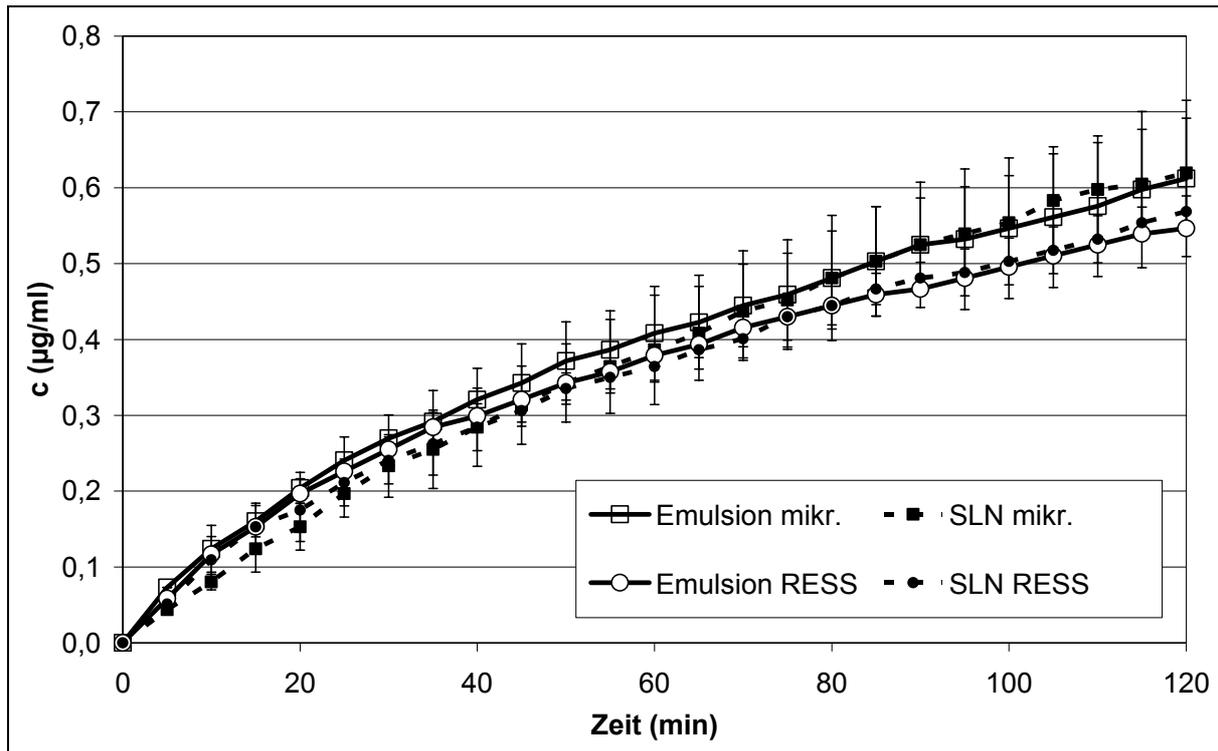


Abb. 5.39 Griseofulvinkonzentration in der Akzeptorkammer

Tab. 5.14 Substanzfluss von Griseofulvin als Kenngröße der Permeation

	Substanzfluss ($\mu\text{g} / (\text{ml} \cdot \text{min})$)
Nanoemulsion mikronisiert	0,0036 +/- 0,0011
Nanoemulsion RESS	0,0031 +/- 0,0001
SLN mikronisiert	0,0037 +/- 0,0011
SLN RESS	0,0035 +/- 0,0001

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Das RESS-Verfahren

Schwerlösliche Arzneistoffe stellen aufgrund der daraus resultierenden geringen Bioverfügbarkeit ein großes Problem für die pharmazeutische Entwicklung dar. Die Lösungsgeschwindigkeit kann durch eine Reduktion der Partikelgröße, was eine Vergrößerung der Oberfläche bewirkt, verbessert werden. Ein interessanter Ansatzpunkt für die Herstellung kleinster Partikel stellt das RESS-Verfahren dar.

Die Herstellung von Arzneistoffen im Mikro- bzw. Nanometerbereich mit Hilfe des RESS-Verfahrens besitzt einige Vorteile gegenüber der konventionellen Partikelherstellung. So ermöglicht dieses Verfahren, welches sowohl im Batch- als auch im Dauerbetrieb eingesetzt werden kann, eine produktschonende und lösungsmittelfreie, damit umweltverträgliche Herstellung von kleinsten Partikeln mit einer engen Korngrößenverteilung (Tom und Debenedetti 1991 b). Auch im Hinblick auf die GMP-Regularien ist das RESS-Verfahren als geschlossener, single-step-Prozess ein interessantes technisches Verfahren (York 1999). Durch das erneute Auflösen im überkritischen Fluid mit anschließendem Entspannen wird ferner der Restlösemittelgehalt der Arzneistoffe aus der Produktion stark gesenkt. Temperaturempfindliche Substanzen können durch die Wahl eines geeigneten Fluides (zum Beispiel Kohlendioxid) mit einer niedrigen kritischen Temperatur mikronisiert werden. Kohlendioxid hat weiter den Vorteil, dass es oxidationsempfindliche Substanzen vor dem Einfluss von Sauerstoff schützt. Das RESS-Verfahren ist somit ein schonendes Verfahren zur Herstellung kleinster Partikel. Bei der Betrachtung von wirtschaftlichen Aspekten kommt Türk (2001) zu dem Ergebnis, dass die Kosten pro Tonne mittels RESS-Technik mikronisiertem Produkt bei einer Betriebsdauer der Anlage von 10 Jahren zwischen 290 und 98.000 Euro betragen, abhängig von der Löslichkeit im überkritischen Fluid. Das sind bezogen auf die Kosten für die Herstellung und Entwicklung eines pharmazeutischen Wirkstoffes, die bei ca. 5 Mio. Euro pro Tonne liegen, zwischen 0,02 und 2 %.

6.2 RESS-Griseofulvinpartikel

6.2.1 Herstellung der RESS-Griseofulvinpartikel

RESS-Griseofulvin wird von Reverchon et al. (1995) erstmals hergestellt. Dabei werden zwei verschiedene Formen gefunden. Liegt die Vorexpanstempertur im Bereich zwischen 100 und 150 °C, werden kugelförmige Partikel mit einer Teilchengröße von 0,9 bis 1,4 µm erhalten. Bei 60 °C entstehen lange Nadeln mit einer Länge von 13,4 bis 36,4 µm, und im Bereich zwischen 60 und 100 °C werden sowohl kugelförmige Partikel als auch lange Nadeln gefunden. Mit den vom Institut für Technische Thermodynamik und Kältetechnik der Universität Karlsruhe gewählten Bedingungen ist es gelungen, das Griseofulvin bis in den Nanometerbereich zu mikronisieren. Bei richtiger Wahl der Parameter wie Druck ($p = 200$ bar), Temperatur ($T_{\text{Vorexpanstempertur}} = 75$ °C bis 145 °C, $T_{\text{Düse}} = 115$ °C), Massenstrom (7 bis 12 g/min), Düsengeometrie (Innendurchmesser und Länge = 50 µm) und Geometrie der Expansionskammer (Volumen = 22 dm³; Innendurchmesser = 0,19 m) führt das RESS-Verfahren zu einer deutlichen Reduktion der Partikelgröße bis in den Nanometerbereich. Bei schnellem Entspannen in die Expansionskammer durch die Kapillardüse entstehen Partikel mit einem mittleren anzahlvolumetrischen Durchmesser von 200 ± 50 nm. Bei Griseofulvin ist keine Abhängigkeit der Partikelgröße vom Vorexpanstempertur und von der Vorexpanstempertur nachweisbar (Türk et al. 2002 a).

Reverchon verwendet eine wesentlich kleinere Expansionskammer (Länge (L) = 200 mm, Durchmesser (D) = 10mm) und eine andere Abscheidetechnik (glass slide). Das bedeutet, dass die Partikeldichte sehr hoch ist, und diese sich recht schnell zusammenlagern. Außerdem setzt Reverchon eine andere Düse ($L/D = 20$) ein; d.h. der Massestrom ist deutlich unterschiedlich. Vermutlich kommt es bei Reverchon bereits in der Düse zur Partikelbildung, bedingt durch das große L/D -Verhältnis.

Im Gegensatz dazu reicht die Partikelgröße beim Stoffsystem Benzoesäure/ CO_2 , abhängig von Vorexpanstempertur oder -temperatur, von 210 bis 460 nm. Sowohl eine Erhöhung des Vorexpanstempertes wie auch eine Erniedrigung der Vorexpanstempertur führen zu kleineren Partikeln. Ursache hierfür ist, dass eine Druckzunahme (bei $T = \text{konstant}$) zu einer Erhöhung der Dichte führt. Damit verbunden ist ein größerer Massenfluss, der für kürzere Verweilzeiten in der Expansionskammer sorgt. Kürzere Verweilzeiten verhindern Partikelwachstum, die Partikel werden somit kleiner.

Für das Stoffsystem Cholesterin/Kohlendioxid kann dagegen wie auch für Griseofulvin keine Abhängigkeit der Partikelgröße vom Vorexpanstempertur und von der Vorexpanstempertur

ratur gezeigt werden. Grund hierfür ist die stark unterschiedliche Löslichkeit von Cholesterin und Griseofulvin im Vergleich zu Benzoesäure. Eine geringe Löslichkeit führt wie auch ein höherer Massenstrom zu einer geringeren Partikelkonzentration. Dadurch wird starkes Partikelwachstum vermieden, was zu sehr kleinen Partikeln im Nanometerbereich führt.

6.2.2 Morphologie der RESS-Griseofulvinpartikel

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sind sehr gut zur Charakterisierung der Teilchenmorphologie geeignet. Das mikronisierte Griseofulvin, das als Ausgangsmaterial für den RESS-Prozess eingesetzt wird, entspricht den Anforderungen des europäischen Arzneibuches, das folgende Eigenschaften nennt: „... im allgemeinen mit einer Teilchengröße von höchstens 5 μm , gelegentlich jedoch über 30 μm ...“. Beim RESS-Produkt sind deutlich die kleinen Primärpartikel mit einer Größe von 200-500 nm zu erkennen, die jedoch beim Abscheidvorgang auf dem Filter Agglomerate bilden, die über Feststoffbrücken zu einer schwammartigen Struktur mit großer Oberfläche verbunden sind. Weiter fällt auf, dass eine glatte Oberfläche entstanden ist. Gericke et al. (2002) sprechen davon, dass bei einer Behandlung von Substanzen mit einem überkritischem Fluid eine sogenannte „smooth surface“ entsteht, die dafür verantwortlich gemacht wird, dass die Benetzbarkeit deutlich abnimmt.

6.2.3 Korngrößenverteilung der RESS-Griseofulvinpartikel

Die aus dem RESS-Prozess erhaltenen Produkte weisen eine Teilchengröße im Submikronbereich auf. Zur Bestimmung der Partikelgrößen müssen geeignete Verfahren wie zum Beispiel die Laserlichtbeugung eingesetzt werden. Dieses Verfahren unter Verwendung des Mastersizer S (Fa. Malvern) ermöglicht eine Messung im Bereich von 0,02 – 2000 μm und ist somit für die Partikelgrößenbestimmung im Submikronbereich geeignet (Teipel et al. 2000). Zur Charakterisierung der dabei gemessenen Korngrößenverteilungen werden aus den Summenverteilungskurven die Korngrößenparameter (x_{10} , x_{20} , x_{50} , x_{80} , x_{90} , $x_{90-x_{10}}$) und aus den Dichteverteilungskurven die Modalwerte bestimmt (DIN 66 141 und Sommer 2000).

