

Evaluierung und Quantifizierung von Einflussfaktoren auf die aerodynamischen Eigenschaften inhalativer Pulvermischungen

Dissertation
zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Bianca Beilmann

geb. 27.09.1977 in Bad Kreuznach

Mainz
2006

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2006

D 77

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein
(1879 – 1955)

Inhaltsverzeichnis

<i>Akronyme & Abkürzungen</i>	<i>1</i>
1 Einleitung	4
1.1 Stand des Wissens	4
2 Zielsetzung	9
3 Theoretischer Teil	10
3.1 Inhalative Pulversysteme und ihre Charakterisierung	10
3.1.1 Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis nach Ph.Eur. / USP	10
3.1.2 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils nach Ph.Eur / USP	12
3.2 Pulvercharakterisierung	18
3.2.1 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung durch Laserbeugung	18
3.2.2 Darstellung der Oberflächenmorphologie/–beladung durch Rasterelektronenmikroskopie	19
3.3 Beurteilung der inter-/ intrapartikulären Bindungskräfte durch Rasterkraftmikroskopie	21
3.4 Herstellung interaktiver Pulvermischungen	25
4 Materialien & Methoden	28
4.1 Materialien	28
4.1.1 Wirkstoffe	28
4.1.2 Trägermaterialien	28
4.1.3 Kapselmaterialien	30
4.1.4 Chemikalien & Reagenzien	31
4.1.5 Verpackungsmaterialien / Device	32
4.2 Methoden – experimenteller Teil	32
4.2.1 Herstellung von inhalativen Pulversystemen	32
4.2.2 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung durch Laserbeugung	35
4.2.3 Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften	36
4.2.4 Stressen von Kapseln	38
4.2.5 Mikroskopische Verfahren zur Oberflächencharakterisierung	38

4.2.6 Bestimmung der Adhäsionskräfte durch Rasterkraftmikroskopie	40
5 Methodenentwicklung – Quantifizierung von Laktose über HPLC	41
5.1 Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis von Laktose	41
5.1.1 Funktionsweise des Brechungsindex-Detektors (RID)	41
5.1.2 Methodenentwicklung	42
5.1.3. Validierung	43
5.2 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose	47
5.2.1 Funktionsweise des Verdampfungslichtstredetektors (ELDS)	47
5.2.2 Methodenentwicklung	48
5.2.3. Validierung	49
6 Ergebnisse I – Betrachtung der Einflussfaktoren	55
6.1 Auswirkung verschiedener Einflussfaktoren auf die ausgebrachte Dosis von Laktose und Ipratropiumbromid	55
6.1.1 Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis aus PE-Kapseln	55
6.1.1.1 <i>Ipratropiumbromid</i>	55
6.1.1.2 <i>Laktose Monohydrat</i>	57
6.1.2 Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis aus Gelatine-Kapseln	58
6.1.2.1 <i>Ipratropiumbromid</i>	58
6.1.2.2 <i>Laktose Monohydrat</i>	60
6.1.3 Statistische Auswertung	61
6.1.3.1 <i>Statistische Bewertung zu Ipratropiumbromid</i>	61
6.1.3.2 <i>Statistische Bewertung zu Laktose Monohydrat</i>	65
6.1.3.3 <i>Zusammenfassung</i>	68
6.2 Auswirkung verschiedener Einflussfaktoren auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose und Ipratropiumbromid	71
6.2.1 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aus PE-Kapseln	71
6.2.1.1 <i>Ipratropiumbromid</i>	71
6.2.1.2 <i>Laktose Monohydrat</i>	75
6.2.2 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aus Gelatine-Kapseln	78
6.2.2.1 <i>Ipratropiumbromid</i>	78
6.2.2.2 <i>Laktose Monohydrat</i>	81
6.2.3 Statistische Auswertung	85
6.2.3.1 <i>Statistische Bewertung zu Ipratropiumbromid</i>	85
6.2.3.2 <i>Statistische Bewertung zu Laktose Monohydrat</i>	89
6.2.3.3 <i>Zusammenfassung</i>	95

6.3 Auswirkung mechanischer Belastung auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose und Ipratropiumbromid	98
6.3.1 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aus PE-Kapseln	98
6.3.1.1 <i>Ipratropiumbromid</i>	98
6.3.1.2 <i>Laktose Monohydrat</i>	101
6.3.2 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aus Gelatine-Kapseln	104
6.3.2.1 <i>Ipratropiumbromid</i>	104
6.3.2.2 <i>Laktose Monohydrat</i>	107
6.3.3 Statistische Auswertung	110
6.3.3.1 <i>Statistische Bewertung zu Ipratropiumbromid</i>	110
6.3.3.2 <i>Statistische Bewertung zu Laktose Monohydrat</i>	113
6.3.3.3 <i>Zusammenfassung</i>	113
7 Ergebnisse II – Quantifizierung der Einflussfaktoren	115
7.1 Oberflächen & Adhäsion	115
7.2 Partikelmorphologie & Adhäsion	119
7.3 Partikel – Kapsel – Wechselwirkungen	123
7.3.1 Phänomen der „Abreicherung“	123
7.3.2 „Auspudereffekt“ – Kapselretention	125
7.3.2.1 <i>Kapselretention 200M Pharmatose®</i>	126
7.3.2.2 <i>Kapselretention 325M Respitose®</i>	130
7.3.2.3 <i>Statistische Auswertung</i>	133
7.4 Partikel – Partikel – Wechselwirkungen	136
7.4.1 Umhüllungs-Effekt – „HOT-SPOTS“	136
7.4.1.1 <i>Statistische Auswertung</i>	142
7.4.2 Funktionen des Trägermaterials	146
7.4.3 Korrelation der ausgebrachten Dosis Ipratropiumbromid - Laktose	150
7.4.4 Korrelation des aerodynamischen Feinanteils Ipratropiumbromid - Laktose	151
8 Diskussion	153
9 Zusammenfassung	157
10 Literatur	160
11 Anhang	167
11.1 Liste der Veröffentlichungen	167

Akronyme & Abkürzungen

α	Statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
ΔF	Kraft
Δz	Höhenveränderung der Spitze durch Cantilverbiegung
A	Ohne Vormischung
a	Beschleunigung
ACI	Anderson Cascade Impactor
ACN	Acetonitril
$A_{\text{Düse}}$	Fläche der Düsen
AFM	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
B	Mit Lactose (grob/fein) Vormischung
AUC	Area under curve (Fläche unter der Kurve)
BI	Boehringer Ingelheim
Brij [®] 35	Polyoxyethylenlaurylether
BSE-Detector	Back Scattering Electron (Rückstreuelektronen) Detektor
C	Mit Wirkstoff-Träger Vormischung
d	Düsendurchmesser (cm)
d_0	Annäherungsdistanz zweier Moleküle (Wechselwirkungsenergie = 0)
DD	Delivered Dose (ausgebrachte Dosis)
D_p	Partikeldurchmesser
EDX-Detector	Energy Dispersive X-Ray (Röntgenstrahlen) Detektor
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungslichtstredetektor)
EtOH	Ethanol
$F_{\text{ablösend}}$	Trennkraft
$F_{\text{adhäsion}}$	Adhäsionskraft
F_c	Zentrifugalkraft (Fliehkraft)
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoff
F_D	Widerstandskraft des Luftstroms (Tragkraft)
FDA	Food and Drug Administration
F_G	Gravitationskraft
FPD	Fine Particle Dose (inhalierbarer Anteil)
F-Wert	Varianzverhältnis; Prüfgröße des F-Tests
g/cm^3	Dichte (Masse / Volumen)

HCl	Salzsäure
HH	HandiHaler®
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
ICH	International Conference of Harmonisation
K_c	Federkonstante
KPI	Kapsel zur Pulverinhalation
Krest	Kapselrest
KV	Kilovolt
l	Liter
LM	Lösungsmittel
log	Logarithmus (natürlicher log zur Basis e \rightarrow \log_e)
LOQ	Limit of Quantification
M	Mesh
m	Masse
min	Minute
mol / l	Molarität (6×10^{23} Moleküle / Liter)
Mr	Relative molare Masse
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	1 Val (6×10^{23} Äquivalente / Liter)
N	Düsenanzahl
N / m	Newton (SI-Einheit für Kraft) / Meter
N ₂	Stickstoff
nm	Nanometer
nN	Nanonewton
OT	Oberteil der Kapsel (Cap)
PDA	Photodiode Array (Detector)
PE	Polyethylen
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Prallplatte
ppm	Parts per million
PSD	Particle Size Distribution
psi	Pounds per square inch (1 psi = 0,0689 bar)
PV	Prüfungsvorschrift
p-Wert	Wahrscheinlichkeitswert ("probability")
$q_3 \lg(x)$	Verteilungsdichte

QBSD	Quadral backscattering Detector (spezieller Rückstreuelektronendetektor)
R	Korrelationskoeffizient
R	Strömungswiderstand
r	Radius (cm)
R ²	Bestimmtheitsmaß
Re	Reynoldszahl (dimensionslos)
REM	Rasterelektronenmikroskop
REML	Restricted Maximum Likelihood
rH	relative Humidity (relative Luftfeuchte)
RID	Refractive Index Detector (Brechungsindexdetektor)
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Retentionszeit
s	Sekunde
SAS	Statistical Analysis System
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SE-Detector	Secondary electron Detector (Sekundärelektronen-Detektor)
SIP	Sample Induction Port
SPAN [®] 85	Sorbitantrioleat
TWO	Twist off Glas
UpM	Umdrehungen pro Minute
USP	United States Pharmacopeia
UT	Unterteil der Kapsel (body)
UV	Ultraviolett
V	Volumenstrom (l/min)
v	Mittlere Geschwindigkeit (cm/s)
VK	Variationskoeffizient
VPSE-Detector	Variable pressure secondary electron detector (SED für variablen Druck)
x ₁₀	Korngrößenparameter (10% der Teilchen sind kleiner als diese Größe)
λ	Wellenlänge (nm)
Φ	Gesamtanteil Pulver in der Kapsel
ν	Kinematische Viskosität (cm ² /s)
ρ	Charakteristische Dichte (kg/cm ³)
μ	Dynamische Viskosität (kg/(m*s))
W _{pot}	Potentielle Energie

1 Einleitung

Ein wichtiger Teil der Standardbehandlung von akuten und chronischen Atemwegserkrankungen ist die pulmonale Wirkstoffapplikation. Auf diese Weise können entsprechende Wirkstoffe (z.B. Salbutamol, Salmeterol, Ipratropiumbromid) zielgerichtet appliziert werden und relativ nebenwirkungsarm ihre Wirkung in den zentralen und peripheren Lungenabschnitten entfalten [1;2].

Erste Wahl in der Therapie waren lange Zeit, die seit den 50er Jahren auf dem Markt befindlichen FCKW-haltigen Dosieraerosole. Allerdings führten die zahlreichen Nebenwirkungen der klassischen Applikationsform bereits 1971 zur Einführung der ersten pulverförmigen Inhalationszubereitungen [3].

Bei dieser neuen Applikationsform entfallen beispielsweise die häufig beobachteten Koordinationsschwierigkeiten zwischen dem Auslösen des Inhalationsstroms und dem Einatmen. Die Inhalation ist nur noch vom Inspirationsluftstrom des Patienten abhängig. Da allerdings zur optimalen Dispergierung mindestens ein Atemvolumenstrom von 30 l/min erforderlich ist, wird die Anwendung bei Kindern unter vier Jahren sowie bei Patienten mit stark eingeschränkter Lungenfunktion untersagt [3].

Weiterhin fehlt der durch Verdunstung des Treibgases hervorgerufene Kältereiz, wodurch die Provokation von zusätzlichen Hustenanfällen bzw. Bronchokonstriktion unterbleibt. Mit dem Verzicht auf Druckgasdosieraerosole werden auch die Aerosolteilchen weniger stark beschleunigt, was zu einer Reduktion der im Rachenraum niedergeschlagenen Wirkstoffanteile und damit verbunden zu geringeren Nebenwirkungen führt [2;3].

Auch das 1987 verfasste „Protokoll von Montreal über Ozonschicht zerstörende Substanzen“ wirkte sich negativ auf den Stellenwert der FCKW-haltigen Dosieraerosole zur Therapie von Atemwegserkrankungen aus [2]. Deshalb wurden die Suche nach alternativen Darreichungsformen sowie die Entwicklungsarbeit an pulverförmigen Inhalativa intensiv vorangetrieben. So stehen heute zahlreiche alternative Applikationsformen zur Verfügung, die sich durch gesteigerte Compliance und deutlich verbesserte Therapiesicherheit auszeichnen und damit die Anfang 2003 vom Markt genommenen FCKW-haltigen Dosieraerosole ersetzen.

1.1 Stand des Wissens

Um den Wirkort in den Bronchiolen zu erreichen, darf der aerodynamische Durchmesser der Wirkstoffpartikel nur im Bereich von 1 - 5 μm liegen. Größere Partikel schlagen sich bereits im Rachenraum nieder, wo sie zu unerwünschten Nebenwirkungen führen können. Kleinere Partikel werden ausgeatmet [1].

Ausgelöst durch die extrem große Oberfläche der Partikel führen elektrostatische Aufladung und Agglomeratbildung zu Schwierigkeiten in der Verarbeitung.

Dies wirkt sich negativ auf die Fließeigenschaften aus, was eine genaue Dosierung der geringen Pulvermengen erschwert. Aus diesem Grund wird bei der Entwicklung einer galenischen Formulierung auf den Einsatz von interaktiven Pulvermischungen zurückgegriffen (siehe Kapitel 3.4). Der Zusatz einer inerten Trägerkomponente – meist Laktose Monohydrat – verbessert sowohl die Fließfähigkeit des Pulvers als auch die damit verbundene Dosiergenauigkeit [4]. Die groben Partikel „zerbrechen“ die vorliegenden Wirkstoff-Agglomerate und die freien Wirkstoffpartikel binden sich an der Trägeroberfläche. Von dort kann sich der Wirkstoff während der Inhalation wieder ablösen und in die tieferen Lungenbereiche vordringen, während der Träger aufgrund seiner Größe (z.B. 60 – 90 µm) im Rachenraum zurückbleibt [1;5].

Mit der Thematik „Entwicklung bzw. Optimierung von pulverförmigen Inhalationszubereitungen“ beschäftigen sich bereits viele Veröffentlichungen [5-12]. Der Fokus liegt hierbei hauptsächlich auf der Evaluierung von Faktoren, welche die aerodynamischen Eigenschaften beeinflussen. Weiterhin beschäftigt man sich mit der Frage, wie der Einfluss der Faktoren zu erklären ist [13-27; 33-34]. Dabei zeigt sich, dass zwischen den beiden Gruppen Partikel-Partikel-Wechselwirkungen und Partikel-Kapsel-Interaktionen zu differenzieren ist.

Partikel - Partikel - Wechselwirkungen

A) Zusammensetzung der Mischung

Die Aufklärung der Interaktionen zwischen Träger und Wirkstoff ist aufgrund eines gesteigerten Interesses an pulverförmigen Inhalativa bevorzugt vorangetrieben worden. Mit verschiedenen Ansätzen wurde versucht, dem Phänomen der interaktiven Pulvermischung und dem damit verknüpften Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften näher zu kommen.

Entscheidend bei diesen Mischungen ist ein ausbalanciertes Verhältnis der vorliegenden Bindungskräfte zwischen Träger und Wirkstoff. Die herrschenden van-der-Waals-Kräfte müssen so groß sein, dass die physikalische Stabilität der Mischung sichergestellt ist. Gleichzeitig müssen die Kräfte relativ schwach sein, um eine optimale Abtrennung der Partikel während der Inhalation zu gewährleisten [6].

In der Literatur finden sich zum Thema „Optimierung der Bindungsverhältnisse“ verschiedene Arbeiten. So werden neben dem Standardträger Laktose Monohydrat auch diverse andere Materialien wie z.B. Mannitol oder Sorbitol betrachtet [4;7;8]. Der Schwerpunkt liegt allerdings auf der Betrachtung verschiedener Laktosequalitäten, wobei die Einflussgröße der Oberflächenbeschaffenheit bzw. der Partikelgrößenverteilung des Trägermaterials auf die Bindungsverhältnisse und damit auf die aerodynamischen Eigenschaften analysiert und bewertet werden [6;9].

Flament [10] zum Beispiel stellt eine Korrelation zwischen der Rauigkeit von Oberflächen und dem inhalierbaren Anteil (FPD) her: mit einem zunehmenden Grad an Unebenheiten auf der Partikeloberfläche nimmt die FPD ab. Kawashima et al. [11] arbeitet diesen Effekt mit granulierter Laktose heraus und Zeng et al. [12] nähert sich dem Thema, indem die Laktoseoberflächen vor der Verarbeitung mit 95% EtOH modifiziert werden (provozierte Porenbildung).

Neben diesen drei Autoren kommen auch viele andere [13-18] zu dem folgenden Ergebnis: Glatte Oberflächen zeichnen sich durch niedrigere Adhäsionskräfte aus, was die Ablösung feiner Partikel fördert und zu einer höheren FPD führt.

Podzeck [6;19] erweitert und ergänzt diese Aussage. Ihre Arbeiten zeigen, dass neben der unterschiedlichen Form der adhärierenden Partikel auch die Breite der Partikelgrößenverteilung des Trägermaterials entscheidend an der Kräftebildung zwischen Wirkstoffpartikeln und glatten Oberflächen beteiligt ist. So bilden sich z.B. an glatten Oberflächen autoadhäsive Schichten aus Trägerpartikeln geringer Größe, in welche sich Wirkstoffpartikel einbetten. Diese werden bedingt durch die vorliegende größere Kontaktfläche fester gebunden und damit während der Inhalation schlechter abgetrennt. Je nach Zusammensetzung der Pulvermischung können glatte Trägeroberflächen sowohl niedrige als auch hohe Adhäsionskräfte aufweisen.

Es gibt allerdings auch Veröffentlichungen, die zu gegenteiligen Resultaten kommen. So beschreibt Chan et al. [20], dass die Modifikation der Trägerpartikel durch Sprühgranulierung zu wellenartigen Unebenheiten auf der Partikeloberfläche führt und die Ausbildung von Kavitäten ausbleibt. Dadurch steigert sich der inhalierbare Anteil, da die Kontaktfläche sowie die vorliegenden van-der-Waals-Kräfte reduziert werden.

Zum Thema Einfluss des Trägers auf die Partikelgrößenverteilung des Wirkstoffs findet man in der Literatur [14;17;19;21-27], dass sich grobe (= größere) Partikel durch stärkere Adhäsionskräfte auszeichnen als kleine Partikel. De Boer [5] erklärt dieses Phänomen folgendermaßen: kleine Partikel weisen, bedingt durch eine geringere Oberflächenrauigkeit, sowohl geringere Wechselwirkungskräfte (z.B. Adhäsionskräfte) als auch effektivere Trennkräfte auf. Grobe Partikel hingegen besitzen neben einer größeren Kontaktfläche auch Stellen mit erhöhten Bindungskräften („HOT-SPOTS“). Dort sind kleine Partikel - unabhängig ob Wirkstoff oder Hilfsstoff - nicht nur während des Mischvorgangs vor Reibungs- und Trennkräften geschützt, sondern auch während der Inhalation, was eine Reduktion der FPD zur Folge hat.

Eine Modifikation der Oberflächerrauigkeit grober Trägerpartikel und damit eine Veränderung der Bindungskräfte lässt sich neben Granulierung und Rekristallisierung des entsprechenden Trägermaterials auch durch Zusatz von feinen (kleinen) Trägerpartikeln erreichen [28]. Dazu werden entweder Träger mit einer genügend breiten Größenverteilung eingesetzt oder es wird zusätzlich eine feine ternäre Komponente zugefügt. In den meisten Fällen dient mikronisierte Laktose [12;16] als Additiv, aber auch andere mikronisierte Stoffe wie z.B. Leucin [29] werden verwendet. Da die Partikelgröße einen negativen Einfluss auf die Fließigenschaften hat, muss der Anteil der ternären Komponente so gering und gleichzeitig so effektiv wie möglich sein.

Zusammengefasst ergeben sich durch den Zusatz zwei Effekte: So lagern sich die feinen Partikel in den Kavitäten des Trägers ab und belegen durch Autoadhäsion die Stellen mit höherer Adhäsionskraft, was die Ablösung der Wirkstoffpartikel erleichtert [1;27;30;31]. Zusätzlich bilden sie mit den feinen Wirkstoffpartikeln so genannte „Multiplets“ - Agglomerate kleiner Partikel (siehe auch Kapitel 3.4). Je nach Studie gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten wie sich diese Agglomerate im Kaskadenimpaktor verteilen. Die „Multiplets“ werden entweder während der Inhalation wieder in Einzelpartikel getrennt und verteilen sich im Kaskadenimpaktor [16;32;33] oder sie schlagen als ein großes Teilchen nieder [19].

B) Mischungsbildung

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit dem ternären Hilfsstoff in den Fokus der Evaluierung rückt, ist die Mischreihenfolge der einzelnen Pulverbestandteile. Studien haben ergeben, dass eine deutliche Verbesserung der aerodynamischen Eigenschaften eintritt, wenn die groben und feinen Trägerbestandteile vor dem eigentlichen Mischen zusammengefügt und homogenisiert werden [5;13;25;34].

Durch diese Vormischung lässt sich die Absättigung der HOT-SPOTS[®] und das Auffüllen der Kavitäten systematisch beeinflussen

In allen bis jetzt genannten Arbeiten lag der Schwerpunkt auf der gezielten Veränderung von aerodynamischen Eigenschaften, wobei hauptsächlich mit dem Wirkstoff Salbutamolsulfat gearbeitet wurde. Eine konkrete Bestimmung der Adhäsionskräfte zwischen den beteiligten Komponenten erfolgte nicht. Dies wurde lange Zeit nur vereinzelt mit indirekten Messmethoden wie der „Zentrifugentechnik“ [35;36] oder einem Siebverfahren [10] durchgeführt, um erste Rückschlüsse auf die Stärke der Bindungskräfte zwischen Träger und Wirkstoff zu erhalten.

Erst mit der langsam einsetzenden Etablierung der Rasterkraftmikroskopie (siehe Kapitel 3.3) werden direkte Aussagen über die Bindungsverhältnisse zwischen Partikeln möglich. Dabei wird die Kraft ermittelt, die aufzuwenden ist, um zwei Partikel wieder zu trennen. Um allerdings statistisch signifikante Aussagen über die herrschenden Kräfteverhältnisse zu erhalten, sind ein hoher Arbeits- und Probenaufwand erforderlich [37;38]. Trotzdem verwendeten Eve et al. [39] dieses Verfahren, um die Bindungskräfte zwischen Laktose und Salbutamolsulfat zu erarbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff viel stärker an Laktose als an andere Salbutamolpartikel bindet. Übereinstimmend zu den bereits vorgestellten Theorien [1;5;31] wird damit die Funktion des Trägers, nämlich die Agglomeratbildung der Wirkstoff-Partikel zu unterbinden, bestätigt.

Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit Partikel-Partikel-Wechselwirkungen. Allerdings wird, statt dem üblicherweise verwendeten Salbutamolsulfat, das quartäre Atropinderivat Ipratropiumbromid eingesetzt. So kann die Allgemeingültigkeit bzw. Wirkstoffspezifität der bereits bekannten Thesen und Theorien überprüft werden.

Zusätzlich wird die aerodynamische Verteilung des Trägermaterials genauer betrachtet und erstmalig in den direkten Zusammenhang mit der Wirkstoff-Verteilung gestellt. Ein Aspekt der in den meisten Veröffentlichungen nicht oder nur ansatzweise betrachtet wird [25;40;41].

Die direkte Ergebniskorrelation von Träger und Wirkstoff bildet somit im Bereich der Partikel-Partikel-Wechselwirkungen einen Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit. Aus diesem Grund wurde intensiv an einem HPLC-Verfahren zur Laktosequantifizierung gearbeitet und die entsprechende Probenaufarbeitung optimiert. Somit ist es nun möglich, mit zwei verschiedenen HPLC-Verfahren aus einer Probenaufarbeitung sowohl den Gehalt des Trägers als auch des Wirkstoffs zu ermitteln und die Resultate in direkter Korrelation zu betrachten.

Damit tragen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wesentlich zum besseren Verständnis der innerhalb einer Pulvermischung vorliegenden Wechselwirkungen bei.

Partikel - Kapsel - Wechselwirkungen

Da neben den üblichen Gelatine-Kapseln lange Zeit kein alternatives Kapselmaterial zur pulmonalen Applikation vorlag, wurde dem Aspekt der Partikel-Kapsel-Wechselwirkung nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Auch die Tatsache, dass einige Formulierungen (Serevent[®], Ventodisk[®]) einzeln abgeteilt in Blisterkammern (z.B. Aluminiumfolie) vorliegen, hat das Interesse an den Interaktionen zwischen Kapsel und Pulvermischung deutlich geschmälert.

Jedoch stellt das Kapselmaterial eine markante Einflussgröße auf die aerodynamischen Eigenschaften dar, die es zu beachten gilt. So verändern Feuchtigkeit, Lagerung und Herstellungsprozess die Oberflächenbeschaffenheit der Kapseln, was sich auf die vorliegenden Kräfteverhältnisse zwischen Pulver und Kapselinnenseite auswirken kann. Auch in diesem Zusammenhang lassen sich die Bindungskräfte zwischen Kapselmaterial und Pulvermischung (meist van-der-Waals-Kräfte oder elektrostatische Wechselwirkungen) durch Rasterkraftmikroskopie nachweisen [42-44].

Neben dieser direkten Methode verwendet Ibrahim et al. [44] ein indirektes Verfahren, um die Stärke der Adhäsionskräfte zu ermitteln. Dazu werden Kapseln mit einer definierten Menge Laktose befüllt. Nach dem Entleeren der Kapseln wird die Laktosemenge erneut bestimmt. Die ermittelte Differenz (vorher - nachher) beschreibt die „Klebeeigenschaften“ des betrachteten Kapselmaterials. Je mehr Laktose in der Kapsel zurück bleibt, desto stärker sind die vorliegenden Kräfte.

In diesem Bereich der Interaktionen liegt ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit. Neben der Einflussgröße handelsüblicher Gelatinekapseln wird der Effekt eines neuen alternativen Kapselmaterials betrachtet und im Vergleich zur Gelatinekapsel bewertet. Diese Alternative aus Polyethylen zeichnet sich durch eine „inerte“ Innenseite aus, was die Wechselwirkungen zwischen Kapselwand und Pulver stark reduziert. So wird es möglich, die aerodynamischen Eigenschaften der „reinen“ Pulvermischung zu bewerten ohne mögliche Einflüsse der Kapsel zu beachten.

Weiterhin wird der Kapselrest näher untersucht und bezüglich der Partikelgrößenverteilung bewertet. Es soll herausgearbeitet werden, welche Anteile des Trägers bevorzugt an der „klebrigen“ Innenseite der Gelatine-Kapsel haften bleiben und welche Effekte sich dadurch auf die inhalierbaren Anteile ergeben.

Nicht zu vernachlässigen ist in diesem Bereich der Wechselwirkungen die Auswirkung der mechanischen Belastung des inhalativen Systems (Pulver und Kapsel). Dieser, in der Literatur kaum beachtete Faktor, wird nun in Kombination mit dem Kapselmaterial betrachtet und entsprechend bewertet.

Basierend auf den erhaltenen Erkenntnissen, die zum besseren Verständnis des komplexen inhalativen Systems aus Pulver und Kapsel beitragen, ist es eventuell möglich mit gezielten Maßnahmen eine Optimierung der aerodynamischen Eigenschaften zu erreichen.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Einflussfaktoren auf die aerodynamischen Eigenschaften von Pulvermischungen evaluiert und quantifiziert werden. Dazu werden, bei konstanter Dosierung der Modellsubstanz Ipratropiumbromid, die variablen Komponenten des inhalativen Systems (z.B. Kapselmaterial, Trägerqualität) sowie der Herstellungsprozess (Mischreihenfolge) modifiziert. Die so erhaltenen Kombinationen werden untersucht und die Ergebnisse kritisch im Zusammenhang mit bereits bekannten Theorien betrachtet. Aus Gründen der Übersicht erfolgt eine Untergliederung der Arbeit in zwei Abschnitte.

Der erste Teil beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Faktoren *Kapselmaterial*, *Trägerlaktose*, *zugesezter Feinanteil*, *Mischreihenfolge* und *mechanische Belastung* auf die aerodynamischen Eigenschaften. Es werden sowohl die ausgebrachte Dosis als auch die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils bestimmt und die beobachteten Effekte bezüglich ihrer statistischen Signifikanz bewertet.

Gemäß den aktuellen Anforderungen der FDA wird dabei die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils nicht, wie allgemein üblich durch den inhalierbaren Anteil (FPD) charakterisiert, sondern nach den aktuellen Anforderungen der FDA bewertet (siehe Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1 Einteilung der Kaskadenimpaktor Trennstufen nach Vorgabe der FDA

<i>Gruppe 1 (PP0 – PP1)</i>	Grober Feinanteil, schlägt sich im bereits Rachenraum nieder
<i>Gruppe 2 (PP2 – PP4)</i>	Inhalierbarer Anteil, gelangt in die Alveolen
<i>Gruppe 3 (PP 5- Filter)</i>	Feinstanteil, wird auf Grund seiner Partikelgröße wieder ausgeatmet

Weiterhin erfolgt die Betrachtung der Effekte nicht nur bezogen auf den Wirkstoff, sondern auch mit Blick auf das Trägermaterial – in diesem Fall Laktose Monohydrat. Um dies zu erreichen, werden zwei HPLC-Methoden zur Bestimmung des Trägermaterials entwickelt und die Probenaufarbeitung optimiert. Die anschließende Validierung der Verfahren erfolgt gemäß den gültigen Guidelines und Vorschriften.

Damit können neben den Ergebnissen der Wirkstoff-Verteilung auch Aussagen über die Verteilung des Trägermaterials erhalten und die Ergebnisse in direkter Korrelation betrachtet werden.

Im zweiten Teil werden die gefundenen Einflussgrößen näher untersucht und quantifiziert. Es wird die Frage nach dem „wie und warum“ geklärt und diskutiert, wie die Faktoren Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften nehmen. Diese Erkenntnisse sollen dazu beitragen, das komplexe System aus Pulver und Kapsel besser zu verstehen und sollen neue Denkanstöße zur Optimierung aufzeigen.

3 Theoretischer Teil

3.1 Inhalative Pulversysteme und ihre Charakterisierung

Ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung pulverförmiger Inhalativa sind die aerodynamischen Eigenschaften, die entscheidend für das Erreichen des Wirkortes und für die damit verbundene Wirksamkeit des Arzneistoffes sind. Entsprechende analytische Verfahren zur Bewertung der inhalativen Systeme finden sich in den verschiedenen Arzneibüchern. Mit den dort beschriebenen Methoden können Effekte, die durch Variationen in der Pulverzusammensetzung oder des Kapselmaterials auftreten, evaluiert werden.

3.1.1 Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis nach Ph.Eur. / USP

Wie in Abb.3-1 dargestellt, besteht die im Arzneibuch beschriebene Apparatur zur Ermittlung der Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis aus einer Steuereinheit zur Flussregulierung und Dosis-Sammelrohren [45;46]. Auf diese Weise kann der in-vivo Luftstrom während des Inhalationsvorgangs abgebildet und die vorliegenden aerodynamischen Eigenschaften der Inhalativa in-vitro standardisiert nachgestellt werden.

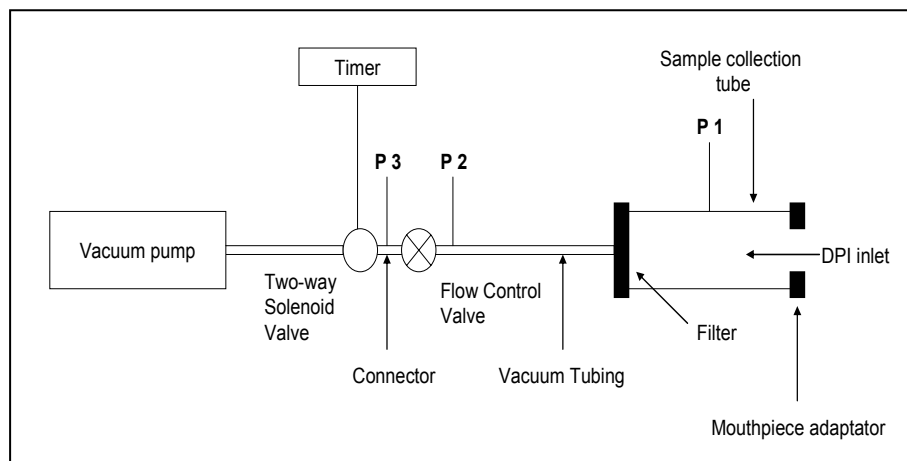


Abb.3-1 Schematischer Aufbau der Steuereinheit zur DD-Bestimmung nach Ph.Eur / USP [45] (P1 = Messstelle für Differenzdruck zwischen Dosis-Sammelrohr und Atmosphäre; P2 und P3 Messstelle für den Absolutdruck)

Im Rahmen der Arbeit besteht die eingesetzte Apparatur zur Abbildung der in-vivo herrschenden Bedingungen aus der in Abb.3-2 dargestellte Steuerwand sowie den in Abb.3-3 gezeigten Dosis-Sammelrohren aus Polyoxymethylen (saugseitig mit Glasfaserfilter (GF 92 Ø 50 mm, Schleicher & Schuell, MicroScience GmbH, Dassel, Deutschland) und Lochsieb).

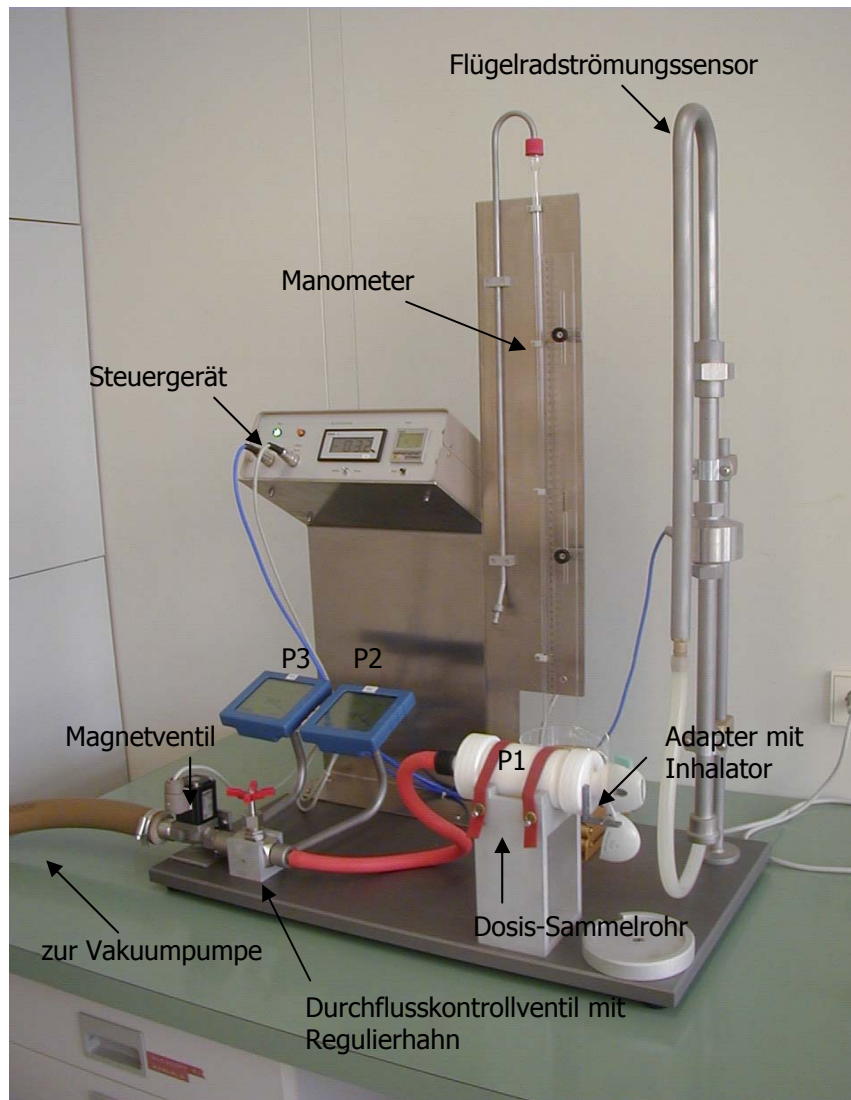


Abb.3-2 Beispiel für eine Steuerwand zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis (Modell BI)

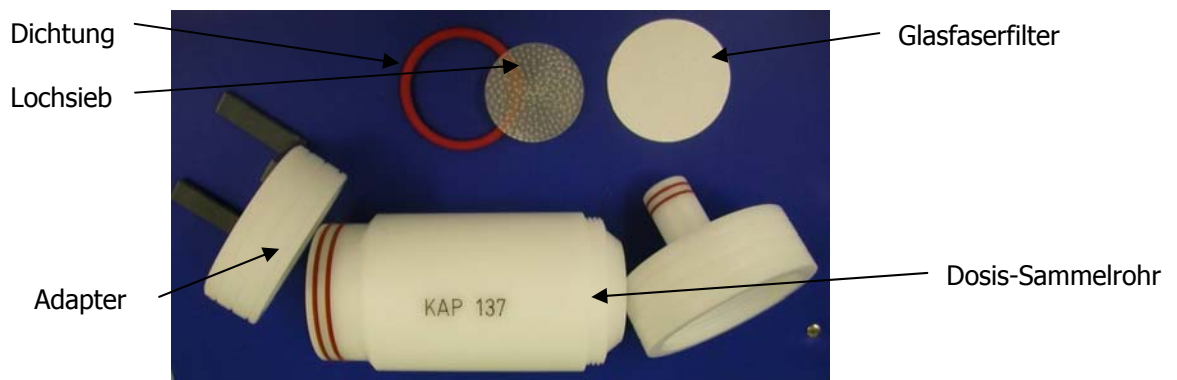


Abb.3-3 Einzelteile eines Sammelrohrs

Ebenfalls angelehnt an die Arzneibuch-Vorschriften [45;46] werden die zur Messung erforderlichen Flusseinstellungen an die vorliegende Apparatur angepasst [47].

Nur so ist eine standardisierte und definierte Ausbringung der Kapseln durch das entsprechende Device – in diesem Fall der HandiHaler® (RPC Formatec GmbH & Co KG, Mellrichstadt, Deutschland) – sichergestellt:

Über einen Ersatzwiderstand, der den Strömungswiderstand des Inhalators mit Kapsel wiedergibt, wird mit einem Mess-Sammelrohr am Differenzdruck-Messgerät (P1) durch das integrierte Manometer eine Wassersäule von 40,8 cm eingestellt (entspricht einem Druckabfall von 4,0 kPa). Auf diese Weise wird der vorgeschriebene Fluss (39 l/min) im System eingestellt und kontrolliert.

Anschließend wird der Absolutdruck an beiden Seiten der Durchflusskontrollventile P3 und P2 abgelesen und das Verhältnis bestimmt (soll: $\leq 0,5$). So ist sichergestellt, dass ausreichend Druck anliegt, um die in-vivo herrschenden Bedingungen abzubilden. Wird der Ersatzwiderstand gegen einen Adapter zur Flussmessung ausgetauscht, kann am Flussmesser der vorherrschende Fluss (soll: 39 l/min) abgelesen werden. Dieser Wert wird benötigt, um die für das geforderte Saugvolumen von 4 l benötigte Saugzeit in Sekunden (siehe Formel) zu berechnen.

$$\frac{60s \times 4 l}{39,0 l} = 6,15s$$

Sind alle Vorbereitungen abgeschlossen, wird das Mess-Sammelrohr gegen ein Proben-Sammelrohr ausgetauscht und erneut über den Adapter zur Flussmessung der angelegte Fluss (39 l/min \pm 5%) kontrolliert. Liegt der Wert im erforderlichen Akzeptanzbereich von 37,0 – 41,0 l/min, wird eine Kapsel (OT nach oben) in das Device (HandiHaler®) eingelegt und angestochen. Der so vorbereitete HandiHaler® wird anschließend über einen Adapter in das Proben-Sammelrohr eingesetzt und die Ausbringung für 6,15 s gestartet. Erneut wird das Verhältnis von P3 zu P2 kontrolliert. Nach Ende der Ausbringung wird das Sammelrohr verschlossen und mit einer definierten Menge Lösungsmittel durch Drehen bzw. Schütteln ausgespült. Die Probelösung kann direkt über HPLC vermessen werden.

3.1.2 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils nach Ph.Eur/USP

Mit diesem Prüfpunkt wird in erster Linie die Verteilung der Wirkstoffpartikel in der Lunge simuliert. Das bedeutet, dass der apparative Aufbau den menschlichen Respirationstrakt abbildet und damit ein aerodynamisches Klassifizierungssystem für in der Luft befindliche Partikel darstellt.

Die Apparatur besteht aus einem Sample Induction Port (SIP) zum Probeneinlass, einem Präseparator zur Vorabscheidung aller groben Partikel, dem Hightop USP als Verbindung zwischen SIP und Präseparator sowie einer Kaskade mit 8 Stufen (Stufe 0 oben bis Stufe 7 und Filter unten). Als Steuerwand dient erneut eine Steuereinheit zur Flussregulierung (siehe Abb.3-4 bis 3-6).

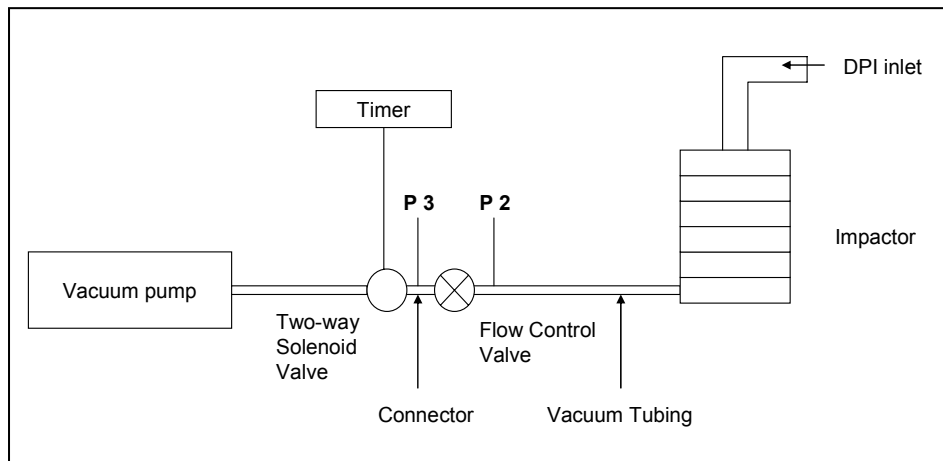


Abb.3-4 Schematischer Aufbau der Steuereinheit zur PSD-Bestimmung nach Ph.Eur / USP [48] (P2 und P3 Messstelle für den Absolutdruck)

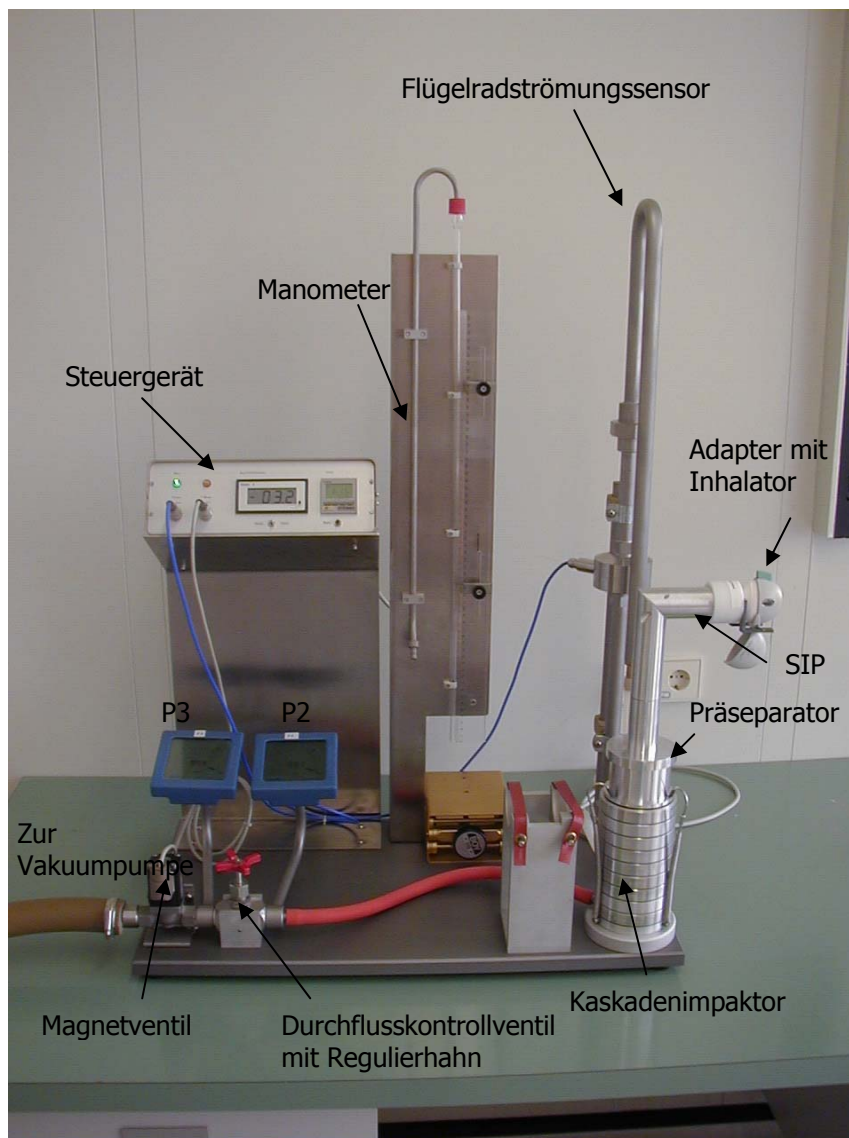


Abb.3-5 Beispiel einer Steuerwand zur Bestimmung des aerodynamischen Feinanteils (Modell BI)

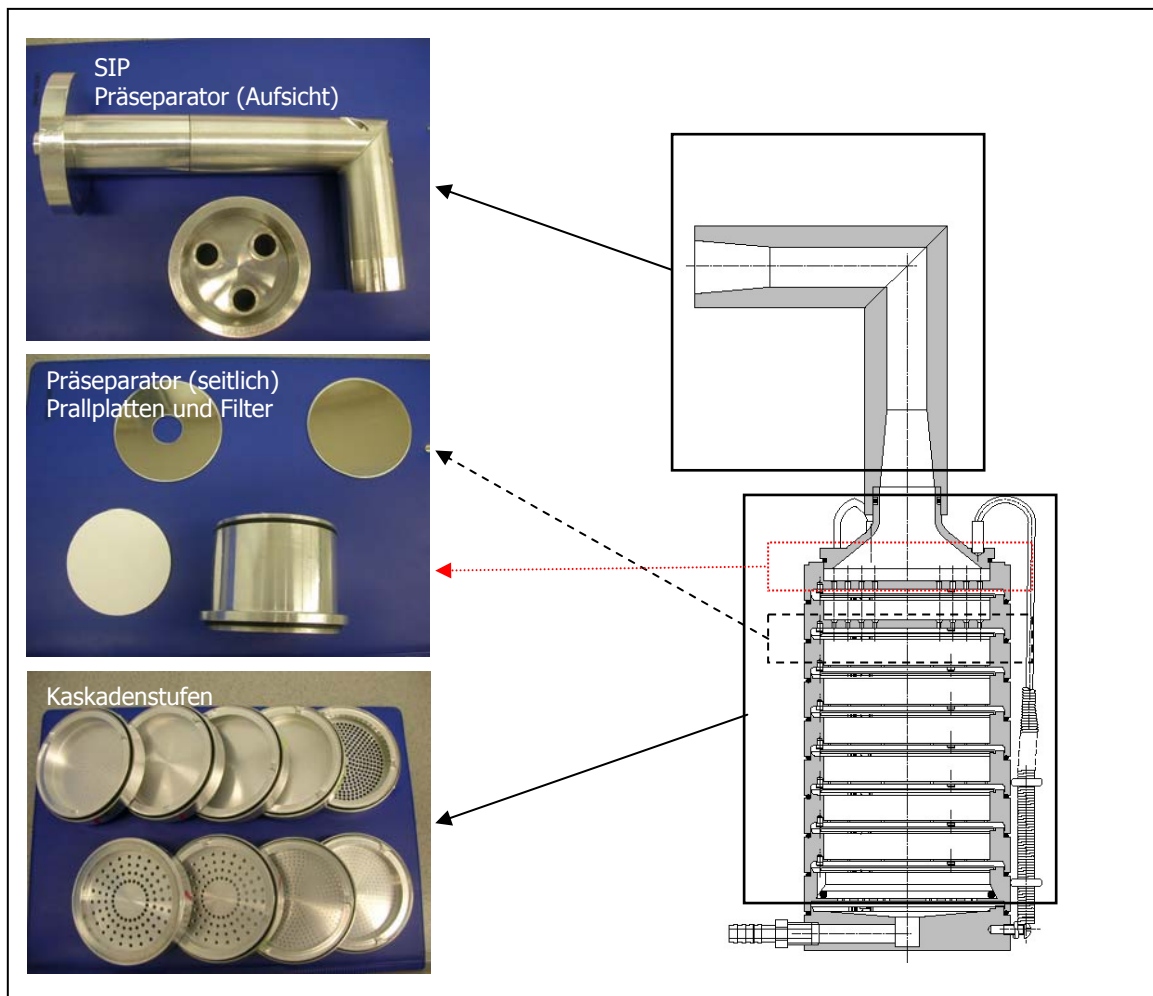


Abb.3-6 Bestandteile des Andersen Kaskadenimpaktors (Skizze ohne Präparator) [48]

Die zwischen den Kaskadenstufen liegenden Prallplatten, sowie der Präparator werden mit einem Coating-Reagenz (siehe Kapitel 4.1.4) bestrichen, um ein wirksames Abscheiden der Teilchen sicherzustellen.

Ist der Aufbau beendet, wird der Impaktor mit einer Kappe verschlossen und auf Dichtigkeit geprüft. Anschließend wird ein Fluss von 39 l/min (abweichend davon in der USP: 28,3 l/min) eingestellt, was bei einer Ausbringungsdauer von 6,15 s den geforderten 4 l Saugvolumen entspricht. Sind die Vorbereitungen abgeschlossen, werden ein Adapter sowie ein bestückter HH[®] eingesetzt und die Kapsel in die Kaskade ausgebracht. Dieser Vorgang wird insgesamt sechsmal (ein Kollektiv) durchgeführt, bevor die Prallplatten und der Filter getrennt voneinander mit Lösungsmittel abgespült werden. Zur Ermittlung der Gesamtbilanz werden neben SIP / Hightop und Präparator auch die ausgebrachten Kapseln ausgespült.

Alle Proben werden mittels HPLC vermessen und bezogen auf den Gehalt einer Kapsel ausgewertet [49].

Die mit dem ACI erreichte Partikelklassifizierung entspricht der durch Lungenpenetration bewirkten Auftrennung und basiert auf den aerodynamischen Teilchendurchmesser [50], der jeder Prallplatte eine definierte Trenngröße zuordnet (siehe Abb.3-7).

Dieses Klassifizierungskriterium ist erforderlich, da sich die geometrischen Abmessungen der Partikel nur aufwändig ermitteln lassen und es aufgrund variabler Dichte und Partikelform nicht ohne weiteres möglich ist, die aerodynamischen Dimensionen mit den physikalischen Größen zu korrelieren.

Definiert wird die eingesetzte aerodynamische Kenngröße als Durchmesser einer Kugel der Dichte 1 g/cm^3 (Normdichte), die in Luft ebenso schnell sinkt wie der zu klassifizierende Partikel. Auch die Kalibrierung des Anderson Kaskadenimpaktors erfolgt mit solchen „Normpartikeln“ (wie z.B. PMMA-Kügelchen) [51].

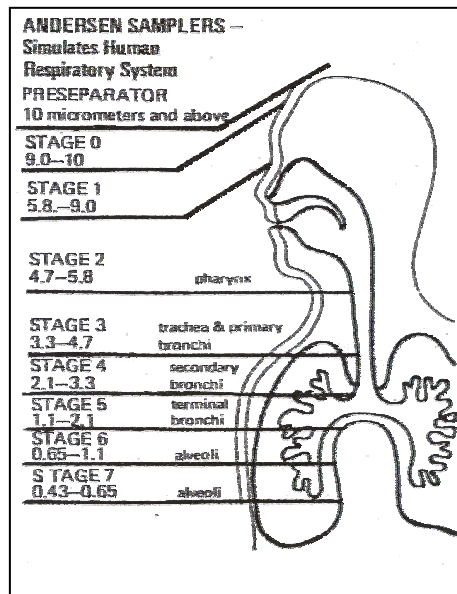


Abb.3-7 Vergleich der Trennstufen des ACI (28 l/min) und Lungenpenetration [47]

Jede der Impaktorstufen besteht prinzipiell aus Düsen und einer Prallplatte. Deshalb sind die Stufen des ACI so ausgelegt, dass sich auf den nachfolgenden Stufen von oben nach unten Partikel mit immer geringerer Trägheit niederschlagen (siehe Tabelle 3-1). Bestimmt wird diese Auftrennung sowohl durch die Trägheitseigenschaften der Teilchen unterschiedlicher Masse und Form als auch durch die im System herrschenden Kräfte (F_D ; F_G ; F_C) [52]. Das Trennprinzip des ACI beruht auf Impaktion:

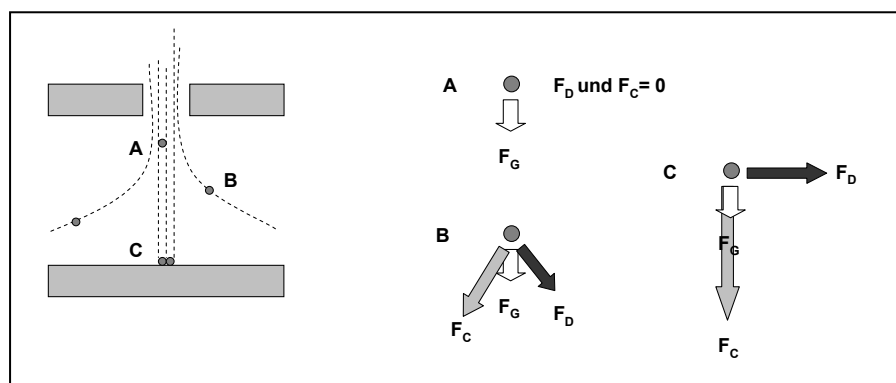


Abb.3-8 Schematische Darstellung des Impaktionsprinzips [52]; die Punkte A-C beschreiben die vorliegende Kräfteverteilung an verschiedenen Stellen des ACI.

Erreicht wird diese Klassifizierung über die Gas- und Partikelgeschwindigkeit in den Düsen (siehe Abb.3-8), welche durch eine Verringerung des Düsendurchmessers stetig ansteigen. Da die Partikel eine größere Trägheit als das Gas besitzen, können sie der umgelenkten Gasstromlinie nicht im gleichen Maße folgen (siehe C in Abb.3-8: $F_C > F_D$) und schlagen bei ausreichender Trägheit auf der entsprechenden Prallplatte nieder. Je kleiner die Partikel, desto besser folgen sie dem umgelenkten Gasstrom (siehe B in Abb.3-8) und scheiden sich auf tiefer liegenden Prallplatten ab. Nicht abgeschiedene Partikel sammeln sich auf einem Endfilter hinter der letzten Impaktionsstufe [51].

Tabelle 3-1 Charakterisierung der Trennstufen in Abhängigkeit des Volumenstroms

PP	Anzahl Düsen	Ø Düsen [cm]	Trennstufe [28,3 l/min]	Trennstufe [39,0 l/min]
0	96	0,2550	$\geq 9,0 \mu\text{m}$	7,7 – 8,5 μm
1	96	0,1887	5,8 – 9,0 μm	4,9 – 7,7 μm
2	400	0,0914	4,7 – 5,8 μm	4,0 – 4,9 μm
3	400	0,0711	3,3 – 4,7 μm	2,8 – 4,0 μm
4	400	0,0533	2,1 – 3,3 μm	1,8 – 2,8 μm
5	400	0,0343	1,1 – 2,1 μm	0,9 – 1,8 μm
6	400	0,0254	0,7 – 1,1 μm	0,6 – 0,9 μm
7	201	0,0254	0,4 – 0,7 μm	0,3 – 0,6 μm
Filter	---	0,2794	$< 0,4 \mu\text{m}$	$< 0,3 \mu\text{m}$

Über die folgende Formel werden die theoretischen Trenngrößen festgelegt. Dabei erfolgt eine Umrechnung der Trennstufen (dargestellt als Partikeldurchmesser = D_p) von 28,3 l/min (V_1) auf 39,0 l/min (V_2):

$$D_{p,2} = D_{p,1} \sqrt{V_1 / V_2}$$

Um neben den Trenngrößen auch die vorliegenden Strömungsverhältnisse – also laminar oder turbulent (siehe Abb.3-9) – zu charakterisieren, wird die der Trennstufe zugehörige Reynoldszahl (Re ; siehe Formel) ermittelt:

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\mu} = \frac{v \cdot d}{\nu} \quad \text{mit:} \quad \begin{aligned} \mu &= \nu \cdot \rho \\ v &= V / A_{\text{Düse gesamt}} \\ A_{\text{Düse gesamt}} &= N \cdot \pi \cdot r^2 \end{aligned}$$

Mit dieser dimensionslosen Kennzahl, die das Verhältnis zwischen Trägheits- und Zähigkeitskräften darstellt [53], ist eine Abschätzung der möglichen Teilchen-Deagglomeration im Kaskadenimpaktor möglich. Nur wenn turbulente Strömungen vorliegen ist eine Trennung der Teilchen zu erreichen. Im laminaren Bereich dagegen findet keine Separation statt.

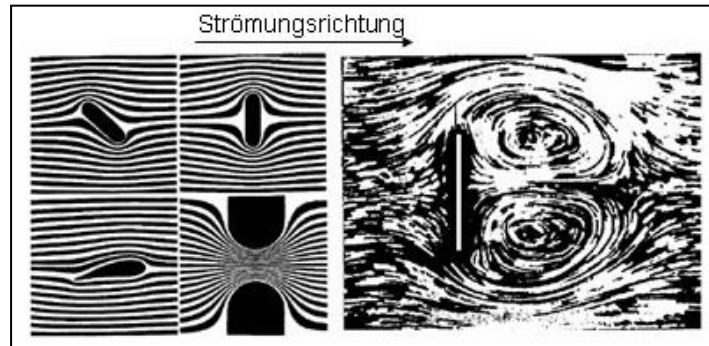


Abb.3-9 Darstellung von laminaren (links) und turbulenten (rechts) Strömungen [54]

Für die Rohrströmung der Düsen wird eine Reynoldszahl > 2320 (Re_{krit}) als kritisch betrachtet. Etwa ab diesem Wert wird eine bis dahin laminare Strömung anfällig gegen kleinste Störungen und verwandelt sich in eine turbulente Strömung. Um also einen Umschlag von einer laminaren in eine turbulente Strömung zu erreichen muss die als kritisch betrachtete Reynoldszahl (Re_{krit}) überschritten werden.

Tabelle 3-2 Reynolds-Zahlen für die einzelnen Stufen des Kaskadenimpaktors (berechnet) mit Berechnungsbeispiel

$$Re_{PP7} = \frac{v \cdot d}{\nu} = \frac{(V/A_{Düse\ gesamt}) \cdot d}{\nu} = \frac{(650\text{ cm}^3/\text{s} / 0,1018\text{ cm}^2) \cdot 0,0254\text{ cm}}{0,15\text{ cm}^2/\text{s}}$$

$$= \frac{162,18\text{ cm}^2/\text{s}}{0,15\text{ cm}^2/\text{s}} = 1081$$

PP	Düsen N	d [cm]	r [cm]	$A_{Düse\ gesamt}$ [cm ²]	v [cm/s]	Re
0	96	0,2550	0,1275	4,9028	132,58	225
1	96	0,1887	0,0944	2,6848	242,11	305
2	400	0,0914	0,0457	2,6245	247,67	151
3	400	0,0711	0,0356	1,5881	409,28	194
4	400	0,0533	0,0267	0,8925	728,30	259
5	400	0,0343	0,0172	0,3696	1758,63	402
6	400	0,0254	0,0127	0,2027	3206,98	543
7	201	0,0254	0,0127	0,1018	6382,05	1081

Wie der Tabelle 3-2 zu entnehmen, liegen die Strömungsverhältnisse im Kaskadenimpaktor eindeutig im laminaren Bereich. Damit muss die Trennung des Wirkstoffs sowohl von den „groben“ als auch von den „feinen“ Laktosepartikeln bereits beim Erreichen des Kaskadenimpaktors abgeschlossen sein. Eine Deagglomeration in diesem Bereich des Systems (SIP, Präseparator und ACI) ist nicht mehr möglich. Folglich müssen alle ablaufenden Trennprozesse bereits vorher stattgefunden haben (z.B. im HandiHaler®; berechnete $Re_{Kapselkammer} \sim 4000$).

3.2 Pulvercharakterisierung

Neben der aerodynamischen Charakterisierung nach Arzneibuch werden weitere Methoden zur Bewertung der Pulvermischungen herangezogen. Diese werden im Folgenden kurz dargestellt.

3.2.1 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung durch Laserbeugung

Die Laserbeugung ist eine schnelle und in der Routine übliche Methode zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung.

Grundlage dieses optischen Verfahrens ist die Beugung des Lichtes an Partikeln, wobei Größe und Form der Teilchen eine entscheidende Rolle auf die Stärke der Beugung haben. Abhängig von der Partikelgrößenverteilung entsteht dadurch eine radialsymmetrische Intensitätsverteilung, deren Ringintensität umgekehrt proportional zum Partikelradius ist. Winkel und Lichtintensität des gestreuten Lichtes geben Informationen über die Partikelgröße [55]. So streuen, wie in Abb.3-10 dargestellt, große Partikel das Licht in kleinen Winkeln mit hoher Intensität, wohingegen kleine Partikel das Licht in großen Winkeln mit niedriger Intensität streuen [56].

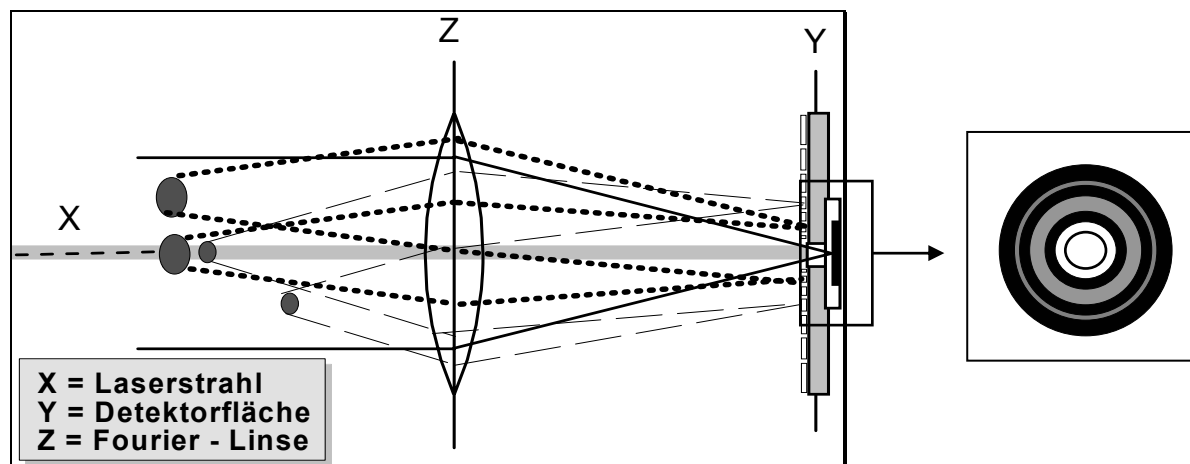


Abb.3-10 Schematische Darstellung des Strahlengangs (Fourier-Optik und Detektorelement) mit Beugungsspektrum von monodispersen Partikeln [55]

Das optische System besteht aus einem Helium-Neon-Laser ($\lambda = 633\text{nm}$), dessen Strahl mit einem Kollimator geweitet und der in seiner ungebeugten Form auf den Mittelpunkt des Detektors fokussiert wird. Die sich an den Strahlengang (Probenaufgabe) anschließende Fourier-Linse sorgt dafür, dass die Beugungsbilder unabhängig von der Teilchenposition im Messvolumen immer die gleiche Position auf dem Detektor einnehmen. Über den in der Brennebene der Fourier-Linse positionierten Detektor wird die Intensität des gebeugten Lichtes erfasst und in Form einer Volumenverteilung ausgewertet. Dabei erfolgt die Berechnung des Teilchendurchmessers über den Äquivalentdurchmesser einer volumengleichen Kugel.

Wichtigstes Kriterium bei der Bestimmung von Partikelgrößen ist es, die Individualität der zu erfassenden Teilchen sicherzustellen. Um dies zu erreichen, müssen die Partikel während der Messung in geeigneter Weise dispergiert werden.

Dazu wird in den meisten Fällen die Trockendispergierung (siehe Kapitel 4.2.2) eingesetzt, da das Dispergieren in Flüssigkeiten einige Probleme aufwirft, welche hauptsächlich auf die Wechselwirkung zwischen Dispergierflüssigkeit und Prüfsubstanz zurückzuführen sind. Es ist allerdings zu beachten, dass auch das Verfahren der Trockendispergierung Nachteile besitzt. So kann z.B. eine Primärkornzerstörung auftreten oder die Dispergierkräfte der Luft reichen nicht aus, um eine vollständige Deagglomeration sicherzustellen [57].

3.2.2 Darstellung der Oberflächenmorphologie /-beladung durch Rasterelektronenmikroskopie

Um eine deutlich höhere Vergrößerung als mit dem Lichtmikroskop zu erreichen, werden die Proben im Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet.

Hier wird die Bilderzeugung anstelle von Licht mit einem Elektronenstrahl erreicht, was eine Auflösung bis in den Nanometerbereich ermöglicht [58]. Dafür werden im Hochvakuum über thermische Emission Elektronen erzeugt und durch Hochspannung beschleunigt. Der daraus entstehende gebündelte Elektronenstrahl rastert die Probe punktförmig ab. Durch die Wechselwirkung der Primärelektronen mit den Probenatomen entstehen diverse Sekundärsignale (siehe Abb.3-11 und Tabelle 3-3), die analysiert und verarbeitet werden.

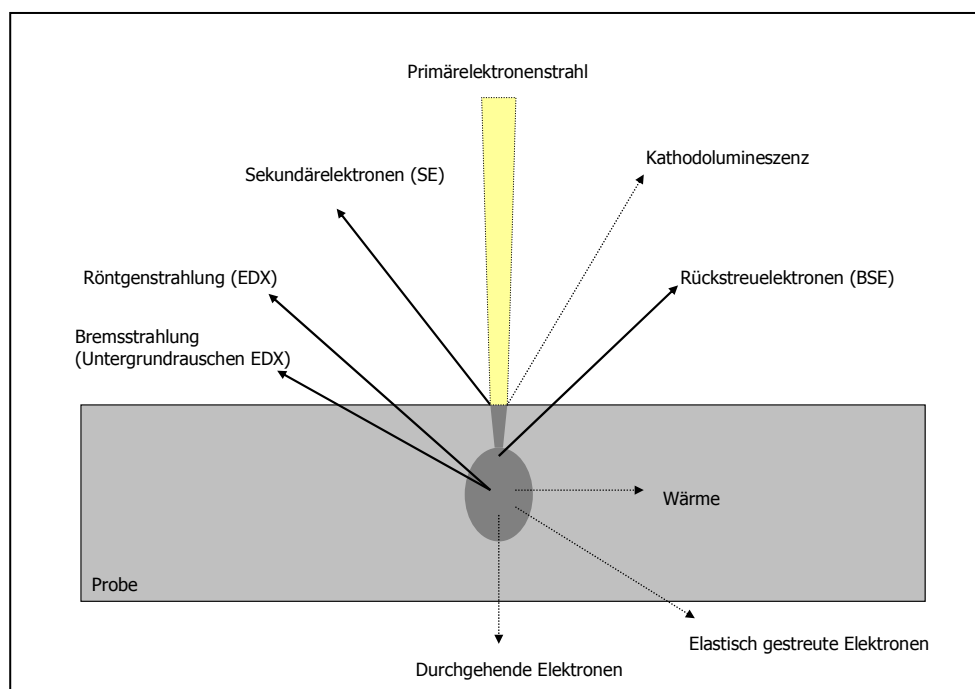


Abb.3-11 Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe (schematische Darstellung der Wechselwirkungskeule)

Da sich allerdings unter den vorliegenden Bedingungen (10 KV für ausreichende Auflösung) im herkömmlichen REM die isolierende Probe durch Elektronenabsorption aufladen kann, ist dieses Verfahren in der Regel nur bei leitfähigen Proben anwendbar. Nicht leitende Proben, wie die vorliegenden Pulver- und Kapselproben, können jedoch durch Sputtering (Kathodenzerstäubung) mit einer dünnen leitfähigen Schicht aus Edelmetall z.B. Gold, Platin überzogen und betrachtet werden [57]. Eine weitere Möglichkeit nicht leitende Proben zu betrachten, ist die Arbeit mit variablem Kammerdruck. Hier wird ein gewisser Gasanteil in der Kammer zugelassen und nicht wie üblicherweise im Hochvakuum gearbeitet. Die vorhandene Gasschicht ist gerade groß genug, um durch den Elektronenstrahl eine Ionisierung der Probe zu erreichen. Über einen speziellen Detektor werden die rückgestreuten Sekundärelektronen detektiert.

Tabelle 3-3 Übersicht der wichtigsten entstehenden Sekundärsignale

Rückstreuelektronen (BSE)	Primärelektronen, welche in die tieferen Probenschichten eindringen und dort ohne Energieverlust am Atomkern gestreut bzw. reflektiert werden. Je tiefer die Primärelektronen in die Probe eindringen, desto breiter verteilt treten die emittierten Elektronen (Rückstreuelektronen) wieder aus der Probe aus und liefern so ein unscharfes Bild. <i>Wie auch für alle anderen Sekundärsignale gilt: je höher die Ordnungszahl desto mehr Elektronen und damit heller der Kontrast.</i>
Sekundärelektronen (SE)	Dringen die Primärelektronen nur in die oberste Probenschicht ein und schlagen dort Elektronen heraus, entstehen Sekundärelektronen (SE1). Auch beim Austritt der Rückstreuelektronen aus der Probe werden Sekundärelektronen aus der obersten Schicht herausgeschlagen (SE2). Diese energiearmen Elektronen liefern eine hohe Ortsauflösung, was für topographische Aufnahmen von Oberflächen genutzt wird.
Röntgenstrahlung	Energiereiche Primärelektronen stoßen aus den kernnahen Schalen der Probenatome Elektronen heraus. Beim Wiederauffüllen dieser Lücken mit Elektronen kernferner Schalen entsteht eine Energiedifferenz, die für jedes Element abhängig von der Ordnungszahl charakteristisch ist. Damit ist die Identifizierung der Elementarzusammensetzung einer Probe (EDX) möglich [58;59].
Bremsstrahlung	Abgelenkte Primärstrahlen, die im EDX als Untergrundrauschen auftreten (2.Variante der Röntgenstrahlung)

Im Rahmen dieser Arbeit kommen zwei verschiedene Rasterelektronenmikroskope zum Einsatz, die sich durch die Wahl der Kathode unterscheiden.

Beim „konventionellen“ REM (10 KV) wird eine Wolframglühkathode auf eine hohe Temperatur geheizt. Dabei erhält ein Teil der frei beweglichen Elektronen genügend hohe kinetische Energie um das Metall zu verlassen. Diese freien Elektronen werden durch ein elektrisches Feld auf die Anode gesaugt und durch ein Loch in der Anode beschleunigt [60].

Das verwendete Feldemissions-REM (1 KV für gleiche Auflösung) besitzt eine thermische Feldemissionskathode (Schottky-Emitter) aus einem Wolframkristall mit Zirkonspitze. Hier entsteht in Abhängigkeit der Kathodentemperatur und der an der Spitze anliegenden Feldstärke ein stabiler Elektronenstrahl.

Für die topographischen Aufnahmen der Proben, wird ein SE-Detektor eingesetzt. Dagegen lassen sich mit einem BSE-Detektor die Materialkontraste innerhalb der Pulvermischung herausarbeiten. Anschließend wird die Probe mit einem EDX-Detektor untersucht, um die vorliegenden Kontraste bezüglich ihrer Elementarzusammensetzung direkt zu charakterisieren.

3.3 Beurteilung der inter-/ intrapartikulären Bindungskräfte durch Rasterkraftmikroskopie

Die Technik der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy = AFM) wurde Mitte der 80iger Jahre von dem Physiker Gerd Binnig entwickelt und 1986 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet [61].

Durch den Einsatz des Rasterkraftmikroskops wird es möglich neben der Topographie einer Probe auch Informationen über mechanische Eigenschaften wie Reibung, Adhäsion, elektrostatische und magnetische Wechselwirkungen bis in den Nanometerbereich zu ermitteln [62]. Dies geschieht über eine Messsonde, den Cantilever (engl. Balken), dessen Auslenkung infolge von Kraftwechselwirkungen beim Abrastern einer Probe durch ein optisches Detektionssystem vermessen wird. Umgesetzt wird der Vorgang des Abrasterns z.B. über einen Piezokristall, der meist als Probenträger eingesetzt wird. Durch Anlegen einer Spannung kann sich der Kristall sowohl in x-, y- (horizontal) als auch in z-Richtung (vertikal) ausdehnen und komprimieren [63;64].

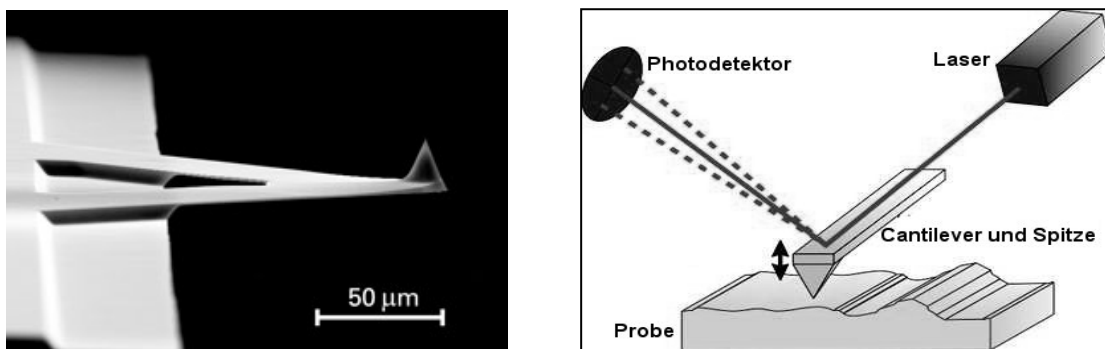


Abb.3-12 Cantilever mit Spitze und typischer Messaufbau [64]

Der Cantilever (siehe Abb.3-12), meist aus Siliciumoxynitrid oder Silicium, ist üblicherweise 100 – 400 µm lang, 40 µm dick und besitzt eine scharfe, kleine Spitze aus Silicium. Damit der Laserstrahl des optischen Detektionssystems reflektiert werden kann, wird die Rückseite des Cantilevers mit Gold beschichtet. Je nach Auslenkung des Cantilevers wird der auf die Rückseite fokussierte Laserstrahl in unterschiedlichen Winkeln reflektiert und trifft auf einen Photodetektor. Dieser positionssensitive Detektor aus vier-segmentigen Photodioden ermittelt die vorliegende Abweichung von der Totalreflektion („Lichtzeigerprinzip“), welche sich je nach Probenhöhe durch die unterschiedliche Auslenkung des Cantilevers ergibt [63]. Auf diese Weise werden zum einen die topographischen Aufnahmen der Oberflächenstrukturen erstellt.

Zum anderen wird der Auslenkungsgrad mit der entsprechenden Federkonstante des Cantilevers ($K_c = 0,01 - 0,2 \text{ N/mm}^2$) in die aufgewendete Kraft umgerechnet (Hook'sches Gesetz), wobei die Auslenkung des Cantilevers (Δz) proportional zur aufgewendeten Kraft (ΔF) ist.

$$\Delta z = \frac{\Delta F}{K_c}$$

Die Größe der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe wird durch die Art der vorliegenden Kräfte bestimmt (siehe Abb.3-14), wobei sich diese Kräfte näherungsweise durch das Lenard-Jones-Potential (Abb.3-13) beschreiben lassen [64].

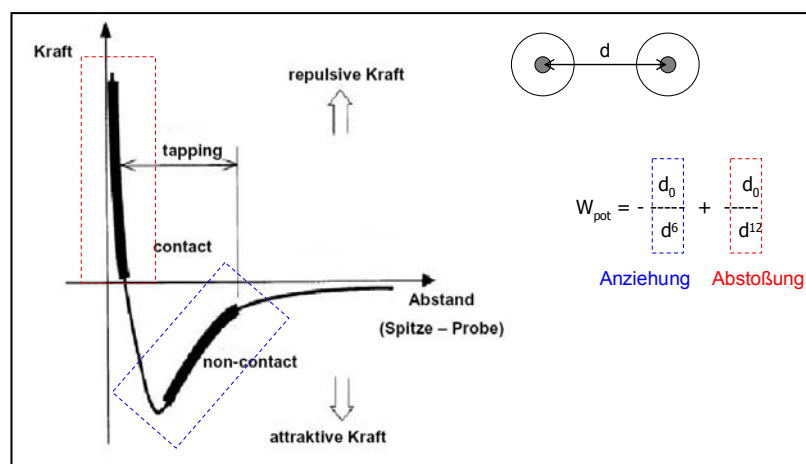


Abb.3-13 Messbereiche der verschiedenen Messmethoden [63;65]; Mit dem Lenard-Jones Potential werden anziehende und abstoßende Wechselwirkungen zwischen zwei Atomen beschrieben (Verlauf der potentiellen Energie)

Die dominantesten Kräfte im interatomaren Abstand sind die *repulsiven (energieerhöhenden) Kräfte*. Sie werden durch abstoßende Elektronenwolken ausgelöst, welche beginnen sich einander anzunähern und zu überlappen. Ab einem Abstand von 1 nm entstehen van-der-Waals-Kräfte (*attraktiv, energieerniedrigend*), die durch induzierte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze hervorgerufen werden.

Sowohl *repulsive* als auch *attraktive* Kräfte gehören zu den elektrostatischen Wechselwirkungen. Ausgelöst durch Ion-Ion-Wechselwirkung oder permanente Dipole besitzen sie eine extrem große Reichweite (10 – 100 μm) und sind in der Lage die kurzreichweitigen Kräfte (z.B. van-der-Waals-Kräfte) zu überdecken und die Messergebnisse zu verfälschen.

Noch stärker kann die Messung durch einen Wasserfilm verfälscht werden. Dabei bilden sich extrem stabile und starke Kapillarkräfte aus (Wasserstoffbrückenbindung), die zu einem schnellen Ansnappen der Spitze an die Probe führen und die real vorliegenden Kräfte überdecken. Durch Arbeiten im Vakuum kann die Ausbildung des „verfälschenden“ Wasserfilms über der Probe verhindert werden [66].

Da die Messspitze idealerweise nicht aus einem Atom besteht und auch benachbarte Atome innerhalb der Probe eine gewisse Anziehung auf den Cantilever ausüben, ist immer zu beachten, dass es sich bei den gemessenen Kräften nicht um Wechselwirkungen zwischen einzelnen Molekülen handelt [65].

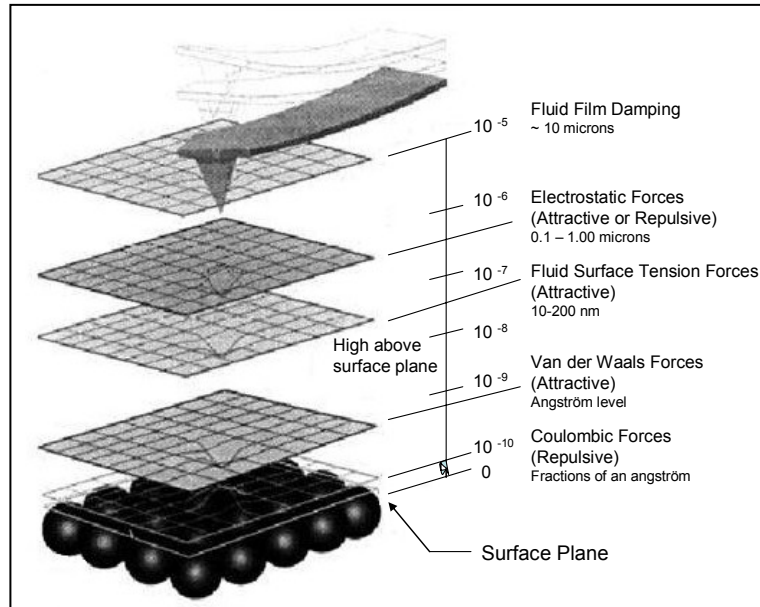


Abb. 3-14 Kräfte in der direkten Umgebung einer Oberfläche [66]

Zur Erfassung der Kräfte werden verschiedene Messmethoden unterschieden:

- **Tapping mode (intermittent contact-mode)**

Hier oszilliert der Cantilever nahe seiner Resonanzfrequenz, wobei die Amplitude der Schwingung größer sein muss als die Reichweite der Adhäsionskräfte (bis 100 nm). Ein Schleifen der Spitze über die Probe wird verhindert, was die zerstörenden Scherkräfte (lateral) deutlich reduziert. Auf diese Weise können sowohl repulsive als auch attraktive Kräfte gemessen werden [65;67].

- **Contact mode („repulsive mode“)**

In diesem Modus kann sowohl bei konstanter Höhe (constant height) als auch mit konstanter Kraft (constant force) gemessen werden. In jedem Fall aber stehen Probe und Spitze in direktem Kontakt (Berührung) zueinander. So werden die repulsiven Kräfte (z.B. Coulomb-Kräfte) gemessen, was sich im linken markierten Bereich des Lenard-Jones-Potentials widerspiegelt (siehe Abb.3-13). Durch den direkten Kontakt zwischen Spitze und Probe treten laterale Scherkräfte auf, die zur Zerstörung der Probe führen können [64;65;67].

- **Non-contact mode**

Die Spitze steht nicht im direkten Kontakt mit der Probe, sondern ist so weit entfernt, dass die attraktiven / adhäsiven van-der-Waals-Kräfte gemessen werden können (siehe Abb. 3-13). Der Cantilever detektiert dabei die vom Abstand zwischen Probe und Spitze abhängige Verschiebung der Resonanzfrequenz [63;64].

Unabhängig von der verwendeten Messmethode werden die Wechselwirkungen in den so genannten „Kraft-Distanzkurven“ (siehe Abb.3-15) dargestellt. Dazu wird das gemessene Signal der Photodiode (Kraft/nN) gegen die Ausdehnung des Piezokristalls aufgetragen (Abstand/ μm).

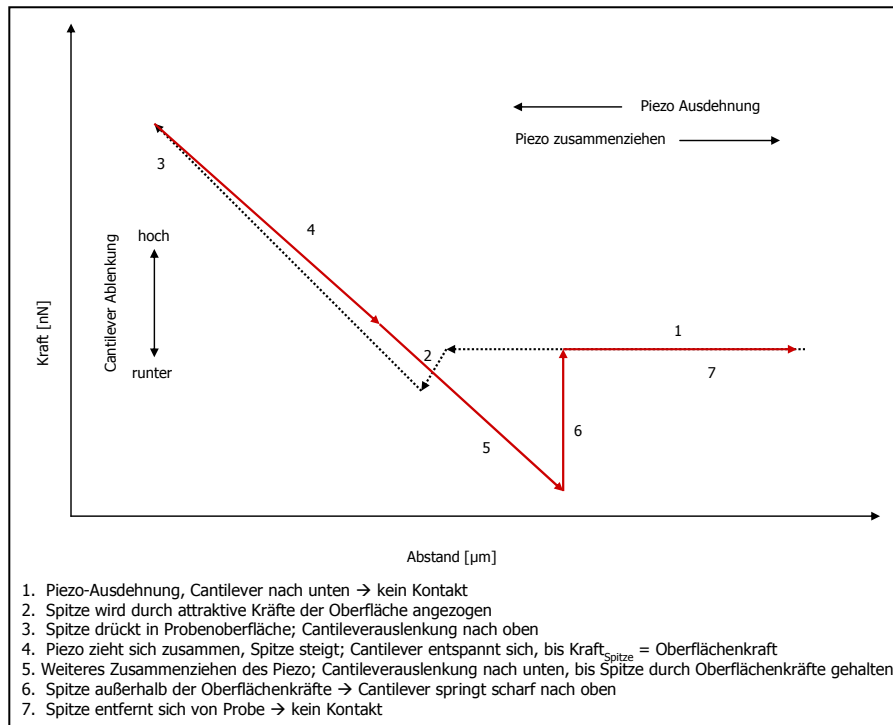
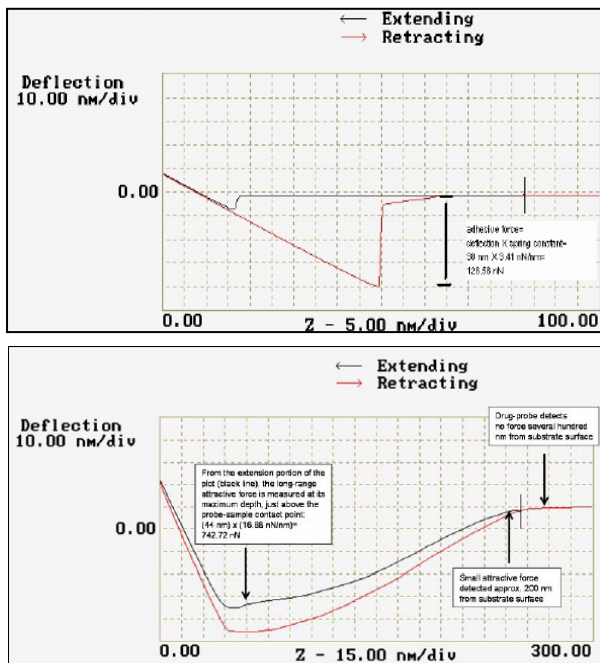


Abb.3-15 Beispiel einer Kraft-Distanzkurve: Abhängigkeit der wirkenden Kraft vom Abstand zwischen Probe und Spitze (rot = Annäherung von Cantilever und Probe; schwarz = Trennen von Cantilever und Probe)

Innerhalb dieser Diagramme kann, wie in Abb.3-16 dargestellt, zwischen elektrostatischer Wechselwirkung (lange Reichweite) und Adhäsionskräften (kurze Reichweite) unterschieden werden:



Zeigt die rote Kurve rechts vom Kontaktpunkt einen V-förmigen Ausschlag und bleibt die schwarze Kurve horizontal, liegen **Adhäsionskräfte** (*induzierte Dipole, kurze Reichweite* → $1/d^6$ z.B. *van-der-Waals-Kräfte*) vor

Weichen sowohl die rote als auch die schwarze Kurve rechts vom Kontaktpunkt nach unten ab, herrschen **elektrostatische Wechselwirkungen** (*Ion-Ion-Wechselwirkung, permanente Dipole, lange Reichweite* → $1/d$)

Abb.3-16 Beispiele für Kraft-Distanzkurven (x-Achse: Abstand, y-Achse: Kraft, z: Abstand zur Probe, wo maximale Kraft herrscht; extending = annähern; retracting = trennen) [68]

3.4 Herstellung interaktiver Pulvermischungen

Mischen beschreibt das möglichst gleichmäßige Verteilen verschiedener Komponenten ineinander. Die Mischungspartner werden durch Konvektion, Diffusion und Scherbewegung intensiv durchdrungen und streben den Zustand einer optimalen Zufalls Mischung an. Erst wenn der höchste Unordnungszustand - die höchste Entropie - erreicht ist, wird der Mischprozess beendet. Entspricht die Zusammensetzung jeder Teilmenge der geforderten Gesamtzusammensetzung, ist die Mischung homogen [69;70].

Als ideal wird eine Mischung bezeichnet, wenn die Partikel einer Komponente nur von Teilchen der anderen Komponente umgeben sind [69;70]. Dieser Fall ist allerdings mit den herkömmlichen Mischprozessen und vor allem mit den unterschiedlichen Komponenten einer inhalativen Pulvermischung nicht zu realisieren. Hier spricht man von einer geordneten Mischung: kleine Wirkstoffpartikel beladen („coaten“) die Oberfläche der großen „groben“ Partikel (siehe Abb.3-17).

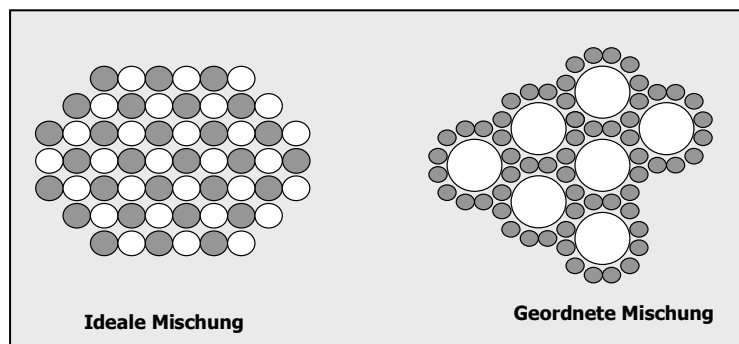


Abb.3-17 Schematische Darstellung einer idealen und einer geordneten Mischung

Da der aerodynamische Durchmesser der Wirkstoffpartikel zwischen 1 – 5 μm liegen muss, um den Wirkort in der Lunge zu erreichen birgt die Herstellung der Pulvermischungen einige Probleme.

Bedingt durch den Mikronisierungsprozess werden die Teilchen stark elektrostatisch aufgeladen, was die Agglomeratbildung fördert und die Fließeigenschaften drastisch verschlechtert (siehe Kapitel 1.1) [1;4]. In Kombination mit der extrem geringen Dosierung (z.B. 40 μg Ipratropiumbromid / Dosis) wird ein genaues Abteilen des Pulvers als Monokomponente unmöglich.

Mischt man die Wirkstoffpartikel mit einem groben, möglichst inerten Trägermaterial (z.B. Laktose oder Glucose) lassen sich diese Probleme umgehen. Sowohl Dosiergenauigkeit als auch Fließverhalten der Pulvermischung werden verbessert. Auch die Agglomeratbildung der feinen Wirkstoffteilchen wird unterbunden, da diese nun an der Oberfläche des Trägers adhären (geordnete Mischung) und während der Inhalation durch die Scherkräfte wieder abgelöst werden (siehe Kapitel 1.1) [1;4]. Diese Aspekte sind entscheidend für die Auswahl des Mischverfahrens, um die Bildung einer optimalen Mischung sicherzustellen und ein Entmischen der verschiedenen Komponenten (z.B. Flotieren des Feinanteils) zu unterbinden.

Ein geeignetes Verfahren zur Herstellung von interaktiven Pulvermischungen ist zum Beispiel das in der Arbeit eingesetzte „Schicht-Sieb-Misch-Verfahren“, welches in der Literatur [30] häufig auch als „Sandwich-Verfahren“ bezeichnet wird. Hier führt das abwechselnde Einarbeiten der verschiedenen Komponenten bereits im Vorfeld zu einer gleichmäßigeren Verteilung der unterschiedlich großen Partikel. Weiterhin zerstört der Siebschritt die Agglomerate der feinen Partikel, was den Teilchen ermöglicht sich an die Oberflächen der groben Partikel zu binden.

Auf diese Weise werden sowohl die Funktion des Trägers, nämlich die Agglomeratbildung des Wirkstoffs zu unterbinden als auch das Entstehen einer geordneten Mischung bewusst gefördert [71;72].

Neben dem Einfluss auf die Mikronisat-Eigenschaften wirken sich die Sieb-/ Mahlschritte auch auf die Merkmale des groben Trägermaterials aus. So werden durch die Belastung während des Mischprozesses zusätzliche Kristalldefekte erzeugt, die sich durch eine deutlich höhere Oberflächenenergie auszeichnen (siehe Abb.3-18). Die Ausbildung aktiver, starker Bindungsstellen am Träger – so genannte „HOT-SPOTS“ wird deutlich gefördert. Alle kristallinen Stellen mit geringerer Energie bezeichnet man als „passive Stellen“ [1].

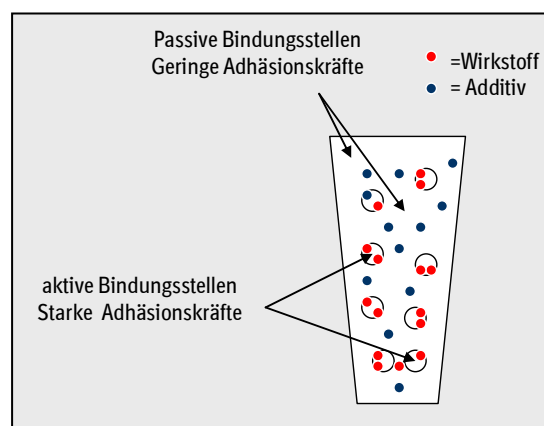


Abb.3-18 Schematische Darstellung der Bindungsplätze eines Trägerpartikels

In binären Mischungen binden bevorzugt mikronisierte Wirkstoffpartikel an diese „aktiven Stellen“ (meist Spalten und Unebenheiten auf der Partikeloberfläche).

Liegen nur geringe Wirkstoffmengen vor (wie z.B. in diesem Fall 0,7% Ipratropiumbromid), belegt der größte Anteil des Wirkstoffs die vorhandenen „HOT-SPOTS“ und wird so stark gebunden, dass die Scherkräfte während der Inhalation nicht ausreichen um die Bindung aufzuheben. Daraus ergibt sich eine deutliche Reduktion des inhalierbaren Anteils, denn die Wirkstoff-Träger-Komplexe schlagen sich aufgrund der Partikelgröße bereits im Rachenraum nieder [27].

Um dies zu verhindern und die aerodynamischen Eigenschaften der Pulvermischung zu verbessern, setzt man der binären Mischung ein feines, ebenfalls inertes Additiv zu – z.B. mikronisierte Lactose oder Magnesiumstearat - und erhält eine ternäre Mischung (siehe Abb. 3-19). Hauptfunktion des Additivs ist dabei die „Absättigung“ der starken Bindungsplätze und das Füllen aller Poren und Unebenheiten.

Auf diese Weise soll die Anzahl der „HOT-SPOTS“ bzw. die Stärke der Adhäsionskräfte reduziert und der Wirkstoffanteil an den passiven Bindungsstellen gesteigert werden, was die Abtrennung während der Inhalation erleichtert [16;25;27;31].

Basierend auf diesen Überlegungen kann die Mischreihenfolge der drei Komponenten Träger – Additiv – Wirkstoff gezielt eingesetzt werden, um die Beladung der „HOT-SPOTS“ und damit die Höhe des inhalierbaren Anteils zu steuern [25].

Mischt man zum Beispiel erst den feinen Hilfsstoff mit dem groben Träger, werden Hilfsstoff-Agglomerate zerstört und die „aktiven Stellen“ mit einem Film aus feinem Additiv überzogen. Der im zweiten Mischgang zugesetzte Wirkstoff belegt dann hauptsächlich die passiven Stellen und kann während der Inhalation besser dispergiert werden [1;31].

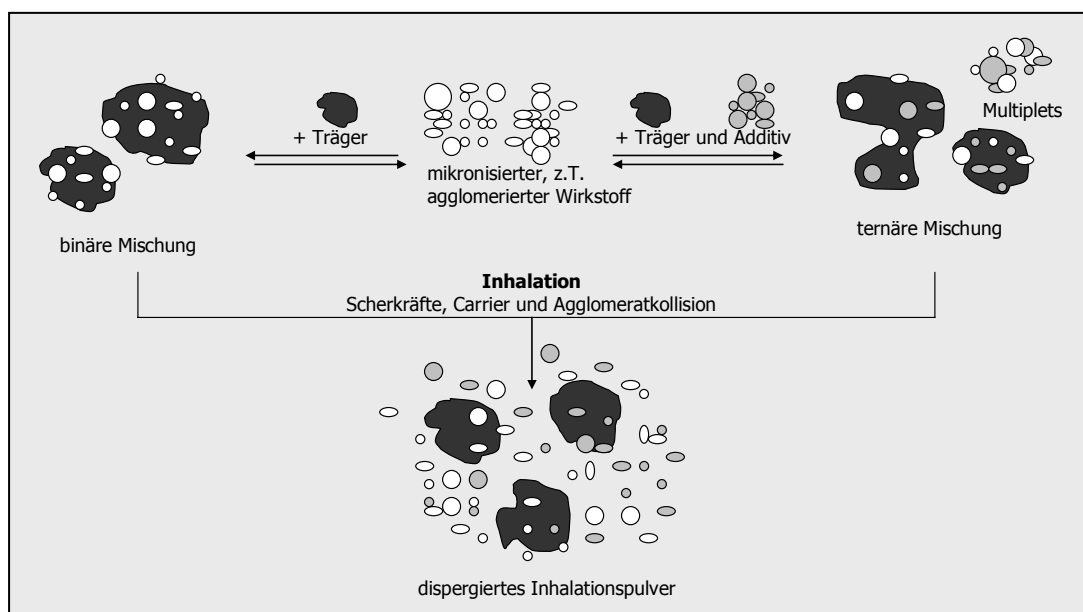


Abb.3-19 Herstellung von pulverförmigen Inhalativa – verschiedene Ansatzmöglichkeiten (binäre und ternäre Mischung)

Neben dem Überziehen des Trägerpartikels und der Ausbildung eines Schutzfilms kommt dem zugesetzten Feinanteil noch eine weitere Funktion zu, welche ebenfalls in der Literatur beschrieben wird [16;19]:

Zusammen mit den feinen Wirkstoffpartikeln bildet das Additiv so genannte „Multiplets“: Agglomerate feiner Partikel. Da die interpartikulären Kräfte zwischen den nahezu gleichgroßen Partikeln viel geringer sind als zwischen den „kleinen“ Wirkstoffpartikeln und den „großen“ Trägerteilchen, werden diese „Multiplets“ viel besser dispergiert als die Wirkstoff-Träger-Komplexe [16]. Daraus resultiert ein weiterer positiver Effekt auf die aerodynamischen Eigenschaften der Pulvermischung.

Wie genau sich verschiedene Mischvarianten und die dabei verwendeten Additivmengen auf die inhalierbare Fraktion des Wirkstoffs auswirken, ist Teil der zentralen Fragestellung und wird in den Kapiteln 6 und 7 ausführlich bewertet und diskutiert.

4 Materialien & Methoden

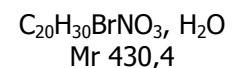
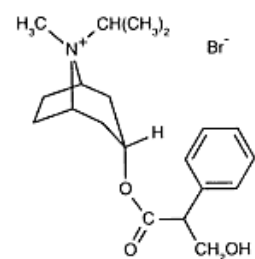
4.1 Materialien

Alle benötigten Ausgangsmaterialien wurden von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG zur Verfügung gestellt.

4.1.1 Wirkstoffe

Ipratropiumbromid

Das weiße kristalline Pulver ist in Wasser und geringfügig in Alkohol [73] löslich. Zur Verwendung in pulverförmigen Inhalativa werden die weißen Kristalle durch Luftstrahlmahlung auf eine definierte Größe von etwa 5 µm zerkleinert. Anwendung findet das quartäre Atropinderivat als Anticholinergikum zur Vorbeugung und Behandlung von Atemnot bei Asthma bronchiale und obstruktiven Atemwegserkrankungen [74].



4.1.2 Trägermaterialien

Laktose (Milchzucker)

Das weiße kristalline Pulver ist langsam löslich in Wasser und praktisch unlöslich in EtOH (96 %) [75]. Als natürlich vorkommendes, reduzierendes Dissaccharid kommt Laktose nur in der Milch von Säugetieren vor und besteht, chemisch gesehen, aus je einem Molekül D-Glucose und D-Galaktose (β -1,4 glykosidisch verknüpft). Dabei kann das Dissaccharid in den beiden anomeren Formen α und β vorliegen [76], wobei die in der Pharmazie gebräuchlichste Form das α -Laktose Monohydrat ist.

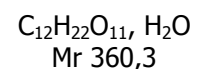
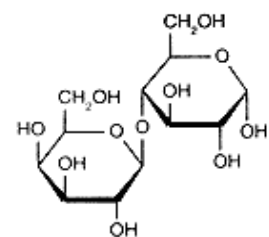


Tabelle 4-1 Übersicht der verwendeten Laktose-Qualitäten

Qualität	Beschreibung
200M Pharmatose®	gemahlen; mittlere Partikelgröße 40 µm
325M Respitose® (zur Inhalation)	gesiebt; mittlere Partikelgröße 65 µm
Laktose mikronisiert	mittlere Partikelgröße 5-10 µm

Alle in dieser Arbeit verwendeten verschiedenen Qualitäten der Firma DMV International (Veghel, Niederlande) entsprechen den Anforderungen der Pharmacopoen.

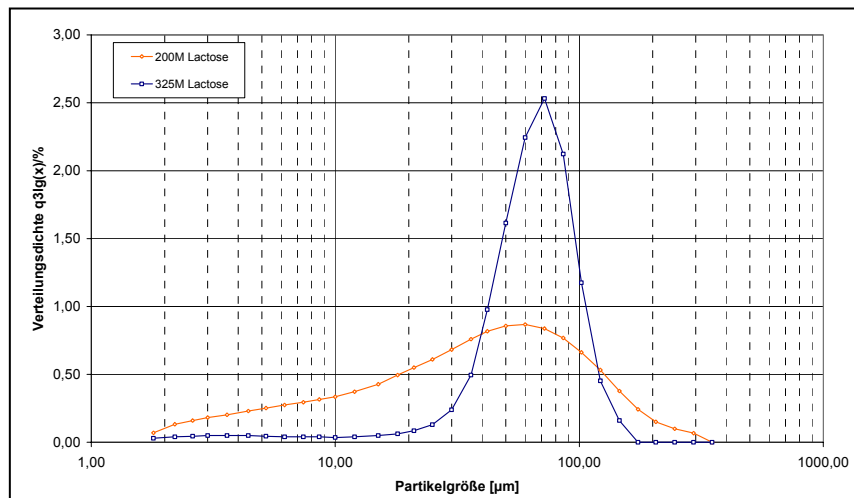


Abb.4-1 Vergleichende Darstellung der Partikelgrößenverteilung der beiden Trägermaterialien (Verteilungsdichte)

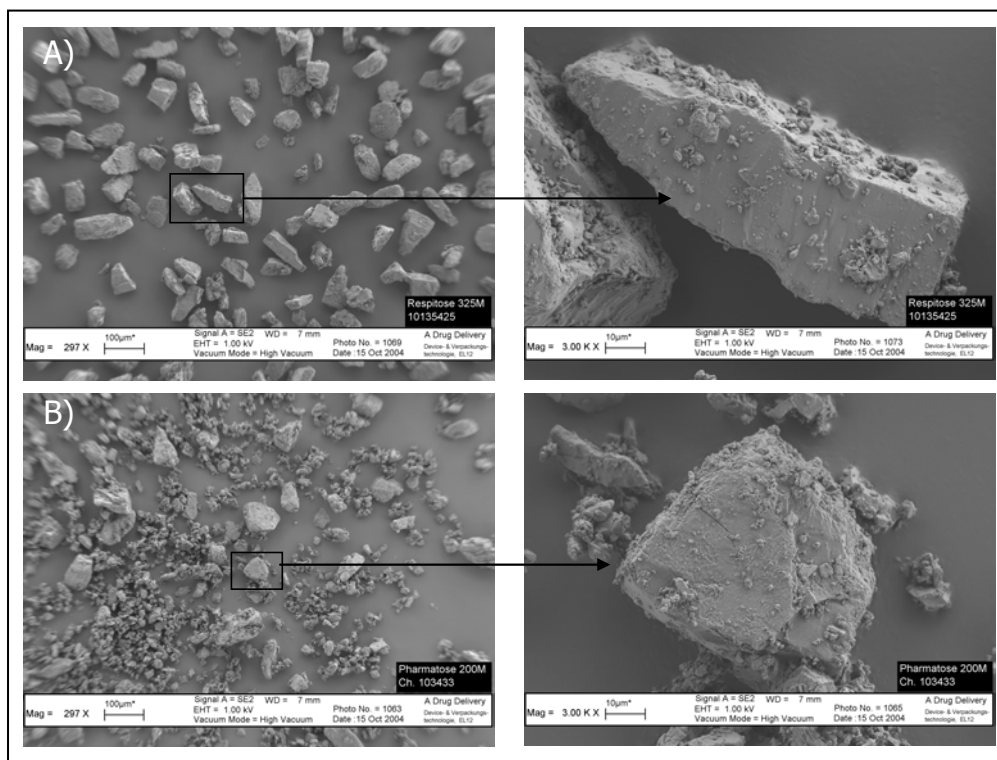


Abb.4-2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Träger A) 325M Respiritose® und B) 200M Pharmatose®

4.1.3 Kapselmaterialien

Gelatine-Kapseln (Rezeptur BI[®]; Capsugel, Bornem, Belgien)

Die türkisfarbenen Kapseln haben laut Hersteller einen Wassergehalt von etwa 14%. Ihre inhomogene, klebrige und reaktive Innenoberfläche zeichnet sich durch zahlreiche Krater, Tröpfchen und „schuppige“ Areale aus. Wie in Abb.4-3 zu erkennen, können diese Strukturen unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Ausgelöst durch die unterschiedlich starke Ausprägung der Strukturen treten sowohl Schwankungen zwischen verschiedenen Chargen (Interchargenvariabilität) als auch innerhalb einer Charge auf (Intrachargenvariabilität).

PE-Kapseln (RPC Formatec GmbH & Co KG, Mellerichstadt, Deutschland)

Die transparenten Kapseln aus Polyethylen zeichnen sich im Vergleich zu den Gelatine-Kapseln durch eine homogene, glatte und damit weitestgehend inerte Innenoberfläche aus (siehe Abb.4-3). Der Wassergehalt liegt bei $< 0,1\%$. Es sind keine signifikanten Schwankungen bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit festzustellen (keine nachweisbare Intra- / Interchargenvariabilität).

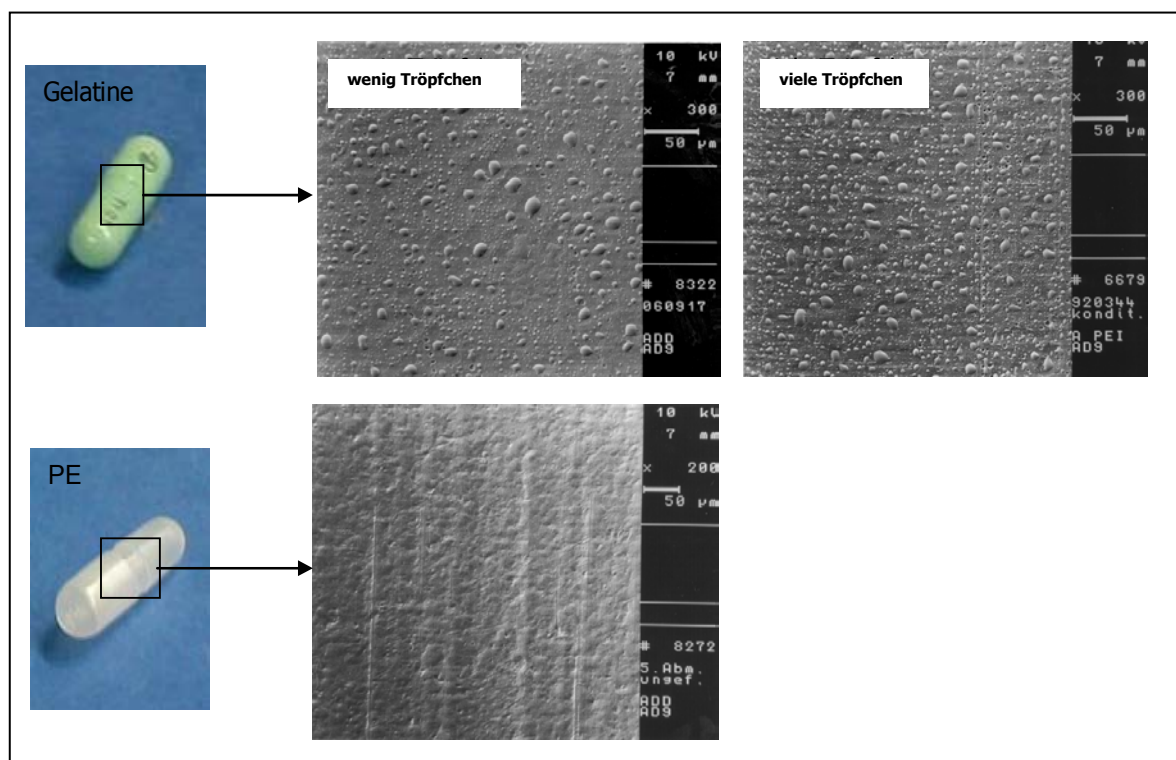


Abb.4-3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Innenseiten von Gelatine-Kapseln (starke Heterogenität \rightarrow Tröpfchenbeladung führt zur Intra-/ Interchargenvariabilität) und PE-Kapseln (gleichmäßige Oberflächenbeschaffenheit)

4.1.4 Chemikalien & Reagenzien

- Chemikalien

Wasser (MilliQ, Academic A10)	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Acetonitril (HPLC grade)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Brij 35 [®]	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycerol (extra rein DAB) 99%	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Ethanol, absolut	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
HCl 1mol/l	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
Ipratropiumbromid Referenzsubstanz	Boehringer Ingelheim GmbH & Co KG, Deutschland
Cyclohexan 99% reinst	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Span [®] 85 zur Synthese	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-1-heptansulfonsäure-Monohydrat	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
o-Phosphorsäure	Fluka, Deisenhofen, Deutschland

- Dispersionsmedium (Nassdispersion)

Cyclohexan 99% mit 0,25% Span[®] 85.

- Lösungsmittel I (0,01N HCl)

10 ml HCl 1mol/l werden ad 1000 ml mit Wasser (MilliQ) versetzt und gemischt.

- Lösungsmittel II (EtOH/Wasser 50:50)

1000 ml Ethanol werden mit 1000 ml Wasser (MilliQ) versetzt und gemischt.

- Fließmittel I (Eluent Laktose)

800 ml Acetonitril werden mit 200 ml Wasser (MilliQ) versetzt und gemischt.

- Fließmittel II (Eluent Ipratropiumbromid)

8,75 g Na-Heptansulfonsäure-Monohydrat werden in 3500 ml Wasser (MilliQ) gelöst und anschließend mit o-Phosphorsäure auf pH 3,20 eingestellt; Diese Pufferlösung wird mit 1610 ml ACN versetzt und gemischt.

- Coating Reagenz

Im Ultraschallbad werden 3 g Brij 35[®] in 20 ml absoluten Ethanol gelöst. 1 ml der daraus resultierenden Lösung wird in 5 g Glycerol gelöst.

- Brij-Blindlösung:

0,5 ml Coating-Reagenz werden ad 100 ml mit LM I / II verdünnt.

- Standard-Lösung Ipratropiumbromid

Stammlösung: 21 mg Ipratropiumbromid werden in einen Messkolben eingewogen und in 100,0 ml LM I / II gelöst.

Verdünnung A: 5,0 ml Stammlösung werden mit LM I / II auf 500,0 ml verdünnt.

- **Standard-Lösungen Laktose**
 - Ausgebrachte Dosis* 50 mg Laktose werden in 50,00 ml LM II gelöst.
 - Aerodynamischer Feinanteil* 250 mg Laktose werden in 50,00 ml LM I gelöst.

- **Probelösungen zur Validierung**

<i>Ausgebrachte Dosis</i>	Linearität	Verdünnungsreihe der Standard-Lösung (Bereich: 0,1 mg/ml – 0,35 mg/ml)
	Stabilität, Richtigkeit, Präzision	1,00 ml Ipratropiumbromid Stammlösung + 5,00 ml Laktose-Standard ad 100,00 ml.
<i>Aerodynamischer Feinanteil</i>	Linearität	Verdünnungsreihe der Standard-Lösung (Bereich: 0,01 mg/ml – 0,1 mg/ml).
	Stabilität, Richtigkeit, Präzision	1,00 ml / 10,00 ml Stammlösung Laktose + 1,00 ml Verdünnung A / Brij-Blindwert.

4.1.5 Verpackungsmaterialien / Device

- **Verpackungsmaterialien**

Polybeutel klein / mittel / groß

Twist-off Glas 200ml

Schnappdeckelgläschen

Alubeutel verschiedener Größen

Glasröhrchen mit Deckel (für Einzelkapseln)

Kunststoffreagenzgläser mit Verschluss

HandiHaler®



Abb.4-4 HandiHaler® (geöffnet)

4.2 Methoden – experimenteller Teil

4.2.1 Herstellung von inhalativen Pulversystemen

Herstellung der Pulvermischungen

Im Rahmen der Dissertation werden alle Formulierungen aus denselben Ausgangsmaterialchargen hergestellt (siehe Tabelle 4-2).

Die Pulvermischungen (Ansatzgröße: jeweils 250 g) werden nach dem Sieb-Misch-Verfahren hergestellt (siehe Abb.4-5). Dazu werden nach dem Abwiegen (LA 6200S / Analytic A200S Sartorius, Göttingen, Deutschland) alle Komponenten abwechselnd

portionsweise mit einem Handsieb der Maschengröße 0,315 mm in eine Schüssel gesiebt, anschließend in ein Mischglas umgefüllt (max. zur Hälfte gefüllt) und für 30 Minuten (900 UpM) im Turbula-Mischer T2C (Willi A Bachofen AG Maschinenfabrik Basel, Schweiz) gemischt.

Das Prinzip des Turbulamischers beruht auf Rotation, Translation und Inversion in dreidimensionaler Bewegung. Dazu wird das Mischgut während des Mischprozesses wechselweise vertauschend, rhythmisch pulsierenden Bewegungen unterworfen [77]. Um die Homogenität sicherzustellen, wird der Sieb-Misch-Vorgang wiederholt.

Tabelle 4-2 Übersicht der eingesetzten Ausgangsmaterialien

Material	Charge	Beschreibung
200M Laktose Monohydrat	103433	Mittlere Partikelgröße 40 µm (gemahlen)
325M Laktose Monohydrat	10135425	Mittlere Partikelgröße 65 µm (gesiebt)
5 µm Laktose Monohydrat	394114	Mikronisiert
Ipratropiumbromid Monohydrat	1010548	Mikronisiert
Polyethylenkapsel	3C0264	Transparent, Wassergehalt < 0,1%
Gelatine-Kapsel	3U0040 4U0030	Türkis, Wassergehalt 14%

Mit den in Tabelle 4-3 beschriebenen Kombinationen werden die Einflüsse der Faktoren *Trägerlaktose*, *Mischreihenfolge* und *Menge Feinanteil* auf die aerodynamischen Eigenschaften der Pulvermischung evaluiert und bewertet. Um die Auswirkungen der Faktoren unabhängig vom *Kapselmaterial* zu betrachten bzw. einen Einfluss des Kapselmaterials aufzuzeigen, erfolgt die Abfüllung der 12 Mischungen sowohl in die „klassischen“ Gelatine-Kapseln als auch in die „inerten“ PE-Kapseln (siehe Abb.4-3). Damit ergeben sich 24 mögliche Kombinationen aus Pulvermischung und Kapselmaterial, die im Folgenden untersucht werden.

Tabelle 4-3 Zusammensetzung der Pulvermischungen (40 µg Ipratropiumbromid/ 5,5 mg abgeteilte Dosis) Mischvarianten A / B / C

Komponente	Charge	0% Additiv [mg/KPI]	2,5% Additiv [mg/KPI]	5% Additiv [mg/KPI]
Ipratropiumbromid, 5µm	1010548	0,0417	0,0417	0,0417
Laktose, 5µm	394114	---	0,1375	0,275
200M Laktose	103433	5,4583	5,3208	5,1833
325M Laktose	10135425	5,4583	5,3208	5,1833
Inhalationspulver		5,50	5,50	5,50
Codierung		200A_0 325A_0	200A/B_2,5 325A/B/C_2,5	200A/B_5 325A/B/C_5

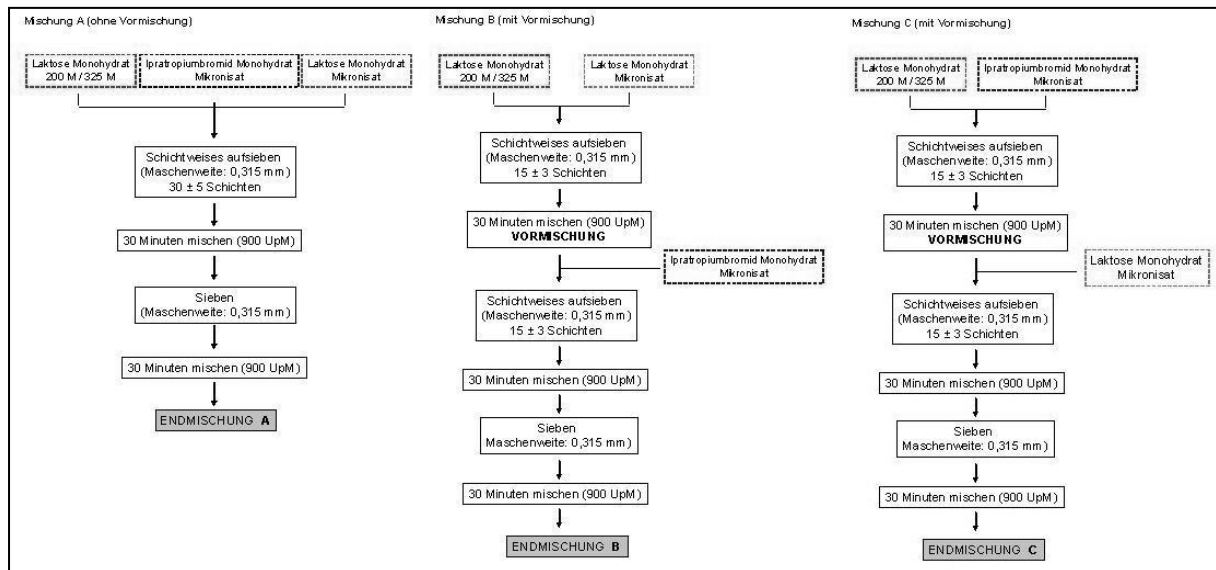


Abb.4-5 Fließdiagramme der unterschiedlichen Mischvarianten A (ohne Vormischung), B (mit Träger (grob/fein)-Vormischung) und C (mit Träger (grob) -Wirkstoff-Vormischung)

Homogenität der Pulvermischung

Um die Gleichförmigkeit der Pulvermischung zu überprüfen werden mittels Stechheber (Anfertigung der Werkstatt BI) an verschiedenen Stellen des Mischbehälters 10 Muster (max. 16,5 mg) entnommen, in einen 25,00 ml Messkolben überführt und mit LM I bis zur Markierung aufgefüllt. Die Gehaltsbestimmung erfolgt gemäß dem aktuell gültigen analytischen Verfahren zur Bestimmung der Homogenität von Pulvermischungen (siehe Tabelle 4-4). Zur Auswertung wird die Software Millenium 3.20 (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) verwendet.

Die Mischungen gelten als homogen, wenn die ermittelten Werte im Bereich von 34-46 µg liegen ($\pm 15\%$ vom Sollwert) und der VK ($n=10$) $\leq 6,0\%$ ist.

Tabelle 4-4 Chromatographische Bedingungen zur Überprüfung der Wirkstoffhomogenität

Säule:	LiChrospher 60RP Select B 125x4 mm, 5 µm Merck, Darmstadt, Deutschland)
Detektion:	UV bei 210 nm (2996 PDA mit 2695 Separation modul, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland)
Säulentemperatur:	25°C
Durchfluss:	2,0 ml/min
Injektionsvolumen:	100 µl
Mobile Phase:	1000 ml Pufferlösung (Wasser + 2,5 g Natrium-1-Heptansulfonsäure Monohydrat mit 0,05 M o-Phosphorsäure auf pH 3,2) mit 270 ml ACN

Kapselabfüllung

Mit einem Stampfvolumeter (J. Engelmanns AG Ludwigshafen, Deutschland) wird aus Teilen der Pulvermischung ein gleichmäßiges Pulverbett erzeugt. Aus diesem werden mittels Stechheber Pulvermengen im Bereich von $5,5 \text{ mg} \pm 5 \%$ entnommen, in die jeweiligen Kapseln gefüllt und genau gewogen (Mettler Toledo AT 261; Giessen, Deutschland).

Dabei werden für die Bestimmung der ausgebrachten Dosis (DD) die genauen Einzelwerte der Kapseln dokumentiert, wohingegen für die Bestimmung des aerodynamischen Feinanteils (PSD) jeweils die mittlere Einwaage des Kollektivs ($n=6$) festgehalten wird. Die Einzelkapseln (DD) werden einzeln in kleinen Glasröhrchen mit Deckel aufbewahrt, während die einzelnen Kollektive (PSD) in Schnappdeckelgläsern gelagert werden.

4.2.2 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung durch Laserbeugung

Trockendispergierung (RODOS)

Sowohl die Trägerlaktosen, als auch die hergestellten Pulvermischungen werden mit einem Laserbeugungsspektrometer HELOS H0925 (SympaTec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) mittels RODOS-Einheit (Trockendispergierer und Falltrichter) analysiert, um die Partikelgrößenverteilung zu ermitteln (siehe Tabelle 4-5).

Die Proben werden dazu über eine VIBRI-Schwingrinne in den optischen Lichttunnel eingebracht und durch komprimierte Luft beschleunigt.

Tabelle 4-5 Messparameter der Laserbeugung bei Trockendispergierung – Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der Pulvermischung

Messbereich:	R4 (0,5 / 1,8...350 μm)
Probenmenge:	500 mg
Dispergierdruck:	3,0 bar
Unterdruck:	Maximal (-85 bis -90 bar)
Produktzufuhr:	VIBRI (Schwingrinnendosierer) 40 % Förderrate; 2,0 mm Förderhöhe; Standardmethode
Auswertemodus:	Windoxs Version 4.1.2.0
Messzeit:	10 s
Start/Stopbedingungen:	Kanal 31 $\geq 1,0 \%$ und Kanal 31 $\leq 1,0 \%$
Optisches System:	Helium-Neon-Laser ($\lambda=633 \text{ nm}$)

Nassdispergierung (Partikelgrößenverteilung des Kapselrests)

Mit dieser Methode wird die Partikelgröße des nach Ausbringung in der Kapsel zurückbleibenden Pulvers bestimmt.

Vor Beginn der Messreihe wurde die Anzahl der ausgebrachten Kapseln evaluiert, welche benötigt wird, um ein detektierbares Signal zu erhalten. Basierend auf dieser Evaluierung werden für jede Probe 6 Kapseln entsprechend aufgearbeitet. Als Referenzwert wird vor jeder Probelösung ein Blindwert (40 ml Cyclohexan + 0,25 % Span[®] 85) ermittelt. Anschließend werden 5 ml des Dispersionsmediums aus der Küvette entnommen und zum Ausspülen der Kapseln ($n = 6$) verwendet, wobei der Spülvorgang direkt in die Küvette erfolgt. Zur vollständigen Desagglomeration der Laktose wird die Probelösung erst für 5 Minuten mit Ultraschall behandelt und anschließend nach einer Pause von 3 Minuten in einer Doppelbestimmung vermessen (siehe Tabelle 4-6). Die jeweils 120 Kapseln einer Kombination ($n=20$ Proben) werden in TWO-Gläsern aufbewahrt.

Tabelle 4-6 Messparameter der Laserbeugung bei Nassdispergierung – Bestimmung der Partikelgrößenverteilung des Kapselrests

Messbereich:	R4 (0,5/1,8...350 μm)
Ultraschallstärke:	50 %
Ultraschalldauer:	300 s
Wartezeit:	180 s
Medium:	Cyclohexan + 0,25 % Span [®] 85
Rührerdrehzahl:	1200 UpM
Messzeit:	10,2 s
Start/Stopbedingungen:	Kanal 31 \geq 1,0 % und Kanal 31 \leq 1,0 %
Auswertemodus:	Windoxs Version 4.1.2.0
Optisches System:	Helium-Neon-Laser ($\lambda=633$ nm)

4.2.3 Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften

Ausgebrachte Dosis (DD)

Die Aufarbeitung erfolgt in Anlehnung an das aktuell gültige analytische Verfahren [47]. Dabei wird jeweils eine Kapsel in das entsprechende Dosis-Sammelrohr (= Tube; Eigenanfertigung der Werkstatt BI) an der Steuerwand (39 l/min) ausgebracht und das Sammelrohr anschließend mit 20,00 ml LM I ausgespült. Zur Gesamtbilanzierung werden die Kapseln jeweils ad 10,00 ml in einen Messkolben gespült. Die erhaltenen Probelösungen werden über HPLC vermessen (siehe Tabelle 4-7/4-8) und mit der Software Millennium 3.20 bzw. Empower 1154 (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) ausgewertet.

Tabelle 4-7 Chromatographische Bedingungen zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis und zur Bestimmung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid

Säule:	LiChrospher 60RP Select B 125x4mm, 5µm (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Detektion:	UV bei 210 nm (2996 PDA Waters GmbH, Eschborn, Deutschland)
HPLC:	2695 Separation Modul (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland)
Säulentemperatur:	25°C
Durchfluss:	2,0 ml/min
Injektionsvolumen:	100 µl
Mobile Phase:	Fließmittel II (siehe Kapitel 4.1.4)
Lösungsmittel:	0,01 N HCl (LM I) EtOH/Wasser (50:50) zur Korrelation mit PSD Laktose (LM II)
Retentionszeit:	2,15 min

Tabelle 4-8 Chromatographische Bedingungen zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis von Laktose

Säule:	APS-2 Hypersil 100x3 mm, 5 µm (Thermo Electron Cooperation, Dreieich, Deutschland)
Detektion:	RID 70 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
HPLC:	LC-10AT-Pumpe (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) Gilson 233XL Dilutor (Abimed, Langenfeld, Deutschland)
Säulentemperatur:	25°C
Durchfluss:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Mobile Phase:	Fließmittel I (siehe Kapitel 4.1.4)
Lösungsmittel:	0,01 N HCl (LM I)
Retentionszeit:	2,5 min

Verteilung des aerodynamischen Feinanteils (PSD)

Die Aufarbeitung erfolgt in Anlehnung an das aktuell gültige analytische Verfahren [49]. Je 6 Kapseln werden in den an der Steuerwand aufgebauten Kaskaden-Impaktor (ACI Andersen 1 ACFM non-viable ambient particle sizing sampler Mark II mit Präseparator, High TOP USP, SIP; Serie 200-800 Thermo Andersen, Atlanta/Georgia, USA) bei 39 l/min ausgebracht.

Anschließend werden sowohl die Prallplatten als auch der Filter mit jeweils 10,00 ml LM I/II (siehe Kapitel 4.1.4) in Kristallisierschalen abgespült. SIP, Präseparator und Kapselrest werden jeweils ad 50,0 ml mit dem entsprechenden Lösungsmittel in einen Messkolben gespült, gegebenenfalls verdünnt und an der HPLC gegen einen externen Standard vermessen (siehe Tabelle 4-7/4-9). Die Auswertung erfolgt mit Millennium 3.20 oder EmPower 1154 (Waters, Eschborn, Deutschland).

Zur besseren Bewertung werden die Ergebnisse von Prallplatten und Filter wie folgt zusammengefasst: PP0 – 1 (Gruppe 1), PP2 – 4 (Gruppe 2), PP5 – Filter (Gruppe 3).

Tabelle 4-9 Chromatographische Bedingungen zur Bestimmung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose

Säule:	APS-2 Hypersil 100x3mm, 5 µm (Thermo Electron Cooperation, Dreieich, Deutschland)
Detektion:	ELSD 2000ES Impactor off (90°C und 2,5 l/min N ₂ -Flussrate) (Alltech GmbH, Unterhaching, Deutschland)
HPLC:	LC-10AT-Pumpe (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) Gilson 233XL Dilutor (Abimed, Langenfeld, Deutschland)
Säulentemperatur:	25°C
Durchfluss:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Mobile Phase:	Fließmittel I (siehe Kapitel 4.1.4)
Lösungsmittel:	EtOH /Wasser (50/50)
Retentionszeit:	2,5 min

4.2.4 Stressen von Kapseln

Um den Einflussfaktor des *Kapselmateriale*s genauer zu betrachten, werden die Kapseln erst einer mechanischen Belastung ausgesetzt, bevor die aerodynamischen Eigenschaften ermittelt werden.

Dazu wird das Device (siehe Abb.4-4) mit einer Kapsel beschickt (OT nach oben), über einen Adapter mit dem Kaskadenimpaktor verbunden und die nicht angestochene Kapsel für 30s / 60s bzw. 120s mechanisch belastet. Durch Einstellen des Flusses auf 39 l/min führt der durchströmende Luftstrom zu einer Rotation der Kapsel im HandiHaler[®]. Nach diesem „theoretischen“ Entleeren wird die Kapsel nach Vorschrift angestochen und ausgebracht.

4.2.5 Mikroskopische Verfahren zur Oberflächencharakterisierung

Lichtmikroskopische Aufnahmen

Mit dem Lichtmikroskop ist es möglich sowohl „bepuderte“ als auch „nicht bepuderte“ Oberflächen der Kapselinnenseiten zu betrachten.

Probenvorbereitung:

Die Unterteile (UT) der Kapsel werden in 8 Abschnitte (Längsstreifen) geteilt und mit doppelseitigem Klebeband waagrecht (gleiche Orientierung) auf einem Objektträger fixiert (siehe Abb.4-6). Aus methodischen Gründen werden die Rundungsbereiche der Kapsel und das Oberteil nicht untersucht.

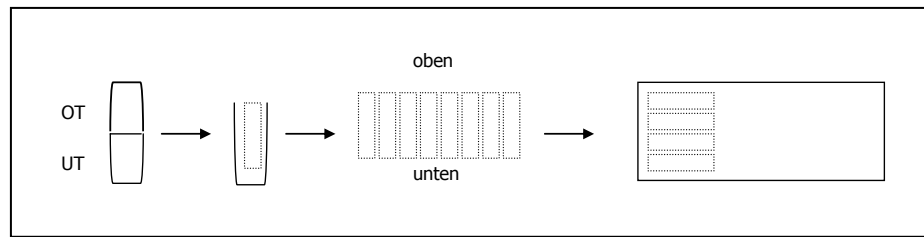


Abb. 4-6 Schematische Darstellung der Kapselpräparation

Zur Charakterisierung der „unbeladenen Kapselinnenseiten“ werden die Schnitte bei 10facher Vergrößerung im Hellfeld (Auflicht) betrachtet. Dafür wird ein Axioplan2 Imaging Mikroskop sowie die AxioCam (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Als Bildbearbeitungsprogramm dient Axio Vision 3.1. (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland).

Die „bepuderten Kapselinnenseiten“ werden bei 20-facher Vergrößerung im Dunkelfeld (Auflicht) durch ein Stereomikroskop Axioplan (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) in Kombination mit einer Olympus DP 10 (Olympus Optical Co Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) betrachtet. Die direkte Bildverarbeitung der Aufnahmen erfolgt dabei mit der Software Analysis (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland).

Mit einem Bildbearbeitungsprogramm (BI Entwicklung) ist es möglich den Aufnahmen einen prozentualen Bedeckungsgrad zuzuordnen. Dazu werden die farbigen Bilder mit geeigneten Filtern in Grauwertbilder umgewandelt, anschließend der Kontrast adjustiert und schließlich durch Anwendung eines Schwellenwertes Binärbilder erzeugt. Aus dem Quotienten der mit Pulver bedeckten Oberfläche und der Gesamtfläche des Bildes ergibt sich der prozentuale Pulverbedeckungsgrad. So können subjektive Eindrücke bezüglich des Beladungsgrades in konkrete Zahlen umgewandelt und verglichen werden.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Aufnahmen der *Kapselinnenseiten* erfolgen mit einem konventionellen Wolframkathoden-REM (Zeiss DSM 940; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). Um die Proben im Hochvakuum bei 10 KV zu betrachten, werden diese mit einer Goldschicht überzogen und so leitfähig gemacht (sputtering). Anschließend werden mit dem SE-Detektor die topographischen Bilder der Innenseiten aufgenommen.

Für die Aufnahmen des *Pulvers* wird mit einem Feldemissions-REM (LEO Gemini SSVP mit QBSD und VPSE, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) bei variablem Druck gearbeitet. Zur topographischen Darstellung, werden die Pulverproben bei 1 KV Spannung im Hochvakuum mit einem VPSE-Detektor abgerastert. Dabei kann auf das „Sputtern“ der Proben verzichtet werden (siehe Kapitel 3.2.2).

Bei 15 KV und 40 Pascal werden die Proben mit einem Rückstreuelektronendetektor (QBSD) abgerastert, um so Materialkontraste innerhalb der Pulvermischungen aufzuzeigen. Unter diesen Bedingungen entsteht über der Probe eine ionisierte und damit leitfähige Gasschicht, welche statt Gold die überschüssigen Elektronen ableitet. Entscheidender Vorteil dieser Variante ist, dass vor allem die Materialkontraste, welche normalerweise durch die Goldschicht überdeckt sind, noch zu erkennen sind.

Um den aufgezeigten Kontrasten (hier „helle“ Flecken auf dunklem Untergrund) gezielt eine Komponente der Mischung zuzuordnen, werden die identischen Proben anschließend bei 10 KV mit einem EDX (Oxford Instruments INCA Energy 200 Link Pentafet[®], Oxford, UK) untersucht.

4.2.6 Bestimmung der Adhäsionskräfte durch Rasterkraftmikroskopie

Die Arbeiten zur Bestimmung von Adhäsionskräften zwischen Ipratropiumbromid und den Komponenten des inhalativen Systems werden von Dr. Mike Allen (Fa. Biometry Contract Analytical Services / Alameda USA) durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Soweit im vorliegenden Bericht [68;78] nicht anderes beschrieben, werden die Proben für jede Messung neu hergestellt. Das in rechteckige Streifen (12 x 4 mm) geschnittene *Kapselmaterial* wird (Kapselinnenseite nach außen) flach auf eine mit doppelseitigem Klebeband versehene Stahlplatte gelegt.

Für die *Pulveroberflächen* wird eine kleine Menge Pulver auf eine glatte, saubere Oberfläche gegeben und vorhandene Agglomerate werden zerkleinert. Anschließend wird das agglomeratfreie Pulver auf eine Stahlplatte mit doppelseitigem Klebeband überführt und gleichmäßig verteilt (dünner Film).

Um die vorliegenden Kräfte zwischen Ipratropiumbromid und den Komponenten Gelatine-Kapseln, PE-Kapseln sowie Laktose 5µm und Laktose 200M zu ermitteln, werden Standard-Silicon-Cantilever (Länge 100 µm; Breite 30 µm; Dicke 1 µm) erst mit einem mikronisierten Ipratropiumbromid- bzw. Laktose-Partikel beklebt bevor die Federkonstante bestimmt wird. Bedingt durch diese Modifikation sind die vorliegenden Kontaktflächen der Spitzen nicht mehr identisch, wodurch ein direkter Vergleich der Messergebnisse erschwert ist. Allerdings ist es durch Mittelwertbildung und Berechnung der Standardabweichung möglich erste Vergleiche anzustellen.

Eine genauere Betrachtung und Bewertung wird möglich, indem der Probenradius etwa 40 nm unter der Probenspitze gescannt und die jeweilige Kontaktfläche ermittelt wird. Dividiert man die erhaltenen Resultate der Kraftmessung durch diese Kontaktflächen, werden die Ergebnisse in der Einheit Kraft/Fläche angegeben und können in Relation zueinander betrachtet werden [68].

Alle Messungen erfolgen an einem Multi Mode AFM (Digital Instruments / Veeco Metrology, Santa Barbara, USA) mit NanoScope III, wobei der piezoelektrische Scanner zuvor auf den x-, y- und z-Achsen kalibriert wird.

Tabelle 4-10 Einstellung am AFM (Messbedingungen)

Vertikale Resonanz des Systems:	~ 0,5 Hz
Rauschlevel:	0,02 nm
Räumliche Auflösung:	1,5 nm lateral und 0,1 nm vertikal
Auswertesoftware:	NanoScope Extender electronics 4.42r4

5 Methodenentwicklung – Quantifizierung von Laktose über HPLC

Um eine mögliche Beeinflussung der aerodynamischen Wirkstoffeigenschaften durch die Trägerpartikel bewerten zu können, werden Kenntnisse über die aerodynamischen Eigenschaften des entsprechenden Trägermaterials immer bedeutender. Nur so ist es möglich, Korrelationen und Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Komponenten einer Formulierung zu erklären. Aus diesem Grund wurden für die beiden Prüfpunkte ausgebrachte Dosis und Verteilung des aerodynamischen Feinanteils HPLC-Methoden entwickelt, die es ermöglichen das Trägermaterial – in diesem Fall Laktose-Monohydrat – quantitativ nachzuweisen. Dabei muss, um eine Quantifizierung bis zur Prallplatte 5 des ACI sicherzustellen, eine Nachweisgrenze bis 10 ppm Laktose gegeben sein. Dieses Limit wurde auf Basis von Wiegeversuchen (Differenzwägung der Prallplatten vor und nach Ausbringung) festgelegt.

Da nur eine direkte Ergebniskorrelation von Wirkstoff und Trägermaterial Aussagen über mögliche Wechselwirkungen zulässt, stand neben der Methodenentwicklung auch eine Optimierung der Probenaufarbeitung im Fokus der Arbeit. Anders als bei bereits vorliegenden Arbeiten [25;41] sollten aus nur einer Probenaufarbeitung, wenn auch über zwei verschiedene HPLC-Verfahren, die beiden Komponenten Träger und Wirkstoff separat quantifiziert werden. Als Grundlage für die chromatographische Methodenentwicklung zur Laktosequantifizierung diente die intern übliche Aufarbeitung zur Wirkstoffbestimmung, welche entsprechend überarbeitet wurde.

Bedingt durch die fehlende UV-Aktivität der Laktose muss statt der üblichen PDA-Detektoren ein geeignetes laktosesensitives Detektionssystem, z.B. ein Brechungsindexdetektor (RID), eingesetzt werden. Dieser kann allerdings mit einer Nachweisgrenze von ~ 100 ppm nur zur Ermittlung der ausgebrachte Menge Laktose (DD) eingesetzt werden (siehe Kapitel 5.1.3).

Für die Bestimmung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose wurde nach diversen Vorversuchen, z.B. Nachsäulenderivatisierung und anschließende Fluoreszenzdetektion des Laktosederivates [79], auf einen Verdampfungslichtstreuendetektor (ELSD) zurückgegriffen. Dieser weist in Kombination mit der vorgeschalteten Chromatographie die geforderte Empfindlichkeit von ~ 10 ppm auf (siehe Kapitel 5.2.3).

5.1 Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis von Laktose

5.1.1 Funktionsweise des Brechungsindex-Detektors (RID)

Die Messgrundlage des verwendeten Detektionssystems ist der Brechungsindex bzw. der Unterschied zwischen den Brechungsindices des reinen Eluenten und der entsprechenden Probe. Das heißt, die Empfindlichkeit des Detektors ist eine Funktion

des Analyt-Lösungsmittelpaars und hängt nicht nur vom Analyten, sondern auch vom Lösungsmittel ab. Damit ist der Einsatz des RID auf den Nicht-Gradientenbetrieb beschränkt. Wie in Abb.5-1 zu erkennen, fällt das Licht der Leuchtdiode durch eine Differentialküvette (Mess-/Referenzzelle) auf einen Hohlspiegel, wird dort reflektiert und durch die Küvette auf eine drehbare Glassplatte (Nullglas) abgelenkt. Enthält die Küvette in beiden Zellen die gleiche Flüssigkeit, wird das Licht exakt auf die Prismenkante positioniert. Die Photodioden erhalten die gleiche Lichtintensität (Differenzialsignal = 0). Unterscheiden sich die Proben, ändert sich die Lichtposition auf dem Prisma und damit die Lichtintensität [80].

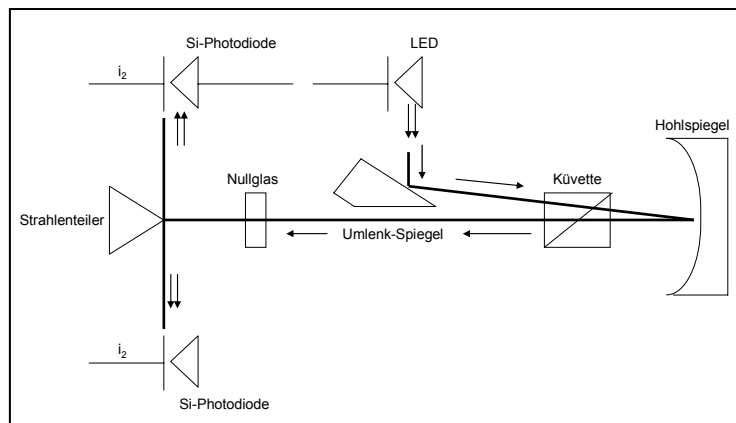


Abb.5-1 Funktionsprinzip eines Brechungsindex-Detektors (RID) [80]

5.1.2 Methodenentwicklung

Als stationäre Phase wird eine Aminosäule („klassische“ Zuckersäule) ausgewählt. Basierend auf den Herstellerangaben [81] werden Eluentzusammensetzung, Flussrate, Säulentemperatur und Injektionsvolumen optimiert.

Tabelle 5-1 Chromatographische Bedingungen RID (ausgebrachte Dosis Laktose)

Säule:	APS-2 Hypersil 100x3 mm, 5 µm (Thermo Electron Cooperation, Dreieich, Deutschland)
Detektion:	RI 70 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
HPLC:	LC-10AT-Pumpe (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) Gilson 233XL Dilutor (Abimed, Langenfeld, Deutschland)
Säulentemperatur:	25°C
Durchfluss:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Mobile Phase:	Fließmittel I (siehe Kapitel 4.1.4)
Lösungsmittel:	0,01 N HCl
Retentionszeit:	2,5 min

5.1.3 Validierung

Nach Abschluss der Entwicklung wird die Methode basierend auf den Anforderungen entsprechender Guidelines [82-84] systematisch überprüft. Diese zielgerichtete Prüfung soll sicherstellen, inwieweit das vorliegende Verfahren zur Quantifizierung von Laktose geeignet ist [85-88].

Spezifität/Selektivität

Bei der HPLC-Bestimmung muss die zu bestimmende Laktose von Ipratropiumbromid und Eluent abgetrennt sein. Dazu werden die folgenden Lösungen zweimal injiziert und entsprechend bewertet: *Blindwert (0,01 N HCl)*, jeweils eine *Standard-Lösung von Laktose und Ipratropiumbromid*, sowie eine *simulierte Probelösung*. Sowohl die in Tabelle 5-2 aufgeführten Retentionszeiten und chromatographischen Kenngrößen als auch die in Abb. 5-2/5-3 dargestellten Chromatogramme belegen die Selektivität der Methode. Alle Komponenten werden klar voneinander getrennt.