Das Ausgangsmaterial (mikronisiertes Griseofulvin) zeigt eine bimodale Partikelverteilung. Diese Verteilung kommt dadurch zustande, dass im mikronisierten Material zum Teil sehr kleine Partikel enthalten sind, die an größeren Partikeln adsorbiert sind. Durch die Behandlung mit Ultraschall während der Messung der Korngrößenverteilung, werden diese kleinen Partikel getrennt erfasst. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit den Erkenntnissen aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Die RESS-Produkte, die bei unterschiedlichen Vorexpanstemperturen hergestellt werden, zeigen nach der Abscheidung auf dem Filter, wie schon bei der in-line Messung, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Korngrößenparameter. Die beim Abscheidevorgang entstandenen Feststoffbrücken sind zum Teil so stark, dass sie unter den zur Partikelgrößenbestimmung angewandten Bedingungen (Ultraschall) nicht zu zerstören sind. Deshalb ist die mittlere Teilchengröße der RESS-Produkte mit $x_{50} = 0,792 \pm 0,43 \mu\text{m}$ 4-mal größer als die Primärpartikel. Trotzdem führt das RESS-Verfahren zu Partikeln im Submikronbereich. Die mittlere Partikelgröße x_{50} des RESS-Produktes ist mit $0,792 \pm 0,43 \mu\text{m}$ 6,6-mal kleiner als das Ausgangsprodukt, für das von uns eine mittlere Partikelgröße x_{50} von $5,274 \pm 0,28 \mu\text{m}$ bestimmt wird.

6.2.4 BET-Oberfläche von RESS-Griseofulvin

Die Partikeloberfläche ist schon für Atkinson et al. (1962) ein wichtiger Parameter für die Charakterisierung der Griseofulvinpartikel. Wie in 1.1.2.1 berichtet gelingt es, die absorbierte Griseofulvinmenge auf das 2,5fache zu steigern, indem die spezifische Oberfläche von $0,4 \text{ m}^2/\text{g}$ auf $2,5 \text{ m}^2/\text{g}$ erhöht wird. Dadurch ist eine Dosisreduktion um die Hälfte von 1 g auf 500 mg möglich. Das mikronisierte Griseofulvin, welches heute zur Arzneimittelherstellung verwendet wird, besitzt eine spezifische Oberfläche nach BET von $4,4 \text{ m}^2/\text{g}$. Die Oberfläche konnte somit durch spezielle Mahlverfahren nochmals erhöht werden.

Wie in Kapitel 6.2.3 diskutiert, führt das RESS-Verfahren zu einer Verkleinerung der Partikelgröße. Dies geht mit der Zunahme der spezifischen Oberfläche einher. Obwohl die Partikel, aufgrund des Abscheidevorgangs auf dem Filter Agglomerate bilden, ist die Oberfläche der beim RESS-Prozess entstandenen Partikel mit $8,8 \text{ m}^2/\text{g}$ doppelt so groß wie die Oberfläche des mikronisierten Griseofulvins ($4,4 \text{ m}^2/\text{g}$).

6.2.5 Thermoanalytische Untersuchungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie

Mit Hilfe der thermischen Analyse werden die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Griseofulvin in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Die Thermogramme der verschiedenen Griseofulvinproben zeigen ausgehend von der Basislinie einen endothermen Peak. Es ist der Schmelzpeak von Griseofulvin. Das Ausgangsmaterial schmilzt bei $218,8 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einer Schmelzenthalpie von $118,4 \text{ J/g}$. Diese Ergebnisse decken sich sehr gut mit den Ergebnissen, die Elamin et al. (1994) für kristallines Griseofulvin gefunden haben. Auch die

Schmelzpunkte und die Schmelzenthalpien für die umkristallisierten Proben und das RESS-Produkt liegen in demselben Bereich. Des Weiteren zeigt keines der Thermogramme einen Glasübergang bei 85 °C und auch keinen exothermen Peak bei 120-130 °C. Dieser wäre einer Rekristallisation von amorphen Anteilen zuzuschreiben, wie von Ahmed et al. (1998) und

Elamin et al. (1994) gezeigt wird. Alle Griseofulvinproben besitzen demnach dieselben kristallinen Eigenschaften. Jedoch liegt nach Ahmed et al. (1996) die untere Bestimmungsgrenze für die DSC bei einem amorphen Anteil von 5-10 %. Deshalb werden ramanspektroskopische Auswertungen benötigt, um endgültig Aussagen über den kristallinen Zustand zu machen.

6.2.6 Ramanspektroskopische Untersuchungen

Die Ramanspektroskopie hat den Vorteil, dass sie auch geringe amorphe Anteile in Substanzen detektieren kann (Taylor und Zografi 1998). Die ramanspektroskopischen Untersuchungen der verschiedenen Griseofulvinproben zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied. Daraus folgt, dass sich der kristalline Zustand des RESS-Produktes nicht von dem des Ausgangsmaterials unterscheidet.

6.2.7 Sättigungslöslichkeit von RESS-Griseofulvin

Die gelöste Menge an Griseofulvin in 250 ml des entsprechenden Testmediums ist in allen untersuchten Pufferlösungen im pH-Bereich 1-7,5 kleiner als die höchste therapeutische Einzeldosis. Deswegen muss Griseofulvin gemäß BCS als schlecht löslich eingestuft werden. Die Sättigungslöslichkeit c_s von Griseofulvin zeigt keine pH-Abhängigkeit, da Griseofulvin im untersuchten pH-Bereich aufgrund der chemischen Struktur weder als Säure noch als Base fungiert.

Die vergleichende Bestimmung der Sättigungslöslichkeit c_s von mikronisiertem Griseofulvin und RESS-Griseofulvin wird in Hanks'scher Lösung bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Wie die Ergebnisse zeigen, wird für das RESS-Produkt eine Erhöhung der Sättigungslöslichkeit um 15 % erzielt. Da sowohl die thermische Untersuchung mittels DSC als auch die ramanspektroskopische Untersuchung keine Unterschiede hinsichtlich des kristallinen Zustandes ergeben, müssen andere Ursachen für die Erhöhung der Sättigungslöslichkeit verantwortlich sein.

Die Partikelgröße des RESS-Griseofulvins liegt somit in einem Bereich, in dem sich die Partikelgröße signifikant auf die Sättigungslöslichkeit auswirkt. Die Abhängigkeit der Sättigungskonzentration von der Teilchengröße wurde von Mosharraf und Nyström (1995) und Müller et al. (1999) diskutiert. So lässt sich die Erhöhung der Sättigungslöslichkeit damit erklären, dass mit abnehmender Partikelgröße nach der Kelvingleichung der Lösungsdruck - bedingt durch eine stärkere Krümmung der Partikeloberfläche - zunimmt.

6.2.8 Auflöseverhalten von Griseofulvin

Sowohl die Vergrößerung der Oberfläche als auch die Erhöhung der Sättigungslöslichkeit sollten einen Einfluss auf die Auflösungsgeschwindigkeit von Griseofulvin haben. Dass dies der Fall ist, kann anhand der Ergebnisse der Untersuchung des Auflöseverhaltens mit Hilfe des Dissolutionsmodells nach Stricker gezeigt werden. So ist die in Lösung gegangene Griseofulvinmenge der RESS-Griseofulvin-Probe zu jedem Zeitpunkt höher, als die von mikronisiertem und umkristalisiertem Griseofulvin. Nach 60 Minuten sind beim RESS-Produkt, verglichen mit auf herkömmlichem Wege mikronisiertem Griseofulvin, fast 30 % mehr in Lösung gegangen. Verglichen mit umkristalisiertem Griseofulvin mit einer mittleren Partikelgröße von 357 μm , kann die freigesetzte Menge des RESS-Griseofulvins sogar um das 2,8fache gesteigert werden. Neben der aufgelösten Griseofulvinmenge nach 60 min wird die Geschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell zur Beurteilung des Auflöseverhaltens herangezogen. Bei der Auswertung (Abb. 5.17) fällt auf, dass der Kurvenverlauf nach 20 Minuten einen leichten Knick aufweist. An diesem Punkt ist die Sättigungskonzentration erreicht. Mit jeder Probennahme - alle 2 Minuten - werden 4 ml an frischem Puffer zugeführt. Darin löst sich vom bislang ungelösten Griseofulvinanteil wieder eine bestimmte Menge. Aus diesem Grunde werden drei Geschwindigkeitskonstanten für die Zeitintervalle 0-20 min, 20-60 min und 0-60 min bestimmt. Für den Zeitraum 0-20 Minuten beträgt die Auflösungsgeschwindigkeitskonstante von RESS-Griseofulvin 0,00921, verglichen mit 0,00747 für das Ausgangsmaterial. So ist die Geschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell für RESS-Griseofulvin um 23 % höher im Vergleich zu dem auf herkömmlichem Wege mikronisiertem Griseofulvin. Die Geschwindigkeitskonstante für das RESS-Griseofulvin liegt auch im Bereich zwischen 20 und 60 Minuten höher, verglichen mit mikronisiertem Griseofulvin und den umkristallisierten Proben, dies ist in Abb. 5.18 deutlich zu erkennen. Dagegen unterscheiden sich die Auflösungsgeschwindigkeitskonstanten der umkristallisierten Proben kaum von der der mikronisierten Probe. Die für den Zeitraum 0-20 Minuten ermittelten Auflösungskonstanten für die fünf Griseofulvinzubereitungen korrelieren sehr gut mit dem Logarithmus der dazu gehörigen spezifischen BET-Oberflächen, wie in Abb. 5.19 zu erkennen ist. Es kann also

eindeutig eine Abhängigkeit der Auflösungsgeschwindigkeitskonstante von der spezifischen BET-Oberfläche festgestellt werden.

Um eine bessere Benetzung der Griseofulvin-Partikel zu erzielen, kann eine feste Dispersion hergestellt werden. Dazu werden die Griseofulvin-Partikel in einen flüssigen PEG-Träger eingearbeitet. Durch die Schaffung von festen Dispersionen kann die Auflösungsgeschwindigkeitskonstante gerade in den ersten Minuten verglichen mit nicht eingebettetem Wirkstoff weiter erhöht werden. Die feste Dispersion, hergestellt mit umkristallisiertem Griseofulvin mit der kleinsten spezifischen BET-Oberfläche besitzt die niedrigste Auflösungsgeschwindigkeitskonstante. Die Einbettung zeigt für das RESS-Produkt nach 10 Minuten eine Freisetzung von über 35 %, wobei beim reinen RESS-Produkt in derselben Zeit nur knapp 16 % freigesetzt sind. Die mit dem RESS-Produkt hergestellte feste Dispersion besitzt die höchste Auflösungsgeschwindigkeitskonstante. In der festen Dispersion aus Griseofulvin und PEG 6000 sind die Primärpartikel demnach noch vorhanden. Da die Löslichkeit von Griseofulvin in PEG 6000 kleiner als 5 % ist (Chiou und Riegelman 1971 a), liegt Griseofulvin nicht molekulardispers gelöst vor. Sonst müssten alle festen Dispersionen das gleiche Auflösungsprofil zeigen. Das PEG dient in diesem Fall zur Erhöhung der Benetzbarkeit und zur Verminderung der Aggregation und Agglomeration der Partikel.

6.2.9 Permeationsverhalten von Griseofulvin

Entsprechend der von Yee (1997) veröffentlichten Korrelation zwischen in-vitro Permeation und der in-vivo Absorption deuten die Transportuntersuchungen der Griseofulvin-Lösungen bei einer physiologischen Temperatur (37 °C) mit einem Permeationskoeffizienten, der im Bereich von $42-48 \cdot 10^{-6}$ cm/s liegt, auf eine vollständige in-vivo Absorption (70-100 %) nach vorheriger Auflösung hin.

Bei Griseofulvin ist von einem passiven Transport auszugehen, da der Substanzfluss durch den Caco-2/TC-7 Monolayer mit Zunahme der Griseofulvinkonzentration ansteigt. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass der Transport von basolateral nach apikal mit dem von apikal nach basolateral vergleichbar ist. Dies deutet weiter darauf hin, dass die Griseofulvinpermeation nicht durch Transporter wie P-Glycoprotein beeinflusst wird. In der Literatur ist beschrieben, dass bei der Untersuchung der Griseofulvinresorption im Dünndarm mittels Perfusionstechnik ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden kann (Gramatte 1994). Somit ist das Caco-2/TC-7 Modell als ein geeignetes in-vitro Modell für die in-vivo Resorption zu sehen.

Mit der dynamischen Messung wird der Einfluss des Auflöseverhaltens der Griseofulvin-Partikel auf die Resorption untersucht. Die RESS-Partikel zeigen nach 120 Minuten eine um 14 % erhöhte Arzneistoffkonzentration in der Akzeptorkammer verglichen mit dem auf herkömmlichem Wege mikronisierten Griseofulvin. Hiermit kann gezeigt werden, dass die Partikelbeschaffenheit der eingesetzten Griseofulvinproben einen Einfluss auf das Permeationsverhalten hat. Zur genaueren Charakterisierung des Permeationsverhaltens wird neben der Griseofulvinkonzentration auch der Substanzfluss durch die Zellen bestimmt. Ursache für den signifikant höheren Substanzfluss des RESS-Griseofulvins, ist neben der höheren Auflösungsgeschwindigkeit auch die höhere Sättigungslöslichkeit des RESS-Produktes, die nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz zu einem erhöhten passiven Arzneistofftransport führt.

Yazdanian et al. (1998) stellen für 51 Arzneistoffe mit unterschiedlicher chemischer Struktur eine Reihenfolge für die Permeationskoeffizienten aus Caco-2-Zell-Versuchen zusammen. Griseofulvin steht mit einem Permeationskoeffizient von $36,6 \pm 5,3$ cm/s an erster Stelle, was durch die hohe Lipophilie des ungeladen vorliegenden Griseofulvins begründet ist. Der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, der oftmals als Parameter für die Vorhersage der zellulären Permeation herangezogen wird, liegt für Griseofulvin bei $\log D_{\text{Okt}} = 2,47 \pm 0,06$. Die Permeation des aufgelösten Griseofulvins bereitet somit keine Probleme. Die dynamische Messung der Permeation macht deutlich, dass sich bei Griseofulvin als schwerlöslichem Arzneistoff die Verbesserung der Auflösungsgeschwindigkeit positiv auf die Resorption auswirkt. Die Verbesserung der Auflösungsgeschwindigkeit wird in dem hier untersuchten Fall durch eine Verkleinerung der Partikel erzielt, was zu einer Vergrößerung der Oberfläche und einer Erhöhung der Sättigungslöslichkeit führt. So decken sich auch die hier gezeigten Ergebnisse mit den grundlegenden Untersuchungen von Atkinson et al. (1962) über den Einfluss der Teilchengröße auf die Absorption.

6.3 RESS-Ibuprofenpartikel

6.3.1 Herstellung der RESS-Ibuprofenpartikel

Ein weiterer schwerlöslicher Modellarzneistoff für das RESS-Verfahren ist Ibuprofen. Charoenchaitrakool et al. (2000) stellen mit Hilfe des RESS-Verfahrens Ibuprofenpartikel mit einer mittleren Teilchengröße von $< 2,5$ μm her. Nachdem es bei Griseofulvin gelungen ist, mit Hilfe des RESS-Verfahrens Partikel im Nanometerbereich herzustellen, wird diese erfolgversprechende Methode am Beispiel von Ibuprofen untersucht.

Die Primärpartikel von Ibuprofen zeigen unabhängig von den Vorexpannungsbedingungen eine Partikelgröße in der Expansionskammer, die im Bereich von 166 bis 326 nm liegt (Türk et al. 2002 b).

6.3.2 Morphologie der RESS-Ibuprofenpartikel

Die auf dem Filter abgeschiedenen RESS-Ibuprofenpartikel besitzen eine mittlere Partikelgröße von 5,74 μm . Es tritt eine Zunahme der Partikelgröße auf. Ursache hierfür ist zum einen Partikelwachstum in der Expansionskammer, zum anderen kommt es zu der Bildung von Agglomeraten während der Abscheidung. Auch das RESS-Produkt von Charoenchaitrakool et al. (2000) weist diese Agglomerate auf.

6.3.3 Korngrößenverteilung der RESS-Ibuprofenpartikel

Die Messung der Korngrößenverteilung mittels Laserbeugung in 0,1 M HCl-Lösung bestätigt das Ergebnis der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Das RESS-Verfahren führt zu einer deutlichen Reduktion der Teilchengröße. Die mittlere Teilchengröße ist jedoch größer als 5 μm . Grund für die höhere mittlere Partikelgröße im Vergleich zu RESS-Griseofulvin ist möglicherweise die höhere Löslichkeit von Ibuprofen in überkritischem Fluid. Eine Erhöhung der Partikelkonzentration im überkritischen Fluid führt auch zu einem erhöhten Partikelwachstum in der Expansionskammer. Die von Charoenchaitrakool et al. (2000) hergestellten RESS-Ibuprofenproben weisen eine mittlere Teilchengröße von kleiner als 2,5 μm auf bei einem x_{90} -Wert von kleiner als 5 μm . Damit sind die Partikel etwas kleiner als das von uns hergestellte Produkt. Die RESS-Ibuprofenpartikel sind jedoch kleiner, als die durch eine Zerkleinerung mit der Stiftmühle hergestellten Partikel.

6.3.4 BET-Oberfläche von RESS-Ibuprofen

Die Vergrößerung der Oberfläche um das über 15fache zeigt, dass Ibuprofen mit Hilfe des RESS-Verfahrens erfolgreich mikronisiert werden kann. Die neu geschaffene Oberfläche ist mit 1,644 m^2/g jedoch nicht so groß wie die Oberfläche, die bei RESS-Griseofulvin erzielt werden kann. Die Mikronisierung durch die Stiftmühle bringt eine Vergrößerung der Oberfläche um das 9,6fache.

6.3.5 Thermoanalytische Untersuchungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie

Der Schmelzpunkt des Ausgangsmaterials liegt etwas höher als der der mikronisierten Produkte. Die verschiedenen Proben zeigen jedoch bei der Schmelzenthalpie keinen signifikanten Unterschied. Dies deutet darauf hin, dass die Mikronisierung sowohl durch die Stiftmühle als auch durch den RESS-Prozess zu keiner Änderung der Kristallinität führt. Charoenchaitrakool et al. (2000) finden bei ihren Untersuchungen eine Abnahme der Schmelzenthalpie und auch eine Abnahme der Intensität des Peaks bei der Röntgenbeugung, dies deutet auf einen leichten Rückgang der Kristallinität hin. Die Änderung der Kristallinität kann durch das Auftreten einer flüssigen Phase, bei zu hoher Vorexpanionstemperatur, begründet sein. Bedingt durch den niedrigen Schmelzpunkt von Ibuprofen (75 °C) und die starke Schmelzpunktsdepression unter Druck (Charoenchaitrakool et al. 2000) steht bei diesem System nur ein geringes Fenster für die Wahl der Vorexpanionstemperatur zur Verfügung. Um die Dreiphasenlinie nicht zu überschreiten, muss die gewählte Vorexpanionstemperatur zwischen $T_{\text{kritisch}}(\text{CO}_2) = 31 \text{ °C}$ und 40 °C liegen. Beim Überschreiten der Dreiphasenlinie entsteht flüssiges Ibuprofen. Beim Auskristallisieren kann es zu Änderungen der Kristallinität kommen. Außerdem würden die Partikel dann größer werden.

6.3.6 FT-Raman-Spektroskopie

Anstelle der Röntgenbeugung wird die Kristallinität bei uns mittels Raman-Spektroskopie untersucht. Die Raman-Spektren von Ibuprofen 50 (Ausgangsmaterial) und von RESS-Ibuprofen weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Zur genaueren Charakterisierung kann die Ramanbande bei 1607 cm^{-1} herangezogen werden. Breitenbach et al. (1999) können in früheren Raman-Untersuchungen von Ibuprofen zeigen, dass kristallines Ibuprofen bei 1608 cm^{-1} eine charakteristische Bande aufweist. Liegt Ibuprofen jedoch in einem amorphen Zustand vor, kommt es zu einer Verschiebung dieser Bande zu höheren Wellenzahlen. Breitenbach et al. (1999) finden für eine amorphe Ibuprofenzubereitung eine Verschiebung der Bande hin zu 1613 cm^{-1} , die bei unserer Untersuchung jedoch nicht auftritt. Damit ist das Vorliegen eines amorphen Zustandes auszuschließen.

6.3.7 Sättigungslöslichkeit von Ibuprofen

Ibuprofen - als ein Propionsäurederivat - ist eine schwache Säure mit den pK_A -Werten 4,4 und 5,2. Gemäß BCS kann Ibuprofen nicht als gut lösliche Substanz eingestuft werden. Zwar

löst sich die höchste Einzeldosis von 800 mg in 250 ml Puffer pH 7,4, nicht dagegen bei einem pH von 1,0; 3,0; 4,5 und 5,5. Ibuprofen zeigt hinsichtlich der Sättigungslöslichkeit keinen Unterschied zwischen RESS-Ibuprofen und Ibuprofen 50. Offensichtlich sind die Partikel des RESS-Ibuprofens nicht klein genug, um eine Zunahme des Lösungsdruckes zu bewirken. So führt der RESS-Prozess bei Ibuprofen nicht zu einer Erhöhung der Sättigungslöslichkeit.

6.3.8 Auflöseverhalten von Ibuprofen

Zur Charakterisierung des Auflöseverhaltens von Ibuprofen wird der Auflösungskoeffizient für die drei Ibuprofen-Proben (Ibuprofen 50, RESS-Ibuprofen und Ibuprofen-Stiftmühle) in Hanks'schem Puffer pH 7,2 bestimmt. Alle Proben zeigen bei einer Einwaage von 25 mg in 100 ml eine vollständige Freisetzung während der Versuchszeit von 75 min. Obwohl signifikante Unterschiede sowohl in der Teilchengröße als auch in der spezifischen BET-Oberfläche vorhanden sind, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Ibuprofen 50 und RESS-Ibuprofen hinsichtlich des Auflöseverhaltens. Dies wird auch bei der Betrachtung der Auflösekurve (Abb. 5.34) deutlich. Ibuprofen, das mit einer Stiftmühle auf eine mittlere Teilchengröße von $x_{50} = 11,61 \pm 0,3 \mu\text{m}$ mikronisiert wird, zeigt verglichen mit Ibuprofen 50 mit einer mittleren Teilchengröße von $x_{50} = 48,89 \pm 1,3 \mu\text{m}$ eine signifikant höhere Auflösungsgeschwindigkeit. RESS-Ibuprofen, dessen mittlere Teilchengröße auf $5,74 \pm 1,4 \mu\text{m}$ reduziert werden kann, und das gegenüber Ibuprofen 50 eine 15fach vergrößerte spezifische Oberfläche sowie eine 1,6fach vergrößerte spezifische Oberfläche verglichen mit durch die Stiftmühle mikronisiertem Ibuprofen aufweist, besitzt kein signifikant verbessertes Auflöseverhalten. Die Tatsache ist damit zu erklären, dass der RESS-Prozess zu einer Hydrophobisierung der Partikel führt. Gericke et al. (2002) spricht davon, dass die CO_2 -Behandlung die Oberflächen glättet, was zu kleineren Adsorptionsflächen für das Wasser führt. Es entsteht eine sogenannte „smooth surface“. Die Auflösungskoeffizienten von Ibuprofen 50 und mit der Stiftmühle mikronisiertem Ibuprofen unterscheiden sich signifikant ($P = 0,111$). Es kann eine Erhöhung von 28 % durch die Mikronisierung mittels Stiftmühle erzielt werden.