Tabelle 5-2 Retentionszeiten und chromatographische Kenngrößen zum Nachweis der Selektivität des analytischen Verfahrens

RT _{Laktose}	~ 3,0 min
RT _{Ipratropiumbromid}	Kein Signal
RT _{HCl}	~ 0,5 min
Auflösung R _{Laktose zu HCl}	2,06 (soll $\geq 1,5$)
Tailingfaktor _{Laktose}	0,9 (soll: 0,5 – 2,0)

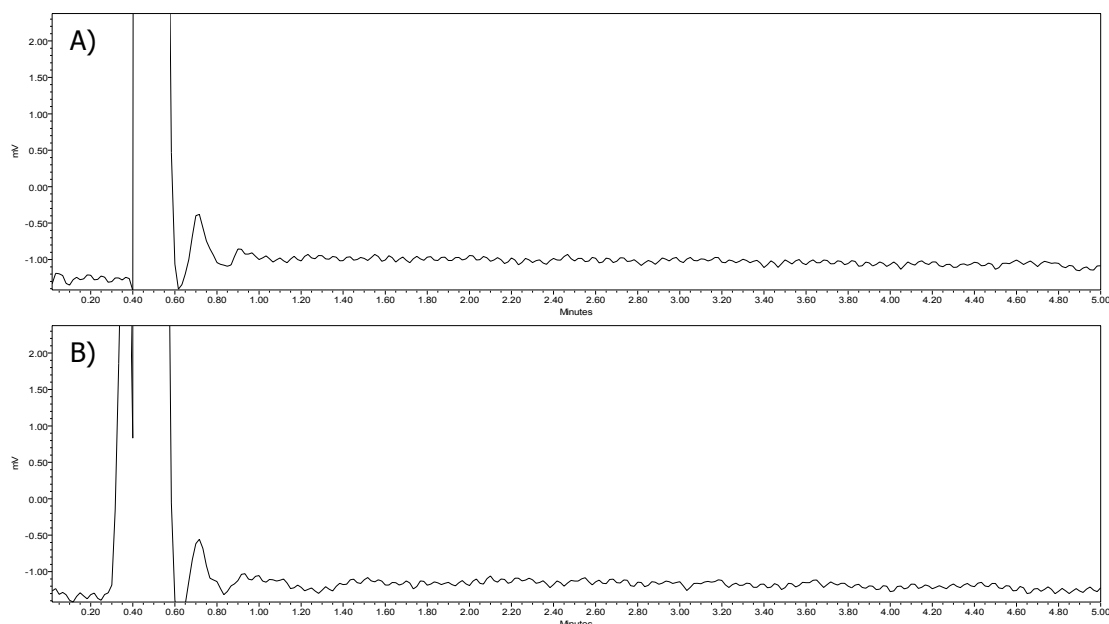


Abb.5-2 Chromatogramme zur Selektivität des analytischen Verfahrens mit RID A) HCl- Blindwert, B) Ipratropiumbromid (Verdünnung A)

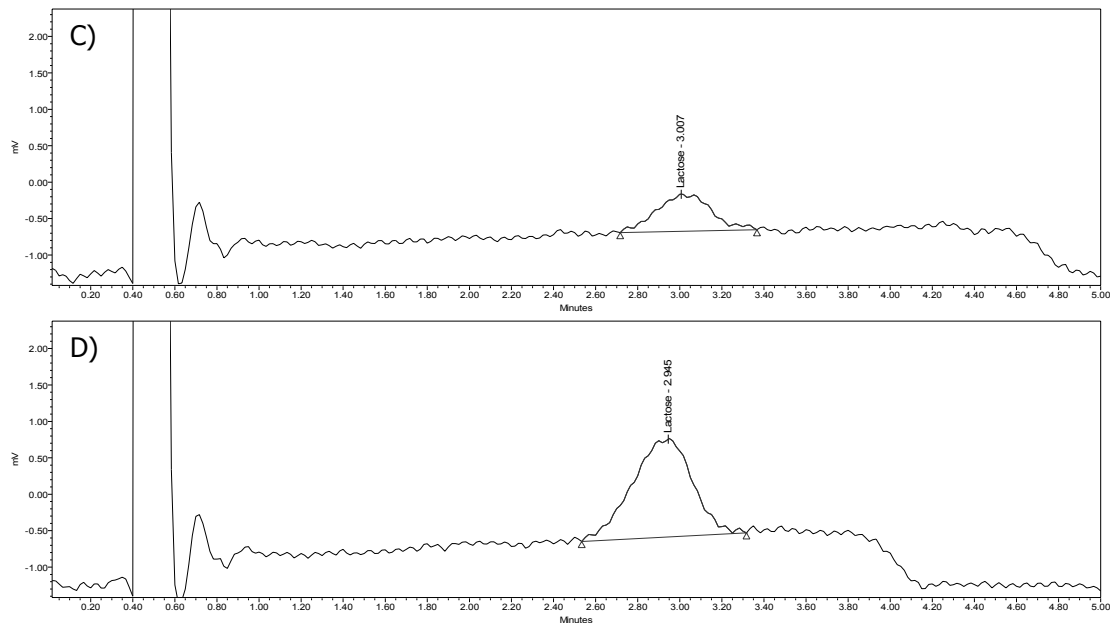


Abb.5-3 Chromatogramme zur Selektivität des analytischen Verfahrens mit RID C) Laktose (0,1mg/ml) und D) Probe der Richtigkeit (Laktose 0,25 mg/ml in Matrix)

Linearität

Die Linearität des Detektorsignals wird an sechs äquidistanten Laktose-Konzentrationen im Bereich von 0,1 mg/ml – 0,35 mg/ml bestimmt. Dazu werden aus einer Stammlösung die verschiedenen Kalibrierstandards hergestellt und je sechsmal vermessen. Es ergeben sich die in Tabelle 5-3 zusammengefassten Werte.

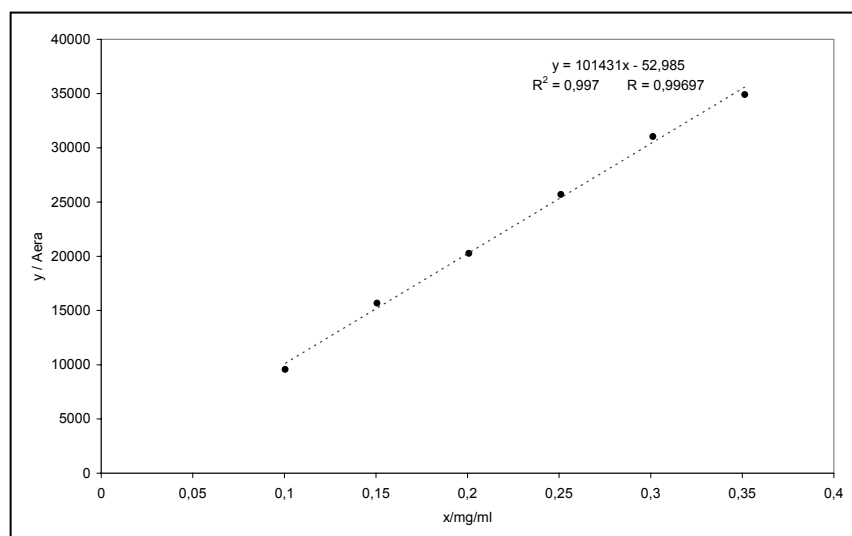


Abb.5-4 Grafik zur Linearität der ausgebrachten Dosis von Laktose (RID)

Aus der in Abb.5-4 dargestellten Geraden geht hervor, dass die Linearität in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 0,35 mg/ml gewährleistet ist. Damit können die Probelösungen direkt und ohne weitere Konzentrationsadaption verwendet werden.

Tabelle 5-3 Ergebnisse zum Nachweis der Linearität des analytischen Verfahrens zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis Laktose mittels RID

Konz. [mg/ml]	Flächen						MW	VK [%]
0,100	10407	9659	9733	9230	9289	9105	9570,6	5,0
0,151	15194	15623	15678	15698	15889	15974	15676,0	1,7
0,201	20816	20917	19507	19893	19678	20767	20263,0	3,2
0,251	25030	25954	26548	25304	25735	25616	25697,7	2,1
0,301	30256	32221	32066	30300	30471	30952	31044,4	2,9
0,351	35136	35650	34608	34372	34965	34666	34903,9	1,3

Nachweisgrenze (LOD)

Die Festlegung des Detektionslimits erfolgt über $VK \leq 10\%$ ($n=6$). Dazu werden die resultierenden Peakflächen der jeweiligen Proben gemittelt und der VK bestimmt. Wie in Tabelle 5-3 zu erkennen, stellt die Verdünnungsstufe 0,1 mg/ml den LOQ des analytischen Verfahrens dar.

Richtigkeit

Die Überprüfung der Richtigkeit erfolgt mit Probelösungen aus 0,25 mg/ml Laktose und 2,1 µg/ml Ipratropiumbromid. Diese Proben werden sechsmal hergestellt und zweifach gegen einen externen Standard vermessen.

Tabelle 5-4 Ergebnisse zum Nachweis der Richtigkeit des analytischen Verfahrens zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis Laktose mittels RID

Sollwert [mg/ml]	Istwert [mg/ml]	Prozentuale relative Abweichung	Wiederfindung [%]	VK [%]
0,251	0,253	0,66	100,66	0,55
0,251	0,246	-1,95	98,04	0,20
0,251	0,252	0,60	100,59	0,78
0,251	0,251	-0,08	99,91	0,18
0,251	0,251	-0,08	99,91	0,36
0,251	0,253	0,71	100,71	1,85

Die Ergebnisse in Tabelle 5-4 belegen die Richtigkeit der Methode. Alle Mittelwerte liegen innerhalb der geforderten Toleranz von 98 – 102 % Wiederfindung bezogen auf den Sollwert. Auch der VK ist in allen Fällen $\leq 2,0\%$.

Präzision / Wiederholbarkeit

Die Konstanz des Chromatographiesystems wird sichergestellt, indem eine Probelösung (0,25 mg/ml Laktose und 2,1 µg/ml Ipratropiumbromid) sechsmal in Folge injiziert wird. Die daraus erhaltenen Peakflächen werden gemittelt, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet (siehe Tabelle 5-5). Mit einem VK $\leq 2,0$ % ist auch die Systempräzision des analytischen Verfahrens gewährleistet.

Tabelle 5-5 Ergebnisse zum Nachweis der Systempräzision des analytischen Verfahrens zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis Laktose mittels RID (0,25 mg / ml Laktose)

Injektion	Fläche
1	25476
2	25674
3	25569
4	25632
5	25211
6	25309
MW	25478,5
SD	184,53
VK	0,72427

Robustheit

Um die Stabilität der Laktose in Lösung zu überprüfen, werden drei Probelösungen (0,25 mg/ml Laktose in Matrix) bei drei unterschiedlichen Bedingungen (Raumtemperatur dunkel bzw. Tageslicht und Kühlschrank) gelagert und zu festgelegten Zeitpunkten gegen einen externen Standard vermessen (n=6).

Wie aus den Tabellen 5-6 bis 5-8 ersichtlich, kann die Probelösung max. sieben Tage im Kühlschrank oder im dunklen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Tabelle 5-6 Stabilität der Probe bei Raumtemperatur im geschlossen, dunklen Schrank (RID)

	Sollwert [mg/ml]	Istwert [mg/ml]	Wiederfindung [%]	VK [%]
1. Tag	0,249	0,252	101,20	1,35
5. Tag	0,249	0,247	99,23	1,24
7. Tag	0,249	0,247	99,48	1,53
14.Tag	0,249	0,217	87,39	3,15

Tabelle 5-7 Stabilität der Probe bei Raumtemperatur im Tageslicht (RID)

	Sollwert [mg/ml]	Istwert [mg/ml]	Wiederfindung [%]	VK [%]
1. Tag	0,253	0,255	100,87	1,37
5. Tag	0,253	0,236	93,10	1,27
7. Tag	0,253	0,233	91,90	0,73
14.Tag	0,253	0,214	86,74	1,92

Tabelle 5-8 Stabilität der Probe im Kühlschrank (RID)

	Sollwert [mg/ml]	Istwert [mg/ml]	Wiederfindung [%]	VK [%]
1. Tag	0,252	0,248	98,70	1,94
5. Tag	0,252	Nicht bestimmt (chromatographische Probleme)		
7. Tag	0,252	0,249	98,95	0,40
14.Tag	0,252	0,218	86,74	1,92

Fazit:

Die Validierung belegt die Eignung des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der ausgebrachten Laktosemenge. Aus einer Probenaufarbeitung können nun sowohl Träger als auch Wirkstoff bestimmt und die Ergebnisse direkt korreliert werden (siehe Kapitel 7.4). Die validierte Methode zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis Ipratropiumbromid entspricht der aktuell gültigen internen Prüfungsvorschrift [47].

5.2 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose

5.2.1 Funktionsweise des Verdampfungslichtstreuendetektors (ELSD)

Dieser sehr empfindliche Detektor ist universell für alle Substanzen anwendbar, die weniger flüchtig als die verwendete mobile Phase sind. Da das Detektorsignal nicht, wie bei anderen Detektoren (z.B. RID) proportional zu den optischen Eigenschaften, sondern proportional zur Analytkonzentration ist, müssen die zu analysierenden Substanzen nicht zwingend optisch aktiv sein.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit ist eine Detektion bis in den Nanogrammbereich möglich, was eng mit der Wahl des Lösungsmittels verknüpft ist. So wirken sich hohe wässrige Anteile negativ auf Peakform und -größe aus [89;90].

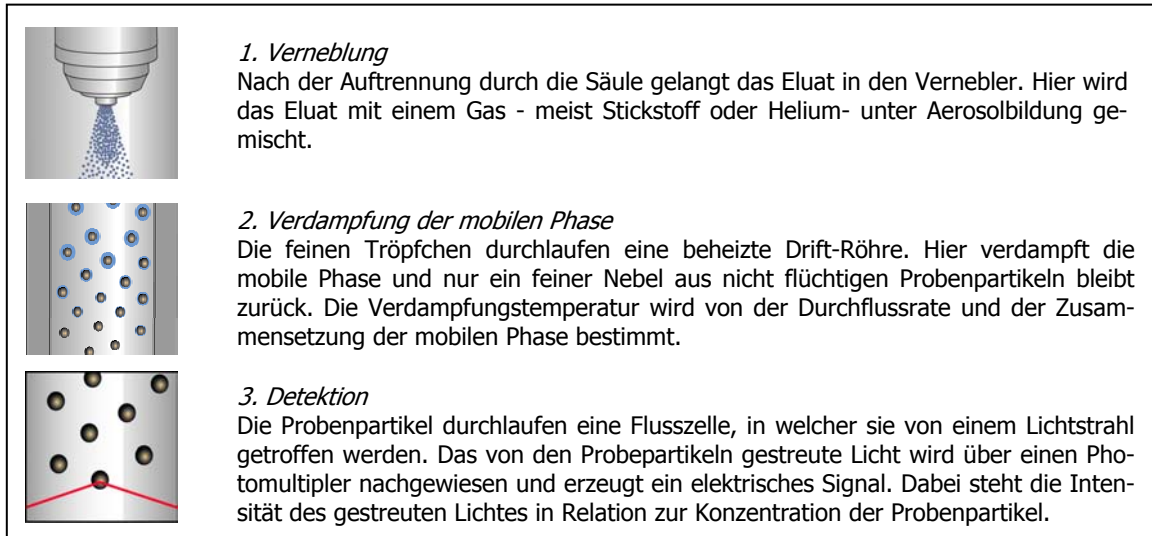


Abb.5-5 Darstellung des Funktionsprinzips eines Verdampfungslichtstreuendetektors (ELSD) [89]

5.2.2 Methodenentwicklung

Nach zahlreichen Versuchen (Evaluierung von Verdampfungstemperatur, Impaktor-Einstellung und Vernebler-Gasfluss) erweist sich der ELSD als geeignete Alternative zum RID.

Um eine identische Probenaufarbeitung für alle Komponenten (Träger und Wirkstoff) sicherzustellen, muss das üblicherweise verwendete Lösungsmittel 0,01 N HCl ausgetauscht und durch die Mischung EtOH/Wasser (50:50) ersetzt werden. Diese Optimierung ist notwendig, da sich im ELSD hohe wässrige Anteile negativ auf Peakform und -größe auswirken und so die Empfindlichkeit herabsetzen (siehe Tabelle 5-9). Die Eignung des modifizierten Lösungsmittels im analytischen Verfahren zur Quantifizierung des Wirkstoffs wird ebenfalls sichergestellt (siehe Kapitel 5.2.3).

Tabelle 5-9 Chromatographische Bedingungen ELSD (aerodynamische Feinanteil Laktose)

Säule:	APS-2 Hypersil 100x3 mm, 5 µm (Thermo Electron Cooperation, Dreieich, Deutschland)
Detektion:	ELSD 2000ES Impactor off (90°C und 2,5 l/min N ₂ -Flussrate) (Alltech GmbH, Unterhaching, Deutschland)
HPLC:	LC-10AT-Pumpe (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) Gilson 233XL Dilutor (Abimed, Langenfeld, Deutschland)
Säulentemperatur:	25°C
Durchfluss:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Mobile Phase:	Fließmittel I (siehe Kapitel 4.1.4)
Lösungsmittel:	EtOH/Wasser (50:50)
Retentionszeit:	2,6 min

5.2.3 Validierung

Auch hier wird nach Abschluss der Methodenentwicklung das Verfahren systematisch überprüft, um die Eignung des analytischen Verfahrens zur Laktosequantifizierung auf den Prallplatten sicherzustellen [82-88].

Spezifität/Selektivität

Bei der HPLC- Bestimmung muss die zu bestimmende Laktose von allen Matrixbestandteilen abgetrennt werden. Um dies sicherzustellen, werden folgende Lösungen zweimal injiziert: *Blindwert (EtOH/Wasser 50:50), Brij-Blindwert, jeweils eine Standardlösung von Ipratropiumbromid und Laktose Monohydrat sowie eine reale Probe.* Sowohl die in Tabelle 5-10 aufgeführten Retentionszeiten und chromatographischen Kenngrößen als auch die in Abb. 5-6/5-7 dargestellten Chromatogramme belegen die Selektivität der Methode. Alle Komponenten werden klar voneinander getrennt.

Tabelle 5-10 Retentionszeiten und chromatographische Kenngrößen zum Nachweis der Selektivität des analytischen Verfahrens

RT _{EtOH/Wasser}	0,7 min
RT _{Brij}	0,8 min
RT _{Laktose}	2,6 min
RT _{Ipratropiumbromid}	0,8 min
Auflösung R _{Laktose zu EtOH/Wasser}	6,3 (soll $\geq 1,5$)
Tailingfaktor _{Laktose}	1,0 (soll: 0,5 – 2,0)

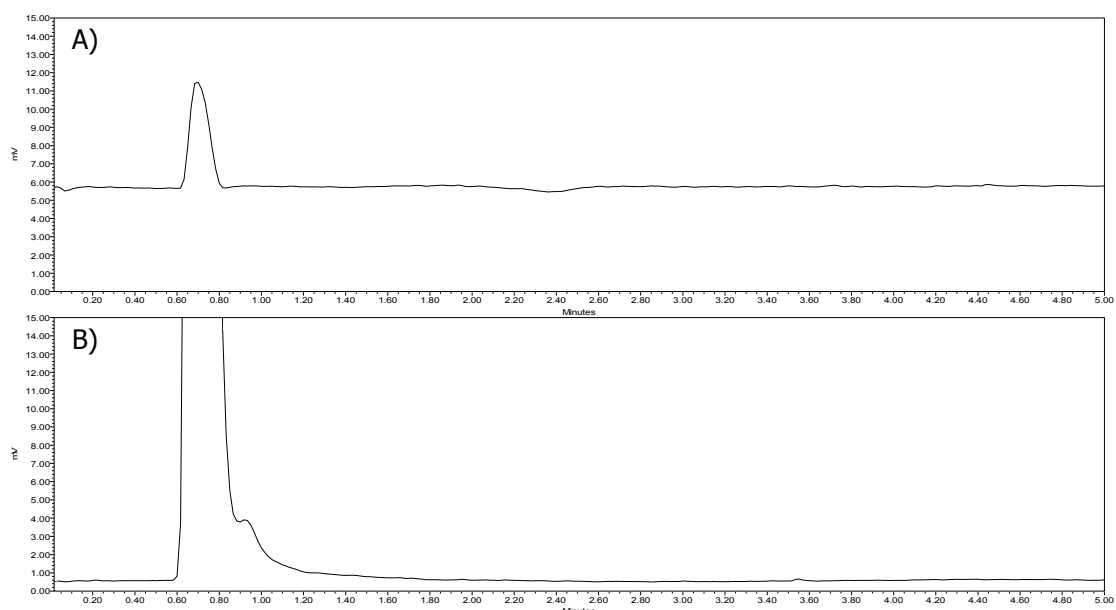


Abb.5-6 Chromatogramme zur Selektivität des analytischen Verfahrens mit ELSD A) LM-Blindwert, B) Brij-Blindwert

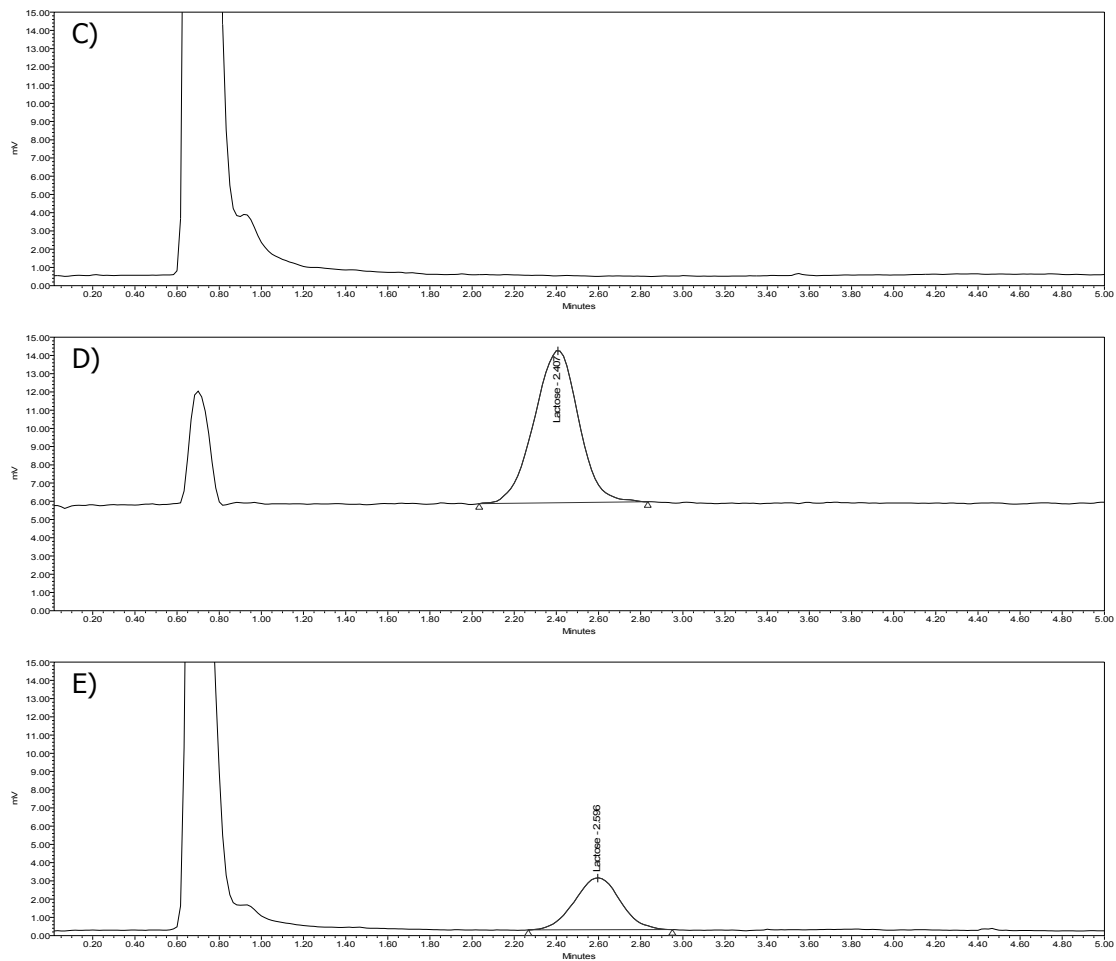


Abb.5-7 Chromatogramme zur Selektivität des analytischen Verfahrens mit ELSD C) Ipratropiumbromid (Verdünnung A), D) Laktose (0,1 mg/ml); E) Probenaufarbeitung der PP 0

Linearität

Die Linearität des Signals wird an sechs Laktose-Konzentrationen im Bereich von 0,01 mg/ml – 0,1 mg/ml bestimmt. Dazu werden aus einer Stammlösung die verschiedenen Kalibrierstandards hergestellt und je sechsmal vermessen (siehe Tabelle 5-10).

Tabelle 5-10 Ergebnisse zum Nachweis der Linearität des analytischen Verfahrens zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis Laktose mittels ELSD

Konz. [mg/ml]	Flächen						MW	VK [%]
0,101	106462	107040	106793	108557	108728	107578	107526,3	0,9
0,081	77854	77338	77003	78785	77234	77156	77561,6	0,9
0,061	52519	52559	52960	52257	52464	52283	52506,9	0,5
0,041	30512	31115	31069	30282	31963	30415	30892,5	2,0
0,020	13217	13055	13528	13256	13753	13956	13460,8	2,6
0,010	6108	6552	5567	5343	5197	6070	5806,2	9,0

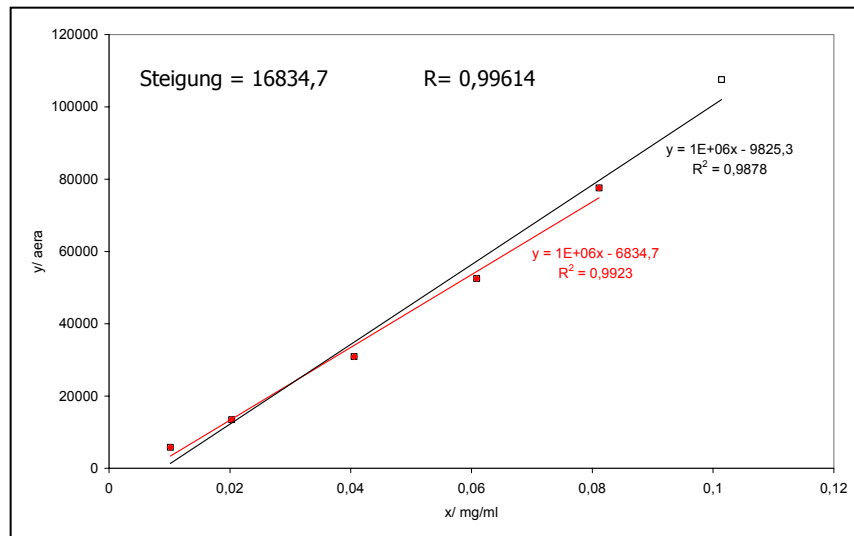


Abb.5-8 Grafische Darstellung der Linearität über fünf bzw. sechs Konzentrationsstufen (ELSD)

Wie anhand der dargestellten Geraden (Abb.5-8) zu erkennen, ist die Linearität nur im Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 80 µg/ml gewährleistet ($R \geq 0,99$). Um eine ausreichend genaue Quantifizierung sicherzustellen, werden die nachfolgenden Analysen mit einer Fünf-Punkt-Kalibrierung in diesem Bereich bewertet.

Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Festlegung des Quantifizierungslimits erfolgt über $VK \leq 10\%$ ($n=6$). Dazu werden die resultierenden Peakflächen der jeweiligen Proben gemittelt und der VK bestimmt. Wie in Tabelle 5-10 zu erkennen, stellt die Verdünnungsstufe 0,01 mg/ml den LOQ des analytischen Verfahrens dar.

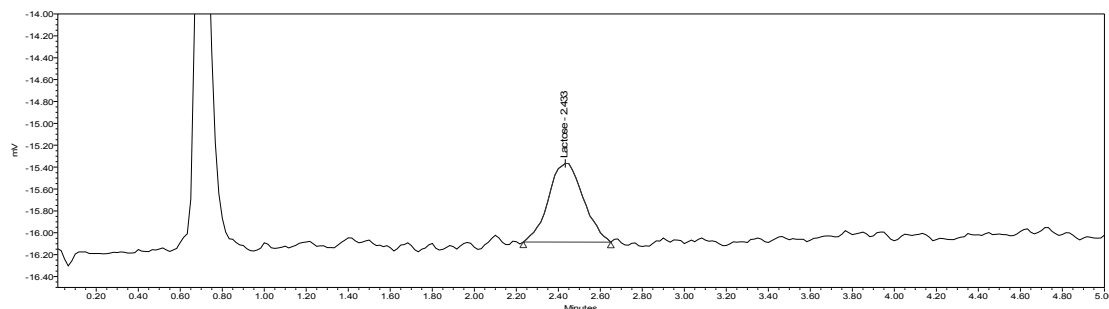


Abb.5-9 Chromatogramm des LOQ (0,01 mg/ml Laktose Monohydrat) ELSD

Richtigkeit

Die Richtigkeit wird durch die Wiederfindung verschiedener synthetisch hergestellter Probelösungen im Konzentrationsbereich 0,1 mg/ml bzw. 0,01 mg/ml überprüft. Jede dieser Lösungen wird sechsmal injiziert und die Peakflächen des Laktosesignals werden gegen eine externe Standardreihe quantifiziert und auf den Sollgehalt bezogen.

Als Matrix werden sowohl Ipratropiumbromid als auch eine Mischung aus Ipratropiumbromid und Brij betrachtet.

Tabelle 5-12 Ergebnisse zum Nachweis der Richtigkeit des analytischen Verfahrens zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis Laktose mittels ELSD (I = Ipratropiumbromid als Matrix und I/B = Ipratropiumbromid und Brij als Matrix)

Sollwert [mg/ml]	Istwert [mg/ml]	Prozentuale relative Abweichung	Wiederfindung [%]	VK [%]
0,101	0,103	1,95	101,95	0,43
0,101 (+I)	0,103	1,53	101,53	1,23
0,101 (+I/B)	0,101	-0,03	99,97	0,99
0,010	0,010	-0,32	99,68	1,78
0,010 (+I)	0,010	0,47	100,47	1,27
0,010 (+I/B)	0,010	0,38	100,37	0,59

Wie aus Tabelle 5-12 ersichtlich wird, ist die Richtigkeit des Verfahrens unter den gegebenen Bedingungen ausreichend belegt. Alle Mittelwerte liegen innerhalb der Toleranz von 98 – 102 % (LOQ: 75 – 125 %). Auch der VK ist in allen Fällen $\leq 2\%$.

Systempräzision

Um die Gleichmäßigkeit des Chromatographiesystems zu überprüfen, wird aus einem Vial (0,1 mg/ml Laktose mit Matrix) sechsmal in Folge injiziert. Die daraus erhaltenen Peakflächen werden gemittelt, Standardabweichung und Variationskoeffizient bestimmt (siehe Tabelle 5-13). Mit einem VK $\leq 2\%$ ist die Systempräzision gegeben.

Tabelle 5-13 Ergebnisse zum Nachweis der Systempräzision des analytischen Verfahrens zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis Laktose mittels ELSD (0,1 mg / ml Laktose)

Injektion	Fläche
1	97041
2	96835
3	98070
4	97664
5	97341
6	97160
MW	97352
SD	450,1
VK	0,5%

Robustheit

Die Stabilität der Standard- und Problösungen wird betrachtet, indem die Lösungen unter zwei verschiedenen Bedingungen (Raumtemperatur dunkel und Kühlschrank) gelagert und nach festgelegten Zeitpunkten gegen eine frisch angesetzte externe Standardreihe bewertet werden. Dabei wird jede Lösung sechsmal injiziert und die Wiederfindung bezogen auf den initialen Wert der Lösungen zur Stabilitätsaussage herangezogen.

Tabelle 5-14 Stabilität von Laktoselösungen (mit / ohne Matrix) bei Raumtemperatur im verschlossenen, dunklen Schrank (ELSD)

		Startwert [mg/ml]	Istwert [mg/ml]	Wiederfindung [%]	VK [%]
Laktose	2. Tag	0,057	0,052	91,15	0,20
	4. Tag	0,057	0,051	89,52	1,55
Laktose + Ipratropi- umbromid	2. Tag	0,056	0,058	103,3	0,02
	4. Tag	0,056	0,055	97,6	1,51
Laktose + Ipratropi- umbromid + Brij	2. Tag	0,056	0,055	99,05	0,54
	4. Tag	0,056	0,055	97,79	1,13

Tabelle 5-15 Stabilität von Laktoselösungen (mit / ohne Matrix) im Kühlschrank (ELSD)

		Startwert [mg/ml]	Istwert [mg/ml]	Wiederfindung [%]	VK [%]
Laktose	2. Tag	0,057	0,057	98,89	0,73
	4. Tag	0,057	0,056	97,93	0,91
Laktose + Ipratropi- umbromid	2. Tag	0,056	0,056	100,46	0,58
	4. Tag	0,056	0,055	97,98	0,37
Laktose + Ipratropi- umbromid + Brij	2. Tag	0,056	0,055	98,70	0,95
	4. Tag	0,056	0,055	98,50	0,81
	7. Tag	0,056	0,049	86,47	0,55

Legt man eine Wiederfindung von 98 - 102% bezogen auf den Startwert als Stabilitätskriterium fest, ist die Haltbarkeit der Lösungen, wie aus den Tabellen 5-14/5-15 ersichtlich, nur bei Lagerung im Kühlschrank für maximal vier Tage gegeben.

Richtigkeit für Ipratropiumbromid in EtOH/ Wasser

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird sichergestellt, indem zwei Probelösungen je fünfmal injiziert, die Mittelwerte sowie die Wiederfindung und der VK ermittelt werden. Wie aus Tabelle 5-16 ersichtlich, hat der Austausch des Lösungsmittels, bei sonst konformen Analysenbedingungen, keinen Einfluss auf die Quantifizierung.

Tabelle 5-16 Ergebnisse zur Richtigkeit von Ipratropiumbromid in EtOH/Wasser

Sollwert [mg/ml]	Istwert [mg/ml]	MW [mg/ml]	VK [%]	Wiederfindung [%]
20,33	20,32	20,31	0,10	100,09
	20,23			
	20,24			
	20,29			
	20,46			
20,87	20,81	20,89	0,09	100,09
	20,81			
	20,99			
	20,72			
	21,12			

Fazit:

Die Validierung belegt die Eignung des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose bis in den geforderten Bereich (~ 10ppm). Um die Probelösungen im kalibrierten Messbereich zu halten, müssen die Proben zur Quantifizierung von Laktose gegebenenfalls nach dem in Tabelle 5-17 beschriebenen Schema verdünnt werden.

Tabelle 5-17 Verdünnungsschema der Proben zur Bestimmung von Laktose

SIP	2,00 ml in 20,00 ml
Präseparator	2,00 ml in 25,00 ml
Kapselrest (nur für Gelatine):	2,00 ml in 20,00 ml

Auch die Vorgabe aus nur einer Probenaufarbeitung sowohl den Gehalt des Trägers als auch den des Wirkstoffs zu quantifizieren kann durch die Optimierung der Probenaufarbeitung sichergestellt werden. Damit können die Messergebnisse direkt korreliert und mögliche Wechselwirkungen aufgezeigt werden (siehe Kapitel 7.4).

6 Ergebnisse I - Betrachtung der Einflussfaktoren

6.1 Auswirkung verschiedener Einflussfaktoren auf die ausgebrachte Dosis von Laktose und Ipratropiumbromid

Um die Effekte der verschiedenen Einflussfaktoren *Kapselmateral, Trägerlaktose, Feinanteil und Mischreihenfolge* auf die *Höhe der ausgebrachten Dosis* von Ipratropiumbromid und Laktose zu betrachten, werden die in Tabelle 4-3 beschriebenen Formulierungen (jeweils $n = 40$ Kapseln) gemäß dem Arzneibuch üblichen Verfahren analysiert und die Ergebnisse entsprechend bewertet.

6.1.1 Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis aus PE-Kapseln

Im praktisch inerten Kapselmateral PE können die nachfolgend beschriebenen Auswirkungen der Einflussfaktoren auf die Höhe der Ausbringung von Ipratropiumbromid und Laktose beobachtet werden.

6.1.1.1 Ipratropiumbromid

200M Pharmatose®

Die verschiedenen Formulierungen des „feinen“ Trägermaterials ergeben nachfolgend beschriebene Ergebnisse, die in Abb.6-1 grafisch dargestellt sind: Je nach Formulierung lässt sich eine ausgebrachte Dosis zwischen 83,4 % - 86,5 % bezogen auf die nominale Dosis von 40 µg erreichen.

Weiterhin ist aus der Abbildung abzuleiten, dass der zunehmende Anteil mikronisierter Laktose (2,5 % bzw. 5 %) keinen Einfluss auf die Höhe der ausgebrachten Dosis hat, da sich die Werte mit Feinanteil nicht signifikant von dem Basiswert ohne Feinanteil unterscheiden. Auch eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Mischreihenfolge ist nicht zu erkennen.

Der zurückbleibende Wirkstoffanteil (= Kapselrest) liegt mit 6,1 % - 7,7 % erwartungsgemäß niedrig (siehe Abb.6-1). Dagegen sind die entsprechenden Variationskoeffizienten unerwartet hoch und ungleichmäßig. Eine Erklärung für diese Beobachtungen liefert die individuelle elektrostatische Aufladung der PE-Kapseln während der Rotation im HandiHaler®. Ausgelöst durch die Reibungsenergie wird die Retention der Pulverpartikel gesteigert und damit die Ausbringung des Pulvers beeinträchtigt (siehe Kapitel 7.1). Bei den Resultaten der ausgebrachten Dosis ist dieser Einfluss nicht mehr so deutlich zu erkennen. Hier überdecken andere Faktoren, wie z.B. die Retention im Inhalator, eine durch elektrostatische Aufladung ausgelöste Schwankung der Resultate.

325M Respitose®

Für die Formulierungen mit dieser „groben“ Trägerlaktose liegt die ausgebrachte Dosis mit 79,6 % - 82,6 % bezogen auf die nominale Dosis von 40 µg etwas niedriger. Allerdings gilt auch hier, dass sowohl der Feinanteil an Laktose als auch die Mischreihenfolge keinen Einfluss auf Höhe der Ausbringung haben (siehe Abb. 6-1).

Entsprechend zu der geringen ausgebrachten Dosis sind die zurückbleibenden Wirkstoffanteile in der Kapsel etwas stärker ausgeprägt. Erneut lässt sich diese Beobachtung durch den bereits beschriebenen Effekt der elektrostatischen Aufladung erklären. Ein Phänomen, welches durch mechanische Belastung (siehe Kapitel 6.3) noch wesentlich stärker in Erscheinung tritt und die Menge der zurückbleibenden Pulvermenge merklich steigert.

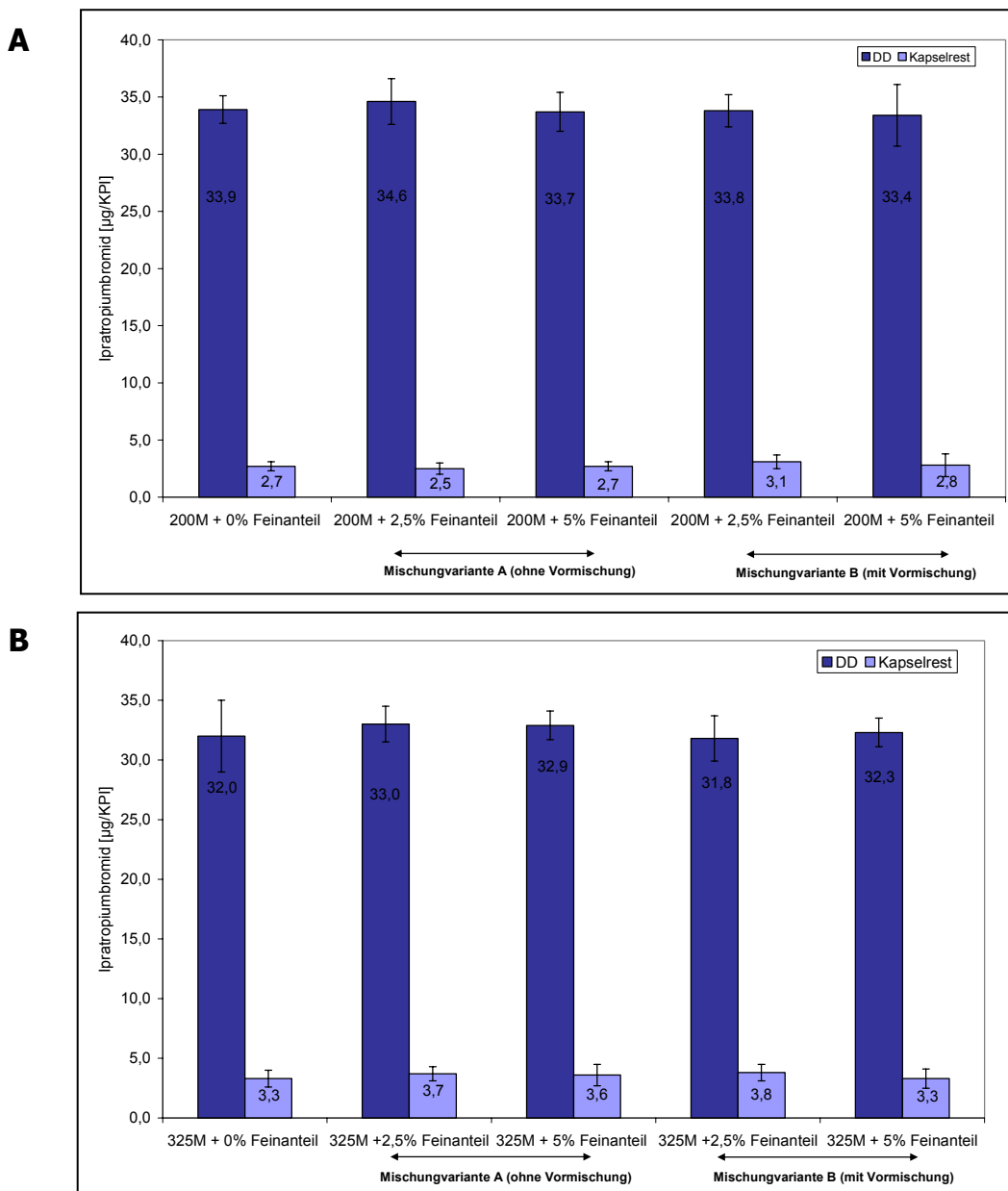


Abb.6-1 Ipratropiumbromid: Vergleich von ausgebrachter Dosis und Kapselrest aus PE-Kapseln A) 200M Pharmatose® und B) 325M Respitose® (n=40 Einzelwerte pro Formulierung)

6.1.1.2 Laktose Monohydrat

Da die Nachweisgrenze (LOD) des analytischen Verfahrens für Laktose bei 0,1 mg/ml liegt (siehe Kapitel 5.1.3), ist es nicht möglich den Kapselrest zu bestimmen. Erst durch das HPLC-Verfahren mit ELSD zur Bestimmung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose kann eine quantitative Aussage bezüglich des zurückbleibenden Laktoseanteils getroffen werden (siehe Kapitel 6.2.1.2).

200M Pharmatose®

Mit 91,7 % – 96,4 % bezogen auf die nominale Menge von 5,5 mg liegt die Ausbringung der Laktose im Vergleich zum Wirkstoff prozentual betrachtet etwas höher. Ein Trend, der sich merklich auf das Ausbringungsverhältnis („Abreicherung“) von Trägermaterial und Wirkstoff auswirkt (siehe Kapitel 7.3.1). Analog zu den Ergebnissen aus Kapitel 6.1.1.1 lassen weder der zunehmende Feinanteil, noch die Mischreihenfolge einen Effekt auf die Höhe der Ausbringung erkennen (siehe Abb.6-2).

325M Respitose®

Die Ausbringung des „groben“ Trägermaterials liegt im Bereich von 93,4 % - 98,6 % und damit ebenfalls höher als die entsprechende Wirkstoffausbringung, wodurch sich erneut das Verhältnis zwischen Wirkstoff und Trägermaterial verändert (siehe Kapitel 7.3.1). Wie bereits bei der 200M Laktose beschrieben, ist kein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Formulierungen zu erkennen (siehe Abb.6-2). Weder der zugesetzte Feinanteil noch die Mischreihenfolge zeigen einen Effekt.

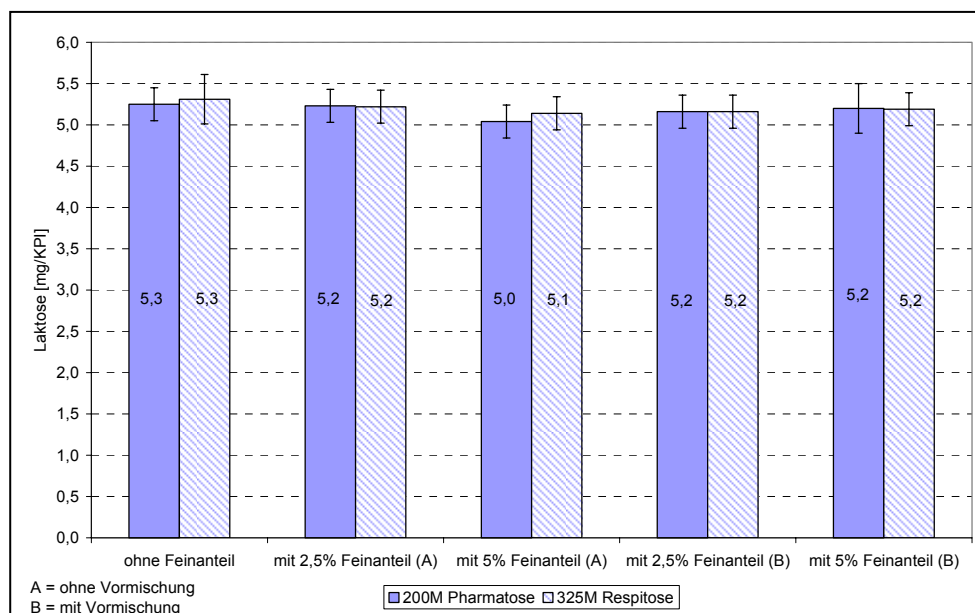


Abb.6-2 Vergleich der ausgebrachten Dosis 200M Pharmatose® und 325M Respitose® aus PE-Kapseln (n= 40 Einzelwerte pro Formulierung)

6.1.2 Gleichförmigkeit der ausgebrachten Dosis aus Gelatine-Kapseln

Die Zusammensetzung der Pulvermischungen wird in allen Kombinationen (siehe Tabelle 4-3) konstant gehalten und nur das „inerte“ Kapselmateriale PE wird durch adhäsive („klebrige“) Gelatine-Kapseln ausgetauscht. Durch diese Modifikation der Kombinationen kann ein Einfluss des Kapselmateriale auf die ausgebrachte Dosis evaluiert werden. Die Versuchsreihe führt zu den nachfolgend aufgeführten Ergebnissen.

6.1.2.1 Ipratropiumbromid

200M Pharmatose[®]

Der Austausch des Kapselmateriale verursacht eine deutliche Veränderung der Resultate. Die Formulierungen der „feinen“ Trägerlaktose liefern mit Ergebnissen im Bereich von 60,5 % - 65,7 % eine deutlich niedrigere Wirkstoffausbringung, als dies bei PE-Kapseln zu beobachten war (siehe Abb.6-3).

Verglichen mit dem Basiswert ist in diesem Fall durch den Zusatz von mikronisierter Laktose ein Anstieg in der ausgebrachten Dosis zu erzielen. Dabei kann allerdings nicht näher zwischen den verschiedenen Additivmengen (2,5% und 5%) differenziert werden. Wie bereits bei den PE-Kapseln beobachtet wurde, sind die genannten Effekte unabhängig von der Mischreihenfolge gültig.

Mit 26,2 % – 32,8 % liegt der Kapselrest erwartungsgemäß höher als im „inerten“ Kapselmateriale (siehe Abb.6-3). Trotzdem ist die Variabilität der Werte hier größer als bei der zugehörigen ausgebrachten Dosis, was den Beobachtungen aus „inerten“ PE-Kapseln entspricht. Anders als bei den PE-Kapseln ist dieser Trend allerdings auf eine Intrachargenvariabilität der Kapseln (siehe Kapitel 4.1.3) zurückzuführen. Durch mehr oder weniger stark ausgebildete Tröpfchen und Schuppen auf der Innenoberfläche der Kapsel wird die „Klebrigkeit“ der Kapsel beeinflusst, was sich in den Ergebnissen des Kapselrestes widerspiegelt.

325M Respitose[®]

Wird die 200M Pharmatose[®] gegen die gröbere 325M Respitose[®] ausgetauscht und alle anderen Parameter inklusive des Kapselmateriale werden konstant gehalten, zeigen sich die nachstehenden Ergebnisse.

Mit Werten im Bereich von 50,3 %– 55,0 % liegt die Ausbringung niedriger als die analog ermittelten Resultate mit 200M Pharmatose[®].

Wie anhand Abb.6-3 zu erkennen ist, lässt sich auch mit dem Zusatz mikronisierter Laktose keine Steigerung der ausgebrachten Dosis erzielen. Vielmehr sind die Resultate der Formulierungen stark inhomogen und neigen im Vergleich zum Basiswert eher zu einer reduzierten Ausbringung.

Analog den bereits beschriebenen Beobachtungen für 200M Laktose ist auch für die Kombination 325M Laktose und Gelatine-Kapseln kein Einfluss der Mischreihenfolge auf die Resultate abzuleiten.

In direktem Zusammenhang mit den niedrigen Werten der Ausbringung stehen die entsprechend höheren Resultate der Kapselretention (siehe Abb.6-3). Aufgrund des adhäsiven Kapselmateriale bleibt mehr Wirkstoff in der Kapsel zurück. Die innerhalb der einzelnen Ergebnisse auftretenden Schwankungen sind durch die Intrachargenvariabilität der Kapseln (siehe Kapitel 4.1) zu erklären.

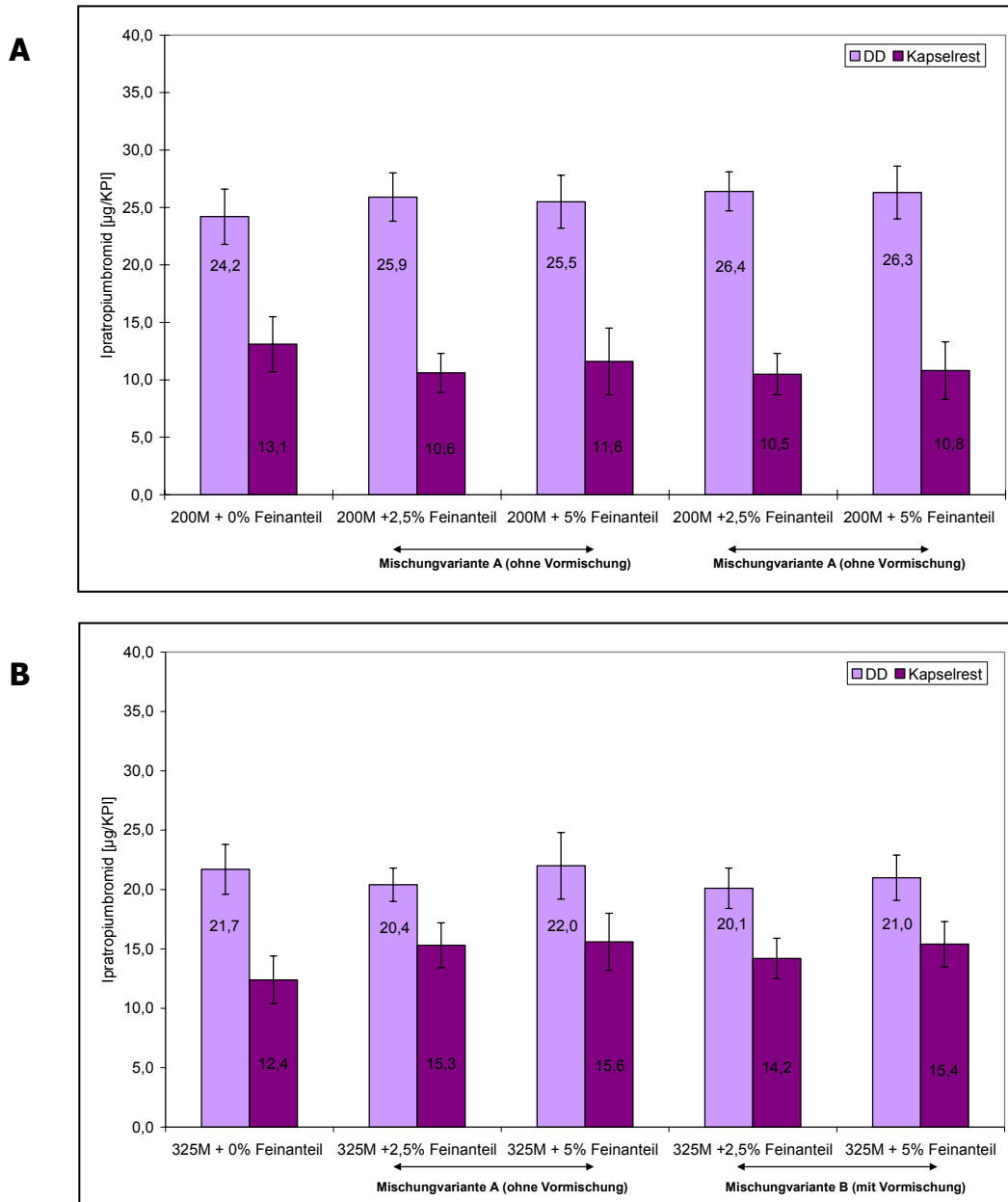


Abb.6-3 Ipratropiumbromid: Vergleich von ausgebrachter Dosis und Kapselrest aus Gelatine-Kapseln A) 200M Pharmatose® und B) 325M Respitose® (n= 40 Einzelwerte pro Formulierung)

6.1.2.2 Laktose Monohydrat

In dieser Versuchsreihe ist die Nachweisgrenze (0,1 mg/ml) des HPLC-Verfahrens mit RID empfindlich genug (siehe Kapitel 5.1.3), um Aussagen über den Kapselrest zu ermöglichen.

200M Pharmatose®

Die ausgebrachte Menge an Laktose ist mit 80,0 % – 90,4 % deutlich höher als die entsprechende ausgebrachte Dosis des Wirkstoffs. Damit ist der Effekt der „Abreicherung“ (= Wirkstoffverlust während der Ausbringung) offensichtlich auch von der Wahl des Kapselmaterials abhängig (siehe Kapitel 7.3.1). Durch den Zusatz mikronisierter Laktose ist ein leichter Anstieg der Ausbringung erreichbar, während die Mischreihenfolge keinen erkennbaren Effekt zeigt. Dies gilt auch für die Kapselretention, die im Vergleich zur „inerten“ Kapsel deutlich ansteigt (Abb.6-4).

325M Respitose®

Mit 70,9 % – 85,5 % ist die Ausbringung zwar deutlich niedriger als die des „feinen“ Trägermaterials, aber das Phänomen der „Abreicherung“ bezogen auf das Verhältnis zwischen Träger und Wirkstoff bleibt erhalten. Analog zu den Resultaten der ausgebrachten Menge zeigt sich ein Anstieg der Kapselretention (siehe Abb.6-4). Weder durch die Mischreihenfolge, noch durch den Zusatz mikronisierter Laktose lassen sich die Ergebnisse verändern.

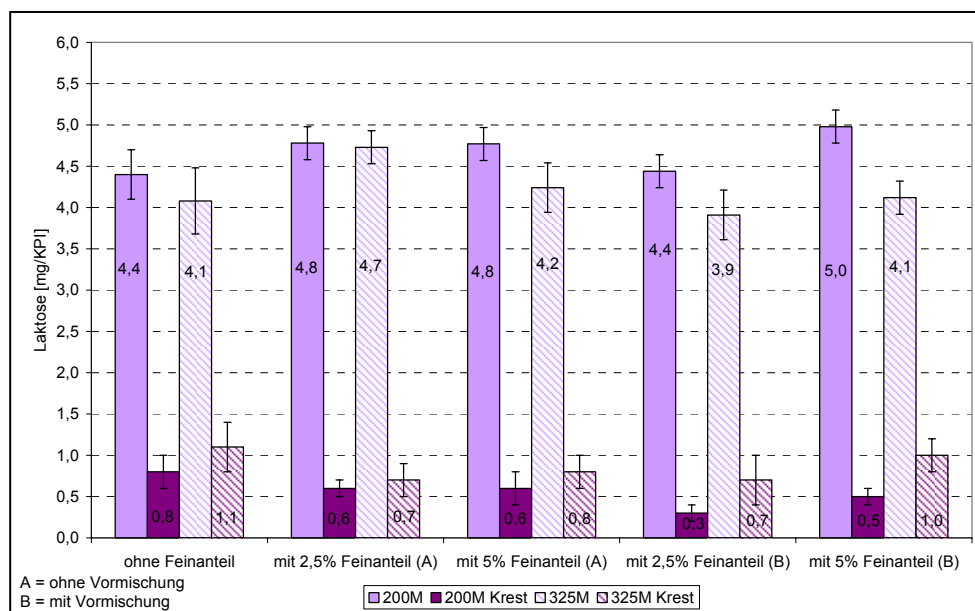


Abb.6-4 Vergleich der ausgebrachten Dosis 200M Pharmatose® und 325M Respitose® aus Gelatine-Kapseln (n= 40 Einzelwerte pro Formulierung)

6.1.3 Statistische Auswertung

Die Analyse, ob beobachtete Unterschiede zufällig oder statistisch signifikant sind (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$), wird mit dem Softwaresystem SAS[®] [91-93] basierend auf je 800 Einzelwerten der ausgebrachten Dosis durchgeführt (siehe Tabelle 6-1).

In dem Verfahren der Varianzanalyse (ANOVA), deren Ziel es, ist den Einfluss der Faktoren *Laktose*, *Kapselart*, *Mischreihenfolge* und *Anteil mikronisierter Laktose* auf den Parameter *ausgebrachte Dosis* zu untersuchen, werden alle genannten Faktoren und Wechselwirkungen als feste Faktoren berücksichtigt.

Zusätzlich zur Streuung zwischen den Einzelkapseln (Reststreuung) wird die Streuung zwischen den jeweils vier Blöcken (4x10 Kapseln) als zufällige Größe mit einbezogen, um alle Variabilitätsursachen zu berücksichtigen [94-96].

Tabelle 6-1 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
(n= Anzahl der gemessenen Kapseln pro Faktorkombination; A= ohne Vormischung; B = mit Vormischung)

Laktose 325M				Laktose 200M			
Kapselart	Mischreihenfolge	Anteil [%]	n	Kapselart	Mischreihenfolge	Anteil [%]	n
Gelatine	-	0	4 x 10	Gelatine	-	0	4 x 10
	A	2,5	4 x 10		A	2,5	4 x 10
	A	5,0	4 x 10		A	5,0	4 x 10
	B	2,5	4 x 10		B	2,5	4 x 10
	B	5,0	4 x 10		B	5,0	4 x 10
PE	-	0	4 x 10	PE	-	0	4 x 10
	A	2,5	4 x 10		A	2,5	4 x 10
	A	5,0	4 x 10		A	5,0	4 x 10
	B	2,5	4 x 10		B	2,5	4 x 10
	B	5,0	4 x 10		B	5,0	4 x 10

6.1.3.1 Statistische Bewertung zu Ipratropiumbromid

Im Rahmen der deskriptiven Statistik werden aus den 40 Einzelwerten der verschiedenen Kombinationen die jeweiligen Mittelwerte gebildet und anschließend die Variationskoeffizienten berechnet (siehe Tabelle 6-2).

Trägt man die Mittelwerte der einzelnen Kombinationen gegen die entsprechenden Variationskoeffizienten auf, sind erste Unterschiede zwischen den einzelnen Kombinationen erkennbar (siehe Abb.6-5).

So lässt sich genau zwischen den beiden Kapselarten (PE und Gelatine) unterscheiden, wobei man innerhalb der Gelatine-Kapseln zusätzlich zwischen den beiden Trägerlaktosen 200M und 325M differenzieren kann (siehe Abb.6-5).

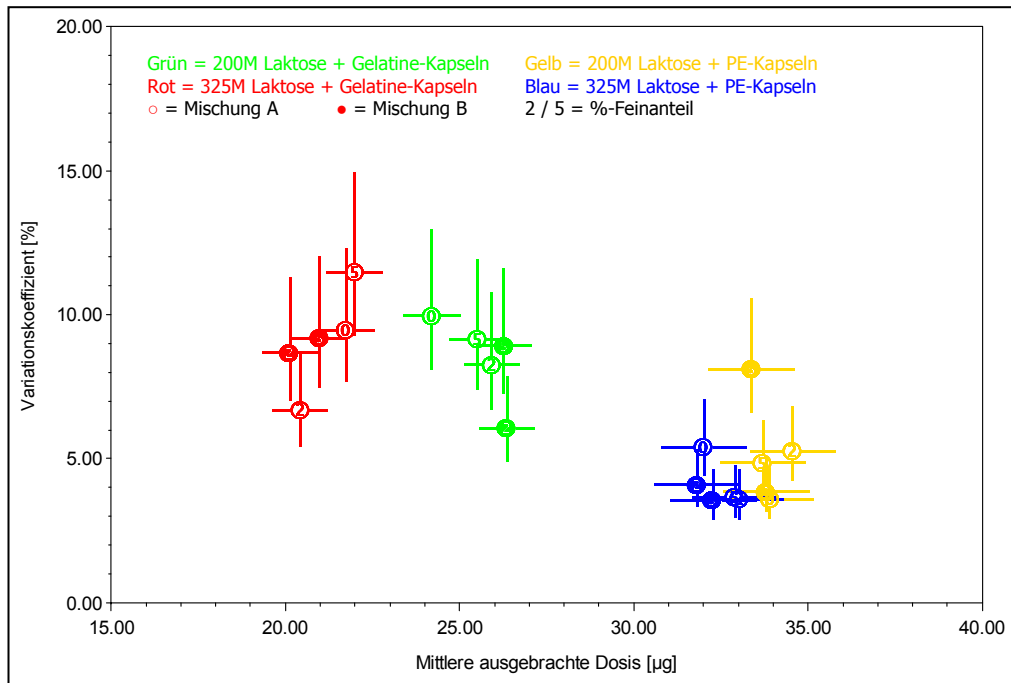


Abb.6-5 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
Grafik zur deskriptiven Statistik mit 95%-Konfidenzintervallen

Tabelle 6-2 Deskriptive Statistiken zu Ipratropiumbromid: Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis* (A = ohne Vormischung; B = mit Vormischung)

Laktose 325M						Laktose 200M					
Kapsel	Variante	Anteil [%]	n	Mittel	VK [%]	Kapsel	Variante	Anteil [%]	n	Mittel	VK [%]
Gelatine	-	0	40	21,8	9,5	Gelatine	-	0	40	24,2	10,0
	A	2,5	40	20,4	6,7		A	2,5	40	25,9	8,3
	A	5,0	40	22,0	11,5		A	5,0	40	25,5	9,1
	B	2,5	40	20,1	8,7		B	2,5	40	26,4	6,0
	B	5,0	40	21,0	9,2		B	5,0	40	26,3	8,9
PE	-	0	40	32,0	5,4	PE	-	0	40	33,9	3,6
	A	2,5	40	33,0	3,6		A	2,5	40	34,6	5,2
	A	5,0	40	32,9	3,7		A	5,0	40	33,7	4,9
	B	2,5	40	31,8	4,1		B	2,5	40	33,8	3,9
	B	5,0	40	32,3	3,5		B	5,0	40	33,4	8,1

Durch die ANOVA (siehe Tabelle 6-3 und Abb.6-6) werden für den Parameter *ausgebrachte Dosis* folgende Haupteffekte statistisch signifikant ($\alpha = 0,05$):

- Das Kapselmaterial zeigt den stärksten Einfluss. Mit PE-Kapseln lässt sich eine signifikant höhere Ausbringung erreichen als mit Gelatine-Kapseln ($p=0,0001$).
- Ebenfalls deutlich ist der Effekt der Trägerlaktose. Mit der „feinen“ 200M Laktose sind die Resultate signifikant höher als mit 325M Laktose ($p = 0,0001$).
- Im Vergleich dazu spielen alle anderen Faktoren (Anteil und Mischreihenfolge) eine eher untergeordnete Rolle. Dennoch führt die Kombination Trägerlaktose und Anteil zu einem leichten Anstieg der Ergebnisse ($p=0,0012$).
Um diesen Effekt näher zu betrachten, werden getrennte ANOVAs für beide Kapselarten durchgeführt (siehe Tabelle 6-4).

Tabelle 6-3 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
Ergebnisse der ANOVA mit allen Faktoren und Wechselwirkungen

	F-Wert	p-Wert
Haupteffekte		
Laktose	76,51	<u>0,0001</u>
Kapselart	1101,98	<u>0,0001</u>
Anteil	0,15	0,6980
Mischreihenfolge	8,68	<u>0,0034</u>
Zweifach-Wechselwirkungen		
Laktose*Kapselart	13,09	<u>0,0003</u>
Laktose*Mischreihenfolge	1,77	0,1836
Laktose*Anteil	10,69	<u>0,0012</u>
Kapselart*Mischreihenfolge	0,57	0,4514
Kapselart*Anteil	0,08	0,7814
Anteil*Mischreihenfolge	0,98	0,3226
Dreifach-Wechselwirkungen		
Laktose*Kapselart*Mischreihenfolge	0,01	0,9031
Laktose*Kapselart*Anteil	0,53	0,4680
Laktose*Anteil*Mischreihenfolge	3,08	0,0802
Kapsel*Anteil *Mischreihenfolge	0,61	0,4336
Vierfach-Wechselwirkungen		
Laktose*Kapselart*Anteil*Mischreihenfolge	0,08	0,7728

Signifikanzniveau α : 0,05

Wie in Abb.6-6 zu erkennen, wirkt sich der Einfluss des Kapselmaterials bei 325M Laktose stärker auf die Ausbringung aus als bei 200M Laktose. So erzielt man mit 200M Laktose in beiden Kapselmaterialien immer höhere DD-Werte als mit 325M Laktose, wobei dieser Trend mit Gelatine-Kapseln klarer in Erscheinung tritt. Die durchgeführte Varianzanalyse bestätigt diese Zweifach-Wechselwirkung ($p=0,0003$).

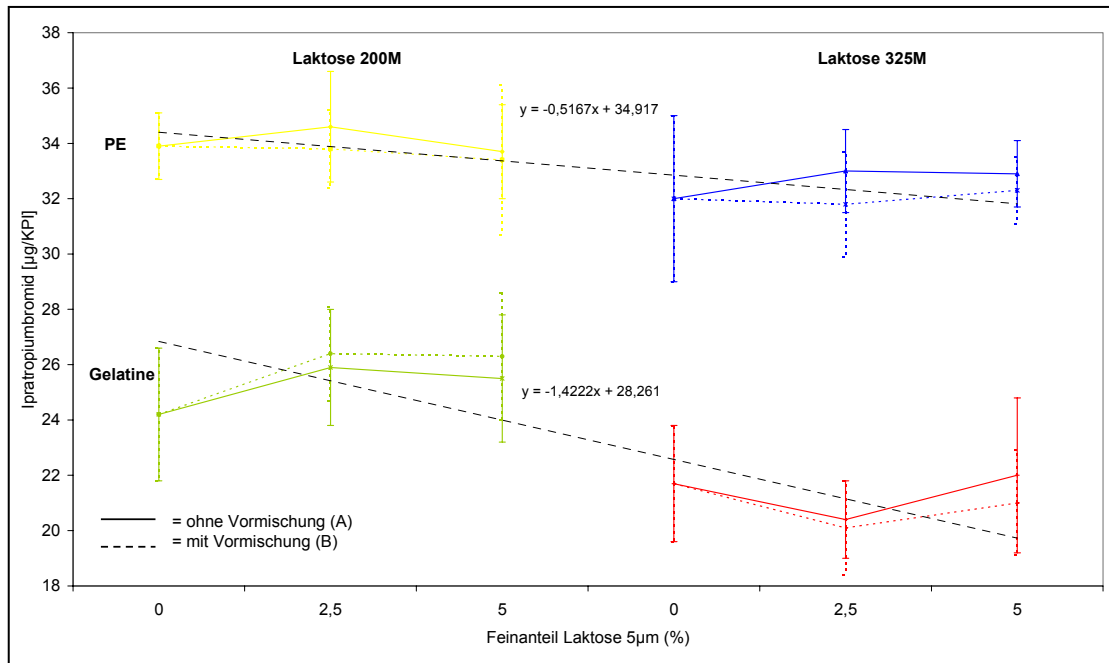


Abb.6-6 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
Grafische Darstellung der Ergebnisse (Ipratropiumbromid)

Tabelle 6-4 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
Ergebnisse der ANOVA für PE- / Gelatine-Kapseln

	PE		Gelatine	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Haupteffekte				
Laktose	14,84	0,0006	290,85	0,0001
Anteil	0,33	0,5716	2,98	0,0948
Mischreihenfolge	2,93	0,0971	0,01	0,9113
Zweifach-Wechselwirkungen				
Laktose*Mischreihenfolge	0,20	0,6549	5,18	0,0302
Laktose*Anteil	0,89	0,3542	6,85	0,0137
Anteil*Mischreihenfolge	0,35	0,5587	0,13	0,7260
Dreifach-Wechselwirkungen				
Laktose*Anteil*Mischreihenfolge	0,01	0,9204	0,92	0,3459

Signifikanzniveau α : 0,05

Durch die getrennte ANOVA bestätigt sich die Art der eingesetzten Trägerlaktose als signifikante Haupteinflussgröße. Unabhängig von der Kapselart gilt, dass 200M Laktose zu einer höheren ausgebrachten Dosis als 325M Laktose führt. Der kombinierte Effekt aus *Trägerlaktose* und *Anteil mikronisierter Laktose* ist nur für die Gelatine-Kapseln nachzuweisen (siehe Tabelle 6-4). Wie in Abb.6-6 zu erkennen, nimmt bei 200M Laktose die ausgebrachte Dosis mit Additivzusatz im Vergleich zum Basiswert zu, während bei 325M Laktose eher ein gegenläufiger Trend zu verzeichnen ist. Ein Effekt, der durch einen „Auspudereffekt“ des Feinanteils hervorgerufen wird (siehe Kapitel 7.3.2).

Die Korrelation zwischen Laktose und Mischreihenfolge ($p=0,0302$) wird ebenfalls in Abb.6-6 deutlich. So liegen mit 325M Laktose die Mittelwerte der Variante A höher als für Variante B, wohingegen sich mit 200M Laktose das umgekehrte Bild zeigt. Dieser Trend ist aber nicht hinreichend relevant, um weiter betrachtet zu werden.

6.1.3.2 Statistische Bewertung zu Laktose Monohydrat

Mit Hilfe der deskriptiven Statistik werden zuerst die Mittelwerte der jeweiligen Kombinationen bestimmt ($n=40$) und anschließend die entsprechenden Variationskoeffizienten ermittelt. Der innerhalb der Kombination 200B_5%_PE vorliegende Ausreißer wurde in den Berechnungen (siehe Tabelle 6-5) nicht berücksichtigt (Messfehler durch Injektion; wegen falscher Probenlagerung keine Nachinjektion möglich). Trägt man die mittlere ausgebrachte Dosis gegen ihren Variationskoeffizienten auf, lassen sich erste Aussagen über relevante Unterschiede machen. Es fällt analog zu Ipratropiumbromid eine Differenzierung zwischen den beiden Kapselarten auf, die allerdings schwächer ausgeprägt ist. Weniger deutlich ist auch die bei Gelatine-Kapseln auftretende Unterscheidung zwischen den beiden Trägerlaktosen (siehe Abb.6-7).

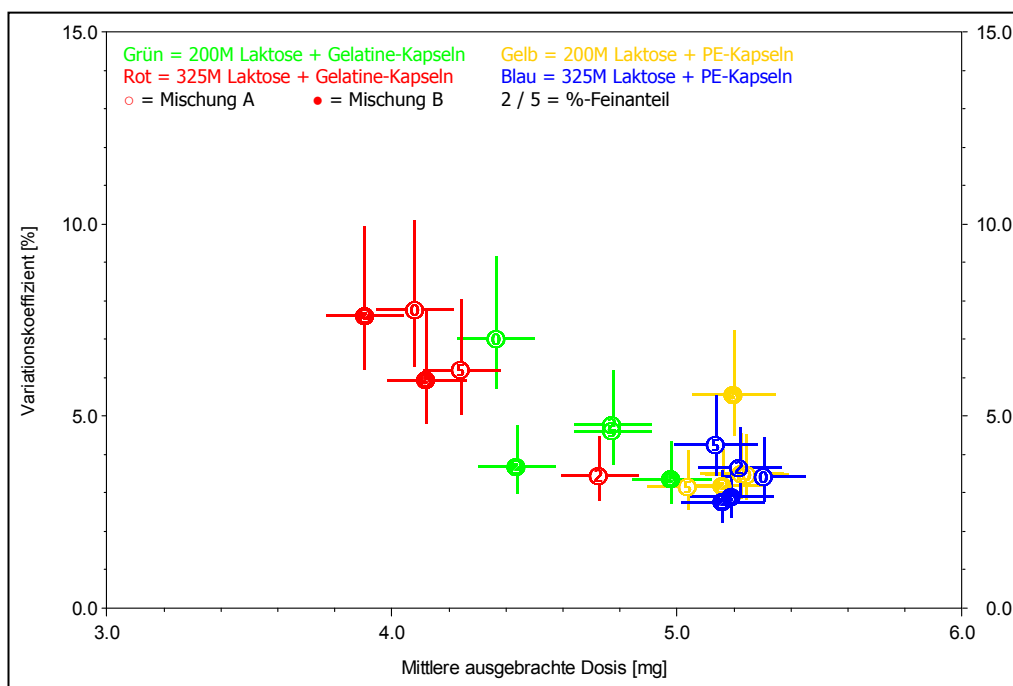


Abb.6-7 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
Grafik zur deskriptiven Statistiken mit 95%-Konfidenzintervallen

Tabelle 6-5 Deskriptive Statistiken zu Laktose: Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis* (A = ohne Vormischung; B = mit Vormischung)

Laktose 325M						Laktose 200M					
Kapsel	Variante	Anteil [%]	n	Mittel	VK [%]	Kapsel	Variante	Anteil [%]	n	Mittel	VK [%]
Gelatine	-	0	40	4,08	7,8	Gelatine	-	0	40	4,37	7,0
	A	2,5	40	4,73	3,5		A	2,5	40	4,78	4,8
	A	5,0	40	4,24	6,2		A	5,0	40	4,77	4,6
	B	2,5	40	3,91	7,6		B	2,5	40	4,44	3,7
	B	5,0	40	4,12	5,9		B	5,0	40	4,98	3,3
PE	-	0	40	5,31	3,4	PE	-	0	40	5,25	3,5
	A	2,5	40	5,22	3,6		A	2,5	40	5,23	3,5
	A	5,0	40	5,14	4,3		A	5,0	40	5,04	3,2
	B	2,5	40	5,16	2,8		B	2,5	40	5,16	3,2
	B	5,0	40	5,19	2,9		B	5,0	39	5,20	5,5

Die ANOVA identifiziert folgende Haupteffekte (siehe Tabelle 6-6 und Abb.6-8):

- Sowohl Kapselmaterial als auch Trägerlaktose führen, wie bereits für den Wirkstoff beschrieben, zu einem deutlichen Einfluss auf die ausgebrachte Dosis.
- Mischvariante A bringt tendenziell höhere Werte als Variante B. Allerdings ist dies, wie auch der Faktor Laktose-Feinanteil, eine nicht relevante Einflussgröße.