6.3.9 Permeationsverhalten von Ibuprofen in Abhängigkeit des Auflöseverhaltens

Ibuprofen wird passiv transzellulär resorbiert (Awadallah 2003). Die Permeation von Ibuprofen ist sehr hoch. Der Permeationskoeffizient aus dem Caco-2 Modell wird mit über $50 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ angegeben (Awadallah 2003, Yee 1997). Somit ist Ibuprofen der BCS-Klasse II zuzu-

ordnen. Da die Permeation bei Ibuprofen nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wird das Permeationsverhalten in Abhängigkeit der Löslichkeit untersucht.

Es kann jedoch kein Unterschied zwischen den einzelnen Proben festgestellt werden. Da weder eine Erhöhung der Sättigungslöslichkeit noch eine starke Erhöhung der Auflösungsgeschwindigkeit erzielt wird, überrascht dieses Ergebnis nicht.

6.4 Einsatz der RESS-Technik für die Mikronisierung von Arzneistoffen

Wie anhand der vorgestellten Ergebnisse gezeigt werden kann, ist die RESS-Technik ein geeignetes Verfahren für die schonende Herstellung von nanoskaligen, kugelförmigen Arzneistoff-Partikeln. Voraussetzung ist, dass der zu mikronisierende Arzneistoff im gewählten überkritischen Fluid löslich ist. Durch die Wahl der Parameter Druck, Temperatur, Massenstrom, Geometrie der Düse und der Expansionskammer können die Partikelgröße, Partikelmorphologie und die physiko-chemischen Eigenschaften der Substanz bestimmt werden. Eine niedrige Vorexpanstempertur und hohe Vorexpanstempertur führen zu 200 bis 400 nm großen Partikeln. Die Partikelgröße kann auch durch eine Verdünnung der dispersen Phase in der Expansionskammer reduziert werden.

Wie in unserem Fall gezeigt wurde, hat die um fast zwei Zehnerpotenzen geringere Löslichkeit von Griseofulvin im überkritischen CHF_3 , im Gegensatz zum System Ibuprofen/ CO_2 eine geringere Keimbildungsrate und Partikelkonzentration in der Expansionskammer zur Folge, dies führt zu kleineren Partikeln.

Beim System Ibuprofen/ CO_2 beträgt die mittlere Teilchengröße unmittelbar nach dem Entstehen der Partikel in der Expansionskammer 200 bis 400 nm. Die auf dem Filter abgeschiedenen Partikel zeigen jedoch eine mittlere Partikelgröße x_{50} von 5,74 μm .

Es scheint hier im Gegensatz zu Griseofulvin zu einem Partikelwachstum zu kommen. Hierbei müssen zwei gegenläufige Effekte betrachtet werden. Die verglichen mit dem System Griseofulvin/ CHF_3 erhöhte Löslichkeit von Ibuprofen in Kohlendioxid führen zu einer erhöhten Keimbildungsrate und Partikelkonzentration, wodurch Partikelwachstum begünstigt wird.

Die tiefere Vorexpanstempertur (35 °C) führt aber andererseits zu einem höhern Massenstrom und damit verbunden zu einer kürzeren Verweilzeit, wodurch Partikelwachstum verhindert wird. Die Partikel werden kleiner.

Letztendlich entscheidend für die Partikelgröße ist hier aber wohl die Abscheidetechnik. Auf den Filtern bilden sich mehrere, übereinander liegende Schichten. Damit können die Partikel auch auf dem Filter weiter anwachsen, die Partikel sind regelrecht „verbacken“.

Mit Hilfe der RESS-Technik ist es aber sowohl für Griseofulvin wie auch für Ibuprofen gelungen, Partikel mit derselben Kristallinität wie die Ausgangsmaterialien herzustellen.

Ziel zukünftiger Arbeiten muss es sein, durch eine Stabilisierung der Partikel, die Agglomeration zu verhindern. Als Möglichkeiten könnten hierbei eine Stabilisierung in einer wässrigen Schutzkolloidlösung (RESSAS), das Coating mit einer zweiten Substanz (CORESS) in Frage oder die Einbettung in einen Träger kommen. Die Einbettung in eine Lipidmatrix als eine mögliche Zubereitung soll im Folgenden diskutiert werden.

6.5 Griseofulvin in festen Lipidnanopartikeln bzw. Nanoemulsionen

Bei der Entwicklung von nanopartikulären Arzneiformen mit Lipiden oder Polymeren als Trägermaterialien hat man bis heute mit erheblichen Problemen, wie zum Beispiel Lösungsmittelrückständen oder das Vorhandensein toxischer Monomere oder Abbauprodukten zu kämpfen. Träger auf Lipidbasis, zu denen neben der Lipid-Nanoemulsion auch die festen Lipidnanopartikel gehören, weisen zum Teil gewisse Lagerinstabilitäten auf. Weiter können sie mit nur geringen Mengen Arzneistoff beladen werden. Bei einer Überladung geht der Wirkstoff nicht in die Matrix über, sondern bleibt am Lipid haften oder bildet Wirkstoffagglomerate im Träger.

6.5.1 Herstellung

Mit Hilfe der Heißhomogenisation unter Hochdruck ist es möglich, Nanopartikel bzw. Nanotröpfchen herzustellen. Wird das bei Raumtemperatur feste Lipid Glyceroldibehenat eingesetzt, entstehen feste Lipidnanopartikel, wird jedoch ein bei Raumtemperatur flüssiges Lipid, in unserem Fall Miglyol verwendet, erhält man eine Nanoemulsion. Die Griseofulvinbeladung der SLN bzw. Nanoemulsion ist mit 1 mg/ml nicht sehr hoch. Mehr Griseofulvin kann jedoch nicht eingearbeitet werden.

6.5.2 Morphologie und Teilchengröße

Das eingesetzte Lipid Glyceroldibehenat kristallisiert in diskusartigen Plättchen, die durch die elektronenmikroskopische Aufnahme visualisiert werden können. Diese Plättchen besitzen

eine größere Oberfläche als die Tröpfchen der Emulsion. Infolgedessen befindet sich ein großer Anteil des Arzneistoffes an der Oberfläche der Partikel.

Sowohl die SLN als auch die Nanoemulsion besitzen eine mittlere Partikelgröße von kleiner als 250 nm.

6.5.3 Griseofulvinpermeation aus SLN und Nanoemulsion

Die Untersuchung des Freisetungsverhaltens eines Arzneistoffes aus SLN ist aufgrund der kolloidalen Größe der Partikel nicht einfach durchzuführen (Mehnert und Mäder 2001). Die in der Literatur beschriebenen Freisetzungsexperimente werden unter den verschiedensten Bedingungen durchgeführt. Die SLN werden in ein Dissolutionsmedium gegeben. Nach bestimmten Zeiten wird eine Probe entnommen und die SLN vom Freisetzungsmittel abgetrennt.

Wir haben das Caco-2/TC-7-Zellmodell als in-vitro Modell für das Freisetzungsverhalten und die anschließende gastrointestinale Permeation herangezogen.

Sowohl die Nanoemulsion als auch die SLN setzen Griseofulvin aus dem Lipidcarriersystem frei. Dabei zeigt die Griseofulvinpermeation im Caco-2/TC-7-Modell für die kolloidalen Lipidzubereitungen SLN und Nanoemulsion keine signifikanten Unterschiede. Nach 120 Minuten beträgt die Griseofulvinkonzentration in der Akzeptorkammer ungefähr 0,6 µg/ml. Der Substanzfluss kann mit ungefähr 0,0035 µg ml⁻¹ min⁻¹ angegeben werden. Es macht demnach keinen Unterschied, ob sich der Wirkstoff in einer flüssigen oder festen Fettphase befindet. Der Substanzfluss der Lipidzubereitungen fällt verglichen mit dem der RESS-Griseofulvin-Partikel ($dc/dt = 0,0068 \mu\text{g ml}^{-1} \text{min}^{-1}$) und der Partikel des mikronisierten Griseofulvins ($dc/dt = 0,0060 \mu\text{g ml}^{-1} \text{min}^{-1}$) bei demselben Griseofulvingehalt in der Dissolutionskammer von 60 µg/ml, deutlich geringer aus. Die Permeation ist beim Einsatz von RESS-Griseofulvinpartikel fast doppelt so schnell, verglichen mit Griseofulvin in Lipidträgern.

Das Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Ugazio et al. (2002). Dabei wird die Freisetzung des schwerlöslichen Arzneistoffes Cyclosporin A aus SLN für eine duodenale Verabreichung untersucht. Die freigesetzte Menge über der Zeit ist sehr gering (4 %).

Diese Untersuchung hat gezeigt, dass die Einbettung von Griseofulvin in eine Lipidmatrix zu einer nanopartikulären Arzneiform führt, aus der der Arzneistoff auch freigesetzt wird. Aufgrund des lipophilen Charakters der Matrix ist die Freisetzung und Resorption des Arzneistoffes aus den SLN geringer als die Freisetzung und Resorption von Griseofulvin aus reinen Arzneistoff-Nanopartikeln.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Fast die Hälfte der neu entwickelten Arzneistoffmoleküle der letzten Jahre mit vielversprechender pharmakologischer Wirkung stellen sich als schwerlöslich in Wasser heraus. Dies führt infolge einer langsamen Freisetzung zu einer unzureichenden Bioverfügbarkeit. Wenn aus dem Molekül kein Salz gebildet werden kann, kommen verschiedenen Methoden und Technologien zur Verbesserung der Löslichkeit in Frage. Dazu gehören zum Beispiel die Zugabe von Cosolventien, Tensiden oder hydrophilen Komplexbildnern wie Cyclodextrin, die Einarbeitung des Wirkstoffes in eine ölige Lösung, die Bildung von Emulsionen oder die Herstellung fester Dispersionen. Die Mikronisierung der Substanz ist sicherlich die einfachste und wichtigste Methode zur Verbesserung der Löslichkeit. Ein großer Vorteil dabei ist, dass ein Pulver aus reinem Wirkstoff, also ohne Träger oder Begleitstoffe anfällt. Für die technologische Weiterverarbeitung eignet sich am besten ein kristallines Pulver. Die Mikronisierung beeinflusst aber oftmals Produkteigenschaften wie die Kristallinität des Arzneistoffes. So können zum Beispiel amorphe Formen auftreten, die andere Eigenschaften wie die ursprünglichen Partikel aufweisen.