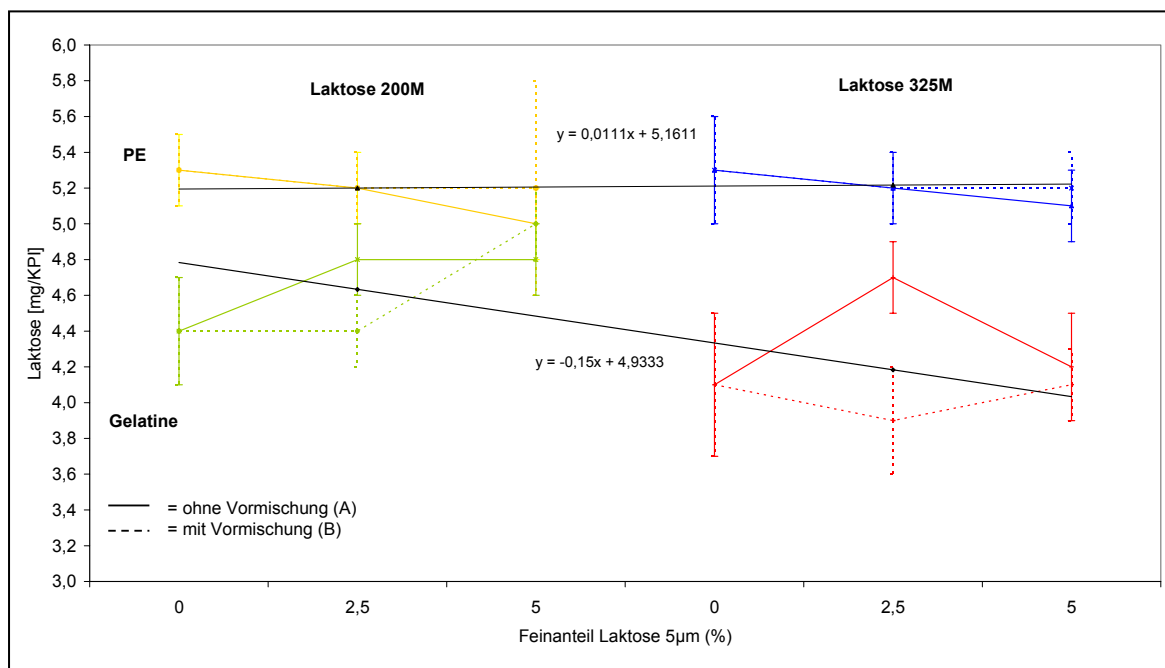


Abb.6-8 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
Grafische Darstellung der Ergebnisse (Laktose Monohydrat)

Bezüglich der Kombination Kapselart und Laktose gelten die gleichen charakteristischen Unterschiede, welche bereits für den Wirkstoff definiert wurden. So ist die Ausbringungsrate von 200M Laktose im Vergleich zur 325M Laktose immer höher. Dieser Trend kommt aber nur bei Gelatine-Kapseln offen zur Geltung ($p=0,0001$).

Tabelle 6-6 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
Ergebnisse der ANOVA mit allen Faktoren und Wechselwirkungen

	F-Wert	p-Wert
Haupteffekte		
Laktose	53,82	<u>0,0001</u>
Kapselart	544,11	<u>0,0001</u>
Anteil	2,76	0,0974
Mischreihenfolge	42,46	<u>0,0001</u>
Zweifach-Wechselwirkungen		
Laktose*Kapselart	71,46	<u>0,0001</u>
Laktose*Mischreihenfolge	0,09	0,7648
Laktose*Anteil	2,27	0,1323
Kapselart*Mischreihenfolge	0,90	0,3434
Kapselart*Anteil	0,09	0,7583
Anteil*Mischreihenfolge	20,85	<u>0,0001</u>
Dreifach-Wechselwirkungen		
Laktose*Kapselart*Mischreihenfolge	5,81	<u>0,0163</u>
Laktose*Kapselart*Anteil	42,64	<u>0,0001</u>
Laktose*Anteil*Mischreihenfolge	0,02	0,8754
Kapsel*Anteil *Mischreihenfolge	30,59	<u>0,0001</u>
Vierfach-Wechselwirkungen		
Laktose*Kapselart*Anteil*Mischreihenfolge	0,00	0,9909

Signifikanzniveau α : 0,05

Zur genaueren Betrachtung der Faktoren werden analog zum Wirkstoff getrennte Varianzanalysen für die beiden Kapselarten durchgeführt (siehe Tabelle 6-7):

Es wird deutlich, dass innerhalb der Kombinationen mit PE-Kapseln weder Trägerlaktose noch Feinanteil und Mischreihenfolge zu einer signifikanten Veränderung führen. Diese Beobachtung unterscheidet sich deutlich von den entsprechenden Ergebnissen des Wirkstoffs. Hier ist die Höhe der ausgebrachten Dosis von der Wahl der Trägerlaktose abhängig (siehe Tabelle 6-4).

In Gelatine-Kapseln dagegen erweist sich die Trägerlaktose als Haupteinflussgröße. So wird die „feine“ 200M Laktose aus Gelatine-Kapseln wesentlich besser ausgebracht als die „grobe“ 325M Laktose ($p=0,0001$).

Weiterhin lässt sich die Ausbringung des „feinen“ Trägermaterials mit Zusatz mikronisierter Laktose weiter steigern, während die ausgebrachte Dosis der „groben“ 325M Laktose mit Additivzusatz relativ inhomogen erscheint (siehe Abb.6-8).

Diese Beobachtung wird durch die Varianzanalyse (ANOVA) als signifikante Zweifach-Wechselwirkung identifiziert ($p=0,0002$).

Alle anderen Faktoren (Mischreihenfolge und daraus abgeleitete Zweifach-Wechselwirkungen) spielen im Vergleich zu den beschriebenen Effekten eine eher untergeordnete Rolle.

Tabelle 6-7 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *ausgebrachte Dosis*
Ergebnisse der ANOVA für PE- / Gelatine-Kapseln

	PE		Gelatine	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Haupteffekte				
Laktose	0,80	0,3786	97,66	<u>0,0001</u>
Anteil	1,53	0,2259	2,03	0,1641
Mischreihenfolge	0,01	0,9406	18,20	<u>0,0001</u>
Zweifach-Wechselwirkungen				
Laktose*Mischreihenfolge	0,02	0,9030	32,01	<u>0,0001</u>
Laktose*Anteil	0,59	0,4476	18,20	<u>0,0002</u>
Anteil*Mischreihenfolge	1,42	0,2431	42,76	<u>0,0001</u>
Dreifach-Wechselwirkungen				
Laktose*Anteil*Mischreihenfolge	0,03	0,8744	0,70	0,4093

Signifikanzniveau α : 0,05

6.1.3.3 Zusammenfassung

Die Höhe der ausgebrachten Dosis von Ipratropiumbromid und Laktose kann durch die betrachteten Faktoren *Kapselart*, *Trägerlaktose*, *Feinanteil* und *Mischreihenfolge* mehr oder weniger deutlich modifiziert werden. Eine genaue Quantifizierung der Einflussfaktoren erfolgt in Kapitel 7 (siehe Abb.6-9/6-10).

Insgesamt betrachtet, lassen sich für Ipratropiumbromid und Laktose identische Trends und Signifikanzen erkennen, die mögliche Abhängigkeiten der Ergebnisse vermuten lassen. Diese mögliche Korrelation wird in einem gesonderten Abschnitt genauer analysiert und bewertet (siehe Kapitel 7.4.3).

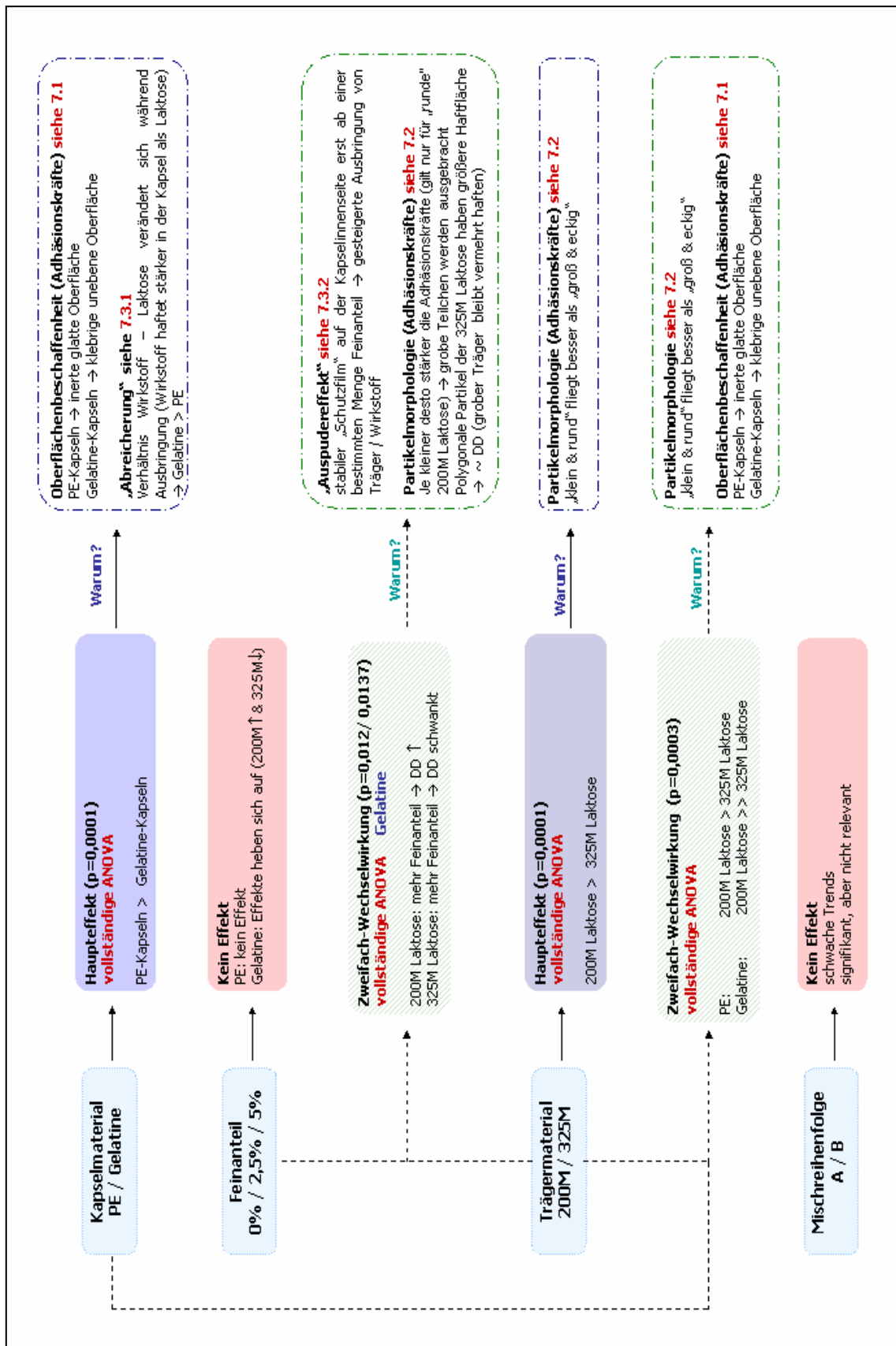


Abb.6-9 Zusammenfassung der Einflussfaktoren – statistische Auswertung und Erläuterung der Effekte auf die ausgebrachte Dosis von Ipratropiumbromid

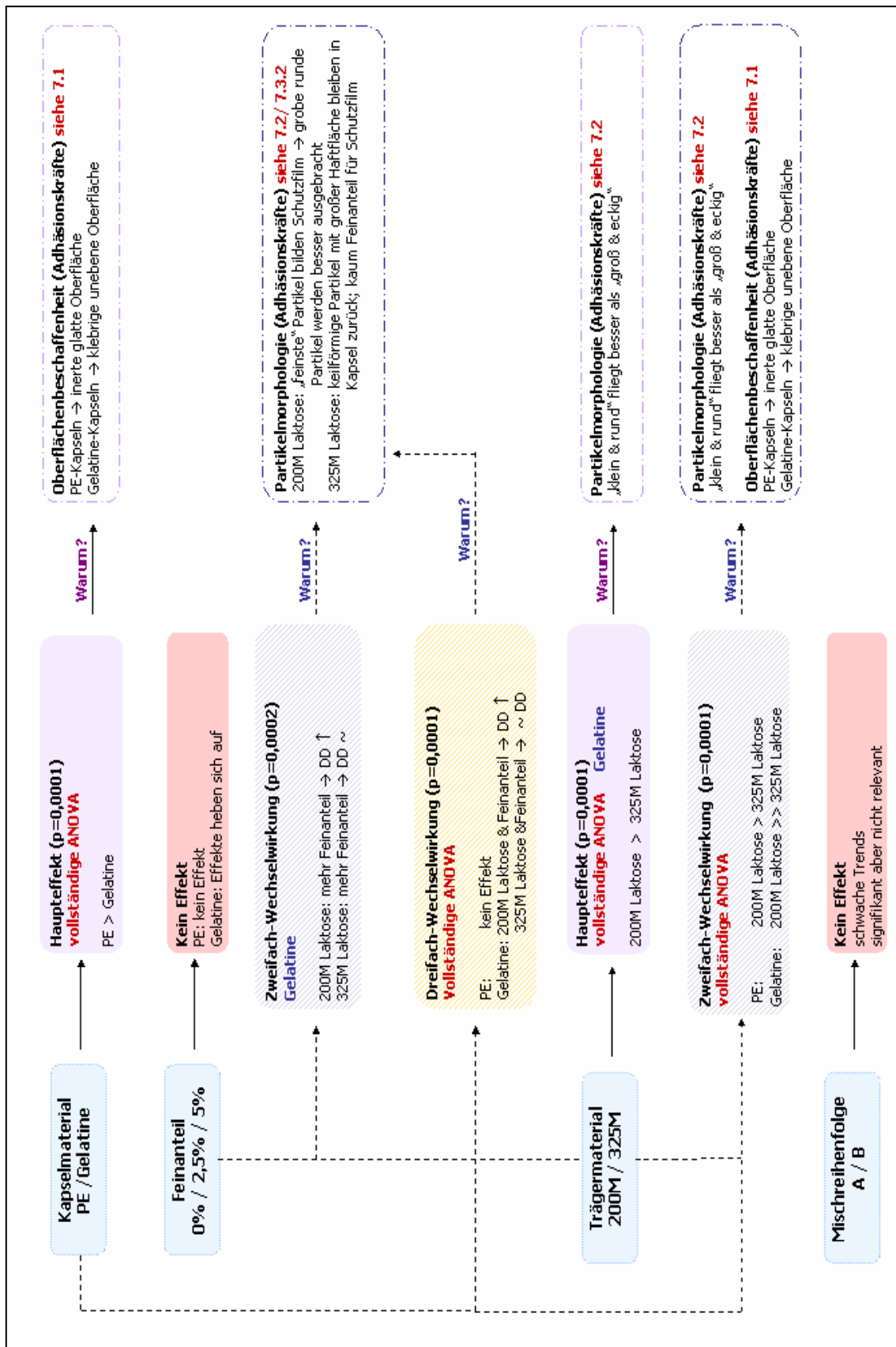


Abb.6-10 Zusammenfassung der Einflussfaktoren – statistische Auswertung und Erläuterung der Effekte auf die ausgebrachte Dosis von Laktose

6.2 Auswirkung verschiedener Einflussfaktoren auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose und Ipratropiumbromid

Um auch die Effekte der verschiedenen Einflussfaktoren *Kapselmateriale, Trägerlaktose, Feinanteil und Mischreihenfolge* auf die *Verteilung des aerodynamischen Feinanteils* von Ipratropiumbromid und Laktose zu betrachten, werden die bereits in Kapitel 6.1 verwendeten Formulierungen (jeweils $n = 4$ Kollektive) gemäß dem im Arzneibuch üblichen Verfahren (siehe Kapitel 4.2.3) analysiert und die Ergebnisse bewertet.

6.2.1 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aus PE-Kapseln

Im praktisch inerten Kapselmateriale PE können die nachfolgend beschriebenen Auswirkungen der Einflussfaktoren auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid und Laktose beobachtet werden.

6.2.1.1 Ipratropiumbromid

200M Pharmatose®

Mit den verschiedenen Formulierungen des „feinen“ Trägermaterials ergeben sich inhalierbare Anteile zwischen 42,0 % und 48,5 % (Gruppen 2+3), bezogen auf die mittlere Einwaage eines Kollektivs. Um eine genauere Betrachtung der aerodynamischen Partikelgrößenverteilung vorzunehmen, erfolgt eine gruppenweise Auswertung gemäß den Vorgaben der FDA (siehe Tabelle 2-1).

Tabelle 6-8 Ergebnisse der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid aus PE-Kapseln (Träger: 200M Laktose mit unterschiedlichen Anteilen Additiv; $n = 4$ MW \pm SD)

	0%	ohne Vormischung (A)		mit Vormischung (B)	
		2,5 %	5 %	2,5%	5%
Gruppe 1 (PP0-1)	2,9 \pm 0,1 μ g	2,9 \pm 0,2 μ g	2,7 \pm 0,1 μ g	2,7 \pm 0,1 μ g	3,0 \pm 0,2 μ g
Gruppe 2 (PP2-4)	14,5 \pm 0,4 μ g	16,0 \pm 0,6 μ g	16,3 \pm 0,3 μ g	16,7 \pm 0,5 μ g	16,8 \pm 0,4 μ g
Gruppe 3 (PP5-Filter)	2,3 \pm 0,2 μ g	2,7 \pm 0,2 μ g	2,9 \pm 0,2 μ g	2,6 \pm 0,2 μ g	2,4 \pm 0,3 μ g

Der in Tabelle 6-8 und Abb.6-11 aufgezeigte Unterschied zwischen dem Basiswert ohne Feinanteil (0%) und den Werten mit Feinanteil (2,5 % und 5%) in Gruppe 2 (PP2 – PP4) zeigt, dass durch den Zusatz mikronisierter Laktose ein deutlicher Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung und damit auf die inhalierbaren Anteile von Ipratropiumbromid erzielt wird. Allerdings ist eine genauere Differenzierung zwischen den Anteilen der mikronisierten Laktose und der Höhe der aerodynamischen Partikelgrößenverteilung nicht möglich. Es stellt sich anscheinend eine „Sättigung“ ein.

Eng verbunden mit dem Anstieg in Gruppe 2 ist eine Reduktion der Ergebnisse im Präseparator (siehe Abb.6-11). Bedingt durch die mikronisierte Laktose bleibt offensichtlich weniger Wirkstoff im Vorabscheider zurück, was sich merklich auf die niedergeschlagene Wirkstoffmenge im Kaskadenimpaktor auswirkt.

Die Verteilung auf den PP0 - PP1 (Gruppe 1) und den PP5 - Filter (Gruppe 3) wird von der Zusammensetzung des Trägers nicht beeinflusst. Auch ein Einfluss des Mischprozesses auf die Resultate ist, bedingt durch die Streuung der Ergebnisse (siehe Abb.6-11), nicht gegeben.

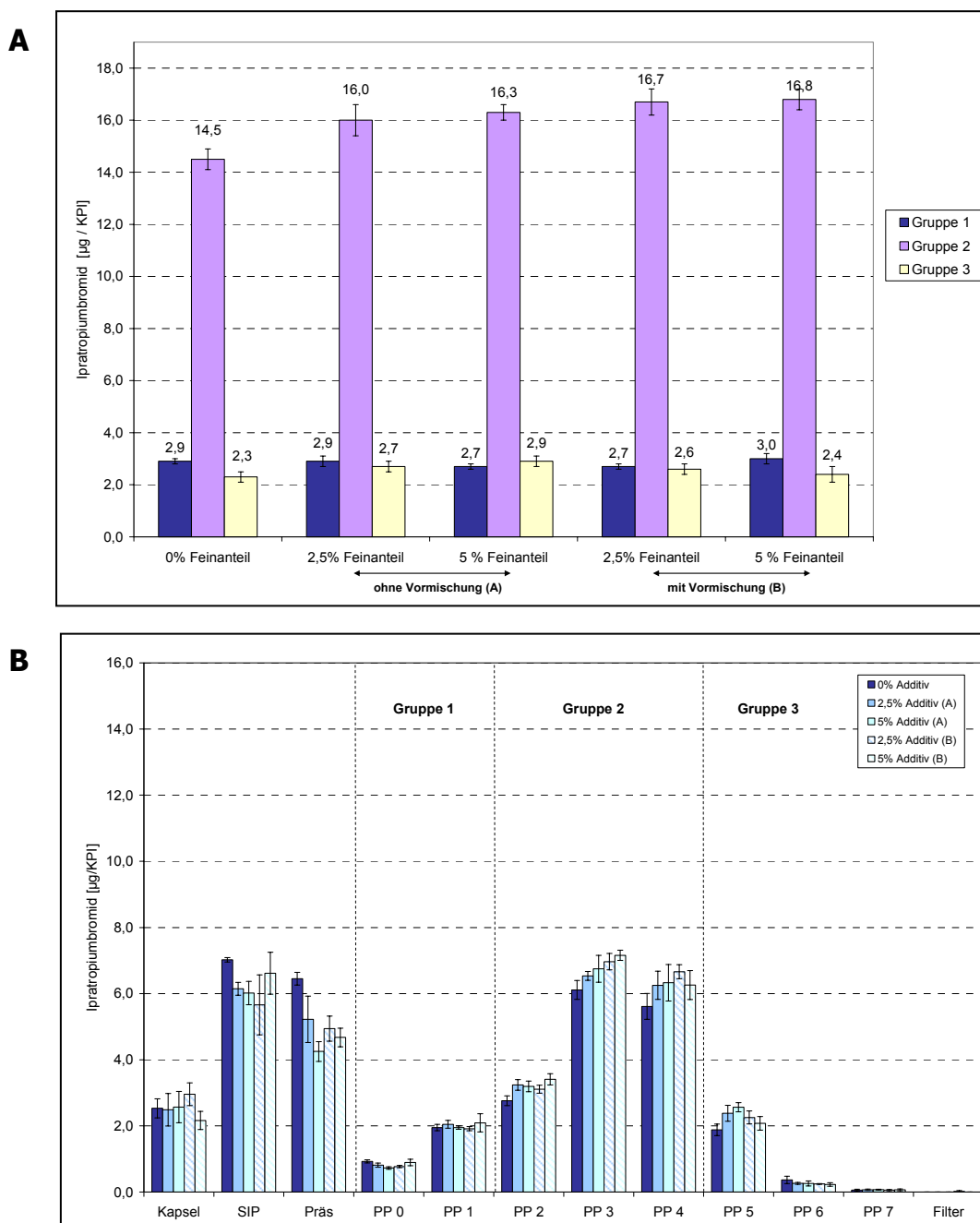


Abb.6-11 Grafische Darstellung der Ipratropiumbromid-Verteilung (200M Laktose / PE-Kapseln)
 A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter
 (n=4 Kollektive pro Formulierung; MW ± SD)

325M Respitose®

Wird die 325M Laktose als Träger eingesetzt, ergeben sich folgende Ergebnisse: Der gesamte inhalierbare Feinanteil (Gruppe 2+3) liegt mit Werten zwischen 25,7 % und 40,6 % niedriger als die entsprechenden Resultate mit 200M Pharmatose®. Dieses Ergebnis war nach den Ergebnissen der ausgebrachten Dosis zu erwarten. Zur genaueren Betrachtung werden auch hier die Ergebnisse nach Gruppen aufgeschlüsselt und entsprechend bewertet (siehe Tabelle 6-9).

Tabelle 6-9 Ergebnisse der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid aus PE-Kapseln (Träger: 325M Laktose mit unterschiedlichen Anteilen Additiv; n= 4 MW ± SD)

	ohne Vormischung (A)			mit Vormischung (B)	
	0%	2,5 %	5 %	2,5%	5%
Gruppe 1 (PP0-1)	1,3 ± 0,1 µg	1,9 ± 0,2 µg	2,5 ± 0,2 µg	2,4 ± 0,3 µg	2,6 ± 0,1 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	9,2 ± 0,7 µg	12,0 ± 0,7 µg	14,8 ± 0,4 µg	12,6 ± 1,5 µg	14,9 ± 1,6 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	1,1 ± 0,3 µg	1,6 ± 0,1 µg	1,5 ± 0,2 µg	1,4 ± 0,2 µg	1,5 ± 0,3 µg

Im Vergleich zur 200M Pharmatose® tritt hier der „Umhüllungs-Effekt“ des zugesetzten Feinanteils und damit der verbunden die gesteigerte inhalierbare Wirkstoffmenge viel stärker in Erscheinung.

Am offensichtlichsten zeigt sich dies erneut in Gruppe 2 (PP2 - PP4). Hier kann nicht nur zwischen den Resultaten des Basiswertes ohne Feinanteil (0% Additiv) und den Formulierungen mit Feinanteil (2,5% und 5% Additiv) unterschieden werden. Es ist auch eine Differenzierung zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Additivmengen (0% < 2,5% < 5%) möglich (siehe Abb.6-12).

In Gruppe 1 (PP0 – PP1) ist dagegen nur eine Unterscheidung zwischen dem Basiswert (0% Additiv) und den Resultaten mit Feinanteil möglich. Eine weitere Differenzierung innerhalb der Formulierungen mit Feinanteil ist nicht zu erkennen. Die Ergebnisse der Gruppe 3 (PP5 - Filter) werden nur gering beeinflusst (siehe Abb.6-12).

Auch im Fall der 325M Repsitose® ist die gesteigerte Wirkstoffverteilung im Kaskadenimpaktor mit einer deutlichen Reduktion des Wirkstoffgehalts im Präseparator verbunden (siehe Abb.6-12).

Ein „Überziehen“ des Carriers mit mikronisierter Laktose und, damit verbunden, ein leichteres Abspalten der Wirkstoffpartikel von der Trägeroberfläche ist wahrscheinlich („Umhüllungs-Effekt“). Gestützt wird diese These durch den sehr hohen Präseparatoranteil des „groben“ Trägermaterials (325M Laktose > 200M Laktose). Da die 325M Laktose fast keinen eigenen Feinanteil besitzt, wird der Wirkstoff viel stärker als dies bei 200M Laktose möglich ist, an die groben Partikel gebunden. Aus diesem Grund kommen hier, die durch den Zusatz mikronisierter Laktose ausgelösten Effekte viel stärker zur Geltung, was an den Ergebnissen (Gruppe 2 und Präseparator) deutlich zu erkennen ist (siehe Abb.6-12/6-13).

Alle genannten Effekte zeigen sich unabhängig von der Mischvariante. Damit ist erneut ein Einfluss der Mischreihenfolgen auf die aerodynamischen Eigenschaften ausgeschlossen.

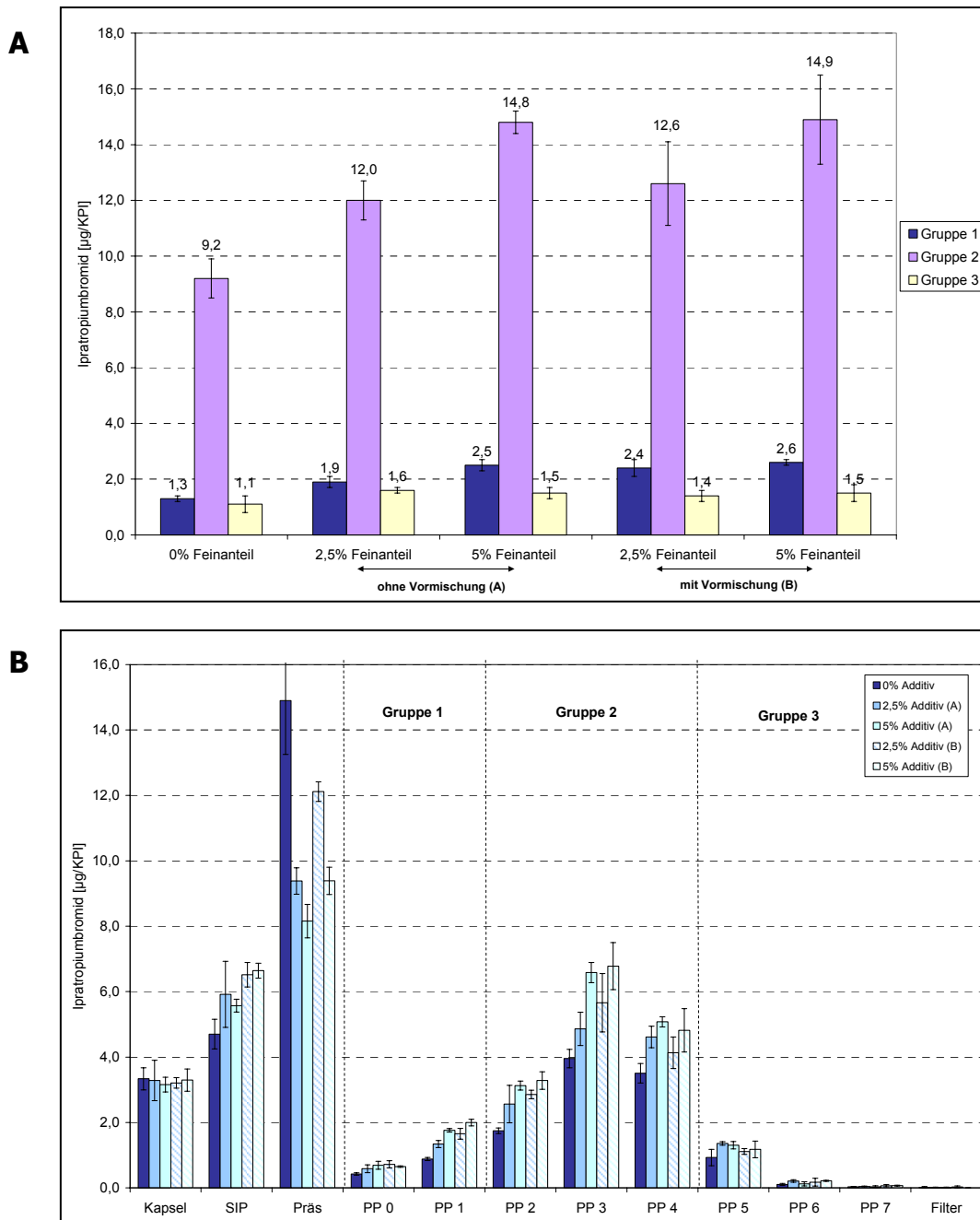


Abb.6-12 Grafische Darstellung der Ipratropiumbromid-Verteilung (325M Laktose / PE-Kapseln)
 A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter
 (n=4 Kollektive pro Formulierung, MW ± SD)

6.2.1.2 Laktose Monohydrat

In diesem Fall wird die Anzahl der zu untersuchenden Formulierungen auf die beiden Mischvarianten A/B mit jeweils 2,5 % Feinanteil reduziert. Da der Probenumfang pro Formulierung ($n = 4$) beibehalten wird, bleibt eine statistische Bewertung aller wichtigen Einflussfaktoren trotzdem möglich. Um weiterhin eine direkte Korrelation zwischen den Ergebnissen von Wirkstoff und Träger herzustellen, werden die Probelösungen erneut auf den Gehalt an Ipratropiumbromid untersucht und entsprechend mit den Resultaten der Laktose korreliert (siehe Kapitel 7.4.4).

Tabelle 6-10 eingesetzte Formulierungen zur Bestimmung der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose (A = ohne Vormischung; B = mit Vormischung)
(n = Anzahl Kollektive pro Formulierung)

Laktose 325M				Laktose 200M			
Kapselart	Mischreihenfolge	Anteil (%)	n	Kapselart	Mischreihenfolge	Anteil (%)	n
Gelatine	-	0	4	Gelatine	-	0	4
	A	2,5	4		A	2,5	4
	B	2,5	4		B	2,5	4
PE	-	0	4	PE	-	0	4
	A	2,5	4		A	2,5	4
	B	2,5	4		B	2,5	4

200M Pharmatose®

Analog zur Wirkstoffverteilung werden die Resultate nach Gruppen klassifiziert und bewertet (siehe Tabelle 6-11 und Abb.6-13). Die inhalierbaren Anteile (Gruppen 2+3) des Trägermaterials liegen zwischen 2,3 % und 3,8 %.

Bereits der Basiswert ohne zusätzlichen Feinanteil besitzt, bedingt durch die relativ breite Partikelgrößenverteilung des „feinen“ Trägermaterials, große inhalierbare Anteile. Durch Zusatz mikronisierter Laktose wird der inhalierbare Anteil weiter gesteigert, wobei besonders die Gruppen 1 und 2 beeinflusst werden. So steigen die Ergebnisse mit Feinanteil im Vergleich zum Basiswert insgesamt um etwa 2,5 % an. Dieser Anstieg des inhalierbaren Laktoseanteils ist ein Indiz für die quantitative Verteilung der zugesetzten Laktose auf den PP0 - PP4.

Die Ergebnisse auf den PP5 – Filter (Gruppe 3) bleiben dagegen durch den zusätzlichen Laktose-Feinanteil unberührt. Hier kann sich, bedingt durch die mittlere Partikelgröße des eingesetzten Additivs (5 – 10µm) keine mikronisierte Laktose niederschlagen und somit nachgewiesen werden.

Tabelle 6-11 Ergebnisse der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid aus PE-Kapseln (Träger: 200M Laktose mit unterschiedlichen Anteilen Additiv; n= 4; MW ± SD)

	ohne Vormischung (A)		mit Vormischung (B)
	0%	2,5 %	2,5%
Gruppe 1 (PP0-1)	124,0 ± 8,1 µg	172,5 ± 11,9 µg	189,6 ± 4,5 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	108,8 ± 15,0 µg	174,9 ± 3,0 µg	195,5 ± 11,7 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	17,8 ± 5,7 µg	17,3 ± 0,5 µg	14,9 ± 1,4 µg

Der geringe Kapselrest (siehe Abb.6-13B) belegt den geringen Einfluss des Kapselmaterials auf die aerodynamische Partikelgrößenverteilung. Analog zu den Beobachtungen des Wirkstoffs sind auch hier alle Ergebnisse unabhängig von der Mischreihenfolge (siehe Abb.6-13).

325M Respitose®

Im Vergleich zur 200M Pharmatose® liegen die Ergebnisse insgesamt deutlich niedriger (siehe Abb.6-13). Dies lässt sich durch die engere Partikelgrößenverteilung des „groben“ Trägermaterials erklären. Dennoch besitzt der Basiswert einen inhalierbaren Anteil (Gruppe 2+3) von 0,7 % und kann - unabhängig von der Mischreihenfolge - durch Zusatz von mikronisierter Laktose auf etwa 1,2 % gesteigert werden (siehe Tabelle 6-12).

Anders als bei den Ergebnissen der 200M Pharmatose® ist hier ein Effekt auf alle Gruppen zu erkennen. So wird durch den Zusatz mikronisierter Laktose sowohl die Verteilung auf den PP0 – PP4 (Gruppe 1+2) als auch auf den PP5 - Filter (Gruppe 3) gesteigert (siehe Abb.6-13).

Tabelle 6-12 Ergebnisse der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid aus PE-Kapseln (Träger: 325M Laktose mit unterschiedlichen Anteilen Additiv; n= 4; MW ± SD)

	ohne Vormischung (A)		mit Vormischung (B)
	0%	2,5 %	2,5%
Gruppe 1 (PP0-1)	59,27 ± 8,8 µg	77,4 ± 29,5 µg	101,11 ± 19,3 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	37,63 ± 1,0 µg	62,40 ± 2,0 µg	60,69 ± 2,4 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	nicht nachweisbar	2,69 ± 5,4 µg	5,66 ± 6,6 µg

Bedingt durch die größeren Materialeigenschaften der 325M Laktose ist der Präseparator-Anteil deutlich höher als für die Formulierungen mit der „feinen“ 200M Laktose. Folglich steht weniger Laktose zur Verteilung im Kaskadenimpaktor zur Verfügung. Dies ist an den Resultaten deutlich nachvollziehbar (siehe Abb.6-13). Bezogen auf den geringen Kapselrest gelten die gleichen Aussagen, wie bereits für die 200M Laktose festgestellt.

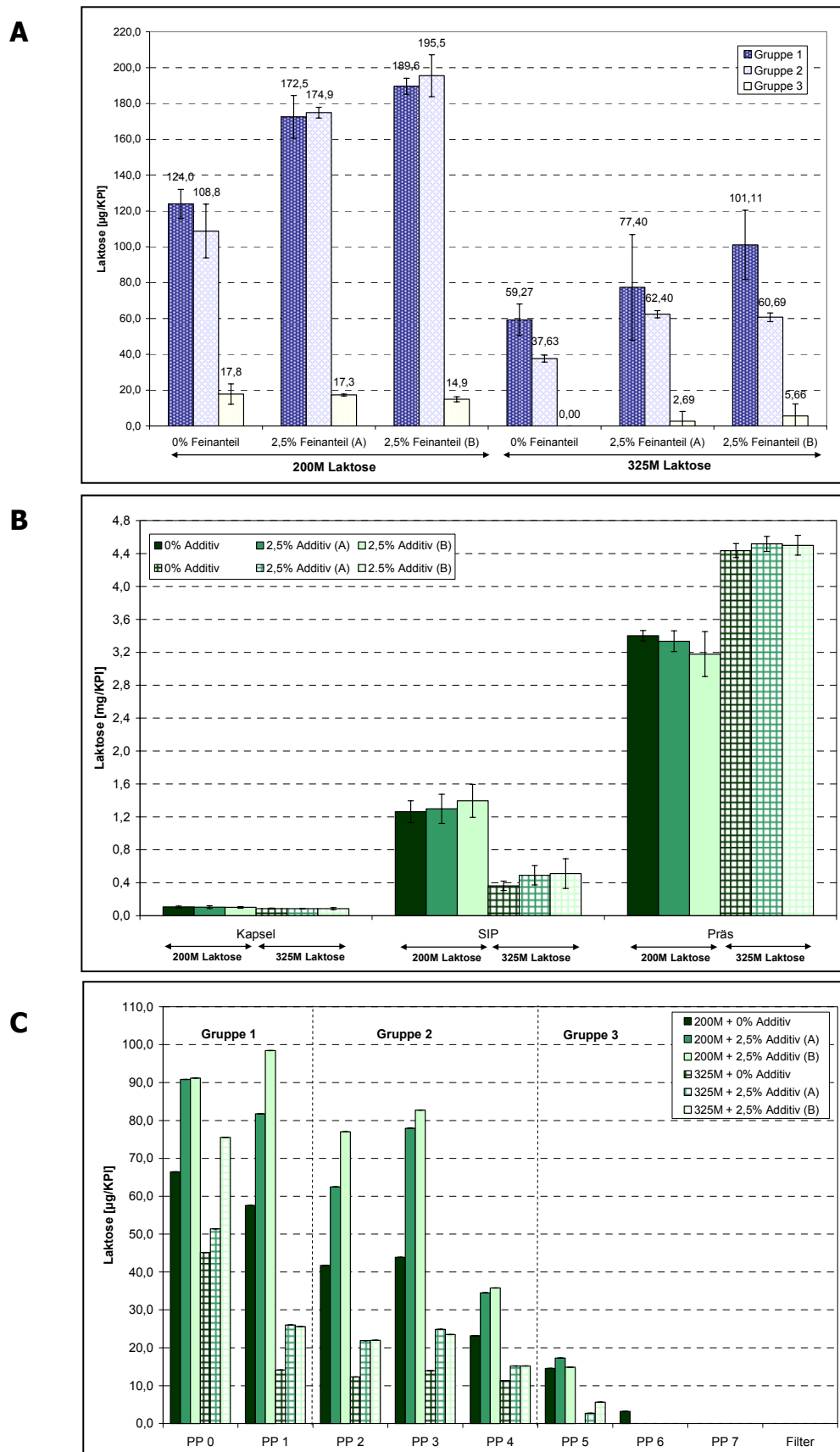


Abb.6-13 vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 200M und 325M Laktose in PE-Kapseln (A = ohne Vormischung, B = mit Vormischung)
 A) Übersicht der Gruppen 1-3; B) Verteilung von Kapsel bis Präseparator und C) Verteilung von PP0 bis Filter (n=4 Kollektive pro Formulierung; MW± SD)

6.2.2 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aus Gelatine-Kapseln

Die Formulierungen werden in allen Kombinationen konstant gehalten und einzig das Kapselmaterial PE durch die stärker adhäsiven Gelatine-Kapseln ausgetauscht. Auf diese Weise wird der Einfluss des Kapselmaterials auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils evaluiert und entsprechend bewertet.

6.2.2.1 Ipratropiumbromid

200M Pharmatose®

Für die verschiedenen Formulierungen ergeben sich, wie nach den Ergebnissen der ausgebrachten Dosis zu erwarten war, niedrigere inhalierbare Anteile (Gruppen 2+3), die im Bereich von 18,9 % - 26,0 % liegen.

In Gruppe 2 ist eine Unterscheidung zwischen dem Basiswert ohne Feinanteil und den Formulierungen mit Feinanteil möglich. Hier zeigt sich der bereits bei den PE-Kapseln beschriebene „Umhüllungs-Effekt“ (siehe Tabelle 6-13) der mikronisierten Laktose. Allerdings ist eine weitere Differenzierung zwischen der prozentualen Zusammensetzung des Trägers und den Ergebnissen der Gruppe 2 nicht möglich.

Analog zu den Ergebnissen aus PE-Kapseln kommt es mit steigender Additivmenge zu einer Reduktion des Wirkstoffanteils im Präseparator (siehe Abb.6-14). Durch die mikronisierte Laktose wird der Wirkstoff leichter vom Carrier abgetrennt und kann sich besser auf den PP2 - PP4 verteilen. Die Verteilung auf den PP0 - PP1 sowie auf den PP5 - Filter wird durch den Additivzusatz nicht verändert. Auch eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Mischvariante ist nicht zu erkennen (siehe Abb.6-14).

Tabelle 6-13 Ergebnisse der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid aus Gelatine-Kapseln (Träger: 200M Laktose mit unterschiedlichen Anteilen Additiv; n= 4; MW ± SD)

	ohne Vormischung (A)			mit Vormischung (B)	
	0%	2,5 %	5 %	2,5%	5%
Gruppe 1 (PP0-1)	1,8± 0,1 µg	2,5 ± 1,1 µg	2,1 ± 0,2 µg	2,0 ± 0,3 µg	1,8 ± 0,4 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	6,9 ± 0,5 µg	8,7 ± 0,7 µg	9,3 ± 0,6 µg	9,2 ± 0,6 µg	9,2 ± 1,9 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	0,6 ± 0,1 µg	0,9 ± 0,1 µg	0,9 ± 0,1 µg	1,2 ± 0,2 µg	1,1 ± 0,3 µg

Sehr deutlich erkennbar ist dagegen der Einfluss des Kapselmaterials auf die Verteilung bzw. die Höhe der ausgebrachten Mengen. So liegen im Vergleich zur PE-Kapsel die Ergebnisse der Verteilung deutlich niedriger, während die Kapselretention um den Faktor fünf ansteigt (siehe Abb.6-11/6-14).

Betrachtet man die theoretische Ausbringung der entsprechenden Formulierungen (Gesamtbilanzierung von Kapsel - Filter; siehe Tabelle 6-14) wird eine Verknüpfung zwischen Höhe der ausgebrachten Wirkstoffmenge und Verteilung sichtbar:

Je geringer die theoretisch ausgebrachte Dosis, desto weniger Wirkstoff verteilt sich somit im Kaskadenimpaktor.

Tabelle 6-14 Theoretisch ausgebrachte Dosen (Summe SIP bis Filter) bei Verwendung von Gelatine-Kapseln (n= 4; MW ± SD)

	ohne Vormischung (A)			mit Vormischung (B)	
	0%	2,5 %	5 %	2,5%	5%
DD-Wert	21,1 ± 1,7 µg	22,5 ± 2,6 µg	22,8 ± 1,2µg	22,7 ± 1,3 µg	20,9 ± 3,1 µg

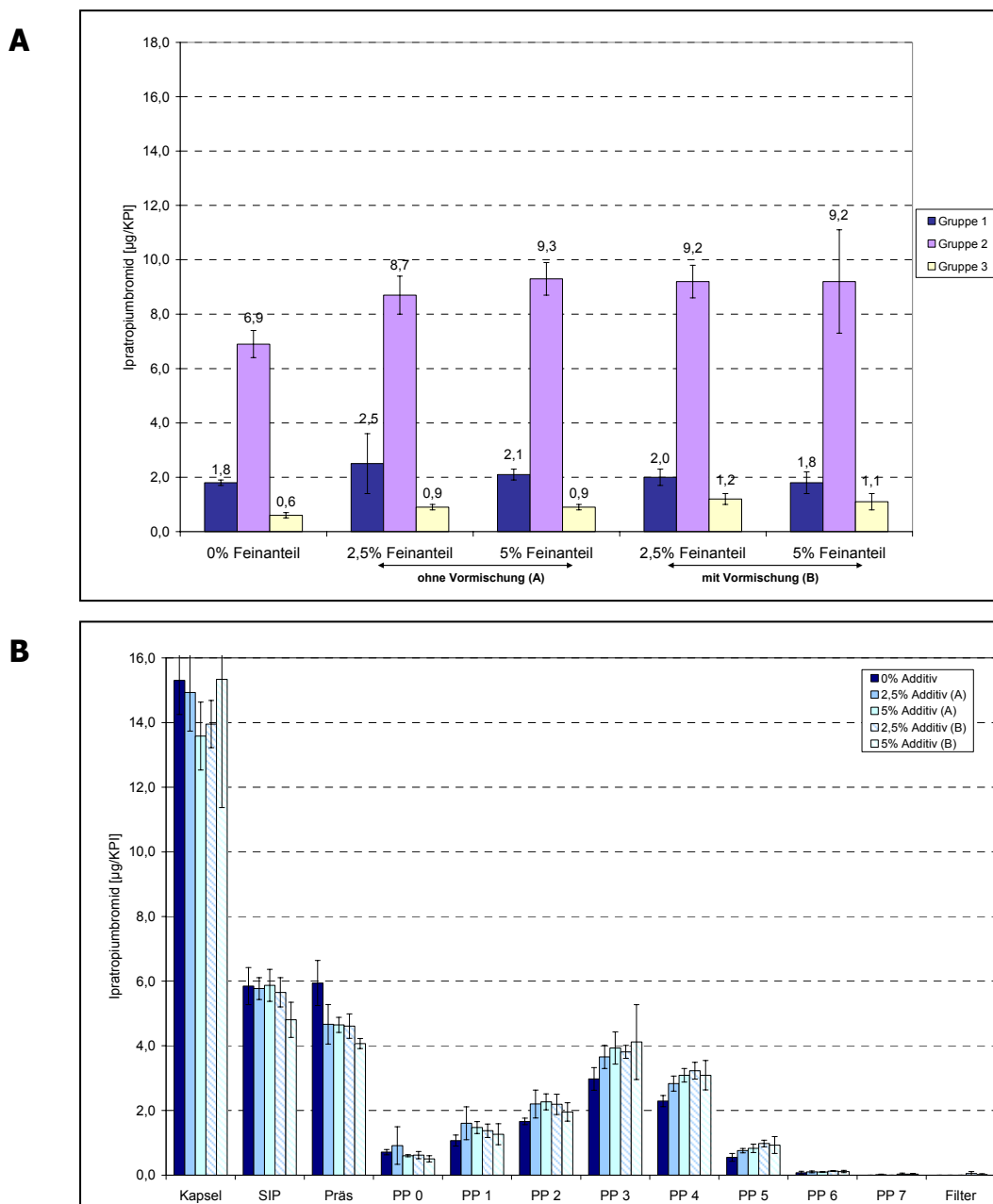


Abb.6-14 Grafische Darstellung der Ipratropiumbromid-Verteilung (200M Laktose / Gelatine-Kapseln) A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter (n=4 Kollektive pro Formulierung, MW ± SD)

325M Respitose®

Mit Werten im Bereich von 13,0 % - 16,75 % liegt der inhalierbare Anteil (Gruppen 2+3) deutlich niedriger als aus PE-Kapseln (25,7 % - 40,6%). Auch hat sich die Auswirkung auf die drei Gruppen deutlich verändert. So ist die signifikante Veränderung der Ergebnisse durch mikronisierte Laktose nicht mehr erkennbar (siehe Tabelle 6-15). Stattdessen zeigt sich bei den verschiedenen Formulierungen eine deutliche Verschiebung zwischen den Resultaten von Kapselrest und Präseparator: Die Kapselretention steigt im Vergleich zur „inerten“ PE-Kapsel um den Faktor sieben an, zusätzlich wird sie durch mikronisierte Laktose sogar noch weiter gesteigert. Parallel dazu ist eine Reduktion der Präseparator-Anteile zu erkennen (siehe Abb.6-12/6-15).

Tabelle 6-15 Ergebnisse der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid aus Gelatine-Kapseln (Träger: 325M Laktose mit unterschiedlichen Anteilen Additiv; n= 4; MW ± SD)

	0%	ohne Vormischung (A)		mit Vormischung (B)	
		2,5 %	5 %	2,5%	5%
Gruppe 1 (PP0-1)	0,9± 0,2 µg	1,2 ± 0,1 µg	1,3 ± 0,1 µg	1,4 ± 0,3 µg	1,3 ± 0,2 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	5,0 ± 0,3 µg	5,7 ± 0,4 µg	6,2 ± 0,7 µg	4,8 ± 0,7 µg	4,9 ± 0,4 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	0,5 ± 0,1 µg	0,4 ± 0,0 µg	0,4 ± 0,1 µg	0,4 ± 0,0 µg	0,4 ± 0,1 µg

Der durch den Feinanteil weniger stark gebundene Wirkstoff wird offensichtlich nicht besser dispergiert und im Kaskadenimpaktor verteilt. Vielmehr werden die Wirkstoffpartikel bevorzugt an der Kapselwand zurückgehalten (siehe Kapitel 7.3.1).

Neben den stärkeren Hafteigenschaften des Kapselmaterials liefert auch die Partikelmorphologie des Trägermaterials eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse. Wie in Abb.4-2 zu erkennen, liegt die 325M Respitose® bevorzugt als „keilförmige“ Trägerpartikel vor. Diese groben Teilchen weisen bedingt durch ihre Form eine größere Haftfläche auf, wodurch auch grobe Teilchen - und damit der gebundene Wirkstoff - an der Kapselinnenseite haften (siehe Kapitel 7.2 und 7.3.2).

Die zweite Funktion des Laktosefeinanteils - neben dem „Coaten“ der Trägerpartikel - einen „Schutzfilm“ auf der Kapselinnenseite zu bilden und damit die Retention zu vermindern, wird ebenfalls nicht ausreichend erfüllt. So führt der zugesetzte Laktosefeinanteil nicht, wie bereits aus Kapitel 6.1 bekannt, zu einer höheren ausgebrachten Dosis sondern eher zu niedrigeren DD-Resultaten. Eine Beobachtung, die sich auch in den theoretisch ermittelten Ergebnissen der Ausbringung widerspiegelt (Gesamtbilanzierung siehe Tabelle 6-16).

Tabelle 6-16 Theoretisch ausgebrachte Dosen (Summe SIP bis Filter) bei Verwendung von Gelatine-Kapseln (n= 4; MW ± SD)

	0%	ohne Vormischung (A)		mit Vormischung (B)	
		2,5 %	5 %	2,5%	5%
DD-Wert	21,5 ± 0,6 µg	19,5 ± 0,8 µg	18,5 ± 1,1 µg	19,6 ± 1,4 µg	17,9 ± 0,8 µg

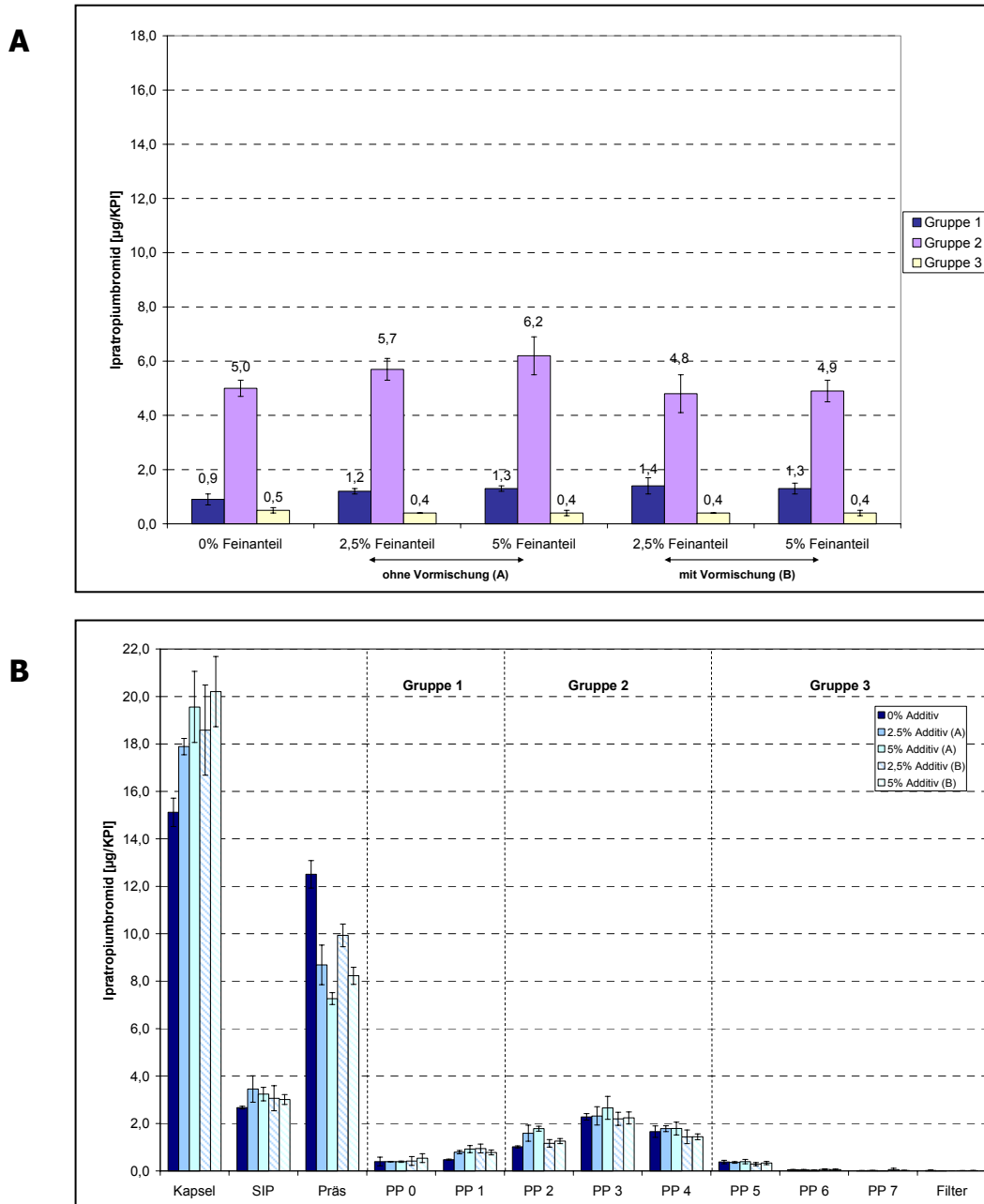


Abb.6-15 Grafische Darstellung der Ipratropiumbromid-Verteilung (325M Laktose / Gelatine-Kapseln) A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter (n=4 Kollektive pro Formulierung, MW ± SD)

6.2.2.2 Laktose Monohydrat

Auch bei der Evaluierung des Effekts von Gelatine-Kapseln auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose wird die Anzahl der zu untersuchenden Formulierungen auf die beiden Mischvarianten A/B mit jeweils 2,5 % Feinanteil reduziert (siehe Kapitel 6.2.1.2). Weiterhin werden die Probelösungen auf den Gehalt an Ipratropiumbromid untersucht, um eine direkte Korrelation zwischen den Ergebnissen von Wirkstoff und Träger herzustellen (siehe Kapitel 7.4.4).

200M Pharmatose®

Analog zu den Beobachtungen mit Ipratropiumbromid fallen die deutlich niedrigeren Resultate der Gruppen auf (siehe Tabelle 6-17). Dieser Effekt wird offensichtlich durch den Austausch des Kapselmaterials ausgelöst.

Tabelle 6-17 Ergebnisse der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid aus Gelatine-Kapseln (Träger: 200M Laktose mit unterschiedlichen Anteilen Additiv; n= 4; MW ± SD)

	ohne Vormischung (A)		mit Vormischung (B)
	0%	2,5 %	2,5%
Gruppe 1 (PP0-1)	64,5 ± 1,2 µg	87,8 ± 1,6 µg	96,4 ± 1,8 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	48,0 ± 0,9 µg	100,2 ± 1,8 µg	104,1 ± 1,9 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	0,9 ± 0,0 µg	2,3 ± 0,0 µg	1,2 ± 0,0 µg

In der Gruppe 1 (PP0 – PP1) haben sich die Werte durch das neue Kapselmaterial annähernd halbiert. Eine Differenzierung zwischen den Resultaten mit und ohne Feinanteil ist nur noch schwach zu erkennen (siehe Abb.6-16). Auch die Ergebnisse der Gruppe 2 sind etwa um die Hälfte reduziert. Allerdings bleibt die deutliche Unterscheidung zwischen den Formulierungen mit und ohne Feinanteil bestehen.

Der größte Effekt zeigt sich in Gruppe 3 (PP5 – Filter). Hier liegen die Ergebnisse relativ nahe beieinander, sind aber im absoluten Vergleich mit den Resultaten aus PE-Kapseln stark reduziert. Die ist als deutlicher Hinweis darauf zu werten, dass bevorzugt der Feinstanteil des Trägermaterials in der bedingt durch die charakteristische Oberflächenbeschaffenheit adhäsiven („klebrigen“) Kapsel (siehe Ab.4-3) zurückgehalten wird. Wie in Abb.6-16 zu erkennen ist, sind die Ergebnisse nicht von der Mischreihenfolge abhängig.

Bedingt durch die Klebeeigenschaften der Kapselinnenseiten steigt der zurückbleibende Laktoseanteil etwa um den Faktor sieben bis zehn an. Allerdings reichen die reduzierten Laktosemengen im ACI nicht aus, um diesen markanten Anstieg der Kapselretention zu erklären. Neben den feinen Laktosepartikeln müssen daher auch grobe Teilchen zurückgehalten werden, was sich anhand der geringeren Laktoseanteile im Präseparator ableiten lässt (siehe Abb.6-13/6-16).

325M Respitose®

Wie in Abb.6-16 zu erkennen ist, liegt die Kapselretention im Vergleich zu den Resultaten der 200M Laktose (Gelatine-Kapseln) deutlich höher. Eine Gegenüberstellung mit den Resultaten der „inerten“ PE-Kapsel ergibt einen Anstieg in der Kapselretention um den Faktor zwölf. Parallel dazu sind die SIP-Werte um die Hälfte reduziert und die Resultate des Präseparators liegen etwa um 13 % niedriger (siehe Abb.6-13/6-16). Diese Beobachtungen stützen die bereits in Kapitel 6.2.2.1 aufgestellte These, dass auch grobe Laktosepartikel durch das Gelatine-Kapselmaterial zurückgehalten werden (siehe Abb.7-18).

Tabelle 6-18 Ergebnisse der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid aus Gelatine-Kapseln (Träger: 325M Laktose mit unterschiedlichen Anteilen Additiv; n= 4; MW ± SD)

	ohne Vormischung (A)		mit Vormischung (B)
	0%	2,5 %	2,5%
Gruppe 1 (PP0-1)	32,9 ± 0,6 µg	66,8 ± 1,2 µg	58,5 ± 1,1 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	2,9 ± 0,0 µg	42,2 ± 0,8 µg	30, ± 0,6 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar

Erwartungsgemäß wirkt sich das Kapselmaterial auf die Verteilung im Kaskadenimpaktor aus (siehe Tabelle 6-18).

Im Vergleich zur PE- Kapsel sind die wieder gefundenen Anteile des Trägermaterials in der Gruppe 1 (PP0 – PP1) zwar reduziert, allerdings nicht so stark wie bei den Formulierungen der „feinen“ 200M Laktose. Auch ein Unterschied zwischen den Formulierungen mit und ohne Feinanteil ist nur schwach zu erkennen (siehe Abb.6-16).

Innerhalb der Gruppe 2 (PP2 – PP4) ist das Ergebnis für die Formulierung ohne Feinanteil sehr deutlich zurückgegangen, während die Ergebnisse mit Feinanteil im Vergleich zur PE-Kapsel nur geringfügig abgenommen haben. Die Differenzierung zwischen Basiswert ohne Feinanteil und den Formulierungen mit Feinanteil bleibt erhalten. Diese Beobachtung ist ein Indiz dafür, dass der „eigene“, bereits im Trägermaterial vorliegende Feinanteil in der Gelatine-Kapsel zurückbleibt, während der zusätzliche Laktose-Feinanteil ausgebracht wird und sich im Kaskadenimpaktor auf den PP2 – PP4 verteilt.

Ein Laktoseanteil auf den PP5 – Filter (Gruppe 3) ist bei Verwendung von Gelatine-Kapseln nicht mehr nachzuweisen. Hier wird, analog zu den Ergebnissen der 200M Laktose, der Feinstanteil des Carriers durch die Adhäsionseigenschaften des Kapselmaterials zurückgehalten (siehe Abb.6-16).

Erneut ist ein Einfluss der Mischreihenfolge auf die Resultate nicht zu erkennen.

Die extrem verringerten Anteile der groben Laktose in SIP und Präseparator sowie die schwankenden Resultate der Kapselretention sind Hinweise für einen nicht ausreichenden „Auspudereffekt“ der mikronisierten Laktose (siehe Abb.6-16).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefert die Partikelmorphologie des Trägers (siehe Abb.4-2) und damit verbunden das Haftbestreben der Partikel (siehe Kapitel 7.2). Letzteres nimmt durch die „Keilform“ der Teilchen zu, wodurch neben dem Feinanteil auch grobe Partikel (mit gebundenem Wirkstoff) in der Kapsel zurückbleiben (siehe Abb.7-18).

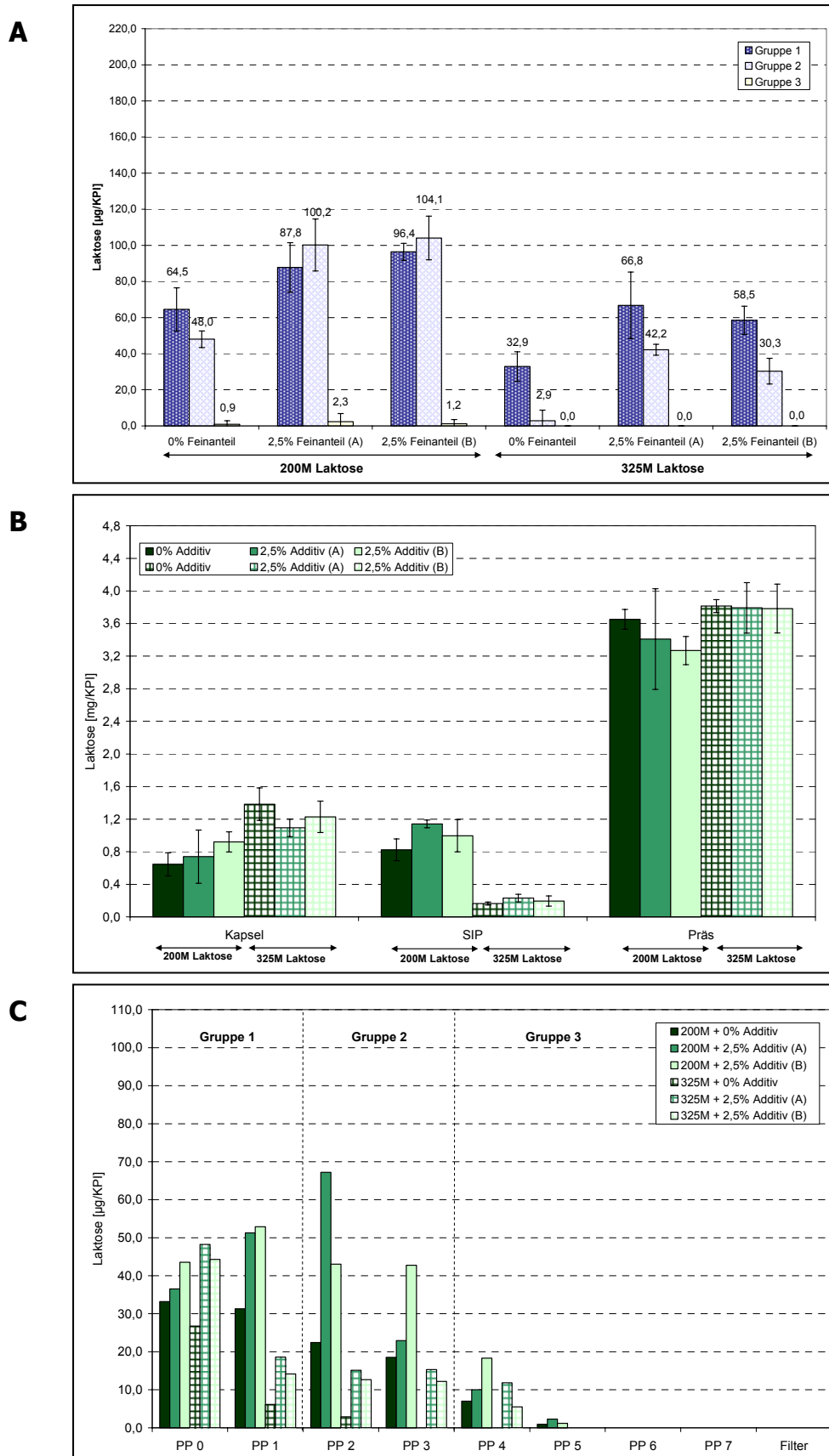


Abb.6-16 vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 200M und 325M Laktose in Gelatine-Kapseln (A = ohne Vormischung, B = mit Vormischung)
 A) Übersicht der Gruppen 1-3; B) Verteilung von Kapsel bis Präseparator und C) Verteilung von PP0 bis Filter (n=4 Kollektive pro Formulierung; MW± SD)

6.2.3 Statistische Auswertung

Die Analyse, ob beobachtete Unterschiede zufällig oder statistisch signifikant sind, erfolgt mit dem Software System SAS[®] [91-93]. Zur Bewertung werden pro Kombination die Ergebnisse von vier Kollektiven (4x6 Kapseln) herangezogen (siehe Tabelle 6-19/6-21) [97;98] und getrennt nach den drei Gruppen (Gruppe 1 = PP0 - PP1; Gruppe 2 = PP2 - PP4; Gruppe 3 = PP5 - Filter) bewertet.

Auf Grund dieser ausführlichen Betrachtung der Verteilung im ACI wird auf die Betrachtung der in Europa für Inhalativa üblicherweise registrierten FPD (=inhalierbarer Anteil) [48], die sich aus den Gruppen 2 und 3 zusammensetzt, verzichtet.

6.2.3.1 Statistische Bewertung zu Ipratropiumbromid

Mit dem Verfahren der Varianzanalyse (ANOVA) wird ein möglicher Einfluss der Faktoren *Laktose*, *Kapselart*, *Mischreihenfolge* und *Anteil mikronisierter Laktose* auf den Parameter *Verteilung des aerodynamischen Feinanteils* untersucht und entsprechend bewertet [97].

Hierzu werden alle genannten Faktoren und Wechselwirkungen als feste Faktoren berücksichtigt und die Streuung zwischen den jeweils vier Kollektiven einer Kombination geht als Reststreuung in die Berechnung mit ein.

Tabelle 6-19 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *aerodynamische Partikelgrößenverteilung* (n = Anzahl der gemessenen Kapseln pro Faktorkombination; A= ohne Vormischung; B = mit Vormischung)

Laktose 325M				Laktose 200M			
Kapselart	Mischreihenfolge	Anteil (%)	n	Kapselart	Mischreihenfolge	Anteil (%)	n
Gelatine	-	0	4	Gelatine	-	0	4
	A	2,5	4		A	2,5	4
	A	5,0	4		A	5,0	4
	B	2,5	4		B	2,5	4
	B	5,0	4		B	5,0	4
PE	-	0	4	PE	-	0	4
	A	2,5	4		A	2,5	4
	A	5,0	4		A	5,0	4
	B	2,5	4		B	2,5	4
	B	5,0	4		B	5,0	4

Tabelle 6-20 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Parameter *Gruppen 1 – 3 (Verteilung von Ipratropiumbromid im ACI)* - Ergebnisse der ANOVA

	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Haupteffekte						
Laktose	120,84	0,0001	325,47	0,0001	388,23	0,0001
Kapselart	133,62	0,0001	1495,10	0,0001	990,06	0,0001
Anteil (mikronisierter Laktose)	0,35	0,5555	16,33	0,0002	0,08	0,7823
Mischreihenfolge	0,04	0,8440	0,01	0,9147	1,23	0,2714
Zweifach-Wechselwirkungen						
Laktose*Kapselart	0,06	0,8089	1,24	0,2699	73,64	0,0001
Laktose*Mischreihenfolge	5,44	0,0231	3,69	0,0595	0,02	0,8901
Laktose*Anteil	5,08	0,0279	8,61	0,0047	0,02	0,8901
Kapselart*Mischreihenfolge	4,06	0,0483	5,24	0,0256	13,02	0,0006
Kapselart*Anteil	5,81	0,0190	6,43	0,0139	0,08	0,7823
Anteil*Mischreihenfolge	0,19	0,6653	1,12	0,2933	0,69	0,4084
Dreifach-Wechselwirkungen						
Laktose*Kapselart*Mischreihenfolge	0,35	0,5555	1,55	0,2181	5,56	0,0216
Laktose*Kapselart*Anteil	0,00	0,9686	7,73	0,0072	0,17	0,6787
Laktose*Anteil*Mischreihenfolge	2,89	0,0944	0,00	0,9878	4,33	0,0417
Kapsel*Anteil*Mischreihenfolge	0,04	0,8440	0,07	0,7948	0,00	1,0000
Vierfach-Wechselwirkungen						
Laktose*Kapselart*Anteil*Mischreihenfolge	0,13	0,7233	0,17	0,6797	1,56	0,2166

Signifikanzniveau α : 0,05

Gruppe 1 (PP0 - PP1)

Durch die ANOVA werden folgende Haupteffekte identifiziert und als statistisch signifikant ausgewiesen (siehe Tabelle 6-20 und Abb.6-17):

- Das Kapselmaterial erweist sich als stärkste Einflussgröße. Mit PE-Kapseln werden deutlich höhere Werte erzielt als mit Gelatine-Kapseln ($p=0,0001$).
- Auch die Trägerlaktose wirkt sich deutlich auf die Ergebnisse aus ($p=0,0001$). So erzielt die „feine“ 200M Laktose höhere Ergebnisse als die „grobe“ 325M Laktose.
- Im Vergleich zu Kapselart und Trägerlaktose spielen alle anderen Faktoren eine eher untergeordnete Rolle. Lediglich bei den Verknüpfungen mit 325M Laktose führt die Verwendung von mikronisierter Laktose zu einem leichten Anstieg der Resultate, was sich auf die beiden Zweifach-Wechselwirkungen Kapselart*Anteil ($p=0,0190$) und Laktose*Anteil ($p=0,0279$) auswirkt.

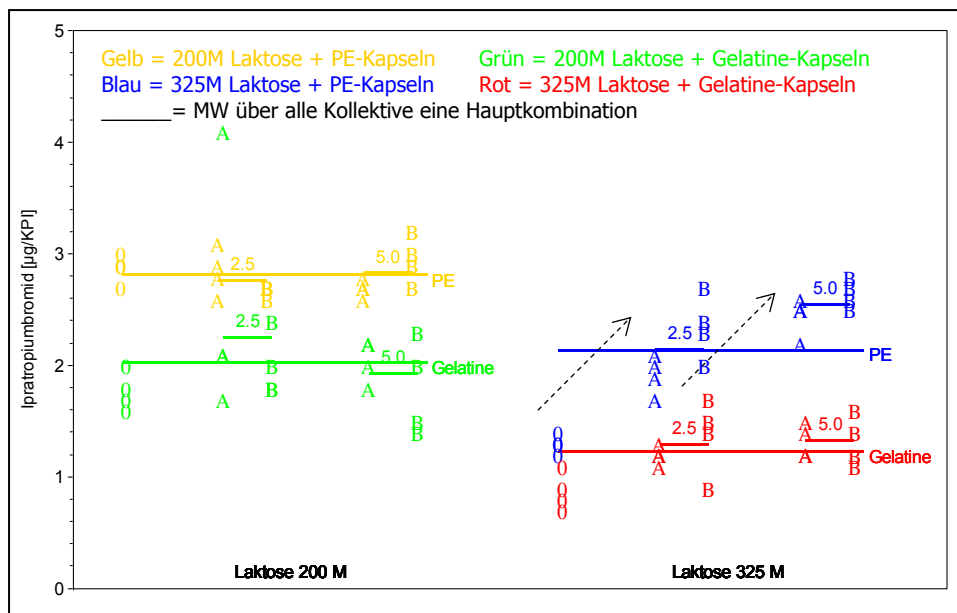


Abb.6-17 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter *Gruppe 1* (Verteilung von Ipratropiumbromid auf PPO-PP1); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

So ergibt die Betrachtung der jeweiligen Kombinationen innerhalb einer Kapselart, dass der Faktor Feinanteil in den „inerten“ PE-Kapseln („Umhüllungs-Effekt“) wesentlich stärker zur Geltung kommt als in den adhäsiven Gelatine-Kapseln („Umhüllungs-Effekt“ und „Auspudereffekt“), was in Kapitel 7 näher betrachtet und erklärt wird. Fasst man die jeweiligen Kombinationen innerhalb einer Trägerlaktose zusammen, ist innerhalb der „groben“ 325M Laktose ein stärkerer Einfluss des Feinanteils zu erkennen, als bei den Formulierungen der „feinen“ 200M Laktose. Die Resultate liegen hier zwar wesentlich höher, aber die genaue Differenzierung zwischen den zugesetzten Additivmengen tritt mit der „groben“ 325M Laktose deutlicher in Erscheinung, was mit den Pfeilen in Abb.6-17 verdeutlicht wird.