Ein vielversprechendes Verfahren für die Herstellung kleinster Partikel bis in den Nanometerbereich stellt das RESS-Verfahren dar. Es handelt sich um ein Verfahren, das die Eigenschaft überkritischer Fluide ausnutzt, Substanzen zu lösen. Der überkritische Feststoff wird dabei in einem überkritischen Fluid gelöst. Nach dem schnellen Entspannen der überkritischen Lösung durch eine Düse auf Umgebungsdruck kommt es durch spontane Phasenübergänge zur Bildung von Nanopartikeln, die frei von organischen Lösungsmitteln sind. Die Partikelgröße kann durch die Wahl der Parameter Druck und Temperatur gesteuert werden. Ist jedoch die Löslichkeit des Arzneistoffes im überkritischen Fluid sehr gering, entstehen in der Expansionkammer nur geringe Partikelkonzentrationen. Starkes Partikelwachstum bleibt aus. Die Partikel werden auf einem Filter abgeschieden und stehen für eine Charakterisierung zur Verfügung.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es möglich ist, mit Hilfe des RESS-Verfahrens unter Verwendung von überkritischem Trifluormethan stabile Griseofulvinnanopartikel herzustellen. Der Wirkstoff fällt in reiner Form, ohne Träger oder Begleitstoffe an. Aufgrund des Abscheidvorgangs auf dem Filter entstehen aus den Primärpartikeln mit einer Partikelgröße von 240 ± 80 nm Agglomerate mit einer schwammartigen Struktur, die eine große Oberfläche

aufweisen. Die Oberfläche ist mit $8,81 \text{ m}^2/\text{g}$ doppelt so groß wie die Oberfläche des auf herkömmlichem Wege mikronisierten Griseofulvin (Ph. Eur.). Es kann weiter gezeigt werden, dass die Mikronisierung der Griseofulvinpartikel in den Nanometerbereich gemäß der Kelvin-Gleichung zu einer Erhöhung der Sättigungslöslichkeit um 15 % führt. Die Erhöhung der Sättigungslöslichkeit führt neben der Vergrößerung der Partikeloberfläche gemäß der Beziehung von Noyes-Whitney zu einer Erhöhung der Auflösungsgeschwindigkeit. Die Auflösungsgeschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell kann durch das RESS-Verfahren verglichen mit auf herkömmlichem Wege mikronisiertem Griseofulvin um 23 % gesteigert werden. Dies führt letztendlich zu einer Erhöhung der Resorption, was mit Hilfe des Caco-2/TC-7-Zellmodells gezeigt werden kann. Bei Griseofulvin handelt es sich um eine Substanz, die gut resorbiert wird (Yee 1997). Der in dieser Arbeit bestimmte Permeationskoeffizient im Bereich von $42\text{-}48 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ bestätigt dieses Ergebnis. Basierend auf den Kenngrößen Löslichkeit und Permeabilität kann Griseofulvin in die Klasse II des biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (niedrige Löslichkeit, hohe Permeabilität) eingeteilt werden. Da Griseofulvin passiv durch die Membranen der intestinalen Zellen transportiert wird, führt eine Erhöhung der Sättigungslöslichkeit und eine Erhöhung der Auflösungsgeschwindigkeit zu einer Erhöhung des Griseofulvintransportes. Bei schwerlöslichen Substanzen wird die Auflösungsgeschwindigkeit zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. So zeigen die RESS-Partikel eine um 14 % erhöhte Arzneistoffkonzentration in der Akzeptorkammer, verglichen mit auf herkömmlichem Wege mikronisiertem Griseofulvin. Als eine Substanz mit einer schlechten Löslichkeit und einer hohen Permeation ist die von Atkinson et al. (1962) gezeigte Verbesserung der Resorption von Griseofulvin in Abhängigkeit von der spezifischen Oberfläche auf eine Verbesserung des Auflöseverhaltens zurückzuführen. Der von Atkinson et al. (1962) untersuchte Bereich der spezifischen Oberfläche von $0,36$ bis $2,43 \text{ m}^2/\text{g}$ kann durch die Bildung von Griseofulvinnanopartikeln bis zu einer spezifischen Oberfläche von $8,81 \text{ m}^2/\text{g}$ erweitert werden. Auch für die RESS-Griseofulvinpartikel mit dieser deutlich erhöhten Oberfläche, kann eine weitere Verbesserung der Auflösungsgeschwindigkeit erzielt werden, dies führt zu einer höheren Resorption von Griseofulvin.

Die physiko-chemische Charakterisierung der RESS-Griseofulvinzubereitung zeigt keinen Unterschied zum Ausgangsmaterial. So gibt weder die dynamische Differenzkalorimetrie noch die Raman-Spektroskopie Hinweise darauf, dass Griseofulvin aus dem RESS-Prozess in einer anderen Kristallinität vorliegt.

Das Caco-2/TC-7-Zellmodell kann neben den Permeationsversuchen auch für Permeationsversuche in Abhängigkeit der Löslichkeit eingesetzt werden. Anstelle der Arzneistoffe werden dazu Arzneistoffcarrier, wie die griseofulvinbeladenen SLN, in das Dissolutionsmedium ge-

geben. Der aufgelöste Wirkstoff kann die Zellmembran passieren. Die Wirkstoffkonzentration kann dann im Akzeptormedium bestimmt werden. Dies ist ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Arzneistofffreisetzung aus festen Lipidnanopartikeln. Erwartungsgemäß ist die Freisetzung und letztendlich die Permeation von Griseofulvin aus diesen Lipidcarriern geringer als die Permeation von partikulärem Griseofulvin.

Der zweite schwerlösliche Arzneistoff, der dem RESS-Prozess unterzogen wird, ist das nicht steroidale Antirheumatikum Ibuprofen. Dabei fällt das Produkt beim Entspannen durch die Düse vergleichbar mit Griseofulvin mit einer mittleren Partikelgröße von 240 ± 80 nm an. Da die Löslichkeit von Ibuprofen in überkritischem Kohlendioxid deutlich höher ist als die von Griseofulvin in Trifluormethan, kommt es in der Expansionskammer zu einer erhöhten Partikelkonzentration, die durch Partikelwachstum zu größeren Teilchen auf dem Filter führt. Die spezifische BET-Oberfläche nimmt für das RESS-Produkt, verglichen mit dem Ausgangsprodukt um mehr als das 15fache zu. Die Löslichkeit und die Auflösungsgeschwindigkeit unterscheiden sich jedoch nicht. Grund dafür ist, dass der RESS-Prozess zu einer Glättung der Partikeloberfläche führt. Diese Hydrophobisierung geht mit einer schlechteren Benetzbarkeit der Oberflächen einher. Eine Einbettung in feste Dispersionen kann in diesem Fall Abhilfe schaffen, was für Griseofulvin gezeigt wurde. Durch eine Einbettung von Griseofulvin in Polyethylenglykol 6000 kann die Geschwindigkeitskonstante nach Hixson-Crowell erhöht werden. Die Einbettung führt beim RESS-Griseofulvin nach 10 Minuten zu einer Verdopplung der freigesetzten Griseofulvinmenge.

Auch beim Ibuprofen kommt es durch den RESS-Prozess zu keiner Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften. Das RESS-Ibuprofen besitzt dieselbe Kristallinität wie das Ausgangsprodukt.

Kapitel 8

Literaturverzeichnis

Ahmed, H.; Buckton, G. und Rawlins, D. A.

“The use of isothermal microcalorimetry in the study of small degrees of amorphous content of a hydrophobic powder”

Int. J. Pharm. **130**, 195-201 (1996)

Ahmed, H.; Buckton, G. und Rawlins, D. A.

“Crystallisation of partially amorphous griseofulvin in water vapour: Determination of kinetic parameters using isothermal heat conduction microcalorimetry”

Int. J. Pharm. **167**, 139-145 (1998)

Alessi, P.; Cortesi, A.; Kikic, I.; Foster, N. R.; Macnaughton, S. J. und Colombo, I.

“Particle production of steroid drugs using supercritical fluid processing”

Ind. Eng. Chem. Res. **35**, 4718-4726 (1996)

Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P. und Crison, J. R.

“A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability”

Pharm. Res. **12**, 413-420 (1995)

Aniedobe, N. E. und Thies, M. C.

“Formation of Cellulose Acetate fibers by the rapid expansion of supercritical methanol solutions”

Macromolecules **30**, 2792-2794 (1997)

Artursson, P.

“Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells”

J. Pharm. Sci. **79**, 476-482 (1990)

Artursson, P.; Ungell, A.-L. und Löfroth, J.-E.

“Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: Cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments.”

Pharm. Res. **10**, 1123-1129 (1993)

Artursson, P.; Palm, K. und Luthman, K.

“Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport”

Adv. Drug Del. Rev. **22**, 67-84 (1996)

Atkinson, R. M.; Bedford, C.; Child, K. J. und Tomich, E. G.

“Effect of particle size on blood Griseofulvin-levels in man”

Nature **193**, 588-589 (1962)

Awadallah, Bilal

“Stereospezifität des aktiven Arzneistofftransports: Modelluntersuchungen an Caco-2/TC-7-Zellen und quantitative Enantiomerenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese”

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2003)

Barthe, L.; Woodley, J. und Houin, G.

“Gastrointestinal absorption of drugs: Methods and studies”

Fundam. Clin. Pharmacol. **13**, 154-168 (1999)

Behr, M.; Dietrich, J.; Mehta, P. J.; Reher, D. und Sucker, H.

“Ergebnisse der Linearisierung der Lösungsgeschwindigkeitsfunktion”

Pharm. Ind. **35**, 210-212 (1973)

Best, W.; Müller, F. J.; Schmieder, K.; Frank, R. und Paust, J.

“Finely divided carotinoids”

Ger. Offen. (1981), Deutsche Patentanmeldung 29 43 267 (BASF AG); Anmeldung: 1979

Bolton, B. A. und Prasad, P. N.

“Laser Raman investigation of pharmaceutical solids: Griseofulvin and its solvates”

J. Pharm. Sci. **70**, 789-792 (1981)

Breitenbach, J.; Schrof, W. und Neumann, J.

“Confocal Raman-spectroscopy: Analytical approach to solid dispersions and mapping of drugs”

Pharm. Res. **16**, 1109-1113 (1999)

Brian, P. W.

“Biological activity of griseofulvin”

Ann. Botany **13**, 59-77 (1949)

- Brian, P. W.; Curtis, P. J. und Hemming, H. G.
"A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by Penicillium janczewskii. III. Identity of curling factor with griseofulvin"
Brit. Mycol. Soc. Trans. **32**, 30-33 (1949)
- Brodin, A.; Frank, S. und Ye, C.
"Preparation of solid dispersions"
PCT Int. Appl. (2001), WO 2001066091 von 08.03.2001
- Caro, I.; Boulenc, X.; Rousset, M.; Meunier, V.; Bourrié, M.; Julian, B.; Joyeux, H.; Roques, C.; Berger, Y.; Zweibaum, A. und Fabre, G.
"Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs"
Int. J. Pharm. **116**, 147-158 (1995)
- Cavalli, R.; Bargoni, A.; Podio, V. Muntoni, E.; Zara, G. P. und Gasco, M. R.
"Duodenal administration of solid lipid nanoparticles loaded with different percentages of tobramycin"
J. Pharm. Sci. **92**, 1085-1094 (2003)
- Chantret, I.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brattain, M. G. und Zweibaum, A.
"Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines"
Cancer Res. **48**, 1936-1942 (1988)
- Chantret, I.; Rodolosse, A.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brot-Laroche, E.; Zweibaum, A. und Rousset, M.
"Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: Evidence for glucose-dependent negative regulation"
J. Cell Sci. **107**, 213-225 (1994)
- Charoenchaitrakool, M.; Dehghani, F.; Foster, N. R. und Chan, H. K.
"Micronization by rapid expansion of supercritical solutions to enhance the dissolution rates of poorly water-soluble pharmaceuticals"
Ind. Eng. Chem. Res. **39**, 4794-4802 (2000)

Chattopadhyay, P. und Gupta, R. B.

“Production of griseofulvin nanoparticles using supercritical CO₂ antisolvent with enhanced mass transfer”

Int. J. Pharm. **228**, 19-31 (2001)

Chester, T. L. und Pinkston, J. D.

“Supercritical fluid and unified chromatography“

Anal. Chem. **72**, 129R-135R (2000)

Chiou, W. L. und Riegelman, S.

“Preparation and dissolution characteristics of several fast-release solid dispersions of griseofulvin“

J. Pharm. Sci. **58**, 1505-1510 (1969)

Chiou, W. L. und Riegelman, S.

“Oral absorption of griseofulvin in dogs: Increased absorption via solid dispersion in polyethylene glycol 6000“

J. Pharm. Sci. **59**, 937-942 (1970)

Chiou, W. L. und Riegelman, S.

“Pharmaceutical applications of solid dispersion systems“

J. Pharm. Sci. **60**, 1281-11302 (1971 a)

Chiou, W. L. und Riegelman, S.

“Absorption characteristics of solid dispersed and micronized griseofulvin in man“

J. Pharm. Sci. **60**, 1376-1380 (1971 b)

Codispoti, J. R.; Prior, M. J.; Fu, M.; Harte, C. M. und Nelson, E. B:

“Efficacy of non-prescription doses of ibuprofen for treating migraine headache. A randomized controlled trial“

Headache **41**, 665-679 (2001)

Coffey, M. P. und Krukonis, V. J.

Phasex Corp. Final Report to NSF

Contr. ISI 8660823 (1988)

DIN 66 141

“Darstellung von Korn-(Teilchen-)größenverteilungen – Grundlagen“

Beuth Verlag GmbH, Berlin (1974)

DIN 53 765

“Prüfung von Kunststoffen und Elastomeren – Thermische Analyse – Dynamische Differenzkalorimetrie (DDK)”

Beuth Verlag GmbH, Berlin (1994)

Domingo, C.; Berends, E. B. und van Rosmalen, G. M.

“Precipitation of ultrafine organic crystals from the rapid expansion of supercritical solutions over a capillary and a frit nozzle”

J. Supercrit. Fluids **10**, 39-55 (1997)

Donsi, G. und Reverchon, E.

“Micronization by the means of supercritical fluids: Possibility of application to pharmaceutical field“

Pharm. Acta Helv. **66**, 170-173 (1991)

Duncan, W. A. M.; Macdonald, G. und Thornton, M. J.

“Some factors influencing the absorption of Griseofulvin from the gastrointestinal tract“

J. Pharm. Pharmacol. **14**, 217-224 (1962)

Edwards, A. D.; Shekunov, B. Y.; Kordikowski, A.; Forbes, R. T. und York, P.

“Crystallization of pure anhydrous polymorphs of carbamazepine by solution enhanced dispersion with supercritical fluids (SEDS)“

J. Pharm. Sci. **90**, 1115-1124 (2001)

Elamin, A. A.; Ahlneck, C.; Alderborn, G. und Nyström, C.

“Increased metastable solubility of milled griseofulvin, depending on the formation of a disordered surface structure“

Int. J. Pharm. **111**, 159-170 (1994)

Engman, H. A.; Lennernäs, H., Taipalensuu, J.; Otter, C.; Leidvik, B. und Artursson, P.

“CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 in human small and large intestinal cell lines suitable for drug transport studies“

J. Pharm. Sci. **90**, 1736-1751 (2001)

FDA Guidance for Industry

“Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system“

CDER/FDA (2000)

FDA-GRAS Notes **(2003)**

Internet: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html>

Fogh, J.; Fogh, J. M. und Orfeo, T.

“One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice“

J. Nat. Cancer Inst. **59**, 221-226 **(1977)**

Foraker, A. B.; Walczak, R. J.; Cohen, M. H.; Boiarski, T. A.; Grove, C. F. und Swaan, R. W.

“Microfabricated porous silicon particles enhance paracellular delivery of insulin across intestinal caco-2 cell monolayers“

Pharm. Res. **20**, 110-116 **(2003)**

Frömming, K. H.; Grote, U.; Lange, A. und Hosemann, R.

“Lyophilisierte Zubereitungen des Griseofulvins. 1. Mitt.: Herstellung, Eigenschaften und in-vitro-Freisetzung“

Pharm. Ind. **48**, 283-288 **(1986)**

Gentles, J. C.

“Experimental ringworm in guinea pigs: Oral treatment with griseofulvin“

Nature **182**, 476-477 **(1958)**

Gerard, D. und Quirin, K.-W. *Persönliche Mitteilung von FLAVEX Naturextrakte GmbH*

In: Stahl, E.; Quirin, K.-W. und Gerard, D.

“Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination“ Springer-Verlag, Berlin **(1987)**

Gericke, S. Wolf, M. und Steffens, K. J.

“Einfluß der Behandlung mit überkritischem Carbondioxid auf die Benetzbarkeit von Pulvern“

Pharm. Ind. **64**, 1293-1996 **(2002)**

Ghaderi, R.; Artursson, P. und Carlfors, J.

“A new method for preparing biodegradable microparticles and entrapment of hydrocortisone in DL-PLG microparticles using supercritical fluids“

Eur. J. Pharm. Sci. **10**, 1-9 **(2000)**

Goldberg, A. H.; Gibaldi, M. und Kanig, J. L.

“Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures III. Experimental evaluation of griseofulvin-succinic acid solid solution“

J. Pharm. Sci. **55**, 487-492 **(1966)**

- Gosselin, P. M., Thibert, R., Preda, M. und McMullen, J. N.
"Polymorphic properties of micronized carbamazepine produced by RESS"
Int. J. Pharm. **252**, 225-233 (2003)
- Gramatte, T.
"Griseofulvin absorption from different sites in the human small intestine"
Biopharm. Drug. Dispos. **15**, 747-759 (1994)
- Grasset, E.; Bernabeu, J. und Pinto, M.
"Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues"
Am. J. Physiol. **248**, C410-418 (1985)
- Grès, M. C.; Julian, B.; Bourrié, M.; Meunier, V.; Roques, C.; Berger, M.; Boulenc, X.; Berger, Y. und Fabre, G.
"Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: Comparison with the parental Caco-2 cell line"
Pharm. Res. **15**, 726-733 (1998)
- Grove, J. F. und McGowan, J. C.
"Identity of griseofulvin and 'Curling factor'."
Nature **160**, 574 (1947)
- Gurdial, G. S.; Macnaughton, S. J.; Tomasko, D. L. und Foster, N. R. S.
"Influence of chemical modifiers on the solubility of o- and m-hydroxybenzoic acid in super-critical carbon dioxide"
Ind. Eng. Chem. Res. **32**, 1488-1497 (1993)
- Haleblian, J. K. und McCrone, W.
"Pharmaceutical applications of polymorphism"
J. Pharm. Sci. **58**, 911-929 (1969)
- Hancock, B. C. und Parks, M.
"What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?"
Pharm. Res. **17**, 397-404 (2000)
- Hannay, J. B. und Hogarth, J.
"On the solubility of solids in gases"
Proc. Roy. Soc. (London) **29**, 324-326 (1879)

Hilgers, A. R.; Conradi, R. A. und Burton, P. S.

“Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa”

Pharm. Res. **7**, 902-910 (1990)

Hixson, A. W. und Crowell J. H.

“Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. I. Theoretical considerations”

Ind. Eng. Chem. **23**, 923-931 (1931)

Hybertson, B. M.; Kitlowski, R. P.; Jepson, E. K. und Repine, J. E.

“Supercritical fluid-aerosolized vitamin E pretreatment decreases leak in isolated oxidant-perfused rat lungs”

J. Appl. Physiol. **84**, 263-268 (1998)

ICH-Q2B Guideline for Industry: Validation of analytical procedures: November 1996

<http://www.fda.gov/cder/guidance/1320fnl.pdf>

Jostan, J. L.; Braun, G. und Buchmann, S.

“Cleaning of electronic components without chlorofluorocarbons”

Galvanotechnik **86**, 2247-2257 (1995)

Jung, J. und Perrut, M.

“Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey”

J. Supercrit. Fluids **20**, 179-219 (2001)

Junginger, H.

“Untersuchungen über Sprüheinbettungen von schwer wasserlöslichen Arzneistoffen in Polymeren. 4. Mitteilung: Abhängigkeit der Auflösungsgeschwindigkeit vom Energiegehalt bei Griseofulvin-Polyvinylpyrrolidon 30-Sprüheinbettungen, -Copräzipitaten und physikalischen Mischungen”

Pharm. Ind. **39**, 383-388 (1977)

Kaiser, C. S.; Römpf, H. und Schmidt, P. C.

“Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide”

Pharmazie **56**, 907-926 (2001)

Kerč, J.; Srčić, S.; Knez, Ž. und Senčar-Božič, P.

“Micronization of drugs using supercritical carbon dioxide”

Int. J. Pharm. **182**, 33-39 (1999)

Kerridge, D.

“Mode of action of clinically important antifungal drugs”

Adv. Microb. Physiol. **27**, 1-72 (1986)

Kim, J. H.; Paxton, T. E. und Tomasko, D. L.

“Microencapsulation of Naproxen using rapid expansion of supercritical solution”

Biotechnol. Prog. **12**, 650-661 (1996)

Koch, H. P. und Ritschel, W. A.

“Synopsis der Biopharmazie und Pharmakokinetik”

ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landberg - München (1986)

Kröber, H.; Teipel, U. und Krause, H.

“Manufacture of submicron particles via expansion of supercritical fluids”

Chem. Eng. Technol. **23**, 763-765 (2000)

Krukonis, V.

“Supercritical fluid nucleation of difficult to comminute solids”

AIChE Meeting, San Francisco, Paper 140f (1984)

Larson, K. A. und King M. L.

“Evaluation of supercritical fluid extraction in the pharmaceutical industry”

Biotechnol. Prog. **2**, 73-82 (1986)

Leuner, C. und Dressman, J.

“Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions”

Eur. J. Pharm. Biopharm. **50**, 47-60 (2000)

Liu, D. Z.; LeCluyse, E. L. und Thakker, D. R.

“Dodecylphosphocholine-mediated enhancement of paracellular permeability and cytotoxicity in caco-2 cell monolayers”

J. Pharm. Sci. **88**, 1161-1168 (1999)

Loth, H. und Hemgesberg, E.

“Properties and dissolution of drugs micronized by crystallization from supercritical gas”

Int. J. Pharm. **32**, 265-267 (1986)

Loth, H. und Schäfer, U.

“Messungen der korngößenabhängigen Lösungsgeschwindigkeiten schlecht benetzbarer Substanzen und ihre mathematische Auswertung”

Acta Pharm. Technol. **31**, 160-166 (1985)

Lukowski, G. und Pflugel, P.

“Electron diffraction of solid lipid nanoparticles loaded with aciclovir”

Pharmazie **52**, 642-643 (1997)

Matson, D. W.; Fulton, J. L.; Petersen, R. C. und Smith, R. D.

“Rapid expansion of supercritical fluid solutions: Solute formation of powders, thin films, and fibers ”

Ind. Eng. Chem. Res. **26**, 2298-2306 (1987)

Mayersohn, M. und Gibaldi, M.

“New Method of solid-state dispersion for increasing dissolution rates”

J. Pharm. Sci. **55**, 1323-1324 (1966)

Mehnert, W. und Mäder, K.

“Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications”

Adv. Drug Deliver. Rev. **47**, 165-196 (2001)

Mishima, K.; Matsuyama, K.; Uchiyama, H. und Ide, M.

“Microcoating of Flavone and 3-Hydroxyflavone with polymer using supercritical carbon dioxide”

The 4th International Symposium on Supercritical Fluids, Sendai (Japan), 267-270 (1997)

Mishima, K.; Matsuyama, K.; Yamauchi, S.; Izumi, H. und Furudono, D.

“Novel control of crystallinity and coating thickness of polymeric microcapsules of medicine by cosolvency of supercritical solution”

The 5th International Symposium on Supercritical Fluids, Atlanta (USA), (2000)

Mohamed, R. S.; Halverson, D. S.; Debenedetti, P. G. und Prud'homme R. K.