Gruppe 2 (PP2 - PP4)

Folgende Haupteinflussfaktoren werden identifiziert (siehe Abb.6-18 / Tabelle 6-20):

- Auch innerhalb Gruppe 2 zeigen Kapselmaterial ($p=0,0001$) und Trägerlaktose ($p=0,0001$) unabhängig voneinander den stärksten Einfluss auf die Ergebnisse. Es gelten die gleichen Aussagen wie bereits für Gruppe 1 beschrieben.
- Zusätzlich verändert der Faktor Feinanteil die Verteilung auf den PP2 – PP4. So ist durch den Additivzusatz im Vergleich zum Basiswert (ohne Feinanteil) ein deutlicher Anstieg der Resultate zu verzeichnen ($p=0,0002$).
- Die Mischreihenfolge hat keinen relevanten Einfluss auf die Verteilung.

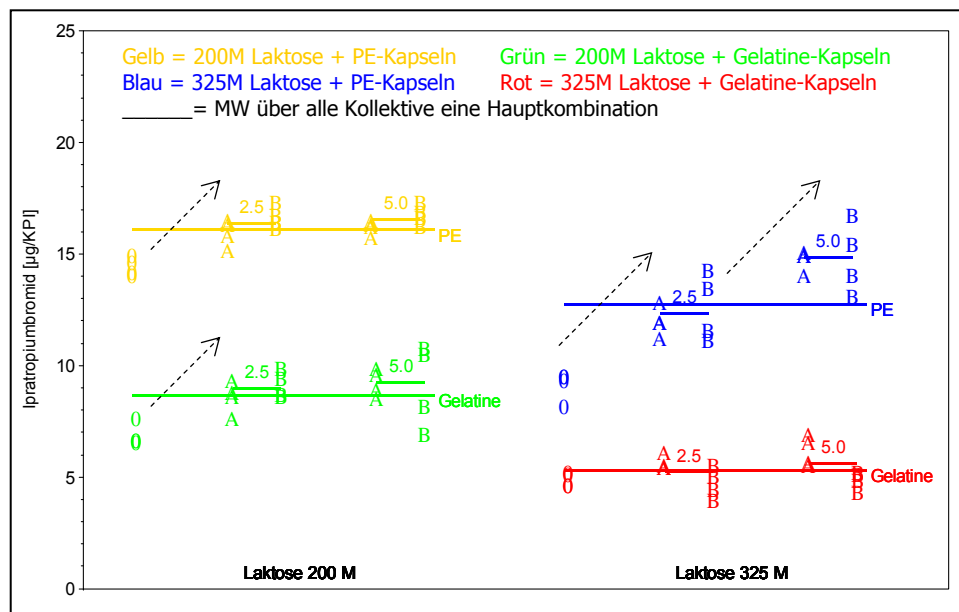


Abb.6-18 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter *Gruppe 2* (Verteilung von Ipratropiumbromid auf PP2-PP4); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

Die für Gruppe 1 aufgezeigte Zweifach-Wechselwirkung Laktose*Anteil ($p=0,0047$) besitzt auch für die Gruppe 2 in beschriebener Art und Weise ihre Gültigkeit. Gleiches gilt für die Zweifach-Wechselwirkung Kapselart*Anteil ($p=0,0139$). Zusätzlich zu diesen Beobachtungen ist der Einfluss des Laktose-Feinanteils auf die Verteilung im ACI gleichzeitig vom eingesetzten Kapselmateriale und der verwendeten Trägerlaktose abhängig (siehe Tabelle 6-20). Das bedeutet, der „Umhüllungs-Effekt“ des Feinanteils lässt sich am deutlichsten mit 325M Laktose in PE-Kapseln darstellen. In dieser Kombination ist die klarste Differenzierung zwischen den einzelnen Ergebnissen möglich. Alle anderen Kombinationen wirken sich im Vergleich dazu weniger deutlich oder gar nicht auf die Verteilung aus (siehe Pfeile in Abb.6-18). Die ANOVA weist diese Beeinflussung der Verteilung als signifikante Dreifach-Wechselwirkung (Laktose*Kapselart*Anteil) aus.

Gruppe 3 (PP5 - Filter)

Hier gelten die gleichen Haupteffekte wie zuvor für Gruppe 1 beschrieben (siehe Abb.6-19 und Tabelle 6-20):

- Sowohl das Kapselmateriale ($p=0,0001$) als auch die Trägerlaktose ($p=0,0001$) zeigen unabhängig voneinander eine sehr ausgeprägte Wirkung auf die Resultate der Gruppe 3. So liefern PE-Kapseln höhere Resultate als Gelatine-Kapseln und 200M Laktose verbessert die Ausbringung im Vergleich zu 325M Laktose.
- Im Vergleich dazu haben die Faktoren Mischreihenfolge und Anteil mikronisierter Laktose nur eine untergeordnete Bedeutung.

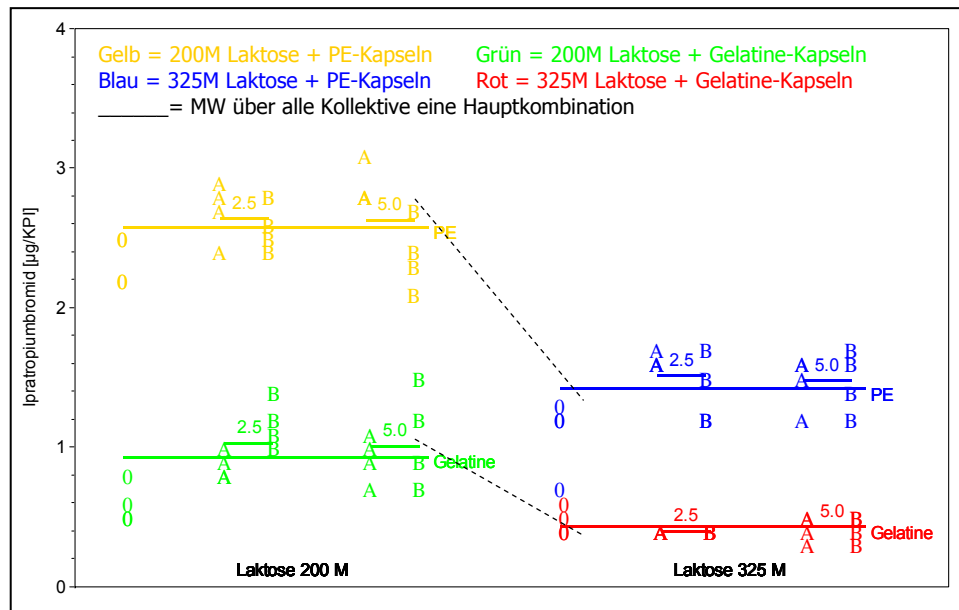


Abb.6-19 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter *Gruppe 3* (Verteilung von Ipratropiumbromid auf PP5-Filter); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

Erneut liefert die 200M Laktose in beiden Kapselarten höhere Werte für die Verteilung als die 325M Laktose. Allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden Kapselmaterialien mit der „feinen“ Laktose viel deutlicher zu sehen (siehe Abb.6-19). Folglich ist die Ergebnisspanne zwischen „inerten“ PE-Kapseln und adhäsiven Gelatine-Kapseln in diesem Fall größer als bei den Formulierungen mit 325M Laktose. Diese Beobachtung wird durch die ANOVA als signifikante Zweifach-Wechselwirkung zwischen Laktose und Kapselart ($p=0,0001$) identifiziert.

6.2.3.2 Statistische Bewertung zu Laktose Monohydrat

Mit dem Verfahren der Varianzanalyse (ANOVA) wird ein möglicher Einfluss der Faktoren *Laktose, Kapselart und Variation* (umfasst Kombinationen aus Feinanteil, Mischreihenfolge und mechanische Belastung) auf den Parameter *Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose* untersucht und entsprechend bewertet [98]. Wie bereits beschrieben, werden alle genannten Faktoren und Wechselwirkungen als feste Faktoren berücksichtigt, während die Streuung zwischen den jeweils vier Kollektiven einer Kombination als Reststreuung in die Berechnung mit eingeht.

Zur genaueren Bewertung der Variationen werden innerhalb einer Verknüpfung von Laktose und Kapselart (z.B. 200M Laktose in PE-Kapseln) zusätzlich paarweise Vergleiche (zweiseitige t-Tests) zwischen den vier Variationen *kein Feinanteil (0)*, *Mischreihenfolge A ohne Belastung (A)*, *Mischreihenfolge B ohne Belastung (B)* und *Mischreihenfolge A mit mechanischer Belastung (A 30)* durchgeführt.

Die Berechnungen erfolgen mit der Prozedur „MIXED“ des Softwaresystems SAS® [91-93].

Tabelle 6-21 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Teilchengrößenverteilung der Laktose (n = Anzahl der gemessenen Kollektive pro Variation; A = ohne Vormischung; B = mit Vormischung)

Laktose 325M			Laktose 200M		
Kapselart	Variation	n	Kapselart	Variation	n
Gelatine	0	4	Gelatine	0	4
	A	4		A	4
	B	4		B	4
	A 30	4		A 30	4
PE	0	4	PE	0	4
	A	4		A	4
	B	4		B	4
	A 30	4		A 30	4

Tabelle 6-22 Einfluss verschiedener Faktoren auf Parameter: *Gruppe 1 - 3*
Ergebnisse der ANOVA

	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Haupteffekte						
Laktose	205,17	<u>0,0001</u>	1205,20	<u>0,0001</u>	65,97	<u>0,0001</u>
Kapselart	177,92	<u>0,0001</u>	818,39	<u>0,0001</u>	141,69	<u>0,0001</u>
Variation	18,25	<u>0,0001</u>	97,83	<u>0,0001</u>	0,57	0,6384
Zweifach-Wechselwirkungen						
Laktose*Kapselart	43,70	<u>0,0001</u>	205,61	<u>0,0001</u>	46,25	<u>0,0001</u>
Laktose*Variation	1,07	0,3713	21,64	<u>0,0001</u>	2,49	0,0717
Kapselart*Variation	2,07	0,1161	32,45	<u>0,0001</u>	1,16	0,3335
Dreifach-Wechselwirkungen						
Laktose*Kapselart*Variation	1,10	0,3585	17,45	<u>0,0001</u>	1,67	0,1863

Signifikanzniveau α : 0,05

Gruppe 1 (PP0 – PP1)

Durch die ANOVA werden folgende Haupteffekte identifiziert und als statistisch signifikant ausgewiesen (siehe Tabelle 6-22 und Abb.6-20):

- Wie schon beim Wirkstoff, zeigt das Kapselmateriale einen starken Einfluss ($p=0,0001$). Mit PE-Kapseln gelangt mehr Laktose auf die PP0 - PP1 als mit Gelatine-Kapseln.
- Die Beobachtung, dass sich im oberen Teil des ACI deutlich mehr „feine“ breit verteilte 200M Laktose niederschlägt als „grobe“ eng verteilte 325M Laktose wird ebenfalls bestätigt ($p=0,0001$).
- Weiterhin signifikant verschieden ($p=0,0001$) sind die unterschiedlichen Variationen innerhalb der Hauptverknüpfungen von Laktose und Kapselart. Über paarweise Vergleiche der verschiedenen Variationen werden die vorhandenen Unterschiede genauer charakterisiert (Tabelle 6-23).

Die Tatsache, dass sich bei der „feinen“ 200M Laktose stärker ausgeprägte Unterschiede zwischen den beiden Kapselarten ergeben als bei der „groben“ 325M Laktose, wird durch eine signifikante Zweifach-Wechselwirkung bestätigt ($p=0,0001$). Bei der „groben“ Laktose, die wesentlich weniger Feinanteil enthält, treten die Unterschiede zwischen den beiden Kapselmateriale nicht so offensichtlich in Erscheinung (siehe Abb.6-20).

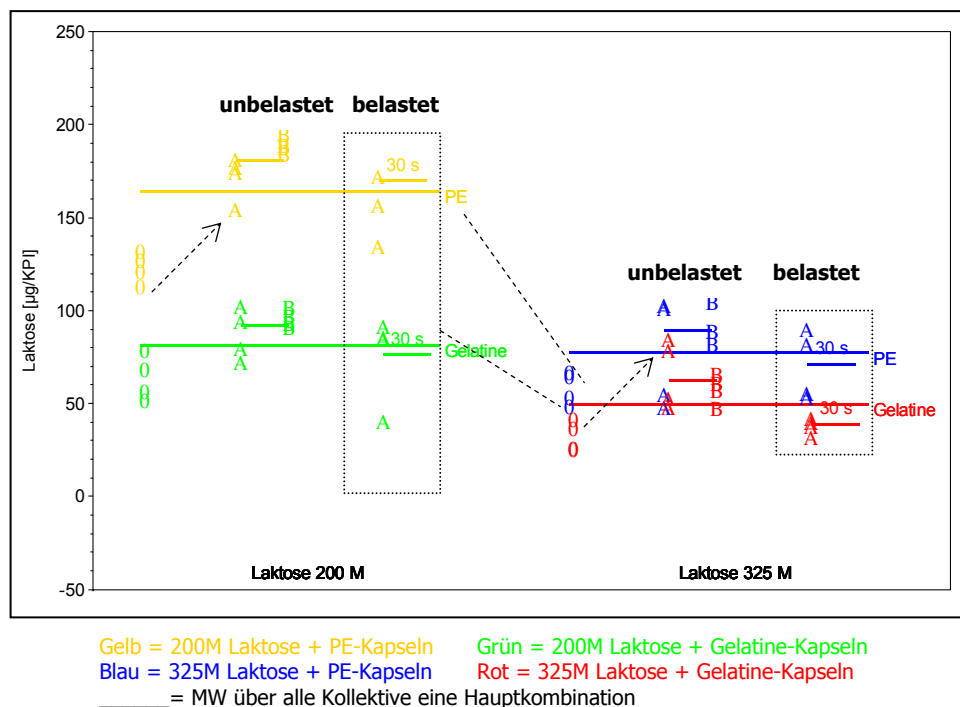


Abb.6-20 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter Gruppe 1 (Laktose-Verteilung auf PP0-PP1); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

Die paarweisen Vergleiche zwischen den Variationen einer Hauptverknüpfung (z.B. 200M Laktose und PE-Kapseln) ergeben folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 6-23):

- Eine deutliche Differenzierung zwischen dem Basiswert ohne Feinanteil und den Ergebnissen mit Feinanteil ist nicht für alle Verknüpfungen signifikant nachweisbar. Damit wird der „Umhüllungs-Effekt“ des Feinanteils (0% → 2,5%) insgesamt betrachtet nur schwach signifikant.
- Sowohl die Mischreihenfolge (A_{2,5} → B_{2,5}) als auch die mechanische Belastung (A_{unbelastet} → A_{belastet}) zeigen, unabhängig von der Verknüpfung, keinen relevanten Einfluss auf die Verteilung der Laktose im oberen Bereich des ACI (siehe auch Kapitel 6.3).

Tabelle 6-23 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter Gruppe 1 (Laktose-Verteilung auf den PP0 – 1); Paarweiser Vergleich der Variationen (Einheit: µg/KPI)

Laktose	Kapselart	Variation	Variation	Differenz	t Wert	p Wert
200M	Gelatine	A_0	A_25	-23,27	-1,98	0,0530
		A_25	A_25_30	11,52	0,98	0,3309
		A_25	B_25	-8,64	-0,74	0,4650
	PE	A_0	A_25	-48,56	-4,14	0,0001
		A_25	A_25_30	2,62	0,22	0,8240
		A_25	B_25	-17,08	-1,46	0,1519
325M	Gelatine	A_0	A_25	-33,87	-2,89	0,0058
		A_25	A_25_30	27,95	2,38	0,0212
		A_25	B_25	8,34	0,71	0,4807
	PE	A_0	A_25	-18,13	-1,55	0,1288
		A_25	A_25_30	6,49	0,55	0,5829
		A_25	B_25	-23,71	-2,02	0,0489

Signifikanzniveau α : 0,05

Gruppe 2 (PP2 – PP4)

Es werden folgende Haupteffekte identifiziert (siehe Tabelle 6-22 und Abb.6-21):

- Die für Gruppe 1 aufgezeigten Beobachtungen besitzen auch für Gruppe 2 ihre Gültigkeit. Sowohl das Kapselmaterial ($p=0,0001$) als auch die Trägerlaktose ($p=0,0001$) werden als starke Einflussgrößen identifiziert.
- Die einzelnen Variationen verhalten sich innerhalb der verschiedenen Laktosearten sehr inhomogen ($p=0,0001$), was durch die paarweisen Vergleiche näher zu charakterisieren ist (siehe Tabelle 6-24).

Auch die Differenzierung zwischen den Kapselarten ist bei 200M Laktose stärker ausgeprägt als bei 325M Laktose. Diese Beobachtung wird analog den Ergebnissen der Gruppe 1 durch die ANOVA als signifikante Zweifach-Wechselwirkung ausgewiesen.

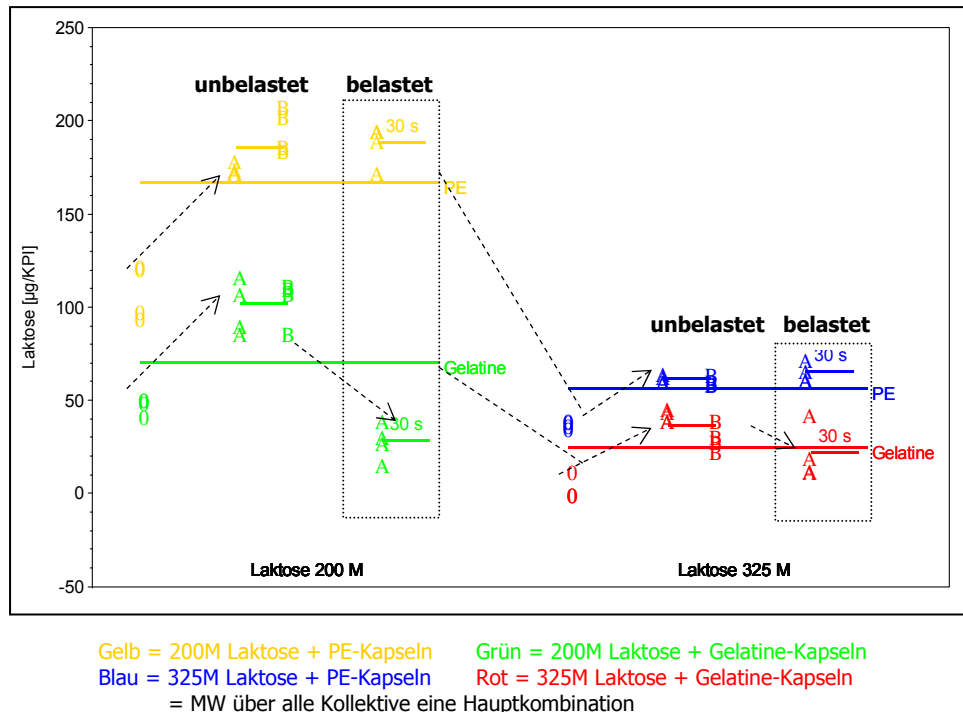


Abb.6-21 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter *Gruppe 2* (Laktose-Verteilung auf PP2-PP4); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

Tabelle 6-24 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *Gruppe 2* (Laktose-Verteilung auf PP2-PP4); Paarweiser Vergleich der Kombinationen (Einheit: µg/KPI)

Laktose	Kapselart	Variation	Variation	Differenz	t Wert	p Wert
200M	Gelatine	A_0	A_25	-52,20	-8,20	0,0001
		A_25	A_25_30	71,59	11,24	0,0001
		A_25	B_25	-3,97	-0,62	0,5361
	PE	A_0	A_25	-66,13	-10,38	0,0001
		A_25	A_25_30	-13,43	-2,11	0,0402
		A_25	B_25	-20,56	-3,23	0,0022
325M	Gelatine	A_0	A_25	-39,34	-6,18	0,0001
		A_25	A_25_30	20,41	3,20	0,0024
		A_25	B_25	11,90	1,87	0,0677
	PE	A_0	A_25	-24,37	-3,83	0,0004
		A_25	A_25_30	-3,45	-0,54	0,5900
		A_25	B_25	1,32	0,21	0,8372

Signifikanzniveau α : 0,05

Weiterhin ist für alle Variationen ein Einfluss des Feinanteils erkennbar ($p=0,0001$). Wie Tabelle 6-24 und Abb.6-21 zu entnehmen, ist der Einfluss mechanischer Belastung nur bei Variationen mit Gelatine-Kapseln nachweisbar. Dieser Aspekt wird in Kapitel 6.3 ausführlicher betrachtet.

Gruppe 3 (PP5 – Filter)

Da für die Verknüpfungen mit Gelatine-Kapseln kein Feinstanteil nachweisbar ist, werden einige Auswertungsparameter des gewählten Verfahrens verletzt. Allerdings ist das Verfahren ausreichend robust, um an der gewählten Auswertestrategie festzuhalten (siehe Tabelle 6-22/6-25):

- Wie erwartet, lässt sich mit der wesentlich „feineren“ 200M Laktose unabhängig vom Kapselmaterial mehr Feinstanteil nachweisen, als dies mit der 325M Laktose möglich ist. Dieser Unterschied wird durch die ANOVA signifikant.
- Erneut ist das Kapselmaterial maßgeblich an der Verteilung beteiligt ($p=0,0001$). So ist mit Gelatine-Kapseln kein Feinstanteil nachweisbar, während mit PE-Kapseln ein Laktoseanteil auf den PP5- Filter zu finden ist (siehe Abb.6-22).

Da der „groben“ Laktose die Feinanteile fehlen, treten auch in Gruppe 3 die Unterschiede zwischen den Kapselmaterialien weniger deutlich in Erscheinung wie bei der „feinen“ Laktose. Analog zur Auswertung der beiden anderen Gruppen, ist auch hier die Zweifach-Wechselwirkung Laktose*Kapselart signifikant (siehe Tabelle 6-22).

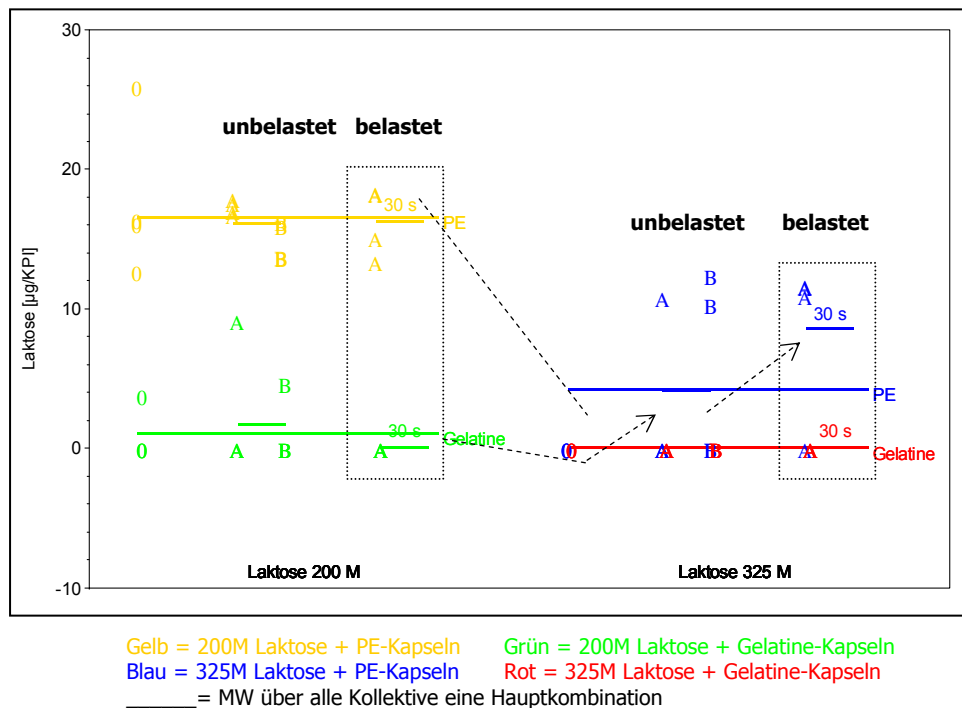


Abb.6-22 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter Gruppe 3 (Laktose-Verteilung auf PP5-Filter); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

Die genaue Betrachtung der Variationen (siehe Tabelle 6-25) zeigt, dass weder Mischreihenfolge noch Feinanteil oder mechanische Belastung einen Einfluss auf die Verteilung haben.

Einziges Ausnahmefeld ist die Verknüpfung 325M Laktose und PE-Kapseln. Trotz des uneinheitlichen Verhaltens der einzelnen Kollektive ist ein deutlicher, wenn auch nicht nachvollziehbarer, Einfluss der mechanischen Belastung zu erkennen (siehe auch Kapitel 6.3).

Tabelle 6-25 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter Gruppe 3 (Laktose-Verteilung auf PP5-Filter); Paarweiser Vergleich der Variationen (Einheit: µg/KPI)

Laktose	Kapselart	Variation	Variation	Differenz	t Wert	p Wert
200	Gelatine	A_0	A_25	-1,33	-0,57	0,5723
		A_25	A_25_30	2,27	0,97	0,3358
		A_25	B_25	1,12	0,48	0,6338
	PE	A_0	A_25	0,47	0,20	0,8417
		A_25	A_25_30	1,04	0,44	0,6585
		A_25	B_25	2,42	1,03	0,3064
325	Gelatine	A_0	A_25	0,00	0,00	1,0000
		A_25	A_25_30	0,00	0,00	1,0000
		A_25	B_25	0,00	0,00	1,0000
	PE	A_0	A_25	-2,69	-1,15	0,2556
		A_25	A_25_30	-5,83	-2,50	0,0161
		A_25	B_25	-2,97	-1,27	0,2106

Signifikanzniveau α : 0,05

6.2.3.3 Zusammenfassung

Auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid und Laktose haben die ausgewählten Parameter *Kapselmaterial*, *Trägermaterial*, *Feinanteil* und *Mischreihenfolge (=Variation)* einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Einfluss (siehe Abb.6-23/6-24). Eine genaue Quantifizierung der Einflussfaktoren wird in weiteren Versuchen evaluiert und in einem eigenen Kapitel (siehe Kapitel 7) zusammengestellt.

Die Auswertung einer möglichen Korrelation zwischen den Ergebnissen von Laktose und Ipratropiumbromid ist dem Kapitel 7.4.4 zu entnehmen.

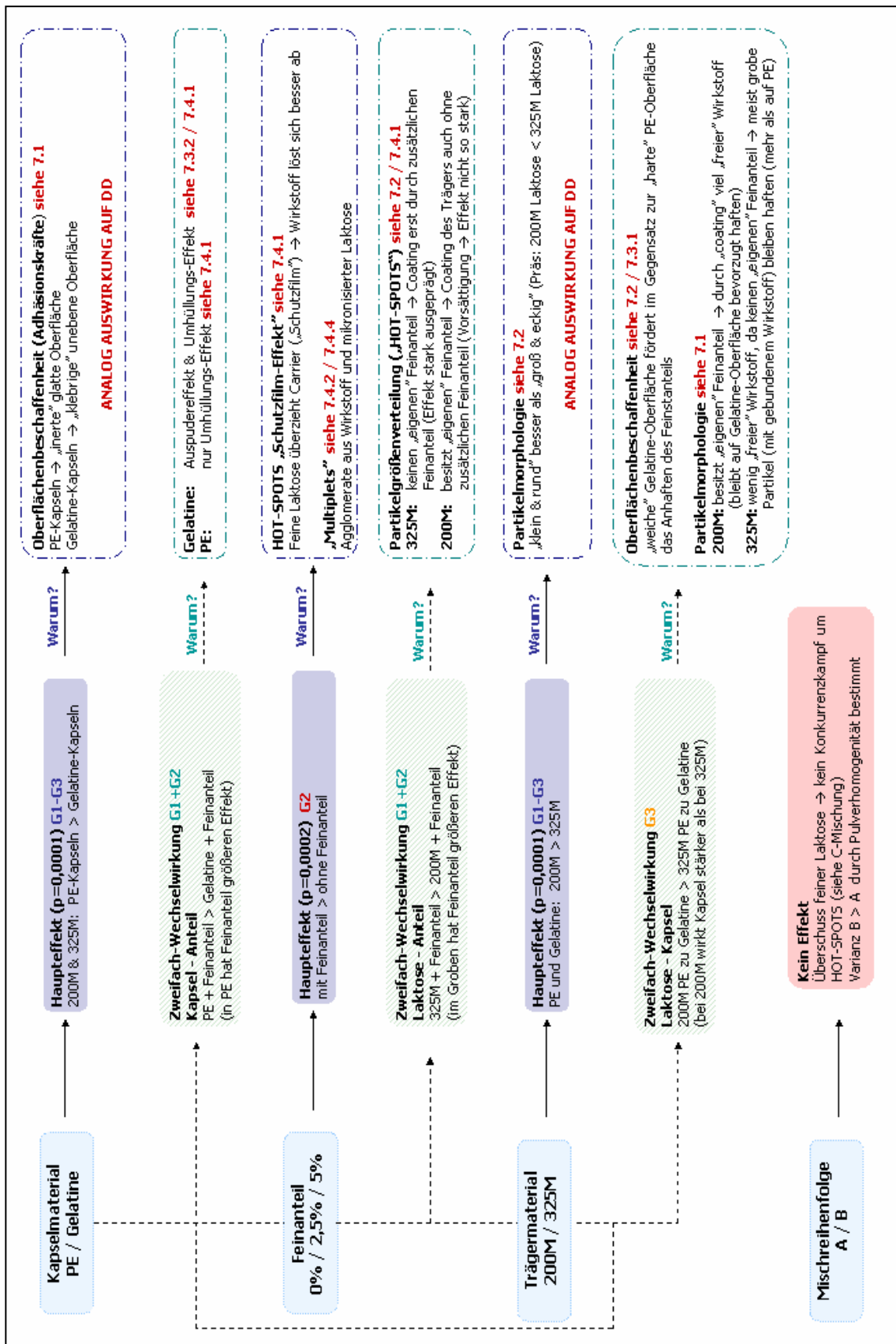


Abb.6-23 Zusammenfassung der Einflussfaktoren – statistische Auswertung und Erläuterung der Effekte auf die Verteilung von Ipratropiumbromid (G1 = Gruppe1, G2 = Gruppe 2; G3 = Gruppe 3)

6.3 Auswirkung mechanischer Belastung auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose und Ipratropiumbromid

Um den Einfluss mechanischer Beanspruchung auf die Verteilung der Pulvermischung im Kaskadenimpaktor zu evaluieren, wird pro Trägerlaktose jeweils eine ausgewählte Formulierung (200A_2,5 / 325A_2,5) nach einem definierten Schema belastet (siehe Kapitel 4.2.4) und analysiert. Als Auswahlkriterium dient die Variabilität der Ergebnisse innerhalb der in Kapitel 6.1 beschriebenen Messreihe.

Für die nicht zeitgleich durchgeführte Versuchsreihe mit 325M Respitose[®] wird, ohne die Variabilität zu berücksichtigen, die analoge Formulierung ausgewählt. Nur so ist ein direkter Vergleich zwischen den beiden Laktosearten gewährleistet. Um auch den Zeiteffekt zwischen den Versuchen aus Kapitel 6.2 (unbelastet) und dem Belastungstest auszuschließen, wird der unbelastete Vergleichswert (Basiswert) neu ermittelt.

6.3.1 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aus PE-Kapseln

In dieser Versuchsreihe werden die Formulierungen im „inerten“ Kapselmaterial untersucht, um ausschließlich den Effekt der mechanischen Belastung auf die Pulvermischung zu betrachten.

6.3.1.1 Ipratropiumbromid

200M Pharmatose[®]

Die Bestimmung der aerodynamischen Partikelgrößenverteilung ergibt für die verschiedenen Stressbedingungen inhalierbare Anteile (Gruppen 2 + 3) von 46,9 % und 52,3 % bezogen auf die mittlere Einwaage eines Kollektivs.

Tabelle 6-26 Übersicht der Gruppen (Ipratropiumbromid) nach unterschiedlicher mechanischer Belastung der 200M Laktose Formulierungen in PE-Kapseln (n = 4; MW ± SD)

	Mechanische Belastungsdauer			
	0 s	30 s	60 s	120 s
Gruppe 1 (PP0-1)	2,9 ± 0,2 µg	3,0 ± 0,3 µg	2,5 ± 0,1 µg	2,4 ± 0,2 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	16,0 ± 0,6 µg	18,2 ± 1,7 µg	16,9 ± 0,5 µg	16,9 ± 1,2 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	2,7 ± 0,2 µg	2,7 ± 0,3 µg	2,8 ± 0,1 µg	2,9 ± 0,3 µg

Innerhalb der Gruppe 1 (PP0 – PP1) ist erst ab 60 s Belastungsdauer eine leichte Reduktion der Verteilung zu erkennen. Die Ergebnisse der Gruppe 2 (PP2 – PP4) dagegen steigen im Vergleich zum Basiswert (0 s) durch mechanische Beanspruchung leicht an. Eine Beobachtung, die sich durch die vorliegende Streuung relativiert.

Einzig die Ergebnisse der Gruppe 3 (PP5 – Filter) werden durch die mechanische Beanspruchung nicht relevant verändert (siehe Tabelle 6-26 und Abb.6-25).

Dagegen tritt, wie in Abb.6-25 zu erkennen ist, abhängig von der Belastungsdauer eine Veränderung der Kapselretention auf. So steigt der Kapselrest mit steigender mechanischer Belastung an. Dies ist möglicherweise auf die elektrostatische Aufladung der Kapsel zurückzuführen – ein Effekt, der bereits in Kapitel 6.1 beschrieben wird. Die durch Rotation entstehende Reibungsenergie führt zur Kapsel-Aufladung und damit zu einer gesteigerten Retention der Wirkstoff-Partikel (siehe Kapitel 7.1).

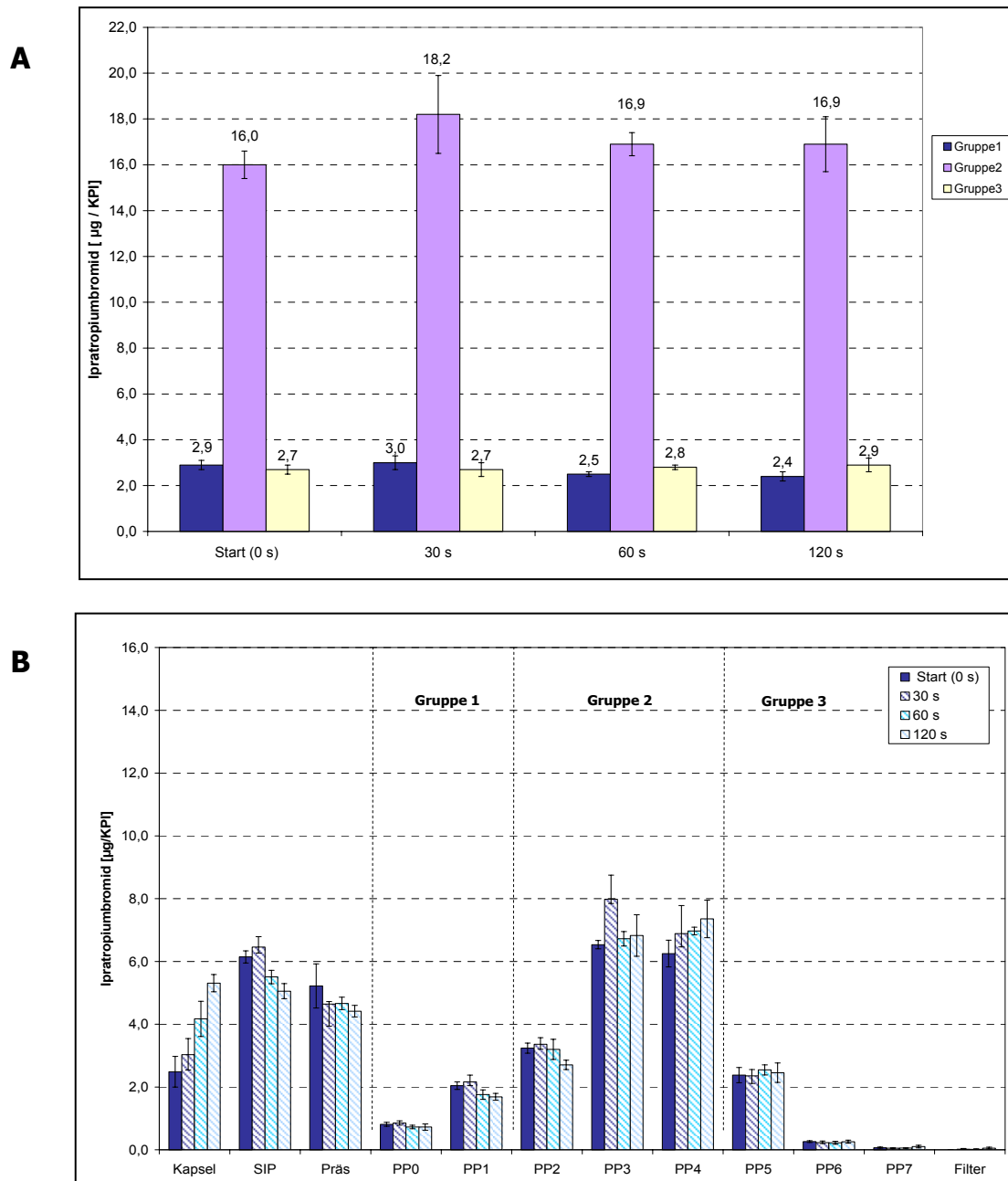


Abb.6-25 Einfluss mechanischer Belastung auf die Verteilung von Ipratropiumbromid (200M Laktose mit 2,5% Additiv / PE-Kapseln); A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter (n=4 Kollektive pro Formulierung, MW ± SD)

325M Respirose®

Wird in der Formulierung die „feine“ 200M Laktose gegen die „grobe“ 325M Laktose ausgetauscht und diese anschließend dem beschriebenen Belastungsschema ausgesetzt, ergeben sich inhalierbare Anteile (Gruppen 2+3) von 29,25 % – 34,0 %.

Tabelle 6-27 Übersicht der Gruppen (Ipratropiumbromid) nach unterschiedlicher mechanischer Belastung der 325M Laktose Formulierungen in PE-Kapseln (n = 4; MW ± SD)

	Mechanische Belastungsdauer			
	0 s	30 s	60 s	120 s
Gruppe 1 (PP0-1)	2,7 ± 0,2 µg	2,0 ± 0,2 µg	2,0 ± 0,7 µg	2,0 ± 1,1 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	11,0 ± 0,1 µg	11,7 ± 0,7 µg	12,4 ± 1,0 µg	10,9 ± 0,5 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	0,7 ± 0,1 µg	1,1 ± 0,2 µg	1,2 ± 0,4 µg	1,3 ± 0,3 µg

Die Ergebnisse der Gruppe 1 (PP0 – PP1) werden durch die mechanische Beanspruchung leicht reduziert. Allerdings wird diese Beobachtung durch die große Streubreite der Messergebnisse relativiert (siehe Tabelle 6-27 und Abb.6-26).

Innerhalb der Gruppe 2 (PP2 – PP4) führt die mechanische Belastung zu schwankenden Ergebnissen. Sowohl die Werte nach 30 s als auch nach 60 s steigen im Vergleich zum unbelasteten Basiswert an, wohingegen die Belastungsdauer von 120 s keinen Effekt zeigt (siehe Abb.6-26).

In Gruppe 3 (PP5 – Filter) kann zwischen dem Basiswert ohne und den Resultaten mit Belastung unterschieden werden. Hier steigen die Ergebnisse mit mechanischer Beanspruchung an. Es kann allerdings nicht näher zwischen den verschiedenen Belastungszeitspannen differenziert werden.

Analog den Beobachtungen bei der „feinen“ Laktose ist auch für die „grobe“ Laktose in Abhängigkeit von der Belastungsdauer ein markanter Anstieg der Kapselretention zu erkennen (siehe Abb.6-26). Dieser Trend zeigt sich parallel zu den annähernd „konstanten“ Ergebnissen im ACI. Je länger die Kapseln einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind, desto größer ist der zurückbleibende Pulverrest.

Wie bereits beschrieben, ist dies eine Auswirkung der elektrostatischen Aufladung. PE-Kapseln laden sich durch Reibung im Device auf und haben dadurch ein stärkeres Haftbestreben gegenüber den Partikeln (siehe Kapitel 7.1).

Eng verbunden mit dieser gesteigerten Retention ist ein Rückgang der Wirkstoffanteile im SIP. Wirkstoffpartikel, die sich unter „normalen“ Umständen (unbelastet) im SIP niederschlagen, bleiben ausgelöst durch die mechanische Beanspruchung in der Kapsel zurück (bedingt durch elektrostatische Aufladung der Kapsel).

Zusammengefasst kann man von einer Umverteilung der Partikel zwischen Kapsel und SIP sprechen.

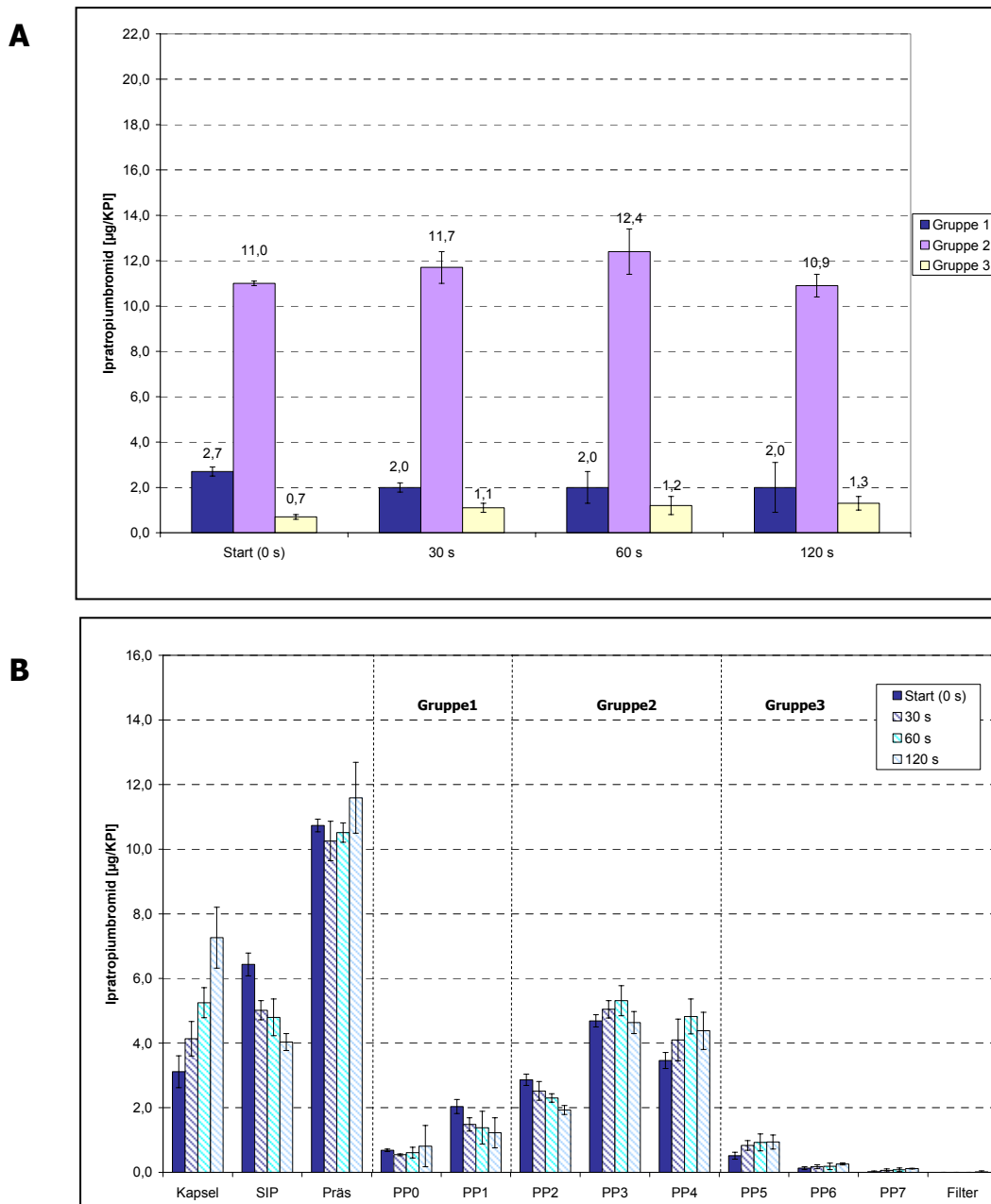


Abb.6-26 Einfluss mechanischer Belastung auf die Verteilung von Ipratropiumbromid (325M Laktose mit 2,5% Additiv / PE-Kapseln) A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter (n=4 Kollektive pro Kombination; MW \pm SD)

6.3.1.2 Laktose Monohydrat

Da die Belastungsdauer keine erkennbaren Unterschiede in der aerodynamische Partikelgrößenverteilung des Wirkstoffes ergibt, werden für das Trägermaterial nur der Basiswert (0 s) sowie der 30 s-Wert betrachtet und entsprechend ausgewertet. Trotzdem ist eine statistische Bewertung des Einflussfaktors *mechanische Belastung* auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose möglich.

200M Pharmatose®

Im Vergleich zum Basiswert (0 s) ist die Verteilung der mechanisch belasteten Probe (30 s) bedingt durch die Streubreite der Ergebnisse (siehe Abb.6-27) nahezu identisch. Diese Aussage gilt für alle Gruppen (siehe Tabelle 6-28).

Damit ist, wie bereits für den Wirkstoff definiert, kein Einfluss der mechanischen Belastung auf die aerodynamischen Eigenschaften erkennbar.

Tabelle 6-28 Übersicht der Gruppen (Laktose) nach unterschiedlicher mechanischer Belastung der 200M Laktose Formulierungen in PE-Kapseln (n = 4; MW ± SD)

	Mechanische Belastungsdauer	
	0 s	30 s
Gruppe 1 (PP0-1)	172,5 ± 3,1 µg	169,9 ± 3,1 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	174,9 ± 3,2 µg	188,9 ± 3,4 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	17,3 ± 0,3 µg	16,3 ± 0,3 µg

Die Ergebnisse von SIP und Präseparator gehen dagegen leicht zurück, während ein deutlicher Anstieg der Kapselretention zu erkennen ist (siehe Abb.6-27). Die durch Rotation ausgelöste elektrostatische Aufladung (siehe Kapitel 7.1) führt also auch zu einer Umverteilung des Trägermaterials. Laktosepartikel, die sich unter „normalen“ Bedingungen in SIP bzw. Präseparator niederschlagen bleiben in der Kapsel zurück.

325M Respitose®

Bezogen auf die Verteilung im Kaskadenimpaktor zeigen sich für die „grobe“ Laktose bedingt durch die große Streubreite der Ergebnisse keine relevanten Unterschiede zwischen belasteten und unbelasteten Kapseln (siehe Abb.6-27 und Tabelle 6-29).

Auch hier ist – verursacht durch die elektrostatische Aufladung – ein markanter Anstieg in der Kapselretention zu verzeichnen, der mit einem Rückgang der Ergebnisse von SIP und Präseparator einhergeht (siehe Abb.6-27).

Tabelle 6-29 Übersicht der Gruppen (Laktose) nach unterschiedlicher mechanischer Belastung der 325M Laktose Formulierungen in PE-Kapseln (n = 4; MW ± SD)

	Mechanische Belastungsdauer	
	0 s	30 s
Gruppe 1 (PP0-1)	77,4 ± 1,4 µg	70,9 ± 1,3 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	62,4 ± 1,1 µg	65,5 ± 1,2 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	2,7 ± 0,1 µg	8,5 ± 0,2 µg

Ausgelöst durch die mechanische Belastung ergeben sich für die beiden Laktosen die gleichen Ergebnisse wie bereits für den Wirkstoff beschrieben: Es kann kein eindeutiger Effekt der mechanischen Belastung auf die Verteilung abgeleitet werden.

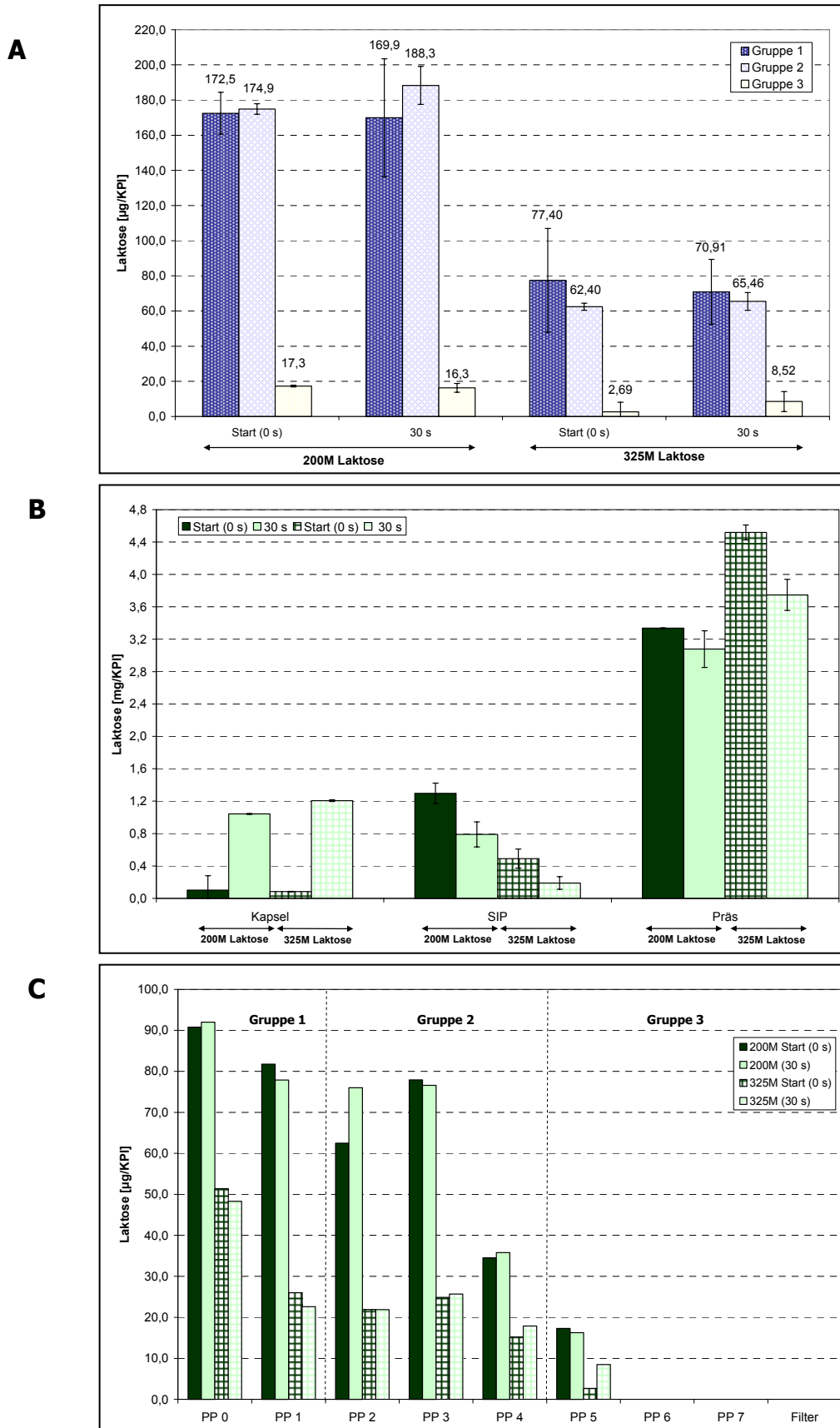


Abb.6-27 vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 200M und 325M Laktose mit jeweils 2,5% Additiv in PE-Kapseln (A = ohne Vormischung, B = mit Vormischung) A) Übersicht der Gruppen 1-3; B) Verteilung von Kapsel bis Präseparator und C) Verteilung von PP0 bis Filter (n=4 Kollektive pro Formulierung; MW± SD)

6.3.2 Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aus Gelatine-Kapseln

Um die Bedeutung des Kapselmaterials zu evaluieren, werden die Versuche bei sonst identischen Parametern mit adhäsiven („klebrigen“) Gelatine-Kapseln wiederholt.

6.3.2.1 Ipratropiumbromid

200M Pharmatose®

Wie bereits aus Kapitel 6.2 bekannt, tritt durch den Austausch des Kapselmaterials (inertes PE gegen adhäsive Gelatine) insgesamt eine deutliche Reduktion der inhalierbaren Anteile ein. Dieser Trend setzt sich, wenn auch weniger stark ausgeprägt, durch mechanische Beanspruchung weiter fort (siehe Tabelle 6-30 und Abb.6-28).

Tabelle 6-30 Übersicht der Gruppen (Ipratropiumbromid) nach unterschiedlicher mechanischer Belastung der 200M Laktose Formulierungen in Gelatine-Kapseln (n = 4; MW ± SD)

	Mechanische Belastungsdauer			
	0 s	30 s	60 s	120 s
Gruppe 1 (PP0-1)	2,5 ± 1,1 µg	1,6 ± 0,8 µg	1,2 ± 0,1 µg	1,4 ± 0,1 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	8,7 ± 0,7 µg	5,6 ± 0,6 µg	5,9 ± 1,0 µg	6,1 ± 0,8 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	0,9 ± 0,1 µg	0,8 ± 0,2 µg	0,7 ± 0,1 µg	0,7 ± 0,2 µg

Sowohl in Gruppe 1 (PP0 – PP1) als auch in Gruppe 2 (PP2 – PP4) tritt, im Vergleich zum Startwert, eine deutliche Reduktion der Ergebnisse auf (siehe Abb.6-28). Allerdings ist es nicht möglich, genauer zwischen den verschiedenen Stressbedingungen zu differenzieren. Die Ergebnisse der Gruppe 3 werden durch die Belastung nicht relevant verändert.

Eng verbunden mit der reduzierten Verteilung im Kaskadenimpaktor ist ein extremer Anstieg der Kapselretention (siehe Abb.6-28). Der durch die mechanische Belastung fehlende Feinanteil im ACI scheint bevorzugt in der Kapsel zurückzubleiben.

Zusätzlich trägt ein Rückgang der Wirkstoffanteile im SIP zur gesteigerten Kapselretention bei. Erneut kommt es durch die Kapselrotation im HandiHaler® zu einer Umverteilung der Wirkstoffpartikel.

Im Gegensatz zur Verteilung im Kaskadenimpaktor, kann innerhalb der Kapselretention zwischen den verschiedenen Stressbedingungen differenziert werden (siehe Abb.6-28). Die Retention ist zwar deutlich höher als der Basiswert (0 s), nimmt aber mit zunehmender Belastung wieder ab. Parallel dazu steigen die Wirkstoffanteile in SIP und Präseparator an.

Offensichtlich stellt sich nach 30 s eine „Sättigung“ der adhäsiven Kapselwand mit mehreren Pulverschichten ein, wobei die „wandfernen“ Schichten durch weitere mechanische Belastung bevorzugt wieder abgelöst werden.

Dies ist durch die unterschiedlich stark ausgeprägten Adhäsionskräfte zwischen den einzelnen Pulverschichten und der Kapselinnenseite zu erklären: je mehr Pulverschichten zwischen den Partikeln und der Kapseloberfläche liegen, desto geringer sind die herrschenden Kräfte (siehe Kapitel 7.1 / 7.2)

Eine weitere Erklärung für diese Beobachtung, ist die Bildung von „Multiplets“ (siehe Kapitel 7.4.2). Die „freien“ oder nur schwach an den Träger gebundenen Wirkstoffteilchen, werden durch die Belastung wieder von der Kapselwand gelöst und bilden mit der mikronisierten Laktose Agglomerate. Diese schlagen sich als scheinbar größere Teilchen bereits in SIP und Präseparator nieder.

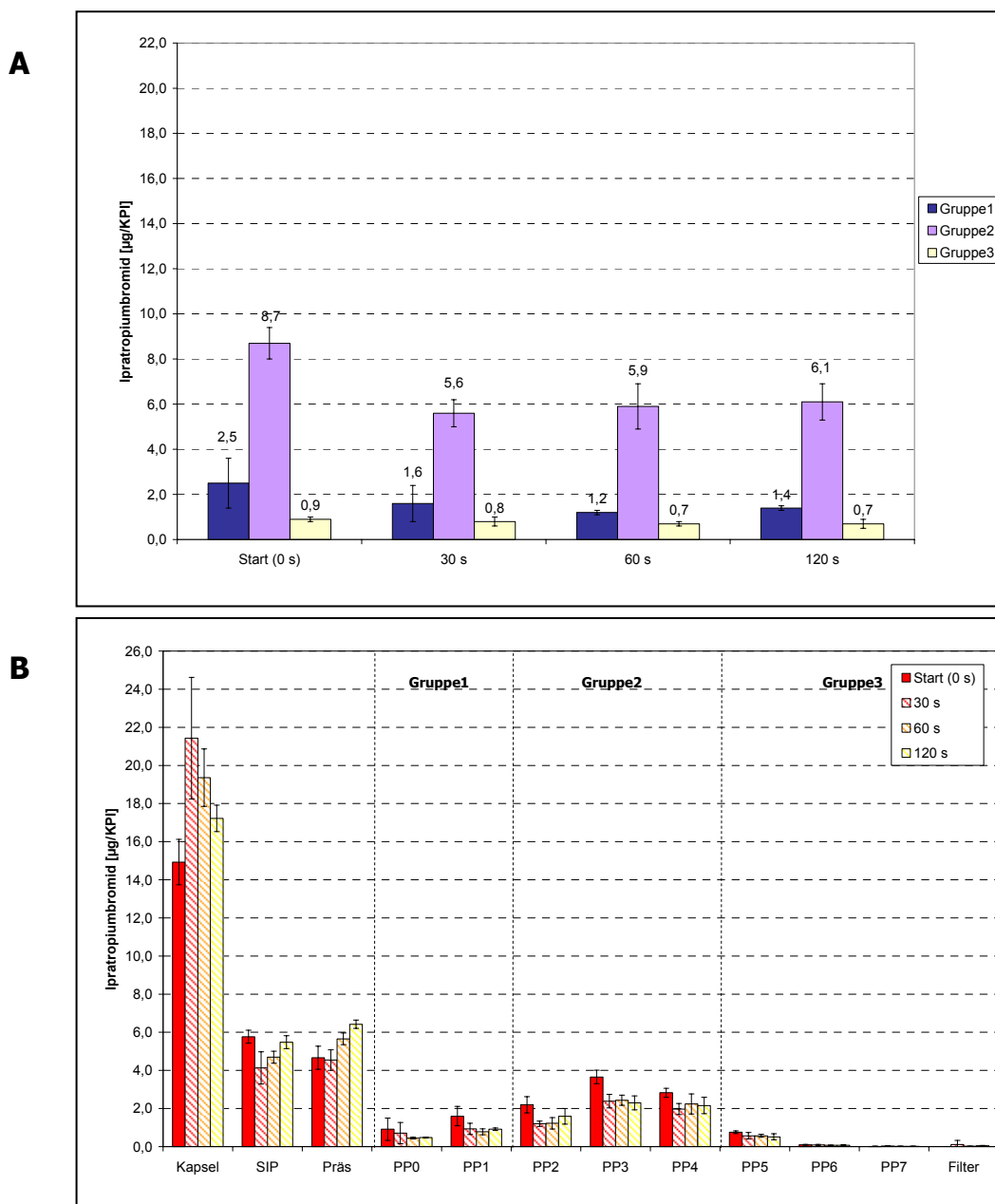


Abb.6-28 Einfluss mechanischer Belastung auf die Verteilung von Ipratropiumbromid (200M Laktose mit 2,5% Additiv / Gelatine-Kapseln) A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter (n=4 Kollektive pro Kombination; MW \pm SD)

325M Respitose®

Alle Aussagen bezüglich der Bedeutung des *Kapselmaterials* auf die Verteilung im Kaskadenimpaktor besitzen, wie bereits in Kapitel 6.2 beschrieben, auch bei der Verwendung von 325M Laktose ihre Gültigkeit. So führt der Austausch des Kapselmaterials auch bei „grober“ Trägerlaktose zu einer deutlichen Reduktion der inhalierbaren Anteile – ein Effekt, der durch mechanische Belastung weiter verstärkt wird (siehe Tabelle 6-31 und Abb.6-29).

Tabelle 6-31 Übersicht der Gruppen (Ipratropiumbromid) nach unterschiedlicher mechanischer Belastung der 325M Laktose Formulierungen in Gelatine-Kapseln (n=4; MW ± SD)

	Mechanische Belastungsdauer			
	0 s	30 s	60 s	120 s
Gruppe 1 (PP0-1)	1,3 ± 0,2 µg	0,7 ± 0,3 µg	0,5 ± 0,2 µg	0,5 ± 0,0 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	5,0 ± 0,4 µg	2,6 ± 0,7 µg	2,3 ± 0,9 µg	1,8 ± 0,2 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	0,3 ± 0,1 µg	0,2 ± 0,1 µg	0,2 ± 0,1 µg	0,1 ± 0,1 µg

Durch die mechanische Beanspruchung reduzieren sich die Ergebnisse der Gruppe 1 (PP0 – PP1) im Vergleich zum Basiswert (0 s) etwa um die Hälfte. Dabei ist eine genauere Differenzierung zwischen den Ergebnissen der einzelnen Stressbedingungen nicht möglich (siehe Abb.6-29). Gleiches gilt für die Resultate der Gruppe 2. Hier tritt, unabhängig von der Belastungsdauer, eine deutliche Reduktion der Ergebnisse ein, die nicht weiter differenziert werden kann (siehe Tabelle 6-31).

Einzig die Verteilung auf den PP5 – Filter (Gruppe 3) wird durch die mechanische Beanspruchung nicht nennenswert beeinflusst.

Der starke Anstieg in der Kapselretention zeigt sich erneut parallel zur reduzierten Verteilung im Kaskadenimpaktor (siehe Abb.6-29). Allerdings führt die zunehmende Belastung in diesem Fall zu keiner weiteren Differenzierung der Ergebnisse.

Ebenfalls eng mit dem Anstieg der Kapselretention verbunden, ist eine Reduktion der Wirkstoffanteile im SIP. Auch hier kann nur zwischen dem Basiswert und den belasteten Werten unterschieden werden. Eine genauere Korrelation zwischen Belastungsdauer und Wirkstoffmenge ist nicht möglich.

Wie in Abb.6-29 zu erkennen, ergeben sich die gesteigerten Kapselreste durch eine Reduktion der Partikelanteile, die bis in SIP und Kaskadenimpaktor vordringen. Wieder ist keine weitere Differenzierung zwischen den einzelnen Stressbedingungen möglich. Das bedeutet, dass auch in diesem Fall die Kapselwand scheinbar bereits nach 30 s mit einem Maximum an Wirkstoff belegt ist („Absättigung“). Da allerdings mit zunehmender Belastung der Formulierung mit 325M Laktose kein Rückgang der Kapselretention zu verzeichnen ist, kann man davon ausgehen, dass die einzelnen Pulverschichten wesentlich stärker gebunden sind, als bei der Formulierung mit 200M Laktose.

Weiterhin bleiben neben den „freien“ Wirkstoffpartikeln auch grobe Trägerpartikel (mit daran gebundenem Wirkstoff) zurück. Diese besitzen aufgrund ihrer „Keilform“ ein stärkeres Haftbestreben als „runde“ Teilchen (siehe Kapitel 7.2), was die fehlende

Reversibilität der Oberflächenbeladung erklärt. Daher sind bei der „groben“ 325M Laktose auch „wandferne“ Schichten noch ausreichend fest mit der Kapseloberfläche verbunden und können durch mechanische Beanspruchung nicht abgelöst werden.

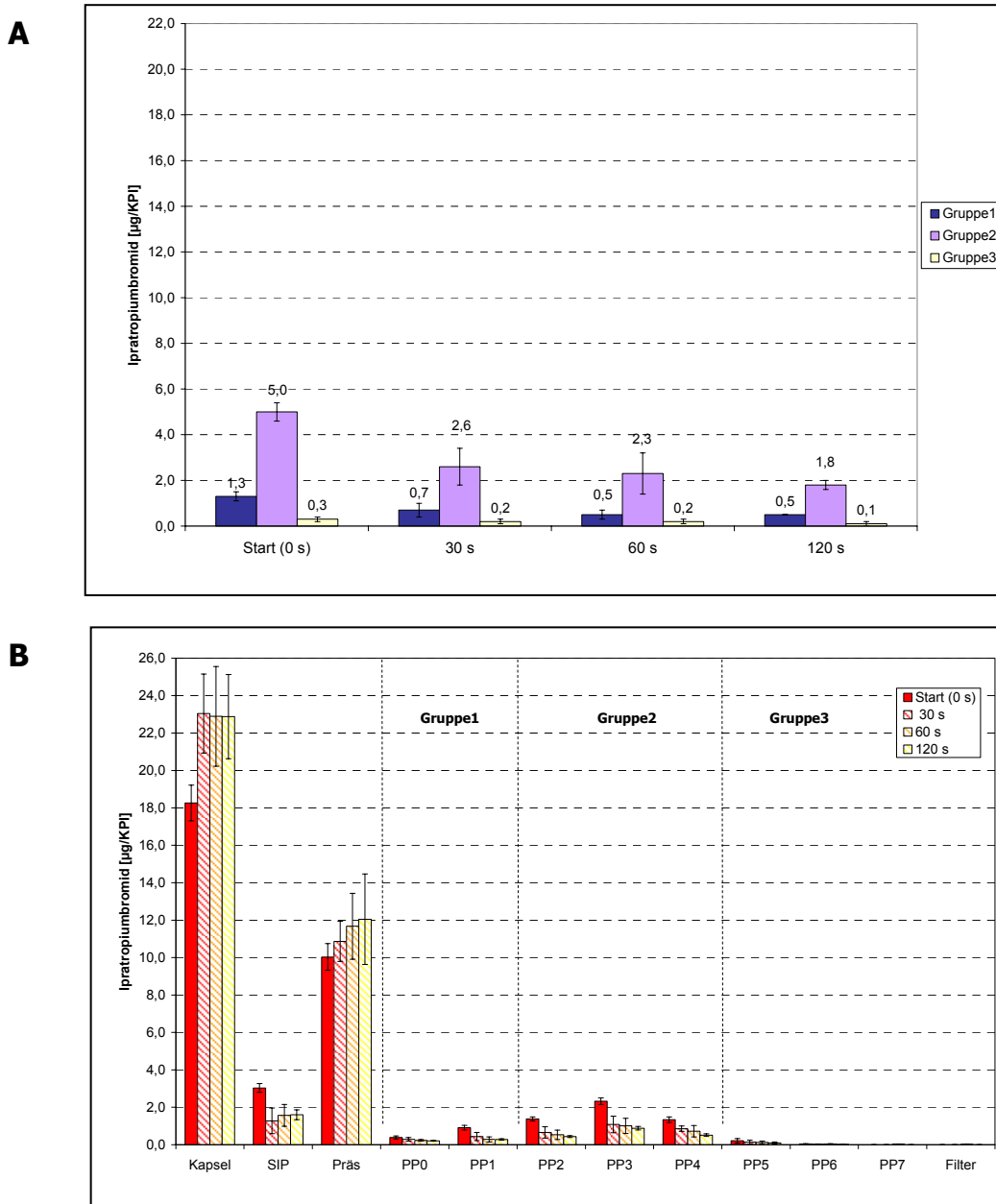


Abb.6-29 Einfluss mechanischer Belastung auf die Verteilung von Ipratropiumbromid (325M Laktose mit 2,5% Additiv / Gelatine-Kapseln) A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter (n=4 Kollektive pro Kombination; MW \pm SD)

6.3.2.2 Laktose Monohydrat

Da bezogen auf die Wirkstoffverteilung keine Differenzierung zwischen den einzelnen Stressbedingungen möglich ist, werden nur der Basiswert (0 s) und der 30s-Wert untersucht und entsprechend bewertet. Dieser reduzierte Probenumfang ist ausreichend, um eine statistische Auswertung der Effekte auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils sicherzustellen.

200M Pharmatose®

Im Vergleich zum Basiswert gehen die Resultate der Gruppe 2 (PP2 – PP4) etwa um den Faktor drei zurück (siehe Tabelle 6-32). Dagegen bleibt die Verteilung auf den PP0 – PP1 durch die mechanische Belastung unverändert. Der Feinstanteil auf den PP5 – Filter ist nach Belastung nicht mehr nachweisbar (siehe Abb.6-30).

Tabelle 6-32 Übersicht der Gruppen (Laktose) nach unterschiedlicher mechanischer Belastung der 200M Laktose Formulierungen in Gelatine-Kapseln (n = 4; MW ± SD)

	Mechanische Belastungsdauer	
	0 s	30 s
Gruppe 1 (PP0-1)	87,8 ± 1,6 µg	76,3 ± 1,4 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	100,2 ± 1,8 µg	28,6 ± 0,5 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	2,3 ± 0,1 µg	Nicht nachweisbar

Die in Abb.6-30 dargestellten Veränderungen in SIP und Präseparator sind, analog zur reduzierten Verteilung im ACI, mit einem leichten Anstieg der Kapselretention verbunden.

325M Respitose®

Im Vergleich zum Basiswert werden die Anteile an Laktose in den Gruppen 1 und 2 (PP0 – PP4) durch mechanische Belastung deutlich reduziert (siehe Tabelle 6-33). Einzig der Feinstanteil (PP5 – Filter) ist sowohl bei belasteten als auch bei den unbelasteten Proben nicht nachweisbar. Dies beweist, dass besonders die feinen Partikel ($\leq 4,9\mu\text{m}$) auf der Kapseloberfläche zurückgehalten werden (siehe Abb.6-30).

Tabelle 6-33 Übersicht der Gruppen (Laktose) nach unterschiedlicher mechanischer Belastung der 325M Laktose Formulierungen in Gelatine-Kapseln (n = 4; MW ± SD)

	Mechanische Belastungsdauer	
	0 s	30 s
Gruppe 1 (PP0-1)	66,8 ± 1,2 µg	38,9 ± 0,7 µg
Gruppe 2 (PP2-4)	42,2 ± 0,8 µg	21,8 ± 0,4 µg
Gruppe 3 (PP5-Filter)	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar

Parallel zu diesen Ergebnissen ist ein leichter Anstieg der Kapselretention zu verzeichnen, wohingegen die Resultate für SIP und Präseparator unverändert bleiben (siehe Abb.6-30). Da die Ergebnisse hier im Milligramm-Bereich liegen, fällt die Umverteilung der Laktosepartikel im ACI (µg-Bereich) nicht ins Gewicht. Allerdings ist der Abb.7-18 klar zu entnehmen, dass neben den „kleinen“ Partikeln auch deutlich „grobe“ Partikel auf der Kapseloberfläche zurück bleiben (siehe Kapitel 7.3.2).

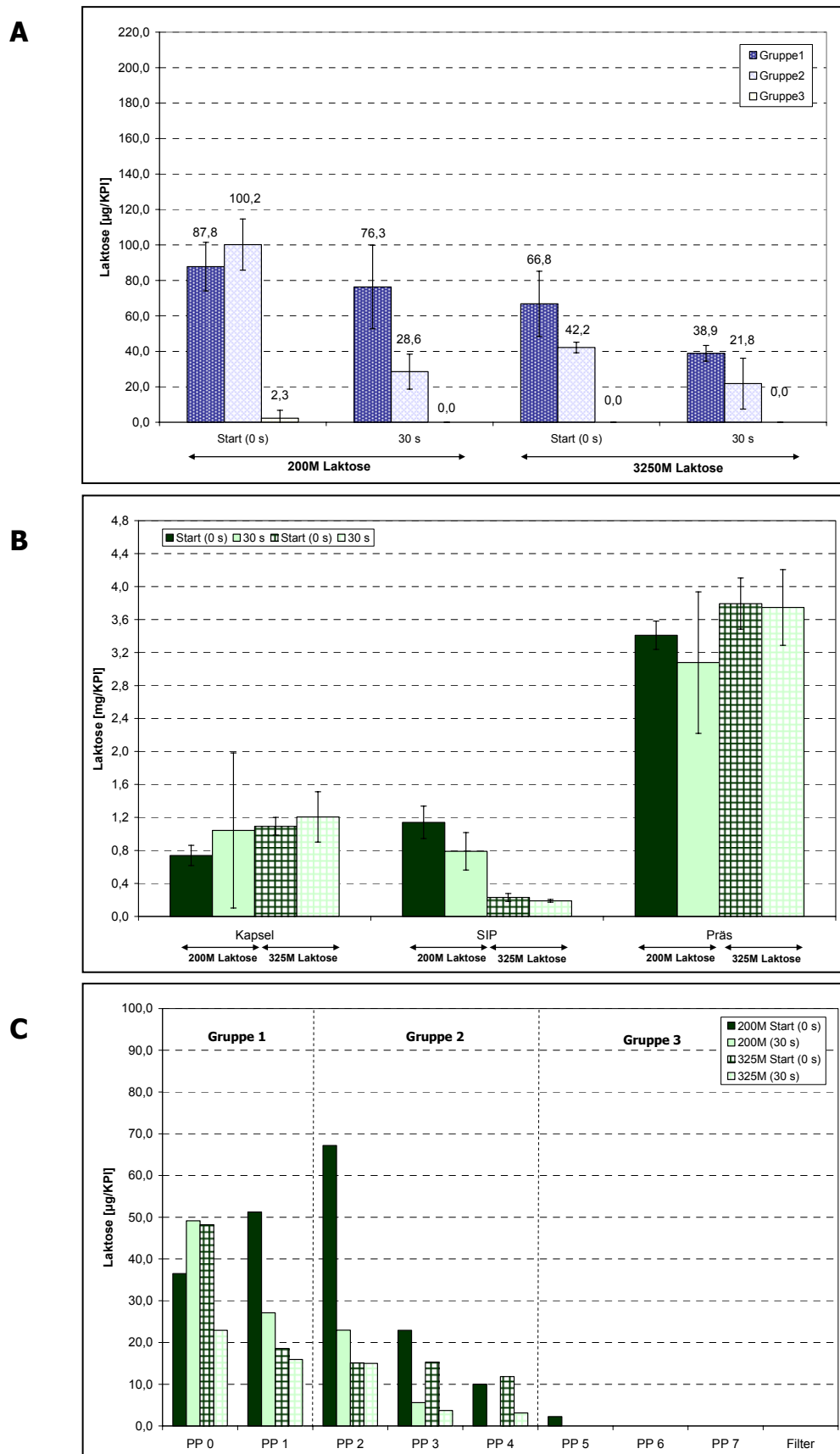


Abb.6-30 vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 200M und 325M Laktose mit jeweils 2,5% Additiv in Gelatine-Kapseln (A = ohne Vormischung, B = mit Vormischung) A) Übersicht der Gruppen 1-3; B) Verteilung von Kapsel bis Präseparator und C) Verteilung von PP0 bis Filter (n=4 Kollektive pro Formulierung; MW± SD)

6.3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der beobachteten Unterschiede erfolgt mit dem Software System SAS® [91-94] und wird analog Kapitel 6.2 durchgeführt [98;99].

6.3.3.1 Statistische Bewertung zu Ipratropiumbromid

Mit dem Verfahren der Varianzanalyse werden die Effekte der Faktoren *Belastungsdauer*, *Kapselart* und *Laktoseart* auf den Parameter *Verteilung des aerodynamischen Feinanteils* untersucht und analog Kapitel 6.2 bewertet [99].

Tabelle 6-34 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter *aerodynamische Partikelgrößenverteilung* (n = Anzahl der gemessenen Kapseln pro Faktorkombination; A= ohne Vormischung; B = mit Vormischung)

Laktose 325M				Laktose 200M			
Kapselart	Formulierung	Zeit [s]	n	Kapselart	Formulierung	Zeit [s]	n
Gelatine	A_2,5	0	4	Gelatine	A_2,5	0	4
	A_2,5	30	4		A_2,5	30	4
	A_2,5	60	4		A_2,5	60	4
	A_2,5	120	4		A_2,5	120	4
PE	A_2,5	0	4	PE	A_2,5	0	4
	A_2,5	30	4		A_2,5	30	4
	A_2,5	60	4		A_2,5	60	4
	A_2,5	120	4		A_2,5	120	4

Tabelle 6-35 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Parameter *Gruppe 1 – 3 (Verteilung von Ipratropiumbromid im ACI)* - Ergebnisse der ANOVA

	Gruppe1		Gruppe2		Gruppe3	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Haupteffekte						
Laktose	34,09	0,0001	477,82	0,0001	548,28	0,0001
Kapselart	95,36	0,0001	2096,73	0,0001	907,44	0,0001
Zeit der mech. Belastung	8,54	0,0001	6,29	0,0011	1,40	0,2536
Zweifach-Wechselwirkungen						
Laktose*Kapselart	3,28	0,0762	20,83	0,0001	133,32	0,0001
Laktose*Zeit	0,46	0,7107	1,22	0,3128	1,81	0,1574
Kapselart*Zeit	0,85	0,4719	22,07	0,0001	8,00	0,0002

Signifikanzniveau α : 0,05

Gruppe 1 (PP0 - PP1)

Durch die ANOVA werden folgende Haupteffekte identifiziert und als statistisch signifikant ausgewiesen (siehe Tabelle 6-35 und Abb.6-31):

- Erwartungsgemäß führt die Ausbringung aus PE-Kapseln zu deutlich höheren Ergebnissen als aus Gelatine-Kapseln ($p=0,0001$).
- Gleiches gilt für den Einfluss des Trägermaterials ($p= 0,0001$). Die Formulierungen aus „feiner“ 200M Laktose liefern signifikant höhere Werte als die entsprechende Formulierung aus „grober“ 325M Laktose.
- Fast man alle Ergebnisse pro Zeitpunkt zusammen und vergleicht diese Werte, ist eine Reduktion sichtbar ($0s > 30s > 60s \geq 120s$; siehe Pfeile in Abb.6-31) – ein Effekt, der zwar durch die ANOVA als signifikant ausgewiesen wird ($p=0,0001$), aber im Vergleich zu den anderen Effekten eine eher untergeordnete Rolle spielt.

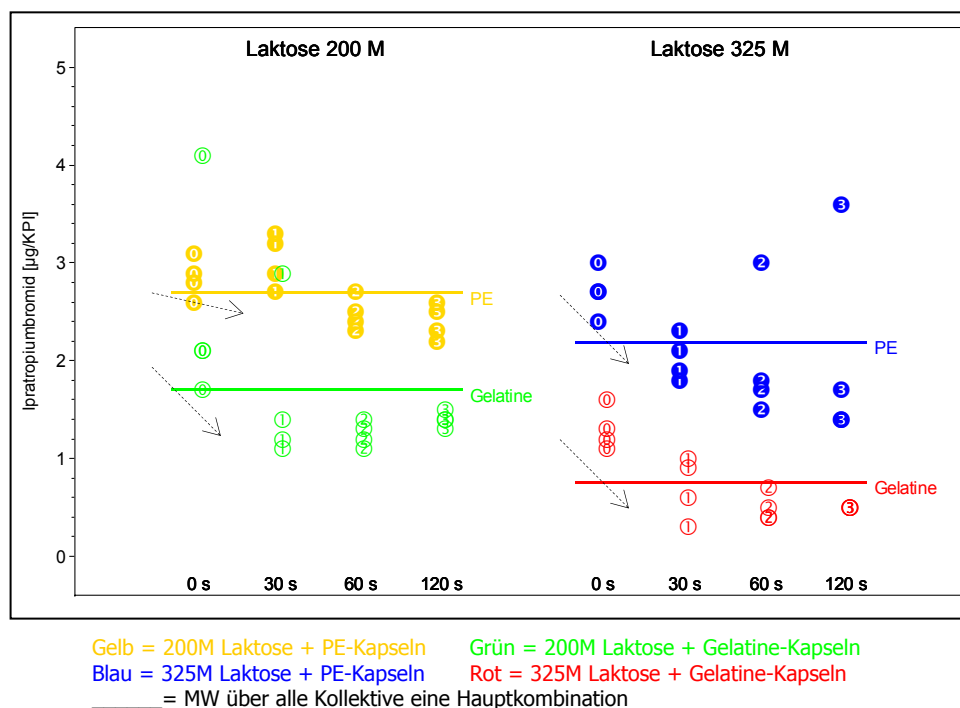


Abb.6-31 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter Gruppe 1 (Ipratropiumbromid-Verteilung auf PP0-PP1); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

Gruppe 2 (PP2 - PP4)

Es werden folgende Haupteffekte durch die ANOVA identifiziert (siehe Tabelle 6-35 und Abb.6-32):

- Es gelten die gleichen Aussagen wie bereits für Gruppe 1 beschrieben: sowohl das Kapselmaterial als auch die Trägerlaktose zeigen unabhängig voneinander einen starken Einfluss auf die Ergebnisse der Gruppe 2 (je $p=0,0001$).

- Wieder sind die Resultate ohne Belastung deutlich höher, als die Ergebnisse mit mechanischer Belastung ($p=0,0011$). Allerdings ist eine genaue Differenzierung innerhalb der verschiedenen Zeitspannen nicht möglich ($0s > 30s \sim 60s \sim 120s$).

Für die Resultate der Gruppe 2 lassen sich innerhalb einer Trägerlaktose deutliche Unterschiede zwischen den Kapselarten nachweisen (= Zweifach-Wechselwirkung). Zwar sind die jeweiligen Ergebnisse mit 200M Laktose immer größer als mit 325M Laktose (siehe MW-Balken in Abb.6-31/6-32), aber eine Differenzierung tritt innerhalb der Gruppe 2 viel deutlicher in Erscheinung. In Kombination mit der Belastungszeit zeigen die Kapselmaterialien unterschiedliche Effekte. So ist eine Reduktion der Ergebnisse nur in Gelatine-Kapseln zu beobachten, während in PE-Kapseln kein Einfluss durch mechanische Belastung nachzuweisen ist (siehe Pfeile in Abb.6-32). Dieser Trend wird durch die ANOVA als signifikant ausgewiesen ($p=0,0001$).

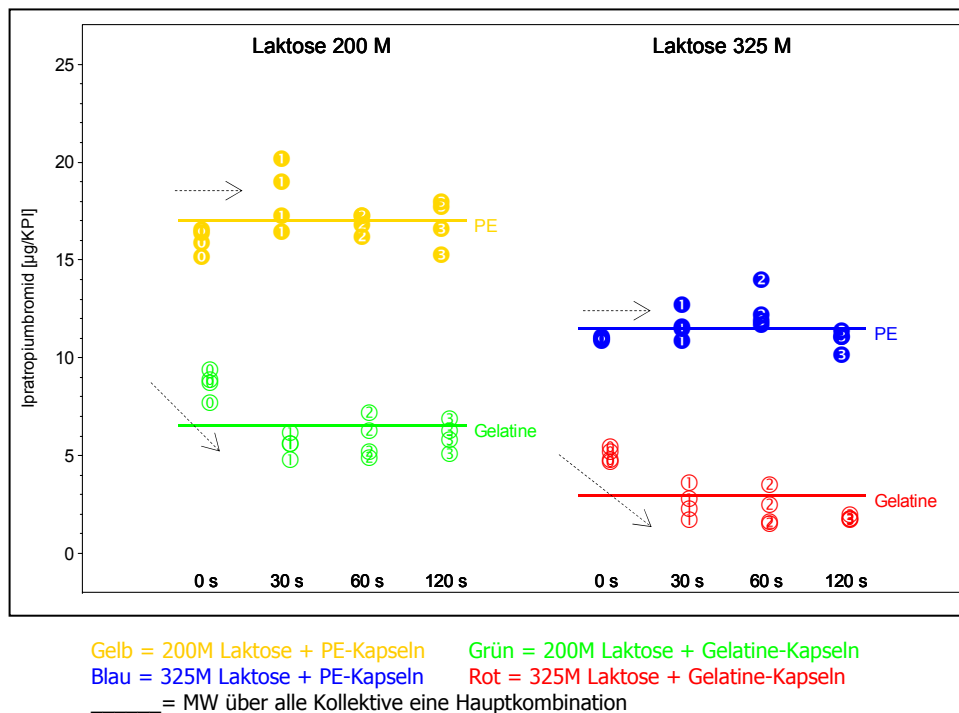


Abb.6-32 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter *Gruppe 2* (*Ipratropiumbromid-Verteilung auf PP2-PP4*); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

Gruppe 3 (PP5 - Filter)

Es ergeben sich folgende signifikanten Effekte (siehe Tabelle 6-35 und Abb.6-33):

- Im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 besitzen nur noch die Faktoren Kapselart und Trägerlaktose einen deutlichen Einfluss auf die Verteilung (je $p=0,0001$). Auch hier liefern PE-Kapseln höhere Resultate als Gelatine-Kapseln. Zusätzlich verbessert 200M Laktose die Ausbringung im Vergleich zu 325M Laktose.

Bezogen auf die signifikanten Unterschiede zwischen den Kombinationen aus Laktose und Kapselart (siehe Abb.6-33) gelten die für Gruppe 2 beschriebenen Aussagen.

Nicht relevant dagegen, sind die in Abhängigkeit der Belastungsdauer beobachteten Unterschiede innerhalb der Kapselarten (siehe Pfeile in Abb.6-33).

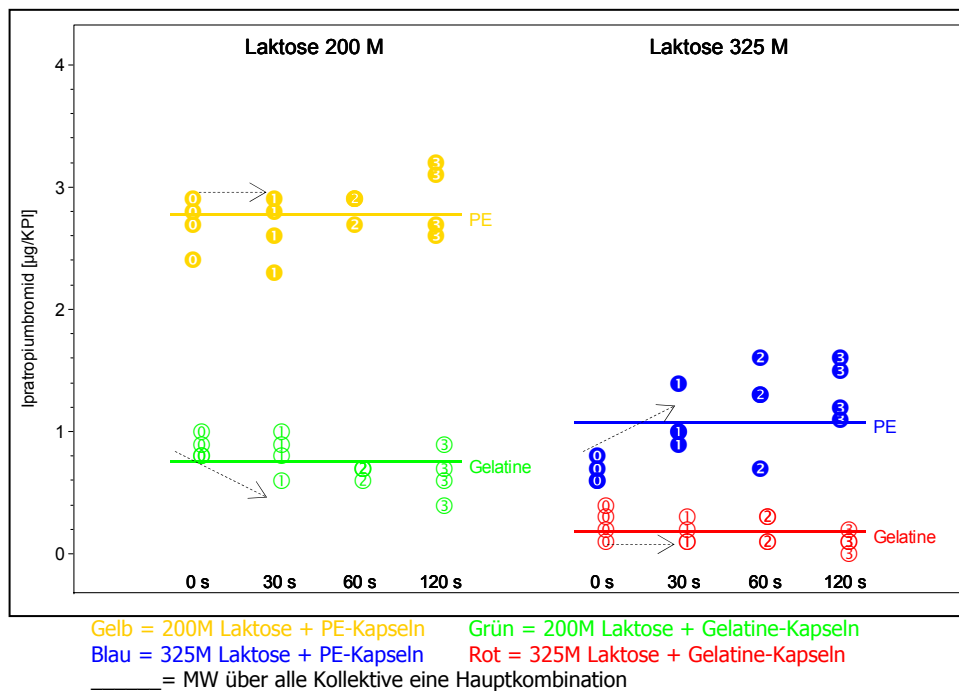


Abb.6-33 Einfluss der verschiedenen Faktoren auf den Parameter *Gruppe 3* (Ipratropiumbromid-Verteilung auf PP5-Filter); direkter Vergleich der vier Hauptkombinationen

6.3.3.2 Statistik zu Laktose Monohydrat

Die genaue statistische Bewertung des Einflussfaktors mechanische Belastung auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Laktose in Abhängigkeit des Kapselmaterials ist Kapitel 6.2.3.2 zu entnehmen. Im Folgenden sind die wichtigsten Aussagen kurz zusammengefasst:

- Für die Gruppen 1 und 3 ist kein deutlicher Einfluss der mechanischen Belastung auf die Verteilung zu erkennen (siehe Abb.6-20/6-22 und Tabelle 6-23/6-25).
- Lediglich in Gruppe 2 zeigt sich ein Kapselmaterial-abhängiger Effekt der mechanischen Belastung auf die Verteilung (siehe Abb.6-21 und Tabelle 6-24). So kann in adhäsiven Gelatine-Kapseln zwischen belasteten und unbelasteten Formulierungen differenziert werden, während in PE-Kapseln kein Unterschied zu erkennen ist.

6.3.3.3 Zusammenfassung

Der Faktor *mechanische Belastung* kann die Verteilung von Ipratropiumbromid und Laktose in Abhängigkeit vom Kapselmaterial deutlich beeinflussen (siehe Abb.6-24/6-34). Eine genaue Quantifizierung der beobachteten Effekte erfolgt in Kapitel 7.

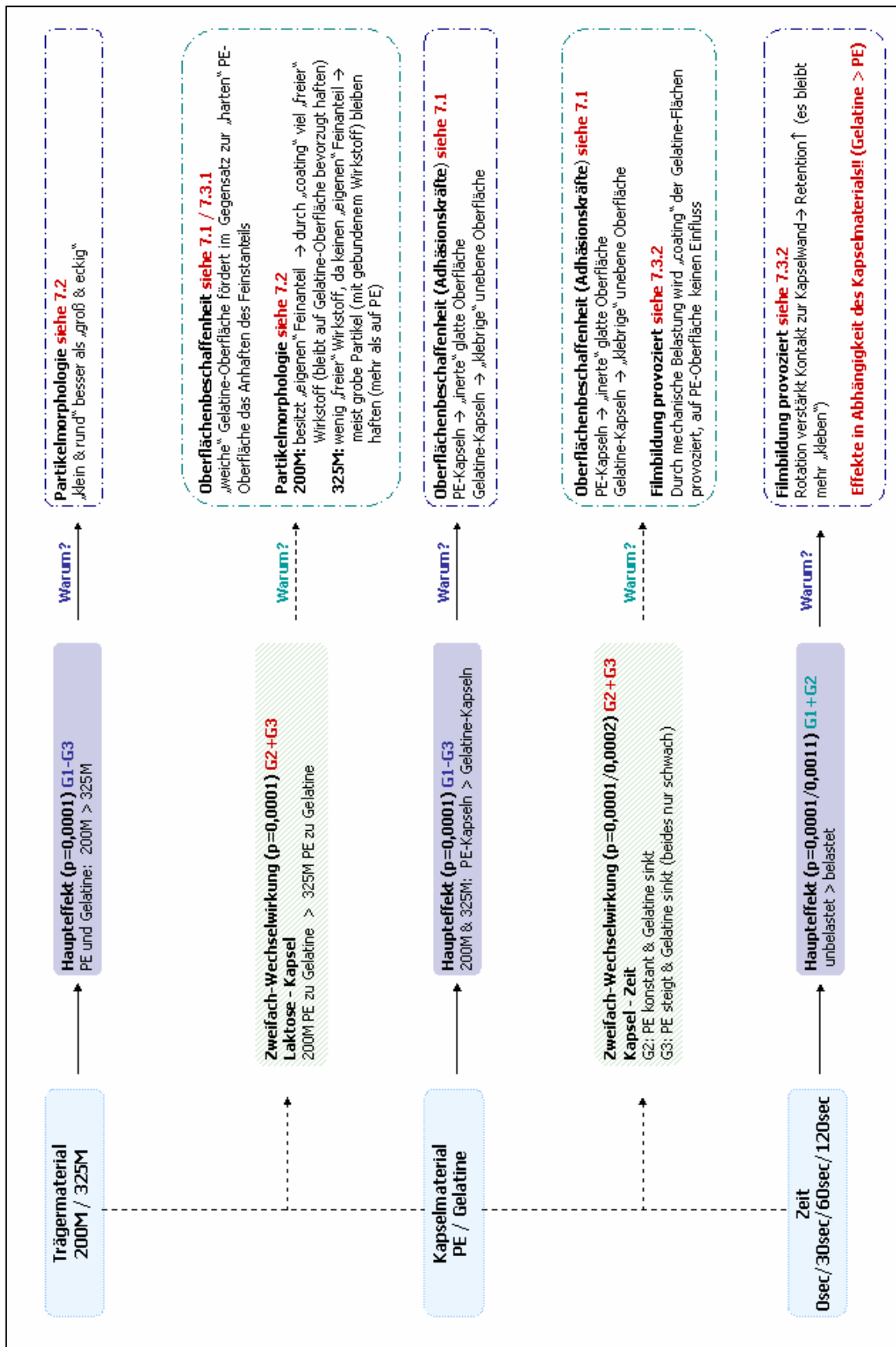


Abb.6-34 Zusammenfassung der Einflussfaktoren – statistische Auswertung und Erläuterung der Effekte auf die Verteilung von Ipratropiumbromid (G1 = Gruppe 1; G2 = Gruppe 2; G3 = Gruppe 3)

7 Ergebnisse II – Quantifizierung der Einflussfaktoren

In diesem Teil der Auswertung wird geprüft und bewertet „WIE“ *Kapselmaterial, Trägerlaktose, Feinanteil, Mischreihenfolge* und *mechanische Belastung* die aerodynamischen Eigenschaften verändern und „WARUM“ die Einflüsse unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Alle aufgezeigten Effekte (siehe Kapitel 6) lassen sich, wie bereits in der Einleitung erwähnt, auf Wechselwirkungen zwischen Kapsel und Partikel sowie zwischen Partikel und Partikel zurückführen. Daher werden diese beiden Beziehungen (Partikel-Kapsel und Partikel-Partikel) getrennt voneinander evaluiert.

Grundvoraussetzung und damit Basis für eine genaue Bewertung der Effekte ist sowohl eine ausführliche und genaue Betrachtung der Oberflächenstruktur von Kapseln als auch der Partikelmorphologie. Hier vorliegende Unterschiede bezüglich Struktur und Form haben einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die herrschenden Bindungskräfte und beeinflussen auf diese Weise die Stärke und das Ausmaß der Wechselwirkungen. Dies zeigt sich auch in den Varianzanalysen, welche neben dem Kapselmaterial auch immer die Trägerlaktosen als Haupteinflussgrößen definieren.

7.1 Oberflächen & Adhäsion

Wie an den unterschiedlichen Ergebnissen der beiden Kapselmaterialien zu erkennen ist, hat die Beschaffenheit der Innenseite einen gravierenden Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften der Pulvermischung. Dieser Einfluss wird in allen Versuchen durch die ANOVA als statistisch signifikant ausgewiesen (siehe Kapitel 6).

Bereits die optische Bewertung der Oberflächenbeladung macht erste Unterschiede zwischen den Kapselmaterialien sichtbar. So sind auf der Innenseite einer Gelatine-Kapsel deutlich mehr Pulverpartikel zu erkennen, als auf der Oberfläche einer PE-Kapsel (siehe Abb. 7-15/7-18).

Die daran anschließende genauere Betrachtung der Leerkapseln im Lichtmikroskop ergibt erste markante Unterschiede bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit. Das Erscheinungsbild der verwendeten Gelatine-Kapsel ist sehr „unregelmäßig“ ausgeprägt: Tröpfchen in unterschiedlicher Form, Größe und Anzahl bilden einen großflächigen Film, der an einigen Stellen von schuppigen Arealen unterbrochen wird (siehe Abb.7-1).

Die Innenseite einer PE-Kapsel dagegen ist völlig frei von solchen Unebenheiten. Hier sind auf einer relativ gleichmäßigen und glatten Oberfläche nur einige Rillen und Riefen erkennbar. Eine Beobachtung, die sich bei der Betrachtung im Rasterelektronenmikroskop bestätigt (siehe Abb.7-1). Dagegen sind auf der Gelatine-Oberfläche neben den Tröpfchen und Schuppen auch unterschiedlich stark ausgeprägte „Grübchen“ und „Krater“ zu finden, die das Erscheinungsbild in charakteristischer Weise beeinflussen (siehe Abb.7-1).

Damit ist der Grad an Unregelmäßigkeiten, wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, bei Gelatine-Oberflächen deutlich stärker ausgebildet als bei PE-Oberflächen, was zu einem merklichen Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften führt. So ist beispielsweise die ausgebrachte Dosis aus Gelatine-Kapseln wesentlich geringer als aus PE-Kapseln, da bedingt durch die Unregelmäßigkeiten mehr Pulver zurück bleibt. Fasst man die Beobachtungen zusammen, ergibt sich folgende These: je unregelmäßiger die Oberflächenstruktur, desto stärker der Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften.

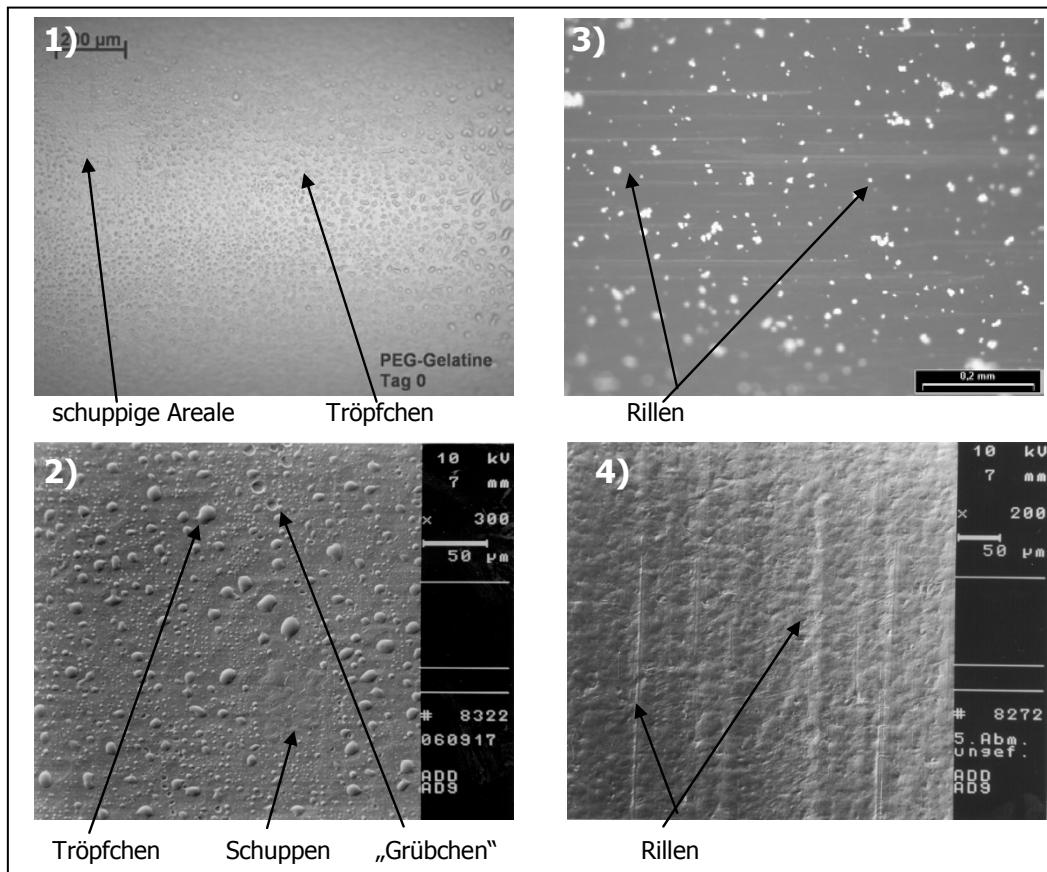


Abb.7-1 Licht- und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Kapselinnenseiten zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur von Gelatine- (1+2) und PE- (3+4) Kapseln

Eine mögliche Erklärung für die dargestellten Unterschiede im Ausbringungsverhalten der Kapseln liefert das verschieden ausgeprägte Haftbestreben der jeweiligen Oberflächen. Durch die Vielzahl der Tröpfchen und „Grübchen“ nehmen die Anzahl der Kontaktstellen auf der Oberfläche und damit die Haftmöglichkeit zu. Vorhandene Pulverpartikel sammeln sich nicht nur in den „Grübchen“ und „Kratern“, sondern sinken in die auf der Oberfläche vorliegenden Tröpfchen ein (siehe Abb.7-2). Aufgrund dieser flexiblen Anpassungsmöglichkeiten wird die Gelatine-Oberfläche als „weich“ bezeichnet.

Die glatte, unflexible Oberfläche einer PE-Kapsel wird dagegen als „hart“ charakterisiert. Hier ist die Anzahl der Kontaktstellen durch fehlende Unebenheiten und „Einbettungsmöglichkeiten“ (kein Anpassen der Oberfläche an die Partikel) verringert. Folglich ist das „Haftbestreben“ der Teilchen merklich reduziert (siehe Abb.7-2).

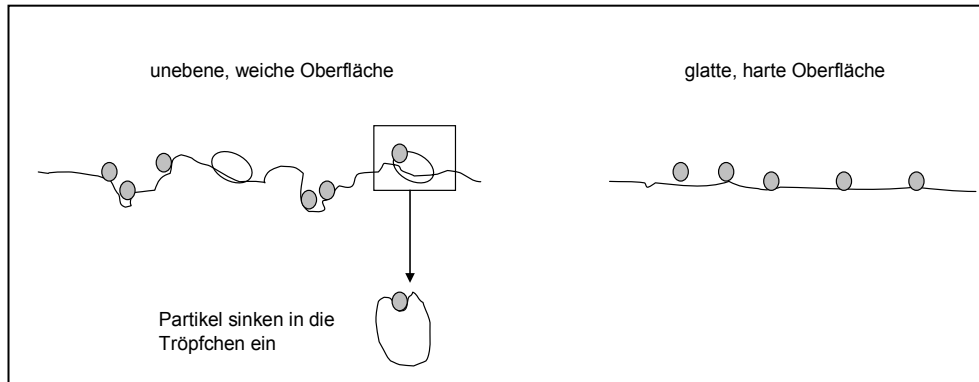


Abb.7-2 Anhaften von Pulverpartikeln auf „weichen“ und „harten“ Oberflächen (schematisch)

Neben der Oberflächenstruktur, die sich als Hauptursache für das unterschiedliche Ausbringungsverhalten der beiden Kapseltypen erweist, werden auch die vorliegenden Bindungskräfte näher betrachtet und charakterisiert. Dazu werden mittels Rasterkraftmikroskopie exemplarisch die Wechselwirkungen zwischen Ipratropiumbromid und den beiden Kapselmaterialien Gelatine und PE ermittelt und quantifiziert (siehe Kapitel 3.3 und 4.2.6).

Das primäre Ziel der vorliegenden Testreihe war es herauszuarbeiten, ob und wie weit das vorliegende Verfahren geeignet ist, Erkenntnisse über die Stärke der Wechselwirkungen zu erhalten. Aus diesem Grund wurde mit einem viel geringeren Probenumfang (vier modifizierte Cantilever siehe P6-P9; $n=20$ Einzelmessungen) gearbeitet, als für eine statistisch signifikante Aussage erforderlich ist. Die Ergebnisse sind daher nur als zusätzliche Information verstehen. Sie können nicht zur Evaluierung des Effekts von Kapseloberflächen auf die aerodynamischen Eigenschaften herangezogen werden, da bedingt durch den Probenumfang eine statistische Bewertung der beobachtenden Ergebnisse nicht möglich ist.

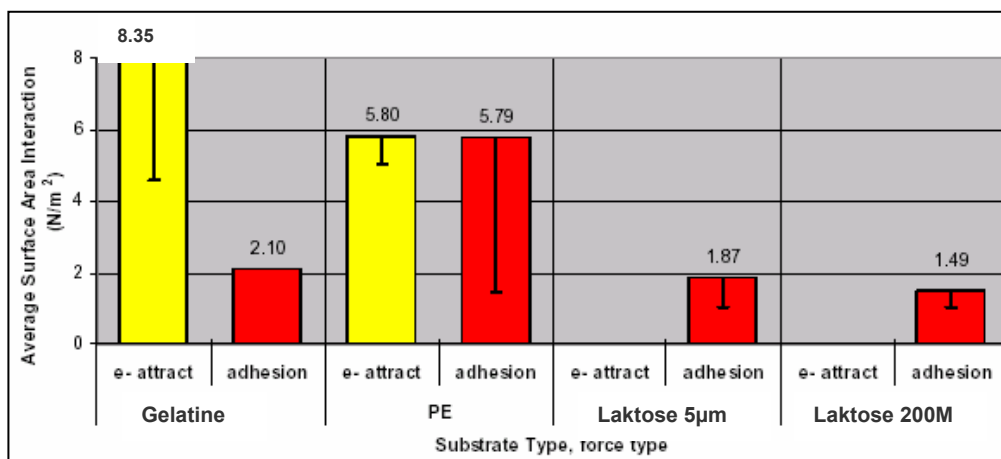


Abb.7-3 Darstellung der Wechselwirkungen als Kraft pro Fläche (N/m²): Ipratropiumbromid gegen verschiedene Proben – Differenzierung in Kräfte mit langer (e-attract) und kurzer (adhesion) Reichweite (MW \pm SD der jeweiligen modifizierten Cantilever; $n=20$ Einzelmessungen pro Cantilever) [68]

Wie in Abb.7-3/7-5 ersichtlich, wird die Wechselwirkung zwischen Ipratropiumbromid und Gelatine von elektrostatischen Kräften (~ 500 nN) dominiert.

Die chemischen Strukturen der beiden Komponenten erklären dieses Ergebnis: sowohl das Polypeptid Gelatine als auch das Salz Ipratropiumbromid verfügen über ionische und polare Gruppen, die zur Ausbildung von permanenten Dipolen und Ion-Ion-Wechselwirkungen führen. Die in Abb.7-4 dargestellte typische Oberflächenladung der beiden Komponenten veranschaulicht dies. So verfügen sowohl Ipratropiumbromid als auch Gelatine über partiell vorhandene positive (blau) und negative (rot) Oberflächenladungen, die je nach Anordnung der Moleküle zueinander, entsprechend in Wechselwirkung treten. Das Rasterkraftmikroskop identifiziert die herrschenden Kräfte eindeutig als elektrostatische Wechselwirkungen mit langer Reichweite (siehe Kapitel 3.3).

Die ebenfalls vorliegenden Adhäsionskräfte gelten als Artefakt, da innerhalb der Messreihe mit einem doppelspitziigen Cantilever gearbeitet wurde. Durch Wassereinschlagerungen zwischen diesen Spitzen entstehen stark verfälschende Kapillarkräfte (siehe Kapitel 3.3), welche als Adhäsionskräfte quantifiziert werden.

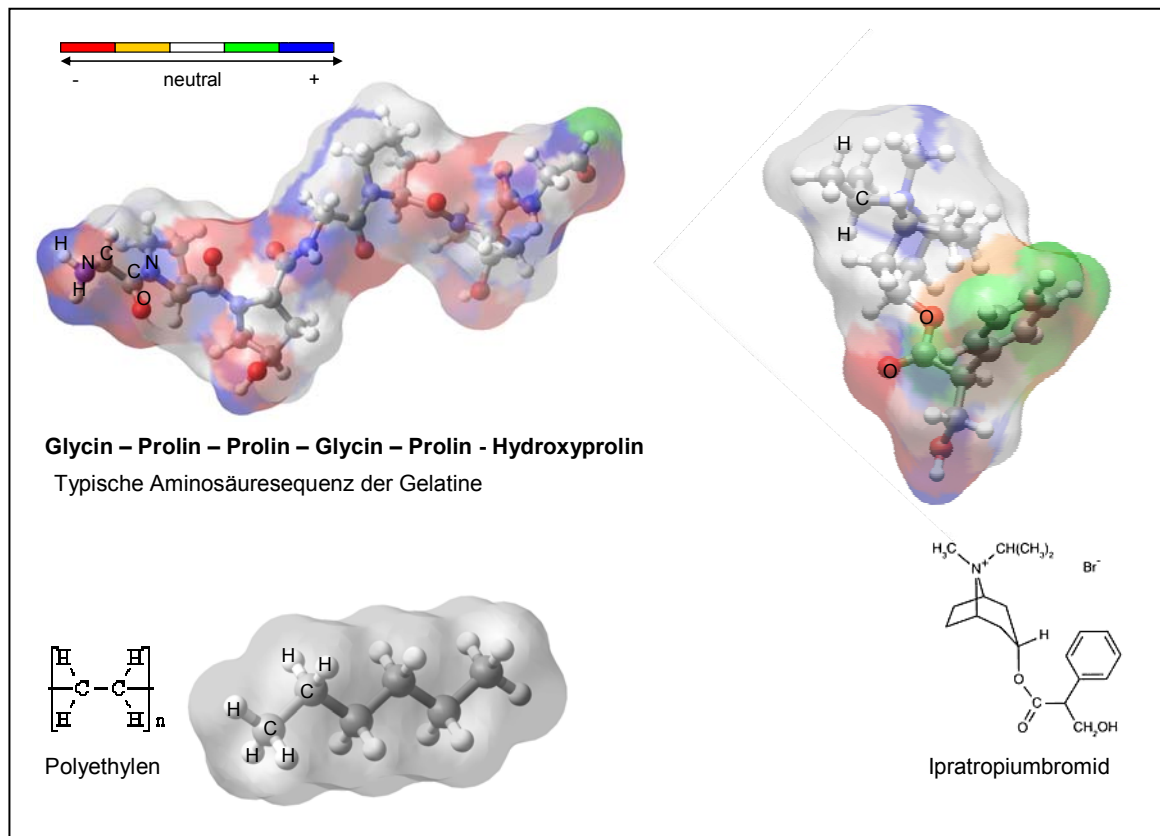


Abb.7-4 3D-Modelle von Gelatine (typische Aminosäuresequenz), PE und Ipratropiumbromid zur Darstellung der typischen Oberflächenbeladung – Erklärung für die Ausbildung der unterschiedlichen Wechselwirkungen [100;101]

Sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch Adhäsionskräfte in annähernd gleicher Größenordnung (~ 500 nN) lassen sich zwischen Ipratropiumbromid und einer PE-Oberfläche nachweisen (siehe Abb. 7-3/7-5). Auch hier sind die Ergebnisse durch die geometrische Anordnung der Atome und der daraus resultierenden typischen Oberflächenladung zu erklären.

Aufgrund der unpolaren Eigenschaften des Polyethylens liegen keine Ladungen oder permanenten Dipole vor, die bereits aus großer Distanz mit den polaren Gruppen des Ipratropiumbromids in Wechselwirkung treten können (siehe Abb.7-4). Erst ab einer gewissen Annäherung der beiden Komponenten ist eine Anziehung durch induzierte Dipole (van-der-Waals-Kräfte) möglich, was sich in den gemessenen Adhäsionskräften (mit kurzer Reichweite) widerspiegelt.

Die innerhalb der Kombination aus PE-Kapsel und Ipratropiumbromid gemessenen elektrostatischen Wechselwirkungen erweisen sich allerdings als Artefakt, da sich während der Präparation die Ladungseigenschaften der Kapselstreifen verändert haben. Wie aus der Elektrostatik allgemein bekannt, entstehen durch Reibung an nichtleitenden Stoffen (z.B. Polyethylen) elektrostatische Zustände. Diese Ladungen können sich aufgrund der isolierenden Wirkungen des Kunststoffes nicht ausbreiten, wodurch es erst zusammen mit einem leitenden Material zum Leitungsfluss kommt [102]. Nähert sich also der Cantilever einer auf diese Weise aufgeladenen Oberfläche, tritt eine mechanische Kraftwirkung auf, die als elektrostatische Wechselwirkung mit langer Reichweite detektiert wird. Durch dieses Artefakt wird die bereits in Kapitel 6.3 aufgestellte Theorie über durch Rotation im Device begünstigte elektrostatische Aufladung von PE-Kapseln bekräftigt. Nur so lassen sich die nach mechanischer Belastung extrem gesteigerten Ergebnisse der Kapselretention erklären.

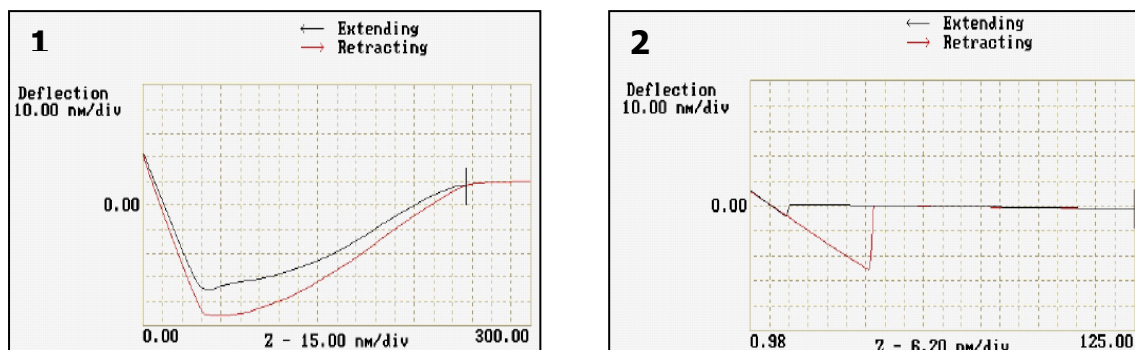


Abb.7-5 Exemplarische Darstellung der Kraft-Distanzkurven (x-Achse: Abstand; y-Achse: Kraft) für beiden Kapselmaterialien und einem Cantilever mit Ipratropiumbromid: Gelatine (1) und PE (2) jeweils der MW aus $n=20$ Einzelmessungen (Extending = annähern der Proben; Retracting = trennen der Proben; z gibt den Abstand zur Probe an, wo die maximale Kraft zwischen Probe und Cantilever herrscht) [68]

7.2 Partikelmorphologie & Adhäsion

Wie in Kapitel 6 beschrieben, erweist sich auch das Trägermaterial als starke Einflussgröße auf die aerodynamischen Eigenschaften von Pulvermischungen. Dies zeigt sich sowohl in den Resultaten der Ausbringung als auch in den Varianzanalysen, die den Träger eindeutig als Haupteinflussfaktor ausweisen (siehe Kapitel 6).

Bereits die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Sympatec zeigt einen Unterschied in der Verteilungsdichte (siehe Abb.4-1).

So ist die 200M Laktose deutlich breiter gestreut und mit einer mittleren Partikelgröße von 40 µm wesentlich „feiner“ als die „grobe“, relativ eng verteilte 325M Laktose mit einer mittleren Partikelgröße von 65 µm.

Auch die genauere Betrachtung im Rasterelektronenmikroskop ergibt eine klare Differenzierung zwischen den beiden Laktosen. Die gemahlene „feine“ 200M Laktose ist deutlich „runder“ bzw. „irregulär“ in ihrem Erscheinungsbild. Dagegen zeigt die gesiebte 325M Laktose eine eher „glatte“ und „keilförmige“ Struktur (siehe Abb.7-6).

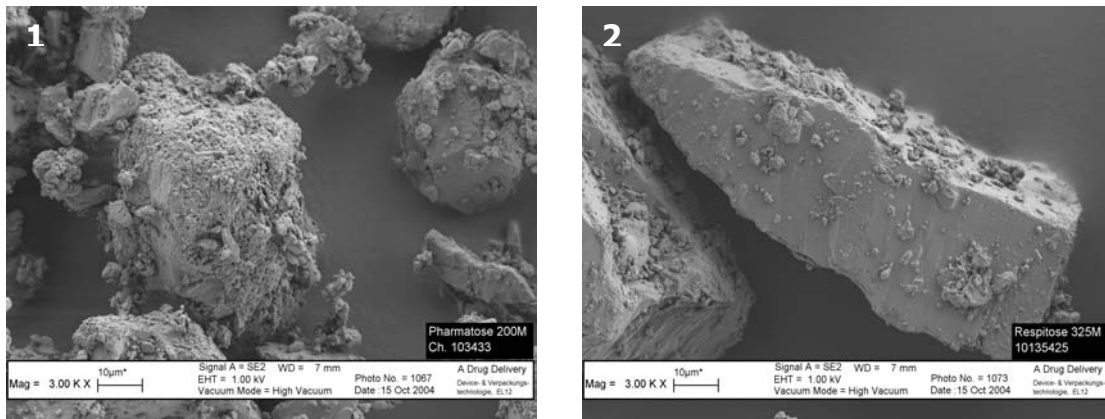


Abb.7-6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Trägerlaktosen 1) „runde, irreguläre“ Partikel der 200M Laktose und 2) „keilförmige“ Partikel der 325M Laktose

Diese ersten Beobachtungen führen, kombiniert mit den Ergebnissen aus Kapitel 6, zu der folgenden These: je feiner und runder das Trägermaterial, desto besser die aerodynamischen Eigenschaften. Daher sind sowohl die ausgebrachte Dosis als auch die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils der Formulierungen aus „grober“ 325M Laktose deutlich niedriger als bei entsprechenden Formulierungen aus „feiner“ 200M Laktose. Diese Beobachtung besitzt ihre Gültigkeit vor allem innerhalb des jeweils eingesetzten Kapselmaterials.

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Partikel liefern die verschiedenen Teilchengrößen und -formen, die sich je nach Ausprägung sehr unterschiedlich auf die Adhäsions- und Reibungskräfte zwischen Teilchen und Kapseloberfläche auswirken. Dabei ist immer zu berücksichtigen, dass die Teilchen sowohl einzeln als auch als Agglomerate vorliegen können, was sich auf Form bzw. Größe und somit auf die Ausprägung der Kräfte auswirkt [103].

Bei annähernd „runden“ Teilchen sind die Adhäsionskräfte eng mit dem Radius der Partikel verbunden (siehe Abb.7-7). Hier gilt: je kleiner die Teilchen, desto größer die Adhäsionskräfte. Hauptursache für diese Beziehung ist die Schwerkraft. Für Teilchen um etwa 1 µm können die van-der-Waals-Kräfte bis um das einmillionenfache größer sein als die der Teilchenmasse proportionale Gravitationskraft. Jedoch bei Teilchen größer 1 mm hebt die Schwerkraft die vorhandenen Adhäsionskräfte auf [104].

In einer Formel lässt sich die Beziehung zwischen Teilchengröße und der herrschender Kraft wie folgt definieren:

$$F_{\text{ablösend}} \sim r^3 \sim m \cdot a$$

$$F_{\text{adhäsion}} \sim r^2$$

Für sehr kleine Teilchen ist damit die Adhäsionskraft immer größer als die Trennkraft ($F_{\text{ablösend}} < F_{\text{adhäsion}}$). Erst ab einer bestimmten Partikelgröße dreht sich dieses Verhältnis um ($F_{\text{ablösend}} > F_{\text{adhäsion}}$).

Das erklärt, warum ein zusätzlicher Feinanteil zum „Auspudereffekt“ führen kann (siehe Kapitel 7.3.2). Je mehr kleine Partikel vorhanden sind, desto mehr bleiben diese aufgrund ihrer Größe haften und steigern die Ausbringung der „größeren“ Teilchen. Es findet quasi ein Verdrängen der „großen“ Teilchen von der Oberfläche statt.

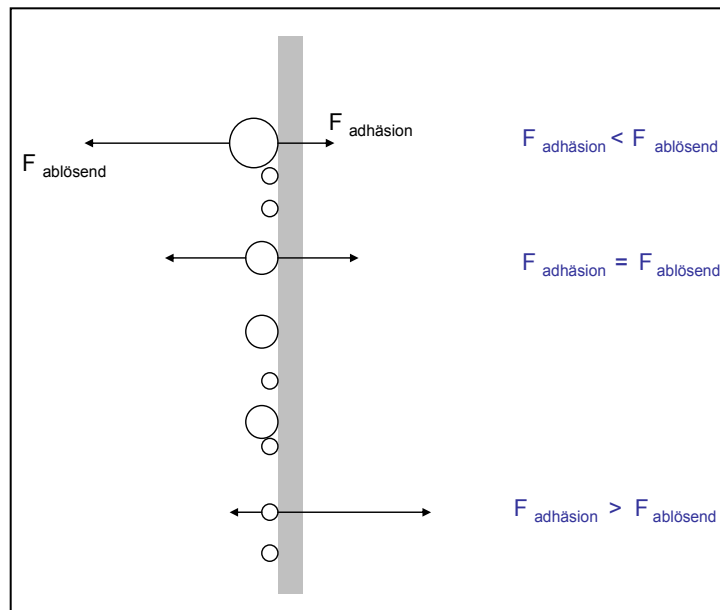


Abb.7-7 Schematische Darstellung der Kräfteverteilung für ideale runde Partikel unterschiedlicher Größe

Für die „keilförmigen“ Teilchen der 325M Laktose verändern sich die beschriebenen Vorfaktoren. Teilchen, die aufgrund ihrer Größe eigentlich ausgebracht werden müssten, bleiben zurück (siehe Abb.7-8). Bedingt durch ihre Form weisen diese Teilchen eine Vielzahl von Kontaktstellen auf, was zu einer relativen großen Kontaktfläche und damit zu einem stärker ausgeprägten Haftbestreben führt als bei „runden“ Teilchen der gleichen Größe [104].

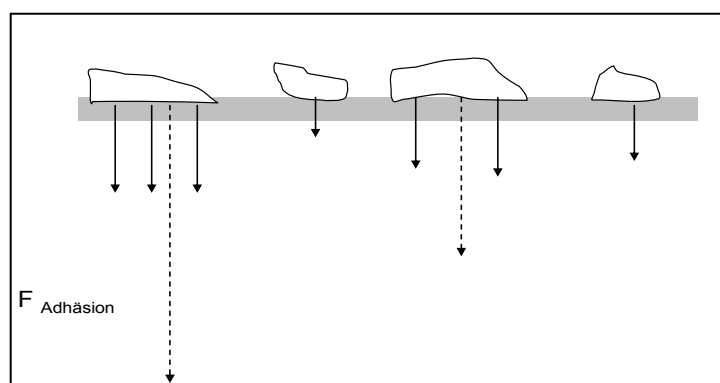


Abb.7-8 Kräfteverteilung für „keilförmige“ Partikel unterschiedlicher Größe (schematisch)

Neben den Adhäsionskräften (Kraft, deren Vektor senkrecht zu Oberfläche steht) sind auch Reibungskräfte (betragsgleiche Kraft, die sich entgegengesetzt zur Strömungskraft aufbaut) entscheidend am Haftbestreben der Teilchen beteiligt. Analog zu den Adhäsionskräften sind diese Kräfte ebenfalls von der Partikelform abhängig.

Alle Teilchenformen, bei denen ein Rollen über die entsprechende Oberfläche vorherrscht oder zumindest erleichtert ist (irregulär geformte Teilchen), führen zu geringeren Reibungskräften [104]. Dadurch muss bei „runden“ Teilchen viel weniger Trennkraft aufgebracht werden als bei „keilförmigen“ Partikeln. Hier sind sowohl die Reibungskräfte als auch die Adhäsionskräfte aufgrund der Vielzahl von Kontaktstellen deutlich stärker ausgeprägt.

Um also ein Teilchen durch den Inhalationsprozess von der Oberfläche abzulösen, muss die Kraft der Strömungsrichtung immer größer sein als die Gesamtwirkung von Reibungs- und Adhäsionskraft (siehe Abb.7-9).

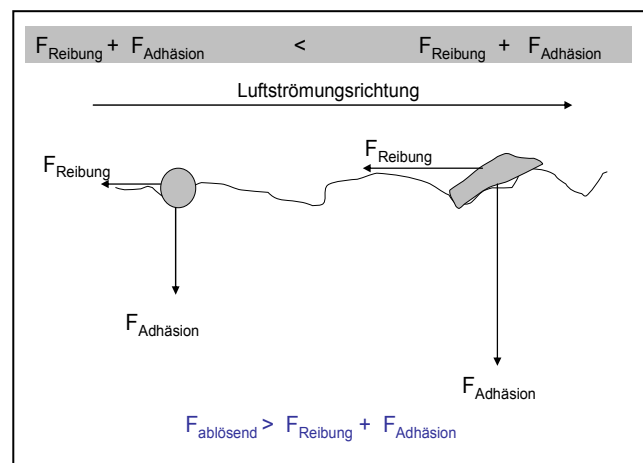


Abb.7-9 Kräfteverhältnisse bei Partikeln mit unterschiedlicher Morphologie (schematisch); Voraussetzung für eine Ablösung ist, dass die ablösende Kraft größer ist als die Summe von Reibungs- und Adhäsionskräften

Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Aspekt bei den durch die Partikelmorphologie bedingten unterschiedlichen Kräften, ist die Oberflächenbeschaffenheit des Kapselmaterials. Je nach Struktur der Oberfläche lassen sich die Ausprägungen der Haftkräfte mehr oder weniger stark beeinflussen (siehe Kapitel 7.1).

Auf „harten“ Oberflächen, wie der PE-Kapsel sind die herrschenden Reibungs- und Adhäsionskräfte unabhängig von der Partikelform nur schwach ausgeprägt (siehe Abb.7-10), da Unebenheiten und „Einbettungsmöglichkeiten“ fehlen. Die flexiblen Anpassungsmöglichkeiten der „weichen“ Gelatine-Oberfläche dagegen bringen den Einfluss der Partikelform viel deutlicher zum Tragen (siehe Kapitel 7.1).

So gilt für „runde“ Teilchen die beschriebene Beziehung zwischen Partikelgröße und Kraft ($F_{\text{ablösend}} \sim r^3$, $F_{\text{adhäsion}} \sim r^2$), während die „keilförmigen“ Teilchen aufgrund der gesteigerten Kontaktfläche ein deutlich stärkeres Haftbestreben zeigen. Der flexible Tröpfchenfilm passt sich in diesem Fall optimal an die Partikelformen an, was die Kontaktfläche weiter vergrößert und ein leichtes Abtrennen der Teilchen verhindert.

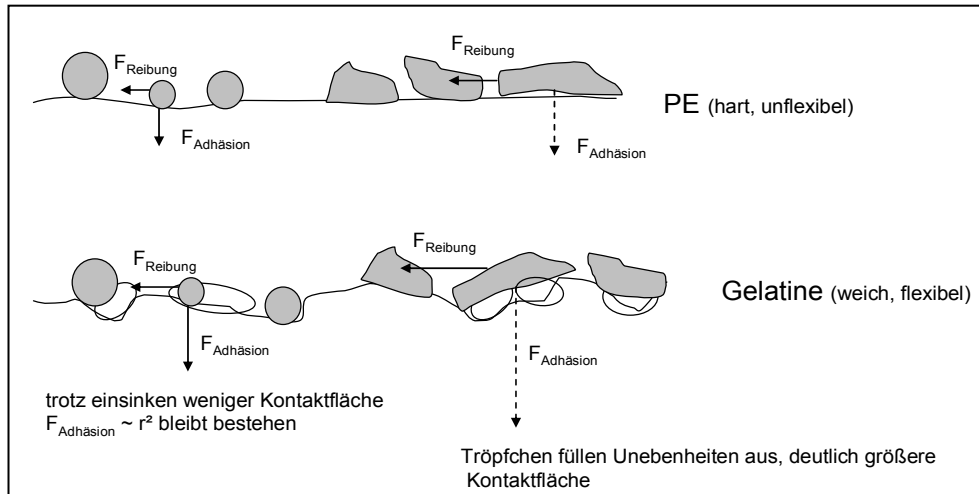


Abb. 7-10 Schematische Darstellung der Einflussgrößen Partikelform und Oberfläche auf die Ausbildung von Adhäsion- und Reibungskräften

7.3 Partikel - Kapsel - Wechselwirkungen

7.3.1 Phänomen der „Abreicherung“

Wie an den Ergebnisse der ausgebrachten Dosis zu erkennen war (siehe Kapitel 6.1), ist der ursprüngliche Wirkstoffanteil von 0,73% in der ausgebrachten Pulvermenge nicht mehr vorhanden. Das Verhältnis hat sich, wie Tabelle 7-1 zu entnehmen ist, merklich verschlechtert. Es ist weiterhin auffällig, dass dieser Trend bei den Resultaten aus Gelatine-Kapseln wesentlich deutlicher zum Tragen kommt als bei den entsprechenden Ergebnissen aus PE-Kapseln. Diese Beobachtungen sind durch einen t-Test als statistisch signifikant nachgewiesen worden.

Eine mögliche Erklärung für diesen Wirkstoffverlust innerhalb der Pulvermischungen ergibt sich, wenn man die verschiedenen Kapseloberflächen und Partikelgrößen näher betrachtet und mögliche Effekte miteinander in Beziehung setzt.

Tabelle 7-1 Prozentualer Wirkstoffgehalt in der ausgebrachten Pulvermenge - „Abreicherung“ (bezogen auf die mittlere ausgebrachte Pulvermenge aus n= 40 EW)

		Wirkstoffgehalt nach Ausbringung (%)				
PE	200M Laktose	0,65	0,66	0,67	0,65	0,65
	325M Laktose	0,61	0,61	0,65	0,61	0,63
Gelatine	200M Laktose	0,55	0,54	0,53	0,63	0,53
	325M Laktose	0,53	0,43	0,52	0,52	0,51

Wirkstoffgehalt in der eingesetzten Pulvermischung: 0,73 %

Die Hauptursache für das Phänomen der Abreicherung ist nicht die Partikelmorphologie des Trägermaterials sondern vielmehr die Partikelform und -größe des Wirkstoffs. Wie dem Kapitel 7.2 zu entnehmen ist, gilt für annähernd „runde“ Teilchen folgende Regel: je kleiner die Partikel, desto stärker die Adhäsionskräfte und damit das Haftbestreben. Dieser Effekt wird auf „weichen“ Oberflächen weiter verstärkt, während diese Regel bei „harten“ Oberflächen keine Gültigkeit hat.

Unter der Annahme, dass sowohl die Ipratropiumbromid-Partikel als auch die mikronisierten Laktosepartikel ein gleich starkes Bindungsbestreben zu den jeweiligen Kapseloberflächen haben, lässt sich die Theorie der „Abreicherung“ (Mindergehalt), für annähernd „runde“ Partikel wie folgt schematisch darstellen (siehe Abb.7-11):

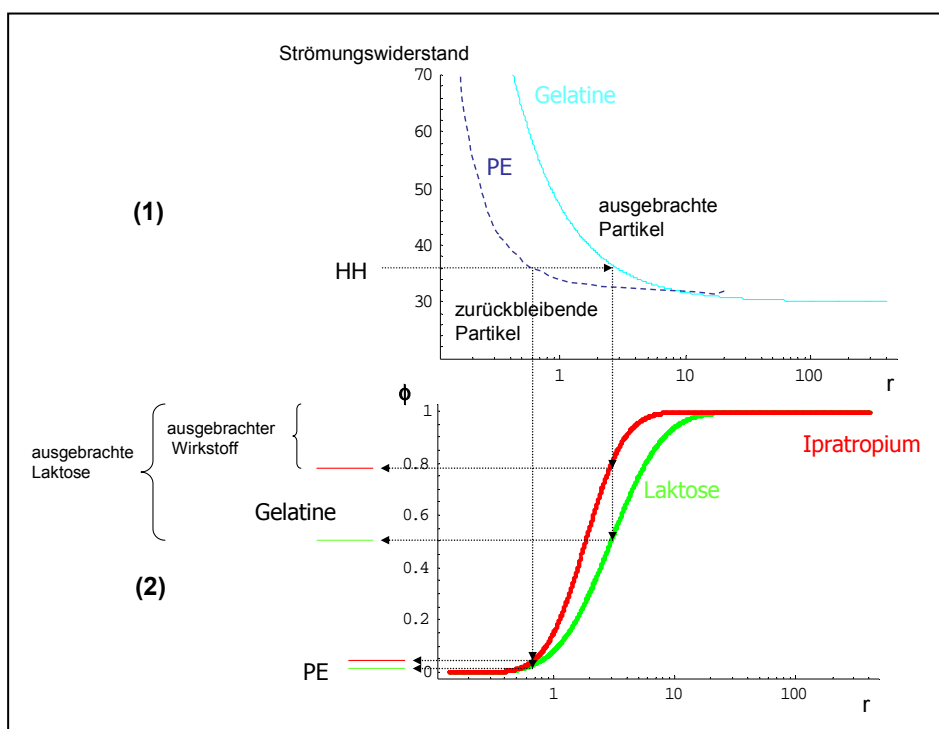


Abb.7-11 Schematische Darstellung der „Abreicherung“ (Mindergehalt) in Abhängigkeit von Partikelgröße und Kapselmaterialeigenschaften bei definiertem Strömungswiderstand im HH[®]
 (1) Beziehung zwischen Strömungswiderstand im Device und ausgebrachte Partikelgröße; (2) Volumenverteilung von Laktose und Ipratropiumbromid (Φ = in der Kapsel vorliegende Pulveranteil)

Wie in Abb.7-11 (1) zu erkennen, lassen sich die Kapsel-eigenschaften über die unterschiedlichen Strömungswiderstände im Inhalator (je größer der Widerstand, desto besser die Rotation und damit die Strömungskraft) definieren. Die Rotation im Device führt bei „harten“ Kapseloberflächen immer zur Ausbringung von kleineren Teilchen als bei „weichen“ Kapseloberflächen. Bei letzteren bleiben trotz identischem Strömungswiderstand auch größere Partikel zurück. So werden beispielsweise aus einer PE-Kapsel bei einem Strömungswiderstand von 36 alle Partikel ausgebracht, die größer 0,5 μm sind, während unter identischen Bedingungen aus einer Gelatine-Kapsel alle Partikel ausgebracht werden, die größer 2,5 μm sind (siehe Abb.7-11 (1)).

Erklären lassen sich diese Effekte durch die unterschiedlichen Strukturen der Kapseloberflächen und dem damit verbundenen „Haftvermögen“ der Partikel auf der Oberfläche (siehe Kapitel 7.1).

Überträgt man, bei vorgegebenem Strömungswiderstand (in diesem Fall etwa 36; siehe Markierung HH in Abb.7.11), diese unterschiedlichen Kapseleigenschaften auf die in Abb.7-11 (2) dargestellte Volumenverteilung der beiden Mikronisate (Ipratropiumbromid und Laktose), ist es möglich die jeweiligen in der Kapsel zurückbleibenden Mengenanteile zu bestimmen. Bereits die Betrachtung der Volumenverteilung (rote / grüne Kurven in Abb.7.11 (2)) zeigt, dass die mikronisierte Laktose (mittlere Partikelgröße: 10 μm) tendenziell gröber ist als das ebenfalls mikronisierte Ipratropiumbromid (mittlere Partikelgröße: 5 μm).

Gemäß der in Kapitel 7.2 aufgestellten Beziehung ($F_{\text{adhäsion}} \sim r^2$) sind die damit die vorliegenden Adhäsionskräfte der Laktosepartikel weniger stark ausgeprägt und die Trennkräfte überwiegen. Für die „feinen“ Ipratropiumbromid-Partikel liegt dagegen das umgekehrte Verhältnis vor: hier überwiegen die Anziehungskräfte. Damit bleiben „freie“ (ungebundene oder leicht vom Carrier ablösbare) Wirkstoffpartikel stärker auf der Innenseite der Kapsel haften und fehlen in der ausgebrachten Pulvermenge.

Auf der „harten“ PE-Oberfläche tritt die beschriebene Differenzierung nicht in Erscheinung (siehe Kapitel 7.1). Hier überwiegen die geringen Hafteigenschaften der Kapsel und die „Anreicherung“ von Ipratropiumbromid auf der Oberfläche ist nur schwach ausgeprägt. Dies zeigen die beiden dicht zusammen liegenden Balken in Abb.7-11 (2). Weder die Laktose-Partikel noch die Ipratropiumbromid-Partikel bleiben in der Kapsel zurück. Sie werden vielmehr fast vollständig ausgebracht.

In der „weichen“ Gelatine-Kapsel dagegen kommt die partikelgrößenabhängige Ausprägung der Trenn- und Haftkräfte viel deutlicher zum Tragen, was sich in der Zusammensetzung der ausgebrachten Pulvermenge widerspiegelt. So liegen die beiden Balken für Laktose und Ipratropiumbromid diesmal im oberen Teil der y-Achse und sind deutlich von einander getrennt (siehe Abb.7-11 (2)). Das bedeutet also, es werden Partikel beider Komponenten zurückgehalten, wobei der Anteil an zurückgehaltenen Ipratropiumbromid-Partikeln deutlich größer ist.

Da die Mengenanteile des Wirkstoffs so gering sind und von den vorhandenen Laktosepartikeln überdeckt werden, kann eine „Anreicherung“ auf der Kapseloberfläche mikroskopisch nicht sichtbar gemacht werden.

7.3.2 „Auspudereffekt“ - Kapselretention

Der Schwerpunkt dieser Interaktion liegt auf der Partikelgrößenverteilung des Trägermaterials, so dass von einer Träger-Kapsel-Wechselwirkung gesprochen werden kann. Wie den Ergebnissen aus Kapitel 6.1 zu entnehmen ist, ergibt der Zusatz mikronisierter Laktose in der Kombination Gelatine-Kapseln und 200M Pharmatose[®] einen positiven Effekt auf die Höhe der ausgebrachten Dosis.

Dies wird auch in der getrennten ANOVA als Zweifach-Wechselwirkung (Laktose*Anteil) identifiziert (siehe Kapitel 6.1.3). In der Kombination aus 325M Laktose und Gelatine-Kapseln bleiben dagegen die Resultate trotz zusätzlichem Feinanteil annähernd konstant.

Die eindeutig kapselmaterialeabhängige Beobachtung wird innerhalb dieser Arbeit als „Auspudereffekt“ bezeichnet und wie folgt definiert: durch Zusatz mikronisierter Laktose kommt es auf der adhäsiven Kapselinnenseite zur Ausbildung eines Schutzfilms aus „kleinen“ Laktosepartikeln, wodurch das Anhaften von „grobem“ Trägermaterial (mit gebundenem Wirkstoff) erschwert wird.

Als Beweis für diese Theorie werden charakteristische Formulierungen ausgewählt (siehe Tabelle 7-2) und gemäß dem in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Die nach Ausbringung in der Kapsel zurückbleibenden Pulverreste von je 6 Kapseln werden zu einer Probe vereinigt und die entsprechende Partikelgrößenverteilung bestimmt.

Tabelle 7-2 Einfluss verschiedener Faktoren auf die *Teilchengrößenverteilung* des Kapselrests - betrachtete Kombinationen (jede Probe ist ein Kollektiv aus 6 Kapseln und wird doppelt vermessen)

Kombination	Kapselart	Feinanteil [%]	Mechanische Belastung	Anzahl der Proben	
				Laktose 200M	Laktose 325M
1	PE	0	Nein	20	20
2	Gelatine	0	Nein	20	20
3	Gelatine	2,5	Nein	20	20
4	Gelatine	2,5	Ja	20	20

7.3.2.1 Kapselretention 200M Pharmatose®

Die jeweils zwanzig Proben (je sechs Kapseln) der vier Kombinationen werden randomisiert vermessen, um alle bekannten und unbekanntem Einflussfaktoren (z.B. tagessabhängige Aufarbeitung, neues Dispersionsmedium) gleichmäßig zu verteilen. Eine erste Aussage bezüglich der Reproduzierbarkeit ist möglich, wenn die Verteilungsdichten der Mittelwerte jeweils logarithmisch gegen die Partikelgröße aufgetragen werden (siehe Abb.7-12).

Wie den entsprechenden Verteilungskurven zu entnehmen, sind die Resultate der Kombinationen 2 - 4 (Gelatine) gut reproduzierbar. Das heißt die detektierte Partikelgrößenverteilung ist nicht zufällig sondern statistisch signifikant für die jeweilige Kombination.

Einzig die Messergebnisse der Kombination 1 (PE-Kapseln) weisen deutliche Unregelmäßigkeiten auf. Dies ist auf die geringe optische Konzentration der Probelösung und auf die damit verbundene Messungenauigkeit zurückzuführen (Detektionslimit). Allerdings ist auch hier der frei gewählte Probenumfang ausreichend groß, um eine statistische Bewertung der Ergebnisse vorzunehmen.

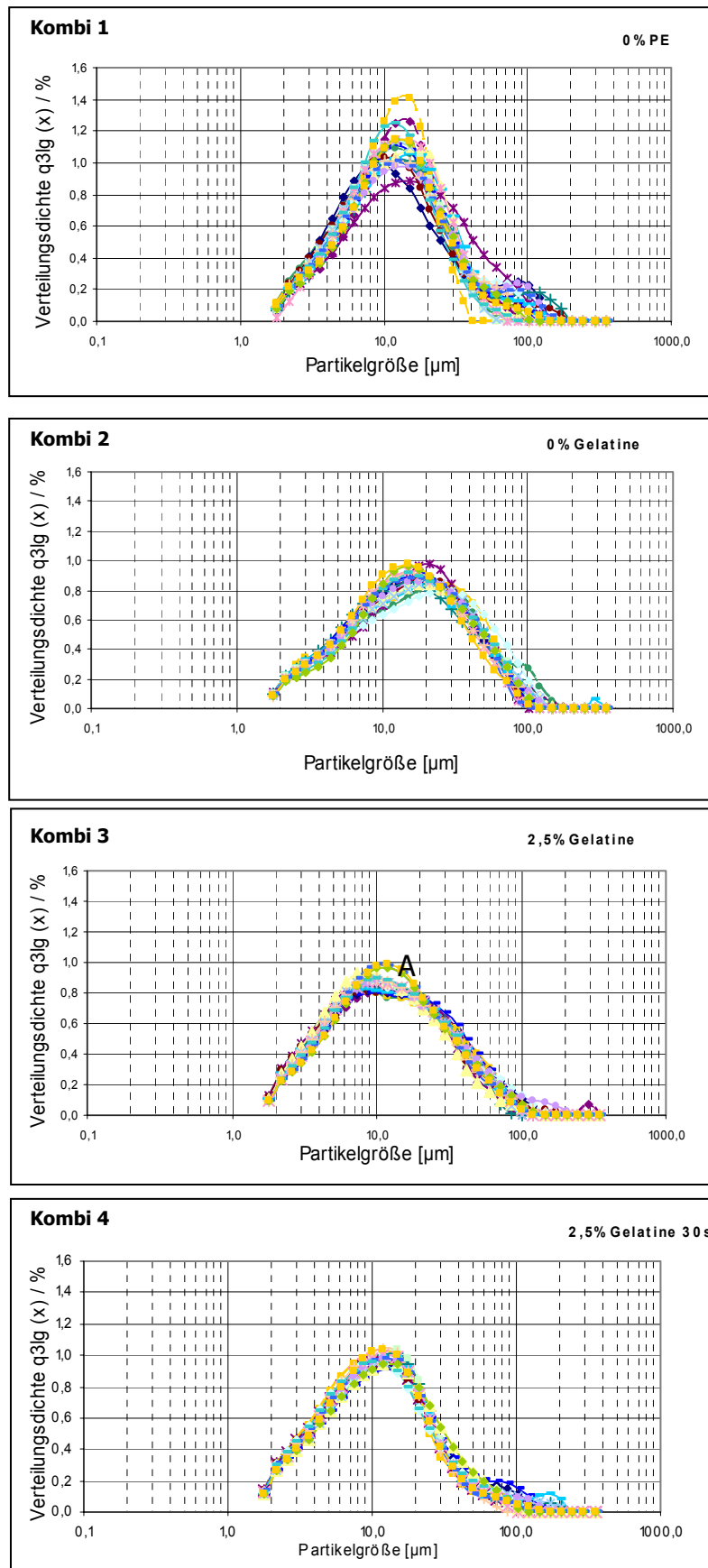


Abb.7-12 Verteilungsdichten Kapselreste der Kombinationen 1 - 4 (jeweils $n=20$) aus 200M Pharmatose® zum Nachweis der Reproduzierbarkeit (mit 2,5% Additiv in Kombi 3-4)

Zur näheren Bewertung der Partikelgrößenverteilung werden die gemittelten Verteilungskurven der vier Kombinationen mit den Verteilungen der jeweiligen Ausgangspulvermischung betrachtet (siehe Abb.7-13). Es zeigt sich in jedem Fall, dass der Grobanteil fast komplett ausgebracht wird und nur Partikel mit einer mittleren Größe von etwa 10 µm als Rest in der Kapsel zurückbleiben.

Diese ist unabhängig vom verwendeten Kapselmaterial und der eingesetzten Pulvermischung (modifiziert durch Feinanteil, mechanische Belastung) gültig.

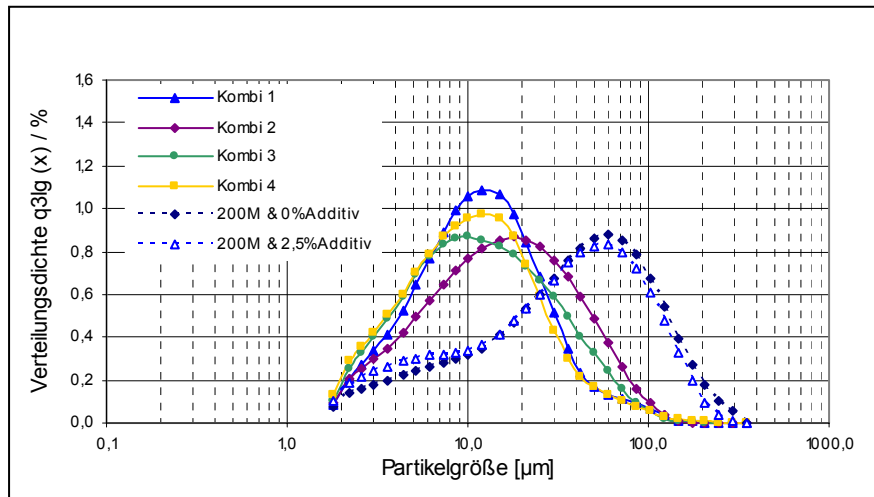


Abb.7-13 absolute Verteilungsdichten der eingesetzten Pulvermischungen aus 200M Pharmatose® und den jeweiligen Kapselresten (Kombi 1-4), die nach Ausbringungen in der Kapsel zurück bleiben (die Kurven setzen sich jeweils aus 31 Punkten zusammen = Stützstellen; MW aus jeweils n = 20)

Um den möglichen „Auspudereffekt“ des Laktosefeinanteils zu erkennen, müssen die Ergebnisse der verschiedenen Kombinationen in Relation zur jeweils eingesetzten Pulvermischung (0% und 2,5% Additiv) betrachtet werden.

Dazu werden die jeweils 31 Stützstellen, welche die entsprechenden Verteilungskurven bilden, durcheinander dividiert (= relative Kapselretention). So wird beispielsweise jede einzelne Stützstelle ($q_{3lg}(x)_{\text{Kapselrest}}$) der Kombi 3 durch die entsprechende Stützstelle ($q_{3lg}(x)_{\text{Pulvermischung}}$) der Pulvermischung mit 2,5% Additiv dividiert (siehe Formel I).

$$(I): q_{3lg}(x)_{\text{relative Kapselretention}} = q_{3lg}(x)_{\text{Kapselrest}} / q_{3lg}(x)_{\text{Pulvermischung}}$$

$$(II): q_{3lg}(x)_{\text{normiert}} = q_{3lg}(x)_{\text{relative Kapselretention}} / \text{SUMME}$$

Bei dieser Umformung geht die Normierung der Flächen unter der Kurve (AUC = 1) verloren. Um diese Normierung wieder herzustellen, werden die jeweils 31 Stützstellen ($q_{3lg}(x)_{\text{relative Kapselretention}}$) aufsummiert (=SUMME). Anschließend wird jede dieser 31 Stützstellen durch die ermittelte SUMME dividiert (siehe Formel II). Auf diese Weise erhält man 31 normierte Stützstellen, welche die in Abb.7-14 dargestellten Verteilungskurven (AUC = 1) ergibt und kann die Teilchengrößenverteilung der verschiedenen Kombinationen miteinander vergleichen.

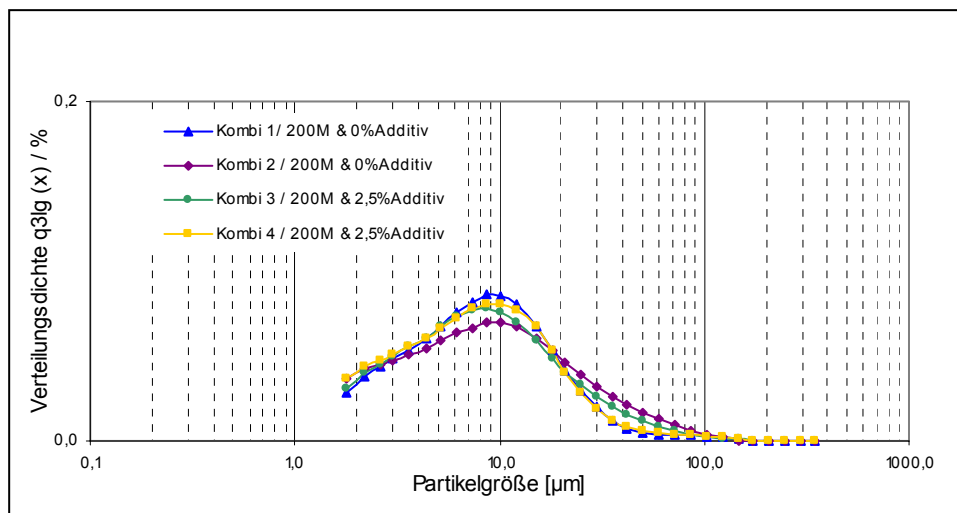


Abb.7-14 normierte Verteilungsdichten der verschiedenen Kombinationen. Unter Verlust der Normierung ($AUC \neq 1$) werden die Kombinationen mit der verwendeten Pulvermischung in Relation gesetzt (Division der jeweiligen Stützstellen). Anschließend werden die Stützstellen aufsummiert (= Summe) und dann durch die Summe dividiert ($AUC = 1$). Die daraus resultierenden Werte bilden die dargestellten Verteilungskurven

Wie in Abb.7-14 zu sehen, bleiben hauptsächlich Partikel mit einer mittleren Größe von $10\mu\text{m}$ zurück. Damit bestätigt sich die Theorie, dass hauptsächlich kleine Partikel zurückbleiben ($F_{\text{adhäsion}} > F_{\text{ablösend}}$), während die groben Teilchen ($F_{\text{adhäsion}} < F_{\text{ablösend}}$) fast vollständig ausgebracht werden (= Selektivität). Steigende Mengen mikronisierter Laktose und mechanische Belastung verstärken dieses Phänomen. Die in Abb.7-15 dargestellten mikroskopischen Aufnahmen der Kapselinnenseiten sowie die prozentuale Oberflächenbeladung (siehe Kapitel 4.2.5) bestätigen die Beobachtungen.

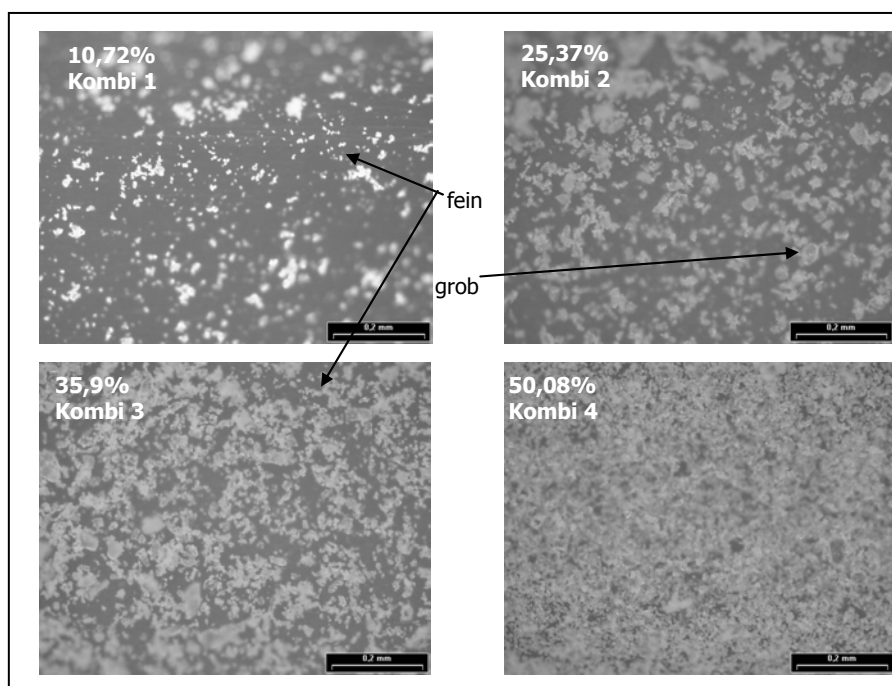


Abb.7-15 Mikroskopische Aufnahmen von Kapselinnenseiten aller Kombinationen mit 200M Pharmatose® (Dunkelfeld; Auflicht)

Trotz Einsatz einer identischen Formulierung (200M Laktose mit 0% Feinanteil) ist die Oberflächenbeladung in Kombination 1 (PE: 10,72 %) deutlich niedriger als in Kombination 2 (Gelatine: 25,37 %). Diese Beobachtung bestätigt die bereits beschriebene Einflussgröße des Kapselmaterials (siehe Kapitel 7.1). Die Partikelretention auf „unflexiblen“ und „harten“ Oberflächen ist deutlich schwächer ausgeprägt als auf „flexiblen“ und „weichen“ Flächen. Wie in Kombination 3 (Gelatine-Kapseln) zu erkennen, lässt sich durch mikronisierte Laktose der Bedeckungsgrad weiter steigern, wobei bevorzugt der zusätzlich eingesetzte Feinanteil haften bleibt. Damit wird die aufgestellte Theorie für annähernd „runde“ Partikel bekräftigt: je kleiner die Partikel, desto stärker das Haftbestreben (siehe Kapitel 7.2). Werden die Kapseln zusätzlich mechanisch belastet (Kombi 4), findet eine weitere Steigerung des Beladungsgrades statt (~ 50 %). Auch hier sind die Hauptkomponenten des dichten Pulverfilms meist „kleine“ Partikel (~ 10 µm).

7.3.2.2 Kapselretention 325M Respitose®

Erneut erfolgt die Analyse gemäß Randomisierungsplan, wobei in diesem Fall zusätzlich zu den unter 7.3.2.1 genannten Einflussfaktoren auch die Chargenvariabilität zu berücksichtigen ist. Aufgrund des Probenumfangs musste innerhalb der Messreihe auf eine neue Gelatine-Kapselcharge (#4U0030) umgestellt werden. Somit bestehen die Kombinationen 2 – 4 jeweils aus sieben Proben der neuen Kapselcharge (--- = neu), während die restlichen zwölf Proben aus der alten Kapselcharge (#3U0040) bestehen. Trotz dieser Chargenmischung lassen die Verteilungskurven, wie in Abb.7-16 dargestellt, keine Variabilität erkennen - die Ergebnisse sind reproduzierbar. Die erneuten Unregelmäßigkeiten in Kombination 1 sind, wie bereits beschrieben, auf die geringe optische Konzentration der Probelösung zurückzuführen.

Anders als bei den Ergebnissen der 200M Laktose gibt es, bereits absolut gesehen, kapselmaterialabhängige Unterschiede zwischen den Partikelgrößenverteilungen der Kapselreste (siehe Abb.7-16). Wie erwartet besteht bei den Formulierungen aus PE-Kapseln (Kombi 1) der Kapselrest hauptsächlich aus Partikeln mit einer Größe von etwa 10 µm. Davon deutlich abweichend, bleiben bei den Formulierungen aus Gelatine-Kapseln (Kombi 2) auch vermehrt grobe Teilchen zurück. Ein Ergebnis, das unter Berücksichtigung der Partikelform verständlich ist (siehe Kapitel 7.2). Durch die „keilförmige“ Struktur liefern die „grogen“ Teilchen mehr Kontaktpunkte und die Haftfläche auf der „flexiblen“ Oberfläche wird weiter vergrößert. Das Verhältnis zwischen Partikelgröße und herrschenden Kräfte gilt in diesem Fall nicht.

Auf der „unflexiblen“ Oberfläche kommen diese partikelformabhängigen Unterschiede der Adhäsionskräfte nicht zum Tragen (siehe Kapitel 7.2). Trotzdem bleibt der Effekt des Feinanteils erhalten (Kombi 3). Der Zusatz „feiner“ Laktose reduziert den zurückbleibenden Grobanteil, da bevorzugt „kleine“ Laktosepartikel an der Kapselwand zurückgehalten werden. Allerdings ist dieser Feinanteil nicht ausreichend, um den kompletten Grobanteil von der Kapselwand zu verdrängen und einen stabilen Schutzfilm zu bilden (geringer „Auspudereffekt“).

Um die Ausbildung eines stabilen Schutzfilms zu überprüfen, müssten mehr als 5% Feinanteil in die entsprechende Mischung eingearbeitet werden. Dies ist mit den vorliegenden Mischmethoden (Aufrahmen feiner Laktose, Inhomogenität) nicht möglich.

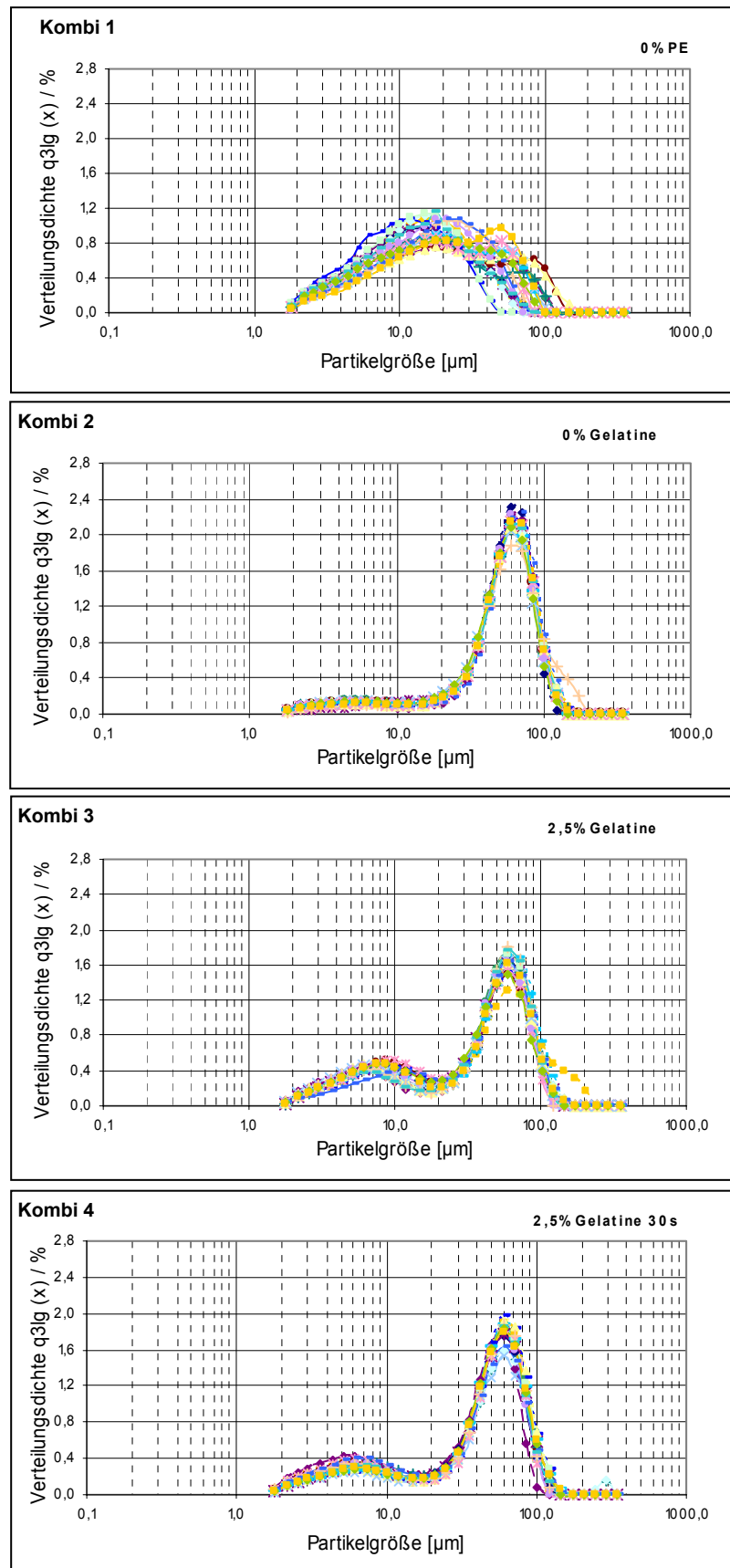


Abb.7-16 Verteilungsdichten Kapselreste der Kombinationen 1 - 4 (jeweils $n=20$) aus 325M Respitose[®] zum Nachweis der Reproduzierbarkeit (mit 2,5% Additiv in Kombi 3-4)

Die analog Kapitel 7.3.2.1 durchgeführte Transformation der Absolutwerte (Abb.7-17 A) in die in Abb.7-17 B dargestellten normierte Relativwerte bestätigt die oben genannten Aussagen.

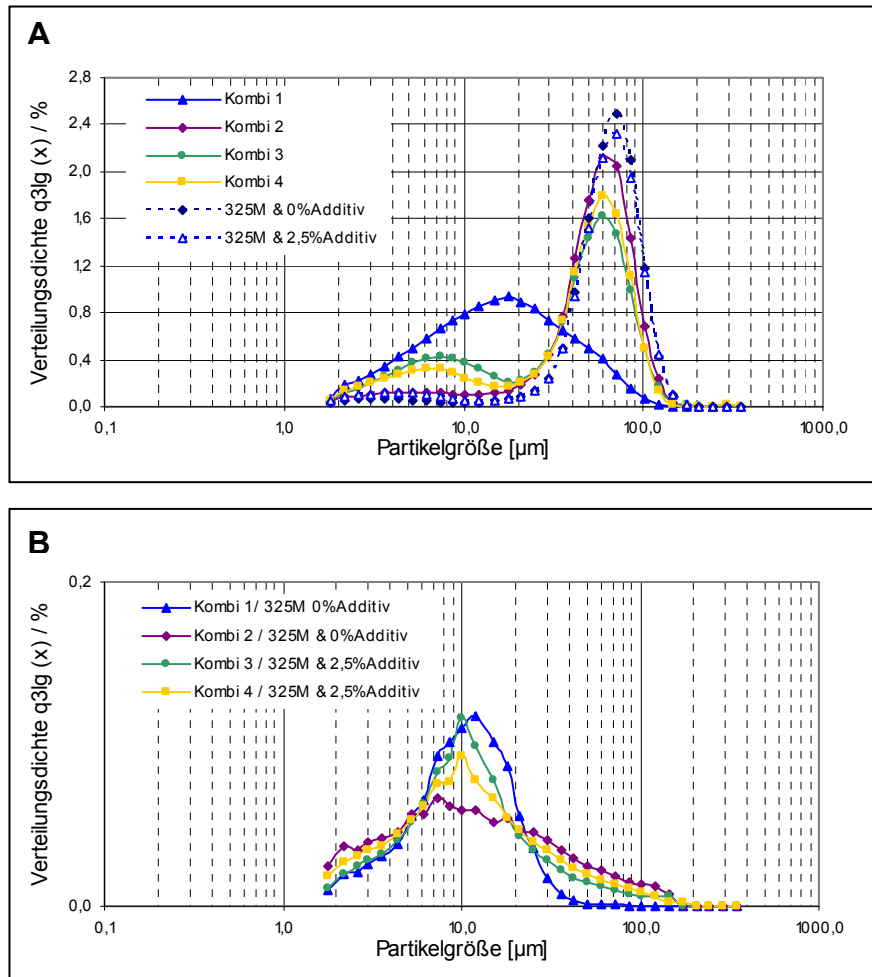


Abb.7-17 A) absolute Verteilungsdichten (MW aus jeweils $n=20$) der eingesetzten Pulvermischungen aus 325M Pharmatose® und den jeweiligen Kapselresten (Kombi 1-4); B) normierten Verteilungsdichten der verschiedenen Kombinationen (durch Umrechnung aus den absoluten Verteilungsdichten ermittelt siehe Kapitel 7.3.2.1)

Mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen und prozentualer Oberflächenbeladung (siehe Kapitel 4.2.5) werden die Ergebnisse anschaulich dargestellt und belegt (siehe Abb.7-18).

Erneut zeigt sich ein Einfluss des Kapselmaterials auf die Stärke der Oberflächenbeladung. So haften trotz identischer Pulvermischung auf der Gelatine-Oberfläche (Kombi 2) etwa fünfmal mehr Partikel als auf der Innenseite einer PE-Kapsel (Kombi 1). Auch der signifikante Größenunterschied der zurückbleibenden Teilchen ist zu erkennen. Auf der Gelatine-Oberfläche bleiben deutlich gröbere Partikel haften, während auf einer PE-Oberfläche hauptsächlich „feine“ Partikel zurückbleiben.

Die Beobachtungen (siehe Abb.7-18) weisen damit alle auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Oberflächenstruktur und den damit verbundenen Auswirkungen auf die Haftkräfte hin (siehe Kapitel 7.1 und 7.2).

Der mit zunehmendem Feinanteil geringe Anstieg der Oberflächenbeladung und die hohen Grobanteile im Kapselrest (Kombi 3) erklären die schwankenden Werte der Ausbringung (siehe Kapitel 6.1).

So reichen die mikronisierten Laktoseanteile nicht aus, um einen stabilen „Schutzfilm“ zu erzielen und die „groben“ Partikel (mit gebundenem Wirkstoff) vollständig zu verdrängen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Adhäsionskräfte der „keilförmigen“ Partikel deutlich stärker ausgeprägt sind als die Bindungskräfte der „rundlichen“ Partikel (siehe Kapitel 7.2). Das bedeutet, es bleiben trotz Feinanteil immer noch „grobe“ Trägerpartikel zurück, was sich in den annähernd gleich bleibenden Werten der Ausbringung widerspiegelt (kein positiver Einfluss des Additivs).

Analog den Formulierungen aus „feiner“ Laktose kann auch bei der „groben“ Laktose durch mechanische Belastung die Oberflächenbeladung gesteigert werden (Kombi 4). Allerdings lassen sich hier keine signifikanten Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung erkennen. Es bleiben sowohl „grobe“ als auch „feine“ Laktosepartikel zurück.

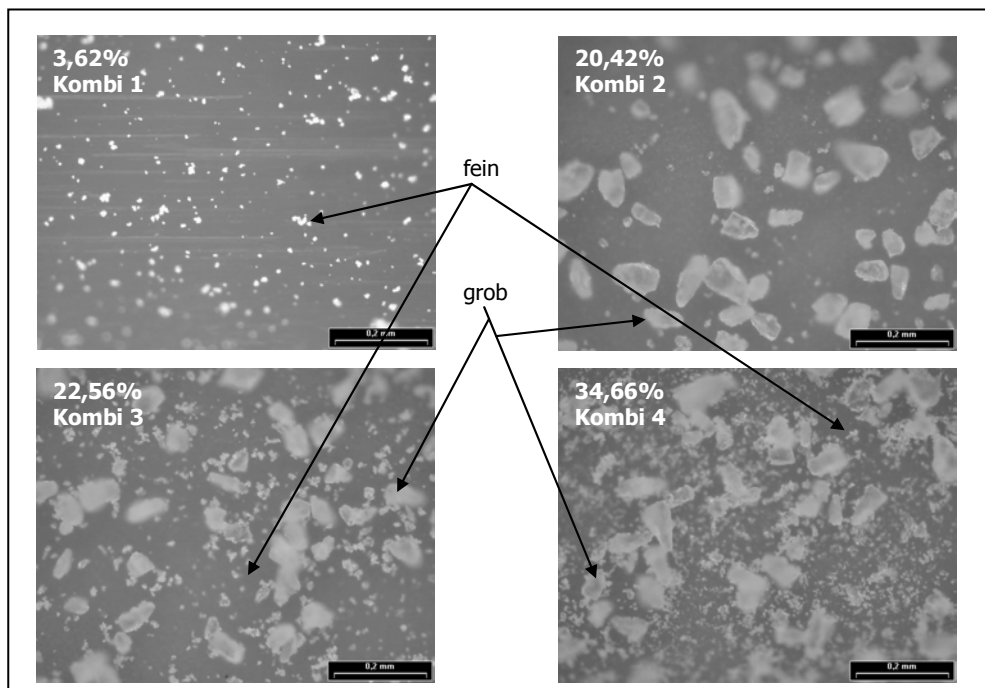


Abb. 7-18 Mikroskopische Aufnahmen von Kapselinnenseiten aller Kombinationen aus 325M Respitose® (Dunkelfeld; Auflicht)

7.3.2.3 Statistische Auswertung

Um zwischen den vier verschiedenen Kombinationen statistisch signifikante Unterschiede herauszufiltern, wird eine Varianzanalyse (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) mit den Faktoren *Kombination*, *Parameter* sowie *Wechselwirkung zwischen Kombination und Parametern* durchgeführt. Die durch gleichzeitiges Ermitteln der einzelnen Parameter (x10 – x90) an einer identischen Probe auftretenden Abhängigkeiten, werden als wiederholte Messungen („repeated measurements“) berücksichtigt.

Daher wird die Analyse mit der Prozedur „Mixed“ des Softwaresystems SAS[®] [91-93] unter gleichzeitiger Verwendung der Einstellungen „unstructured“ und „REML“ für die zu schätzende Kovarianzstruktur durchgeführt.

Weiterhin werden alle Messwerte zur Varianzstabilisierung log-transformiert. Da die Messwerte der Kombinationen aus 325M Laktose eine stärkere Streuung aufweisen, werden die beiden Laktosearten getrennt voneinander betrachtet [105].

200M Pharmatose[®]

Innerhalb der Auswertung beschränken sich die zu berücksichtigenden Korngrößenparameter auf den Bereich von x30 - x70 (siehe Abb.7-19). Alle außerhalb liegenden Werte werden nicht betrachtet, da die Partikel in diesen Bereichen aufgrund ihrer Größe (zu groß oder zu klein) nicht für den „Auspudereffekt“ des zugesetzten Additivs (mittlere Partikelgröße 5 – 10 µm) relevant sind.

Die mittels ANOVA durchgeführte Betrachtung der relevanten paarweisen Vergleiche weist folgende Unterschiede als statistisch signifikant aus [105].

- Trotz identischer Formulierung ist der Kapselrest in PE-Kapseln deutlich feiner und mengenmäßig geringer als in Gelatine-Kapseln (materialabhängiger Effekt).
- Mit Zusatz mikronisierter Laktose werden die Korngrößenparameter signifikant geringer. Das heißt, der Kapselrückstand wird feiner → „Auspudern“.
- Durch die mechanische Belastung wird die Veränderung der Korngrößenparameter weiter verstärkt (Kapselrest wird „feiner“)

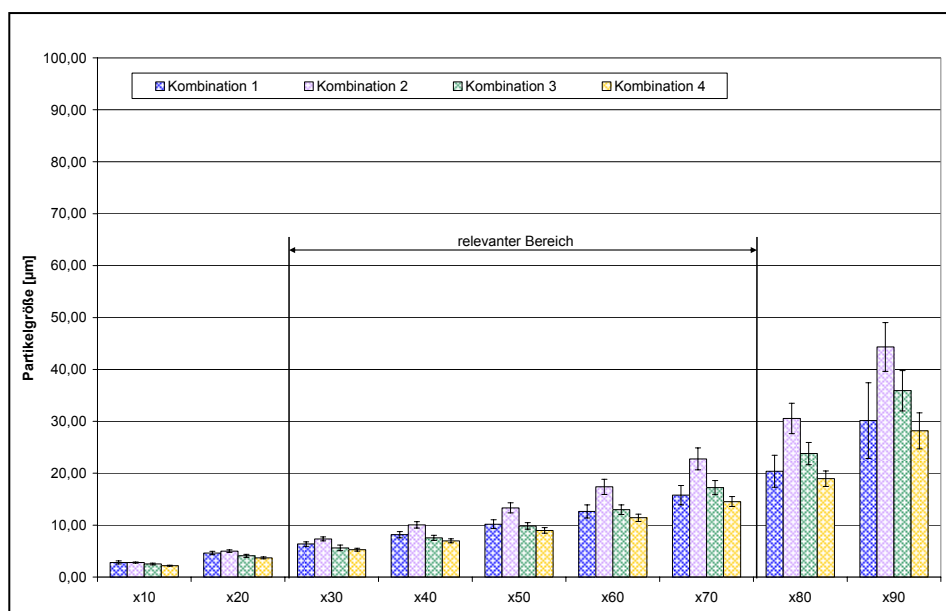


Abb. 7-19 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Teilchengrößenverteilung des Kapselrests (MW \pm SD; jeweils n = 20 Einzelwerte)
Vergleich der x-Werte (200M Pharmatose[®]) aller Kombinationen (Kombi 3 und 4 mit 2,5% Additiv)

325M Respitose®

Wie bereits für 200M Pharmatose® beschrieben, beschränkt sich die Auswertung nur auf die Korngrößenparameter im Bereich von x30 - x70 (siehe Abb.7-20), da die Partikel außerhalb dieses Bereichs nicht der mittleren Partikelgröße des eingesetzten Additivs entsprechen und somit nicht für den „Auspudereffekt“ relevant sind.

Die paarweisen Vergleiche zeigen folgende statistisch signifikanten Unterschiede:

- Trotz identischer Formulierung ist der Kapselrest bei PE-Kapseln wesentlich feiner als bei Gelatine-Kapseln (materialabhängiger Effekt). Aufgrund der Oberflächenstruktur bleibt in Gelatine-Kapseln ein deutlicher Grobanteil zurück.
- Mit Zusatz mikronisierter Laktose wird die Korngröße der in den Gelatine-Kapseln verbleibenden Partikel zu geringeren Werten verschoben. Das heißt, der Grobanteil wird zu Gunsten der feinen Partikel reduziert → „Auspudern“.
- Durch mechanische Belastung wird die Zusammensetzung des Kapselrestes aus „groben“ und „feinen“ Partikeln nicht signifikant verändert.

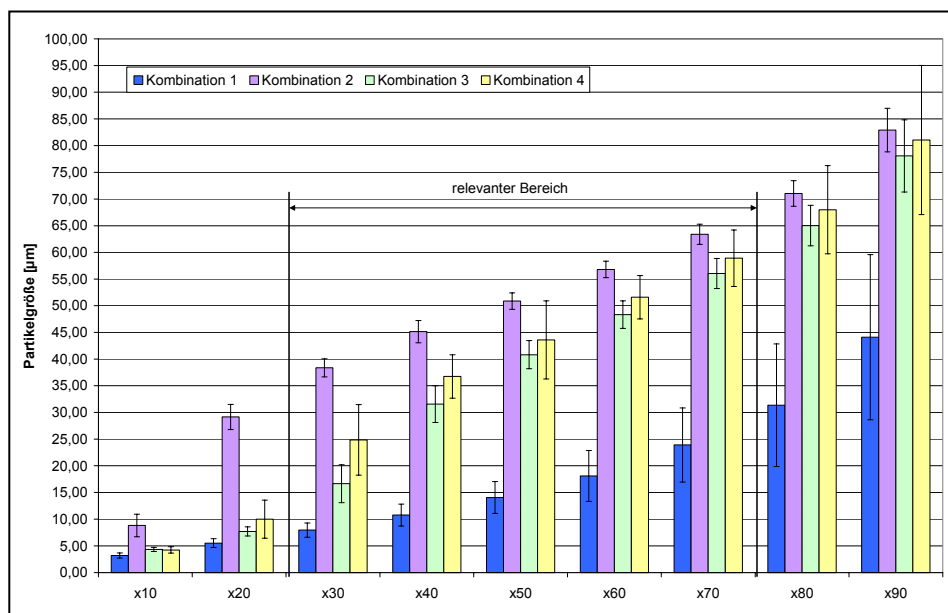


Abb. 7-20 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Teilchengrößenverteilung des Kapselrests (MW \pm SD; jeweils n = 20 Einzelwerte)
Vergleich der x-Werte (325M Respitose®) aller Kombinationen (Kombi 3 und 4 mit 2,5% Additiv)

Wie die Ergebnisse zeigen ist die Kombination der Faktoren Partikelform und Kapseloberfläche entscheidend an den unterschiedlichen Ergebnissen der ausgebrachten Dosis beteiligt. Durch dieses Zusammenspiel lässt sich ein kapselmaterialabhängiger Einfluss des zugesetzten Additivs nachweisen, der als „Auspudereffekt“ bezeichnet wird.

7.4 Partikel - Partikel - Wechselwirkungen

7.4.1 Umhüllungs-Effekt – „HOT-SPOTS“

Neben der bereits beschriebenen Wechselwirkung zwischen Kapselmaterial und Pulvermischung („Auspudereffekt“ siehe Kapitel 7.3.2), die sich deutlich auf die Höhe der Ausbringung des Kapselinhaltes auswirkt, zeichnet sich weiterhin eine Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Pulverpartikeln ab, was die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils ebenfalls deutlich beeinflusst.

Dieser zuletzt genannte Einfluss entspricht den gängigen Theorien (siehe Kapitel 3.4). So schreibt Podzeck [104] dem mikronisierten Laktose-Additiv ein Glätten der Trägeroberfläche zu. Durch Ausbildung autoadhäsiver Schichten „kleiner“ Laktosepartikel wird es damit möglich, die Bindungskräfte zwischen Wirkstoff und Trägerlaktose zu reduzieren. Vorhandene Poren, Unebenheiten und andere Oberflächenstrukturen, die starke Bindungsenergien („HOT-SPOTS“) aufweisen, werden belegt und die Ablösung des Wirkstoffs wird erleichtert.

Innerhalb der Arbeit wird diese positive Auswirkung des mikronisierten Laktoseanteils auf den inhalierbaren Anteil mit dem Begriff „Umhüllungs-Effekt“ oder „Coating-Effekt“ umschrieben.

Wie den Resultaten aus Kapitel 6.2 zu entnehmen ist, unterliegt der „Coating-Effekt“ offensichtlich einer Sättigung, welche durch die unterschiedlichen Partikelgrößenpektren der eingesetzten Trägerlaktosen beeinflusst wird.

Ist der Träger, wie die 325M Laktose relativ „grob“ und besitzt keinen „eigenen“ Feinanteil, führen die zugesetzten Additivmengen zu einem deutlichen Anstieg der inhalierbaren Anteile ($0\% < 2,5\% < 5\%$). Diese Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Additivmengen macht deutlich, dass es erst durch den Zusatz mikronisierter Laktose konzentrationsabhängig zur Ausbildung einer ausreichenden Schutzschicht kommt. Auf diese Weise entsteht ein starker „Umhüllungs-Effekt“.

Für die „feine“ 200M Laktose dagegen ist der „Umhüllungs-Effekt“ des zusätzlichen Laktosefeinanteils ($0\% < 2,5\% \sim 5\%$) weniger stark ausgeprägt. Hier führt bereits der „eigene“ Feinanteil zur Ausbildung einer autoadhäsiven Schicht, was den Effekt des zusätzlichen Mikronisats vermindert.

Diese Vermutung bestätigt sich beim Vergleich der beiden Basisformulierungen (ohne zusätzlichen Feinanteil). So ist mit 200M Laktose die Wirkstoffausbringung in den ACI deutlich größer und der Präseparator-Anteil wesentlich geringer als bei der entsprechenden Formulierung mit 325M Laktose (siehe Kapitel 6.2).

Auch die bei 200M Laktose fehlende Differenzierung zwischen den Resultaten mit 2,5% und 5% mikronisierter Laktose belegt diese Beobachtung: Ein Anstieg der Verteilung durch den „Coating-Effekt“ ist nicht mehr zu erkennen. Die Ausbildung einer autoadhäsiven Schutzschicht ist abgeschlossen.

Ein weiterer, in der Literatur dokumentierter Aspekt, ist die Auswirkung der Mischreihenfolge auf den „Umhüllungs-Effekt“. Je nachdem, in welcher Reihenfolge die Komponenten zu einer Mischung zusammengefügt werden, können die „HOT-SPOTS“ gezielt mit einer Komponente belegt und abgesättigt werden (siehe Kapitel 3.4).

Da dieser Effekt bei den beiden verwendeten Hauptmischvarianten (A = ohne Vormischung / B = mit Vormischung) nicht so deutlich zu erkennen ist (siehe Kapitel 6.2), wird für die Evaluierung der „HOT-SPOTS“ eine neue Mischvariante (C) eingeführt. Diese besteht aus einer Träger-Wirkstoff-Vormischung, in die nachträglich der Laktosefeinanteil eingearbeitet wird.

Um eine möglichst isolierte und unabhängige Betrachtung des „Umhüllungs-Effekts“ sicherzustellen, sind daher folgende Faktoren zu beachten:

- Der mögliche Sättigungsprozess durch „eigenen“ Feinanteil wird verhindert, in dem nur 325M Laktose eingesetzt wird. Dadurch wird der Effekt des zugesetzten Additivs nicht durch die Einflüsse des bereits vorhandenen Feinanteils überdeckt.
- Die Partikel-Kapsel-Wechselwirkung, welche hauptsächlich in Gelatine-Kapseln zum Tragen kommt, wird ausgeschlossen, in dem die Formulierungen vorzugsweise in „inerten“ PE-Kapseln untersucht werden. Damit liegt der Betrachtungsschwerpunkt nur auf dem aerodynamischen Effekt.
- Zusätzlich zur optimierten Auswahl von Trägerlaktose und Kapselmaterial wird neben den bekannten Mischvarianten A und B („alt“) die „neue“ Mischvariante C (Träger-Wirkstoff-Vormischung) eingeführt. Damit werden die beiden möglichen Extreme der „HOT-SPOT“-Belegung (hauptsächlich mit Laktose bzw. Wirkstoff belegt) abgebildet und können miteinander verglichen werden.

Daraus ergeben sich die in Tabelle 7-3 aufgeführten Formulierungen, welche nachfolgend auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils untersucht und bewertet werden.

Tabelle 7-3 Einfluss des *Umhüllungs-Effekt* („HOT-SPOTS“) auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils – Probenumfang (n = Anzahl der gemessenen Kollektive pro Kombination; A = ohne Vormischung; B = mit Träger-Additiv-Vormischung; C = mit Träger-Wirkstoff-Vormischung)

Laktose 325M			
Kapselart	Mischreihenfolge	Feinanteil [%]	n
PE	0	0	4
	A / B / C	2,5	4 / 4 / 4
	A / B / C	5	4 / 4 / 4

Da, wie erwartet, innerhalb der verschiedenen Feinanteile die Ergebnisse der „alten“ Mischungen (A / B) nicht signifikant verschieden sind, werden die Resultate der Kollektive für die grafische Darstellung zu einem Mittelwert (n=8) zusammengefasst (siehe Abb.7-21).

Um die Unterschiede zwischen den Mischvarianten genauer zu betrachten, erfolgt eine Auswertung nach Gruppen (siehe Tabelle 7-4).

Tabelle 7-4 Ergebnisübersicht der Gruppen (Ipratropiumbromid; Träger 325M Laktose mit unterschiedlichen Mengen Additiv in PE-Kapseln) nach Verwendung verschiedener Mischreihenfolgen: A = ohne Vormischung; B = mit Träger-Additiv-Vormischung; C = mit Träger-Wirkstoff-Vormischung (n = 4 bzw. n=8 für A/B); MW ± SD)

	Mischung A / B			Mischung C	
	0 %	2,5 %	5 %	2,5 %	5%
Gruppe 1 (PP0–1)	1,3 ± 0,1 µg	2,2 ± 0,3 µg	2,6 ± 0,2 µg	2,4 ± 0,4µg	2,3 ± 0,1µg
Gruppe 2 (PP2–4)	9,2 ± 0,7 µg	12,3 ± 1,1 µg	14,9 ± 1,0 µg	7,1 ± 0,9µg	8,4 ± 1,2µg
Gruppe 3 (PP5–Filter)	1,1 ± 0,3 µg	1,5 ± 0,2 µg	1,5± 0,3 µg	0,4 ± 0,1µg	0,5 ± 0,2 µg

Bei den „alten“ Formulierungen liegt der inhalierbare Feinanteil (Gruppen 2+3) mit Werten zwischen 10,3 µg – 16,4 µg genau im erwarteten Bereich (siehe Kapitel 6.2). Auch die Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Additivmengen und den damit verknüpften positiven Effekten auf die Höhe der Resultate tritt wieder auf. Trotz identischer Zusammensetzung (Komponenten und Mengenanteile) fallen die inhalierbaren Anteile der „neuen“ Formulierungen mit Werten von 7,5 µg – 8,9 µg wesentlich niedriger aus. Sie entsprechen in etwa den Ergebnissen des Basiswerts ohne zusätzlichen Feinanteil (siehe Tabelle 7-4).

Am offensichtlichsten zeigen sich die Unterschiede zwischen den verschiedenen Formulierungen in Gruppe 2 (PP2 - PP4). Hier kann bei den „alten“ Mischvarianten wieder deutlich zwischen den unterschiedlichen Additivmengen (0 % < 2,5 % < 5 %) differenziert werden. Der „neuen“ Mischvariante fehlt dagegen dieser Trend. Es ist keine Differenzierung (0 % ~ 2,5 % ~ 5 %) zwischen den Resultaten mit und ohne Feinanteil möglich (siehe Abb.7-21).

Analog den Ergebnissen in Kapitel 6.2.1 ist für die „alten“ Formulierungen innerhalb der Gruppe 1 (PP0 – PP1) nur eine Unterscheidung zwischen dem Basiswert (ohne Feinanteil) und den Resultaten mit Feinanteil möglich. Eine weitere Differenzierung zwischen den Additivmengen wird nicht beobachtet. Diese Aussagen sind auch für die „neuen“ Formulierungen gültig. Hier erreichen die verschiedenen Additivmengen annähernd die gleichen Ergebnisse wie bereits für die „alten“ Formulierungen beschrieben. Die Mischreihenfolge scheint, im Gegensatz zum Laktosefeinanteil, keinen Einfluss auf die Resultate der Gruppe 1 zu haben (siehe Abb.7-21).

Betrachtet man die Ergebnisse der Gruppe 3 (PP5 - Filter), ist innerhalb der „alten“ Formulierungen kein Unterschied zwischen dem Basiswert und den Formulierungen mit Feinanteil zu erkennen (siehe Abb.7-21).

Die „neuen“ Formulierungen dagegen zeigen sowohl im Vergleich zum Basiswert als auch zu den „alten“ Formulierungen eine deutlich geringere Verteilung. Offensichtlich wird durch die Modifikation der Mischreihenfolge besonders der Wirkstoff-Feinanteil an der Trägeroberfläche gebunden und steht im unteren Bereich des Kaskadenimpaktors nicht mehr zur Verfügung.

Ein weiterer Indikator für den „Umhüllungs-Effekt“ ist, neben der Verteilung im Kaskadenimpaktor, auch der Wirkstoffanteil im Präseparator. So sind im Präseparator parallel zu der mit Additiv gesteigerten Verteilung im ACI für die „alten“ Formulierungen deutlich rückläufige Wirkstoffanteile zu erkennen (siehe Abb.7-21).

Als Folge des autoadhäsiven Schutzfilms wird der Wirkstoff weniger stark an den Träger gebunden und kann dadurch leichter abgetrennt und besser verteilt werden. Bestätigt wird diese Aussage durch die extrem hohen Präseparator-Werte der Basisformulierung (siehe Abb.7-21). Dieser Formulierung fehlt der Laktosefeinanteil zur Ausbildung der Schutzschicht, wodurch der Wirkstoff stark an der Carrieroberfläche gebunden wird.

Durch die „neuen“ Formulierungen, die ebenfalls hohe Wirkstoffanteile im Vorabscheider aufweisen, wird diese Theorie bekräftigt (siehe Abb.7-21). Die nachträglich zugesetzte mikronisierte Laktose kann keinen „Schutzfilm“ mehr ausbilden, da der Wirkstoff durch die Vormischung bereits fest mit den Trägerpartikeln verbunden ist.

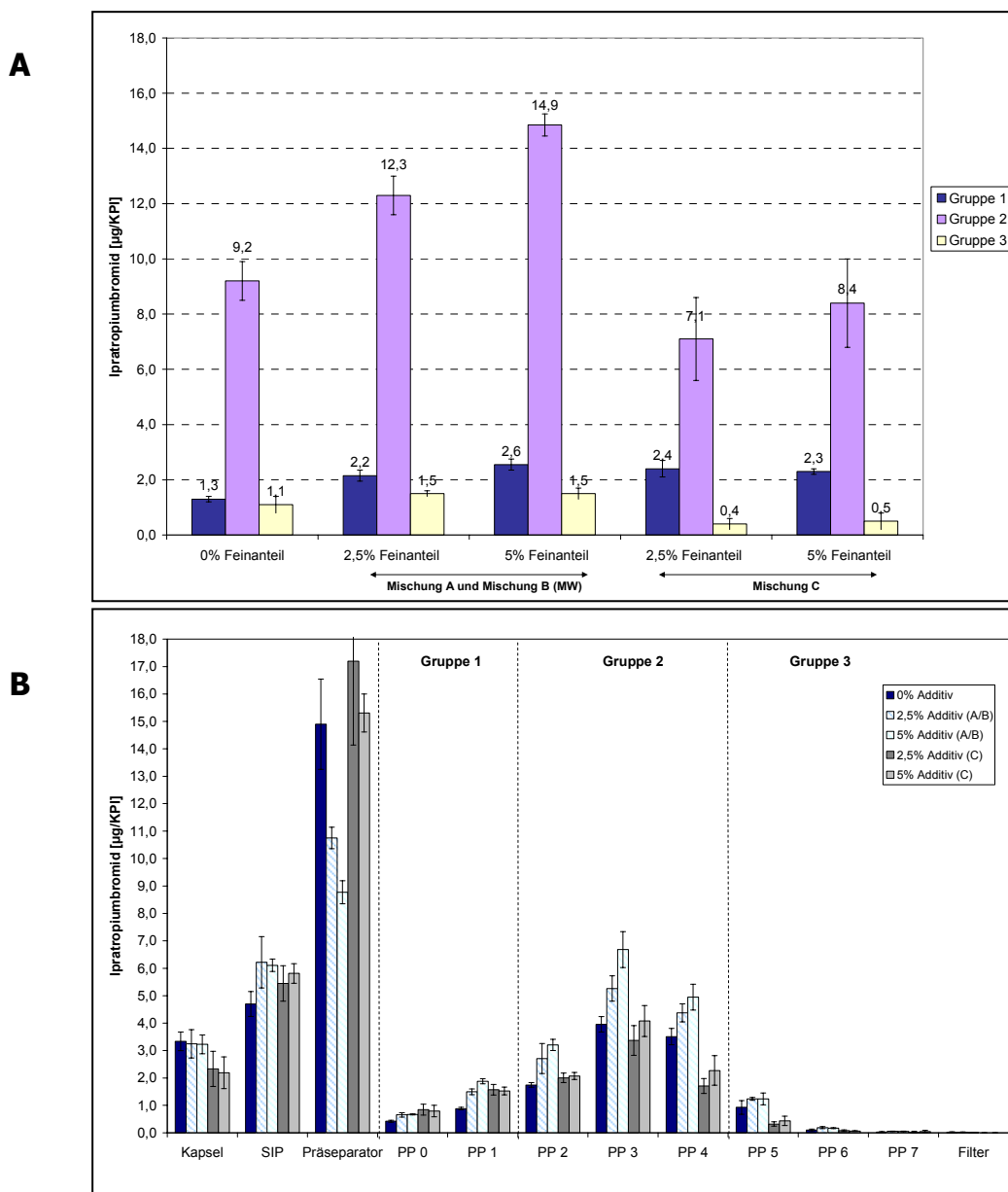


Abb.7-21 Darstellung der Ipratropiumbromid-Verteilung (verschiedene Mischvarianten: A = ohne Vormischung; B = mit Träger-Additiv-Vormischung; C = mit Träger-Wirkstoff-Vormischung); A) Übersicht der Gruppen 1-3 und B) Gesamtverteilung von Kapsel bis Filter (n=4 Kollektive bzw. n = 8 Kollektive für A/B; MW \pm SD)

Zum besseren Verständnis der beschriebenen Partikel-Partikel-Wechselwirkungen werden die vorliegenden Bindungskräfte zwischen den verschiedenen Pulverkomponenten mittels Rasterkraftmikroskopie ermittelt und quantifiziert (siehe Kapitel 4.2.6) [78]. Um eine genauere Quantifizierung der vorliegenden Bindungskräfte zu erhalten, wurden die Haftkräfte, die je nach Oberflächenbeschaffenheit des Partikels unterschiedlich stark ausgeprägt sein können, an mehreren Stellen der Probe ermittelt.

Wie anhand Abb.7-22/7-23 ersichtlich, wird die Wechselwirkung zwischen Laktosepartikeln hauptsächlich über Adhäsionskräfte mit kurzer Reichweite (an zwölf verschiedene Stellen gemessen: $42,66 \text{ nN} \pm 25,01 \text{ nN}$) definiert. Die sehr geringen elektrostatischen Wechselwirkungen, welche mit zwei der acht modifizierten Cantilever detektiert werden, gelten als nicht relevant.

Auch die Wechselwirkung zwischen Laktose und Ipratropiumbromid wird von schwachen Adhäsionskräften (an siebzehn verschiedenen Stellen gemessen: $46,77 \text{ nN} \pm 17,04 \text{ nN}$) geprägt, wobei in diesem Fall keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit langer Reichweite nachweisbar sind.

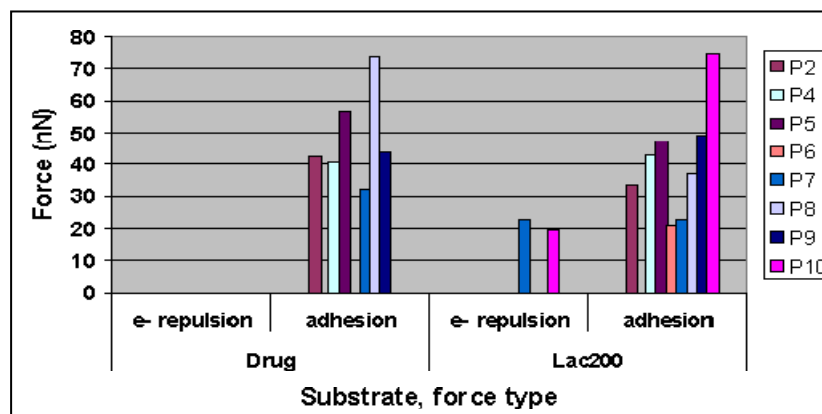


Abb.7-22 Darstellung der unterschiedlichen Wechselwirkungen (Kraft in nN); mikronisierter Laktose gegen Ipratropiumbromid und Laktose 200M – Differenzierung in Kräfte mit langer (e-repulsion) und kurzer (adhesion) Reichweite (n=240 Einzelwerte für Laktose gegen Ipratropiumbromid und n=340 Einzelwerte für Laktose gegen Laktose)

Über die chemische Struktur der eingesetzten Komponenten lassen sich die Ergebnisse erklären: Wie den 3D-Modellen der Abb.7-24 zu entnehmen, dominiert im Disaccharid Laktose hauptsächlich eine negative Oberflächenladung (rot). Dies erklärt, warum die Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen (weitreichend) zwischen zwei Laktose-Molekülen ausbleibt (Abstoßung) und es erst ab einer gewissen Annäherung der Moleküle zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (kurze Reichweite) kommt. Eine Beobachtung, die sich in den gemessenen Adhäsionskräften widerspiegelt.

Ebenfalls auf die Oberflächenladung zurückzuführen ist auch die Ausbildung der Adhäsionskräfte (z.B. Wasserstoffbrücken) zwischen dem Salz Ipratropiumbromid und dem Disaccharid Laktose (siehe Abb.7-24). Zwischen der vorwiegend neutralen (grau) bis partiell negativ geladenen (rot) Oberfläche eines Ipratropiumbromid-Moleküls und der vornehmlich negativen Oberfläche eines Laktose-Moleküls können sich keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit langer Reichweite ausbilden.

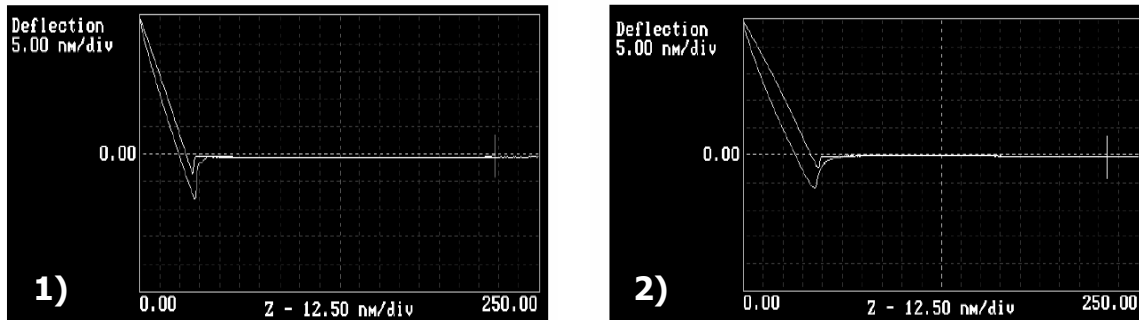


Abb.7-23 Exemplarische Darstellung der Kraft-Distanzkurven für einen Cantilever mit Laktose-spitze (MW aus 20 Einzelmessungen): Laktose (1) und Ipratropiumbromid (2)

Die in etwa gleich bleibende Affinität (siehe Abb.7-22/7-23) zwischen den verschiedenen Pulverpartikeln macht deutlich, dass keine der beiden Komponenten bevorzugt an den Träger gebunden wird. Vielmehr ist die Ausbildung von Multiplets, Schutzfilmen auf Trägerpartikeln und Wirkstoff-Carrierbindungen bezogen auf die Stärke der Bindungskräfte für alle Pulverkomponenten gleich wahrscheinlich und wird damit hauptsächlich durch andere Faktoren wie z.B. Partikelform und prozentualen Feinanteil bestimmt (siehe Kapitel 7.2/7.3).

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Kapitel 7.1 (siehe Abb.7-3/7-22) sind die vorliegenden Kräfte deutlich geringer als zwischen Partikeln und Kapseloberflächen. So besitzen z.B. Wirkstoff-Partikel ein stärker ausgeprägtes Haftbestreben zur Kapseloberfläche als zur Carrieroberfläche (Wirkstoff - Kapsel > Wirkstoff - Laktose).

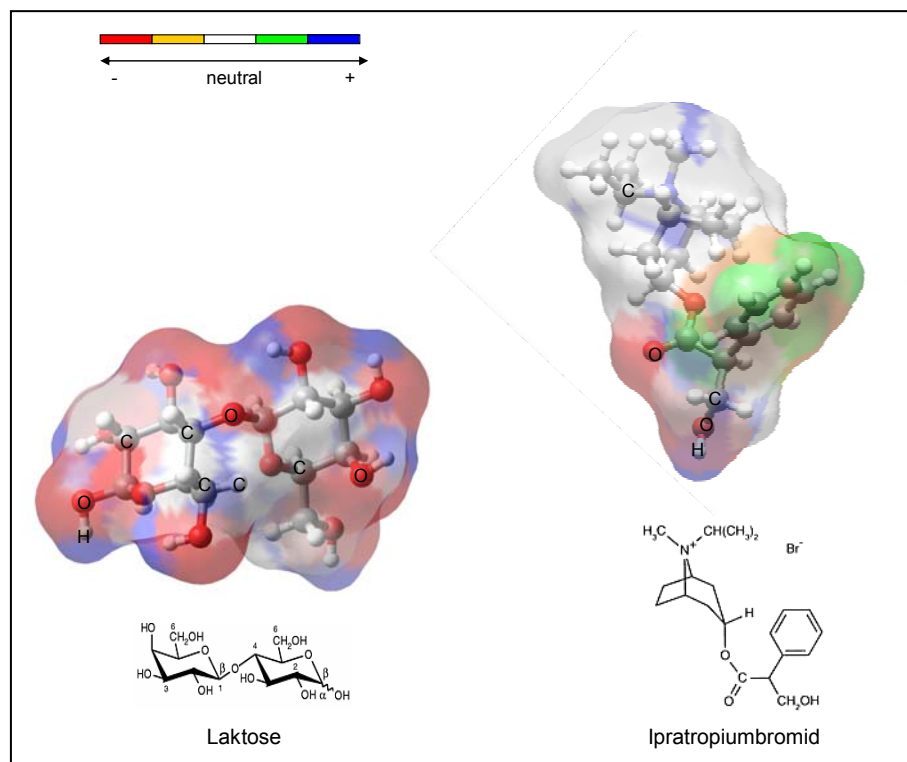


Abb.7-24 3D-Modelle zur Darstellung der Oberflächenladung von Laktose und Ipratropiumbromid – Erklärung für die Ausbildung der Wechselwirkungen [100;101]

7.4.1.1 Statistische Auswertung

Das Verfahren der Varianzanalyse wird eingesetzt, um die durch die Faktoren *Anteil mikronisierter Laktose und Mischreihenfolge* ausgelösten Effekte auf den Parameter *Verteilung des aerodynamischen Feinanteils (Gruppe 1 - 3)* zu bewerten.

Dazu werden als Datenbasis pro Kombination die Werte von vier Kollektiven (4x6 Kapseln) herangezogen (siehe Tabelle 7-5) sowie alle Faktoren und Wechselwirkungen als feste Faktoren berücksichtigt. Zusätzlich geht die Streuung zwischen den vier Kollektiven der jeweiligen Kombination als Reststreuung mit in die Berechnung ein.

Um eine genauere Bewertung der Trends sicherzustellen, werden auf der Basis der vorliegenden ANOVA anschließend paarweise Vergleiche (zweiseitige t-Tests) durchgeführt [106]. Alle Berechnungen erfolgen mit der Prozedur „MIXED“ des Software-system SAS® [91-93].

Tabelle 7-5 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid (n= Anzahl der gemessenen Kollektive pro Faktorkombination; A = ohne Vormischung; B = mit Träger-Additiv- Vormischung; C = mit Träger- Wirkstoff-Vormischung)

Feinanteil [%]	Mischreihenfolge	n
0	0	4
2,5	A / B	4 / 4
	C	4
5,0	A / B	4 / 4
	C	4

Tabelle 7-6 Einfluss verschiedener Faktoren auf Parameter: *Gruppe 1 - 3 (Anteil Ipratropiumbromid auf den PP im ACI)* - Ergebnisse der ANOVA

	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Haupteffekte						
Anteil	7,57	0,0119	23,78	0,0001	0,05	0,8192
Mischreihenfolge	4,85	0,0186	81,20	0,0001	65,79	0,0001
Wechselwirkung						
Anteil*Mischreihenfolge	4,46	0,0243	0,90	0,4224	1,09	0,3533

Signifikanzniveau α : 0,05

Gruppe 1 (PP0 - PP1)

Folgender Faktor wird als Haupteffekt identifiziert (siehe Tabelle 7-6 / Abb.7-25):

- Durch den Zusatz mikronisierter Laktose wird eine Steigerung der Ipratropiumbromid-Anteile auf den PP0 - PP1 erreicht (Pfeil in Abb.7-25), wobei keine genauere Differenzierung der Ergebnisse mit unterschiedlichen Additivmengen möglich ist ($0\% < 2,5\% \sim 5$). Sowohl die ANOVA ($p=0,0119$) als auch die paarweisen Vergleiche (siehe Tabelle 7-7) bestätigen dies.

Die genaue Betrachtung der paarweisen Vergleiche (siehe Tabelle 7-7) bestätigt die in Kapitel 6.2 aufgestellte Theorie, dass kein Einfluss der Mischreihenfolge (Variation A / B) auf die Verteilung von Ipratropiumbromid im oberen Bereich des ACI vorliegt. Die in Tabelle 7-7 vorliegenden Unterschiede zwischen den Mischvarianten A und B bei Mischungen mit 2,5% Additiv sind auf die niedrigeren Werte der Mischvariante A zurückzuführen, was unter Beachtung der Ergebnisse in 6.2 (identische Formulierung) nicht nachzuvollziehen ist.

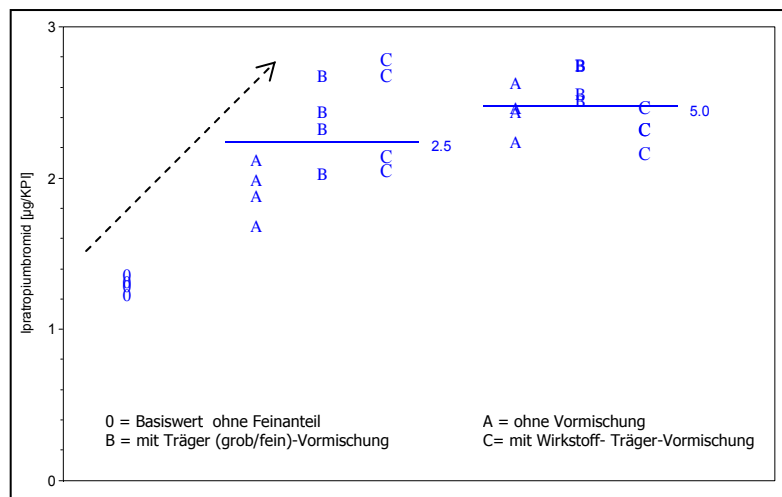


Abb.7-25 Einfluss des zugesetzten Additivs (Umhüllungs-Effekt) in Abhängigkeit der Mischreihenfolge auf den Parameter Gruppe 1 (Verteilung von Ipratropiumbromid auf PP0-PP1); n=4 Kollektive

Gruppe 2 (PP2 – PP4)

Für die Verteilung auf den PP2 - PP4 werden folgende Effekte statistisch signifikant (siehe Tabelle 7-6 und Abb.7-26):

- Durch den Zusatz von mikronisierter Laktose ist eine sichtbare Steigerung der Resultate auf den PP2 – PP4 möglich ($p=0,0001$). Dabei kann nicht nur zwischen dem Basiswert und den Resultaten mit Additiv unterschiedenen werden (siehe Pfeile in Abb.7-26), sondern auch zwischen den beiden Additivmengen ($0\% < 2,5\% < 5\%$). Diese Beobachtung wird durch die paarweisen Vergleiche (siehe Tabelle 7-7) bestätigt.

- Der Faktor Mischreihenfolge spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. So lassen sich mit den „alten“ Formulierungen (A/B) deutlich höhere Resultate im Vergleich zum Basiswert erzielen, während sich die „neue“ Formulierung (C) kaum vom Basiswert unterscheidet. Dieser Einfluss der Mischreihenfolge wird durch die ANOVA bestätigt ($p=0,0001$). Auch die beidseitigen t-Tests im Rahmen der paarweisen Vergleiche bestätigen diese Aussage (siehe Tabelle 7-7).

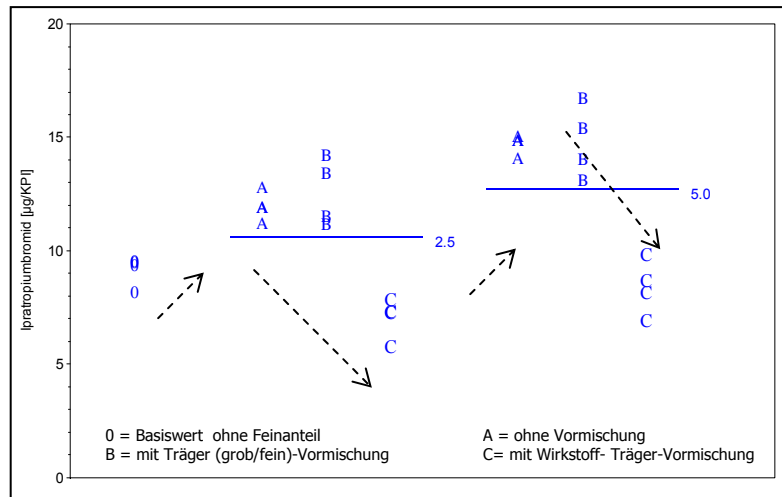


Abb.7-26 Einfluss des zugesetzten Additivs (Umhüllungs-Effekt) in Abhängigkeit der Mischreihenfolge auf den Parameter *Gruppe 2* (Verteilung von Ipratropiumbromid auf PP2-PP4); n=4 Kollektive

Gruppe 3 (PP5 – Filter)

Werden, unabhängig vom Feinanteil, die Resultate der jeweiligen Mischreihenfolgen zusammengefasst, liegen die „alten“ Formulierungen im Vergleich zum Basiswert leicht erhöht, während die „neuen“ Formulierungen niedriger liegen als alle Kombinationen. Die paarweisen Vergleiche bestätigen dies (siehe Tabelle 7-7).

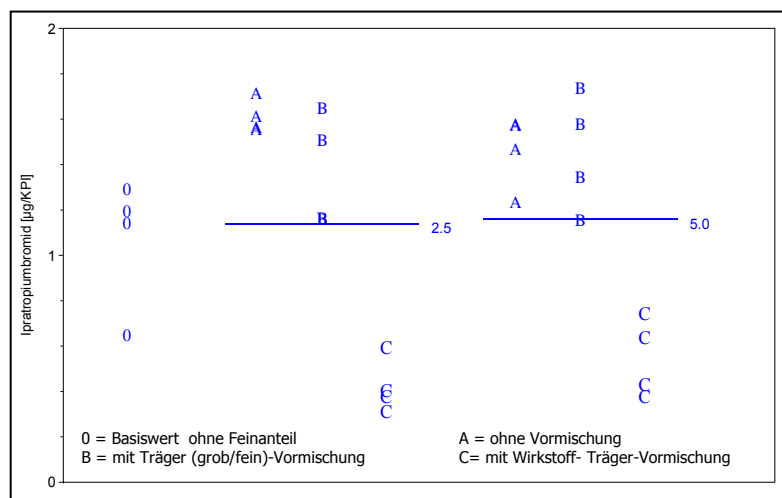


Abb.7-27 Einfluss des zugesetzten Additivs (Umhüllungs-Effekt) in Abhängigkeit der Mischreihenfolge auf den Parameter *Gruppe 3* (Verteilung von Ipratropiumbromid auf PP5-Filter); n=4 Kollektive

Tabelle 7-7 Paarweise Vergleiche für die Parameter *Gruppe 1 – Gruppe 3* (Einheit: $\mu\text{g}/\text{KPI}$)

Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3					
Anteil Misch- [%] variante	Anteil Misch- [%] variante	Differenz [$\mu\text{g}/\text{KPI}$]	p Wert	Differenz [$\mu\text{g}/\text{KPI}$]	p Wert				
0	0	2,5	A	-0,62	0,0004	-2,83	0,0011	-0,54	0,0010
0	0	2,5	B	-1,07	0,0001	-3,44	0,0002	-0,30	0,0472
0	0	2,5	C	-1,11	0,0001	2,13	0,0098	0,65	0,0002
0	0	5	A	-1,14	0,0001	-5,58	0,0001	-0,39	0,0119
0	0	5	B	-1,34	0,0001	-5,67	0,0001	-0,38	0,0135
0	0	5	C	-1,02	0,0001	0,78	0,3072	0,53	0,0013
2,5	A	2,5	B	-0,45	0,0061	-0,61	0,4269	0,24	0,1026
2,5	A	2,5	C	-0,49	0,0032	4,96	0,0001	1,20	0,0001
2,5	A	5	A	-0,52	0,0019	-2,75	0,0014	0,15	0,3000
2,5	B	2,5	C	-0,04	0,7822	5,57	0,0001	0,95	0,0001
2,5	B	5	B	-0,27	0,0779	-2,23	0,0071	-0,08	0,5621
2,5	C	5	C	0,09	0,5272	-1,35	0,0869	-0,12	0,3918
5	A	5	B	-0,20	0,1929	-0,09	0,9034	0,01	0,9566
5	A	5	C	0,13	0,3933	6,37	0,0001	0,92	0,0001
5	B	5	C	0,33	0,0378	6,46	0,0001	0,91	0,0001

Signifikanzniveau α : 0,05

Im Vergleich zu den Ergebnissen einer binären Mischung, lässt sich die Verteilung von Ipratropiumbromid im ACI durch den Zusatz von Additiv deutlich steigern. Wie in Abb.7-28 dargestellt, ist dieser Effekt auf die Ausbildung eines Schutzfilms aus Additiv zurückzuführen, wodurch der Wirkstoff weniger stark gebunden und leichter von der Trägeroberfläche wieder abgelöst wird.

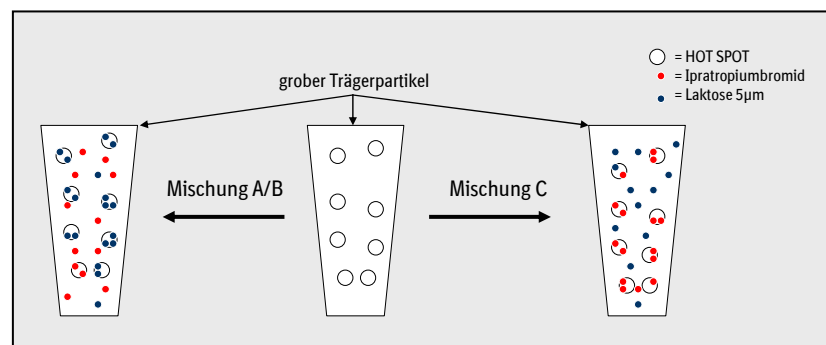


Abb.7-28 Schematische Darstellung der „HOT-SPOTS“ – provozierte Belegung aktiver Bindungsplätze durch unterschiedliche Mischreihenfolgen (Zusammenfassung der Ergebnisse)

7.4.2 Funktionen des Trägermaterials

Üblicherweise wird den Formulierungen von inhalativen Pulvermischungen eine Trägerkomponente zugesetzt, um so die Fließfähigkeit sowie die Dosiergenauigkeit zu verbessern. Der Träger hat dabei die Aufgabe, vorliegende Mikronisatagglomerate zu „knacken“, den Wirkstoff „Huckepack“ zu tragen und auf diese Weise die Ausbringung zu fördern (siehe Kapitel 1.1).

Als Beleg für diese Theorien wird reines Wirkstoffmikronisat ($\sim 5,5$ mg / Kapsel) in die beiden Kapseltypen PE und Gelatine abgefüllt und bezogen auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils bewertet. Die erhaltenen Resultate werden mit den Ergebnissen der Wirkstoff-Träger-Mischungen aus Kapitel 6.2 verglichen. Da sehr unterschiedliche Wirkstoffanteile (5,5 mg bzw. 40 μ g) vorliegen, müssen die Resultate der einzelnen Kaskadenstufen erst in einen prozentualen Wirkstoffgehalt (bezogen auf den Gesamtgehalt) umgerechnet werden. Erst dann ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich.

Die Beobachtungen werden exemplarisch für die Formulierungen mit 200M Laktose dargestellt und lassen sich vollständig auf die Ergebnisse der entsprechenden Formulierungen mit 325M Laktose übertragen.

PE-Kapseln

In Abb.7-29 ist für das reine Mikronisat ein extrem gesteigerter Präseparatoranteil ($\sim 35\%$) zu erkennen, der bedingt durch die eingesetzte Partikelgröße ($\sim 5\mu\text{m}$) eher ungewöhnlich ist. Die Resultate der Mischungen dagegen weisen einen deutlich geringen Wirkstoffanteil im Präseparator auf ($\sim 17\%$).

Diese Vorabscheidung bestimmt wesentlich die Wirkstoff-Verteilung im Kaskadenimpaktor. So gelangen nur 40% des reinen Mikronisats in den ACI und verteilen sich auf den Prallplatten. Deutlich weniger als bei den Formulierungen mit Trägermaterial. Hier erreichen 60% des Wirkstoffs den ACI und werden verteilt (siehe Abb.7-29).

Bereits diese ersten Beobachtungen weisen darauf hin, dass der Träger in der Lage ist, die kohäsiven Wirkstoffagglomerate zu zerschlagen und eine bessere Verteilung der Wirkstoff-Partikel zu erreichen.

Noch deutlicher werden die Unterschiede zwischen Mikronisat und Pulvermischung, wenn man die prozentuale Verteilung im Kaskadenimpaktor bezogen auf den jeweiligen Gesamtfeinanteil (Summe PP0 - Filter) betrachtet (siehe Abb.7-29).

Der vorhandene Feinstanteil auf den PP5 – Filter ist beim reinen Wirkstoff-Mikronisat deutlich stärker ausgeprägt als bei den Mischungen. Dies gilt auch für die „groben“ Partikel auf PP0. Dagegen zeigt sich auf den PP1 – PP3 ein gegenteiliges Bild. Hier gelangt durch die Träger-Wirkstoff-Mischung prozentual gesehen mehr Wirkstoff auf die Prallplatten als bei der reinen Mikronisat-Formulierung. Möglicherweise führt in diesem Fall die partikelgrößenabhängige Ausprägung der Adhäsionskräfte (siehe Kapitel 7.2) zu einer Verschiebung der Wirkstoffverteilung. So liegen im reinen Mikronisat bedingt durch die starken Kohäsionskräfte hauptsächlich Wirkstoff-Agglomerate vor. Diese Formationen aus mehreren Wirkstoffteilchen sind gerade groß genug, um die Kapsel zu verlassen ($F_{\text{ablösend}} > F_{\text{adhäsion}}$) und zu groß, um sich im ACI zu verteilen.

Die Agglomerate schlagen sich bereits im Präseparator nieder. Neben den Agglomeraten werden auf der „harten“ und „unflexiblen“ PE-Oberfläche auch die „freien“ Einzelpartikel nur schwach gebunden und somit ebenfalls ausgebracht. Dieser Feinstanteil ist klein genug, um sich im unteren Drittel (PP5 – Filter) des ACI niederzuschlagen (siehe Abb.7-29).

Mit dem Zusatz der Trägerlaktose ändert sich die Verteilung im Kaskadenimpaktor (siehe Abb.7-29). Während sich bei der Basisformulierung (ohne Feinstanteil) der Wirkstoff stark an den „groben“ Trägerteilchen bindet und zusammen mit dem Carrier im Präseparator abgeschieden wird, ändert sich die Verteilung durch den Zusatz von mikronisierter Laktose. Hier werden die Wirkstoffanteile im Vorabscheider deutlich reduziert, da der vorhandene Mikronisat-Schutzfilm die Abtrennung der „runden“ Wirkstoffteilchen merklich erleichtert (siehe Kapitel 7.4.1). Bedingt durch die Abhängigkeit von Bindungsbestreben und Partikelgröße bleibt bevorzugt der Feinstanteil ($F_{\text{adhäsion}} > F_{\text{ablösend}}$) auf dem groben Träger haften, während sich größere Teilchen ablösen und im ACI verteilen (siehe Kapitel 7.2).

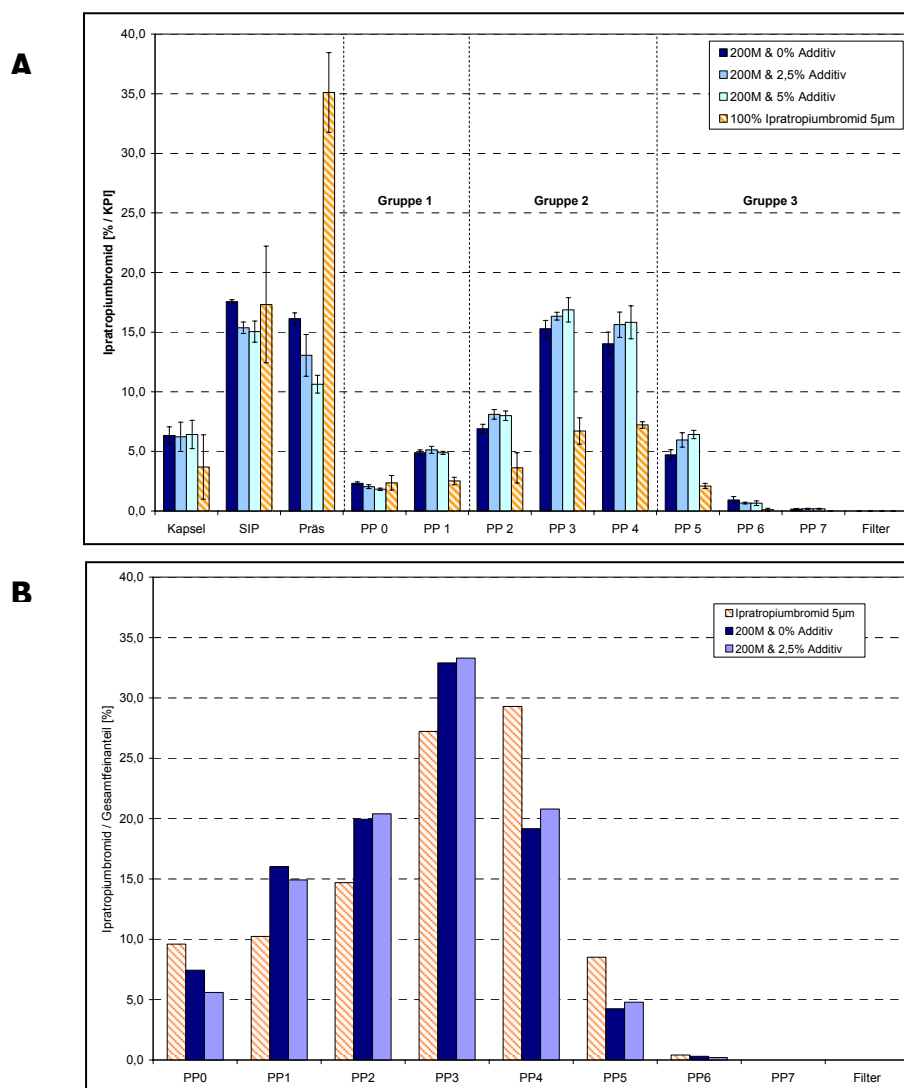


Abb.7-29 prozentuale Ipratropiumbromid-Verteilung aus PE-Kapseln bezogen auf A) Gesamtwirkstoffmenge und B) Gesamtfeinstanteil (MW \pm SD; n=4 Kollektive pro Formulierung)

Ein weiterer Aspekt ist die Anbindung der Wirkstoff-Partikel an mikronisierte Laktosepartikel („Multiplets“). Die im Kaskadenimpaktor vorliegenden laminaren Strömungen (siehe Kapitel 3.1.2) sind nicht ausreichend, um vorhandene „Multiplets“ aus Laktose und Wirkstoff zu zerstören. Daher schlagen sich die Agglomerate bevorzugt im oberen/mittleren Bereich (PP1 – PP3) des ACI nieder (siehe Kapitel 7.4.4). Es kommt zu einer deutlichen Verschiebung der Partikelgrößenverteilung in den größeren Bereich.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe Abb.7-30) einer Pulvermischung machen dies sichtbar. Ipratropiumbromid (helle Partikel) ist sowohl auf dem „groben“ Carrier als auch in Agglomeraten mit „feinen“ Laktosepartikeln nachweisbar. Ein Hinweis darauf, dass sowohl der „grobe“ Carrier als auch das „feine“ Additiv an der Verteilung des Wirkstoffs im Kaskadenimpaktor beteiligt sind.

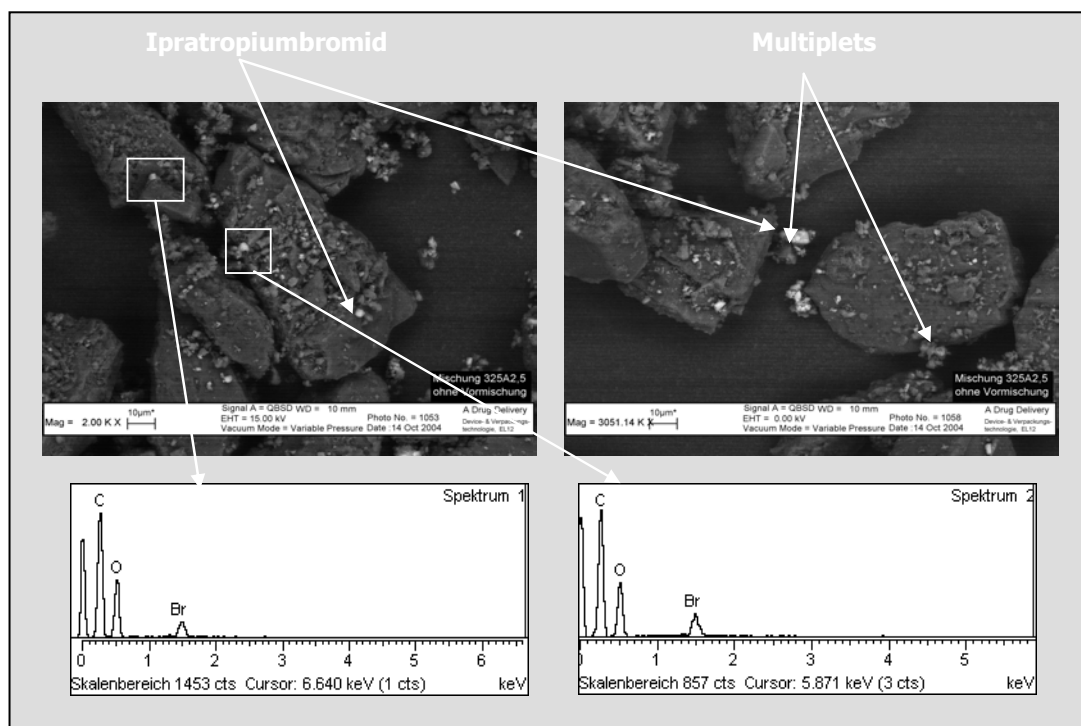


Abb.7-30 REM-Aufnahmen (Mit BSE-Detektor) und die jeweiligen EDX-Spektren der 325A_2,5% Mischung - Identifizierung der Wirkstoffpartikel sowie Darstellung von „Multiplets“ und Wirkstoff-Carrier-Komplexen

Gelatine-Kapseln

Die Betrachtung der Ergebnisse im adhäsiven Kapselmaterial ergibt die gleichen Trends bezogen auf die Verteilung im ACI wie bereits für die PE-Kapseln definiert. Auch hier findet durch den Träger eine Verschiebung der „theoretischen“ Partikelgröße in den größeren Bereich statt. Gleiches gilt für die Verteilung der Wirkstoffpartikel im Präseparator. Erneut werden innerhalb der Träger-Wirkstoff-Mischungen die Wirkstoffanteile im Präseparator deutlich reduziert, was auf eine Desagglomeration der Wirkstoffagglomerate durch den Träger und eine bessere Verteilung im Kaskadenimpaktor zurückzuführen ist (siehe Abb.7-31).

Einziger Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Kapselmaterialien ist die Kapselretention. Die Anreicherung des Feinstanteils in der Kapsel wird durch die Gelatine-Kapseln noch deutlicher abgebildet (siehe auch Kapitel 7.3).

Da in der Formulierung aus reinem Mikronisat die Wirkstoffagglomerate groß genug sind, überwinden die herrschenden Scherkräfte ($F_{\text{ablösend}}$) die Adhäsionskräfte der annähernd „runden“ Teilchen und die Partikel werden ausgebracht.

Nur die „feinsten“ Wirkstoffpartikel bleiben aufgrund der extrem starken Adhäsionskräfte (siehe Kapitel 7.2) auf der „weichen“ Gelatine-Oberfläche zurück.

Bedingt durch den Träger kommt es zu einer Zerstörung der Agglomerate, wodurch die Zahl der „freien“ Wirkstoffpartikel ansteigt. Innerhalb einer Träger-Wirkstoff-Mischung liegt also mehr „Feinstanteil“ vor, welcher auf der Kapseloberfläche zurückbleibt und somit zu einem deutlich erhöhten Kapselrest führt (siehe Abb.7-31).

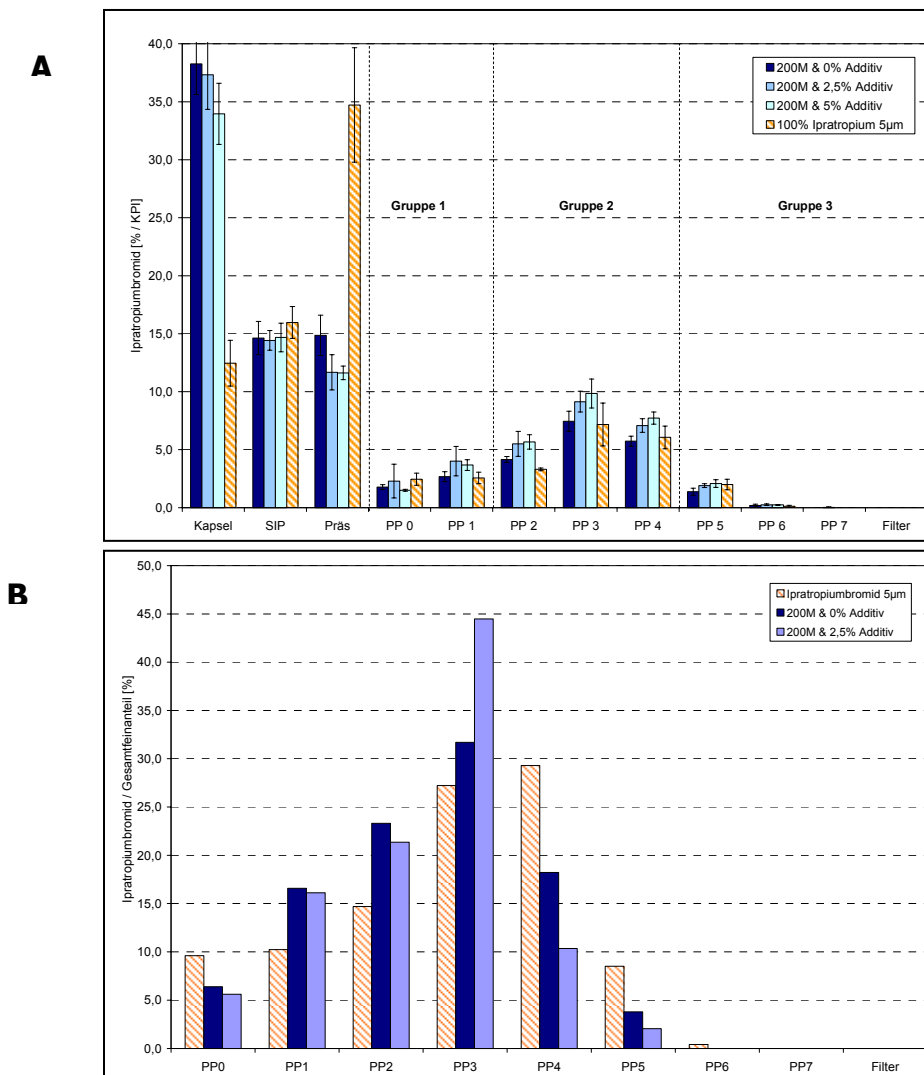


Abb.7-31 prozentuale Ipratropiumbromid-Verteilung aus Gelatine-Kapseln bezogen auf A) Gesamtwirkstoffmenge und B) Gesamtfeinanteil (MW \pm SD; n=4 Kollektive pro Formulierung)

Damit fallen dem Laktosefeinanteil innerhalb der Partikel-Partikel-Wechselwirkung verschiedene Funktionen zu. Neben der Ausbildung eines Schutzfilms um die Trägerpartikel (siehe 7.4.1) führt er zur Bildung von „Multiplets“ und trägt somit zweifach deutlich auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils bei (siehe Abb.7-32).

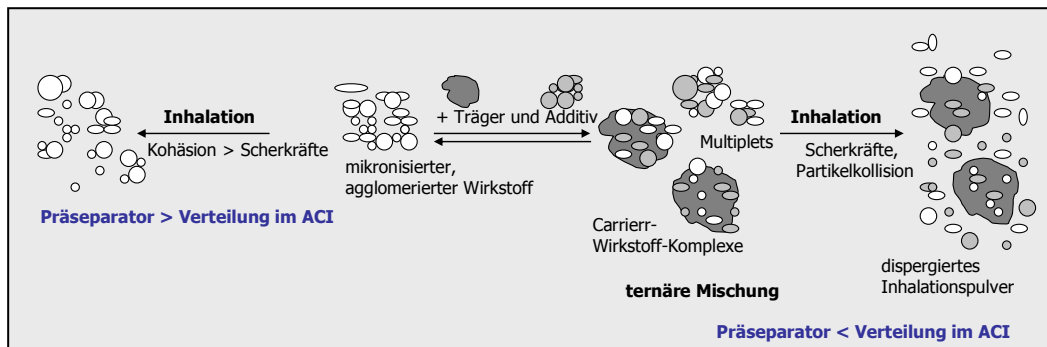


Abb.7-32 Schematische Darstellung der Trägerfunktion (Zusammenfassung der Ergebnisse)

7.4.3 Korrelation der ausgebrachten Dosis Ipratropiumbromid - Laktose

Trägt man die jeweilige ausgebrachte Dosis von Ipratropiumbromid gegen die entsprechenden Resultate von Laktose auf, lassen sich die erhalten Grafiken auf unterschiedliche Weise betrachten und bewerten (siehe Abb.7-33).

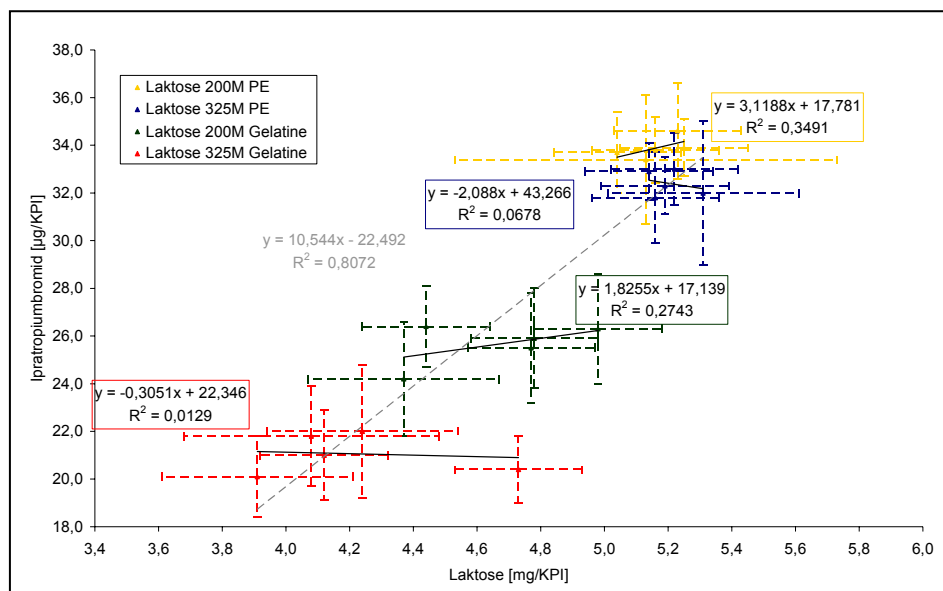


Abb.7-33 Korrelation der ausgebrachten Dosis Ipratropiumbromid - Laktose in Abhängigkeit von Trägermaterial und Kapselart (n= 40 EW; MW ± SD)

Betrachtet man die vier möglichen Kombinationen aus Trägerlaktose und Kapselmaterial (z.B. Gelatine & 200M Laktose) getrennt, lässt zwischen entsprechenden Resultaten dieser Gruppen keine Korrelation erkennen. Die beiden Ergebnisse sind also innerhalb der jeweiligen Kombination nicht voneinander abhängig.

Im Vergleich der vier Kombinationen untereinander zeigt sich dagegen eine Korrelation (z.B. Gelatine & 200M Laktose und PE & 200M Laktose). So steigt die ausgebrachte Dosis in Abhängigkeit von dem eingesetzten Kapselmaterial und der verwendeten Trägerlaktose an. Dies bestätigt die bereits durch die ANOVA belegte These, dass sowohl das Kapselmaterial als auch die Trägerlaktose zu den Haupteinflussfaktoren auf die ausgebrachte Dosis zählen.

7.4.4 Korrelation des aerodynamischen Feinanteils Ipratropiumbromid - Laktose

Zur besseren Übersicht wird die Aufteilung in die drei Gruppen (G1 = PP0 – PP1; G2= PP2 – PP4, G3 = PP5 – Filter) beibehalten. Um eine mögliche Beziehung zwischen den Ergebnissen abzuleiten, werden die Ipratropiumbromid-Anteile gegen die entsprechenden Resultate der Laktose-Bestimmung aufgetragen (eingesetzte Formulierungen siehe Kapitel 5.3). Auch hier sind, wie bereits bei der ausgebrachten Dosis beschrieben, zwei Betrachtungsweisen möglich.

Gruppe 1 (PP0 – PP1)

Die separate Betrachtung der vier Kombinationen aus Trägerlaktose und Kapselmaterial (z.B. Gelatine & 200M Laktose) ergibt für jede Kombination eine Korrelation zwischen dem Trägerfeinanteil und dem entsprechenden Ipratropiumbromid-Feinanteil (siehe Abb.7-34). Diese Abhängigkeit ist für die Kombinationen mit Gelatine-Kapseln stärker signifikant als für die entsprechenden Kombinationen mit PE-Kapseln ($R^2_{\text{Gelatine \& 325M Laktose}} = 0,988$ und $R^2_{\text{PE \& 325M Laktose}} = 0,35$).

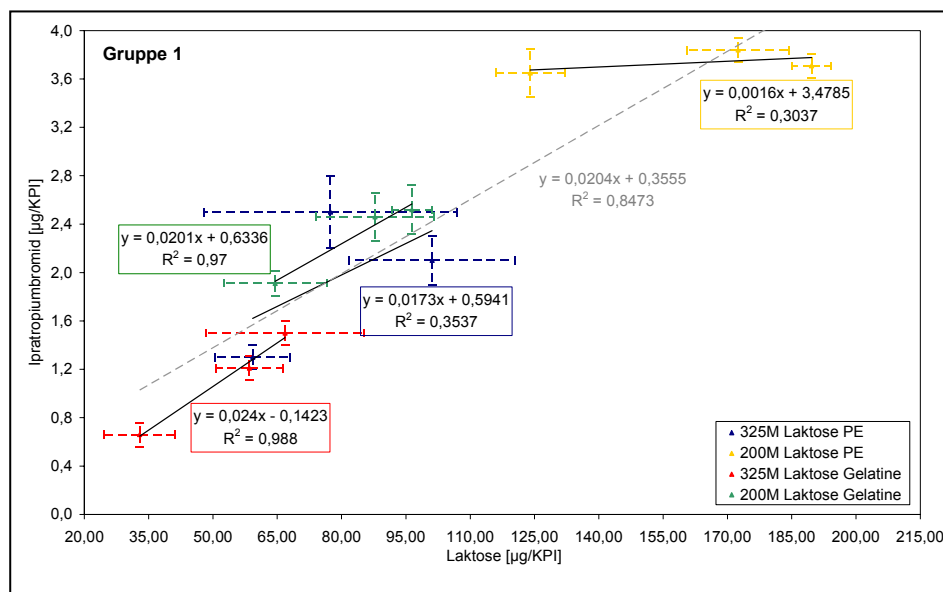


Abb.7-34 Korrelation von Ipratropiumbromid und Laktose in *Gruppe 1*
Vergleich der vier Hauptkombinationen (n= 4 Kollektive; MW ± SD)

Da sich allerdings mit steigendem Laktosefeinanteil ein für die Gruppe 1 deutlicher und relevanter Anstieg des Ipratropiumbromidgehalts erzielen lässt (Steigung der Trendline $\sim 0,7\mu\text{g}$), wird für alle Kombinationen eine signifikante und relevante Abhängigkeit der Ergebnisse angenommen.

Im direkten Vergleich der vier Kombinationen zeigt sich die bereits in Kapitel 7.4.3 beschriebene Abhängigkeit der Ergebnisse vom eingesetzten Kapselmaterial und der verwendeten Trägerlaktose. Werden hingegen die vier voneinander unabhängige Kombinationen miteinander verglichen, muss bei der Bewertung eine größere Variabilität der Trendline angenommen werden.

Gruppe 2 (PP2 – PP4)

Innerhalb der Gruppe 2 ist für alle Kombinationen eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Ipratropiumbromid-Anteil und dem entsprechenden Laktosefeinanteil zu erkennen (siehe Abb.7-35).

So lässt sich durch den steigenden Laktosefeinanteil die Verteilung von Ipratropiumbromid auf den entsprechenden Prallplatten im Mittel um etwa $2,5 \mu\text{g}$ steigern. Eine Steigerung, die wesentlich zur Optimierung des inhalierbaren Wirkstoffanteils (Gruppen 2+3) beiträgt.

Bezogen auf den Vergleich der vier Kombinationen untereinander, gelten die gleichen Aussagen wie sie für Gruppe 1 definiert wurden.

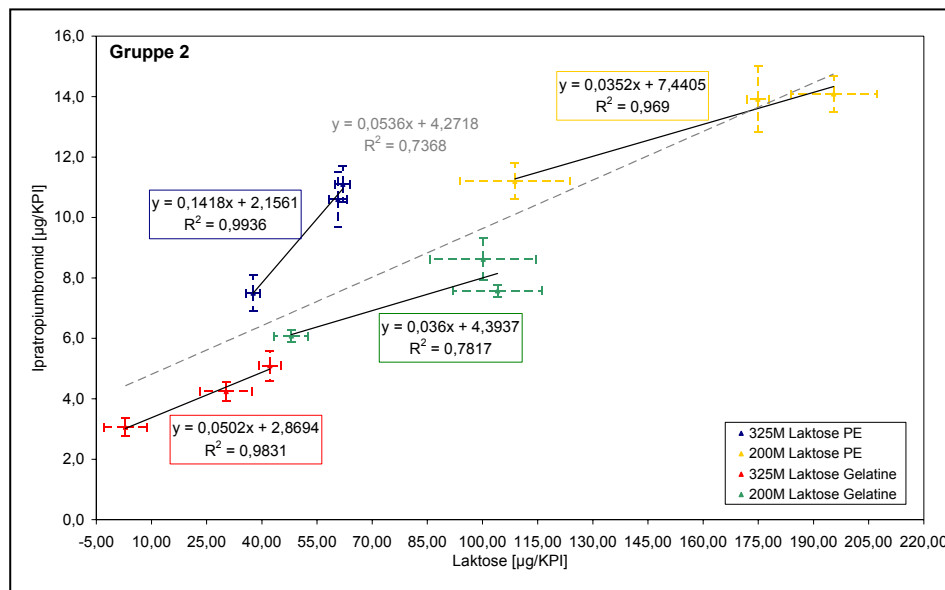


Abb.7-35 Korrelation von Ipratropiumbromid und Laktose in *Gruppe 2*
Vergleich der vier Hauptkombinationen (n= 4 Kollektive; MW \pm SD)

Gruppe 3 (PP5 – Filter)

Aufgrund der Datenlage (extreme Streuung und negative Steigung der Trendline) ist für die Verteilung auf den PP5 – Filter keine Aussage über eine Korrelation der Messergebnisse möglich.

8 Diskussion

Es lassen sich verschiedene Haupteinflussfaktoren und kombinierte Wechselwirkungen definieren, die sowohl einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Höhe der ausgebrachten Dosis als auch auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid haben. Einige dieser Einflussfaktoren, wie die *Qualität des Trägermaterials* und der *Einfluss einer ternären Komponente*, sind bereits in der Literatur zu finden. Andere interessante Aspekte wurden erst im Rahmen der Arbeit gefunden – beispielsweise der Einfluss des *Kapselmaterials*.

Die Betrachtung der verschiedenen *Kapselmaterialien* ergibt, dass sich mit „inerten“ PE-Kapseln eine viel höhere Ausbringung erzielen lässt, als mit „klebrigen“ (adhäsiven) Gelatine-Kapseln. Ein Effekt der sich folglich auch auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils von Ipratropiumbromid auswirkt: je mehr Wirkstoff ausgebracht wird, desto mehr kann sich auch im Kaskadenimpaktor verteilen.

Als Hauptgründe für diesen, als statistisch signifikant ausgewiesenen Einflussfaktor lassen sich die unterschiedlichen Oberflächenstrukturen bzw. Materialeigenschaften der beiden verwendeten Kapselarten anführen (siehe Abb.4-3). REM-Aufnahmen ermöglichen die Differenzierung der verschiedenen Kapseloberflächen in „harte“ und „weiche“ Strukturen. Dabei zeichnen sich die „harten“ Oberflächen durch ein geringes Haftbestreben aus, während die „weichen“ Strukturen mit einer Vielzahl an Kontaktstellen ein eher ausgeprägtes Haftbestreben besitzen. Letztere reduzieren die Höhe der Ausbringung, da nachweislich mehr Material auf dieser durch Krater und Tröpfchen unebenen Oberfläche zurückbleibt, während auf der eher ebenen PE-Oberfläche deutlich weniger Material zurückbleibt (siehe Kapitel 7.1 und Abb.7-18).

Da die Ausprägung der Bindungskräfte auch von dem eingesetzten Wirkstoff abhängig ist, sind die hier vorliegenden Ergebnisse spezifisch für den verwendeten Wirkstoff Ipratropiumbromid. Um eine Aussage zur Allgemeingültigkeit dieser Einflussgröße zu machen, muss in weiteren Versuchen das Bindungsverhältnis zwischen verschiedenen Wirkstoffen und den beiden Kapselmaterialien ermittelt und mit der ausgebrachten Dosis bzw. der Verteilung im Kaskadenimpaktor in Beziehung gesetzt werden. Eine interessante Fragestellung, die beispielsweise mit Rasterkraftmikroskopie oder anderen adäquaten Methoden betrachtet werden kann.

Ein bereits aus der Literatur bekannter und in der vorliegenden Arbeit bestätigter Haupteinflussfaktor auf die Eigenschaften einer inhalativen Pulvermischung ist die Qualität des eingesetzten *Trägermaterials*. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit dem Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit bzw. der Partikelgrößenverteilung des Trägermaterials auf die vorliegenden Bindungsverhältnisse und der damit verknüpften Auswirkung auf die aerodynamischen Eigenschaften von Salbutamolsulfat [6-15]. Auch die Arbeit von Podzeck [33], die sich mit dem Bindungsverhalten von Salmeterol Xinafoate an Trägerpartikel mit unterschiedlicher Partikelgrößenverteilung beschäftigt, wird mit den innerhalb der Arbeit erzielten Ergebnissen bestätigt.

Es wird für den Wirkstoff Ipratropiumbromid nachgewiesen, dass die Ausbringung mit „feiner“ 200M Laktose und damit ebenso die Verteilung im ACI deutlicher gesteigert wird, als dies unter Verwendung von „grober“ 325M Laktose möglich ist (siehe Kapitel 6.1 und 6.2).

Diese Differenzierung zwischen den verschiedenen Trägerqualitäten ist primär auf die vorliegenden Unterschiede in Struktur, Form und Größe der Partikel zurückzuführen, was einen entscheidenden Einfluss auf die herrschenden Bindungskräfte und damit auf das Ausmaß der Wechselwirkungen hat (siehe Kapitel 7.2).

So sind bei „runden“ Teilchen (200M Laktose) die vorliegenden Adhäsions- und Reibungskräfte wesentlich geringer als bei „keilförmigen“ Partikeln (325M Laktose). Das erklärt, warum unabhängig vom Kapselmateriale die Formulierungen mit 200M Laktose im Vergleich zu den Formulierungen mit 325M Laktose immer höhere Ausbringungs-Ergebnisse liefern (siehe Kapitel 6.1). Für die annähernd „runden“ Partikel wird eine Abhängigkeit [104] zwischen Größe und Stärke der Adhäsionskräfte definiert ($r^2 \sim F_{\text{adhäsion}}$), die auf „keilförmige“ Partikel nicht übertragbar ist.

Weiterhin gilt, dass die partikelformabhängigen Effekte stark von der Oberflächenstruktur des entsprechenden Kapselmateriale beeinflusst werden (siehe Kapitel 7.1). Je nachdem ob die Partikel mit einer „harten“ oder „weichen“ Oberfläche in Kontakt treten, wird die Stärke der Adhäsions- und Reibungskräfte modifiziert. Folglich sind die Unterschiede zwischen den Trägerlaktosen in „inerten“ PE-Kapseln längst nicht so stark ausgeprägt wie bei den entsprechenden Formulierungen in adhäsiven Gelatine-Kapseln (siehe Kapitel 7.4.3).

Diese Ergebnisse zeigen die komplexen Strukturen innerhalb einer pulverförmigen Inhalationszubereitung auf und tragen wesentlich dazu bei, die in der Literatur vorhandenen Thesen um einen weiteren Aspekt zu erweitern: Es wird deutlich, dass es schwierig ist klar zwischen einem „reinen“ Effekt der einzelnen Komponenten und einem kombinierten Effekt zu unterscheiden.

Ein ebenfalls aus der Literatur schon bekannter Einflussfaktor auf die aerodynamischen Eigenschaften von inhalativen Pulvermischungen ist der *Zusatz einer ternären Komponente* – meist mikronisierte Laktose – zu einer bestehenden binären Träger-Wirkstoff Mischung. Die dazu vorliegenden Arbeiten [1;12;16;25-28;30-33] vertreten die Theorie, dass die zugefügte ternäre Komponente die aktiven Bindungsplätze der groben Laktose – so genannte „HOT-SPOTS“ - belegt und mit einem Schutzfilm überzieht. Dabei lagern sich die feinen Partikel in den Kavitäten des Trägers ab und belegen durch Autoadhäsion die Stellen mit höherer Adhäsionskraft, was die Bindungsverhältnisse zwischen Träger und Wirkstoff verändert und die Wirkstoff-Verteilung steigert. Diese Modifikation der Bindungsverhältnisse ist je nach Additivzusatz unterschiedlich stark ausgeprägt und unterliegt einer Sättigung, was sich durch gezielte Variation der Mischreihenfolge bei sonst identischer Zusammensetzung, sowie im direkten Vergleich mit binären Mischungen deutlich zeigen lässt.

Der Einfluss der Mischreihenfolge auf die Absättigung der „HOT-SPOTS“ und damit auf die Verteilung des Feinanteils ist bereits für Salbutamolsulfat aus der Literatur bekannt [1;21-27] und kann auch für die Formulierungen mit Ipratropiumbromid bestätigt werden. Stellt man eine Vormischung aus „grober“ und „feiner“ Laktose her und arbeitet den Wirkstoff nachträglich ein (Mischung B) wird die Verteilung im ACI im Vergleich zu einer binären Mischung aus grober Laktose und Wirkstoff merklich gesteigert.

Wird - wie bei Mischvariante C - die mikronisierte Laktose erst nachträglich zugefügt, wird die Bindung des Wirkstoffs an die starken Bindungsplätze gefördert. Der vorhandene Laktose-Feinanteil kann keinen ausreichenden Schutzfilm ausbilden, um den Wirkstoff zu verdrängen. Auch dies spiegelt sich sehr deutlich in den Ergebnissen wieder. Die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils entspricht annähernd den Werten einer binären Mischung. Es ist kein „Umhüllungs-Effekt“ nachzuweisen. Diese Beobachtung lässt die Allgemeingültigkeit des Coating-Effekts vermuten.

Die Theorie der Sättigung dagegen ist ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit und leitet sich aus den signifikanten Unterschieden der beiden Trägermaterialien ab. In Kombination mit der „feinen“ 200M Laktose stellt sich ein Maximum an Wirkstoff-Verteilung ein, die auch durch weiteren Additiv-Zusatz nicht mehr gesteigert werden kann (keine Differenzierungen zwischen den Ergebnissen mit 2,5 % und 5% Feinanteil möglich). In Kombination mit der „groben“ 325M Laktose dagegen, ist ein ausgeprägter Umhüllungs-Effekt der ternären Komponente sichtbar. Es kann deutlich zwischen den beiden ternären Mischungen mit 2,5% und 5% Additiv differenziert werden (siehe Kapitel 6.2). Dass diese Effekte des Feinanteils im „inerten“ Kapselmaterial stärker ausgeprägt sind als in den „klebrigen“ Gelatine-Kapseln zeigt erneut, wie durch die komplexe Zusammensetzung des inhalativen Systems die Effekte der einzelnen Komponenten von anderen Einflussgrößen überdeckt und abgeschwächt werden.

Neben dem bereits beschriebenen „Schutzfilm“ wird in der Literatur auch die Bildung von so genannten „Multiplets“ diskutiert [16,32-33], welche ebenfalls die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils fördern. Ein direkter Vergleich der aerodynamischen Eigenschaften von ternären Mischungen und reinem Ipratropiumbromid Mikronisat, sowie die Korrelation der Laktose-Verteilung und der Ipratropiumbromid-Verteilung im Kaskadenimpaktor verdeutlichen dies (siehe Kapitel 7.4). So werden durch die „groben“ Trägerpartikel vorliegende Wirkstoffagglomerate zerstört, was eine gesteigerte Wirkstoffverteilung im ACI zur Folge hat. Dabei bleiben die „feinsten“ Teilchen entweder bevorzugt am Carrier haften oder verändern durch „Multiplet-Bildung“ ihre scheinbare Größe, wodurch sich die Verteilung des Wirkstoffs in den oberen / mittleren Bereich des ACI verschiebt. Auch das Vorliegen einer positiven Korrelation zwischen Laktose-Feinanteil und dem entsprechenden Ipratropiumbromid-Feinanteil zeigt, dass die Steigerung der inhalierbaren Wirkstoffanteile nachweislich von zwei Effekten der mikronisierten Laktose beeinflusst wird: Belegung der HOT-SPOTS („Schutzfilm“) und Ausbildung von „Multiplets“. Wäre das zugefügte Additiv einzig an der Ausbildung eines Schutzfilms beteiligt, würde der Laktose-Feinanteil gebunden an den Carrier im Präseparator zurückbleiben und sich nicht zusammen mit dem Wirkstoff im Kaskadenimpaktor verteilen. Mit REM-Aufnahmen lassen sich diese beiden Phänomene anschaulich darstellen (siehe Abb.7-30).

Ein weiterer Hinweis auf die komplexen Strukturen innerhalb des inhalativen Systems ist die Beobachtung eines kapselmaterialabhängigen Effekts des Feinanteils auf die Höhe der ausgebrachten Dosis, der als „Auspuedereffekt“ bezeichnet und der Literatur nicht erwähnt wird. Dieser Effekt tritt nur auf „weichen“ Oberflächen in Kombination mit „runden“ Trägerteilchen auf und führt dazu, dass ein Anhaften der „groben“ Trägerpartikel unterbunden damit die Ausbringung verstärkt wird. Es ist also mit adhäsiven Gelatine-Kapseln ein Anstieg der ausgebrachten Dosis durch steigenden Additiv-zusatz zu erkennen.

Dieses Zusammenspiel von Partikelform und Kapseloberfläche erklärt den kapselmaterialabhängigen Effekt des Feinanteils und lässt sich eindeutig definieren: Mit der „weichen“ Gelatine-Kapsel bei annähernd „runden und feinen“ Trägerpartikeln ergibt sich eine Steigerung der ausgebrachten Dosis. In diesem Fall ist die Ausbildung eines „stabilen“ Schutzfilms durch den Feinanteil gegeben und die Ausbringung von „grober“ Laktose und Wirkstoff wird gefördert (siehe Abb.7-15). Bei „grogen und keilförmigen“ Partikeln fehlt diese positive Korrelation (siehe Kapitel 6.1). Hier reichen zum einen die „feinen“ Bestandteile nicht aus, um einen stabilen „Schutzfilm“ zu erzielen. Zum anderen sind die Haftkräfte der „grogen“ Partikel durch eine vergrößerte Kontaktfläche gesteigert (siehe Kapitel 7.2), was ein Ablösen der Trägerpartikel von der Oberfläche erschwert. Diese Thesen werden durch die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung des Kapselrestes bestätigt und durch lichtmikroskopische Aufnahmen der Kapselinnenseiten anschaulich dargestellt (siehe Kapitel 7.3; Abb.7-15 / 7.18).

Die mechanische Belastung eines inhalativen Systems zeigt einen weiteren kapselmaterialabhängigen Effekt, der die Einflussgröße des Kapselmaterials belegt. Lässt man die elektrostatische Aufladung der PE-Kapseln und den damit verbundenen Anstieg des Kapselrestes außer Acht – ein Effekt der durch das lange Rotieren der nichtleitenden Kunststoff-Kapsel im HandiHaler® auftritt - ist kein erkennbarer Einfluss zu verzeichnen. Erst mit den „klebrigen“ Gelatine-Kapseln ergeben sich ein ausgeprägter Rückgang des inhalierbaren Anteils und ein deutlicher Anstieg des Kapselrests, wodurch alle Effekte durch andere Einflussfaktoren wie Trägermaterial und zugesetzter Feinanteil überdeckt werden.

Wie die vorliegende Arbeit beweist, müssen die pulverförmigen Inhalationszubereitungen als komplexes System aus mehreren Komponenten betrachtet werden, die sowohl unabhängig voneinander als auch in Kombination einen entscheidenden Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften der Pulvermischung haben. Am offensichtlichsten wird diese Zusammenspiel der verschiedenen Einflussfaktoren in der Kombination „grobe“ Trägerlaktose und „klebriges“ Kapselmaterial. Hier kommen weder der in der PE-Kapsel deutlich zu sehende „Coating-Effekt“ noch der für Gelatine-Kapseln beschriebene „Auspudereffekt“ eindeutig zur Geltung.

Zusammengefasst lassen sich die in der Literatur aufgestellten Thesen bezüglich der Einflussfaktoren Trägermaterial und zugesetzter Feinanteil, welche für die Wirkstoffe Salbutamolsulfat und Salmeterol definiert wurden auch für den Wirkstoff Ipratropiumbromid festhalten und anschaulich belegen. Damit ist eine Allgemeingültigkeit der Aussagen bezüglich HOT-SPOTS und Multiplets wahrscheinlich.

Dagegen sind sowohl der Einfluss des Kapselmaterials als auch das komplexe Zusammenspiel aller Faktoren kaum in der Literatur beschrieben, womit die Arbeitsergebnisse primär wirkstoffbezogen sind und der Nachweis einer Allgemeingültigkeit noch zu erbringen ist.

9 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit relevanten Einflussfaktoren auf die aerodynamischen Eigenschaften von Pulvermischungen, sowie mit einer detaillierten Charakterisierung dieser Faktoren.

Um eine direkte Beziehung zwischen den Pulverkomponenten einer inhalativen Formulierung abzuleiten, werden geeignete analytische Verfahren entwickelt und validiert, die es erstmals ermöglichen aus einer Probenaufarbeitung sowohl den Wirkstoff als auch das Trägermaterial quantitativ zu erfassen. Dies trägt entscheidend zum besseren Verständnis der vorliegenden Wechselwirkungen innerhalb des inhalativen Systems bei.

Die Analyse der Einflussfaktoren *Kapselmaterial*, *Trägerlaktose*, *Feinanteil*, *Mischreihenfolge* und *mechanische Belastung* ergibt verschiedene Haupteinflussfaktoren und kombinierte Wechselwirkungen, die einen deutlichen Effekt auf die aerodynamischen Eigenschaften ausüben (siehe Abb.9-1). Zur Charakterisierung dieser Eigenschaften dienen die arzneibuchüblichen Verfahren, bezogen auf die Höhe der ausgebrachten Dosis und die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils. Die ermittelten Resultate werden mittels Varianzanalyse auf statistische Signifikanz getestet.

Sowohl das *Kapselmaterial* als auch die *Trägerlaktose* konnten als primäre Einflussfaktoren auf die Höhe der Ausbringung identifiziert werden. Ein Effekt, der sich eindeutig und statistisch signifikant auf die Höhe der Verteilung im ACI auswirkt: So lassen sich mit „inerten“ PE-Kapseln deutlich höhere Ausbringungs-Resultate erzielen als mit „adhäsiven“ Gelatine-Kapseln, während „feines“ Trägermaterial die Ausbringung stärker fördert, als dies mit „grobem“ Trägermaterial möglich ist.

Der zu einer binären Mischung zusätzlich zugefügte *Feinanteil an Trägermaterial (ternäre Mischung)* wirkt sich verschiedenartig auf die aerodynamischen Eigenschaften aus und stellt damit ebenfalls eine relevante und nicht zu vernachlässigende Einflussgröße dar. Neben einem ausgeprägten kapselmaterialabhängigen Effekt auf die Höhe der ausgebrachten Dosis liegt im Vergleich zur binären Mischung zusätzlich eine erhebliche Steigerung in der Verteilung des aerodynamischen Feinanteils vor, die, je nach Additivzusatz unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Dieser „*Umhüllungs-Effekt*“ unterliegt, wie in der Arbeit gezeigt wurde, einer Sättigung und zeigt sich unabhängig vom verwendeten Kapselmaterial.

Weiterhin kann in Abhängigkeit des zugesetzten *Feinanteils an Trägermaterial* ein deutlicher Einfluss der *Mischreihenfolge* auf die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils aufgezeigt werden.

Als stark kapselmaterialabhängige Einflussgröße erweist sich die *mechanische Belastung*. Sieht man von einem stark zunehmenden Kapselrest durch elektrostatische Aufladung des Kapselmaterials ab, ist in PE-Kapseln kein erkennbarer Einfluss zu verzeichnen. Allein mit Gelatine-Kapseln ergibt sich ein ausgeprägter, von der Belastungsdauer unabhängiger, Rückgang des inhalierbaren Anteils.

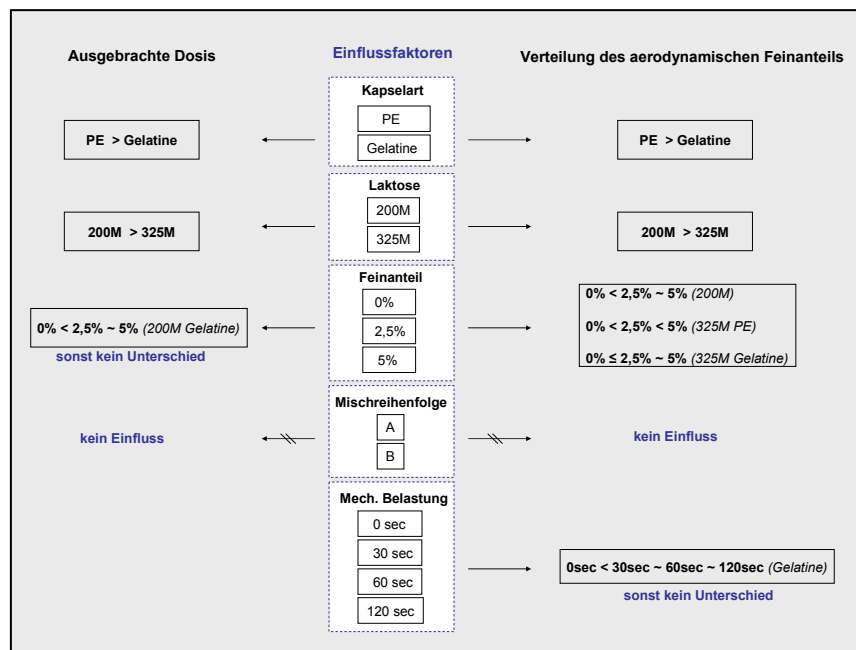


Abb.9-1 Einflussfaktoren auf die aerodynamischen Eigenschaften von Pulvermischungen (charakterisiert nach ausgebrachter Dosis und Verteilung des aerodynamischen Feinanteils) – Ergebnisübersicht für Ipratropiumbromid und Laktose

Durch die direkte Korrelation der Ausgebrachten Dosis von Laktose und Ipratropiumbromid zeigt sich in Abhängigkeit vom *Kapselmateriale* und der *Trägerlaktose* ein parallel verlaufender Anstieg der Ergebnisse. Diese Beobachtung wird im direkten Vergleich der inhalierbaren Feinanteile bestätigt. Weiterhin wird eine positive Korrelation der Resultate mit zunehmendem *Anteil feiner Laktose* ersichtlich. So ist mit dem Anstieg des inhalierbaren Laktoseanteils auch eine statistisch signifikante Steigerung der inhalierbaren Wirkstoffanteile erkennbar.

Die anschließende Evaluierung und Quantifizierung der Faktoren basiert auf einer ausführlichen Betrachtung der Partikelmorphologie sowie der Oberflächenstruktur von Kapseln. Die hier vorliegenden Unterschiede bezüglich Struktur, Form und Größe haben einen entscheidenden Einfluss auf die herrschenden Bindungskräfte und beeinflussen Stärke und Ausmaß der Wechselwirkungen.

REM-Aufnahmen ermöglichen eine Unterscheidung der Kapseloberflächen in „harte“ und „weiche“ Strukturen. Dabei zeichnen sich die „harten“ Oberflächen durch ein geringes Haftbestreben aus, während die „weichen“ Strukturen ein eher ausgeprägtes Haftbestreben besitzen.

Für die Partikel wird eine Abhängigkeit zwischen Größe und Stärke der Adhäsionskräfte definiert ($r^2 \sim F_{\text{adhäsion}}$). Eine Regel, die nur für annähernd „runde“ Teilchen gilt und auf „keilförmige“ Partikel nicht übertragbar ist.

Zusätzlich zu diesen theoretischen Überlegungen wird mit dem Verfahren der Rasterkraftmikroskopie im Rahmen der Arbeit neben einer genauen Charakterisierung auch eine Quantifizierung der Kräfte erzielt und ein direkter Kräftevergleich zwischen den Komponenten möglich.

Partikel - Partikel - Wechselwirkungen

Zu den interpartikulären Wechselwirkungen gehört die Trägerfunktion der „groben“ Laktose, um auf diese Weise sowohl die Wirkstoffausbringung wie auch die Verteilung im Kaskadenimpaktor zu fördern. Ein direkter Vergleich der aerodynamischen Eigenschaften von ternären Mischungen und reinem Mikronisat verdeutlicht dies. So werden durch die Trägerpartikel vorliegende Wirkstoffagglomerate zerstört, was eine gesteigerte Wirkstoffverteilung im ACI zur Folge hat. Da allerdings die „feinsten“ Teilchen bevorzugt am Carrier haften und sich durch „*Multiplet-Bildung*“ die scheinbare Größe der „freien“ Wirkstoffpartikel vergrößert, verlagert sich die Partikelgrößenverteilung des Wirkstoffs in den oberen / mittleren Bereich des ACI.

Auch der „*Umhüllungs-Effekt*“ des Feinanteils beruht auf einer Partikel-Partikel-Wechselwirkung. Wie sich durch gezielte Variation der Mischreihenfolge bei sonst identischer Zusammensetzung, sowie im direkten Vergleich mit binären Mischungen deutlich zeigt, wird durch den Additivzusatz die Wirkstoffverteilung wesentlich gesteigert. Dem Feinanteil kommt hierbei die primäre Aufgabe zu, einen Schutzfilm um die groben Trägerpartikel zu bilden, wodurch sich die Bindungsverhältnisse zwischen Träger und Wirkstoff verändern. Diese Modifikation ist je nach Additivzusatz unterschiedlich stark ausgeprägt und unterliegt einer Sättigung. Zusätzlich zum beschriebenen „*Schutzfilm*“ bildet der Feinanteil mit den Wirkstoffpartikeln so genannte „*Multiplets*“, die ebenfalls die Verteilung des aerodynamischen Feinanteils fördern. Beide Phänomene lassen sich mit REM-Aufnahmen anschaulich darstellen und bekräftigen die in der Arbeit aufgestellten Korrelationen.

Partikel - Kapsel - Wechselwirkungen

Bei diesen Wechselwirkungen kombinieren sich die Oberflächeneffekte der Kapseln mit der partikelgrößenabhängigen Ausbildung von Adhäsionskräften. Dies führt in der ausgebrachten Pulvermischung zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Mindergehalt an Wirkstoff („*Abreicherung*“). Je nach verwendetem Kapselmaterial bleiben die feinsten „runden“ Wirkstoffpartikel bevorzugt auf der Kapseloberfläche haften. Neben dieser Wirkstoff-Kapsel-Wechselwirkung liegt weiterhin eine Träger-Kapsel-Wechselwirkung vor, die entscheidend an den Ergebnissen der ausgebrachten Dosis beteiligt ist. So ist durch den zusätzlichen Laktose-Feinanteil die Ausbildung eines Schutzfilms auf der Kapselinnenseite zu beobachten („*Auspudereffekt*“). Dieser Effekt tritt nur auf „weichen“ Oberflächen und in Kombination mit „runden“ Trägerteilchen auf. Dies führt dazu, dass ein Anhaften der groben Trägerpartikel unterbunden damit die Ausbringung verstärkt wird. Belegt werden diese Thesen, durch die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung des Kapselrestes. Auch das provozierte Anhaften der Partikel durch mechanische Belastung wird auf diese Weise evaluiert und bestätigt. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Kapselinnenseiten helfen, die Messdaten optisch darzustellen.

Die durch die Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen wesentlich zum besseren Verständnis des komplexen Systems aus Pulvermischung und Kapsel bei. Alle aufgezeigten Methoden zur Charakterisierung von Wechselwirkungen können künftig bereits im Rahmen der Entwicklung von Inhalationspulvern entscheidend dazu beitragen, die aerodynamischen Eigenschaften der Systeme besser zu verstehen und zu optimieren.

10 Literaturverzeichnis

- [1] Steckel, H. (2002): „Inhalationspulver – neue Entwicklung bei Pulverinhalatoren“ / *PZ Prisma 10 (3): S. 145 – 157*
 - [2] Abt, C. (2001): „Baldiges Aus für die FCKW-haltigen Dosieraerosole“ / *Schweizerische Ärztezeitung 82 Nr. 22: S. 1137 – 1139*
 - [3] Grützmann, R., Schmidt, P.C. (2004): „Pulverinhalatoren und Dosieraerosole richtig anwenden“ / www.pharmazeutische-zeitung.de/pza/2004-24/titel.htm
 - [4] Arnold, K., Grass, P., Knecht, A., Roos, R., Sluke, G., Thieme, H., Wenzel, J.: „Inhalationspulver und Verfahren zu ihrer Herstellung“ / *Internationale Veröffentlichung WO93/11746*
 - [5] Dickhoff, B.H.J., de Boer, A.H., Lambregts, D., Frijlink, H.W. (2003): „The effect of carrier surface and bulk properties on drug particle detachment from crystalline lactose carrier particles during inhalation as a function of carrier payload and mixing time“ / *Eur. J Pharm Biopharm 56: S. 291 - 302*
 - [6] Podczek, F. (1997): „The relationship between particulate properties of carrier materials and the adhesion force of drug particles in interactive powder mixtures“ / *J Adhesion Sci Technol 11(8): S. 1089 - 1104*
 - [7] Tee, S.K., Marriott, C., Zeng, X.M., Martin, G.P. (2000): „The use of different sugars as coarse and fine carriers for aerosolised salbutamol sulphate“ / *Int J Pharm 208: S. 111 - 123*
 - [8] Steckel, H., Bolzen, N. (2004): „Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations“ / *Int J Pharm 270: S. 297 - 306*
 - [9] Villax, P. (2004): „Selecting Lactose for a Capsule Based Dry Powder Inhaler“ / *Pharmaceutical Technology Europe (April): S. 23 – 35*
 - [10] Flament, M.P., Leterme, P., Gayot, A. (2004): „The influence of carrier roughness on adhesion, content uniformity and the in vitro deposition of terbutaline sulphate from dry powder inhalers“ / *Int J Pharm 275: S. 201 - 209*
 - [11] Kawashima, Y., Serigano, T., Hino, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H. (1998): „Effect of surface morphology of carrier lactose on dry powder inhalation property of pranlukast hydrate“ / *Int J Pharm 172: S. 179 - 188*
 - [12] Zeng, X.M., Martin, G.P., Marriott, C., Pritchard, J. (2001): „Lactose as a Carrier in Dry Powder Formulations: The Influence of Surface Characteristics on Drug Delivery“ / *J Pharm Sci 90 (9): S. 1424 - 1434*
-

-
- [13] Podczeczek, F. (1998): „Adhesion forces in interactive powder mixtures of a micronized drug and carrier particles of various particle size distributions” / *J Adhes Sci Technol* 12 (12): S. 1323 – 1339
- [14] Heng, P., Chan, L.W., Lim, L.T. (2000): „Quantification of the Surface Morphologies of Lactose Carriers and their Effect on the in vitro Deposition of Salbutamol Sulphate” / *Chem Pharm Bull* 48 (3): S. 393 – 398
- [15] Zeng, X.M., Martin, G.P., Marriott, C., Pritchard, J. (2000): „The influence of carrier morphology on drug delivery by dry powder inhalers” / *Int J Pharm* 200: S. 93 - 106
- [16] Zeng, X.M., Martin, G.P., Tee, S.K., Marriott C. (1998): „The role of fine particle lactose on the dispersion and deaggregation of salbutamol sulphate in air stream in vitro” / *Int J Pharm* 176: S. 99 - 110
- [17] Zeng, X.M., Martin, G.P., Marriott, C., Pritchard, J. (2000): „The Effect of Carrier Size and Morphology on the Dispersion of Salbutamol Sulphate after Aerosolization at Different Flow Rates” / *J Pharm Pharmacol* 52: S. 1211 - 1221
- [18] Kassem, N.M., Ganderton, D. (1990): „The influence of carrier surface on the characteristics of inspirable powder aerosols” / *J Pharm Pharmacol* 42: 11P
- [19] Podczeczek, F. (1999): „The Influence of Particle Size Distribution and Surface Roughness of Carrier Particles on the in vitro Properties of Dry Powder Inhalations” / *Aerosol Sci Technol* 31: S. 301 - 321
- [20] Chan, L.W., Lim, L.T., Heng, P.W.S. (2003): „Immobilization of Fine Particles on Lactose Carrier by Precision Coating and its Effect on the Performance of Dry Powder Formulations” / *J Pharm Sci* 92 (5): S. 975 - 984
- [21] Kulvanich, P., Stewart, P.J. (1987): „The effect of particle size and concentration on the adhesive characteristics of a model drug-carrier interactive system” / *J Pharm Pharmacol* 39: S. 673 - 678
- [22] French, D.L., Edwards, D.A., Niven, R.W. (1996): „The influence of formulation on emission, deaggregation and deposition of dry powders for inhalation” / *J Aerosol Sci* 27 (5): S. 769 - 783
- [23] deBoer, A.H., Hagedorn, P., Gjaltema, D., Goede, J., Kussendrager, K.D., Frijlink, H.W. (2003): „Air classifier technology (ACT) in dry powder inhalation Part 2. The effect of lactose carrier surface properties on drug-to-carrier interaction in adhesive mixtures for inhalation” / *Int J Pharm* 260: S. 201 - 216
- [24] Staniforth, J.N., Rees, J.E., Lai, F.K., Hersey, J.A. (1982): „Interparticle forces in binary and ternary ordered powder mixes” / *J Pharm Pharm* 34: S. 141 - 145
- [25] Zeng, X.M., Martin, G.P., Marriott, C. Tee, S.K. (1999): „Effects of particle size and adding sequence of fine lactose on the deposition of salbutamol sulphate from dry powder formulation” / *Int J Pharm* 182: S. 133 - 144
- [26] Steckel, H., Müller, B.W. (1997): „In vitro evaluation of dry powder inhalers II: influence of carrier particle size and concentration on in vitro deposition” / *Int J Pharm* 154: S. 31 – 47
-

-
- [27] Staniforth, J.N.: „Carrier particles for use in dry powder inhalers“ / *United States Patent 6,153,224*
- [28] Zeng, X.M., Martin, G.P., Marriott, C., Pritchard, J. (2001): „The use of lactose recrystallised from carbopol gels as a carrier for aerosolised salbutamol sulphate“ / *Eur J Pharm Biopharm 51: S. 55 – 62*
- [29] Lucas, P., Anderson, K., Potter, U. J., Staniforth, J.N. (1999): „Enhancement of Small Particle Size Dry Powder Aerosol Formulations using an Ultra Low Density Additive“ / *Pharm Research 16 (10): S. 1643 - 1647*
- [30] Steckel, H., Markefka, P., te Wierik, H., Kammelar, R. (2004): „Functionality testing of inhalation grade lactose“ / *Eur J Pharm Biopharm 57: S. 495 - 505*
- [31] Steckel, H. (2002): „Inhalations powders – a simple dosage form for pulmonary delivery?“ / *Swiss Pharma 24 (9a): S. 15 - 28*
- [32] Lucas, P., Anderson, K., Staniforth, J.N. (1998): „Protein Deposition from Dry Powder Inhalers: Fine Particle Multiplets as Performance Modifiers“ / *Pharm Research 15 (4): S. 562 - 569*
- [33] Podczeczek, F. (1998): „The relationship between physical properties of lactose monohydrate and the aerodynamic behaviour of adhered drug particles“ / *Int J Pharm 160: S. 119 - 130*
- [34] Dickhoff, B.H.J., deBoer, A.H., Lambregts, D., Frijlink, H.W. (2005): „The interaction between carrier rugosity, carrier payload and its effect on drug particle redispersion from adhesive mixtures during inhalation“ / *Eur J Pharm Biopharm 59: S. 197 – 205*
- [35] Podczeczek, F. (1997): „Optimization of the operation conditions of an Anderson-Cascade impactor and the relationship to centrifugal adhesion measurements to aid the development of dry powder inhalations“ / *Int J Pharm 149: S. 51 - 61*
- [36] Podczeczek, F., Newton, M. J. (1995): „Development of an Ultracentrifuge Technique to Determine the Adhesion and Friction Properties between Particles and Surfaces“ / *J Pharm Sciences 84 (9): S. 1067 - 1071*
- [37] Bérard, V., Lesniewski, E., Andrès, C., Pertuy, D., Laroche, C., Pourcelot, Y. (2002): „Affinity scale between a carrier and a drug in DPI studied by Atomic force microscopy“ / *Int J Pharm 247: S. 127 - 137*
- [38] Roberts, C.J. (2005): „What can we learn from atomic force microscopy adhesion measurements with single drug particles?“ / *Eur J Pharm Sci 24: S. 153 – 157*
- [39] Eve, J.K., Patel, N., Luk, S.Y., Ebbens, S.J., Roberts, C.J. (2002): „A study of single drug particle adhesion interactions using atomic force microscopy“ / *Int J Pharm 238: S. 17 - 27*
- [40] Louey, M.D., Stewart, P.J. (2002): „Particle Interactions Involved in Aerosol Dispersion of Ternary Interactive Mixtures“ / *Pharm Research 19(10): S. 1524 - 1531*
- [41] Srichana, T., Martin, G.P., Marriott, C. (1998): „On the relationship between drug and carrier deposition from dry powder inhalers in vitro“ / *Int J Pharm 167: S. 13 - 23*
-

-
- [42] Willing, G.A., Burk, T.R., Etzler, F.M., Neuman, R.D. (2001): „Adhesion of pharmaceutical particles to gelatine capsules having variable surface physicochemical properties: evaluation using a combination of scanning probe microscopy technique“ / *Colloid and Surfaces (A)* 193: S. 117 – 127
- [43] Willing G.A., Etzler, F.M., Ibrahim, T.H., Neuman, R.D. (2000): „New Approach to the Study of Particle-Surface Adhesion Using Atomic Force Microscopy“ / *J Colloid Interface Science* 226: S. 185 – 188
- [44] Ibrahim, T.H., Burk, T.R., Etzler, F.M., Neuman, R.D. (2000): „Direct adhesion measurements of pharmaceutical particles to gelatine capsule surfaces“ / *J Adhesion Sci Technol* 14 (10): S. 1225 - 1242
- [45] European Pharmacopoea 5.0 2005 (online): Preparations for inhalation / S. 618 - 622
- [46] USP 2005 Inc. Official 1/1/2005 – 3/31/2005 (online): General Chapter <601> Aerosols, nasal sprays, metered-dose inhalers and dry powder inhalers / www.uspnf.com
- [47] Prüfungsvorschrift zur Bestimmung der ausgebrachten Dosis nach Ph.Eur. / USP / *BI internes Dokument*
- [48] European Pharmacopoea 5.0 2005 (online): Preparations for Inhalation: aerodynamic assessment of fine particle / S. 244 – 253
- [49] Interne Prüfungsvorschrift zur Verteilung des aerodynamischen Feinanteils nach Ph.Eur. / USP / *BI internes Dokument*
- [50] Thermo Andersen Operator Manual - 1 ACFM non-viable sampler series 20-800
- [51] Bayerisches Landesamt für Umweltschutz / TÜV Süddeutschland – Grundsatzuntersuchung Korngrößenverteilung Projekt I
www.bayern.de/lfu/luft/veroeffentlich/umweltforsch/tuev_feinstaub/abschlussbericht_proj1
- [52] deBoer, A.H., Gjaltema, D., Hagedoorn, P., Frijlink, H.W. (2002): „Charaterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor anaylsis and laser diffraction technique“ / *Int J Pharm* 249: S. 219 – 231
- [53] Ebert, H. (1978): „Physikalisches Taschenbuch“ / *Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH; 5. Auflage*
- [54] Bohl, W. (2002): „Technische Strömungslehre“ / *Vogel Fachbuch Kamprath Reihe; 12. Auflage*
- [55] Müller, R. (1996): „Teilchengrößenverteilung in der Laborpraxis“ / *WVGmbH Stuttgart*
- [56] Handbuch zur Entwicklung, Optimierung, Validierung und Spezifikationsfindung von Teilchengrößenmessmethoden mit Hilfe der Laser-Streulichtanalyse / *BI internes Dokument*
- [57] Malguth, E. (2002): „Versuchsprotokoll zur Rasterelektronenmikroskopie“ / *Institut für Physik TU Berlin* (www.gifp.physik.tu-berlin.de)
-

-
- [58] Flegler, S., Heckman, J., Klomparens, K. (1995): „Elektronenmikroskopie - Grundlagen, Methoden, Anwendungen“ / *Spektrum Akademischer Verlag*
- [59] Goldstein I.G., Newbury D., Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L & Michael J (2003): „Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis“ / *Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York Boston, Dordrecht, London, Moscow*
- [60] Streicher, P., Selhuber, C. (2002): „Rasterelektronenmikroskopie - Biophysikalisches Praktikum im Physikalisch-Chemischen Institut Heidelberg“
- [61] www.3sat.de „Der Physiker Gerd Bining – Ein Porträt des Nobelpreisträgers“
- [62] Döring, A. (2001): Dissertation an der Universität Ulm zum Thema „Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an Haftklebstoffen“
- [63] Briegner, S., Rill, M.S. (2003): „Rasterkraftmikroskopie (AFM) - Fortgeschrittenen Praktikum der Physik Universität Ulm“
- [64] Sarid, D. (1991): „Review of Scanning Force Microscopy“ / *Journal of Vacuum Science & Technology B (V9): S. 431*
- [65] Hafner, T. (2003): „AFM – Atomic Force Microscopy“ - Vortrag im Rahmen des physikalisch-chemischen Fortgeschrittenen Praktikum der Universität Heidelberg
- [66] Messerschmidt, C. (1999): Dissertation an der TU Berlin zum Thema „Meso- und Nanostrukturierung von Oberflächen mit supramolekularen Aggregaten und deren Charakterisierung mit dem Rasterkraftmikroskop“ / *Kapitel 2 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie*
- [67] Hinterdorfer, P. (2003): „Die Grundlagen der Atomkraftmikroskopie“ – Praktikumsskript zur Charakterisierung von Bio-Nanostrukturen / *Institut für Biophysik der Universität Linz*
- [68] Allen, M. (April 2004): „Nano scale Interfacial force measurements: comparative electrostatics and adhesion between BI Drug particle surfaces vs. capsule and vs. Lactose powder surface“ / *interner Bericht Biometrology Contract Analytical Services*
- [69] Voigt, R. (2000): „Pharmazeutische Technologie“ / *Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; 9. Auflage: S. 8 – 10 (Kapitel 1.3. Mischen)*
- [70] Bauer, K.H., Frömmling, K.H., Führer, C. (2002): „Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie“ / *WVGmbH Stuttgart; 7. Auflage: S. 133 – 138 (Kapitel 3.1. Mischen)*
- [71] Yeung, C.C., Hersey, J.A. (1979): „Ordered Powder mixing of coarse and fine particulate systems“ / *Powder Technology 22: S. 127 - 131*
- [72] Yip, C.W., Hersey, J.A. (1977): „Perfect powder mixtures“ / *Powder Technology 16: S. 189 - 192*
- [73] European Pharmacopoea 5.0 2005 (online): Monographie Ipratropiumbromid / *S. 1831*
-

-
- [74] Mutschler, E. (1997): „Arzneimittelwechselwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie“ / *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*; 7. Auflage, korrigierter Nachdruck: S. 305 – 307 und 615
- [75] European Pharmacopoea 5.0 2005 (online): Monographie Lactose Monohydrat / S.1887
- [76] Lerk, C.F. (1987): „Physikalisch-pharmazeutische Eigenschaften von Lactose“ / *Pharmazie Unserer Zeit* 16 (2): S. 39 - 46
- [77] Turbula® System Schatz Informationsbroschüre; WAB AG Maschinenfabrik Basel
- [78] Allen, M. (Juli 2005): „Nano scale Interfacial force measurements: comparative electrostatics and adhesion between Lactose probe (Lac5) vs. Ipratropiumbromid (Drug) and Lactose (Lac200)“ / *interner Bericht Biometrology Contract Analytical Services*
- [79] Koimur, M., Lu, B., Westerlund, D. (1996): „High performance liquid chromatography of disaccharides on a porous graphitic carbon column applying post-column derivatization with benzamide“ / *Chromatographia* 43 (5/6): S. 254 – 260
- [80] Gaby Aced, G., Möckel, H.J. (1991): „Liquidchromatographie – apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC“ / *VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim*: S. 119 – 121
- [81] Applications specific columns: Carbohydrates / *Thermo Hypersil Keystone catalogue 2002*: S. 90 – 92
- [82] Interne Arbeitsanweisung (2003): „Validierung von analytischen Verfahren“
- [83] ICH Guideline Q2B (1997): „Validation of Analytical Procedures: Methodology“ / *International Conference of Harmonization, Fed.Reg. (62 Fr 27463)*
- [84] Green, J.M. (1996): „A Practical Guide to Analytical Method Validation“ / *Analytical Chemistry* 1996 (68): S. 305A – 309A
- [85] Kirchhoff, C. (2002). Dissertation an der Universität Würzburg zum Thema „HPLC-Methodenentwicklung und Validierung im Bereich der Stabilitätsanalytik“
- [86] Zischka, M. (2003): „Grundlagen der Chemometrie und Qualitätssicherung“ / Praktikumsskript Institut für analytische Chemie, Mikro- und Radiochemie der TU Graz
- [87] Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. (2001): „Instrumentelle pharmazeutische Analytik“ / *WVGmbH Stuttgart*, 3. Auflage: S. 416 – 492
- [88] Weyers, W.M. (2003): „Validierung chemisch-physikalischer Analysenmethoden im Pharmabereich“ / *Swiss Pharma* 25 (4): S. 5 - 7
- [89] ELSD 2000 Informationsbroschüre #437A; Alltech Alltech Associates, Inc.
- [90] Dreux, M., Lafosse, M., Morin-Allory, L. (1996): „What is light scattering detection?“ *Societe D´etudes, de developpement et de realisations (SEDERE)* / *Reprint from LC/GC International; Reprint publication number 0232*
-

-
- [91] SAS[®] System (Version 8.2.) - SAS Institute Inc. Cary, North Carolina / USA
- [92] Dufner, J., Jensen, U., Schumacher, E. (1992): „Statistik mit SAS“ / *B.G. Teubner Stuttgart, 1. Auflage (Teubner Studienbücher)*
- [93] Little, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.S., Wolfinger, R.S. (1996): „SAS System for Mixed Models“; SAS Institute Inc., Cary, North Carolina / USA
- [94] Sachs, L. (2003): „Angewandte Statistik“ / *Springer Verlag Berlin Heidelberg, 11. überarbeitete und aktualisierte Auflage*
- [95] Kubiak, R. (Oktober 2004): „Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter Ausgebrachte Dosis“ / *interner Bericht zur statistischen Auswertung*
- [96] Kubiak, R. (April 2005): „Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter Ausgebrachte Laktose-Dosis“ / *interner Bericht zur statistischen Auswertung*
- [97] Kubiak, R. (Januar 2005): „Einfluss verschiedener Faktoren auf den Parameter aerodynamische Partikelgrößenverteilung“ / *interner Bericht zur statistischen Auswertung*
- [98] Kubiak, R. (Juni 2005): „Einfluss verschiedener Faktoren auf die Teilchengrößenverteilung der Laktose“ / *interner Bericht zur statistischen Auswertung*
- [99] Kubiak, R. (Januar 2005): „Rütteltest - Einfluss von mechanischem Stress auf den Parameter aerodynamische Partikelgrößenverteilung“ / *interner Bericht zur statistischen Auswertung*
- [100] Maestro (Version 7.1) und MacroModell (Version 9.0) zur Darstellung der Moleküle und Berechnung von Konformation bzw. Partialladung – Fa. Schroedinger, Portland, OR, USA
- [101] Cambridge Structural Database (Version 5.26)
- [102] Luttgens, G., Boschung, P. (1980): „Elektrostatische Aufladung“ / *Kontakt & Studium Band 4; expert-Verlag Grafenau*
- [103] Dickhoff, B.H.J., Ellison, M.J.H., deBoer, A.H., Frijlink, H.W. (2002): „The effect of budesonide particle mass on drug particle detachment from carrier crystals in adhesive mixtures during inhalation“ / *Eur. J Pharm Biopharm 54: S. 245 - 248*
- [104] Podzeck, F. (1997): „Pulveraersole zur Inhalation“ / *DAZ 137. Nr.42: S.3711 – 3717*
- [105] Kubiak, R. (November 2004): „Einfluss verschiedener Faktoren auf die Teilchengrößenverteilung des Kapselrests“ / *interner Bericht zur statistischen Auswertung*
- [106] Kubiak, R. (Juni 2005): „HOT-SPOTS: Einfluss verschiedener Faktoren auf die Teilchengrößenverteilung von Ipratropiumbromid und Laktose“ / *interner Bericht zur statistischen Auswertung*
-

11 Anhang

11.1 Liste der Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht

A. Publikationen

Beilmann, B., Langguth, P., Häusler, H., Grass, P. (2006): „High-Performance Liquid Chromatography of lactose with Evaporative Light Scattering Detection, applied to determine fine particle dose of carrier in Dry Powder Inhalation products“ / *J Chrom A 1107: S. 204 - 207*

Beilmann, B., Kubiak, R., Grass, P., Häusler, H., Langguth, P. (2006): "Dry Powder Inhaler formulations: interparticle forces, coating effect and resulting deposition pattern"/ *AAPS PharmSciTech submitted*

Beilmann, B., Langguth, P., Häusler, H., Grass, P. (2006): „Partikelinhalation aus biopharmazeutischer Sicht“ / *Deutsche Apotheker Zeitung submitted*

B. Posterpräsentationen

Beilmann, B., Langguth, P., Graß, P., Häusler, H.
Influence of capsule material on the aerosolization characteristics of dry powder inhalation products / *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Regensburg 06. - 09. Oktober 2004. Abstract veröffentlicht in den Proceedings der Jahrestagung, ISBN 3-00-014723-3*

Beilmann, B., Langguth, P., Häusler, H., Graß, P.
Development of HPLC Lactose applied to determine fine particle dose of carrier in DPI's / *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Mainz 05. - 08. Oktober 2005. Abstract veröffentlicht in den Proceedings der Jahrestagung, ISBN 3-00-016844-3*