“Solids formation after the expansion of supercritical mixtures”

ACS Symposium Series **406**, 355-378 (1989)

Moneghini, M.; Kikic, I.; Voinovich, D.; Perissutti, B. und Filipović-Grčić, J.

“Processing of carbamazepine-PEG 4000 solid dispersions with supercritical carbon dioxide: preparation, characterisation, and in vitro dissolution”

Int. J. Pharm. **222**, 129-128 (2001)

Morck, H.

“40 Jahre Ibuprofen – Erfolgsstory eines Analgetikums”

Pharm. Ztg. **147**, Supplement zur Pharm. Ztg. 44 (2002)

Moriyoshi, T.; Kita, T. und Uosaki, Y.

“Static relative permittivity of carbon dioxide and nitrous oxide up to 30 MPa”

Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **97**, 589-596 (1993)

Mosharraf, M. and 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, R. H.

“Feste Lipidnanopartikel (SLN)”

In: Müller, R.H. und Hildebrand, G. E.

“Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen”

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2. Auflage, (1998)

Müller, R. H.; Böhm, B. H. L. und Grau, M. J.

“Nanosuspensionen – Formulierungen für schwerlösliche Arzneistoffe mit geringer Bioverfügbarkeit. 1. Mitteilung: Herstellung und Eigenschaften”

Pharm. Ind. **61**, 74-78 (1999)

Müller, R. H.; Mäder, K. und Gohla, S.

“Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art”

Eur. J. Pharm. Biopharm. **50**, 161-177 (2000)

Nellans, H. N.

“Mechanisms of peptide and protein absorption. (1). Paracellular intestinal transport: Modulation of absorption.”

Adv. Drug Delivery Rev. **7**, 339-364 (1991)

Noyes A. A. und Whitney, W. R.

"The rate of solution of solid substances in their own solutions"

J. Am. Chem. Soc. **19**, 930-934 (1897)

Oakes, R. S.; Clifford, A. A. und Rayner, C. M.

"The use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry"

J. Chem. Soc., Perkin Trans. **1**, 917-941 (2001)

Ohgaki, K.; Kobayashi, H.; Katayama, T. und Hirokawa, N.

"Whisker formation from jet of supercritical fluid solution"

J. Supercrit. Fluids **3**, 103-107 (1990)

Oxford, A. E.; Raistrick, H. und Simonart, P.

"The biochemistry of micro. ovrddot. organisms. LX. Griseofulvin C₁₇H₁₇O₆Cl, a metabolic product of Penicillium griseo-fulvum Dierckx"

Biochem. J. **33**, 240-248 (1939)

Palakodaty S. und York. P.

"Phase behavioural effects on particle formation processes using supercritical fluids"

Pharm. Res. **16**, 976-985 (1999)

Perrut, M.

"New challenges for supercritical fluids"

In: Proceedings of the 7th Meeting on Supercritical, Antibes, Band **1**, 1 (2000)

Perrut, M.; Jung, J. und Leboeuf, F.

"Solid state morphology of particle prepared by a supercritical fluid process"

In: High Pressure in Venice, Chemical Engineering Transactions, Band **2**, 711-716 (2002)

Petersen, R. C.; Matson, D. W. und Smith, R. D.

"The formation of polymer fibers from the rapid expansion of supercritical fluid solutions"

Polym. Eng. Sci. **27**, 1693-1697 (1987)

Pfeifer, S.; Pflugel, P. und Borchert, H. H.

"Biopharmazie"

Ullstein/Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden, 3. überarbeitete Auflage (1995)

Phillips E. M. und Stella, V. J.

"Rapid expansion from supercritical solutions: Application to pharmaceutical processes"

Int. J. Pharm. **94**, 1-10 (1993)

Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M.-D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J. und Zweibaum, A

"Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture"

Biol. Cell **47**, 323-330 (1983)

Rasenack, N. und Müller, B. W.

"Mikro- und Nanoteilchen: Die Bedeutung der Teilchengröße in der Pharmazie"

Prisma **9**, 183-190 (2002)

Reverchon, E; Donsi, G. und Gorgoglione, D

"Salicylic acid solubilization in supercritical CO₂ and its micronization by RESS"

J. Supercrit. Fluids **6**, 241-248 (1993)

Reverchon, E.; Della Porta, G.; Taddeo, R.; Pallado, P. und Stassi, A.

"Solubility and micronization of griseofulvin in supercritical CHF₃"

Ind. Eng. Chem. Res. **34**, 4087-4091 (1995)

Reverchon, E;

"Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nano-particles"

J. Supercrit. Fluids **15**, 1-21 (1999)

Reverchon, E. und Della Porta, G.

"Production of antibiotic micro- und nano-particles by supercritical antisolvent precipitation"

Powder Technol. **106**, 23-29 (1999)

Ritschel, W. A.

"Angewandte Biopharmazie"

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1973)

Schmidt, H.

"Tränen im Aquarium"

Verlag Kiepenheuer & Witsch, Köln (1993)

Senčar-Božič, P.; Srčič, S.; Knez, Ž. und Kerč, J.

“Improvement of nifedipine dissolution characteristics using supercritical CO₂”

Int. J. Pharm. **148**, 123-130 (1997)

Serajuddin, A. T. M.

“Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: Early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs”

J. Pharm. Sci. **88**, 1058-1066 (1999)

Sekiguchi, K. und Obi, N.

“Studies on absorption of eutectic mixtures. I. A comparison of the behaviour of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man”

Chem. Pharm. Bull. **9**, 866-872 (1961)

Sekiguchi, K.; Obi, N. und Ueda, Y.

“Studies on absorption of eutectic mixtures. II. Absorption of fused conglomerates of chloramphenicol and urea in rabbits”

Chem. Pharm. Bull. **12**, 134-144 (1964)

Siewert, M.; Dressman, J.; Brown, C. und Shah, V.

“FIP/AAPS Guidelines for Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms”

Dissolution Technologies **9(1)**, 6-15 (2003)

Singer, S. J. und Nicolson G. L.

“Fluid mosaic model of the structure of cell membranes”

Science **175**, 720-731 (1972)

Snavely, W. K.; Subramaniam, B.; Rajewski, R. A. und Defelippis, M. R.

“Micronization of insulin from halogenated alcohol solution using supercritical carbon dioxide as an antisolvent”

J. Pharm. Sci. **91**, 2026-2039 (2002)

Sommer, Karl

“40 Jahre Darstellung von Partikelgrößenverteilungen – und immer noch falsch?”

Chem.-Ing. Tech. **72**, 809-812 (2000)

Stahl, E.; Quirin, K.-W. und Gerard, D.

“Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination”

Springer-Verlag, Berlin (1987)

Steckel, H.; Thies, J. und Müller, B. W.

“Micronizing of steroids for pulmonary delivery by supercritical carbon dioxide”

Int. J. Pharm. **152**, 99-110 (1997)

Steckel, H. und Müller, B. W.

“Metered-dose inhaler formulation of fluticasone-17-propionate micronized with supercritical carbon dioxide using the alternative propellant HFA-227”

Int. J. Pharm. **173**, 25-33 (1998)

Stricker, H.

“Die in-vitro-Untersuchung der ‚Verfügbarkeit von Arzneistoffen‘ im Gastrointestinaltrakt.”

Pharm. Ind. **31**, 794-799 (1969)

Subra, P. und Debenedetti, P.

“Application of RESS to several low molecular weight compounds”

Process Technology Proceedings **12**, 49-54 (1996)

Subra, P. und Jestin, P.

“Powder elaboration in supercritical media: Comparison with conventional routes”

Powder Technology **103**, 2-9 (1999)

Subramaniam, B.; Rajewski, R. A. und Snavely, K.

“Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide”

J. Pharm. Sci. **86**, 885-890 (1997)

Taylor, L. S. und Zografi, G.

“The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy”

Pharm. Res. **15**, 755-761 (1998)

Teipel, U; Kröber, H.; Förter-Barth, U. und Krause, H.

“Im Submikronbereich tut sich was! – Partikelherstellung unter Anwendung überkritischer Fluide”

Verfahrenstechnik **34 (7-8)**, 65-67 (2000)

Tiwari, S.B. und Udupa, N.

“Supercritical fluids: Towards environment friendly processing”

Indian Drugs **36(4)**, 212-219 (1999)

Tom, J. W. und Debenedetti, P. G.

“Formation of bioerodible polymeric microspheres and microparticles by rapid expansion of supercritical solutions”

Biotechnol. Prog. **7**, 403-411 (1991 a)

Tom, J. W. und Debenedetti, P. G.

“Particle formation with supercritical fluids - a review”

J. Aerosol Sci. **22**, 555-584 (1991 b)

Tom, J. W.; Lim, G. B.; Debenedetti, P. G. und Prud’homme R. K.

“Applications of supercritical fluids in the controlled release of drugs”

ACS Symposium Series **514**, 238-257 (1993)

Tom, J. W.; Debenedetti, P. G. und Jerome, R.

“Precipitation of poly(L-lactic acid) and composite poly(L-lactic acid)-pyrene particles by rapid expansion of supercritical solutions”

J. Supercrit. Fluids **7**, 9-29 (1994)

Türk, M.

“Formation of small organic particles by RESS: experimental and theoretical investigations”

J. Supercrit. Fluids **15**, 79-89 (1999)

M. Türk

“Erzeugung von organischen Nanopartikeln mit überkritischen Fluiden“,

Habilitationsschrift, Universität Karlsruhe (TH), (2001)

Türk, M.; Hils, P.; Helfgen, B.; Schaber, K.; Martin, H. J. und Wahl, M. A.

“Micronization of pharmaceutical substances by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS): A promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents”

J. Supercrit. Fluids **22**, 75-84 (2002 a)

- Türk, M.; Helfgen, B.; Hils, P.; Lietzow, R. und Schaber, K.
“*Micronization of pharmaceutical substances by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS): Experiments and Modeling*”
Part. Part. Syst. Charact. **19**, 327-335 (2002 b)
- Tur, K. M.; Ch'ng, H.-S. und Baie, S.
“*Use of bioadhesive polymer to improve the bioavailability of griseofulvin*”
Int. J. Pharm. **148**, 63-71 (1997)
- Ugazio, E., Cavalli, R. und Gasco, M. R.
“*Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN)*”
Int. J. Pharm. **241**, 341-344 (2002)
- Ungell A.-L.
“*In vitro absorption studies and their relevance to absorption from the GI-tract*”
Drug Dev. Ind. Pharm. **23**, 879-892 (1997)
- Veiga, M. D.; Diaz, P. J. Und Ahsan, F.
“*Interactions of Griseofulvin with cyclodextrins in solid binary systems*”
J. Pharm. Sci. **87**, 891-900 (1998)
- Vemavarapu, C; Mollan, M. J. Und Needham T. E.
“*Crystal doping aided by rapid expansion of supercritical solutions*”
AAPS PharmSciTech **3**, article 29 (2002)
- Vudathala, G. K. und Rogers, J. A.
“*Oral bioavailability of griseofulvin from aged griseofulvin:lipid coprecipitates: In vivo studies in rats*”
J. Pharm. Sci. **81**, 1166-1169 (1992)
- Wartewig, S. und Neubert, R.
“*Nicht-invasive Analysenmethoden der Schwingungsspektroskopie in der pharmazeutischen Forschung*”
Pharm. Ind. **8a**, 863-869 (2002)
- Weidner, E.; Steiner, R. und Knez. Ž.
“*High pressure Chemical Engineering*”
Process Technology Proceedings **12**, 223-228 (1996)

Westesen, K. und Siekmann, B.

"Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles"

Int. J. Pharm. **151**, 35-45 (1997)

Westesen, K.; Bunjes, H.; Drechsler, M.; Hammer, G.; Mehlem, J.; Schaal, G. und Unruh, T.
Vortrag, DPhG Jahrestagung Münster 2000,

"Colloidal lipid-based carrier system and drug dispersions"

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. **333**, Suppl. 2, S. 35 (2000)

Wilson, G.; Hassan, I. F.; Dix, C. J.; Williamson, I.; Shah, R.; Mackay, M. und Artursson, R.

"Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier"

Adv. Drug Delivery Res. **11**, 25-40 (1990)

Wilson, T. H.

"Intestinal Absorption"

W. B. Saunders Co., Philadelphia (1962)

Witschi, C. und Doelker, E.

"Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physico-chemical properties, analytical methods and documented values"

Eur. J. Pharm. Biopharm. **43**, 215-242 (1997)

Woodcock, S.; Williamson, I.; Hassan, I. und Mackay, M.

"Isolation and characterization of clones from the Caco-2 cell line displaying increased taurocholic acid transport"

J. Cell Sci. **98**, 323-332 (1991)

Yang, S.; Zhu, J.; Lu, Y.; Liang, B. und Yang, C.

"Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration"

Pharm. Res. **16**, 751-757 (1999)

Yazdanian, M.; Glynn, S. L.; Wright, J. L. und Hawi, A.

"Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds"

Pharm. Res. **15**, 1490-1494 (1998)

Yee S.

"In vitro permeability across caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in men – fact or myth"

Pharm. Res. **14**, 763-766 (1997)

York, P.

"Strategies for particle design using supercritical fluid technologies"

PSTT **2**, 430-440 (1999)

Young, T. J.; Mawson, S.; Johnston, K. P.; Henriksen, I. B.; Pace, G. W. und Mishra, A. K.

"Rapid expansion from supercritical to aqueous solution to produce submicron suspensions of water-insoluble drugs"

Biotechnol. Prog. **16**, 402-407 (2000)

Kapitel 9

Anhang

Tab. 9.1 Messdaten der Kalibrierung von Griseofulvin (HPLC-Analytik)

	$C_{\text{Griseofulvin}} [\mu\text{g/ml}]$ vor Zugabe des internen Stan- dards	$\frac{\text{AUC}_{\text{Griseofulvin}}}{\text{AUC}_{\text{P-Phenylphenol}}}$	$C_{\text{Griseofulvin}} [\mu\text{g/ml}]$ vor Zugabe des internen Stan- dards	$\frac{\text{AUC}_{\text{Griseofulvin}}}{\text{AUC}_{\text{P-Phenylphenol}}}$
	0,118	0,316	0,824	0,830
	0,118	0,288	0,824	0,837
	0,118	0,295	0,824	0,825
Mittelwert		0,300		0,831
Relstdv [%]		4,863		0,726
	0,236	0,389	0,942	0,883
	0,236	0,382	0,942	0,886
	0,236	0,399	0,942	0,883
Mittelwert		0,390		0,884
Relstdv [%]		2,191		0,196
	0,353	0,489	1,413	1,219
	0,353	0,464	1,413	1,197
	0,353	0,470	1,413	1,200
Mittelwert		0,474		1,205
Relstdv [%]		2,751		0,990
	0,471	0,556	1,884	1,496
	0,471	0,559	1,884	1,488
	0,471	0,559	1,884	1,516
Mittelwert		0,558		1,500
Relstdv [%]		0,310		0,961

	$C_{\text{Griseofulvin}} [\mu\text{g/ml}]$ vor Zugabe des internen Stan- dards	$\frac{AUC_{\text{Griseofulvin}}}{AUC_{\text{P-Phenylphenol}}}$	$C_{\text{Griseofulvin}} [\mu\text{g/ml}]$ vor Zugabe des internen Stan- dards	$\frac{AUC_{\text{Griseofulvin}}}{AUC_{\text{P-Phenylphenol}}}$
	0,589	0,646	2,355	1,815
	0,589	0,645	2,355	1,817
	0,589	0,638	2,355	1,761
Mittelwert		0,643		1,798
Relsdv [%]		0,678		1,767
	0,707	0,703	2,826	2,080
	0,707	0,699	2,826	2,057
	0,707	0,693	2,826	2,138
Mittelwert		0,698		2,092
Relsdv [%]		0,721		1,996
Beta =	0,661	Steigung; slope		
Alpha =	0,248	Ordinatenabschnitt; intercept		
r =	0,999	Korrelationskoeffizient; regression coefficient		
S_y =	0,024	Reststandardabweichung der Regression; standard deviation of the regression (Sigma Dach)		
$S_y / \text{Beta} =$	0,037	rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} procedural standard deviation validation		
LOD ⁶ =	0,119	limit of detection = $3,3 * s_y/\text{beta}$		
LOQ ⁷ =	0,362	limit of quantitation = $10 * s_y/\text{beta}$		

⁶ Nachweisgrenze: Limit of Detection; gemäß ICH Topic Q2B

⁷ Bestimmungsgrenze: Limit of Quantitation; gemäß ICH Topic Q2B

Tab. 9.2 Messdaten der Präzision und Richtigkeit von Griseofulvin (HPLC-Analytik)

	Konzentration [µg/ml]	Konzentration [µg/ml]	Konzentration [µg/ml]	Konzentration [µg/ml]	Konzentration [µg/ml]
Soll	0,353	0,824	1,413	2,144	3,216
Ist	0,380	0,870	1,307	2,290	3,176
	0,378	0,849	1,307	2,201	3,187
	0,343	0,855	1,322	2,159	3,175
	0,373	0,875	1,343		
	0,352	0,855	1,309		
	0,376	0,871	1,321		
n	6	6	6	3	3
x	0,367	0,862	1,318	2,217	3,179
Stabw	0,015	0,011	0,014	0,067	0,007
Relsdv [%]	4,218	1,268	1,045	3,023	0,217
Wiederfindung (%) (ist/soll * 100)	103,833	104,637	93,279	103,390	98,860
Mittelwert Relsdv (%)			2,0		
Mittelwert Wieder- findung (%)			100,8		

Kapitel 10

Firmenverzeichnis

Abbott GmbH & Co. KG, Knollstr. 50, D-67061 Ludwigshafen
Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Heinrichstraße 3-4, D - 12207 Berlin
BASF AG, Carl-Bosch-Str. 38, D-68056 Ludwigshafen
Beckmann Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B13, D-47807 Krefeld
Bio-Rad GmbH, Heidemannstr. 164, D-80939 München
Bruker Optik GmbH, Rudolf-Plank-Str. 23, D-76275 Ettlingen
Büchi Labortechnik GmbH, Postfach 10 02 12, D-78402 Konstanz
Carl Zeiss Jena GmbH, Tatzendpromenade, D-07745 Jena
Carl Zeiss Jena GmbH, Carl-Zeiss-Str., D-72447 Oberkochen
Corning Costar Corporation, Koolhavenlaan 12, NL-1119 NE Schiphol-Rijk
Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Toxikologisches Institut, Wilhelmstr. 56,
D-72074 Tübingen
Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, D-22331 Hamburg
Fisher Scientific GmbH, Im heiligen Feld 17, D-58239 Schwerte
Fluka (siehe Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Freie Universität Berlin, Pharmazeutische Technologie, Kelchstr. 31, D-12169 Berlin
GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Schulze-Delitzsch-Straße 4, D-30938 Burgwedel
Greiner Bio-One GmbH, Maybachstraße 2, D-72636 Frickenhausen
Hellma GmbH & Co. KG, Postfach 1163, D-79371 Müllheim/Baden
Heraeus Instruments GmbH & Co. KG Labortechnik, Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau
Hosikawa Alpine AG, Peter-Dörfler-Str. 13-15, D-86199 Augsburg
INSERM, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, 16 avenue Paul-
Vaillant-Couturier F-94807 Villejuif
Invitrogen GmbH, Technologiepark, Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe
ISMATEC, Laboratoriumstechnik GmbH, Futtererstrasse 16, D-97877 Wertheim-Mondfeld
Janke und Kunkel, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel-Str. 10, D-79217 Staufen
Knauer GmbH, Hegauer Weg 38, D-14163 Berlin
Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Beuckestraße 22, D-14163 Berlin
Knoll AG (siehe Abbott)
Liebherr Hausgeräte GmbH, Memminger Straße 77-79, D-88416 Ochsenhausen
Macherey-Nagel GmbH, Valencienner Straße 11, D-52355 Düren

Malvern Instruments, Rigipsstr. 19, D-71083 Herrenberg
Martin-Luther-Universität, IADP, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, D-06120 Halle (Saale)
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Am Wöllerspfad 4, D-97922 Lauda-Königshofen
Perkin Elmer GmbH, Postfach 1011, D-88662 Überlingen
Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, D-64293 Darmstadt
Messer Griesheim GmbH, Fütingsweg 34, D-47805 Krefeld
Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-35353 Gießen
Microsoft Deutschland GmbH, Konrad-Zuse-Straße 1, D-85716 Unterschleißheim
Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5, D-65824 Schwalbach
Nunc GmbH & Co. KG, Hagenauer Straße 21a, D-65203 Wiesbaden
Orion Microscopy, 46, Avenue des Jardins, B-1030 Brussels
Retsch GmbH & Co. KG, Rheinische Strasse 36, D-42781 Haan
Sartorius AG, Weender Landstraße 94-108, D-37075 Göttingen
Shimadzu Deutschland GmbH, Albert-Hahn-Straße 6-10, D-47269 Duisburg
Siemens AG, Wittelsbacherplatz 2, D-80333 München
Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Wunstorferstraße 40, D-30926 Seelze
Tecan Deutschland GmbH, Theodor-Storm-Str. 17, D-74564 Crailsheim
Universität Karlsruhe (TH), Institut für Technische Thermodynamik und Kältetechnik, Engler-
Bunte-Ring 21, D-76131 Karlsruhe
Uniqema, Steintor 9, D-46446 Emmerich
Wagner & Munz GmbH, In der Rosenau 4, D-81829 München
Welding GmbH & Co., Grosse Theaterstrasse 50, D-20254 Hamburg
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstraße 12, D-69469 Weinheim
Wizard Zahoransky KG, Schwarzwaldstr. 3, D-79674 Todtnau
WPI (World Precision Instruments), Liegnitzer Str. 15, D-10999 Berlin
WTB Binder Labor Technik GmbH, Postfach 102, 78502 Tuttlingen

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Ammon, Döring, Drews, Gauglitz, Grabmayr, Häfelinger, Hanack, Heide, Jönsson, Kovar, Lindner, Müller, Nagel, Pommer, Reinhard, Roth, Safayhi, Schmidt, Schultz, Steinhilber, Strähle, Wahl, Wankmüller

LEBENS LAUF

22. Januar 1973	Geboren in Dinkelsbühl, als erstes Kind von Hans und Margret Martin (geb. Schnell)
1979 – 1983	Grundschule Kreßberg
1983 – 1989	Realschule Wilhelmsdorf
1989 – 1992	Gymnasium Wilhelmsdorf
1992	Allgemeine Hochschulreife
1992 – 1993	Freiwilliges Soziales Jahr: Diakonisches Jahr im Kinderdorf Tuttlingen
Oktober 1993 – Oktober 1997	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
März 1996	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1997	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1997 – April 1998	Pharmaziepraktikum in der Brücken-Apotheke, Dußlingen
April 1998 – Oktober 1998	Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm
Dezember 1998	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Approbation zum Apotheker
Januar 1999 – Juli 1999	Vertretung der Abteilungsleiterin der Abteilung Galenik in der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm
seit Oktober 1999	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Beginn der Dissertation „Charakterisierung von schwerlöslichen Arzneistoff-Nanopartikeln hergestellt durch das RESS-Verfahren zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. A. Wahl
März 2003	Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie