

# **Polymerpartikel zur ektoparasitären Anwendung am Tier**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

CLAUDIA SELBACH

aus

Hückeswagen

Bonn 2009



Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. K.-J. Steffens
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Siepmann

Tag der Promotion: 22. März 2010  
Erscheinungsjahr: 2010



## **Abstract**

Parasiten beim Haustier sind nicht nur unangenehm, sondern vielmehr auch Überträger gefährlicher Krankheiten. Ein effizienter und lang anhaltender Schutz ist daher wünschenswert. Ziel dieser Arbeit war es, ein Formulierungskonzept zur topischen Anwendung mit langer Wirkdauer gegen Ektoparasiten, wie Zecken und Flöhe, zu entwickeln. Als Wirkstoffe stehen Flumethrin und Imidacloprid zur Verfügung. Für eine retardierte Freisetzung wird der Wirkstoff in einer Polymermatrix aus nicht bioabbaubaren Polymeren, wie Polystyrol und Polymethylmethacrylat, verkapselt. Die Herstellung der Partikel erfolgt entweder über ein Sprühtrocknungs- oder ein Emulsion Evaporation Verfahren. Die ca. 2 µm großen Partikel sollen im Fell haften und den Wirkstoff über drei Monate freisetzen. Die Anbindung an das Fell kann zum einen über elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen, zum anderen über eine Antigen–Antikörper–Bindung. Hierfür ist die Ausstattung der Partikeloberfläche mit funktionellen Gruppen Voraussetzung. Dies geschieht unter Verwendung der Copolymere Poly(meth)acrylat (Eudragit®) und Styrol-Maleinsäureanhydrid.

Untersucht wurde der Einfluss der Formulierungsbestandteile auf die Partikeleigenschaften. Eine Optimierung hinsichtlich des Wirkstoffgehalts, der Größe und des Freisetzungsverhaltens wurde durchgeführt. Die über das Emulsion Evaporation Verfahren hergestellten Partikel zeigen grundsätzlich günstigere Eigenschaften. Ein hoher Wirkstoffgehalt beschleunigt die In vitro Freisetzung ebenso, wie ein niederes Molgewicht des Matrixpolymers. Durch den Massenanteil der verwendeten Copolymere ist die Partikelgröße variierbar. In einem In vivo Versuch kann nach neun Wochen noch eine 55 %ige Wirksamkeit gegen Zecken erreicht werden



# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b><u>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
A.1	EINLEITUNG	1
A.2	ZIELSETZUNG	2
<b>B</b>	<b><u>ALLGEMEINER TEIL</u></b>	<b><u>3</u></b>
B.1	PARASITOLOGIE	3
B.1.1	ZECKEN	3
B.1.2	FLÖHE	4
B.2	WIRKSTOFFE	7
B.2.1	FLUMETHRIN	7
B.2.2	IMIDACLOPRID	8
B.3	KAPSELMATERIAL	10
B.3.1	POLYSTYROL	10
B.3.2	POLYMETHYLMETHACRYLAT – PMMA	11
B.3.3	CHITOSAN	11
B.3.4	EUDRAGIT <sup>®</sup> RS 100	12
B.3.5	EUDRAGIT <sup>®</sup> S 100	13
B.3.6	EUDRAGIT <sup>®</sup> L 100	13
B.3.7	EUDRAGIT <sup>®</sup> E 100	14
B.3.8	STYROL-MALEINSÄUREANHYDRID COPOLYMER	15
B.4	PARTIKELHERSTELLUNG	16
B.4.1	SOLVENT EVAPORATION VERFAHREN	16
B.4.1.1	Grundlagen	16
B.4.1.2	Praktische Anwendung	16
B.4.2	SPRÜHTROCKNUNGSVERFAHREN	17
B.4.2.1	Grundlagen	17
B.4.2.2	Praktische Anwendung	18
B.5	INSTRUMENTELLE METHODEN	19
B.5.1	LASERDIFFRAKTOMETRIE	19
B.5.2	HPLC	22
B.5.3	DSC	24
B.5.4	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	26
B.6	KONTROLLIERTE WIRKSTOFFFREISETZUNG	29

<b>C</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>34</b>
<b>C.1</b>	<b>ALLGEMEINE VORVERSUCHE UND TECHNIKEN</b>	<b>34</b>
C.1.1	AUSWAHL DES LÖSUNGSMITTELS	34
C.1.2	HOMOGENISIERUNG	35
C.1.3	AUFREINIGUNG	37
C.1.4	FREISETZUNG	40
<b>C.2</b>	<b>POLYSTYROL</b>	<b>44</b>
C.2.1	EMULSION EVAPORATION VERFAHREN	44
C.2.1.1	Einfluss des Wirkstoffgehalts	44
C.2.1.1.1	Partikelgröße	44
C.2.1.1.2	Glasübergangstemperatur	47
C.2.1.1.3	Freisetzung	50
C.2.1.2	Einfluss des Molekulargewichts	56
C.2.1.2.1	Auswirkungen auf die Formulierung	56
C.2.1.2.2	Partikelgröße	57
C.2.1.2.3	Glasübergangstemperatur	60
C.2.1.2.4	Freisetzung	62
C.2.1.2.5	Flumethringehalt	64
C.2.1.3	Einfluss des Emulgatoranteils	65
C.2.1.3.1	Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer	66
C.2.1.3.2	Eudragit® S 100	70
C.2.1.3.3	Eudragit® E 100	71
C.2.1.3.4	Eudragit® RS 100	71
C.2.1.4	Verdopplung der organischen Phase	71
C.2.1.5	Polystyrol mit Imidacloprid	72
C.2.2	SPRÜHTROCKNUNG	74
C.2.2.1	Polystyrol mit Eudragit® RS	74
C.2.2.2	Polystyrol mit Eudragit® S	75
C.2.2.2.1	Optimierung des Emulgatoranteils Eudragit® S	75
C.2.2.2.2	Optimierung der Homogenität	76
C.2.3	VERGLEICH SPRÜHTROCKNUNG UND EMULSION EVAPORATION	78
C.2.3.1	Polystyrol mit Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer	78
C.2.4	ZUSAMMENFASSUNG POLYSTYROL	82
<b>C.3</b>	<b>PMMA</b>	<b>83</b>
C.3.1	EMULSION EVAPORATION VERFAHREN	83
C.3.1.1	Eudragit® RS 100	83
C.3.1.1.1	Formulierung	84

C.3.1.1.2	Freisetzung .....	85
C.3.1.2	Eudragit® L 100.....	85
C.3.1.3	Eudragit® S 100.....	86
C.3.1.3.1	Einfluss des Hochdruckhomogenisators.....	87
C.3.1.3.2	Änderung des Emulgatoranteils .....	91
C.3.1.3.3	Änderung des Wirkstoffgehalts.....	92
C.3.1.4	Eudragit® E 100 .....	94
C.3.2	SPRÜHTROCKNUNG .....	94
C.3.2.1	Eudragit® S .....	95
C.3.2.1.1	Wirkstoffgehalt.....	95
C.3.2.1.2	Epoxidharzeinbettung.....	97
C.3.2.1.3	Einfluss des Molekulargewichts.....	99
C.3.2.2	Eudragit® RS .....	104
C.3.2.2.1	Einfluss des Wirkstoffgehalts.....	105
C.3.2.2.2	Einfluss des Emulgatoranteils .....	106
C.3.2.3	Eudragit® E.....	107
C.3.3	ZUSAMMENFASSUNG PMMA.....	108
<b>C.4</b>	<b>SONSTIGE POLYMERE .....</b>	<b>110</b>
C.4.1	EUDRAGIT® RS .....	110
C.4.1.1	Wirkstoffgehalt.....	110
C.4.1.2	Vergleich Emulsion Evaporation und Sprühtrocknung.....	112
C.4.2	CHITOSAN.....	114
C.4.3	ZUSAMMENFASSUNG SONSTIGE POLYMERE .....	116
<b>C.5</b>	<b>ZECKEN-FILTER-VERSUCHE.....</b>	<b>117</b>
<b>C.6</b>	<b>TIERVERSUCH IN VIVO.....</b>	<b>124</b>
C.6.1	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG .....	125
C.6.2	ERGEBNISSE.....	127
<b>D</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u></b>	<b><u>134</u></b>
<b>E</b>	<b><u>EXPERIMENTELLER TEIL.....</u></b>	<b><u>136</u></b>
<b>E.1</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>136</b>
E.1.1	CHEMIKALIEN .....	136
<b>E.2</b>	<b>METHODEN UND GERÄTE.....</b>	<b>138</b>
E.2.1	HERSTELLUNGSVORSCHRIFT SOLVENT EVAPORATION VERFAHREN.....	138
E.2.1.1	Microfluidizer.....	138
E.2.2	HERSTELLUNGSVORSCHRIFT SPRÜHTROCKNUNGSVERFAHREN.....	139

E.2.2.1	Büchi Sprühtrockner.....	139
E.2.3	PARTIKELCHARAKTERISIERUNG.....	140
E.2.3.1	Mikroskopie.....	140
E.2.3.2	Laserdiffraktometrie – Mastersizer.....	140
E.2.3.3	Rasterelektronenmikroskop - REM.....	141
E.2.3.4	DSC.....	141
E.2.3.5	Oberflächenbestimmung.....	142
E.2.4	FREISETZUNG.....	144
E.2.4.1	Waschvorgang für Freisetzung.....	144
E.2.4.2	Versuchsaufbau.....	144
E.2.4.3	HPLC-Analyse.....	145
E.2.5	ZECKEN – FILTER – VERSUCH.....	145
E.2.6	TIERVERSUCH IN VIVO.....	146
<b>F</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b>148</b>
<b>G</b>	<b><u>ANHANG.....</u></b>	<b>155</b>
<b>G.1</b>	<b>OPTIMIERTE FORMULIERUNG POLYSTYROL.....</b>	<b>155</b>
<b>G.2</b>	<b>OPTIMIERTE FORMULIERUNG PMMA.....</b>	<b>157</b>
<b>H</b>	<b><u>LEBENS LAUF.....</u></b>	<b>159</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Da	Dalton
Dos Na Lösung	Natrium Dioctylsulfosuccinat Lösung
EtOH	Ethanol
FAD	Flohspeichel Allergie Dermatitis
g	Gramm
geom. Mittel	geometrisches Mittel
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
H <sub>2</sub> O	Wasser
k.A.	keine Angaben
LD <sub>50</sub>	die Dosis, die für 50 % der Population letal ist
LM	Lösungsmittel
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAH	Maleinsäureanhydrid
max.	maximal
MeOH	Methanol
MF	Microfluidizer
MFT	Mindestfilmbildetemperatur
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MSCP	Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer
Mw	Molekulargewicht
Na <sup>+</sup>	Natrium Ion
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
∅	Durchmesser

PESU	Polyethersulfon
PET	Polyethylenterephthalat
PMMA	Polymethylmethacrylat
ppm	Parts per Million
PS	Polystyrol
$R^2$	Bestimmtheitsmaß
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute
sog.	sogenannt
$T_g$	Glasübergangstemperatur
u.a.	unter anderem
V	Volumen
V	Volt
vgl.	vergleiche

## A Einleitung und Zielsetzung

### A.1 Einleitung

In unserer heutigen Zeit haben Haustiere einen hohen Stellenwert erlangt. Das Zusammenleben mit ihnen ist Teil moderner Lebensqualität geworden. Für viele Menschen sind ihre Haustiere lieb gewonnene, vollwertige Familienmitglieder. Für andere ersetzen die Tiere sogar die Familie. Die Beziehung zum Haustier ist somit rein emotional, und in keiner Weise unter einem wirtschaftlichen Aspekt zu betrachten. Weil sie so wichtig sind, erfahren Haustiere beinahe die gleiche Aufmerksamkeit und Gesundheitsfürsorge wie Menschen. Das Wohlergehen des Tieres steht für den Besitzer an erster Stelle. Dabei ist er nicht kosten-, sondern nutzenorientiert.

Im Nutztiersektor dagegen spielen Kosten eine enorme Rolle. Veterinärmedizinische Präparate müssen schnell und einfach anwendbar sein, auch für eine große Anzahl an Tieren. Aber vor allem müssen die Kosten gering sein. Wirtschaftlichkeit und Rentabilität sichern hier das Überleben der Betriebe.

Während also Kosten im Nutztierbereich von großer Bedeutung sind, spielen die Behandlungskosten im Haustiersektor eine untergeordnete Rolle. So können in diesem Bereich größere Preisspannen erzielt werden, was die veterinärmedizinischen Produkte für Haustiere für die Industrie besonders attraktiv macht.

Neben den auch in der Humanmedizin bekannten Erkrankungen sind immer noch vorwiegend Parasiten ein Problem bei Hund und Katze. Bei den Endoparasiten wären Spulwürmer, Hakenwürmer, Peitschenwürmer und Bandwürmer zu nennen. Im ektoparasitären Bereich sind vor allem Zecken, Flöhe, Läuse, Haarlinge und Milben von Bedeutung.

Der Befall mit Zecken und / oder Flöhen wird vom Tierbesitzer als sehr unangenehm empfunden, zudem können durch solche Parasiten auch Krankheiten übertragen werden. Eine sofortige Wirkung, sog. Knock Down Effekt, des angewendeten Ektoparasitizids ist daher vom Kunden erwünscht. Der Markt bietet zur Bekämpfung von Zecken und Flöhen verschiedenste Arzneiformen an: Shampoo, Spray, Tabletten, Injektions-Suspension, Spot on, Halsband. Die Wirkdauer der einzelnen Formulierungen ist dabei auf 1-2 Monate beschränkt, nur die Halsbänder weisen eine längere Wirksamkeit von bis zu 6 Monaten auf.

Die Handhabung eines Präparates sollte genauso einfach wie effektiv sein. Zudem ist eine lange Wirkdauer von Vorteil. Die sog. Spot ons werden im Nacken des Tieres aufgetragen und verteilen sich durch Spreitungseffekte über den gesamten Körper. Innerhalb von 24 h tritt die Wirkung ein und hält je nach Parasit und Präparat 4 bis 8 Wochen an (z.B. Advantage / Advantix von der Bayer Animal Health GmbH gegen Flöhe / Zecken und Flöhe;

Wirkdauer 4 Wochen [12]; Frontline von Merial, Wirkdauer gegen Zecken 4 Wochen und gegen Flöhe 8 Wochen. [45]) Im Gegensatz dazu haben Floh- und Zeckenhalsbänder eine Wirkdauer von bis zu 6 Monaten (z.B. Bolfo / Kiltix von der Bayer Animal Health GmbH gegen Flöhe und Zecken; Wirkdauer bis zu 6 Monaten. [16]) Auch hier ist die Anwendung denkbar einfach: das Halsband wird dem Tier um den Hals gelegt und verbleibt über den Zeitraum der Wirkdauer am Hals des Tieres. Wirkungseintritt ist allerdings erst nach ca. 1-2 Tagen zu beobachten. Diese Latenzzeit wird vom Kunden jedoch problemlos akzeptiert. In der vorliegenden Arbeit soll nun eine Formulierung entwickelt werden, die sowohl die Vorteile der Spot ons als auch die Vorteile der Halsbänder vereint. Das neue Produkt soll einfach und sicher in der Anwendung sein, ein Knock Down Effekt ist erwünscht, Wirkdauer über 3-6 Monate und so unauffällig wie ein Spot on.

### **A.2 Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung und Charakterisierung von polymeren Mikropartikeln, die ein eingebettetes Insektizid über einen Zeitraum von 3-6 Monaten freisetzen sollen. Dabei müssen die Partikel so klein sein, dass sie mit dem bloßen Auge nicht mehr im Fell des Tieres sichtbar sind. Zudem muss die Freisetzung so langsam von statten gehen oder die Beladung so hoch sein, dass die gewünschte Wirkdauer erreicht werden kann. Eine Formulierung als Spray oder Wipe on ist das Ziel, da sie besonders anwenderfreundlich sind. Die Polymerpartikel müssen jedoch nicht nur auf das Tier aufgebracht werden, sie müssen auch im Fell haften. Hierzu gibt es zum einen die Möglichkeit, die Partikel über anionische oder kationische Wechselwirkungen an das Haar zu binden, so wie es auch bei Haarsprays und Haarlacken der Fall ist. Zum anderen ist eine Anbindung über Antikörper, die spezifisch für ein Antigen des Hundehaars sind, denkbar. [13] Letztere Methode bringt die große Herausforderung der Stabilisierung eines Antikörpers in einer Formulierung mit sich.

Im Folgenden geht es nun um die Methodenentwicklung zur Herstellung polymerer Mikropartikel definierter Größe mit modifizierter Oberfläche und geeignetem Freisetzungsprofil.

## B Allgemeiner Teil

### B.1 Parasitologie

#### B.1.1 Zecken

Zecken gehören zu den Spinnentieren und besitzen somit vier, im Larvenstadium nur drei, Beinpaare. Es werden zwei Familien unterschieden: die *Argasidae* (Lederzecken) und die *Ixodidae* (Schildzecken). Voll gesogen können sie bis zu 3 cm groß werden. Charakteristisch für Zecken ist ihr ausgeprägtes Beißwerkzeug und das sog. Hallersche Organ. Das Hallersche Organ ist eine mit Chemorezeptoren, die sich auch entlang der Vorderbeine finden, bestückte Grube an den Vordertarsen (Endglieder der Vorderbeine) der Zecke, das der Findung eines Wirtes dient. Mit ihrem ausgeprägten Beißwerkzeug graben sie sich in die Haut. Dabei stechen sie keine Ader an, sondern formen mit ihrem Sauger eine Grube, die während des länger dauernden Saugvorgangs mehrmals mit Blut vollläuft. Die Zeckencuticula ist so dehnbar, dass die Zecke mehrere Male das eigene Körpergewicht an Blut aufsaugen und der Körper stark anschwellen kann. Bei dem Saugvorgang, der eine Dauer von mehreren Minuten bis Tagen hat, entzieht die Zecke ihrem Wirt eine beachtliche Menge Blut, die bei starkem Zeckenbefall zu einer Anämie beim Wirtstier führen kann, welche dadurch dann besonders anfällig für Infektionskrankheiten sind. Während des Saugvorgangs injiziert die Zecke Speichel in die Stichwunde, der neben gerinnungshemmenden, betäubenden und gefäßerweiternden Substanzen auch Krankheitserreger und neurotoxische Substanzen enthält. Letztere führen zu einer Paralyse (aufsteigende Zeckenlähme), die bei Erreichen der Atemmuskulatur zum Tod des Wirtes führt. Diese Lähmung ist jedoch meist reversibel, wenn die Zecke rechtzeitig entfernt wird.

Im Allgemeinen saugen alle Entwicklungsstadien der Zecke Blut. Aus dem Ei entwickelt sich eine Larve, welche sich nach einer Häutung zur Nymphe differenziert, die sich dann schließlich nach erneuter Häutung zum geschlechtsreifen, adulten Tier ausbildet. Jedes Stadium wird mit der zum Wachstum notwendigen Häutung abgeschlossen, außerdem ist für jede Häutung und vor der Eiablage eine Blutmahlzeit notwendig. Der Lebenszyklus einer Zecke wird durch Zeiten des Hungerns, welche von langer Dauer sein können, charakterisiert. Die Nahrungsaufnahme nimmt nur einen kleinen Teil im Leben einer Zecke in Anspruch. In diesen Zeiten werden jedoch enorme Mengen Blut aufgesaugt.

Der Entwicklungszyklus einer Schildzecke kann bis zu sechs Jahre dauern, dabei nimmt der Kontakt mit dem Wirt nur 2 % dieser Zeit in Anspruch. Hungerperioden von mehr als drei Jahren sind keine Seltenheit. Es wurden schon Gattungen beobachtet, die 14 Jahre ohne Nahrung auskamen. Diese Fähigkeit ist für die Zecke sehr wichtig. Wenn die Epidemiologie

und die Übertragung gewisser Pathogene durch die Zecke betrachtet wird, muss jedoch die lange Überlebensdauer der Zecke mit bedacht werden. [43]

Zecken sind Überträger wichtiger Krankheiten, die sowohl den Haustieren als auch Menschen gefährlich werden können, da sie keine große Wirtsspezifität besitzen. Zu den Krankheitserregern zählen Viren, Bakterien, Rickettsien, Anaplasmen, Protozoen und Nematoden. Übertragen werden Erreger durch Speichel und Darminhalt der Zecke, sowie durch den Fraß dieser durch den Wirt. Speichel injiziert die Zecke während der Blutmahlzeit in die Stichwunde, um Blutgerinnung und Schmerzempfindung zu unterdrücken. Zudem kommt es auch vor, dass sie Teile des Darminhalts in den Wirt pumpt. Nematoden übertragen sich durch den Fraß der Zecke auf den Wirt („abknabbern“ der Zecke von der Haut). *Ixodes ricinus* (Abb. 1) als sehr häufig vorkommende Zeckenart, ist der Überträger des TBE-Virus, das die Frühsommermeningoencephalitis (FSME, Hirnhautentzündung) auslöst, und Überträger des Bakteriums *Borrelia burgdorferi*, welches die Ursache für die Lyme-Krankheit oder auch Borreliose ist.



**Abb. 1** *Ixodes ricinus*

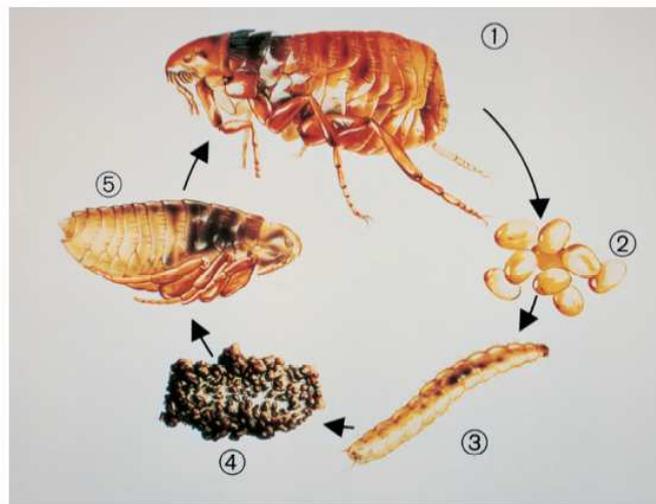
Gegen FSME ist eine Impfung möglich. Drei Teilimpfungen schützen durch aktive Immunisierung für drei Jahre, bevor eine Auffrischung des Impfschutzes notwendig wird. [25; 48] Symptome der Borreliose sind die Wanderröte und in Phase eins grippeartige Symptome. In Phase zwei können Herzmuskelentzündung, Arthritis, Nervenentzündungen und Lähmungen auftreten. Phase drei beinhaltet Syphilis-ähnliche, Multiple-Sklerose-ähnliche Hirnveränderungen. Die einzelnen Symptome können zusammen als auch unabhängig voneinander auftreten. Das Krankheitsbild ist somit sehr komplex und nicht immer leicht zu diagnostizieren. Eine Heilung ist nur bei frühzeitiger Antibiotikatherapie möglich. [67]

### **B.1.2 Flöhe**

Flöhe sind blutsaugende, braune, flügellose Insekten mit einer Größe von 1,5-6 mm. Sie besitzen sechs Beine und eine starke Körpersegmentierung. Adulte Tiere sind wegen ihres kräftigen dritten Beinpaars zu besonderen Sprungleistungen fähig. Eine weitere

Besonderheit stellt die Pygidialplatte dar. Sie befindet sich am unteren Rücken mit einer artspezifischen Anzahl an Sinneshaaren. Eine hohe Dichte an Rezeptoren in diesem Bereich ist für die Wahrnehmung von Luftbewegungen und Erschütterungen zuständig. Mit ihren Ocellen können die Flöhe lediglich hell-dunkel unterscheiden, somit ist die Pygidialplatte ein wichtiges Organ zur Orientierung und Wirtsfindung. [44]

Die Entwicklung eines Flohs verläuft über mehrere Stadien. (Abb. 2) Beginnend mit dem Ei, aus dem eine Larve schlüpft, die sich dann nach zweimaligem Häuten verpuppt und sich schließlich über die Adultenvorstufe zum adulten Tier entwickelt. Diese Entwicklungsstadien sind innerhalb von 14 Tagen abgeschlossen, können sich aber auch über einen Zeitraum von 140 Tagen erstrecken, abhängig von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und der Anwesenheit eines Wirtes. [39]



**Abb. 2** Lebenszyklus des Katzen und Hunde Flohs (1) Adulter weiblicher Floh (2) Eier (3) Larve (4) Puppe (5) Adultenvorstufe (Preemerged adult) [39]

Flöhe können maximal 18 Monate alt werden. Das Weibchen legt über einen Zeitraum von 3-6 Wochen täglich 10-25 Eier, die aus dem Fell des Tieres auf den Boden fallen. Daraus schlüpfen nach einigen Tagen bein- und augenlose Larven, auch Drahtwürmer genannt, die sich hauptsächlich von zerfallenen organischen Substanzen aus ihrer Umgebung, toten Adulten und Kottropfen der adulten Tiere ernähren. Zwei Häutungen und 2-3 Wochen später verpuppen sich die Larven. Die Puppe bleibt für 1-2 Wochen in einem unbeweglichen Zustand (Adultenvorstufe) bevor sie dann auf einen Umweltreiz, z. B. Vibration, hin den Kokon verlässt. Bleibt dieser Reiz aus, so kann der Floh in dem Puppenkokon längere Zeit verharren und sichert somit sein Überleben. [44]

Die zwei wichtigsten Spezies auf dem Haustiersektor sind *Ctenocephalides felis*, der Katzenfloh und *Ctenocephalides canis*, der Hundefloh. [39] Sie saugen nicht einfach nur Blut, sondern können auch Krankheiten übertragen, Allergien auslösen und bei starkem

Befall zu Anämien führen. Da Flöhe wirtsunspezifisch sind, können Krankheiten auch auf den Menschen übertragen werden.

Die Flohspeichel Allergie Dermatitis (FAD) wird durch den Speichel ausgelöst, den der Floh in die Stichwunde injiziert, um eine Blutkoagulation zu verhindern. An diesen Stellen entstehen kleine Hauterhebungen und Krusten, die durch Scheuern und Lecken des Hundes oder der Katze schnell größer werden. Die Haut ist entzündet und gerötet, Haare fallen aus und Bakterien sorgen für eine eitrige Sekundärinfektion. Auch können Flöhe Würmer, bakterielle Erreger und viröse Infektionen übertragen. Um eine Übertragung von Krankheiten zu verhindern, muss nicht nur das Haustier, sondern auch dessen Umgebung gegen Flöhe behandelt werden. Denn 99 % einer Flohpopulation befinden sich in der Umgebung des Tieres. Die adulten Flöhe, die der Tierbesitzer sieht, sind somit nur die Spitze des Eisbergs.

[39; 44]

## B.2 Wirkstoffe

### B.2.1 Flumethrin

Flumethrin gehört in die Wirkstoffklasse der Pyrethroide. Bei Raumtemperatur ist es eine feste, klare, gelbe Substanz, die erst ab 60 °C zu einer zäh fließenden Masse wird. Sein chemischer Name lautet Alpha-Cyano-(4-fluoro-3-phenoxy)-benzyl-3-[2-chloro-2-(4-chlorophenyl)-ethenyl]-2,2-dimethyl-cyclopropancarboxylat (Abb. 3). Wie alle Pyrethroide ist Flumethrin lipophil und nicht wasserlöslich.

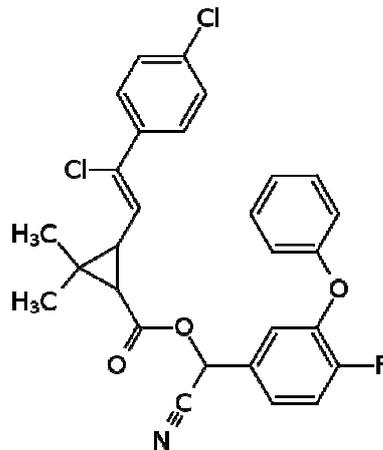


Abb. 3 Strukturformel Flumethrin

Flumethrin ist ein schnell wirkendes, neurotoxisches Kontaktgift. Bei Anthropoden führt es schnell zu einem Knock down Effekt und bei genügender Einwirkzeit zum Tod. Durch passive Penetration gelangt es durch die lipophile Insektencuticula in den Insektenkörper. Flumethrin führt zu einer verlangsamten Schließung bzw. einer lang andauernden Öffnung von Na<sup>+</sup>-Kanälen der Nervenzellmembran. Dadurch kommt es zum vermehrten Na<sup>+</sup>-Ionen Einstrom in die Zelle, welches eine spontane Depolarisation zur Folge hat. Dies führt zu initialen Erregungszuständen, gefolgt von Koordinationsstörungen und Lähmungen bis hin zum Tod des Insekts. Aufgrund der Reizung traktiler Elemente in den Extremitäten (Fuß-Rückzieh-Effekt), hat Flumethrin auch eine repellierende Wirkung. Darüber hinaus kommt es bei Zecken zu einer Hemmung der Eiablage, sodass überlebende, weibliche Zecken nicht für Nachwuchs sorgen können.

Trotz seiner neurotoxischen Wirkung besitzt Flumethrin eine hohe Anwendersicherheit. Die mittlere letale Dosis (LD<sub>50</sub>), d.h. für 50 % der betrachteten Population ist die verabreichte Dosis letal, für Säugetiere bei oraler Gabe unterscheidet sich von der topischen LD<sub>50</sub> für Insekten bei Pyrethroiden generell mindestens um den Faktor 1000. Sie liegt bei > 10.000 mg/kg Körpergewicht. [40] Dennoch können beim Einsatz von Flumethrin einige unangenehme Nebenwirkungen auftreten. So führt ein Dauerkontakt mit der Haut zu starken

Reizungen bis hin zu schmerzhaften Hautläsionen. Inhalation führt zu Irritationen der Schleimhäute. Oral wird Flumethrin schlecht resorbiert, jedoch kann über bestehende Hautläsionen eine große Menge Flumethrin in den Körper gelangen, sodass Nebenwirkungen wie Übererregbarkeit, Hypersalivation, Erbrechen, Diarrhoe, milder Tremor, Ataxie und Erschöpfung zu beobachten sind. [40]

### B.2.2 Imidacloprid

Imidacloprid gehört in die Wirkstoffklasse der Guanidinderivate. Strukturell ist es dem Nicotin sehr ähnlich und zählt deswegen auch zu den Neonicotinoiden (Abb. 4). Imidacloprid besteht aus farblosen Kristallen, die einen schwachen charakteristischen Geruch aufweisen. Der chemische Name lautet: 1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2 imidazolidinimin.

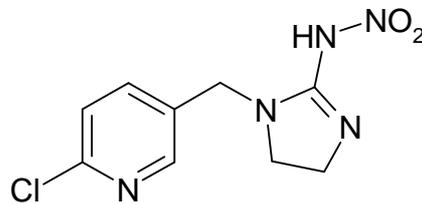


Abb. 4 Strukturformel Imidacloprid

Im Pflanzenschutz angewendet wirkt Imidacloprid als Fraß- und Kontaktgift. Es wird gut über die Wurzeln aufgenommen und in die Blätter transportiert. Äußerlich aufgebracht verteilt es sich zwischen Blattober- und -unterseite. Da der Abbau des Insektizids in der Pflanze nur langsam voran schreitet, hält die Wirkung längere Zeit an.

Im veterinärmedizinischen Bereich findet Imidacloprid gegen Parasiten (Flöhe und Tierläuse) seine Anwendung. Topische Formulierungen gegen Flöhe werden vor allem bei Hund und Katze eingesetzt. Reizungen von Haut und Augen sind dabei nicht zu erwarten. Auch wenn die Wirkung zeitlich nicht unmittelbar nach der Behandlung eintritt, sondern eine Latenzzeit von mehreren Stunden zu erwarten ist, so wirkt Imidacloprid doch sehr zuverlässig und lang anhaltend.

Beim Insekt wirkt Imidacloprid wie Acetylcholin am nicotinischen Acetylcholinrezeptor der Nervenzellen, es wird aber nicht durch das Enzym Acetylcholinesterase abgebaut. Durch den ausgelösten Dauerreiz wird die chemische Signalübertragung gestört. Es kommt zu motorischen Störungen, Tremor, Muskellähmungen und schließlich zum Tod des Insekts.

Imidacloprid ist jedoch für Säugetiere gut verträglich. Die Affinität des Imidacloprids zu nicotinartigen Rezeptoren der Insekten ist wesentlich höher als jene zu Säugetierrezeptoren. Zudem ist die topische Wirkkonzentration so gering, dass für Säuger keine Vergiftungsgefahr besteht. Schon 10-20 mg/kg Körpergewicht Imidacloprid reichen für eine topische Anwendung aus. Die orale LD<sub>50</sub> für Ratten liegt dagegen bei 424 mg/kg Körpergewicht, die dermale LD<sub>50</sub> liegt sogar bei > 5000 mg/kg Körpergewicht. Nach oraler Aufnahme,

beispielsweise durch intensive Fellpflege der Katze, kann jedoch vorübergehendes Speicheln und Würgen die Folge sein. Imidacloprid wird gut und rasch aus dem Magen-Darm-Trakt aufgenommen und innerhalb von 48 h im Körper nahezu vollständig abgebaut oder unverändert ausgeschieden. [39]

## B.3 Kapselmaterial

### B.3.1 Polystyrol

Polystyrol (PS) gehört zu den Thermoplasten, d.h. bei Erwärmung wird es erst weich, dann flüssig, bis es sich schließlich in seine Einzelbestandteile zersetzt. Thermoplastische Polymere können im erwärmten Zustand dauerhaft verformt werden. In seinem Grundzustand ist Polystyrol ein farb- und geruchloses Polymer. Sein Grundbaustein ist das Monomer Styrol (Abb. 5).

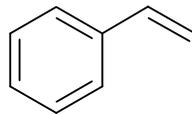


Abb. 5 Strukturformel Styrol

Chemisch betrachtet ist Polystyrol (Abb. 6) ein Polyvinylbenzol, dessen Phenylsubstituenten ataktisch längs der Kette angeordnet sind. So können sich keine kristallinen Bereiche bilden. Polystyrol ist also amorph. [20] Es ist ein im Alltag häufig vorkommendes Polymer. Polystyrol ist ein robustes, inertes Material, das vielseitig Verwendung findet. Die Glasübergangstemperatur wird laut Literatur [20] mit 100 °C für hochwärmestandfestes Polystyrol, mit 90 °C für normal fließendes und mit 80 °C für leicht fließendes Polystyrol angegeben. Eine besondere Form des Polystyrols ist das sogenannte Styropor®. Hierbei handelt es sich um aufgeschäumtes Polystyrol. Styropor® ist weiß und undurchsichtig, sehr leicht, besitzt eine geringe Wärmeleitfähigkeit, ist wenig elastisch und von geringer Festigkeit. [6]

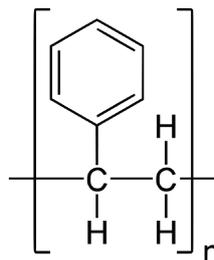


Abb. 6 Strukturformel Polystyrol

Als Kapselmaterial ist Polystyrol für den hier gesuchten Zweck gut geeignet: es ist in Wasser stabil, gesundheitlich unbedenklich und es setzt einmal verkapselte Stoffe nur langsam wieder frei. [53] Mit dem richtigen Copolymer kombiniert lässt sich die Partikeloberfläche modifizieren, sodass eine Anbindung an das Haar möglich wird. Polystyrol ist u. a. in Dichlormethan, Chloroform, Tetrahydrofuran und Acetonitril löslich oder quillt stark. In

Wasser, Alkoholen und Aceton ist dagegen keine Veränderung zu verzeichnen. [17] Als Kapselmaterial findet Polystyrol vielfach Verwendung. [53; 56; 58; 65; 66]

### B.3.2 Polymethylmethacrylat – PMMA

PMMA, auch weitläufig bekannt unter Plexiglas, ist ein klarsichtiger Thermoplast mit hoher Steifigkeit und guter Witterungsbeständigkeit. Wegen seiner geringen Zähigkeit ist es schlag- und spannungsrissempfindlich. [20] Löslichkeit oder starke Quellung ist u. a. in Aceton, Ethanol, Dichlormethan, Chloroform und Acetonitril zu beobachten. [17] Gegenüber Wasser ist PMMA formstabil. Somit besitzt Polymethylmethacrylat die notwendigen Eigenschaften, um mit den hier einzusetzenden Verfahren verarbeitet zu werden. Sein Glasübergang liegt laut Literatur bei 106 °C. [20] Die Strukturformel zeigt Abb. 7.

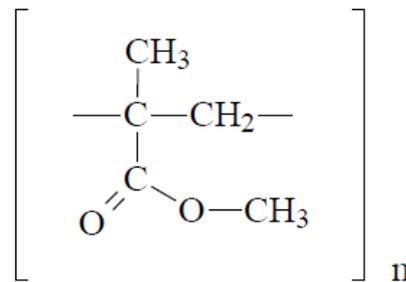


Abb. 7 Strukturformel von Polymethylmethacrylat

PMMA ist ein vielseitig eingesetztes Polymer, so findet es u. a. Verwendung als Uhrglas, Schutzscheibe, Gehäuse und in zahnmedizinischen Artikeln. [20]

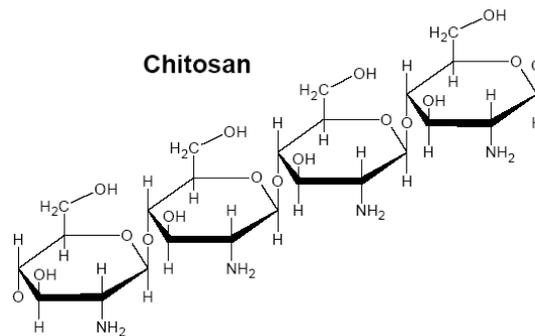
Auch in der pharmazeutischen Industrie sind Einsatzgebiete für PMMA vorhanden. So wird es z. B. als Verkapselungsmaterial verwendet. [57; 65] Hier dient es der retardierten Freisetzung von Wirkstoffen.

### B.3.3 Chitosan

Chitosan ist ein Biopolymer, das natürlich in der Natur vorkommt. Durch Deacetylierung des Chitins, welches aus den Panzern von Schalentieren gewonnen wird, wird Chitosan erhalten. Die Deacetylierung kann teilweise oder auch vollständig erfolgen, daraus ergeben sich Produkte mit unterschiedlichen Eigenschaften. Dies wirkt sich vor allem auf die Löslichkeit als auch auf die Viskosität aus. Daher ist die Qualität des Chitosans von Hersteller zu Hersteller unterschiedlich.

Aufgrund der Deacetylierung entstehen freie Aminogruppen, die dafür sorgen, dass Chitosan zwar in Wasser und verdünnten Säuren löslich ist, jedoch nicht in basischen Lösungen.

Chitosan (Abb. 8) wird vielfältig eingesetzt. Anwendung findet es z.B. in der Wasseraufbereitung, um Schwebstoffe zu binden und auszufällen. Auch wird es eingesetzt in Medizinprodukten als Lipidabsorbens und in Wundaufgaben, wegen seiner Bakteriziden und fungiziden Wirkung. [38]

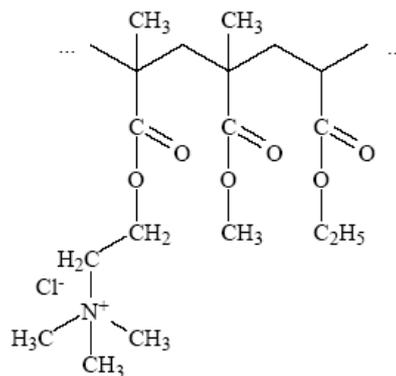


**Abb. 8 Strukturformel Chitosan**

Wegen seiner Wasserlöslichkeit gehört Chitosan nicht zu den geeigneten Kapselmaterialien. Jedoch können die freien Amin-Gruppen des Chitosans mit Glutardialdehyd quervernetzt werden. Durch diese Vernetzungen kann die Wasserlöslichkeit gesteuert werden. Mit steigender Vernetzung sinkt die Löslichkeit in Wasser soweit, dass Chitosan in Wasser stabil bleibt. Verbleibende, freie Amin-Gruppen können die Partikeloberfläche modifizieren und somit eine spätere Kopplungsreaktion vereinfachen.

### B.3.4 Eudragit<sup>®</sup> RS 100

Eudragit<sup>®</sup> RS wird in der pharmazeutischen Industrie vor allem als Filmbildner und Bindemittel eingesetzt. Weiterhin hat es tensidische Eigenschaften, die auch einen Einsatz als Dispergierhilfsmittel ermöglichen. [1] Eudragit<sup>®</sup> RS ist ein Copolymer aus Acryl- und Methacrylsäureestern mit einem geringen Anteil an quaternären Ammonium Gruppen (Abb. 9).



**Abb. 9 Strukturformel Eudragit<sup>®</sup> RS**

Diese Ammonium Gruppen liegen als Salz vor und machen den erhaltenen Polymerfilm permeabel. Aufgrund seiner Permeabilität, pH-unabhängigen Quellung und Lösungseigenschaften wird es zur Retardierung von Arzneistoffen eingesetzt. In der Literatur wird die Herstellung von Eudragit<sup>®</sup> Partikeln mit dem Sprühtrocknungs- und Emulsion Evaporation Verfahren beschrieben. [21; 36; 51] Sein mittleres Molgewicht beträgt

$M_w = \sim 30.000 \text{ g/mol}$  [22]. Die Glasübergangstemperatur, welche für die Charakterisierung von Polymeren von großer Bedeutung ist, liegt bei  $T_g = \sim 65 \text{ °C}$ . Ein weiterer wichtiger Parameter zur Charakterisierung ist die Mindestfilmbildungstemperatur (MFT). Sie gibt an, bei welcher Temperatur die Latexpartikel der Dispersion zu einem klaren, durchgehenden Film zerfließen, bei welcher Temperatur die Partikel koaleszieren. Sie ist charakteristisch für Polymerdispersionen und kann durch Weichmacher beeinflusst werden. Für die Eudragit<sup>®</sup> RS 30D Dispersion liegt die MFT bei  $\sim 45 \text{ °C}$ .

In der hier vorliegenden Arbeit stehen die Emulgatoreigenschaften des Eudragits<sup>®</sup> im Vordergrund. Seine Grenzflächenaktivität wird zur Emulgierung und gleichzeitigen Oberflächenmodifizierung der Polymerpartikel genutzt.

### B.3.5 Eudragit<sup>®</sup> S 100

Eudragit<sup>®</sup> S 100 ist ein anionisches Copolymer bestehend aus Methacrylsäure und Methylmethacrylat (Abb. 10).

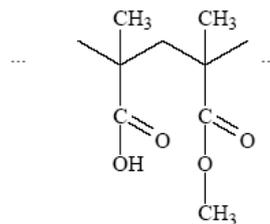


Abb. 10 Strukturformel Eudragit<sup>®</sup> S und L

Das Verhältnis von freien Carboxylgruppen zu Estergruppen beträgt ungefähr 1:2. Diese Säuregruppen sind für pH-abhängige Lösungseigenschaften verantwortlich. Im sauren Magen pH ist es nicht löslich, erst im basischen Milieu des Darms löst sich das Copolymer, sodass es für magensaftresistente Überzüge Verwendung findet. Wie auch das Eudragit<sup>®</sup> RS besitzt es tensidische Eigenschaften. Sein Molgewicht beträgt  $M_w = \sim 123.000 \text{ g/mol}$ . Die Glasübergangstemperatur  $T_g$  kann nicht bestimmt werden, da sie mit  $T_g > 150 \text{ °C}$  so hoch liegt, dass es zu einer Überlappung mit der Zersetzung der funktionellen Gruppen kommt. [22]

### B.3.6 Eudragit<sup>®</sup> L 100

Das Eudragit<sup>®</sup> L 100 ist dem Eudragit<sup>®</sup> S 100 sehr ähnlich. Das Molgewicht liegt ebenfalls bei  $M_w = \sim 123.000 \text{ g/mol}$  und auch die Glasübergangstemperatur kann nicht bestimmt werden, da sie mit  $T_g > 150 \text{ °C}$  schon in dem Bereich der Zersetzung der funktionellen Gruppen liegt. Auch bestehen beide Polymere aus Methacrylsäure und Methylmethacrylat. Jedoch besitzt Eudragit<sup>®</sup> L 100 einen höheren Anteil an Carboxylgruppen. Das Verhältnis von freien

Carboxylgruppen zu Estergruppen ist ungefähr 1:1. Damit erhöht sich die Hydrophilie und die Wasserlöslichkeit von Eudragit<sup>®</sup> L (Strukturformel siehe Abb. 10).

In der Literatur wird der Einsatz von Eudragit<sup>®</sup> L zur Herstellung von Mikropartikeln und zur Veränderungen des Freisetzungsprofils beschrieben. [46; 68]

Erwünscht ist eine Verringerung der notwendigen Emulgatormenge bei gleich bleibender Oberflächenladung der Partikel. Jedoch ist dieses Eudragit<sup>®</sup> so hydrophil, dass die emulgierenden Eigenschaften nicht mehr ausreichend sind und die Emulsion instabil wird. Daher findet Eudragit<sup>®</sup> L 100 nur in Vorversuchen Anwendung. Eine Optimierung wird zugunsten des Eudragit<sup>®</sup> S 100 nicht durchgeführt. [22]

### B.3.7 Eudragit<sup>®</sup> E 100

Eudragit<sup>®</sup> E 100 ist ein kationisches Polymer bestehend aus Dimethylaminoethylmethacrylat, Butylmethacrylat und Methylmethacrylat (Abb. 11).

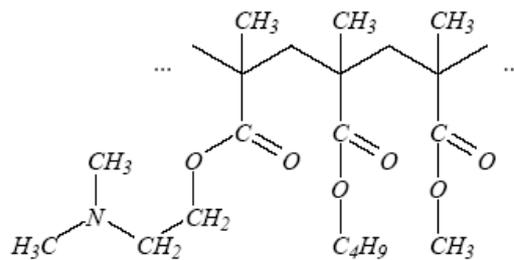


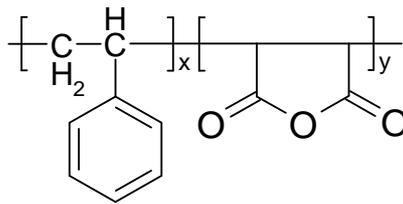
Abb. 11 Strukturformel Eudragit<sup>®</sup> E

Das tertiäre Amin ist kationisierbar, somit ist die Löslichkeit pH-abhängig. [46] Seine Anwendung findet es ebenso wie die anderen Eudragite<sup>®</sup> hauptsächlich in der Feststoffformulierung als Filmüberzug. Im sauren Magen pH löst es sich schnell und zügig auf und sorgt für eine schnelle Wirkstofffreisetzung. Eudragit<sup>®</sup> E bildet einen wasserdichten Überzug der Tablette und schützt so den Wirkstoff vor Feuchtigkeit. Dies ist bei empfindlichen Wirkstoffen von großem Vorteil. Das Molgewicht von Eudragit<sup>®</sup> E 100 liegt bei  $M_w = \sim 47.000$  g/mol. Die Glasübergangstemperatur hat einen Wert von  $T_g = \sim 48$  °C.

Eudragit<sup>®</sup> E 100 wird in anfänglichen Versuchen als Emulgator und Oberflächenmodifizierer bei der Partikelherstellung eingesetzt. Jedoch zeigt sich keine homogene Tröpfchenverteilung der Emulsion und keine homogene Partikelverteilung der Suspension. Die Partikel scheinen aneinander zu kleben. Eine weitere Optimierung erfolgt hier nicht, aufgrund der guten Ergebnisse mit den Eudragiten<sup>®</sup> RS und S. Auf Basis des heutigen Wissensstands ist jedoch nicht auszuschließen, auch mit Eudragit<sup>®</sup> E eine erfolgreiche Formulierung zu entwickeln. [22]

### B.3.8 Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer

Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer ist ein weißes geruchloses Pulver. Es ist teilweise im basischen Milieu löslich. Im Falle von Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer 7 % handelt es sich um ein farbloses Granulat, das in organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan und Chloroform löslich ist, nicht jedoch in Wasser. Eine allgemeine Strukturformel zeigt Abb. 12. Der Anteil an Maleinsäureanhydrid (MAH) variiert. So enthält das Produkt von Sigma-Aldrich 7 Gewichts-% MAH. Die Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymere 86/14 und 50/50 von der Firma ABCR GmbH & Co. KG enthalten dagegen 14 und 50 Molare-% Maleinsäureanhydrid.



**Abb. 12 Allgemeine Strukturformel von Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer; der Anteil an Maleinsäureanhydrid variiert**

Maleinsäureanhydrid wird genutzt, um unpolare Polyolefine polarer und sie damit mischbar oder auch verträglich mit anderen Polymeren zu machen. [20] Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer dient als Schlagzähigkeitsverbesserer von glasfaserverstärktem Polycarbonat und als Verträglichmacher für Polystyrol. [20]

In der hier vorliegenden Arbeit dient Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer (MSCP) der Oberflächenmodifizierung von Polystyrolpartikeln. Es zeigt sich, dass Eudragite® nicht kompatibel sind, MSCP aufgrund seiner Styrolgruppen jedoch schon. Die oberflächenmodifizierenden Carboxylgruppen entstehen durch Verseifung des Anhydrids durch ein basisches Milieu.

Das in Wasser dispergierte MSCP besitzt emulgierende Eigenschaften, die jedoch bei 7 % MAH nicht genügend ausgeprägt sind, sodass keine stabile Emulsion entsteht. MSCP 14 % erzeugt stabile Emulsionen und wird bevorzugt eingesetzt, da MSCP 50 % eine höhere Hydrophilie besitzt, dass Polymer aber in den Partikel miteingeflochten werden soll, der in der lipophilen Phase entsteht.

## **B.4 Partikelherstellung**

### **B.4.1 Solvent Evaporation Verfahren**

#### **B.4.1.1 Grundlagen**

Das Solvent Evaporation oder auch Emulsion Evaporation Verfahren ist ein oft beschriebenes Verfahren zur Herstellung von Polymerpartikeln. [51; 53; 56; 58; 65] Hierbei liegen die einzelnen Partikelkomponenten in gelöster Form in einer Emulsion vor. Durch Abzug des organischen Lösungsmittels bilden sich feste Partikel. Aus der Emulsion wird so eine Suspension.

Mit diesem Verfahren lassen sich sehr schonend Polymermikropartikel herstellen, da auf Extrembedingungen verzichtet werden kann. Durch den Einsatz der bereits polymerisierten Monomere ist ein Zusatz reaktiver Agenzien, wie sie für eine Polymerisation wichtig sind, nicht notwendig. Das System kommt ohne extreme pH-Werte aus, jedoch stabilisieren sich einzelne Formulierungen erst in einem basischen oder sauren Milieu. Dies ist als unproblematisch zu betrachten, sowie keine pH-sensitiven Stoffe eingesetzt werden. Zudem werden sowohl Polymer als auch Wirkstoff in der organischen Phase des Systems gelöst und kommen so nur in geringem Maße mit der wässrigen Phase in Kontakt. In diesem Fall sollte dennoch auf Zersetzungsprodukte geprüft werden. Der Entzug des Lösungsmittels geschieht durch einfaches Erhitzen und dadurch Verdampfen der Lösungsmittelphase. Durch den langsamen Lösemittelentzug wird die Aushärtungsphase der Partikel verlängert. So bilden sich massive, gleichmäßig geformte Partikel. Schwer flüchtige Lösungsmittel können am Rotationsverdampfer abgezogen werden, dadurch lässt sich die nötige Energiezufuhr minimieren. Zu hohe Temperaturen können für thermolabile Stoffe problematisch werden. Auch hier muss das Auftreten möglicher Zersetzungsprodukte abgeklärt werden.

#### **B.4.1.2 Praktische Anwendung**

In der vorliegenden Arbeit kommen verschiedene Polymere und Copolymere zum Einsatz. Aufgrund ihrer günstigen chemischen und physikalischen Eigenschaften konzentrieren sich die Arbeiten auf die Polymere Polystyrol und PMMA. Andere Polymere, wie Polyvinylalkohol, Chitosan oder auch Polyvinylpyrrolidon quellen oder lösen sich sogar in Wasser, sodass ein langsames Freisetzungsprofil nicht erreicht werden kann. Als Wirkstoff wird meist Flumethrin verwendet. Dichlormethan bildet die organische Phase, Ethylacetat und Chloroform werden auch verwendet, zeigen jedoch keine optimalen Ergebnisse.

Wirkstoff und Polymer werden in der organischen Phase gelöst. Das Copolymer, welches hier die Aufgabe des Emulgators übernimmt, wird in der wässrigen Phase dispergiert. Dafür

ist teilweise ein bestimmter pH-Wert einzustellen. Aber auch ein Lösen in der organischen Phase kann nötig sein, wenn das Copolymer nur aus der organischen Phase heraus seine emulgierende Wirkung entfaltet. Mit Hilfe von hohen Scherkräften, wie sie ein UltraTurrax erzeugt, lässt sich die organische Phase in der wässrigen Phase dispergieren. Es entsteht eine homogene Emulsion, die durch den Einsatz eines Hochdruckhomogenisators eine noch feinere Tröpfchenverteilung erhält. Durch leichtes Erwärmen und gleichzeitiges Rühren kann die organische Phase abgezogen werden. So bilden sich aus der inneren Phase Wirkstoff beladene Polymerpartikel. Die erhaltene Suspension ist über einen längeren Zeitraum stabil und steht der weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

## **B.4.2 Sprühtrocknungsverfahren**

### **B.4.2.1 Grundlagen**

Die Sprühtrocknung ist ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Partikeln. [21; 51] Versprühen lassen sich u.a. Lösungen, Emulsionen und Suspension. Bei der Sprühtrocknung gelangt die Formulierung mit einer Pumpe gefördert durch die Zweistoffdüse von oben in den Sprühzylinder. Hier findet die Verdampfung des Lösungsmittels statt. Verdampftes Lösungsmittel und Feststoffpartikel gelangen über ein Verbindungsstück in den Zyklon. Hier entweicht das Lösungsmittel nach oben durch einen Filter; ggf. wird das Lösungsmittel auch durch eine spezielle Vorrichtung wieder zurückgewonnen. Die Feststoffpartikel werden in dem Zyklon nach unten abgeschieden und sammeln sich in einem Auffanggefäß. Es wird ein trockenes Pulver erhalten, das sofort für weitere Charakterisierungen zur Verfügung steht. Wasch- und Aufreinigungsschritte entfallen. Jedoch ist das Verfahren der Sprühtrocknung nicht sehr schonend. Der flüssige Anteil der zu versprühenden Formulierung wird schnell verdampft. Dies geschieht durch eine dem System angepasste Temperatur und einen hohen Luftstrom. Die Zeit, die dem Polymer zum Aushärten bleibt, ist sehr kurz. So kann es dazu kommen, dass sich die entstehenden Partikel verformen oder aufplatzen, auch hohle Partikel sind für das Sprühtrocknungsverfahren nicht ungewöhnlich. Diese Phänomene sind wie folgt zu erklären: Wird die Formulierung versprüht, so verdampft das Lösungsmittel rasch. Eine harte Schale bildet sich, während im Innern noch Lösungsmittelreste vorhanden sind. Im weiteren Trocknungsverlauf verdampft auch das letzte Lösungsmittel. Da das Partikel schon eine harte Schale hat, baut sich im Innern ein Druck auf, der letztendlich das Partikel zum Platzen bringt. So erhalten die Partikel ein sichtbares Loch oder fallen wieder in sich zusammen. Hohle Partikel entstehen, wenn das verdampfende Lösungsmittel die gelösten Bestandteile mit nach außen an den Rand des Tropfens treibt, dort dann verdampft und der Feststoff aushärtet. Solche Partikel sind für eine langsame und lang dauernde Freisetzung nicht geeignet, da der Wirkstoff aus einem hohlen oder aufgeplatzten Partikel leicht entweichen

kann. Durch die Wahl des Lösemittels kann Einfluss auf die Bildung von hohlen und geplatzten Partikeln genommen werden. [21]

### **B.4.2.2 Praktische Anwendung**

Für die in dieser Arbeit verwendeten Kapselmaterialien erwies sich das Versprühen von Emulsionen als am besten geeignet. Durch die Emulsionströpfchen sind die Partikel schon vorgeformt. Hierüber lässt sich auch in gewissem Maß die Partikelgröße beeinflussen. Das Versprühen von Lösungen kann dagegen problematischer sein. Ist die Verdampfung nicht optimal, so kommt es bei Polystyrol zu einer Fadenbildung. Das leicht flüchtige Lösungsmittel wird in der Düse so warm, dass es schon vor dem Austritt in den Sprühzylinder zu einer geringen Verdampfung kommt. Dadurch fällt das Polymer ungleichmäßig aus und es bilden sich netzartige Fadenstrukturen aus. Dieses Phänomen kann umgangen werden, wenn sichergestellt wird, dass die Verdampfung des Lösungsmittels erst im Sprühzylinder stattfindet. Der Büchi Mini Sprühtrockner B-290 kann dieses leisten, da die Zweistoffdüse temperiert werden kann. (weiteres hierzu siehe E.2.2.1)

Versprüht werden die gleichen Formulierungen, wie sie auch im Solvent Evaporation Verfahren eingesetzt werden. Dabei stellt sich heraus, dass die Formulierungen, die PMMA enthalten, einfacher zu versprühen und die Polystyrol Formulierungen für das Solvent Evaporation Verfahren besser geeignet sind. Vorteil der Sprühtrocknung ist die Geschwindigkeit, mit der die trockenen Partikel erhalten werden. Jedoch gibt es in diesem Verfahren keine Waschschriffe, sodass im Überschuss eingesetztes Edukt als Verunreinigung im eigentlichen Produkt vorhanden ist. Der Emulgator ist die Komponente, die nicht vollständig für die Belegung der Grenzfläche benötigt wird. Diese Emulgatorreste unterstützen eine gute Redispergierung, da sie die Benetzbarkeit deutlich verbessern. Es ist jedoch auch möglich, dass sich der Überschuss an Emulgator beim Trocknungsvorgang auf den eigentlichen Partikeln ablagert. Dieser Emulgator ist nicht fest gebunden und wird beim Redispergierungsvorgang wieder in Lösung gebracht. Dies bedeutet, dass eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM-Aufnahme) ein anderes, größeres Partikelbild zeigt, als mit der Laserdiffraktometrie gemessen wird. Die Tatsache, dass der Emulgator nur teilweise für die Bildung der Partikel benötigt wird, sorgt dafür, dass die Gesamt-Partikelmasse sinkt. Dies wiederum erhöht den Flumethrinanteil, der auf die Gesamtmasse bezogen wird. Daraus müsste sich ein höherer Wirkstoffgehalt als theoretisch berechnet ergeben.

## B.5 Instrumentelle Methoden

### B.5.1 Laserdiffraktometrie

Die Messung von Teilchengrößen ist in der pharmazeutischen Industrie von besonderer Bedeutung. Verschiedene Formulierungen stellen auch unterschiedliche Ansprüche an vorhandene Partikel. So kann durch Partikelmessungen die Güte eines Mahlvorgangs geprüft oder auch die Stabilität einer Formulierung kontrolliert werden. Ein Partikelwachstum deutet auf eine ungenügende Stabilität hin.

Die Grundlage der Laserdiffraktometrie ist die Beugung von Licht. Je nach Form und Größe der Teilchen entstehen unterschiedliche, aber charakteristische Beugungsmuster. Als Lichtquelle dient ein 2 mW Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm (Mastersizer 2000, Malvern Instruments). Für die Messung des Feinbereichs dient bei Malvern Instruments eine Blaulicht Diode mit einer Wellenlänge von 450 nm. Sie ermöglicht eine Messung bis zu einer Partikelgröße von 20 nm. Das Laserlicht wird durch ein optisches System aufgeweitet, trifft dann auf die Probe, bevor das Streulicht, durch eine Fourierlinse geleitet, vom Detektor erfasst und vom Computer ausgewertet wird (Abb. 13). Die Fourierlinse dient dem Ausgleich unterschiedlicher Abstände der Partikel zum Detektor. So nehmen gleich große Partikel immer dieselbe Position auf dem Detektor ein. Ungebeugte Laserstrahlen treffen auf den Mittelpunkt der Detektiereinheit.

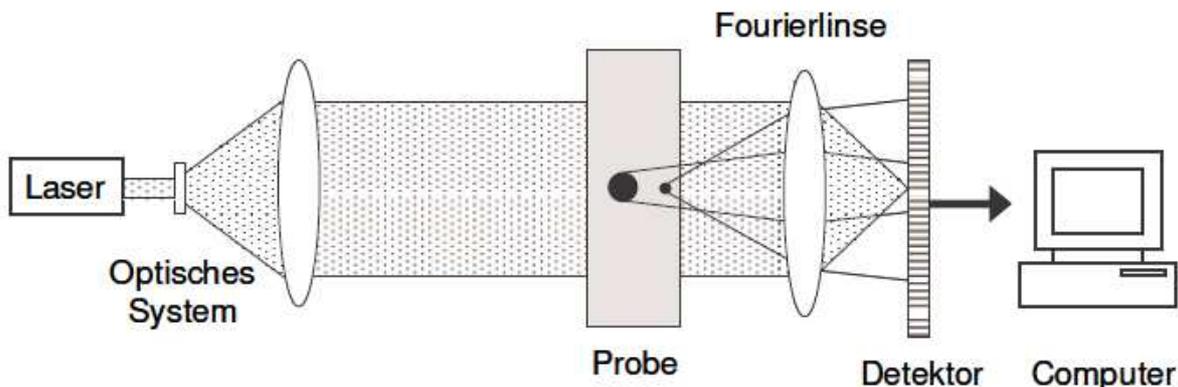


Abb. 13 Schematische Darstellung eines Laserdiffraktometers [47]

Der Detektor besteht aus ringförmigen Elementen, die im Brennpunkt der Fourierlinse positioniert sind. Die Ringsegmente nehmen dabei von innen nach außen an Breite zu. So wird die größere Streuung bei der Beugung des Lichts an kleinen Partikeln, die in den äußeren Ringsegmenten detektiert werden, ausgeglichen. Jedes Ringsegment misst die Lichtintensität, somit wird vom System eine Radialsymmetrie erfasst. Dies wiederum bedeutet, dass nur kugelförmige Teilchen präzise gemessen werden können, da nur diese ein radialsymmetrisches Beugungsbild erzeugen. Der Beugungswinkel kleiner Teilchen ist

groß, der Beugungswinkel großer Teilchen dagegen klein (Abb. 13). Neben der Beugung von Licht kommt es zu weiteren Wechselwirkungen zwischen Laserlicht und Partikeln, wie Absorption, Emission, Brechung und Reflektion. Bei Malvern Instruments wird eine komplexe Detektoreinheit genutzt, um die vielseitigen Wechselwirkungen zu erfassen und so das Partikelbild zu charakterisieren. Es können Vorwärts-, Weitwinkel-Vorwärts-, Seit- und Rückstreuung erfasst werden. [41]

Vorteil der Laserdiffraktometrie ist die große Spannweite an Partikelgrößen, die mit dieser Messtechnik erfasst werden kann. Malvern Instruments gibt einen Messbereich von  $0,02\ \mu\text{m}$  bis  $2000\ \mu\text{m}$  an. So wird durch dieses Messprinzip eine große Partikelspanne abgedeckt. Dies hat den Vorteil, dass ein Gerät vielen Anwendungen und Fragestellungen offen steht. Zudem können multimodale Teilchensuspensionen charakterisiert und Agglomerate bis zur oben angegebenen Größe erfasst werden. So ist eine Beurteilung der Güte einer Suspension möglich. Da die Formulierungen, die Gegenstand dieser Arbeit sind, teilweise auch Agglomerate enthalten, ist diese Messanordnung für eine Charakterisierung der Teilchenverteilung optimal.

Die Auswertung der Beugungsbilder kann nach zwei Theorien erfolgen. Zum einen steht die Fraunhoferbeugung zur Verfügung, zum anderen kann eine Auswertung über die Mie-Theorie erfolgen. Mit Hilfe der Mie-Theorie lassen sich Partikel im Submikronbereich erfassen. Für ihre Berechnung müssen allerdings der Brechungsindex und die Absorption der dispergierten Teilchen bekannt sein. Eine genaue Bestimmung dieser Parameter ist schwierig, daher werden meist Näherungswerte zur Bestimmung herangezogen. Die Mie-Theorie gilt nur für sphärische Partikel. Diese Einschränkung ist jedoch von geringer Bedeutung, da durch die Anordnung der Detektorelemente bei der Laserdiffraktometrie sphärische Partikel postuliert werden.

Bei der Fraunhoferbeugung erfolgt eine Berechnung der Partikelgröße über das Fraunhofersche Beugungsintegral, das sich durch den Einfall monochromatischen, kohärenten Lichtes für die Intensitätsverteilung  $I$  wie folgt ergibt (Gl. 1):

$$I = I_0 \cdot \left[ \frac{2 \cdot J_1(x)}{x} \right]^2 \quad (\text{Gl. 1})$$

mit  $x$

$$x = \frac{2 \cdot \pi \cdot r \cdot s}{\lambda \cdot f} \quad (\text{Gl. 2})$$

$I$	<i>Intensitätsverteilung</i>
$I_0$	<i>Intensität des einfallenden Lichtstrahls</i>
$J_1$	<i>Besselfunktion erster Art und erster Ordnung</i>
$r$	<i>Teilchenradius</i>
$s$	<i>Radialer Abstand zur optischen Achse</i>
$\lambda$	<i>Wellenlänge des Laserlichts</i>
$f$	<i>Brennweite der Linse</i>

Diese mathematische Vereinfachung aus Gleichung (Gl. 1) setzt eine gewisse Partikelgröße voraus, um Verfälschungen und Messungenauigkeiten auszuschließen. Die Messung der reinen Beugung bei sehr kleinen Partikeln (große Beugungswinkel) ist zudem als kritisch zu betrachten, da Überlagerungen mit anderen Streulichtphänomenen möglich sind. Somit ist die Berechnung der Partikelgröße mit dem Fraunhofer Beugungsintegral im Submikronbereich nur bedingt sinnvoll.

Es ist zu beachten, dass die erhaltenen Partikelgrößenanalysen volumenbasiert sind. Dies bedeutet, dass sich prozentuale Größenangaben auf das Gesamtvolumen der Partikel beziehen. Bei der Annahme, dass eine Suspension anzahlmäßig 50 % Partikel mit einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  enthält und 50 % der Partikel einen 10  $\mu\text{m}$  Durchmesser besitzen, geht das Volumen mit dem Faktor 1000 in die prozentuale Größenverteilung ein (Gl. 3).

$$V = \frac{1}{6} \pi \cdot d^3 \quad (\text{Gl. 3})$$

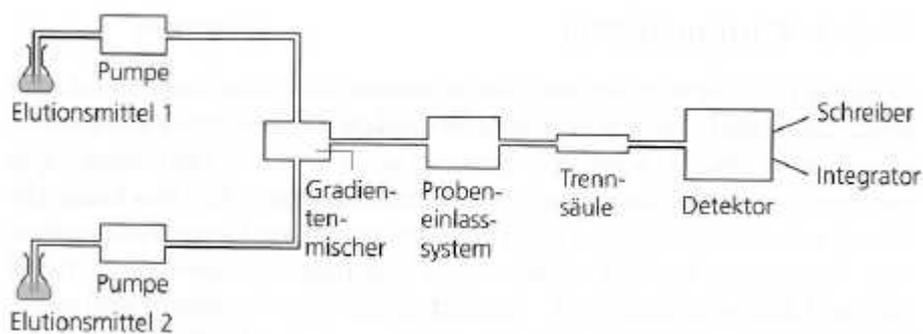
$V$	<i>Volumen des Partikels</i>
$d$	<i>Partikeldurchmesser</i>

Demzufolge machen die großen Partikel (50 % in der Anzahlverteilung) 99,9 % des Gesamtvolumens aus. Dies zeigt sehr deutlich, dass die großen Partikel durch ihr vielfach größeres Volumen viel stärker ins Gewicht fallen, und dass das volumenbasierte Ergebnis keineswegs mit der Anzahlverteilung korreliert.

Eine Umrechnung des volumenbasierten Ergebnisses in eine Anzahlverteilung ist möglich, jedoch muss beachtet werden, dass die Rohdaten auf einer Messung des Volumens basieren und somit systematische Fehler bei der Umrechnung nicht auszuschließen sind.

### B.5.2 HPLC

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) ist aus dem heutigen Laboralltag nicht mehr wegzudenken. Sie dient der Auftrennung und Analyse eines Probengemischs. Dabei können qualitative und quantitative Aussagen über die Probe gemacht werden. Aufgrund verschiedener HPLC-Trennverfahren ist die Analyse verschiedenster Substanzen möglich. Die HPLC ist eine Säulenchromatographie, deren Trennmechanismus vor allem auf Adsorptions- und Verteilungsvorgängen und ionischen Wechselwirkungen beruht. Diese Wechselwirkungen finden zwischen der Probe, der stationären und der mobilen Phase statt. Der schematische Aufbau einer HPLC ist in Abb. 14 zu sehen.



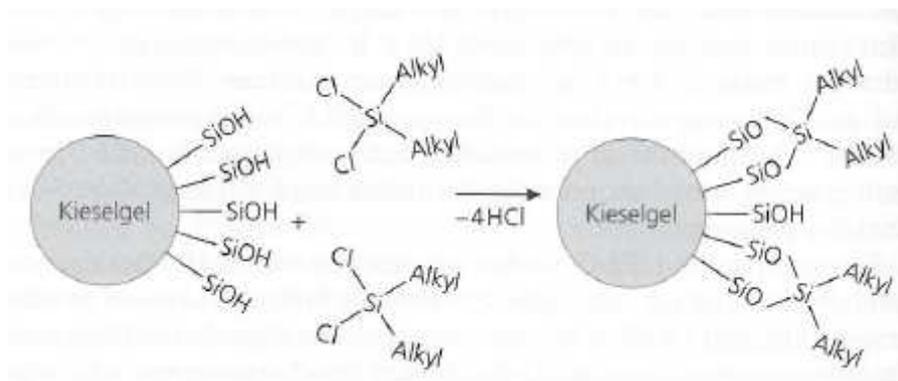
**Abb. 14 Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage [55]**

Über hochpräzise Pumpen gelangen die Elutionsmittel zum Gradientenmischer. Die Pumpen müssen pulsationsarm arbeiten, um einen kontinuierlichen Fluss auf der Säule zu erzeugen. Das Probeneinlasssystem sorgt für einen immer gleichen Auftrag der Probe ins System. Die Auftrennung der Analyse findet in der Trennsäule statt. Je nach Art der Probe und besonderen Fragestellungen, sind das Säulenmaterial, die Länge der Säule und der Innendurchmesser variierbar. Die aufgetrennten Probenbestandteile verlassen nacheinander die Säule und werden von einem geeigneten Detektor erfasst. Eine Visualisierung der Ergebnisse wird durch einen Computer vorgenommen.

Die HPLC ist so vielseitig einsetzbar, da viele Parameter variiert werden können. Vom Elutionsmittel über die Säule bis hin zum Detektor ist eine Optimierung je nach Bedarf möglich. Entscheidend für eine gute Auftrennung sind die Wechselwirkungen der Probe mit der mobilen (Elutionsmittel) und der stationären Phase (Trennsäule). Das Elutionsmittel muss rein sein und darf kein Störsignal verursachen. Als Fließmittel kann sowohl eine einzige Lösungsmittelkomponente als auch ein Lösungsmittelgemisch dienen. Für die Stärke eines Elutionsmittel ist die Hydrophilie oder Lipophilie ausschlaggebend. Ein lipophiler Stoff wird zu einem lipophilen Elutionsmittel eine so hohe Affinität haben, dass es mit einer kurzen Retentionszeit den Detektor erreicht. Ein hydrophiler Stoff dagegen wird mit dem Säulenmaterial stärker wechselwirken und den Detektor dementsprechend später erreichen.

In der sog. Elutropen Reihe sind Lösungsmittel nach steigender Polarität sortiert. Bleibt die Zusammensetzung des Elutionsmittels über die Analysendauer konstant, so handelt es sich um eine isokratische Analyse. Ändert sich das Mischungsverhältnis liegt ein Gradient vor.

Die Trennsäule ist ca. 5 bis 30 cm lang und besitzt einen Innendurchmesser von 2 bis 8 mm. Sie sind meist stahlummantelt und lassen sich leicht ins System einbauen. Die Säulen können mit unterschiedlichen Trennmaterien befüllt werden. Der Teilchendurchmesser liegt meist zwischen 5 und 25  $\mu\text{m}$ . Partikelmaterial, Korngröße, Porengröße und Säulenlänge haben Einfluss auf die Trenneigenschaften. Als Trennmaterien eignen sich Stoffe mit einer großen spezifischen Oberfläche, die einem hohen Druck in der Trennsäule standhalten und sich nicht verändern, wie Kieselgel und Aluminiumoxid. Die Trennmaterien können noch chemisch modifiziert werden, wie es in der häufig verwendeten Umkehrphasenchromatographie (reversed phase; RP) der Fall ist. Dabei wird die ursprünglich polare Oberfläche hydrophobiert (Abb. 15). Als Alkylreste sind Methyl-, Acetyl- und Octadecylgruppen gebräuchlich.



**Abb. 15 Umsetzung der Silanolgruppen des Kieselgels mit Alkylchlorosilanen zur Hydrophobierung [55]**

Sämtliche Veränderungen der Parameter haben zum Ziel eine Überlagerung verschiedener Substanzen durch ähnliche Retentionszeiten zu vermeiden und weit auseinander liegende Retentionszeiten für eine bessere Auswertung auf ein sinnvolles Maß zu verkürzen. Für die Detektion stehen verschiedene Detektoren mit unterschiedlichen Eigenschaften zur Verfügung. Welcher Detektor optimal ist, ist individuell nach Probe und gesuchten Ergebnissen abzuwägen. Häufig finden UV / Vis-, Fluoreszenz-, Leitfähigkeits- und Brechungsindex-Detektoren, chemische Reaktionsdetektoren, elektrochemische und massenselektive Detektoren Anwendung.

Die HPLC ist ein äußeres Chromatogramm, d. h. dass die aufgetrennten Substanzen das chromatographische System verlassen und mittels eines Detektors erfasst werden. Das Detektorsignal wird in ein Diagramm übertragen, welches das Signal gegen die Zeit darstellt (Abb. 16).

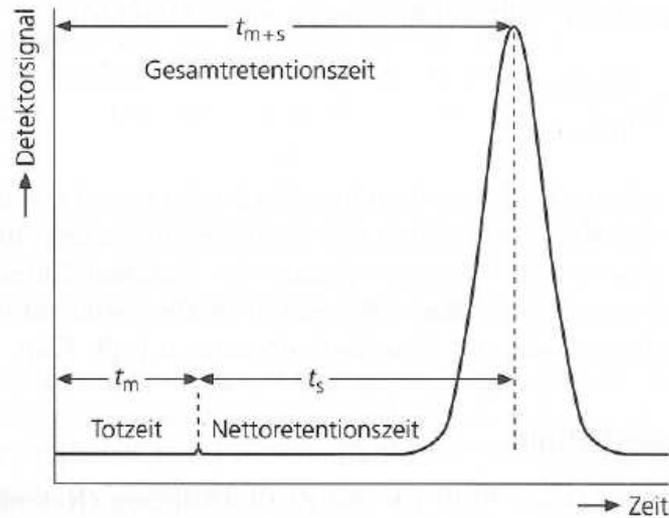


Abb. 16 Schematische Darstellung eines HPLC-Chromatogramms [55]

Der erhaltene Peak ähnelt unter idealen Bedingungen der Gauß'schen Normalverteilung. Dabei wird die Zeit, die das Elutionsmittel benötigt, um die Säule zu passieren als Totzeit  $t_m$  bezeichnet. Die Zeit, die die Analyse in der stationären Phase verbringt, ist die Nettoretentionszeit  $t_s$ . Daraus errechnet sich dann die Gesamtretentionszeit  $t_{m+s}$  wie folgt:

$$t_{m+s} = t_m + t_s \quad (\text{Gl. 4})$$

$t_{m+s}$	Gesamtretentionszeit
$t_m$	Totzeit
$t_s$	Nettoretentionszeit

Die Retentionszeit kann in einem bestehenden System zur qualitativen Charakterisierung einer Substanz herangezogen werden. Jedoch ist zu beachten, dass geänderte Parameter, wie Temperatur, Säulenlänge, Strömungsgeschwindigkeit und Elutionsmittel, die Retentionszeit beeinflussen. [55]

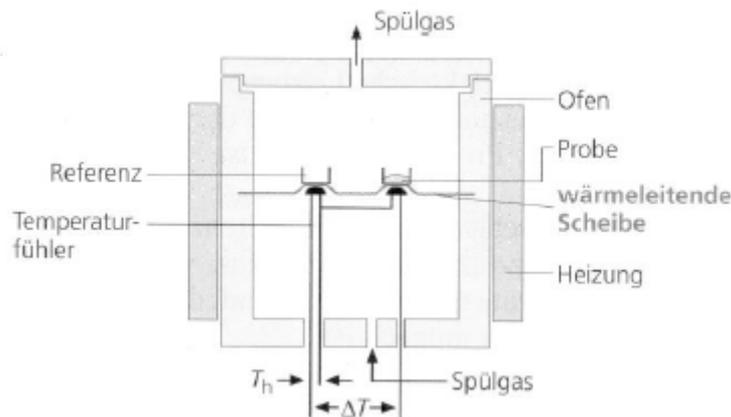
### B.5.3 DSC

Die DSC (Differential Scanning Calorimetry oder Dynamische Differenz-Kalorimetrie, DDK) gehört wie eine Vielzahl anderer Messmethoden zu den Thermischen Analysen. Das Verfahren beruht auf der Messung von Wärmestromdifferenzen zwischen einem Proben- und einem Referenztiegel. Dabei wird der Wärmestrom während des Temperaturprogramms quantitativ gemessen. Da der Wärmefluss eine auf den Tiegel übertragene Leistung darstellt, ist die Messeinheit Watt bzw. Milliwatt. Enthalpieänderungen, wie sie bei einer Kristallisation oder auch bei Schmelzvorgängen vorkommen, werden durch die Integration des Wärmeflusses über die Zeit erhalten. Dabei gilt: Je größer die Enthalpieänderung, umso größer ist auch das Integral (AUC = Area under the curve).

Die DSC ist ein einfaches und schnelles Verfahren zur Charakterisierung von Stoffen. Es dient der Qualitätskontrolle und –sicherung. So kann die Reinheit, Identität, Polymorphie und die Stabilität von Substanzen bestimmt werden. Die DSC macht Kristallisations- und Schmelzvorgänge ebenso sichtbar, wie Glasübergänge oder Vernetzungsprozesse. Ein großer Vorteil dieser Messmethode besteht in der sehr geringen Probenmenge. So sind Mengen im Milligrammbereich für eine Analyse ausreichend.

Grundsätzlich sind zwei Messanordnungen zu unterscheiden. Zum einen gibt es die Dynamische Wärmestrom-Differenz-Kalorimetrie und zum anderen die Dynamische Leistungskompensations-Differenz-Kalorimetrie.

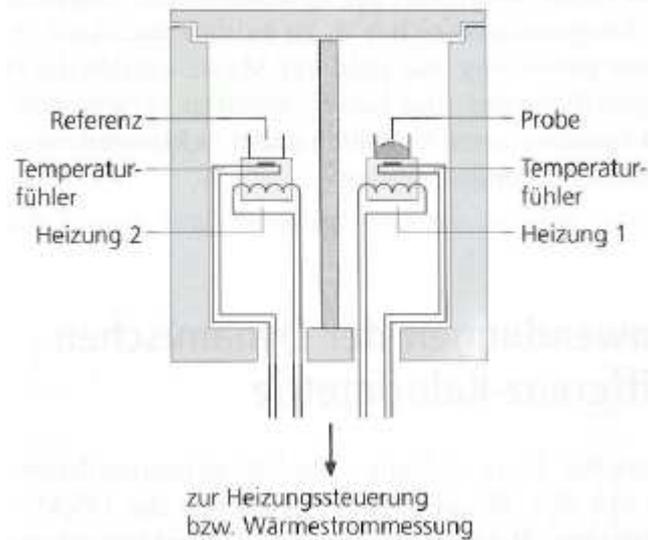
Bei der ersten Messanordnung befinden sich Probe und Referenz in einem Ofen auf einer Heizplatte (Abb. 17). Beide Tiegel erhalten die exakt gleiche Wärmezufuhr.



**Abb. 17 Schematischer Aufbau eines Dynamischen Wärmestrom-Differenz-Kalorimeters**  
 $T_h$  = Ofentemperatur ;  $\Delta T$  = Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz [55]

Kommt es bei der Probe zu einer Zustandsänderung, so ändert sich auch der Wärmestrom im Vergleich zum Referenztiegel. Diese Wärmestromdifferenz ist proportional zu der entstehenden Temperaturdifferenz. Die wiederum wird von dem Gerät gemessen und in eine Leistung (Wärmestrom) umgerechnet, sodass die Zeit in Minuten und die Temperatur in  $^{\circ}\text{C}$  gegen die Temperaturdifferenz in Milliwatt aufgetragen werden.

Bei der Dynamischen Leistungskompensations-Differenz-Kalorimetrie befinden sich Probe und Referenz in zwei verschiedenen Öfen, auch steht jedem Tiegel eine Heizung zur Verfügung (Abb. 18).



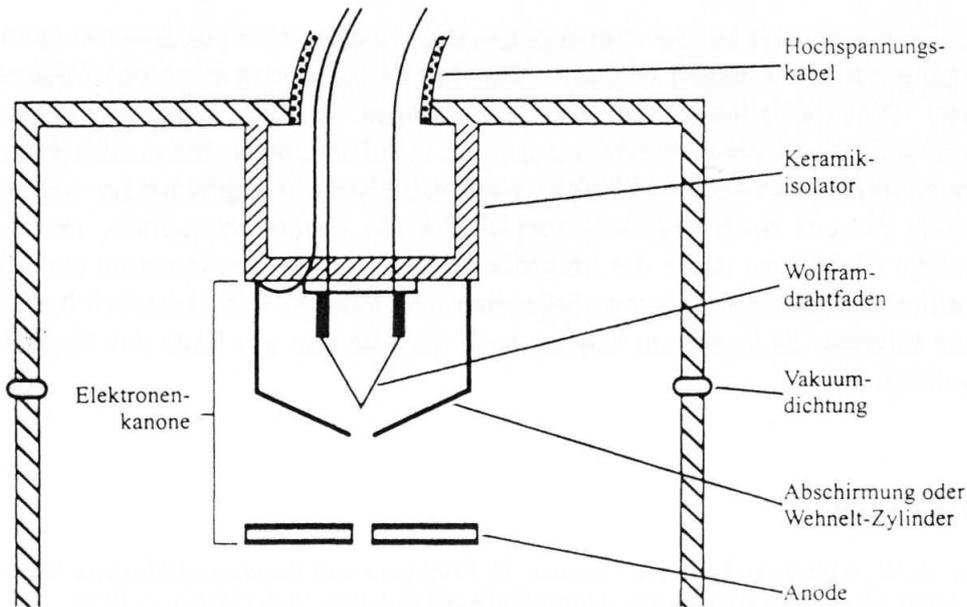
**Abb. 18 Schematischer Aufbau eines Dynamischen Leistungskompensations-Differenz-Kalorimeters [55]**

Bei diesem Versuchsaufbau werden die Temperatur der Probe und der Referenz gleich gehalten. Bei einer Zustandsänderung der Probe muss entweder mehr oder weniger Wärme zugefügt werden. Hier wird also direkt die notwendige Wärmeleistung gemessen. Gegen diese in Milliwatt werden dann die Zeit in Minuten und die Temperatur in °C aufgetragen.

Wie angesprochen ist die Temperaturdifferenz zu der Wärmestromdifferenz proportional und die Fläche bzw. das Integral des bei einer Zustandsänderung erhaltenen Peaks proportional zur Enthalpieänderung. Eine quantitative Analyse macht eine vorangegangene Kalibrierung erforderlich. Kalibriersubstanzen sollten einen scharfen Schmelzpeak zeigen, absolut rein und inert sein. Häufig werden Metalle, wie z. B. Indium, zu einer Kalibrierung herangezogen, da sie diese Anforderungen erfüllen. Eine Kalibrierung sollte für alle experimentellen Parameter erfolgen. Es ist jedoch zu beachten, dass eine größere Probenmasse den Peak nicht nur breiter und höher macht, sondern auch eine Verschiebung zu höheren Temperaturen verursacht. Daher sollten für eine Probenreihe, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, ähnliche Probenmassen eingesetzt werden. [27]

### **B.5.4 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterelektronenmikroskopie ist ein weit verbreitetes Verfahren, wenn es um die Abbildung von Strukturen und Oberflächen geht. Sein hohes Auflösungsvermögen und die Vergrößerungsmöglichkeiten erlauben es, auch kleinste Strukturen sichtbar zu machen und zu analysieren. Dazu wird ein Elektronenstrahl auf einen kleinen Punkt der Probe fokussiert und rastert diese zeilenweise ab. Die hierfür benötigten Elektronen werden in einer Elektronenkanone erzeugt (Abb. 19).



**Abb. 19** Schematische Darstellung einer Elektronenkanonenkammer

Im Wesentlichen werden drei Typen von Elektronenkanonen eingesetzt: eine Wolfram-Haarnadelektrode, eine Lanthanhexaborid-Kristallelektrode und eine Feldemissions-Elektronenkanone. Die Wolfram-Haarnadelektrode wird als Standard angesehen und soll hier beschrieben werden. Vorteile sind die Stabilität, die relativ kostengünstige Ersetzung und die Tatsache, dass kein Ultrahochvakuum für einen ordnungsgemäßen Betrieb notwendig ist. Die Wolframdrahtschleife, die haarnadelförmig gebogen ist, dient als Kathode. Eine angelegte Spannung erzeugt einen Stromfluss, der den Draht aufheizt. An der Spitze des Wolframfadens entsteht durch Glühemission eine Elektronenwolke. So wird diese Kathode auch als Glühkathode bezeichnet. Die Anode befindet sich auf einem Nullpotential, ist aber in Bezug auf den Faden positiv, und übt eine Anziehungskraft auf die Elektronen der Elektronenwolke an der Kathode aus. Die Elektronen werden in Richtung Anode beschleunigt. Der Wehnelt-Zylinder ist eine Metallkapsel und negativ geladen. Er wirkt auf die beschleunigten Elektronen abstoßend und erzeugt so eine elektrostatische Linse. Einige Elektronen treffen auf die Anode und tragen so nicht zur Bilderzeugung bei. Der Elektronenstrahl, der die Anodenöffnung passiert, trifft auf die Probe und kann diese abbilden. Dieser Vorgang findet im Hochvakuum statt, um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen aus der Luft zu vermeiden. Für eine Abbildung müssen die Proben elektrisch leitend sein. Da dies jedoch auf die meisten Proben nicht zutrifft, werden diese mit einer sehr dünnen Metallschicht versehen. So wird eine negative Aufladung verhindert. Dazu wird die Probe in einem Kathodenzerstäuber mit Gold bedampft. So entsteht eine Goldschicht mit einer Dicke von 10 bis 20 nm. Trifft der feine Elektronenstrahl auf die Probe, so wird dieser mit Hilfe von Ablenkspulen, die ein Magnetfeld erzeugen, in einem kontrollierten Muster (Raster) über die Probe geführt. Aufgrund komplexer Wechselwirkungen des

Elektronenstrahl mit der Probenoberfläche kommt es zur Bildung von Sekundärelektronen, die durch eine Saugspannung in Richtung des Detektors beschleunigt werden, und dort eine ihrer Menge entsprechende Anzahl von Impulsen erzeugen. Auf einer Erhebung der Oberfläche wird eine große Anzahl an Sekundärelektronen detektiert, eine große Anzahl Impulse wird erfasst, welche vom Detektor in einem hellen Punkt umgesetzt wird. Bei einer Vertiefung werden wenige Sekundärelektronen detektiert, die Anzahl der Impulse sinkt, ein dunkler Punkt wird abgebildet. So entsteht ein Bild aus tausenden Punkten unterschiedlicher Intensität, die der Topographie der Probe entsprechen. Sekundärelektronen entstehen bei der Wechselwirkung zwischen den einfallenden Elektronen und den schwach gebundenen Leitungsbandelektronen in den Probenatomen. Die Sekundärelektronen sind energiearm und für die Bilderzeugung von großer Bedeutung. Rückgestreute Elektronen des Elektronenstrahls sind energiereich. Sie werden auch zur Bilderzeugung genutzt, jedoch ist die Auflösung geringer als bei dem Bild, das von den Sekundärelektronen erzeugt wird. Das Rückstreuungselektronenbild ist ein Tiefenbild, während das Sekundärelektronenbild ein Oberflächenbild darstellt. So erreichen die meisten Rasterelektronenmikroskope eine Auflösung von 4 bis 6 nm. [24]

## B.6 Kontrollierte Wirkstofffreisetzung

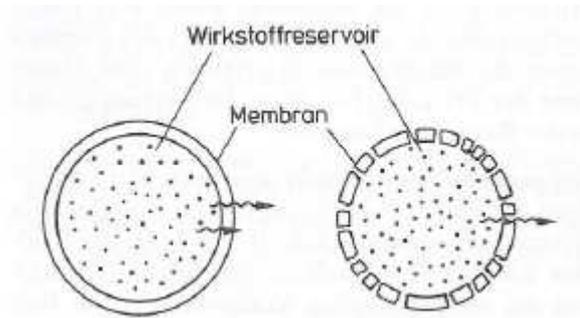
Potente und effiziente Wirkstoffe sollen helfen, Krankheiten zu bekämpfen, Schmerzen zu lindern und Menschen zu heilen. Eine noch so wirksame Substanz kann jedoch ihre Wirkung nicht entfalten, wenn sie nicht zum Wirkort gelangen kann. Die richtige Formulierung sorgt für eine gezielte Freisetzung zum richtigen Zeitpunkt, im richtigen Maße und am richtigen Ort. Zur Erfüllung dieser Kriterien stehen verschiedene Freisetzungsmodelle und modifizierende Formulierungssubstanzen zur Verfügung.

So gibt es Retardarzneiformen, die den Wirkstoff über einen verlängerten Zeitraum freisetzen oder Depotarzneiformen, die ein lokales Wirkstoffdepot im Muskel oder subcutan anlegen. Eine modifizierte Freisetzung beinhaltet verschiedene Freisetzungsmethoden, wie pH-abhängige Freisetzung, Burst-Effekt durch Platzen des Überzugs, Freisetzung aus einer Matrix, diffusionskontrollierte Freisetzung durch eine porenfreie oder eine porenhaltige Membran, Freisetzung mit Hilfe osmotischer Effekte und quellungskontrollierte Freigabe. [7]

Je nach Indikationsgebiet und gewünschter Wirkung finden die verschiedenen Freisetzungsmechanismen ihre Anwendung. Eine schnelle Resorption gefolgt von einem mehr oder weniger schnellen Abfall der Plasmakonzentration kann ebenso erwünscht sein, wie ein langsames Anfluten mit dem Erhalt eines wirksamen Plasmaspiegels über einen längeren Zeitraum.

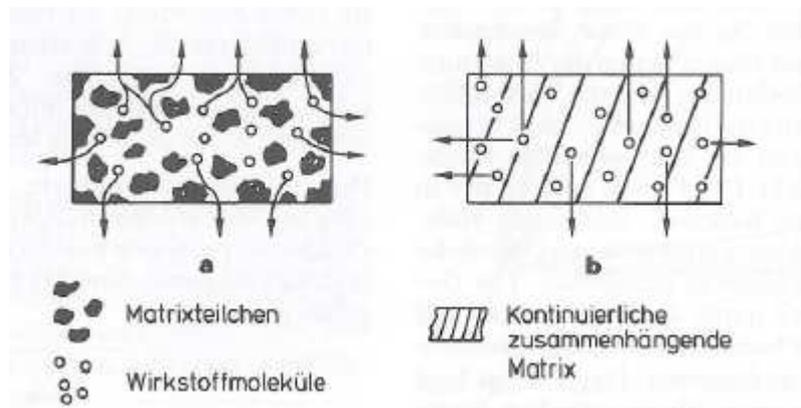
Vorteile der retardierten Freisetzung sind gleichmäßigere Plasmaspiegel, was zu einer Minderung an unerwünschten Nebenwirkungen führen kann, längere Wirkdauer und damit verbunden eine Verringerung der Einnahmehäufigkeit, welches wiederum die Patientencompliance verbessert, und verbesserte Wirkung durch Plasmaspiegel im therapeutischen Bereich über einen längeren Zeitraum. Wirkstoffe, die die Magenschleimhaut reizen oder auch solche, die im sauren Magen pH nicht beständig sind, können durch einen magensaftresistenten Überzug sicher im Darm freigesetzt werden. Einzeldosen von Retardformulierungen sind meist höher dosiert und bergen, z. B. bei unsachgemäßer Handhabung, die Gefahr eines Dose-Dumping, bei dem der gesamte Wirkstoff schlagartig freigesetzt wird. An Wirkstoffe, die in einer Retardformulierung angewendet werden sollen, werden somit besondere Anforderungen gestellt. So sind Wirkstoffe mit einer geringen therapeutischen Breite nicht für eine Retardarzneiform geeignet. Bei Wirkstoffen mit einer schnellen Elimination erreicht die zu applizierende Wirkstoffmenge einen Wert, der nicht mehr in einer Einzeldosis unterzubringen ist. Ist dagegen die Elimination langsam, so retardiert sich der Wirkstoff selbst über seine Eliminationsrate. Auch der Einsatz eines Prodrugs kann zu einer Retardierung führen. Interessant sind also solche Stoffe mit großer therapeutischer Breite, mittlerer Eliminationsrate und nicht zu großer Wirkstoffmenge je Einzeldosis.

In der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine topische Anwendung, bei der auch eine Retardierung des Wirkstoffs erwünscht ist. Die Freisetzung soll kontinuierlich über 3 bis 6 Monate verlaufen. Dies kann zum einen über eine unlösliche, porenfreie oder über eine porenhaltige Membran erfolgen, an der die Freisetzung diffusionskontrolliert erfolgt (Abb. 20).



**Abb. 20 Diffusionskontrollierte Freisetzung durch unlösliche, porenfreie Membran (links) und porenhaltige Membran (rechts) [7]**

Auch ist ein Matrixsystem denkbar. Hier wird zwischen heterogenen, porenhaltigen Matrices, bei denen die Diffusion durch die Poren erfolgt, und homogenen, porenfreien Matrices, der Wirkstoff diffundiert hier durch das Matrixmaterial, unterschieden (Abb. 21).



**Abb. 21 Matrixsystem; a heterogene, porenhaltige Matrix – Wirkstoff diffundiert durch die Poren; b homogene, porenfreie Matrix – Wirkstoff diffundiert durch das Matrixmaterial [7]**

Aus dem 1. Fick'schen Gesetz (Gl. 5) leitet sich die sog. Diffusionsgleichung ab. Sie beschreibt die diffusionskontrollierte Freisetzung durch eine Membran und wird auch als das 2. Fick'sche Gesetz der Diffusion bezeichnet (Gl. 6):

$$J = \frac{\partial m}{A \cdot \partial t} = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (\text{Gl. 5})$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (\text{Gl. 6})$$

<i>A</i>	<i>Querschnitt eines Volumenelementes (m<sup>2</sup>)</i>
<i>t</i>	<i>Zeit (s)</i>
<i>D</i>	<i>Diffusionskoeffizient</i>
<i>m</i>	<i>Masse</i>
$\frac{\partial c}{\partial x}$	<i>Konzentrationsgradient</i>
$\partial x$	<i>Diffusionsstrecke</i>
<i>J</i>	<i>Massenfluss</i>

Die Diffusionsgleichung beschreibt die Geschwindigkeit, mit der sich die Konzentration eines gelösten Stoffes an einem bestimmten Punkt *x* einer Lösung verändert. Diese Veränderung setzt sie dann zu der räumlichen Variation der Konzentration an diesem Punkt in Beziehung. [2] Vorausgesetzt wird, dass die Membran weder quillt noch sich auflöst und im System Sink-Bedingungen herrschen, d. h. auch wenn der verkapselte Wirkstoff gänzlich im Freisetzungsmedium gelöst ist, wird maximal ein Drittel der Löslichkeitsgrenze erreicht. Bei der diffusiven Freisetzung aus einem Membransystem kann zwischen einer Kinetik nullter und erster Ordnung unterschieden werden. [61] Bei einer Kinetik 0. Ordnung (Gl. 7) ist die Freisetzung Konzentrationsunabhängig. Die Geschwindigkeit bleibt konstant. Konzentrationsabhängig ist die Freisetzung bei einer Kinetik 1. Ordnung (Gl. 8). Mit sinkendem Wirkstoffgehalt nimmt auch die Freisetzung ab. [3]

$$\frac{\Delta C(t)}{\Delta t} = k \quad (\text{Gl. 7})$$

$$C(t) = C(0) \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{Gl. 8})$$

<i>C(t)</i>	<i>Konzentration zum Zeitpunkt <i>t</i></i>
<i>t</i>	<i>Zeit</i>
<i>C(0)</i>	<i>Konzentration zum Zeitpunkt 0</i>
<i>k</i>	<i>Geschwindigkeitskoeffizient</i>
<i>e</i>	<i>Eulersche Zahl = 2,718</i>

Die Freigabekinetik von Matrixsystemen kann durch die sog. „Higuchi-Gleichung“ beschrieben werden. Auf ein planares System bezogen unterscheidet Higuchi zwischen einer homogenen, porenfreien und einer heterogenen, porenhaltigen Matrix. [29; 30] Die Freisetzung aus der homogenen Matrix wird durch Gleichung (Gl. 9) beschrieben:

$$Q = \sqrt{Dt(2A - C_s)C_s} \quad (\text{Gl. 9})$$

Bei Betrachtung der heterogenen Matrix muss die Porosität des Systems mit berücksichtigt werden. Dies beschreibt Gleichung (Gl. 10) durch:

$$Q = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau}(2A - \varepsilon C_s)C_s t} \quad (\text{Gl. 10})$$

<i>Q</i>	<i>Wirkstoffmenge, die nach der Zeit t je Flächeneinheit abgegeben wird</i>
<i>D</i>	<i>Diffusionskoeffizient</i>
<i>A</i>	<i>Gesamtwirkstoffkonzentration in der Matrix je Volumeneinheit</i>
<i>t</i>	<i>Zeit</i>
<i>C<sub>s</sub></i>	<i>Löslichkeit des Wirkstoffs in dem die Matrix umgebenden Medium</i>
<i>ε</i>	<i>Porosität der Matrix</i>
<i>τ</i>	<i>Gewundenheitsfaktor des kapillaren Systems</i>

Wie Gleichung (Gl. 10) erkennen lässt, spielt die Matrixoberfläche bei der Freisetzung eine entscheidende Rolle. Die Porosität bestimmenden Kapillaren können gewunden oder geradlinig sein, einen kleinen oder großen Durchmesser besitzen, in großer Anzahl oder nur selten vorhanden sein. Bei einer porenfreien Matrix ist die Wirkstofflöslichkeit in der Matrix selbst von Bedeutung. Oberflächenbeschaffenheit und Stoffeigenschaften sind also wichtige Parameter für die Freisetzungsgeschwindigkeit. Ebenso sollte davon ausgegangen werden, dass die Wirkstofflöslichkeit  $C_s$  in dem die Matrix umgebenden Medium größer ist, als der gelöste Wirkstoffanteil  $A$  in der Matrix selbst. Um eine reelle Freisetzung messen zu können, müssen im System Sink-Bedingungen herrschen, d. h.  $A \ll C_s$ . Ist dies nicht der Fall, sondern es gilt  $A \gg C_s$ , so wird ein Pseudo Steady State erreicht. Dies bedeutet, dass genauso viel in die Matrix hinein-, wie auch hinausdiffundiert. Wird eine homogene Porengröße und gleichmäßige Porenverteilung vorausgesetzt, so ist die Freisetzungsraten noch eine Funktion der Zeit und der Oberfläche.

Für die Anwendbarkeit der Higuchi-Gleichung gelten folgende Vereinfachungen: Die dem Freisetzungsmedium zugängliche Oberfläche ändert sich im Verlauf des Versuchs weder durch Erosion noch durch Quellung. Für eine konstante Lösungsgeschwindigkeit müssen Sink-Bedingungen herrschen. Die Porosität, die durch den herausgelösten Wirkstoff bedingt ist, bleibt unberücksichtigt. Eine Übereinstimmung der theoretisch und praktisch ermittelten Freisetzung ist bis zu einer Freisetzungsraten von 50 % gegeben. [29; 30]

Die Gleichung nach Peppas kann ebenfalls genutzt werden, die Freisetzung eines Wirkstoffs zu beschreiben. Das 2. Fick'sche Gesetz und die Higuchi Gleichung sind Sonderfälle der Peppas Gleichung. Sie beschreiben die Freisetzung, die auf diffusive Vorgänge zurückzuführen ist. Die Gleichung nach Peppas lautet (Gl. 11):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (\text{Gl. 11})$$

- $M_t$  Freigesetzte Arzneistoffmenge zum Zeitpunkt  $t$   
 $M_\infty$  Insgesamt freigesetzte Arzneistoffmenge  
 $k$  Geschwindigkeitskonstante  
 $t$  Zeit  
 $n$  Die Freisetzung beschreibender Exponent

Der Exponent  $n$  und die Geschwindigkeitskonstante  $k$  werden durch die strukturellen und geometrischen Charakteristiken, die das System beinhaltet, beeinflusst. So kann durch den Exponent  $n$  eine diffusive, anomalische und durch Quellung verursachte Freisetzung beschrieben werden (Tabelle 1). [61]

**Tabelle 1 Freisetzungskinetik und –mechanismus in Abhängigkeit des Freisetzungsexponenten  $n$  für verschiedene geometrische Körper**

Exponent $n$			Kinetik und Freisetzungsmechanismus
Planare Fläche	Zylinder	Kugel	
0,5	0,45	0,43	Fick'sche Diffusion $\sqrt{t}$ - Kinetik
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Anomaler Transport
1,0	0,89	0,85	Polymerquellung Kinetik 0. Ordnung

## C Ergebnisse und Diskussion

### C.1 Allgemeine Vorversuche und Techniken

#### C.1.1 Auswahl des Lösungsmittels

Für die Verkapselung von Wirkstoffen in einer Polymermatrix wird für viele Herstellungsverfahren vorausgesetzt, dass Lösungsmittel existieren, welche sowohl das Polymer als auch den Wirkstoff lösen. In der hier vorliegenden Arbeit wird vor allem auf das Sprühtrocknungs- und das Emulsion Evaporation Verfahren eingegangen. Voraussetzung für das Emulsion Evaporation Verfahren ist eine Emulsion, bei der das organische Lösungsmittel die einzelnen Formulierungsbestandteile löst und gleichzeitig unmischbar mit der wässrigen Phase ist. Zudem sollte die organische Phase möglichst untoxisch sein und einen wesentlich niedrigeren Siedepunkt als Wasser haben, damit sie leicht abgedampft werden kann. Diese Bedingungen minimieren die Zahl der möglichen Lösemittel erheblich. Schwefelkohlenstoff und Dichlorethan scheiden wegen ihrer Giftigkeit aus. Zur Verfügung stehen Dichlormethan, Chloroform (=Trichlormethan) und Ethylacetat. Die Siedepunkte der Lösemittel sind Tabelle 2 zu entnehmen. [62; 63; 64]

**Tabelle 2 Siedepunkte der Lösemittel**

<b>Lösemittel</b>	<b>Siedepunkt [°C]</b>
Dichlormethan	39,8 - 40
Chloroform	60,5 - 61,5
Ethylacetat	76,5 - 77,5

Den Siedepunkten nach scheint sich Dichlormethan für das Emulsion Evaporation Verfahren am besten zu eignen. Bei der Sprühtrocknung sollte ein höherer Siedepunkt kein Problem darstellen. Sowohl Chloroform als auch Dichlormethan sind wasserunlöslich. Ethylacetat löst sich mit 7,8 % in Wasser. [8]

Versuche mit Chloroform zeigen, dass sich die Formulierungen im Emulsion Evaporation Verfahren nicht so geschmeidig verarbeiten lassen, wie mit Dichlormethan. Zudem ist ein Aufheizen der Emulsion zum Entzug des Lösemittels auf über 60 °C als kritisch zu betrachten, da einige Formulierungen eine Glasübergangstemperatur aufweisen, die in diesem Temperaturbereich liegt. Die aus der Chloroformphase entstandenen Partikel liegen in ihrer Größe über denen der Partikel, die aus der Dichlormethanphase erhalten werden. Somit ist Dichlormethan Chloroform in der Partikelherstellung vorzuziehen.

Ethylacetat ist durch seinen hohen Siedepunkt für einen Einsatz im Emulsion Evaporation Verfahren nicht geeignet. Dies ist für das Sprühtrocknungsverfahren, bei dem Emulsionen versprüht werden, als nicht problematisch zu sehen. Die, wenn auch geringe Löslichkeit von Ethylacetat in Wasser stellt sich jedoch als kritisch heraus. Wird im Herstellungsprozess die organische Phase in die Wasserphase gegeben, vermischt sich das Ethylacetat sofort solange mit dem Wasser, bis seine Löslichkeitsgrenze erreicht ist. Das in der organischen Phase gelöste Polymer droht auszufallen, wenn der Arbeitsschritt der Zugabe des Lösemittels zu langsam verläuft. Ist dieser kritische Punkt überwunden, kommt es zur Bildung einer stabilen Emulsion. Bei einer Formulierung mit Polystyrol und Eudragit® S wird in der Sprühtrocknung ein voluminöses Produkt erhalten, das im redispergierten Zustand sehr kleine Partikel erkennen, sich aber auch schlecht benetzen lässt. Eine REM-Aufnahme dieser Probe zeigt fadenartige Polymerstrukturen und zusammengefallene Partikel. Aufgrund der Löslichkeit in Wasser und der sich daraus ergebenden kritischen Phase der Zugabe von Ethylacetat in die Wasserphase, wird von einer weiteren Verwendung dieses Lösemittels abgesehen.

Mittel der Wahl mit bestmöglichen Lösemittleigenschaften bleibt Dichlormethan. Zudem ist dies für den Einsatz in den hier verwendeten Verfahren gebräuchlich. [56; 65]

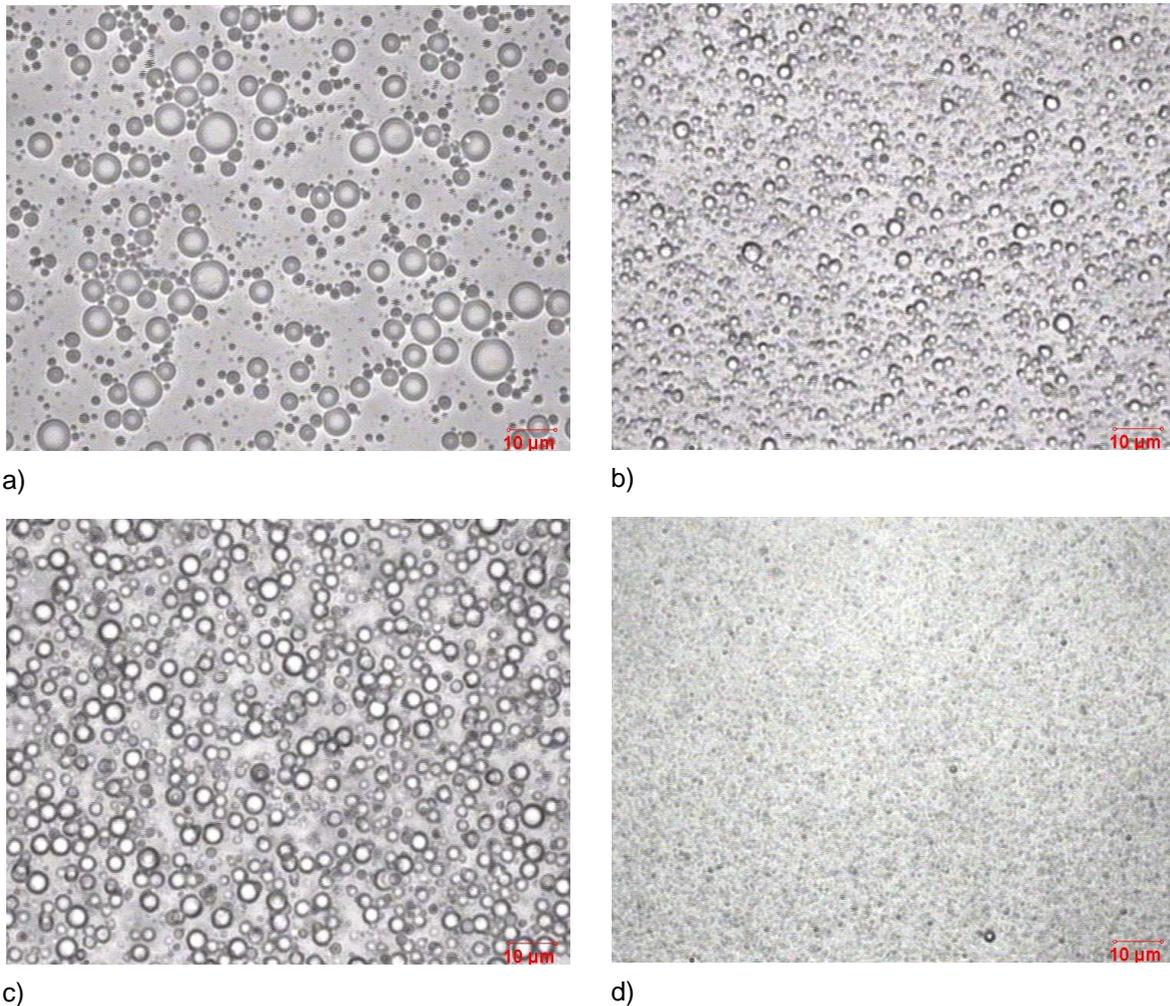
### **C.1.2 Homogenisierung**

Gemäß Herstellungsvorschrift wird die organische Phase mit Hilfe des UltraTurrax in der wässrigen Grundlage dispergiert. Der Energieeintrag ist nötig, um eine stabile Emulsion zu erzeugen. Trotz des Erhalts eines stabilen Systems zeigen mikroskopische Aufnahmen, dass die Tröpfchen teilweise noch sehr groß sind oder dass die Tröpfchengrößenverteilung sehr inhomogen ist (Abb. 22).

Es wird davon ausgegangen, dass sich die Homogenität der Emulsion auch auf die Partikelgrößenverteilung der Suspension auswirkt, die beim Emulsion Evaporation Verfahren erhalten wird. Dies kann damit begründet werden, dass sich in den Tropfen der organischen Phase die Bestandteile der Partikel befinden. In großen Tropfen ist mehr Polymer gelöst, welche dann große Partikel zur Folge haben.

Eine weitere Homogenisierung ist notwendig, wenn kleine Partikel mit einer monomodalen Größenverteilung erhalten werden sollen. Für diese Optimierung wird der Microfluidizer M-110Y der Firma Microfluidics verwendet. Er presst die Emulsion pulsatil durch zwei Interaktionskammern, die mit einem porösem Keramikmaterial definierter Porengröße gefüllt sind. Dabei besitzt die erste Kammer einen größeren Porendurchmesser als die darauf folgende. Eine weitere Optimierung kann durch Erhöhung des Drucks, der die Lösung durch die Kammern pumpt, oder durch Minimierung der Porendurchmesser der

Interaktionskammern erreicht werden. Eine Verkleinerung der Tröpfchengröße ist nicht bei jeder Emulsion im gleichen Maße zu erreichen (Abb. 22):



**Abb. 22 Emulsionen vor und nach Einsatz des Microfluidizer (MF); a) PS Formulierung ohne MF; b) PS Formulierung mit MF; c) PMMA Formulierung ohne MF; d) PMMA Formulierung mit MF**

Die Bilder a) und b) zeigen eine Polystyrol Formulierung. Eine Verbesserung nach Einsatz des Microfluidizer ist deutlich sichtbar, jedoch scheint das Ergebnis nicht optimal. c) und d) zeigen eine PMMA Formulierung. Die Verbesserung ist augenscheinlich. Ein homogenes Emulsionsbild wird erhalten. Trotz des apparenten suboptimalen Ergebnisses in b) resultieren aus dieser Formulierung Partikel mit einer engen Größenverteilung. Ein erneutes Bearbeiten mit dem Microfluidizer oder eine Erhöhung des Druckes zur besseren Homogenisierung ist nicht erforderlich. Zudem muss beachtet werden, dass ein nicht unerheblicher Energieeintrag stattfindet. Die Emulsion erwärmt sich beim Durchgang durch den Microfluidizer, sodass ein Teil der organischen Phase dem System entweicht, da Dichlormethan einen geringen Siedepunkt von 40 °C [ 63] besitzt. Dieser Verlust kann das System möglicherweise in seinen Eigenschaften verändern und negativ beeinflussen. Die gleiche Polymermenge ist dann in einer geringeren Menge Dichlormethan gelöst. Die

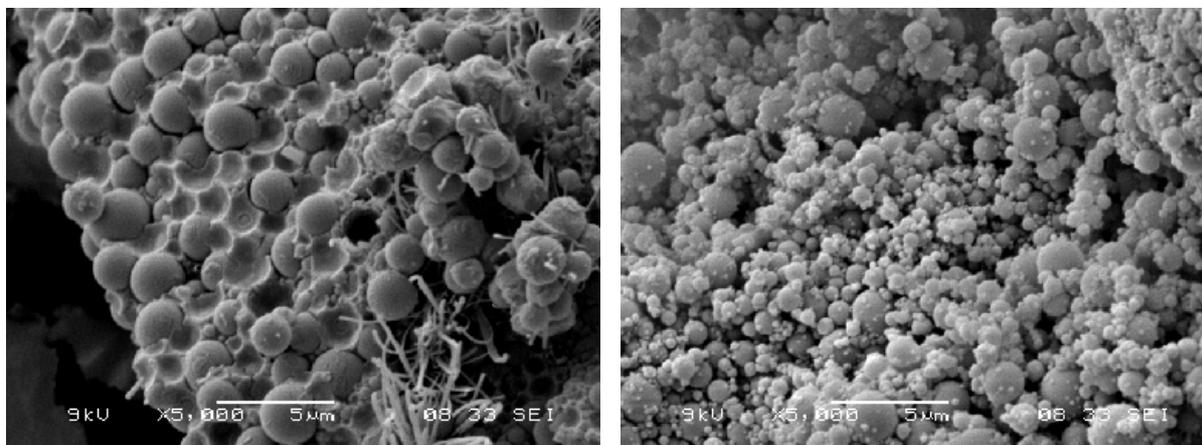
organische Phase wird dadurch viskoser und ein Ausfallen oder Koaleszieren der Tropfen wahrscheinlicher. Es sollte daher darauf geachtet werden, das Emulsionssystem durch äußere Einflüsse möglichst wenig zu verändern.

### **C.1.3 Aufreinigung**

Das anfängliche Verständnis der Formulierung beruht auf der Annahme, dass Polymer, Wirkstoff und Emulgator nach dem Verdampfen der organischen Phase in Form von Partikeln in einer wässrigen Phase vorliegen, deren pH-Wert an das System angepasst wurde (meist basisch). Ein Waschschrift scheint nicht nötig. Zudem lässt sich die Suspension schwerlich filtrieren und bei einer Zentrifugation bleibt ein gewisser Partikelanteil im Überstand, der nicht sedimentiert. Wird die wässrige Phase bei Raumtemperatur abgedampft, bildet sich eine glasartige, weißlich gelbe Schicht auf den Partikeln. Es zeigt sich, dass diese glasartige Schicht vom Emulgator gebildet wird, der bei dem Trocknungsvorgang verfilmt. Aufgrund des vorhandenen Überschuss werden in C.2.1.3 Versuche zur Optimierung des Emulgatoranteils durchgeführt. Dabei stellt sich heraus, dass keine Sättigung der Oberflächen mit Emulgatormolekülen erfolgt, sondern dass es vielmehr zu einer Ausbildung eines Verteilungsgleichgewichtes zwischen wässriger und organischer Phase kommt. Für den Erhalt einer stabilen Emulsion muss der Emulgator demnach im Überschuss eingesetzt werden. Zur Entfernung der überschüssigen Edukte ist ein nachgeschalteter Aufreinigungsschritt nötig. Anfangs ist Filtration das Mittel der Wahl. Dies ist eine sehr schonende Methode, die zudem Produktverluste bei geeignetem Filtermaterial nahezu ausschließt. Der Filter geeigneter Porengröße muss zudem pH-beständig sein, da die Suspensionen meist stark basisch sind. Unter diesen Voraussetzungen findet sich ein PESU-Filter (Polyethersulfon) der Firma Sartorius mit einer Porengröße von  $\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$ . Diese Art der Aufreinigung ist jedoch nicht optimal. Der Filter verstopft sehr schnell und eine zeitintensive Filtration ist die Folge. Gewaschen werden die Partikel durch die Zugabe von destilliertem Wasser, bis das Filtrat einen nahezu neutralen pH-Wert erreicht. Trocknen die auf dem Filter erhaltenen Partikel, so lassen sie sich einfach mörsern, jedoch schlecht redispergieren. Werden die Partikel vor ihrer Eintrocknung wieder redispergiert, wird eine homogene, aggregatfreie Suspension erhalten. Eine Verbesserung des Filtrationsvorgangs konnte nicht erzielt werden.

Durch das Verfahren der Zentrifugation lässt sich die Partikelsuspension ebenfalls aufreinigen. Sehr kleine Partikel sedimentieren nicht bei der angewendeten Zentrifugalkraft und verbleiben im Überstand. Dieser wird im Verlauf des Waschvorgangs mehrmals ausgetauscht und verworfen, sodass hier ein Partikelverlust entsteht, der jedoch so marginal ist, dass keine veränderten Ergebnisse zu erwarten sind.

Um zu zeigen, dass ein Waschschrift zu der gewünschten Aufreinigung führt, wird der eine Teil der erhaltenen Partikelsuspension filtriert, während bei dem anderen Teil lediglich das Wasser bei Raumtemperatur abgedampft wird. Die so erhaltenen Partikelproben werden zum einen im Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet, als auch einer Partikelgrößenanalyse mittels Laserdiffraktometrie unterzogen.



a)

b)

**Abb. 23 Polystyrolpartikel mit MSCP 50/50 als Emulgator a) ungewaschen; H<sub>2</sub>O verdampft bei RT; b) gewaschen mit H<sub>2</sub>O**

In Abb. 23 ist zu sehen, dass ein Waschvorgang in jedem Fall eine Aufreinigung des Produktes bedeutet. a) zeigt die ungewaschene Probe. Runde Partikel mit glatter Oberfläche sind erkennbar, jedoch scheinen diese Partikel wie eingebettet. Leere Buchten, in denen auch Partikel lagen, bleiben zurück. Im unteren Bildteil ist eine fadenartige Verunreinigung zu sehen, die eventuell vom eingesetzten Polymer stammt. Die ungewaschenen Partikel lassen sich besser redispergieren, was auf die Partikel einbettende Substanz zurückzuführen ist. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hier um einen Überschuss an Emulgator handelt, der neben den Partikeln ausfällt. Durch diesen Überschuss, der bei einem Redispergiervorgang wieder in Lösung geht, wird eine größere Agglomeratbildung unterbunden. Die Partikelgrößenverteilung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Der geringe D(90)-Wert dieser ungewaschenen Partikel zeigt, dass kaum Agglomerate vorhanden sein können.

**Tabelle 3 Partikelgrößenanalyse redispergierter Partikel gewaschen und ungewaschen**

Probe	Dispergiermedium	Ultraschall	D(10) [µm]	D(50) [µm]	D(80) [µm]	D(90) [µm]
PS Partikel ungewaschen	Wasser	6 min	0,797	1,571	2,401	2,997
PS Partikel gewaschen	0,1 % wässrige DOS Na-Lösung	6min	0,738	2,077	11,733	19,327

Die gewaschenen Partikel zeigen ein deutlich anderes Bild. In der REM-Aufnahme sind keine Verklebungen oder andere Überreste zu sehen (Abb. 23). Die Partikel liegen nebeneinander vor, wobei anhand der Aufnahme nicht beurteilt werden kann, ob die Partikel vereinzelt sind. Die Größenverteilung scheint hier wesentlich nach kleineren Größen verschoben zu sein. Dies ist zum Teil mit einer fehlenden Homogenisierung der Suspension vor der Aufteilung in gewaschen und ungewaschen zu erklären, außerdem ist ein Verschwinden der kleinen Partikel im Emulgatorüberschuss in der ungewaschenen Probe denkbar. Kleinere Partikelgrößen der gewaschenen Probe sind nach Betrachtung der REM-Aufnahmen zu erwarten. Die Partikel lassen sich jedoch schlecht redispergieren. Der Einsatz einer tensidischen Lösung als Dispergierhilfsmittel verbessert zwar die Benetzung, kann aber auch nicht alle Agglomerate auflösen. Die genaue Größenverteilung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Der extreme Anstieg vom D(50)- zum D(80)- und D(90)-Wert ist nur durch vorhandene Agglomerate zu erklären. Durch den Einsatz von Ultraschall, der in die Messeinheit des Laserdiffraktometers integriert ist, kann eine Verbesserung der Partikelgrößenverteilung erzielt werden. Agglomerate lassen sich so, zumindest teilweise, singularisieren.

Es soll noch darauf hingewiesen werden, dass die hier beschriebene Formulierung einen sehr hohen Emulgatoranteil besitzt. Der damit verbundene Überschuss ist demzufolge auch besonders groß. Der deutliche Unterschied zwischen gewaschen und ungewaschen verwundert daher nicht. Ein weiterer Versuch zu dieser Thematik, mit einer Formulierung mit der geringsten möglichen Menge an Emulgator, führt zu den gleichen Ergebnissen, auch wenn der Emulgatorüberschuss hier nicht so groß ist. Es konnte gezeigt werden, dass ein Waschschrift eine Aufreinigung bewirkt und den Überschuss an eingesetzten Edukten entfernt.

Dieses Phänomen wirkt sich auch auf den Wirkstoffgehalt der Probe aus. Der Gehalt wird auf die eingesetzte Feststoffmenge bezogen. Dazu gehören das Polymer, der Emulgator und der Wirkstoff. Verringert sich eine dieser Komponenten, wird der Wirkstoff auf eine geringere Gesamtmenge bezogen. Dies hat zur Folge, dass der Wirkstoffgehalt steigt. Zur Stützung dieser Theorie wird der Gehalt einer Partikelcharge bestimmt, deren eine Hälfte gewaschen und die andere ungewaschen vorliegt. Zudem wird die gleiche Formulierung mit steigendem Wirkstoffgehalt im gewaschenen Zustand auf ihre Wirkstoffmenge hin untersucht.

**Tabelle 4 Wirkstoffgehalt gewaschener und ungewaschener Polystyrol Formulierungen**

<b>Probe</b>	<b>Theoret. Wirkstoffgehalt [%]</b>	<b>Prakt. Wirkstoffgehalt [%]</b>
7a_EE ungewaschen	9	6,3
7a_EE gewaschen	9	10,5
7b-4_EE gewaschen	13	14,5
7c-5_EE gewaschen	17	19,2

Tabelle 4 zeigt, dass bei der gleichen Probe im gewaschenen und ungewaschenen Zustand ein sehr unterschiedlicher Wirkstoffgehalt festgestellt werden kann. Bei allen drei gewaschenen Proben ist der ermittelte Wirkstoffgehalt höher als der theoretisch berechnete. Dies bestätigt die Vermutung, dass der Gehalt bei den um den überschüssigen Emulgator befreiten Partikeln durch die Verringerung der Gesamtmasse steigt. Eine Steigerung von ~ 2 % absolut ist möglich und realistisch, wenn die Partikel gewaschen werden.

#### **C.1.4 Freisetzung**

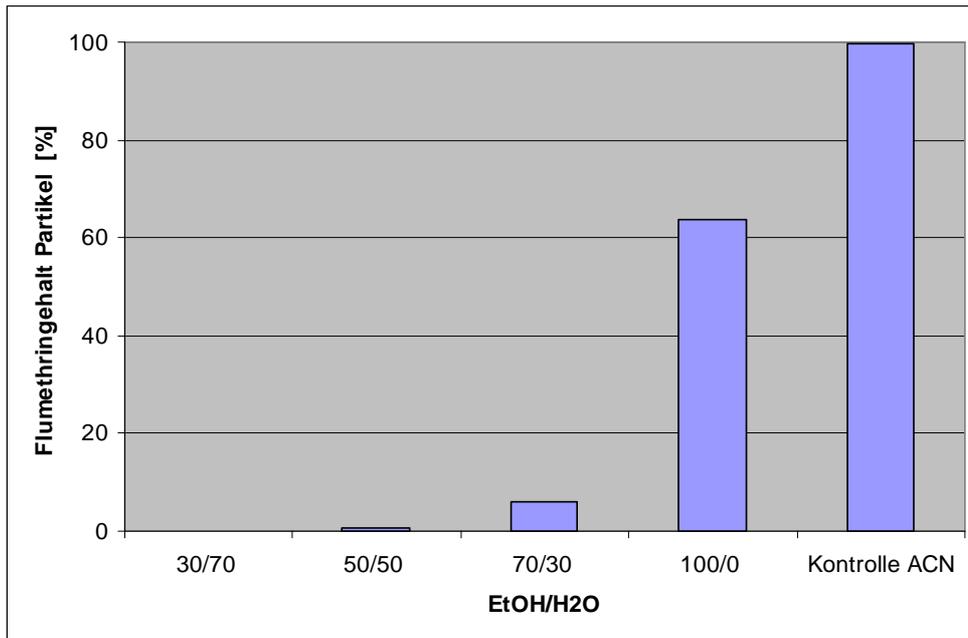
Neben einer guten Verkapselung des Wirkstoffs ist es auch wichtig, dass die aktive Substanz die Matrix wieder verlassen und ihre Wirkung entfalten kann. Um eine kontrollierte Freisetzung zu erreichen, ist der Einsatz von In vitro Tests unerlässlich. [23] Zudem kann so eine Freisetzung unter standardisierten Bedingungen stattfinden. So können verlässliche Aussagen getroffen und der Einfluss verschiedener Parameter untersucht werden. Dabei sollte das ausgesuchte Freisetzungsmodell dem späteren Anwendungsbereich so nahe wie möglich sein. Die für dieses Projekt erarbeitete Formulierung dient der Bekämpfung von Zecken und Flöhen und soll im Hundefell haften. Die Freisetzung findet demzufolge nicht auf der Hundehaut statt, sondern tatsächlich im Fell des Hundes. Diese Freisetzungsbedingungen sind im Labor schwerlich nachzustellen. Ein Freisetzungsmedium scheint in diesem Fall nicht zu existieren, wobei beachtet werden muss, dass das Hundefell von einer natürlichen Sebumschicht überzogen ist, deren Zusammensetzung individuell unterschiedlich ist. Inwieweit diese Sebumschicht die Freisetzung beeinflusst und vorantreibt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig zu beantworten. Ein Freisetzungsmodell, welches die Sebumschicht als wichtigen Faktor der Freisetzung wieder aufgreift, wird in C.5 näher beschrieben. Für eine quantitative, reproduzierbare Analyse der eingesetzten Wirkstoffmenge ist das Vorhandensein eines Freisetzungsmediums jedoch fast unerlässlich. Dabei muss beachtet werden, dass auf diese Weise erhaltene Freisetzungskurven lediglich dem Vergleich verschiedener Formulierungen dienen können, und ein Bezug zu der Freisetzung auf dem Hund nicht direkt möglich ist.

Das Freisetzungsmittel sollte einfach in der Handhabung sein, es darf das Kapselmittel weder auflösen noch quellen, muss aber den Wirkstoff lösen und es muss mit der Analyse- methode der HPLC kompatibel sein. Als geeignet zeigt sich eine Ethanol-Wasser- Mischung. [17] Welches Mischungsverhältnis als optimal zu betrachten ist, soll ein Freisetzungsversuch über 24 h bei verschiedenen Mischungsverhältnissen von Ethanol und Wasser zeigen. Für eine diffusive Freisetzung müssen dafür Sink-Bedingungen herrschen, nur so kann davon ausgegangen werden, dass sich kein Steady State zwischen der Diffusion in und aus der Matrix heraus einstellt. [29] Dafür ist es notwendig, die Löslichkeiten des Wirkstoffs Flumethrin in den Ethanol-Wasser-Mischungen zu kennen. Vorversuche hierzu wurden bereits durchgeführt. [9] Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen, dass die Löslichkeit des Wirkstoffs Flumethrin stark sinkt, sobald das Lösungsmittel einen auch nur geringen Wasseranteil besitzt.

**Tabelle 5 Löslichkeiten von Flumethrin in Ethanol-Wasser-Mischungen**

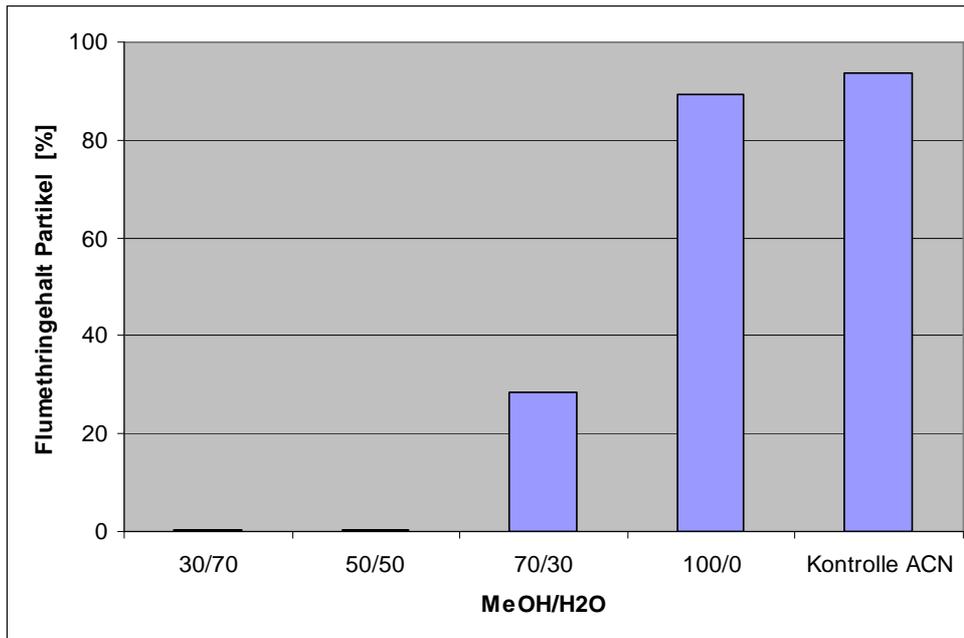
<b>Lösungsmittelmischung Ethanol / Wasser</b>	<b>Gehalt Flumethrin [%]</b>
Ethanol / Wasser 4:6	3,498e-4
Ethanol / Wasser 5:5	4,548e-3
Ethanol / Wasser 7:3	0,0694
Ethanol / Wasser 8:2	0,527
Ethanol / Wasser 9:1	1,976
Ethanol / Wasser 10:0	10,34

Für die Freisetzungsversuche werden folgende Ethanol-Wasser-Mischungen in einem Versuchszeitraum von 24 h getestet: 30/70; 50/50; 70/30; 100/0. Während der Versuchsdauer werden die Proben bei Raumtemperatur geschüttelt (vgl. E.2.4.2) Nach 24 h werden die Proben filtriert und mittels HPLC vermessen. Das Ergebnis ist Abb. 24 zu entnehmen.



**Abb. 24 Freisetzung Flumethrin bei unterschiedlichen Lösemittelzusammensetzungen bezogen auf den Flumethringehalt der Partikel**

Es ist gut zu erkennen, dass mit steigendem Ethanol-Gehalt auch die freigesetzte Menge Flumethrin steigt. Um verschiedene Formulierungen miteinander vergleichen zu können, ist sowohl eine sehr große als auch eine sehr kleine Freisetzungsrates nicht von Vorteil. Bei einer mittleren Freisetzung sollten Unterschiede in der Freisetzung am sichersten auswertbar sein. Nach Abb. 24 ist die Ethanol-Wasser-Mischung 70/30 optimal für den Vergleich des Freisetzungsverlaufs verschiedener Formulierungen. Dieses Freisetzungsmittel ist allerdings nur für die Flumethrin beladenen Polystyrolpartikel geeignet. Nach [17] löst sich PMMA in reinem Ethanol, und selbst in Mischungen aus Ethanol und Wasser ist es nicht stabil. Methanol dagegen soll PMMA nicht lösen. Analog zu der Freisetzung in Ethanol-Wasser-Mischungen wird bei den PMMA Partikeln mit Methanol-Wasser-Mischungen verfahren. Das Ergebnis dieser Freisetzung ist in Abb. 25 zu sehen:



**Abb. 25 Freisetzung Flumethrin bei unterschiedlichen Lösemittelzusammensetzungen bezogen auf den Flumethringehalt der Partikel**

Bei den PMMA Partikeln ist ebenfalls eine mittlere Freisetzung von Vorteil, wenn verschiedene Formulierungen miteinander verglichen werden sollen. Das Verhältnis 70/30 Methanol zu Wasser zeigt sich optimal. Ein direkter Vergleich der PMMA- und Polystyrolformulierungen ist durch die Wahl der unterschiedlichen Freisetzungsmedien nicht ohne weiteres möglich.

Die Freisetzung wird durch das eingesetzte Freisetzungsmedium beeinflusst. [23; 52] Auch die physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs und für die Herstellung benötigte Zusätze können die Freisetzungskinetik beeinflussen. [19; 23; 52; 54]

## **C.2 Polystyrol**

### **C.2.1 Emulsion Evaporation Verfahren**

#### **C.2.1.1 Einfluss des Wirkstoffgehalts**

Der Wirkstoffgehalt der Partikel ist für eine langsame und lang andauernde Freisetzung von großer Bedeutung. Je mehr Wirkstoff das Partikel enthält, umso mehr kann theoretisch auch freigesetzt, und umso länger kann die notwendige Wirkkonzentration gehalten werden. Die verkapselbare Wirkstoffmenge ist limitiert. Je nach Größe und Herstellungsverfahren der Partikel lässt sich mehr oder weniger Wirkstoff in den Kapseln unterbringen. In Bezug auf Flumethrin als Modellwirkstoff und das Emulsion Evaporation Verfahren als Herstellungsmethode ergibt sich eine experimentelle Höchstkonzentration von ~ 20 % (m/m). Mehr Wirkstoff liegt als Überschuss außerhalb der Kapseln vor und verklebt diese so sehr, dass sie nicht mehr singularisiert werden können.

In der hier vorliegenden Arbeit wird mit drei Konzentrationsabstufungen gearbeitet: 9, 13 und 17 % (m/m). Bei einer praktischen Überprüfung dieser Werte werden jedoch Konzentrationenerhalten, die eine Abstufung von ca. 10, 15 und 20 % (m/m) zeigen (siehe C.1.3). Diese Konzentrationssteigerung ist dadurch zu erklären, dass die Edukte nicht vollständig zum Produkt umgesetzt werden. Besonders ist hier der Emulgator zu nennen, der dem System im Überschuss zugesetzt wird. Ein Teil bleibt in der wässrigen Lösung als gelöster Bestandteil zurück. Dieser verringert den Feststoffgehalt, sodass die eingesetzte Wirkstoffmenge auf eine kleinere Masse bezogen werden muss. Eine Variation des Wirkstoffgehalts soll zeigen, wie sich die Eigenschaften der Partikel verändern, z. B. Größe, Glasübergangstemperatur, Freisetzung.

##### **C.2.1.1.1 Partikelgröße**

Für diesen Versuch wird eine Formulierung gewählt, die in Vorversuchen eine stabile Emulsion und Partikel in einer praxisrelevanten Größe ergibt. Vermessen wird hier in allen Fällen die Suspension, die nach dem Abzug des Lösungsmittels erhalten wird. Werden die Partikel gewaschen, getrocknet und dann wieder redispersiert, kann es zu Agglomeraten kommen, die eine genaue Messung der Partikelgröße erschweren. Zur Ermittlung der Größenverteilung wird die Laserdiffraktometrie herangezogen (siehe Kap. B.5.1). Mit dieser Methode lassen sich Partikel in einem Größenbereich von 0,02 bis 2000  $\mu\text{m}$  messen. [41] Die Ergebnisse werden volumenbasiert errechnet. Zu weiteren Geräteangaben siehe E.2.3.2.

Die untersuchten Formulierungen setzen sich wie folgt zusammen (Tabelle 6):

**Tabelle 6 Standardformulierung**

Substanz	Menge
Polystyrol	2,64 g (m/m bezogen auf die organische Phase) ± 5 %
Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer (MSCP14)	1,05 g (m/m bezogen auf Polymermasse) ± 28 %
Flumethrin	0 – 0,75 g (m/m bezogen auf Feststoffanteil) ± 0-19 %
Wasser	160 ml
Dichlormethan	40 ml

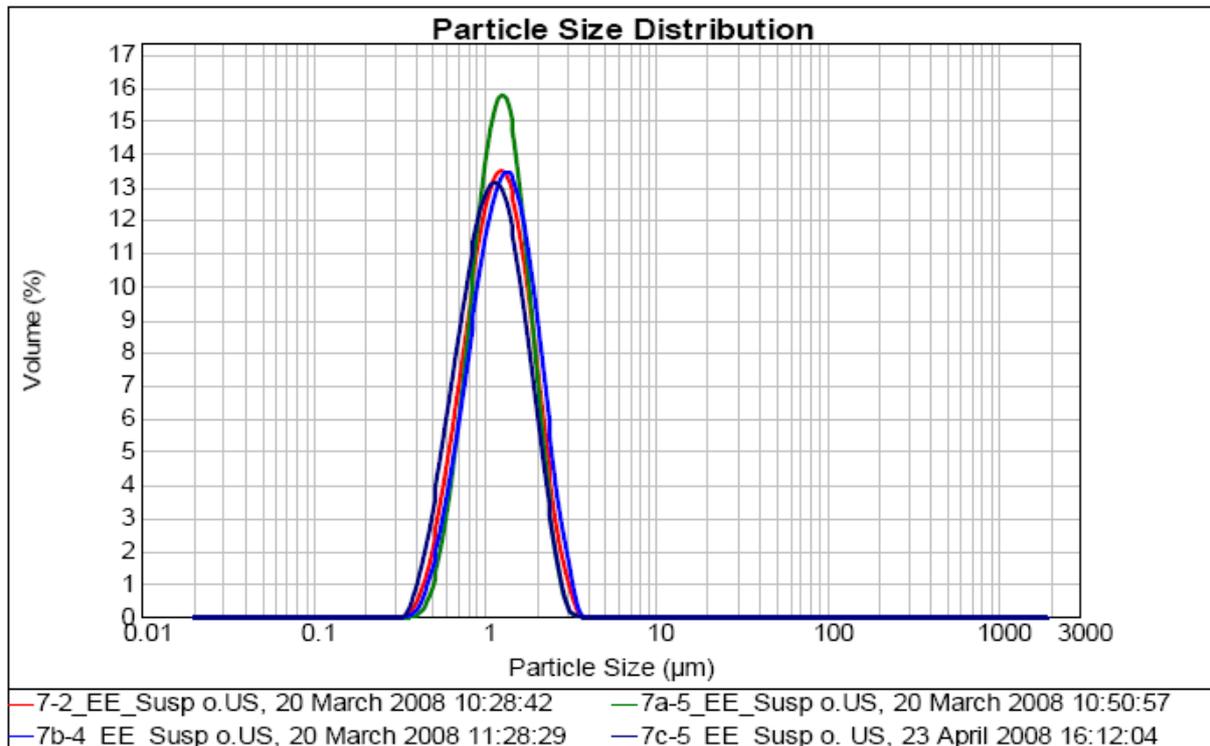
Das in den Standardformulierungen verwendete Polystyrol ist Ware für technische Zwecke. Das Molekulargewicht ist nicht genau definiert, liegt aber nach Herstellerangaben im Mittel bei 265.800 g/mol. [4]

Tabelle 7 zeigt die Partikelgrößenverteilung der Formulierung mit steigendem Flumethringehalt. Die Messungen beziehen sich auf die Suspensionen, die nach dem Entzug der organischen Phase erhalten werden. Für eine monomodale Größenverteilung werden die Formulierungen vorher mit dem Microfluidizer behandelt. Der positive Effekt des Microfluidizers ist in C.1.2 beschrieben.

**Tabelle 7 Partikelgrößenverteilung bei steigendem Flumethringehalt; Vermessung der Suspension mit der Laserdiffraktometrie**

Probe	Flumethringehalt [%]	D(10) [µm]	D(50) [µm]	D(90) [µm]
7-2_EE-MiFlu	0	0,678	1,207	2,068
7a-5_EE-Miflu	10,4	0,750	1,231	1,956
7b-4_EE-MiFlu	14,5	0,723	1,296	2,209
7c-5_EE-MiFlu	19,1	0,618	1,110	1,921

Tabelle 7 zeigt, dass das Hauptfeld der Partikel eine Größe von 0,6-2,2 µm hat. Damit liegen sie in einem für die Anheftung an Fell relevanten Größenbereich. Anbindungsversuche haben gezeigt, dass die notwendige Anbindungsstärke mit der Größe der Partikel sinkt. Eine Größe von 2 µm gilt nach bisherigen Erkenntnissen als Obergrenze für eine gute Anbindung. Trotz des steigenden Wirkstoffgehalts ist keine Volumenzunahme bei den Partikeln festzustellen. Visualisiert wird die Partikelgröße in Abb. 26.



**Abb. 26 Einfluss des Wirkstoffgehalts auf die Partikelgröße; 7-2\_EE 0 %; 7a-5\_EE 10,4 %; 7b-4\_EE 14,5 %; 7c-5\_EE 19,1 %**

Wie dicht die einzelnen Verteilungen beieinander liegen, ist gut zu erkennen. Die Ordinate zeigt die Partikelgröße, logarithmisch aufgetragen. Die Abszisse gibt die Partikelanzahl in Volumenprozent an. Kleine Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung ergeben sich durch den Herstellungsprozess, der unvermeidbaren, natürlichen Fehlerquellen unterliegt. Diese Streuungen sind unvermeidbar und in einem gewissen Maß akzeptabel. Durch wiederholte Herstellung soll gezeigt werden, dass die Werte in Tabelle 7 reproduzierbar sind. Dazu wird jede Formulierung mindestens dreimal hergestellt. Aus den Kennzahlen der Verteilung lässt sich die Standardabweichung ermitteln. [37] Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, liegen die relativen Standardabweichungen unter 10 %. Diese Streuung ist als akzeptabel einzustufen.

**Tabelle 8 Mittelwerte der gemessenen Partikelgrößen und die dazugehörigen Standardabweichungen**

Probe	Flumethringehalt Theoretisch [%]	D(10) [µm]	D(50) [µm]	D(90) [µm]
7_EE-MiFlu	0	0,70 +/- 0,02	1,24 +/- 0,05	2,12 +/- 0,07
7a_EE-Miflu	9	0,72 +/- 0,05	1,23 +/- 0,01	2,03 +/- 0,16
7b_EE-MiFlu	13	0,72 +/- 0,01	1,25 +/- 0,04	2,11 +/- 0,10
7c_EE-MiFlu	17	0,63 +/- 0,07	1,17 +/- 0,08	2,10 +/- 0,15

### C.2.1.1.2 Glasübergangstemperatur

Die Bestimmung der Glasübergangstemperatur  $T_g$  kann für verschiedenste Zwecke genutzt werden. So reagiert sie sensibel auf Konformationsänderungen, Solvate, Hydrate, Verunreinigungen und Molekulargewichte, um nur einige Punkte zu nennen. In einer Formulierung, in der verschiedene Komponenten aufeinander stoßen, wird die Glasübergangstemperatur vielseitig beeinflusst. Durch den Einsatz sog. Weichmacher kann die  $T_g$  nach unten korrigiert werden.

Eine  $T_g$  unter 40 °C ist in diesem Fall als kritisch zu betrachten, wenn davon ausgegangen werden kann, dass auf der Haut im Fell des Hundes eine Temperatur von 30-35 °C herrscht. Liegt die Glasübergangstemperatur unter der des Hundefells, verschmelzen die Partikel mit dem Fell. Dieses Phänomen kann erwünscht sein, da so eine Anheftung des Partikels an das Fell möglich ist. Jedoch ist auch eine unerwünschte Verklebung des Deckhaars möglich. In dieser Arbeit werden die Glasübergangstemperaturen zur weiteren Charakterisierung der Formulierungen herangezogen.

Abb. 27 zeigt sehr anschaulich, wie die  $T_g$  vom Wirkstoffgehalt beeinflusst wird. Wie durch die amorphe Struktur des Flumethrins zu erwarten war, löst es sich gut in dem amorphen Polymer.

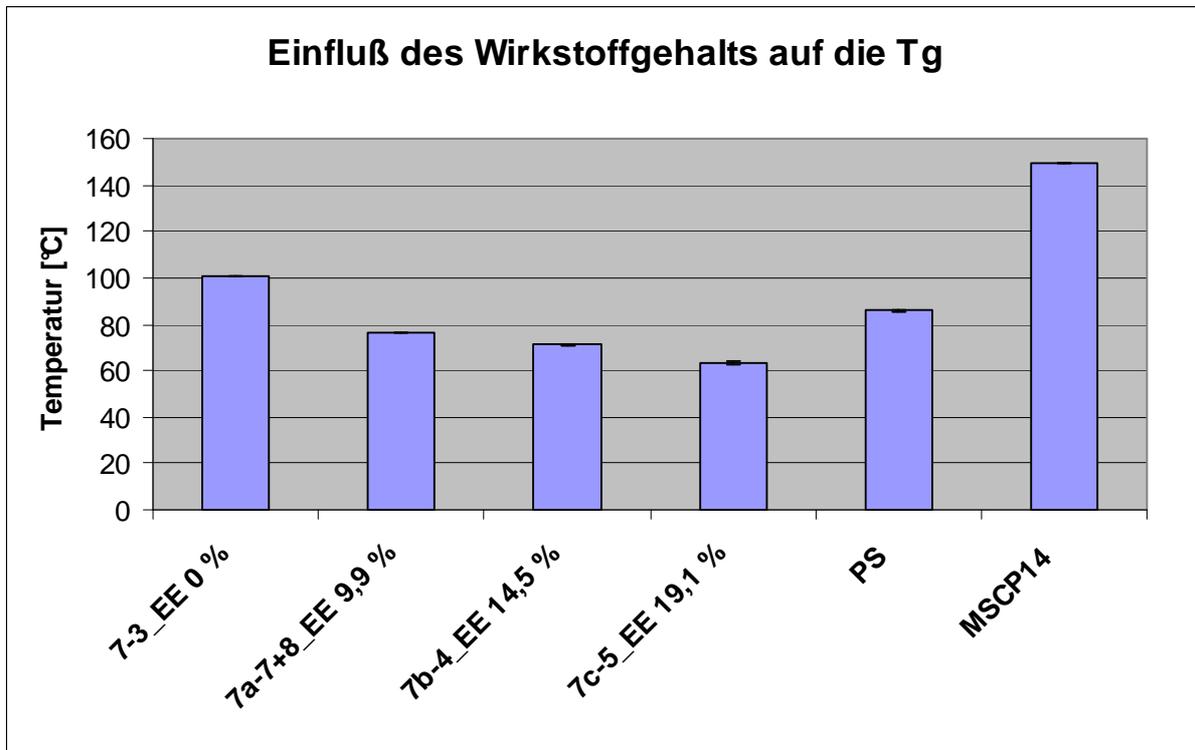
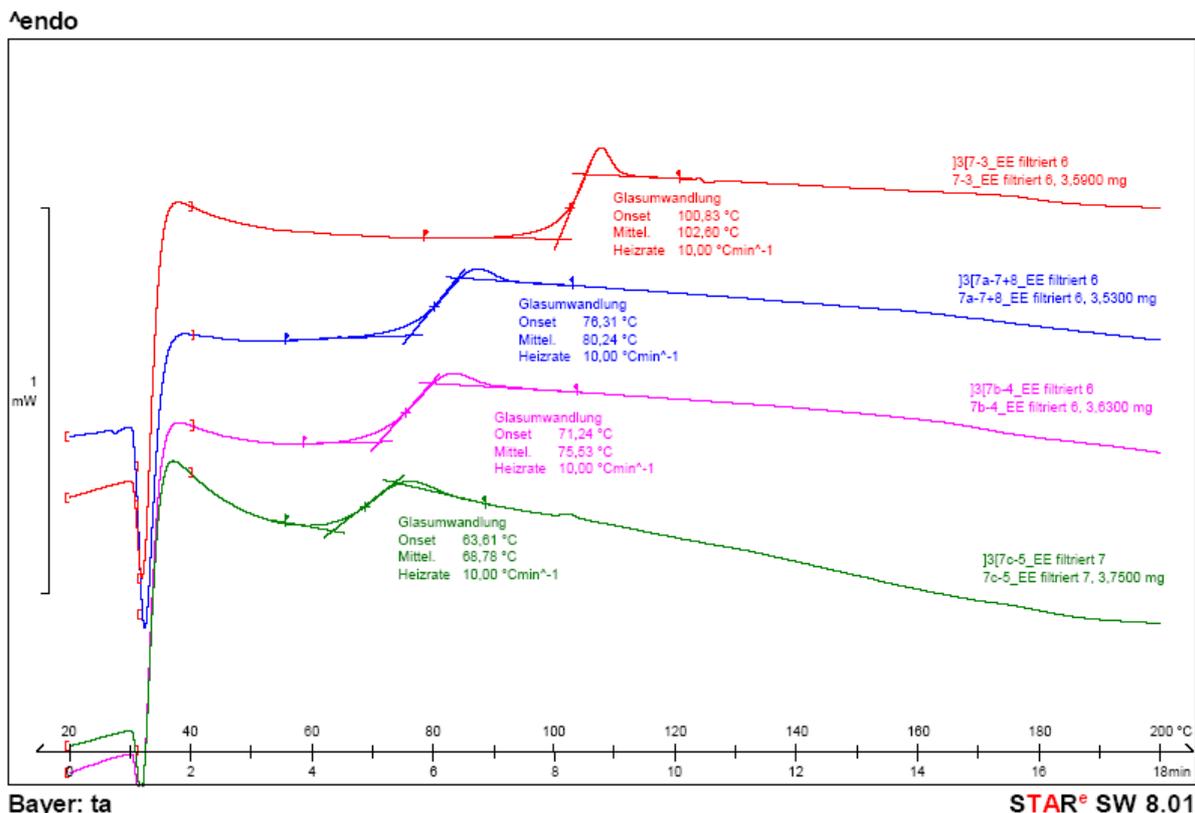


Abb. 27 Glasübergangstemperaturen der Formulierungen mit steigendem Wirkstoffgehalt [7-3\_EE 0 % Flumethrin, 7a-7+8\_EE 9,9 % Flumethrin; 7b-4\_EE 14,5 % Flumethrin; 7c-5\_EE 19,1 % Flumethrin] und der Ausgangsstoffe Polystyrol (PS) und Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer (MSCP14)

Das Partikel besteht nicht aus einem Kern-Schale Modell, sondern stellt ein homogenes Gemisch aus Wirkstoff und Polymermatrix dar. Dies legt zum einen die Herstellungsmethode nahe (vgl. E.2.1), zum anderen zeigen die Glasübergangstemperaturen der Ausgangsstoffe und des fertigen Produkts, dass Flumethrin einen Weichmacher-Effekt ausübt. [59] Die Glasübergangstemperatur der Partikel liegt also niedriger, als die des reinen Polymers. Außerdem ist nur eine thermische Reaktion zu beobachten, was ebenfalls auf das Vorliegen einer festen Lösung hindeutet (Abb. 28).



**Abb. 28** Glasübergangstemperatur in Abhängigkeit vom Wirkstoffgehalt; 7-3\_EE 0 % Flumethrin (rot), 7a-7+8\_EE 9,9 % Flumethrin (blau); 7b-4\_EE 14,5 % Flumethrin (pink), 7c-5\_EE 19,1 % Flumethrin (grün)

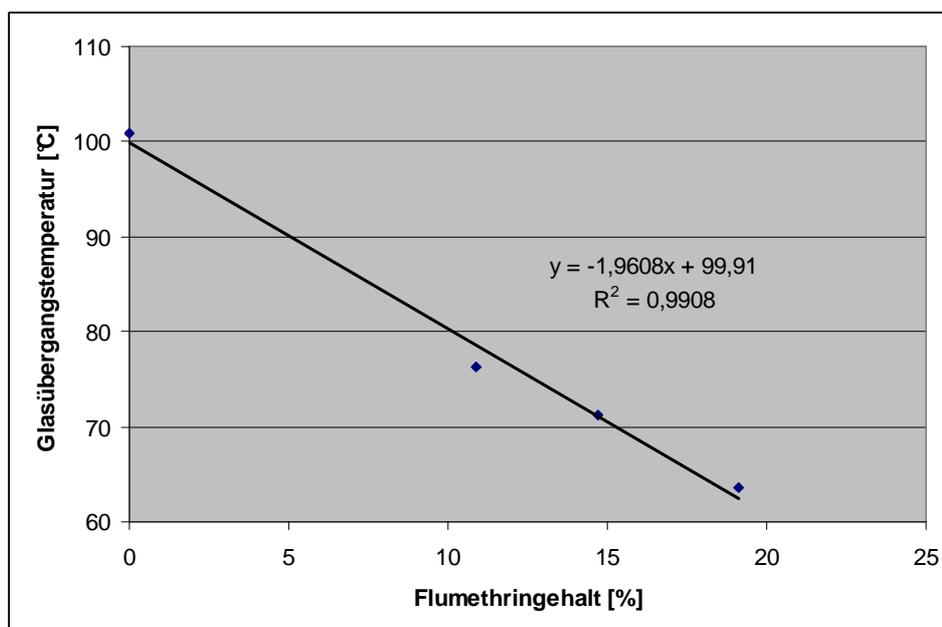
Die Abszisse zeigt den Zeit- und den Temperaturverlauf. Auf die Ordinate wird der Wärmestrom durch die Einheit Milliwatt wiedergegeben. Durch die hier gewählte Darstellung sind nur relative Zahlen auf der Ordinate möglich. Zur besseren Ansicht werden die Messkurven außerdem auf den aussagekräftigen Teil, Segment drei der Messung, gekürzt. Segment drei zeigt die zweite Aufheizphase, die Glasübergangstemperaturen unverfälschter darstellt als die erste Aufheizphase, in der z. B. Restwasser für einen weiteren Kurvenausschlag sorgt. Abb. 28 zeigt die Glasübergangstemperaturen bei Formulierungen mit unterschiedlichem Wirkstoffgehalt. Es ist zu erkennen, dass die Glasübergangstemperatur mit steigendem Flumethringehalt sinkt. Der Wirkstoff fungiert als Weichmacher, indem er sich zwischen die einzelnen Moleküle des Polymers setzt und so

dessen physikalische Eigenschaften beeinflusst. Die  $T_g$  sinkt von 100 °C auf 63 °C. Die genauen Daten sind aus Tabelle 9 ersichtlich.

**Tabelle 9 Glasübergangstemperatur bei steigendem Flumethringehalt**

Probe	Flumethringehalt [%]	$T_g$ [°C]
7-3_EE	0	100,83
7a-7+8_EE	10,9	76,31
7b-4_EE	14,7	71,24
7c-5_EE	19,1	63,61

Um den Ausgangswert, d.h. die Glasübergangstemperatur bei Partikeln ohne Wirkstoff, besser einordnen zu können, werden die Einzelbestandteile auf ihre Enthalpieeigenschaften untersucht. Die Placebo Partikel bestehen lediglich aus zwei Komponenten. Zum einen aus dem Kapselmaterial Polystyrol und zum anderen aus dem oberflächenmodifizierenden Copolymer Styrol-Maleinsäureanhydrid. Das hier verwendete Polystyrol besitzt eine  $T_g$  von 86 °C (laut Literatur > 70 °C [5]). Das Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer hat einen Glasübergang bei 149 °C (zu diesem Produkt ist leider kein Literaturwert vorhanden). Die Placebo Partikel liegen mit einem Wert von ~ 101 °C genau dazwischen (Abb. 27). Da auch hier nur ein Glasübergang und keine weiteren Peaks zu sehen sind, gilt die Annahme einer homogen vorliegenden Polymermatrix. Polystyrol fungiert als Weichmacher für das Copolymer Styrol-Maleinsäureanhydrid und senkt dessen Glasübergangstemperatur. Der Zusammenhang zwischen Wirkstoffgehalt und Glasübergangstemperatur ist linear mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9908$  (Abb. 29).



**Abb. 29** Glasübergangstemperatur in Abhängigkeit vom Wirkstoffgehalt

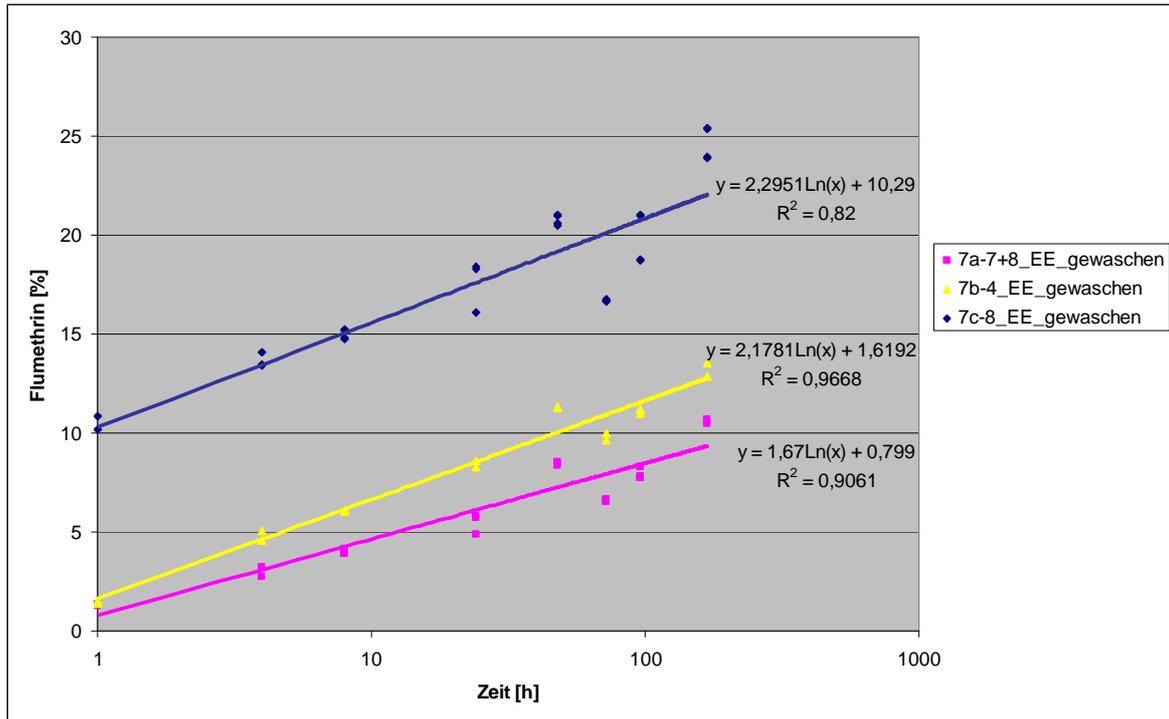
Auf der Ordinate wird die Glasübergangstemperatur und auf der Abszisse der Flumethringehalt abgebildet. Der Wirkstoffgehalt ist in dem hier getesteten Bereich umgekehrt proportional zur Glasübergangstemperatur.

### C.2.1.1.3 Freisetzung

Es ist zu vermuten, dass eine höhere Beladung der Partikel auch eine schnellere Freisetzung begünstigt. Die Glasübergangstemperatur sinkt, das Molekülgerüst des Partikels ist somit flexibler. Dies sollte den Austritt des Wirkstoffs aus den Partikeln vereinfachen. [59] Zudem steigt der Wirkstoffgehalt bei gleich bleibender Größe der Partikel. Eine Diffusion des Wirkstoffs aus dem Partikel wird so begünstigt.

Um diese Vorüberlegungen zu stützen und zu überprüfen, werden Formulierungen verschiedener Wirkstoffgehalte in einem Freisetzungsvorversuch getestet. Hierzu dient eine Ethanol-Wasser-Mischung (70/30 (V/V) %) als Freisetzungsmedium. Das optimale Mischungsverhältnis wurde in einem Vorversuch ermittelt (C.1.4). 5 ml dieses Alkoholgemischs, mit Partikeln versetzt, werden mit einem Multi Wrist® Shaker auf Stufe 7 bei Raumtemperatur in waagerechter Anordnung sieben Tage geschüttelt (siehe E.2.4). Die Probenziehung findet nach 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 und 168 h statt. Aus organisatorischen Gründen ist auch eine Probenziehung bei 144 h anstatt 168 h möglich. An dieser Stelle sei noch einmal erwähnt, dass diese Freisetzungsmethode dem Vergleich der Proben untereinander dient, und keine direkten Schlüsse auf die Freisetzung im Hundefell zulässt. Die Freisetzung beeinflussenden Faktoren auf dem Hundefell sind zu komplex, um sie in einem einfachen Versuch darstellen zu können.

Die Proben werden, wie in Kap. E.2.4.1 beschrieben, vorbereitet. Der Feststoffgehalt der gewaschenen Partikelsuspension entscheidet über die Menge, die dem FreisetzungsmEDIUM zugesetzt wird. Dabei ist zu beachten, dass die Proben das Volumen, in dem die Freisetzung gemessen wird, erhöhen. Zur Vereinfachung wird davon ausgegangen, dass die Probensuspension eine Dichte von 1 mg/ml besitzt. Das zugesetzte Probenvolumen wird dann von der benötigten Wassermenge, der Ethanol-Wasser-Mischung abgezogen. So lässt sich auf eine einfache Art das richtige Probenvolumen für die Freisetzung zusammenstellen. Abb. 30 zeigt die freigesetzte Menge Flumethrin in Abhängigkeit von der Zeit.



**Abb. 30** Freisetzung von Flumethrin bezogen auf den Flumethringehalt der Partikel; Freisetzung mit Partikeln verschiedenen Wirkstoffgehalts: 10,9 % (pink); 14,7 % (gelb); 18,8 % (blau)

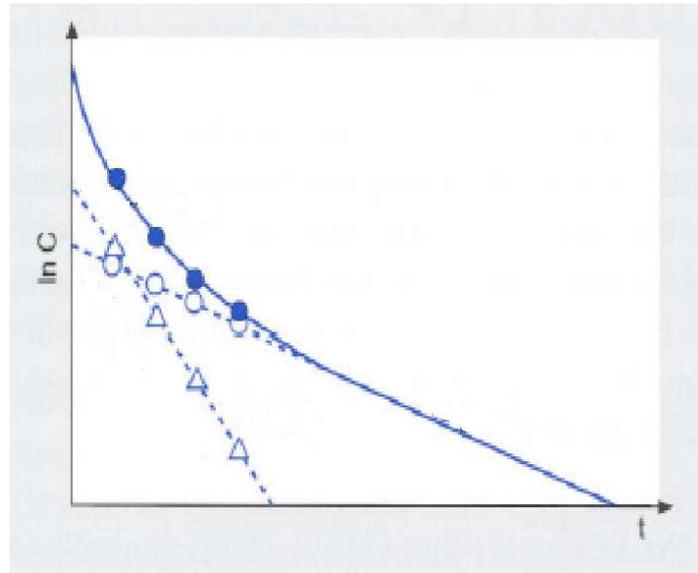
Verglichen werden hier Formulierungen, die sich lediglich in ihrem Wirkstoffgehalt unterscheiden. Die genauen Gehaltsangaben sind Tabelle 10 zu entnehmen. Probe 7a-7+8\_EE hat den geringsten Wirkstoffgehalt und setzt am langsamsten frei. Je mehr Wirkstoff vorhanden ist, umso mehr wird im gleichen Zeitraum freigesetzt. [68]

**Tabelle 10 Flumethringehalt; Formulierungen unterscheiden sich nur im Wirkstoffgehalt, Gehaltsbestimmung mittels HPLC**

Probe	Flumethringehalt [%]
7a-7+8_EE_gewaschen	10,9
7b-4_EE_gewaschen	14,7
7c-8_EE_gewaschen	18,8

Wie in C.2.1.1.1 bereits gezeigt, ändert sich die Partikelgröße mit steigendem Wirkstoffgehalt nicht. Demnach ist bei hohem Wirkstoffgehalt mehr Flumethrin in demselben Volumen verteilt. Die Flumethrindichte ist höher. Somit befindet sich auch mehr Flumethrin an der Oberfläche, dass durch einen kurzen Diffusionsweg schnell freigesetzt werden kann. [31; 59] Dies zeigt sich durch einen hohen Burst-Effekt bei 7c-8\_EE. Bei Partikeln mit geringem Wirkstoffgehalt befindet sich dementsprechend weniger Flumethrin an der Oberfläche. Somit hat auch eine geringere Menge Flumethrin einen kurzen Diffusionsweg. Der Burst-Effekt ist kleiner. Eine genaue Steuerung des Burst-Effekts ist schwierig. [32] 7b-4\_EE und 7c-8\_EE setzen ähnlich schnell frei. Dies lässt sich am Steigungsfaktor der Diagrammgleichung erkennen (Abb. 30).

Im Folgenden soll ein Abgleich der erhaltenen Freisetzungskurven mit verschiedenen Freisetzungskinetiken zeigen, welchem Mechanismus die ermittelten Freisetzung folgen. Eine Kinetik 0. Ordnung kann ausgeschlossen werden, da hierfür eine gleich bleibende, konstante Freisetzung beobachtet werden muss. Dies ist hier nicht der Fall. Charakteristisch für eine Kinetik 1. Ordnung ist ein exponentieller Abfall der Freisetzung. Wird die Zeit gegen den natürlichen Logarithmus der Konzentration aufgetragen, so wird eine Gerade erhalten. Zeigen die erhaltenen Werte lediglich in der terminalen Phase einen linearen Zusammenhang, ist das Vorliegen einer Kinetik 2. oder auch 3. Ordnung möglich (Abb. 31) Dies bedeutet, dass die Geschwindigkeitskonstante nicht über den gesamten Bereich konstant ist. Der vordere Teil des Graphen besitzt die Form einer Hyperbel, da sich verschiedene Freisetzungsraten überschneiden. Durch das Abschälverfahren können die verschiedenen Freisetzungsgeschwindigkeitskonstanten aus dem Verlauf errechnet werden. Bei einer Kinetik 2. Ordnung muss sich aus den Differenzen aus den gemessenen Werten und den vom terminalen Teil extrapolierten Werten eine Gerade ergeben. Ist dies nicht der Fall ist ein weiteres Abschälen nötig und es handelt sich beim Erhalt einer Gerade um eine Kinetik 3. Ordnung.



**Abb. 31** Abschälverfahren. ● tatsächlich gemessene Konzentration; ○ Konzentrationen auf der rückextrapolierten terminalen Gerade; Δ Differenzwerte zwischen tatsächlichen und rückextrapolierten Konzentrationen [33]

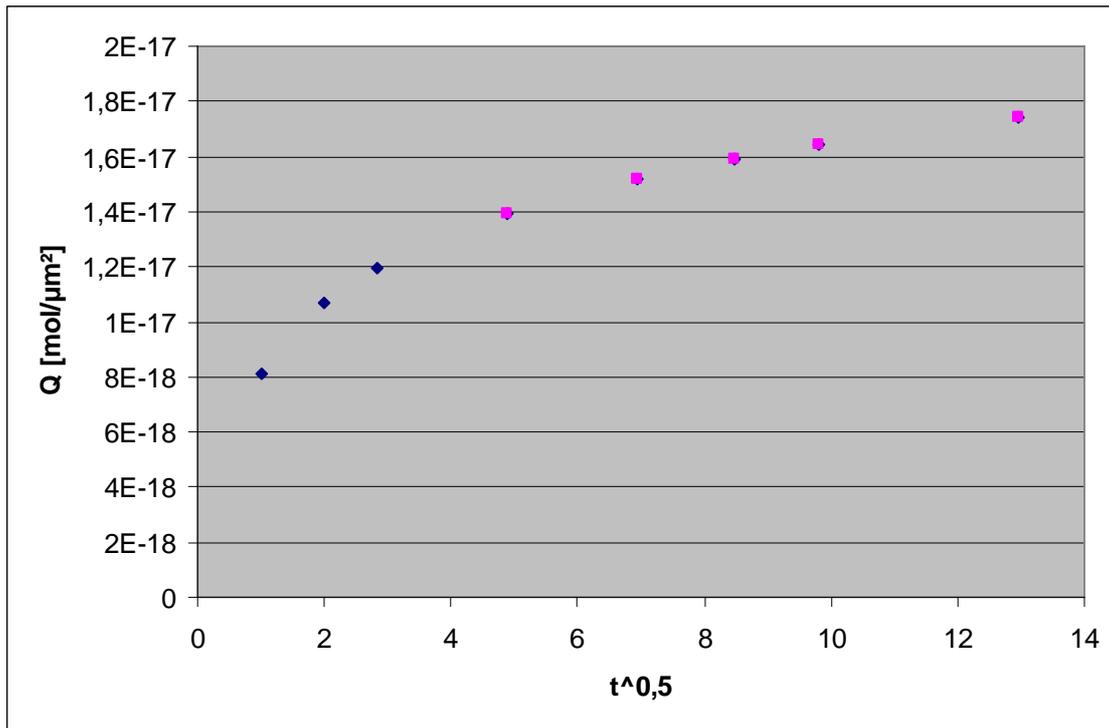
Bei den hier vorliegenden Freisetzungskurven kann keine Kinetik 1. Ordnung festgestellt werden. Nach Anwendung des Abschälverfahrens zeigen die erhaltenen Differenzen keinen linearen Zusammenhang. Somit liegt auch eine Kinetik 2. Ordnung nicht vor. Für ein erneutes Abschälen ist die Anzahl der Datenpunkte zu gering. Die erhaltene Freisetzung lässt sich mit diesem Modell nicht ausreichend beschreiben.

Des Weiteren soll das Modell von Higuchi auf die ermittelten Freisetzungskurven übertragen werden. [29; 30] Die Freisetzung nach Higuchi oder das Quadratwurzelgesetz beschreibt die Freisetzung aus einer Matrix. Dabei wird die Wurzel der Zeit gegen die pro Flächeneinheit freigesetzte Wirkstoffmenge aufgetragen. Zudem sind die Sättigungskonzentration des Wirkstoffs in dem Lösemittel, in dem die Freisetzung stattfindet, und die Menge an Wirkstoff pro Volumeneinheit von Bedeutung (Gl. 12).

$$Q = \sqrt{Dt(2A - C_s)C_s} = k_H \cdot \sqrt{t} \quad (\text{Gl. 12})$$

$Q$	Wirkstoffmenge, die nach der Zeit $t$ je Flächeneinheit abgegeben wird
$D$	Diffusionskoeffizient
$A$	Gesamtwirkstoffkonzentration in der Matrix je Volumeneinheit
$t$	Zeit
$C_s$	Löslichkeit des Wirkstoffs in dem die Matrix umgebenden Medium
$k_H$	Formulierungsabhängige Proportionalitätskonstante

Wird die Wurzel der Zeit  $t$  gegen  $Q$ , das aus experimentell ermittelten Werten erhalten wird, aufgetragen, so zeigt sich kein linearer Zusammenhang (Abb. 32).



**Abb. 32 Freisetzung nach Higuchi. Bei den Proben 7a-7+8\_EE, 7b-4\_EE und 7c-8\_EE wird dieses Freisetzungsprofil erhalten**

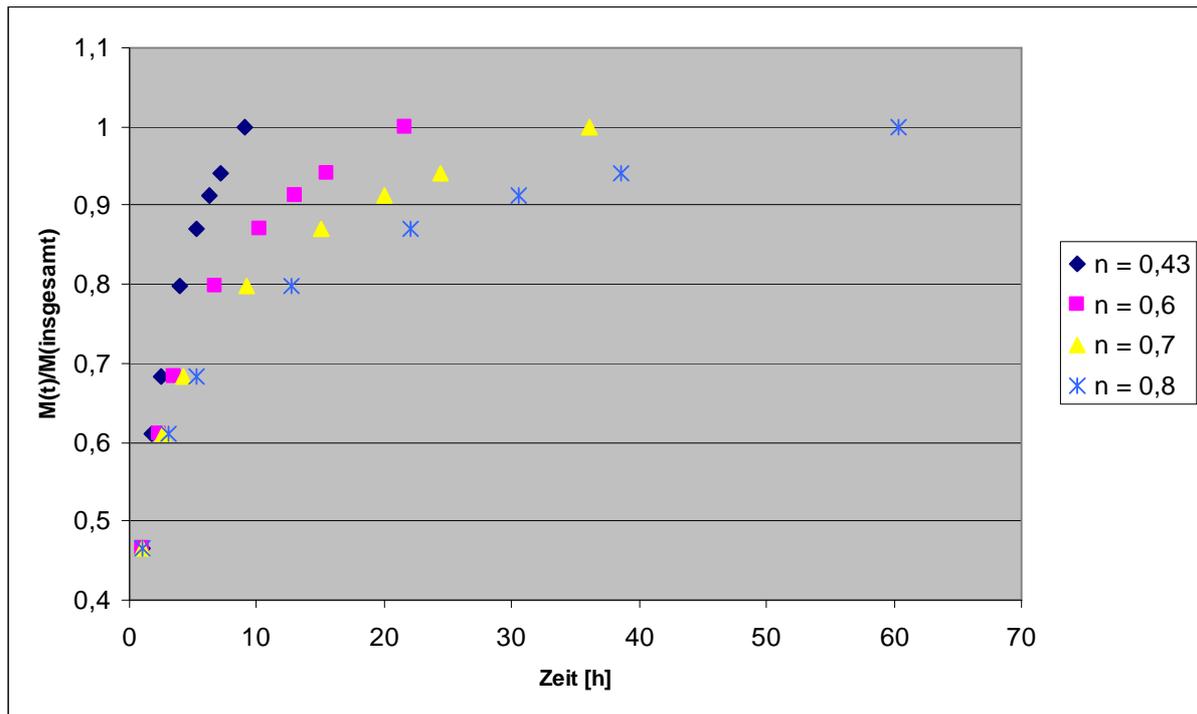
Aus den Werten  $\sqrt{t} > 4$  lässt sich eine Linearität vermuten (in Abb. 32 pink dargestellt). Die Tatsache, dass keine Linearität über den gesamten Freisetzezeitraum erhalten wird, deutet auf eine komplexere Freisetzung hin, die sich durch das angewendete Versuchsmodell nicht erklären lässt.

Als letztes Modell soll die Freisetzung nach Peppas (Gl. 13) zeigen, ob sie die erhaltene Freisetzung beschreiben kann. Peppas setzt die freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt  $t$  und die insgesamt freigesetzte Wirkstoffmenge ins Verhältnis. Der Exponent  $n$  beschreibt die Kinetik näher und ist von der Geometrie der Freisetzungsmatrix und dem Freisetzungsmechanismus abhängig (vgl.B.6).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (\text{Gl. 13})$$

- $M_t$  Freigesetzte Arzneistoffmenge zum Zeitpunkt  $t$
- $M_\infty$  Insgesamt freigesetzte Arzneistoffmenge
- $k$  Geschwindigkeitskonstante
- $t$  Zeit
- $n$  Die Freisetzung beschreibender Exponent

Um die Kompatibilität der Freisetzung nach Peppas mit den in diesem Versuch erhaltenen Werten zu überprüfen, werden für  $n$  verschiedene Werte angenommen.



**Abb. 33** Freisetzung nach Peppas bei variierendem Faktor  $n$ . Darstellung ist gültig für die Proben 7a-7+8\_EE, 7b-4\_EE und 7c-8\_EE

In Abb. 33 ist die Zeit gegen  $M(t)/M(\text{insgesamt})$  aufgetragen. Bei einer Richtigkeit des angewendeten Modells werden lineare Zusammenhänge erfasst. Dies ist in diesem Fall nicht zu erkennen. Bei  $n = 0,43$  zeigt sich die beste Übereinstimmung zwischen dem Modell von Peppas und den ermittelten Freisetzungswerten. Eine Ausgleichsgerade durch diese Werte zeigt einen Korrelationsfaktor von  $R^2 = 0,9195$ . Eine gewisse Richtigkeit dieses Modells für die ermittelte Freisetzung ist vorhanden, jedoch ist keine vollständige Klärung dieser Freisetzung mit dem Modell von Peppas möglich.

Der Versuch, die erhaltenen Freisetzungen mit einem Freisetzungsmodell zu beschreiben, zeigt, dass die experimentell ermittelten Werte nicht vollständig mit den verwendeten Modellen korrelieren. Dies kann mit einem komplexen Freisetzungsmechanismus zusammenhängen, der durch viele Parameter beeinflusst wird. So ist eine leicht ungleichmäßige Verteilung des Wirkstoffs in der Matrix möglich. Auch ist es denkbar, dass die mit Carboxylgruppen modifizierte Oberfläche durch ihre größere Polarität im Freisetzungsmedium leicht quillt und für den Burst-Effekt mitverantwortlich ist. [32; 46] Zudem ist keine einheitliche Partikelgröße vorhanden. Kleinere Partikel werden aufgrund ihrer größeren Oberfläche eine schnellere Freisetzung zeigen als größere. [52] Bei bioabbaubaren Polymeren kann sich dieser Effekt auch umkehren, wenn im Verlauf der Freisetzung die Porosität steigt. [60] Für die Berechnung der Freisetzung nach verschiedenen Freisetzungstheorien wird die mittlere Partikelgröße herangezogen. Hieraus

ergibt sich ein gewisser Fehler für weitere Berechnungen. Die größte Übereinstimmung ist mit der Theorie von Higuchi und Peppas bei  $n = 0,43$  erkennbar.

### C.2.1.2 Einfluss des Molekulargewichts

Als Kapselmaterial, der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Partikel, werden Polymere verwendet. Die Molekülmasse ist hier von Bedeutung, da diese die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Polymers beeinflusst. Eine exakte Angabe des Molekulargewichts ist bei technisch verwendeten Polymeren nicht immer möglich, aber auch nicht immer nötig. Dies liegt daran, dass eine genaue Steuerung der Polymerisation schwierig ist und so ein Produkt mit Molekülen von unterschiedlichen Molekulargewichten erhalten wird.

Für die hier durchgeführten Versuche werden Polystyrole einer genau definierten Molekülmasse verwendet. Nur so kann gezeigt werden, wie sich das Molekulargewicht auf die Formulierung, Glasübergangstemperatur, Partikelgröße und Freisetzung auswirkt. Die Polymere werden von der Firma PSS GmbH speziell für diesen Zweck synthetisiert, die Molegewichte reichen von 2.000 Da bis 500.000 Da. Die Grundformulierung ist Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11 Grundzusammensetzung der Formulierung bei verändertem Molekulargewicht des Polymers**

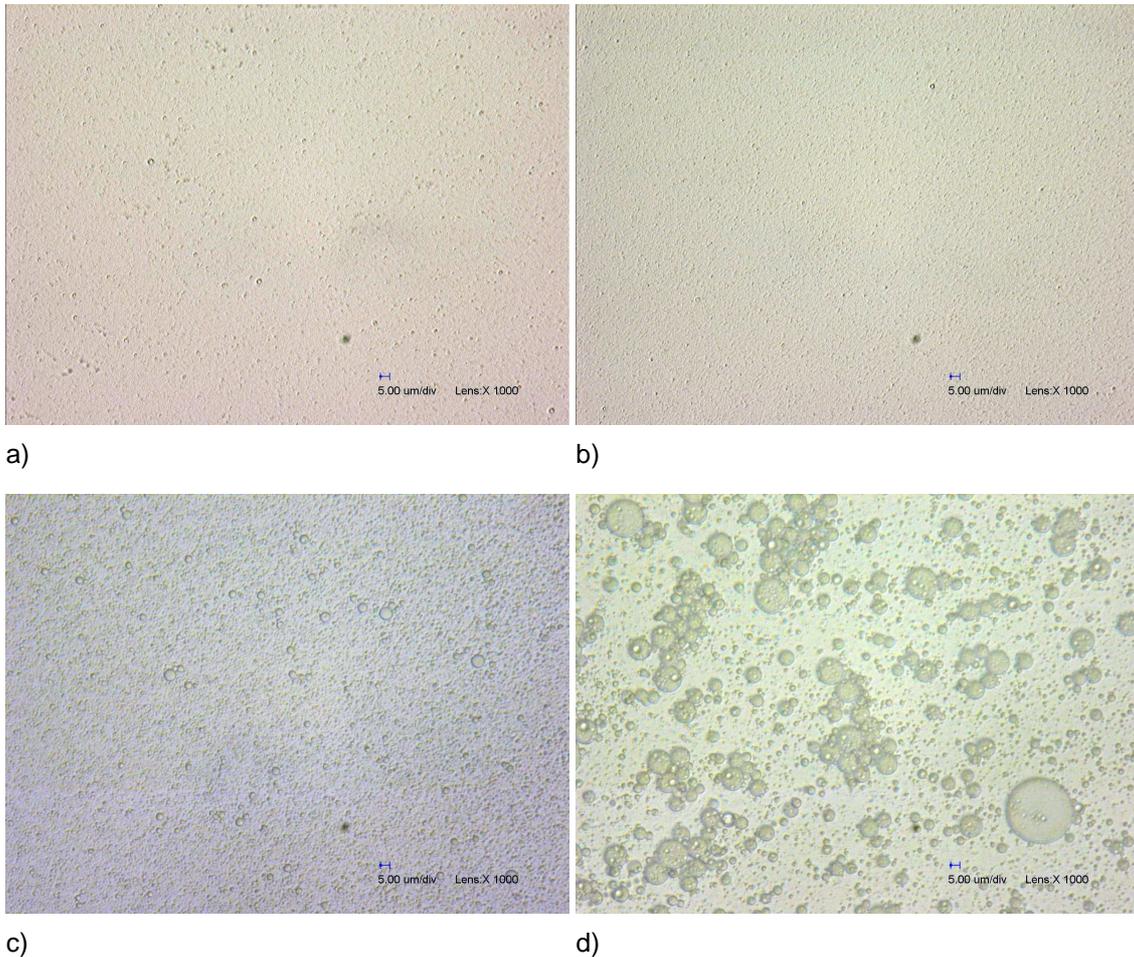
Substanz	Menge [%]
Polystyrol (2000 – 500.000 Da)	5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
MSCP 14	28 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	13 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

#### C.2.1.2.1 Auswirkungen auf die Formulierung

Die Polymere zeigen ein stark unterschiedliches Lösungsverhalten. Nach Versuchsprotokoll in E.2.1 wird das Polymer in Dichlormethan gelöst. Polystyrol mit dem Molekulargewicht ( $M_w$ ) 2.000 Da löst sich sehr schnell. Die Lösungsgeschwindigkeit nimmt mit zunehmendem Molekulargewicht ab. Auch das Aussehen des Polymers hängt vom Polymerisationsgrad ab. So sind die niedrigen Molekulargewichte granulat- und pulverartig, wohingegen die höher molekularen Polystyrole sehr voluminös erscheinen.

Die Eigenschaften der Emulsion werden von dem Molekulargewicht des Polymers beeinflusst. Alle Emulsionen scheinen stabil, jedoch zeigen sich beim Einsatz des Microfluidizer und beim Verdampfen des Lösungsmittels Unterschiede. Die Polymere mit  $M_w = 2.000$  Da und  $M_w = 15.000$  Da lassen sich durch den Einsatz des Microfluidizer sehr fein dispergieren, die Emulsionströpfchen werden so klein, dass sie lichtmikroskopisch kaum sichtbar sind. Bei Polystyrol  $M_w = 110.000$  Da und  $M_w = 500.000$  Da zeigt sich dagegen ein

weniger großer Einfluss. Große Tropfen bleiben vorhanden und auch insgesamt werden die Emulsionstropfen nicht so klein (Abb. 34).



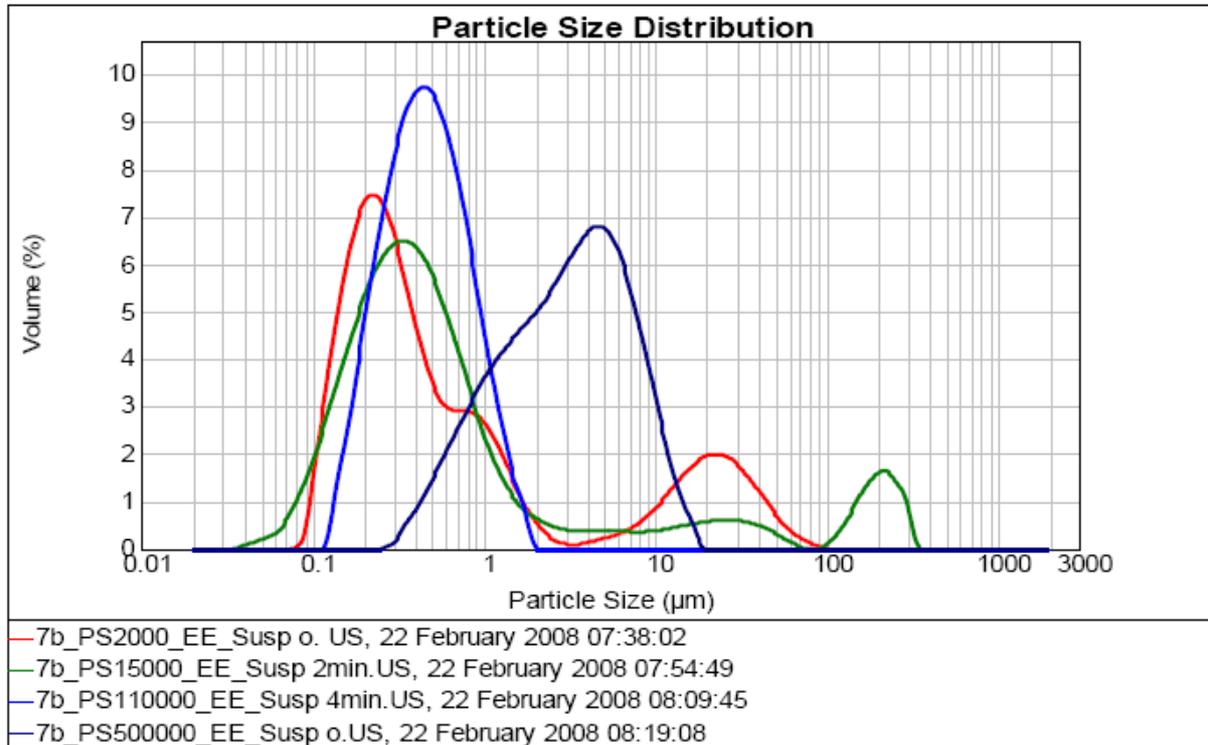
**Abb. 34** Emulsion nach Bearbeitung mit dem Microfluidizer; a) Mw = 2000 Da; b) Mw = 15000 Da; c) Mw = 110.000 Da; d) Mw = 500.000 Da

Wird das Lösungsmittel verdampft, zeigen sich nur bei den beiden höher molekularen Polystyrolen Polymerablagerungen am Rührfisch und Temperaturfühler. Ablagerungen heißt in diesem Fall, dass Emulsionströpfchen koaleszieren und, bevor es zur Ausbildung fester Polymerpartikel kommt, als großes Agglomerat ausfallen. Dies zeugt im Allgemeinen von einer unzureichenden Stabilität der Emulsion.

#### C.2.1.2.2 Partikelgröße

Die Partikelgröße ist ein entscheidender Faktor, wenn es um die Anbindung der Partikel ans Fell geht. Sind die Partikel zu groß, sind sie für eine Anheftung zu schwer und fallen ab. Darüber hinaus sollen sie für das menschliche Auge nicht sichtbar sein. Sind die Partikel jedoch zu klein, kann davon ausgegangen werden, dass eine Wirkdauer von 3-6 Monaten nicht erreicht werden kann. Als Kompromiss wird für eine Anbindung eine optimal maximale Größe von 2 µm angenommen.

Die Partikelgröße wird unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Zum einen werden die Suspensionen, die direkt nach dem Verdampfen des Lösungsmittels erhalten werden, mit der Laserdiffraktometrie vermessen, zum anderen werden die Partikel vor der Messung gewaschen und getrocknet, und dann wieder in einer tensidhaltigen Lösung redispersiert. Ultraschall dient der Singularisierung von Partikeln aus Agglomeraten und wird nur bei Bedarf in zwei Minuten Schritten eingesetzt.



**Abb. 35 Partikelgrößenanalyse bei steigendem Molekulargewicht; Polystyrol Mw = 2000 bis 500000 Da**

Abb. 35 zeigt die Partikelgrößenverteilung von Suspensionen mit Polystyrolpartikeln folgender Molekulargewichte: 2.000 Da (rot); 15.000 Da (grün); 110.000 Da (hellblau); 500.000 Da (dunkelblau).

Liegt der Suspension eine stabile, homogene Emulsion zugrunde, so kann davon ausgegangen werden, dass auch die Suspension eine homogene Größenverteilung zeigt. Agglomerate, vor allem solche, die durch Verklebung noch nicht ausreichend ausgehärteter Partikel entstehen, sind kaum oder gar nicht vorhanden. Die Laserdiffraktometriemessung der Molekulargewichte 2.000 Da (rot) und 15.000 Da (grün) zeigt deutlich, dass die Partikel zwar sehr klein sind, aber auch große Agglomerate vorhanden sind, die durch Ultraschall nicht singularisierbar sind. Dies zeigt, dass die Emulsion nicht optimal stabilisiert vorlag. Polystyrol mit 110.000 Da (hellblau) zeigt eine gleichmäßige Verteilung, jedoch sind die Partikel viel kleiner als der vorgegebene D(90)-Wert von 2 µm. So ist zwar eine gute Anbindung garantiert, jedoch besteht die Gefahr, dass keine ausreichende Retardierung gewährleistet ist.

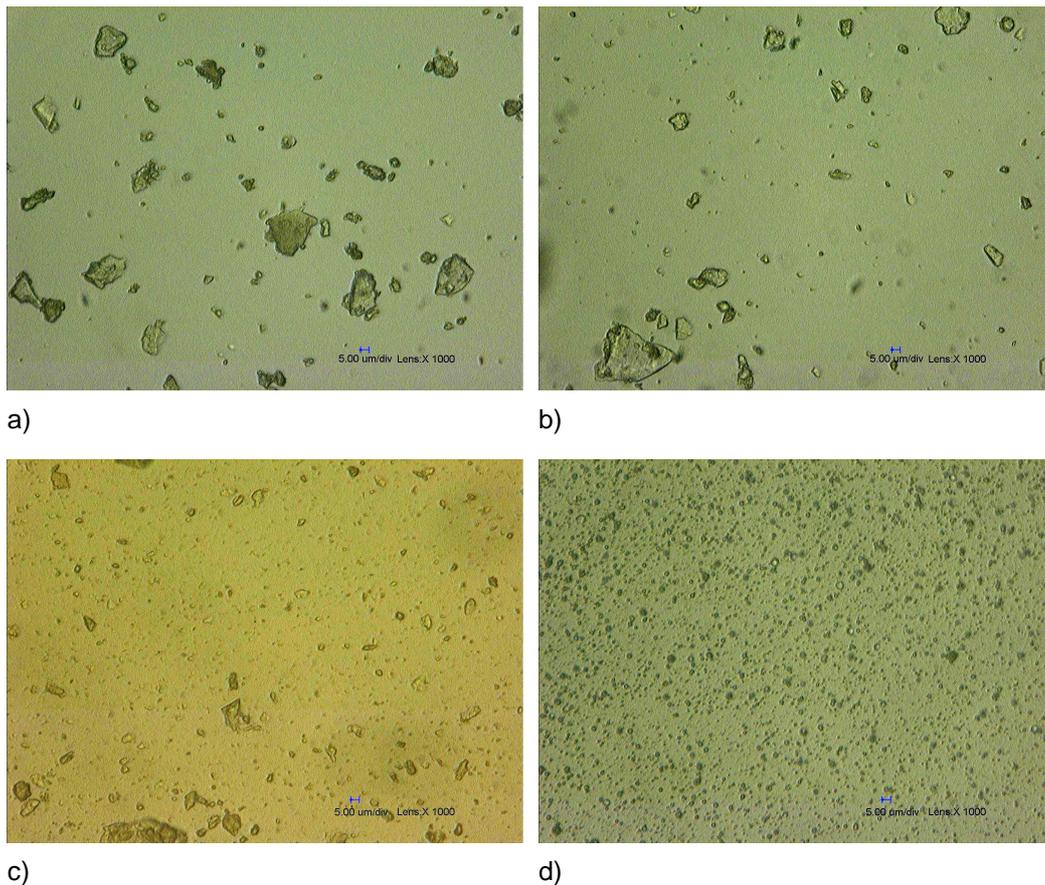
Bei einem Molekulargewicht von 500.000 Da (dunkelblau) ist die Verteilung nicht optimal, die Spannweite ist zu groß, und auch die absolute Größe liegt mit über 10 µm für eine Anbindung zu hoch. Eine genaue Verteilung kann aus Tabelle 12 entnommen werden.

**Tabelle 12 Partikelgrößenverteilung bei verschiedenen Molekulargewichten des Kapselmaterials Polystyrol**

Probe	D(10) [µm]	D(50) [µm]	D(80) [µm]	D(90) [µm]
7b_PS2000_EE	0,149	0,369	3,344	21,191
7b_PS15000_EE	0,142	0,418	1,475	30,953
7b_PS110000_EE	0,213	0,449	0,754	0,971
7b_PS500000_EE	0,822	3,127	6,297	8,385

Der im Vergleich zu den D(10)- und D(50)-Werten sehr hohe D(90)-Wert von 7b\_PS2000\_EE und 7b\_PS15000\_EE zeigt, dass es sich hier um Agglomerate handelt. Durch den Einsatz von Ultraschall kann eine Besserung erzielt werden. Agglomerate, die durch Verklebung der Partikel bei der Herstellung entstanden sind, bleiben vorhanden. Probe 7b\_PS110000\_EE weist ein sehr homogenes Partikelbild auf, Agglomerate sind nicht vorhanden. Auch bei 7b\_PS500000\_EE deutet die Partikelgrößenverteilung nicht auf Agglomerate hin. Das hohe Molekulargewicht sorgt für eine viskosere organische Phase, die sich nicht sehr fein in der wässrigen Phase dispergieren lässt. Dadurch resultiert ein Partikelkontingent aus größeren Partikeln.

Nach ihrer Herstellung werden die Partikel gewaschen und getrocknet. Dabei kommt es zu einer erneuten Agglomeration. Die Partikel lassen sich bei Redispergierung durch eine Tensidlösung (0,1 %ige wässrige Dodecylsulfat-Natrium Lösung, Dos Natrium) gut benetzen, jedoch bleiben die Agglomerate bestehen. Mikroskopische Aufnahmen (Abb. 36) zeigen, dass es sich bei den Proben 7b\_PS2000\_EE und 7b\_PS15000\_EE nicht nur um Agglomerate handelt, sondern um Verschmelzungen der Partikel, die so stark sind, dass einzelne Partikel nicht mehr zu erkennen sind. Probe 7b\_PS110000\_EE zeigt auch solche Verschmelzungen, jedoch nicht in einem solchen Maß. Dagegen treten bei 7b\_PS500000\_EE kaum Verklebungen auf. Diese Verschmelzungen können umgangen werden, wenn die Partikel direkt nach dem Waschvorgang, ohne einen Trocknungsschritt, also noch im feuchten Zustand, redispergiert werden.



**Abb. 36** Partikel resuspendiert in 0,1 %iger Dos Natrium Lösung; a) 7b\_PS2000\_EE; b) 7b\_PS15.000\_EE; c) 7b\_PS110.000\_EE d) 7b\_PS500.000\_EE6

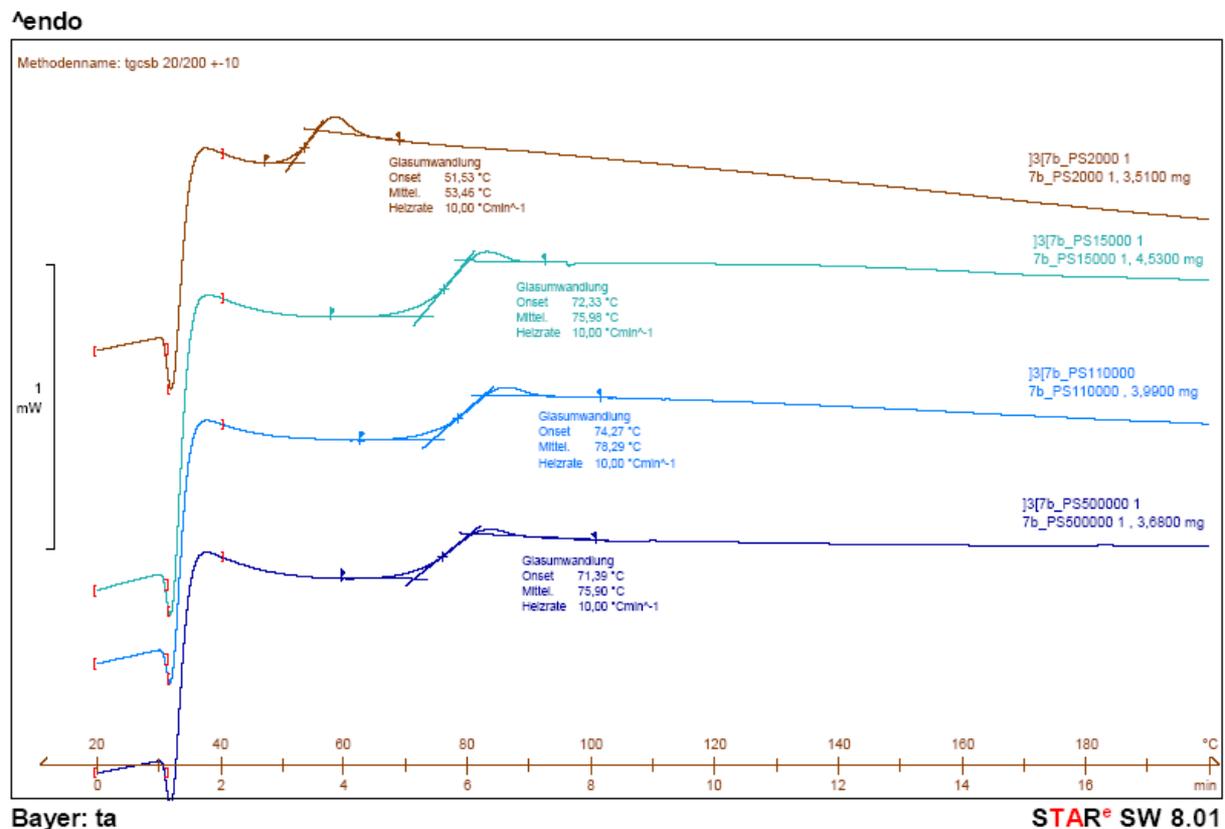
Dieses Beispiel zeigt, dass das Emulsionssystem ein sensibles System ist, das sich schon durch eine Variation in der Molekülmasse des Polymers, aus dem Gleichgewicht bringen lässt. Optimierung des Systems ist durch eine Änderung des Emulgatoranteils möglich, um ein Zusammenfließen der entstehenden Partikel durch eine größere Stabilisierung zu verhindern, oder im Falle von  $M_w = 500000$  Da durch eine anteilmäßige Erhöhung der organischen Phase, da so die Viskosität sinkt und eine homogenere Dispergierung in der Wasserphase möglich ist. Ein Verschmelzen der Partikel beim Trocknungsvorgang kann durch Sprühtrocknung der Suspension verhindert werden, ein Waschschrift sollte dem vorausgehen.

### C.2.1.2.3 Glasübergangstemperatur

Die Glasübergangstemperatur wird nach der in E.2.3.4 beschriebenen Methode ermittelt. Das Herstellungsverfahren legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Verkapselung des Wirkstoffs nicht um ein Kern-Schale Modell handelt, sondern um eine Polymermatrix in der der Wirkstoff homogen verteilt ist. Eine Bestätigung dieser Vermutung kann die DSC liefern. Ist nur ein Glasübergang zu sehen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der untersuchten Probe um eine homogene Mischung handelt. Mehrere Glasübergänge oder

auch Schmelzpeaks deuten dagegen auf getrennt voneinander vorliegende Bestandteile hin. Wie vermutet, zeigt die DSC-Messung der Proben nur einen Glasübergang mit einem kleinen Relaxationspeak (siehe Abb. 37). Es kann also davon ausgegangen werden, dass ein homogenes Probenmaterial vorliegt.

Für den Nachweis einer festen Lösung (Feststoff in Feststoff gelöst), wie sie hier existiert, kann auch die Röntgendiffraktometrie herangezogen werden. Sie detektiert die Beugung von Röntgenstrahlen, wie sie von Kristallen verursacht wird. Bei einer festen Lösung liegen die einzelnen Bestandteile amorph vor. Werden kristalline Strukturen detektiert, kann es sich demnach nicht um eine homogene Mischung aus Wirkstoff und Polymermatrix handeln. Dieser Nachweis kann in diesem Fall nicht angewendet werden, da der Wirkstoff Flumethrin schon im Reinzustand amorph ist.



**Abb. 37** Glasübergangstemperatur in Abhängigkeit vom Molekulargewicht; 7b\_PS2000 Mw = 2000 Da (braun), 7b\_PS15000 Mw = 15000 Da (türkis); 7b\_PS110000 Mw = 110000 Da (blau), 7b\_PS500000 Mw = 500000 Da (dunkelblau)

Zudem zeigt Abb. 37, dass die Glasübergangstemperatur auch vom Molekulargewicht des Polymers abhängt. Mit steigendem Molekulargewicht steigt die Glasübergangstemperatur, die dann aber ein gewisses Maximum nicht überschreitet. Die genauen Werte sind Tabelle 13 zu entnehmen.

**Tabelle 13 Glasübergangstemperaturen bei steigendem Molekulargewicht**

Probe	Mw [Da]	Tg [°C]
7b-PS2000	2000	51,53
7b-PS15000	15000	72,33
7b-PS110000	110000	74,27
7b-PS500000	500000	71,39

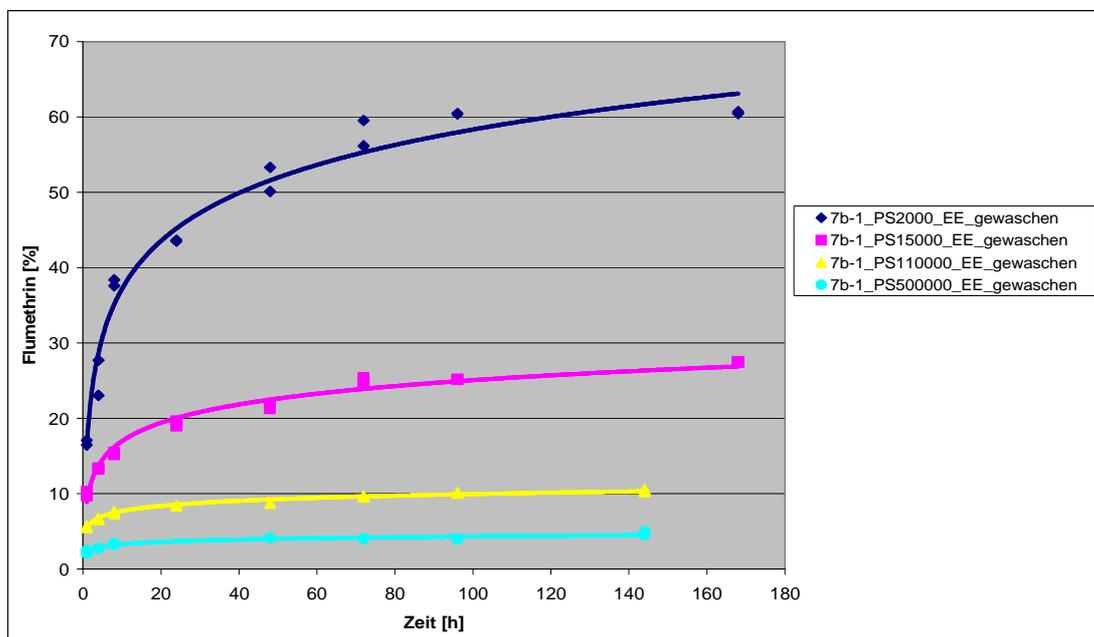
Wenn der Glasübergang ein Maß für die Flexibilität und Weichheit des eingesetzten Materials ist, liegt die Vermutung nahe, dass sich diese auch auf die Freisetzung des Wirkstoffs aus den Partikeln auswirkt. Demzufolge müsste eine niedrigere Glasübergangstemperatur zu einer schnelleren Freisetzung führen. [50] Dies hieße, dass die Partikel mit einem Molekulargewicht von 2000 Da am schnellsten freisetzen, sich zwischen den anderen Partikelsorten jedoch kein deutlicher Unterschied bemerkbar machen sollte, da die Glasübergangstemperaturen hier im gleichen Größenbereich liegen. Diese Vermutung findet ihre Bestätigung in C.2.1.2.4.

#### **C.2.1.2.4 Freisetzung**

Die Freisetzung wird in einem Ethanol-Wasser-Gemisch 70/30 (V/V) % gemessen. Eine optimale Zusammensetzung dieser Komponenten wird in Vorversuchen ermittelt (vgl. C.1.4). Dazu werden die Auswirkungen verschiedener Mischungsverhältnisse auf das Freisetzungsverhalten untersucht. Als optimal wird die Mischung angenommen, bei der innerhalb von 24 h eine mittlere Freisetzung erreicht werden kann. Wird zu wenig freigesetzt, können Unterschiede der Formulierungen schlecht beobachtet werden. Dies gilt auch, wenn zu viel freigesetzt wird. Die Freisetzungsmethode ist kritisch zu betrachten, da sie die realen Bedingungen nicht widerspiegeln kann. Das Medium „Hundefell“, in dem die Freisetzung tatsächlich stattfindet, ist schwer nachzustellen. Diese vereinfachte Darstellung dient dem Vergleich der einzelnen Formulierungen und der ersten Interpretation des Freisetzungsverhaltens verschiedener Formulierungen.

Im hier dargestellten Beispiel handelt es sich um eine Formulierung von Polystyrolpartikeln mit einem theoretischen Wirkstoffgehalt von 13 %. Als Emulgator wird Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer 86/14 verwendet. Die Formulierungen sind durch ihre identische Zusammensetzung vergleichbar, da sie sich lediglich im Molekulargewicht des eingesetzten Polymers unterscheiden. Verschiedene Partikelgrößen werden aus den einzelnen Formulierungen erhalten. Die sich daraus ergebenden Oberflächenunterschiede nehmen auch Einfluss auf die Freisetzung, lassen sich jedoch nicht vermeiden. [52] Sinkende Glasübergangstemperaturen bei sinkendem Molekulargewicht (siehe C.2.1.2.3)

ließen bereits auf eine schnellere Freisetzung schließen. [59] Abb. 38 bestätigt dies nun. Bei einem Molgewicht von 2000 Da (blau) beträgt die Freisetzung nach einer Woche bereits über 60 % des verkapselten Flumethrins. Steigt das Molgewicht auf 15000 Da (pink), so beträgt die Freisetzung nach einer Woche lediglich noch 28 %. Wird das Molekulargewicht noch weiter auf 110000 Da (gelb) und 500000 Da (hellblau) erhöht, so verringert sich die freigesetzte Menge Flumethrin auf 10 % und 5 % nach sechs Tagen. Die Vermutung, dass die Partikel der Molgewichte von 15000, 110000 und 500000 Da ähnlich freisetzen, da ihre Glasübergangstemperaturen im gleichen Größenbereich liegen, wird hier nicht im erwarteten Maße bestätigt. Es ist jedoch deutlich erkennbar, dass Partikel mit dem Molgewicht von 2000 Da wesentlich schneller und mehr Wirkstoff freisetzen als die übrigen Partikelsorten. Dies korreliert mit den gemessenen Glasübergangstemperaturen. [50]



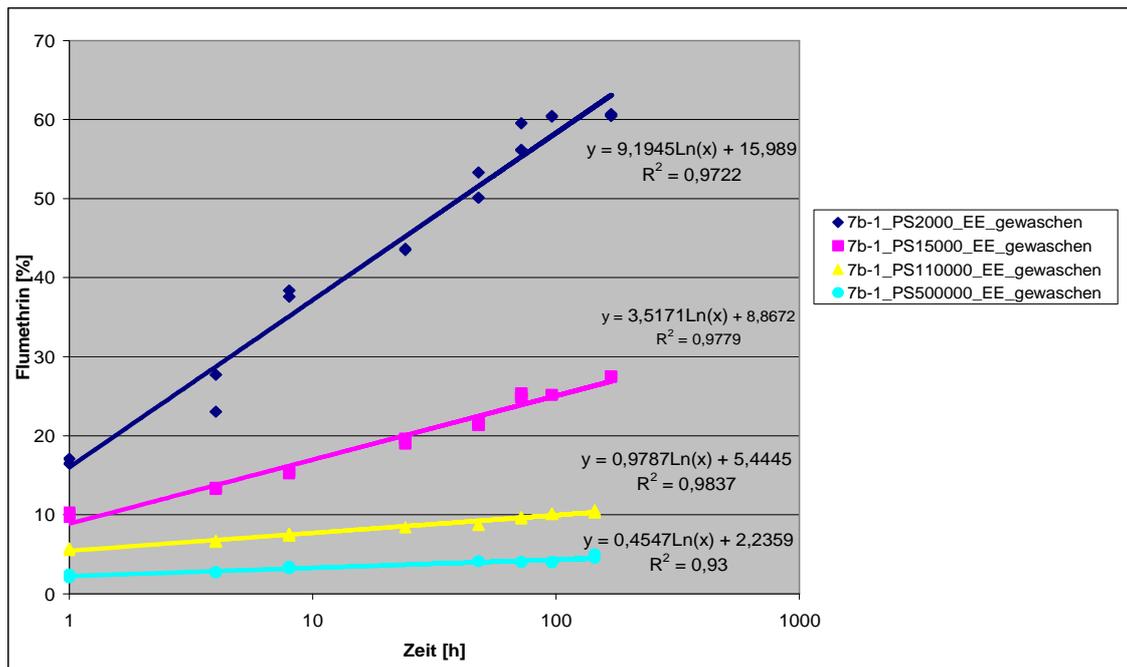
**Abb. 38 Freisetzung von Flumethrin bezogen auf den Flumethringehalt der Partikel bei steigendem Molgewicht der Polymermatrix**

Die unterschiedlichen Freisetzungskurven zeigen, dass das Molekulargewicht einen großen Einfluss auf die Freisetzung hat. Ein niedriges Molgewicht sorgt für eine schnellere Diffusion des Wirkstoffs aus den Partikeln. Mit steigendem Molekulargewicht dagegen sinkt die Freisetzungsgeschwindigkeit. [32]

Die Freisetzung kann demzufolge durch die Wahl eines bestimmten Molekulargewichts gesteuert werden. So ist es denkbar, dass die Zielformulierung Partikel mit unterschiedlichem Molekulargewicht enthält. Für einen schnellen und sofortigen Wirkungseintritt werden Partikel mit einem Polymer niedrigeren Molgewichts eingesetzt und für die stark retardierte Freisetzung werden höhere Molgewichte gewählt. Es soll an dieser Stelle noch erwähnt werden, dass die Freisetzung neben dem Molekulargewicht auch von der Partikelgröße (größere Oberfläche bei kleinen Partikeln) und dem Wirkstoffgehalt (vgl.

C.2.1.1.3) abhängig ist. Welcher Faktor den größten Einfluss auf die Freisetzung hat, ist nicht vollständig geklärt. Aus C.2.1.2.5 wird ersichtlich, dass die Partikel des geringsten Molgewichts, die die größte Freisetzungsrates haben, den niedrigsten Wirkstoffgehalt besitzen. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Einfluss des Molgewichts größer als der des Wirkstoffgehalts ist. Für eine allgemeingültige Aussage muss diese Beobachtung noch näher untersucht werden.

Abb. 38 zeigt, dass sich die erhaltenen Werte mit Hilfe einer Funktion darstellen lassen. Wird nun die Skalierung der Abszisse logarithmiert so wird noch deutlicher, wie sehr die Werte korrelieren. Dies ist in Abb. 39 zu sehen.



**Abb. 39 Freisetzung von Flumethrin bezogen auf den Flumethringehalt der Partikel bei steigendem Molgewicht der Polymermatrix; logarithmisch dargestellt**

Anhand der Ausgleichsgeraden ist zu erkennen, dass die Werte für die Freisetzung mit dem Polymer von 2000 Da am stärksten abweichen. Dennoch liegt das Bestimmtheitsmaß mit einem Wert von  $R^2 = 0,97$  in einem sehr guten Bereich. Als mögliche Fehlerquellen während der Freisetzung sind ungenaues Zupipettieren der Probe und des Lösungsmittels, Konzentrationsunterschiede, Verlust des Lösungsmittels durch verdampfen und unzureichendes Abfiltrieren der Probe vor der Analyse mittels HPLC zu nennen.

### C.2.1.2.5 Flumethringehalt

Kapitel C.2.1.2 beschäftigt sich mit dem Einfluss des Molekulargewichts auf die Formulierung. Um einen Vergleich anstellen zu können, ist es wichtig, die restlichen Formulierungsbestandteile in ihrer Menge konstant zu halten. Somit ändert sich auch die eingesetzte Flumethrinmenge absolut und prozentual nicht. Bei den Freisetzungsvorversuchen

zeigt sich jedoch, dass der Flumethringehalt mit dem Molekulargewicht steigt. Tabelle 14 zeigt den Wirkstoffgehalt in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Polymers. Der theoretische Flumethringehalt liegt bei 13 %. Die mittels HPLC ermittelten Werte liegen jedoch zwischen ~ 9 und ~ 16 %.

**Tabelle 14 Wirkstoffgehalt in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Polymers**

Probe	Flumethringehalt [%]
7b-1_PS2000_EE gewaschen	9,6
7b-1_PS15000_EE gewaschen	12,9
7b-1_PS110000_EE gewaschen	15,9
7b-1_PS500000_EE gewaschen	16,2

Der Grund für die Unterschiede im Wirkstoffgehalt kann mit der Größe der Partikel zusammen hängen. So besitzen die kleineren Partikel eine größere Oberfläche. Für die Entstehung dieser Oberflächen ist der eingesetzte Emulgator von großer Bedeutung. Je größer die Oberfläche, umso mehr Emulgator wird benötigt. Dies hat zur Folge, dass mehr des im Überschuss zugesetzten Emulgators für die Partikelbildung benötigt wird. Für 7b-1\_PS500000\_EE wird demnach am wenigsten Emulgator benötigt. Die Masse der Polymermatrix verringert sich um den nicht benötigten Emulgatoranteil, während die Wirkstoffmenge gleich bleibt. So wird der Wirkstoff auf eine geringere Gesamtmasse bezogen, der Gehalt steigt. Diese Überlegung wird in der Praxis bestätigt.

Bei einem theoretischen Gehalt von 13 % scheint ein ermittelter Wirkstoffgehalt von 9,6 % sehr niedrig. Wirkstoffverluste können im Herstellungsprozess und der späteren Aufreinigung der Partikel auftreten.

### C.2.1.3 Einfluss des Emulgatoranteils

Für die Herstellung der Partikel ist die Emulsion von zentraler Bedeutung. Ihre Güte entscheidet über die Qualität der Partikel. Nur eine ausreichend stabile Emulsion mit einer kleinen, homogenen Tröpfchenverteilung führt zu genügend kleinen Partikeln mit einer monomodalen Größenverteilung. Interessant ist nun der Einfluss, den der Emulgator auf das System ausübt. Dazu werden zum einen verschiedene Emulgatoren getestet, zum anderen der Einfluss der zugesetzten Menge des als Optimum bezeichneten Emulgators.

Die Auswahl der verschiedenen Emulgatoren beruht auf folgendem Hintergrundgedanken: Für die weitere Verarbeitung und spätere Anbindung an Haare muss die Partikeloberfläche geladen sein. Je nach Verfahren ist eine positive oder eine negative Ladung notwendig. Dabei muss die Oberfläche nicht permanent kationisch oder anionisch, sondern ionisierbar sein, d.h. die Oberfläche soll Molekülgruppen enthalten, die als Protonendonatoren oder

-akzeptoren fungieren. Carboxyl- und Amin-Funktionen sind solche ionisierbaren Molekülgruppen. Ein Emulgator, der eben solche Eigenschaften hat und sich, wenn das Lösungsmittel abgezogen wird, auf der Partikeloberfläche anlagert ist damit keine Formulierungssubstanz, die später aufwendig entfernt werden muss, sondern ein Bestandteil der Partikel.

Zu diesen Substanzen gehören die Eudragite<sup>®</sup>, die in der pharmazeutischen Industrie vor allem als Filmbildner eingesetzt werden, aber auch Copolymere wie das Styrol-Maleinsäureanhydrid (vgl. Kapitel B.3). Die Eudragite<sup>®</sup> gehören in die Gruppe der Methylmethacrylate. In ihren strukturellen Eigenschaften sind sie dem Polymer PMMA ähnlich und sollten daher mit diesem kompatibel sein. Dies ist notwendig wenn die Eudragite<sup>®</sup> ihre Wirkung als Emulgator entfalten und sich an der Polymermatrix des Partikels anlagern sollen. Gleiches gilt für das Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer. Aufgrund der Styrol Gruppe ist es dem Polystyrol ähnlich und sollte sich so an dessen Oberfläche verankern lassen. Dies gilt auch für die Polystyrolsulfonsäure, jedoch sind ihre emulgierenden Eigenschaften nicht deutlich genug ausgeprägt, sodass keine stabile Emulsion erhalten werden kann.

In der hier vorliegenden Arbeit werden die emulgierenden Eigenschaften folgender Substanzen in der Kombination mit Polystyrol weiter untersucht: Eudragit<sup>®</sup> S 100, Eudragit<sup>®</sup> RS 100, Eudragit<sup>®</sup> E 100 und Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer 86/14, 50/50 und 93/7. Die vermuteten Kompatibilitäten werden bestätigt, sodass der Einfluss des Emulgatoranteils nur mit dem Copolymer Styrol-Maleinsäureanhydrid systematisch überprüft wird. Die Kombinationen mit den übrigen Emulgatoren sollen im Folgenden nur kurz erwähnt werden.

### **C.2.1.3.1 Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer**

Die Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymere unterscheiden sich lediglich in ihrem Säureanteil (siehe auch B.3.8). In Versuchen zeigte sich, dass das Copolymer 86/14 ein optimales Verhältnis zwischen dem hydrophilen und lipophilen Molekülteil aufweist. Das Copolymer mit einem Maleinsäureanhydridgehalt von 7 % (m/m) ist zu wenig hydrophil, sodass keine stabile Emulsion gebildet werden kann. Sowohl das Copolymer 50/50 als auch das Copolymer 86/14 ist in der Lage stabile Emulsionen zu bilden. Eingesetzt wird jedoch das Copolymer 86/14, da hier der hydrophile Anteil geringer ist. Aufgabe des Copolymers ist es, sich in das Matrixsystem des Partikels einzuflechten und so dessen Oberfläche zu modifizieren. Dies sollte einfacher von statten gehen, wenn der lipophile Teil des Polymers möglichst groß ist.

Für die Untersuchung, welchen Einfluss der Emulgatoranteil auf die Partikel hat, wird eine bewährte Formulierung verwendet, Polystyrol- und Flumethringehalt konstant gehalten und

nur der Emulgatoranteil (MSCP 14) variiert. Tabelle 15 zeigt die allgemeine Zusammensetzung der Partikel.

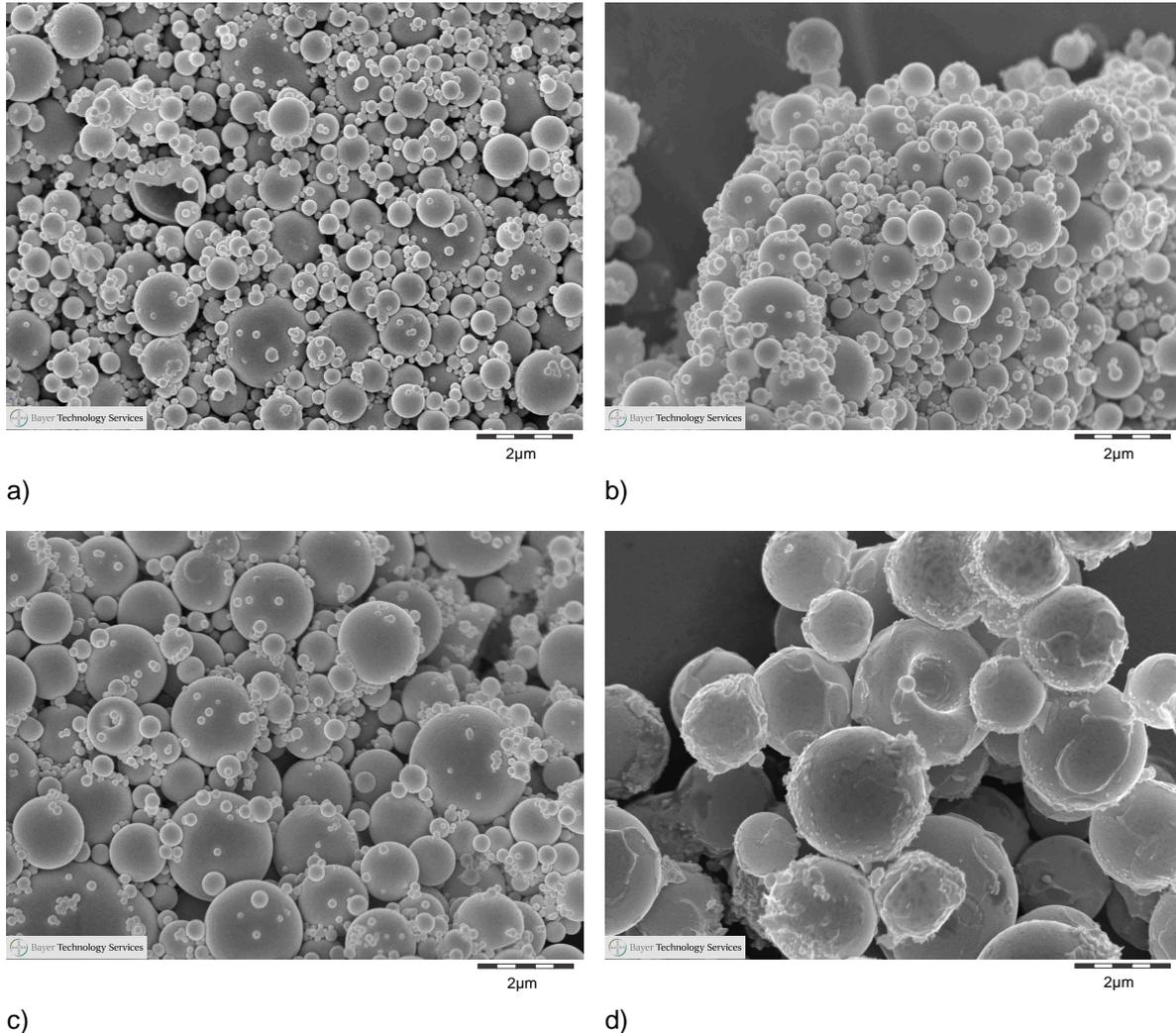
**Tabelle 15 Zusammensetzung der Partikelsorten mit steigendem Emulgatoranteil**

Substanz	Menge [%]
Polystyrol	5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
MSCP 14	17 %; 23 %; 28 % und 33 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	13 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Ein Emulgatoranteil von 17 % wird hier als untere Grenze gewählt, da bei einem geringeren Gehalt ein Brechen der Emulsion zu befürchten ist. So sind zwar die Emulsionen mit 23 und 17 % Copolymeranteil noch stabil, jedoch kommt es beim Verdampfen des Lösungsmittels zu einer Polymerablagerung am Rührfisch, was auf eine nicht ausreichend stabilisierte Emulsion hindeutet. Die Formulierung mit 28 % Copolymer ist als optimal anzusehen. Es wird eine stabile Emulsion ohne Koaleszenz beim Abdampfen des Lösungsmittels erhalten. Ein Überschuss an Copolymer ist dafür notwendig. Dieser Überschuss wird bei einem Copolymergehalt von 33 % noch größer. Damit ist die Menge des Copolymers, das in die Partikel miteingeflochten wird, längst überschritten. Es entsteht also ein Gleichgewicht, das zugunsten des in Lösung verbleibenden Copolymers verschoben wird. Eine weitere Erhöhung des Emulgatoranteils ist als nicht sinnvoll zu erachten.

Bei der Auswertung des Versuchs ist die Betrachtung der Partikelgröße von besonderem Interesse. Zur Stabilisierung der Emulsion muss die gesamte Oberfläche der dispergierten organischen Phase mit Emulgatormolekülen besetzt sein. Viele kleine Tropfen haben dabei eine größere Oberfläche, als wenige große mit dem gleichen Volumen. Auch wenn der Emulgator immer im Überschuss zugegeben wird, liegt die Vermutung nahe, dass ein noch größerer Anteil des Copolymers kleinere Tropfen stabilisieren kann, welches dann auch kleinere Partikel zur Folge hat. Um dies zu zeigen, reicht eine mikroskopische Aufnahme nicht aus. Daher werden die hergestellten Partikel mittels REM und Laserdiffraktometrie untersucht, auch eine Messung der spezifischen Oberfläche wird durchgeführt.

Die REM-Aufnahmen zeigt Abb. 40.



**Abb. 40 REM Aufnahmen der Formulierungen mit verändertem Emulgatoranteil; a) 33 % MSCP 14; b) 28 % MSCP 14; c) 23 % MSCP 14; d) 17 % MSCP 14**

Die Partikel liegen filtriert und gewaschen vor. Von a) nach d) nimmt der Copolymeranteil ab. Es ist deutlich erkennbar, dass die Partikelgröße mit sinkendem Emulgatoranteil steigt. Der Anteil sehr kleiner Partikel ist bei einem hohen Copolymeranteil sehr groß. Diese Versuche wurden ohne den Einsatz des Microfluidizer durchgeführt. Es ist zu vermuten, dass die Partikel mit Hilfe des Microfluidizer insgesamt kleiner und homogener verteilt vorlägen. Bild d) zeigt Partikel, die scheinbar nicht gründlich genug gewaschen wurden. Ob diese Ablagerungen wirklich aufgrund eines mangelhaften Waschvorgangs entstanden sind oder fester Bestandteil der Partikel sind, ist abschließend noch nicht geklärt. Da die REM-Aufnahmen nur einen kleinen Ausschnitt der Probe zeigen, ist nicht gewährleistet, dass sie für die gesamte Probe repräsentativ sind. Eine Partikelgrößenmessung mit Hilfe der Laserdiffraktometrie soll weiteren Aufschluss geben. Hier ist allerdings zu beachten, dass nicht zwischen einzelnen Partikeln und Agglomeraten unterschieden werden kann. Die Partikelgrößen sind tabellarisch in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16 Partikelgrößenmessung der Suspension mittels Laserdiffraktometrie**

Probe	D(10) [µm]	D(50) [µm]	D(80) [µm]	D(90) [µm]
a) 33% MSCP 14	0,679	1,281	1,891	2,262
b) 28% MSCP 14	0,700	1,294	1,889	2,250
c) 23% MSCP 14	0,820	1,510	2,176	2,578
d) 17% MSCP 14	0,794	1,647	2,456	2,940

Die Messung mittels Laserdiffraktometrie zeigt nur einen kleinen Unterschied in der Partikelgröße bei sinkendem Emulgatoranteil. Diese Änderung ist wesentlich geringer als es die REM-Aufnahmen vermuten lassen. Der Grund hierfür liegt zum einen in der volumenbasierten Auswertung des Laserdiffraktometers. Viele kleine Partikel fallen nicht so sehr ins Gewicht wie wenige große. Zum anderen ist es möglich, dass sich die kleinsten Partikel auf der Oberfläche der größeren Partikel angelagert haben und so ein Agglomerat erfasst wird und keine einzelnen Partikel.

Weiteren Aufschluss soll die Messung der spezifischen Oberfläche geben. Dabei wird die Stickstoff-Adsorption nach Mehrpunkt-BET-Methode bei -196 °C ermittelt (siehe dazu auch E.2.3.5). Die Ergebnisse dieser Messung sind Tabelle 17 zu entnehmen.

**Tabelle 17 Messung der Spezifischen Oberfläche nach Mehrpunkt-BET-Methode bei sinkendem Emulgatoranteil**

Probe	Spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]
a) 33% MSCP 14	8,4
b) 28% MSCP 14	8,3
c) 23% MSCP 14	6,7
d) 17% MSCP 14	6,3

Wie nach der Partikelgrößenmessung mittels Laserdiffraktometrie und den REM-Aufnahmen erwartet, nimmt die spezifische Oberfläche mit sinkendem Emulgatoranteil ab. Aber auch hier zeigt sich ein Unterschied zwischen REM-Aufnahmen und BET-Messung. Bei Betrachtung der mikroskopischen Aufnahme wird bei a) eine vielfach höhere Oberfläche angenommen als bei d). Es kann aber nur ein Unterschied von 2 m<sup>2</sup>/g gemessen werden. Dies kann folgende Begründung haben: Für die Messung werden die trockenen Partikel verwendet. Ein vorangegangener Waschschritt sollte dafür sorgen, dass keine Eduktreste das Ergebnis verfälschen. Die getrockneten Partikel werden zu einem feinen Pulver gemörsert und dann vermessen. Wie Redispergierungsversuche zeigen, lassen sich die gewaschenen Partikel schlecht benetzen. Sie sind sehr hydrophob und durch den

Trocknungsvorgang haben sich Agglomerate gebildet. Ob und wie viele Agglomerate vorliegen, lässt sich durch die BET-Messung nicht ermitteln, da keine detaillierte Auswertung der Probe möglich ist. Es ist aber davon auszugehen, dass nicht nur einzelne Partikel vermessen werden, sondern auch Agglomerate, die für eine geringere Oberfläche sorgen. Die erhaltenen Werte spiegeln also nicht die tatsächliche Oberfläche der Probe wider. Dennoch ist die Tendenz erkennbar, dass bei sinkendem Emulgatoranteil auch die Gesamtoberfläche durch das Vorhandensein größerer Partikel sinkt.

Es konnte gezeigt werden, dass der Emulgatoranteil die Partikelgröße beeinflusst. Eine Modifizierung der Größe ist demnach zusätzlich auch über die Zusammensetzung der Formulierung möglich. Als untere Grenze für die Emulgatorkonzentration ist die Stabilität der Emulsion zu sehen. Es muss soviel Emulgator vorhanden sein, dass daraus ein stabiles System resultiert. Die obere, sinnvolle Grenze bildet der Emulgatoranteil von 33 %. Eine weitere Verkleinerung der Partikelgröße ist bei noch höheren Emulgatorkonzentrationen zwar nicht ausgeschlossen, jedoch erhöht sich auch der Anteil des in der Wasserphase verbleibenden Emulgators. Eine Sättigung der Oberfläche wird somit erreicht.

An dieser Stelle soll kurz erwähnt werden, dass auch versucht wurde durch die Höhe des Druckes des Microfluidizer die Partikelbildung zu beeinflussen. Der Standarddruck von 500 bar (vgl. E.2.1.1) kann nicht erhöht werden, da der Energieeintrag sonst so groß wird, dass durch die Erwärmung der Emulsion zuviel Dichlormethan verdampft. Wird der Druck verringert zeigt sich jedoch auch keine Verschlechterung der erhaltenen Tröpfchenverteilung. Der Einfluss des Microfluidizer kann nicht so fein dosiert werden, dass es zu einem merklichen Unterschied in der Tröpfchengröße kommt. Über eine Mehrfachbehandlung der Emulsion mit dem Microfluidizer kann eine Verbesserung erzielt werden. Jedoch verdampft bei jedem Durchgang erneut Dichlormethan, was negative Auswirkungen auf die erhaltene Emulsion haben kann. Variationen in der Partikelgröße müssen also über die Zusammensetzung der Emulsion gesteuert werden und nicht über Druckänderungen des Microfluidizer.

Freisetzungsversuche von Partikeln mit steigendem Emulgatoranteil wurden nicht durchgeführt. Es ist zu vermuten, dass die Freisetzungsrates mit steigender Partikelgröße abnimmt. [52]

### **C.2.1.3.2 Eudragit® S 100**

Eudragit® in Kombination mit Polystyrol wird nur ganz zu Anfang der Arbeit in Vorbereitung auf die Sprühtrocknung getestet. Dabei werden keine Optimierungen vorgenommen, es wird lediglich geprüft, ob Polystyrol und Eudragit® S ein stabiles Emulsionssystem bilden. Mit Hilfe des Emulsion Evaporation Verfahrens wird die Emulsion in eine Suspension überführt. Die Güte der Emulsion kann so über die erhaltenen Partikel erneut geprüft werden. Zusätzliche Charakterisierungen werden nicht unternommen, da die Formulierung dem Verfahren der

Sprühtrocknung unterworfen werden soll. Weitere Informationen zu Polystyrol - Eudragit<sup>®</sup> Partikeln finden sich demzufolge in C.2.2 Sprühtrocknung – Polystyrol.

Polystyrol ergibt mit Eudragit<sup>®</sup> S scheinbar stabile Emulsionen. Die Tröpfchengröße ist inhomogen. Ein Microfluidizer kommt nicht zum Einsatz. Die erhaltene Suspension zeigt Partikel < 5 µm, die Größenverteilung ist wiederum nicht homogen. Zudem bildet sich beim Abzug des Lösungsmittels ein großer Polymerpfropf am Rührfisch, welches für eine unzureichende Stabilität der Emulsion spricht. Eine Optimierung kann in jedem Fall erfolgen, jedoch scheint dies angesichts der guten Ergebnisse mit Styrol-Maleinsäureanhydrid als oberflächenmodifizierendes Molekül nicht sinnvoll.

#### **C.2.1.3.3 Eudragit<sup>®</sup> E 100**

Eudragit<sup>®</sup> E ist ein kationisierbares Molekül. Es löst sich in einer wässrigen Phase mit saurem pH-Wert und kann erst in diesem Milieu seine Emulgatoreigenschaften entfalten. Die Emulsionstropfen sind in ihrer Größe inhomogen, es sind sogar große doppelwandige Öltropfen vorhanden, die aber nicht sehr stabil sind. Wird das Lösungsmittel verdampft, bilden sich kleine Partikel, die meist < 5 µm sind, jedoch liegen die Partikel nicht einzeln vor. Es bilden sich Partikelnester, wo viele kleine Partikel als Agglomerat zusammenheften. Eine weitere Optimierung mit Polystyrol und Eudragit<sup>®</sup> E wird nach diesen Versuchen nicht weiter verfolgt.

#### **C.2.1.3.4 Eudragit<sup>®</sup> RS 100**

Eudragit<sup>®</sup> RS ist permanent kationisch geladen, es ist nicht wasserlöslich, aber dennoch in der Lage eine Emulsion zu stabilisieren. In Kombination mit Polystyrol wird eine Emulsion mit kleinen (~ 7 µm), homogenen Tröpfchen erhalten. Auch die daraus entstehende Suspension zeigt kleine Partikel (< 5 µm) in einer homogenen Größenverteilung. Diese Formulierung wird in der Sprühtrocknung weiter untersucht.

#### **C.2.1.4 Verdopplung der organischen Phase**

Bei einem Probenvolumen von 200 ml können ca. 3 g Partikel erhalten werden. Die Möglichkeit das Volumen pro Ansatz zu erhöhen, ist nicht realisierbar, da eine größere Flüssigkeitsmenge nicht mehr vom UltraTurrax bewältigt werden kann. Somit wird versucht die organische Phase zu verdoppeln, das Gesamtvolumen aber beizubehalten. Die Emulsion setzt sich nun aus 80 ml Dichlormethan und 120 ml Wasser zusammen. Dadurch verdoppelt sich auch die Menge der Edukte, wobei die Konzentrationsverhältnisse gleich bleiben.

Die entstehenden Emulsionen scheinen stabil. Beim Abzug des Lösungsmittels, kommt es jedoch zu größeren Polymerausfällungen, welches auf eine ungenügende Stabilität hinweist. Wird der Emulgatoranteil kleiner, so werden die Polymerablagerungen größer. Die erhaltenen Emulsionen lassen sich demnach schneller aus dem Gleichgewicht bringen. Die

mikroskopischen Aufnahmen der Emulsionen und Suspensionen zeigen keinen merklichen Unterschied zu denen mit einer organischen Phase von nur 40 ml. Partikelgrößenmessungen zeigen, dass die Partikel, die in der organischen Phase kleineren Volumens hergestellt werden, kleiner sind. Dafür werden zwei Formulierungen einmal mit dem Phasenverhältnis 160 ml / 40 ml und einmal mit 120 ml / 80 ml Wasser / Dichlormethan hergestellt. Die Formulierungen werden nicht mit dem Microfluidizer homogenisiert, welches wohl zu einer weiteren Verkleinerung der Partikel führen würde. Die Partikelgrößenverteilung ist Tabelle 18 zu entnehmen.

**Tabelle 18 Partikelgrößenanalyse mittels Laserdiffraktometrie bei unterschiedlicher Lösemittelzusammensetzung**

Probe	D(10) [µm]	D(50) [µm]	D(80) [µm]	D(90) [µm]
7a_EE 28 % MSCP 14 40 ml Dichlormethan	0,693	1,247	1,790	2,115
7a_EE_80ML 28 % MSCP 14 80 ml Dichlormethan	0,771	1,554	2,419	3,012
10b-2_EE 17 % MSCP 14 40 ml Dichlormethan	0,794	1,647	2,456	2,940
10b_EE_80ML 17 % MSCP 14 80 ml Dichlormethan	0,760	1,638	2,580	3,198

Bei der Probe 7a ist der Größenunterschied beider Formulierungen deutlich erkennbar. Der Emulgatoranteil dieser Probe ist zudem hoch, was eine bessere Stabilität gewährleistet. Die Probe 10b enthält dagegen einen geringeren Anteil an Emulgator. Die Stabilisierung der Emulsion ist hier schwieriger. Ein Unterschied zu der Formulierung mit höherem Anteil an organischer Phase ist kaum noch sichtbar. Aufgrund dessen, dass es bei den Formulierungen mit 80 ml Dichlormethan zu großen Produktverlusten durch Polymerausfällungen aufgrund ungenügender Stabilisierung kommt, wird das anfängliche Verhältnis von wässriger zu nicht wässriger Phase von 160 ml / 40 ml beibehalten.

### C.2.1.5 Polystyrol mit Imidacloprid

Alle vorangegangenen Optimierungen wurden auf den Wirkstoff Flumethrin abgestimmt. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Eigenschaften von Flumethrin und Imidacloprid ist nicht davon auszugehen, dass die optimierte Formulierung auch für Imidacloprid günstig ist. Dennoch soll versucht werden das kristalline Imidacloprid mit der auf Flumethrin

abgestimmten Methode zu verkapseln. Für eine Verkapselung muss der Wirkstoff amorph vorliegen, nur so kann die gewünschte Partikelgröße erreicht werden. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Verkapselung ist die Löslichkeit von Imidacloprid in der organischen Phase. Diese ist in Dichlormethan mit 6,7 % gegeben. [11] Um sicher zu gehen, dass der Wirkstoff verkapselt wird, darf er sich nicht in der wässrigen Phase lösen. Flumethrin ist praktisch unlöslich in Wasser, Imidacloprid löst sich jedoch mit 0,061 % in Wasser. [11] Um beim Verdampfen des Lösungsmittels das Verteilungsgleichgewicht von Imidacloprid nicht ungünstig zu beeinflussen, wird mit einer Imidacloprid gesättigten Wasserphase gearbeitet. Die Formulierung ist Tabelle 19 zu entnehmen.

**Tabelle 19 Zusammensetzung der Imidacloprid verkapselten Partikel**

Substanz	Menge [%]
Polystyrol	5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
MSCP 14	28 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Imidacloprid	9 %, 13 % und 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Die erhaltenen Emulsionen scheinen von ihrer Konsistenz sehr niedrigviskos und wässrig, im Gegensatz zu den vergleichbaren Emulsionen mit Flumethrin. Ein befürchtetes Brechen der Emulsion tritt jedoch nicht ein. Zur Verbesserung des Partikelbildes werden die Emulsionen mit dem Microfluidizer homogenisiert. Jedoch zeigt sich unabhängig vom Wirkstoffgehalt keine wesentliche Besserung. Die vermutete Instabilität kommt beim Verdampfen der organischen Phase zum Tragen. Es bilden sich große Polymerablagerungen, die nur entstehen, wenn die Emulsionstropfen, bedingt durch ungenügende Stabilität, koaleszieren. Sowohl die lichtmikroskopischen Aufnahmen als auch die Analyse der Laserdiffraktometrie der erhaltenen Suspension zeigen, unabhängig vom Wirkstoffgehalt, ein homogenes Partikelbild mit D(90)-Werten von ~ 2 µm. Die Verkapselung von Imidacloprid scheint trotz der auftretenden Instabilitäten erfolgreich verlaufen zu sein. Eine Analyse des Wirkstoffgehalts der Partikel soll dies bestätigen. Dazu werden die erhaltenen, gewaschenen Partikel in Lösung gebracht, der enthaltene Wirkstoff herausgelöst und mittels HPLC-Methode analysiert. In allen Imidacloprid Proben konnte lediglich 0,05 % Imidacloprid gefunden werden. Eine Verkapselung des Wirkstoffs ist somit fehlgeschlagen. Ein Grund hierfür ist wohl die nicht optimal stabilisierte Emulsion, deren Formulierung für den Wirkstoff Imidacloprid optimiert werden müsste. Auch ist es wahrscheinlich, dass die Löslichkeit von Polystyrol in Dichlormethan besser ist als die von Imidacloprid. Dies bedeutet, dass der Wirkstoff mit seinen kristallinen Eigenschaften beim Abzug des organischen Lösungsmittels seine Löslichkeitsgrenze erreicht und auskristallisiert, bevor das Polystyrol feste Partikel ausbilden kann. Dieses Beispiel zeigt, dass die für Flumethrin optimierten Formulierungen nicht ohne weiteres auf Imidacloprid übertragbar sind. Die Entwicklung einer Formulierung,

die für die Verkapselung von Imidacloprid geeignet ist, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen und wird so nicht weiter verfolgt.

## **C.2.2 Sprühtrocknung**

Die Sprühtrocknung ist das zweite große Verfahren, das hier zum Einsatz kommen soll. Ein Vorteil liegt darin, dass die Partikel in trockener Form erhalten werden. Ein Waschschrift, wie Zentrifugation oder Filtration, entfällt. Es ist jedoch zu bemerken, dass im Überschuss eingesetzte Edukte neben dem gewünschten Produkt anfallen. Dies kann von Vorteil sein, da der überschüssige Emulgatoranteil bei einer späteren Redispergierung der Partikel als Lösungsvermittler dient. Es kann aber auch beim Auftragen der Partikel in einer Suspension auf das Fell zu unerwünschten Verklebungen kommen, wenn die als Emulgator verwendeten Eudragite<sup>®</sup> ihre filmbildenden Eigenschaften entwickeln. Als positiv ist auch zu nennen, dass die Bildung von Agglomeraten durch die Trocknung einzelner Emulsionstropfen erschwert, wenn nicht sogar unterbunden wird.

Polystyrol konnte nicht sehr erfolgreich mit dem Verfahren der Sprühtrocknung verarbeitet werden. Es wird die Versprühung von reinen Lösungen, Emulsionen und Suspensionen getestet. Dabei wird Polystyrol mit verschiedenen Copolymeren kombiniert: Eudragit<sup>®</sup> S und RS, Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer 86/14 und 50/50. Die Standardversuchsbedingungen sind E.2.2.1 zu entnehmen.

Die Versprühung von reinen Lösungen zeigt sich als nicht praktikabel. Das Lösungsmittel der versprühten Tropfen kann nicht schnell genug verdampft werden, sodass die Aushärtung der Partikel nicht optimal verläuft. Das Polymer kann so nicht in sphärischen Partikeln aushärten, sondern zieht spinnennetzartige Fäden. Das dennoch in kleinen Mengen erhaltene Produkt ist nicht redispergierbar und lässt kaum einzelne Partikel erkennen.

### **C.2.2.1 Polystyrol mit Eudragit<sup>®</sup> RS**

Eudragit<sup>®</sup> RS ist permanent kationisch geladen. Es ist im wässrigen Milieu nicht löslich, besitzt dennoch emulgierende Eigenschaften, um eine Emulsion zu stabilisieren. Der positive Vorversuch von Polystyrol und Eudragit<sup>®</sup> RS kann in der Sprühtrocknung nicht bestätigt werden, obwohl sich die Versprühung der Emulsion problemlos zeigt. Ein flockiges, stark elektrostatisches Produkt wird erhalten. Die mikroskopische Aufnahme lässt einzeln geformte Partikel erkennen. Diese sind stark hydrophob und lassen sich nicht benetzen. Eine Redispergierung und damit Vereinzelung der Partikel ist nicht möglich. Die wenigen, redispergierten Partikel zeigen sich homogen in Größe und Aussehen. Weitere Versuche werden wegen der schlechten Benetzbarkeit der Partikel nicht unternommen.

## C.2.2.2 Polystyrol mit Eudragit® S

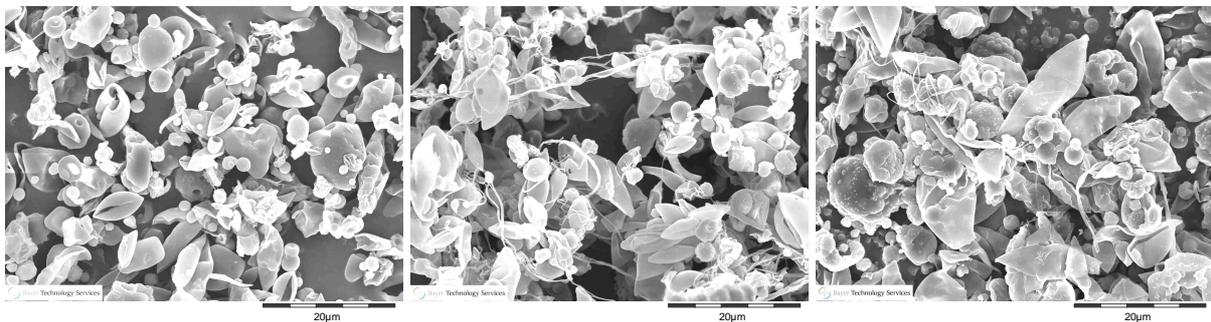
### C.2.2.2.1 Optimierung des Emulgatoranteils Eudragit® S

Im Emulsion Evaporation Verfahren konnte bereits gezeigt werden, dass der Anteil des eingesetzten Emulgators Einfluss auf die Produktqualität nimmt. Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass ein höherer Anteil an Emulgator in der Lage ist, Partikel einer größeren Oberfläche und damit kleinere Partikel zu erzeugen (siehe C.2.1.3). Inwieweit dies auch auf die Sprühtrocknung zutrifft wird am Beispiel Polystyrol mit Eudragit® S getestet. Die Standardformulierung ist Tabelle 20 zu entnehmen.

**Tabelle 20 Standardformulierung zur Optimierung des Emulgatoranteils**

Substanz	Menge [%]
Polystyrol	5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® S	33 %; 28 % und 17 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	9 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Alle Emulsionen werden ohne den Einsatz des Microfluidizer hergestellt. Sie sind stabil und lassen sich ohne die Ausbildung von Polymerfäden versprühen. Die Produkte sind flockig und nicht elektrostatisch. Die Partikel sind redispergierbar, kleinere Agglomerate bleiben jedoch zurück. Das Partikelkontingent ist  $< 5 \mu\text{m}$ , jedoch ist die Größenverteilung inhomogen. Besonders die Probe mit dem geringsten Emulgatoranteil zeigt große Inhomogenitäten. Hier sind auch größere, nicht sphärische Partikel zu beobachten. Da die lichtmikroskopischen Aufnahmen aufgrund ihrer Auflösung nicht für eine ausreichende Beurteilung geeignet sind, werden REM-Aufnahmen zur weiteren Charakterisierung angefertigt (Abb. 41).



a)

b)

c)

**Abb. 41 REM-Aufnahmen von Polystyrol - Eudragit® S - Partikeln mit unterschiedlichem Emulgatoranteil; a) 33 % Eudragit® S, b) 28 % Eudragit® S; c) 17 % Eudragit® S**

Die im Lichtmikroskop als lediglich in der Partikelgröße inhomogen erachteten Formulierungen zeigen in den REM-Aufnahmen ein völlig anderes Bild (vgl. Abb. 41).

Einzelne Partikel sind hier kaum zu erkennen. Vielmehr sind Gebilde vorherrschend, die wie Partikelschalen aussehen. Auch einige Polymerfäden sind sichtbar. Die Proben machen den Eindruck, dass sich während des Trocknungsvorgangs die äußere Umhüllung der Partikel gelöst hat und separat neben dem Matrixpolymer ausgefallen ist. Die Schalen zeigen eine glatte, ebene Oberflächenstruktur, während die erhaltenen Partikel eine unförmige, raue Oberfläche besitzen. Die Inhomogenität der Größe wird hier bestätigt. Teilweise sind Partikel mit einem Loch erkennbar. Dieses Phänomen ist für das Sprühtrocknungsverfahren nicht ungewöhnlich. Durch den äußerst schnellen Trocknungsvorgang härten die Partikel außen teilweise schneller aus als innen. Das restliche, noch im Partikel verbleibende Lösungsmittel kann nun durch die ausgehärtete Partikelhülle nicht mehr entweichen. Beim fortschreitenden Trocknungsprozess baut sich durch das verdampfende Lösungsmittel ein Druck im Partikel auf, der dieses letztendlich zum Platzen bringt und das Lösungsmittel entweichen lässt. Das erhaltene Partikel ist hohl, welches nicht erwünscht ist, da so durch eine größere Oberfläche auch eine schnellere Wirkstofffreisetzung begünstigt wird. [52] Abb. 41 lässt nicht erkennen, dass ein sich ändernder Emulgatorgehalt Auswirkungen auf die Partikelgröße oder das Aussehen der Partikel hat. Diese Versuche machen jedoch sehr deutlich, dass Polystyrol mit dem Methylmethacrylat-Derivat Eudragit® S nicht kompatibel ist. Eudragit® S, welches sich aufgrund seiner emulgierenden Eigenschaften an der Grenzfläche Wasser – organische Phase aufhalten wird, bildet die äußere Schale der Partikel. Gewünscht ist der Effekt, dass sich der emulgierende Bestandteil mit seinem hydrophoben Molekülteil in der Polymermatrix des Partikels verankert, so dessen Oberfläche modifiziert und den Partikel für eine Anbindung an das Hundehaar vorbereitet. Es kann davon ausgegangen werden, dass die schalenartigen Gebilde von dem Emulgator gebildet werden, der nicht mit der Polymermatrix kompatibel ist. Der Versuch die Oberfläche zu modifizieren ist somit misslungen. Für weitere Untersuchungen muss eine emulgierende Substanz gefunden werden, die mit dem Matrixpolymer Polystyrol kompatibel ist.

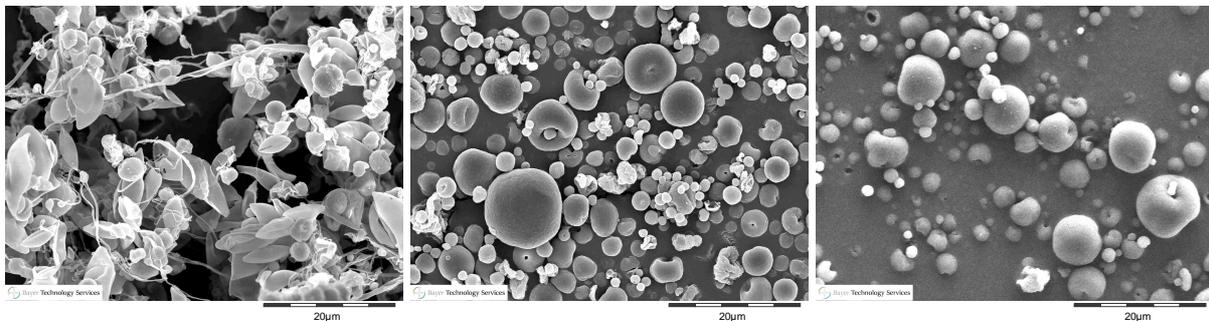
### **C.2.2.2.2 Optimierung der Homogenität**

Im Rahmen der in C.2.2.2.1 durchgeführten Versuche wird auch untersucht, welchen Einfluss der Einsatz eines Hochdruckhomogenisators auf das System hat. Dazu wird eine Formulierung gleicher Zusammensetzung keinmal, einmal und dreimal mit dem Microfluidizer behandelt. Die Formulierungsbestandteile sind in Tabelle 21 aufgeführt.

**Tabelle 21 Zusammensetzung der Formulierung zur Untersuchung des Einflusses eines Hochdruckhomogenisators**

Substanz	Menge [%]
Polystyrol	5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® S	28 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	9 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Das Produkt, welches aus der nicht behandelten Emulsion gewonnen wird, ist flockig, aber nicht elektrostatisch. Die Partikel, die nach der einfach und mehrfach Behandlung mit dem Microfluidizer erhalten werden, sind sehr fein pulvrig und ebenfalls nicht elektrostatisch. Schon die mikroskopische Betrachtung der Emulsionen zeigt nach Einsatz des Microfluidizer eine enorme Verbesserung der Tröpfchengröße. So ist die organische Phase nach dem einmaligen Durchfluss durch den Microfluidizer so fein in der Wasserphase verteilt, dass nur noch wenige große Emulsionstropfen zurückbleiben. Nach dem dreimaligen Durchtritt durch den Microfluidizer sind die Tropfen der organischen Phase so fein dispergiert, dass einzelne Emulsionstropfen kaum noch erkennbar sind. Die Vorschrift zum Einsatz des Microfluidizer ist E.2.1.1 zu entnehmen. Alle drei Proben lassen sich gut redispergieren. Die erhaltenen Partikel sind teilweise sehr klein, sodass sie im Lichtmikroskop kaum erkennbar sind. Jedoch sind auch größere Partikel sichtbar. Die REM-Aufnahmen aus Abb. 42 geben Auskunft darüber, ob die Homogenisierung tatsächlich erfolgreich verlaufen ist.



a)

b)

c)

**Abb. 42 REM-Aufnahmen von Polystyrol - Eudragit® S - Partikeln mit Behandlung durch den Microfluidizer; a) keinmal, b) einmal; c) dreimal**

In a) sind die in C.2.2.2.1 beschriebenen Schalen zu sehen. Die Edukte der Emulsion konnten zu keinem homogenen Produkt verarbeitet werden. Doch schon nach einmaliger Bearbeitung mit dem Microfluidizer werden Partikel, wie in b), erhalten, bei denen keine Inkompatibilitäten mehr zu sehen sind. Allerdings zeigt sich kein Partikelbild einer monomodalen Größenverteilung. Es sind sehr kleine ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) aber auch sehr große ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) Partikel vorhanden. Die Oberfläche der Partikel ist leicht rau. Neben hohlen, erkennbar an einem Loch in der Hülle, sind auch stark verformte Partikel vorhanden. c) zeigt

zu b) keine Verbesserung. Zwar deuten die Aufnahmen der Emulsion aufgrund einer homogeneren Tröpfchenverteilung auch auf ein homogeneres Partikelbild hin, dies kann jedoch durch die REM-Aufnahmen nicht bestätigt werden. Selbst ein dreimaliger Durchgang durch den Microfluidizer bringt kein optimales Ergebnis. Verformte und hohle Partikel sind unerwünscht, jedoch durch das Verfahren der Sprühtrocknung meist unumgänglich. Die mikroskopischen Aufnahmen der redispergierten Partikel zeigen auch große Partikel, es entsteht jedoch der Eindruck, dass die Zahl der großen Partikel im REM-Bild wesentlich größer ist als beim mikroskopischen Bild. Dieser Eindruck kann möglicherweise wie folgt begründet werden: Das überschüssig eingesetzte Eudragit® S liegt gelöst in der erhaltenen Emulsion vor. Durch das Verfahren der Sprühtrocknung werden im Überschuss eingesetzte Edukte nicht entfernt, sondern sie fallen neben dem gewünschten Produkt aus. Diese Eduktreste werden durch die REM-Aufnahme erfasst, die die trockene Probe abbildet. Werden die Partikel dagegen redispergiert, löst sich auch der Überschuss an Emulgator, der teilweise in Wasser löslich ist. Hiervon ist zum einen der Teil betroffen, der separat zu den gewünschten Polystyrolpartikeln ausfällt, zum anderen löst sich auch der Emulgator von den Polystyrolpartikeln, der nicht fest auf der Oberfläche in die Polymermatrix mit eingeflochten werden konnte. Dadurch zeigt sich im lichtmikroskopischen Bild ein anderes, wohl kleineres Partikelbild.

### C.2.3 Vergleich Sprühtrocknung und Emulsion Evaporation

#### C.2.3.1 Polystyrol mit Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer

In einem weiteren Versuch soll geklärt werden wie sich Polystyrol mit Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer in der Sprühtrocknung und im Emulsion Evaporation Verfahren verhält. Diese Versuchsreihe wird etwas umfassender angesetzt, sodass eine Formulierung nach dem folgenden Schema (Abb. 43) bearbeitet wird:

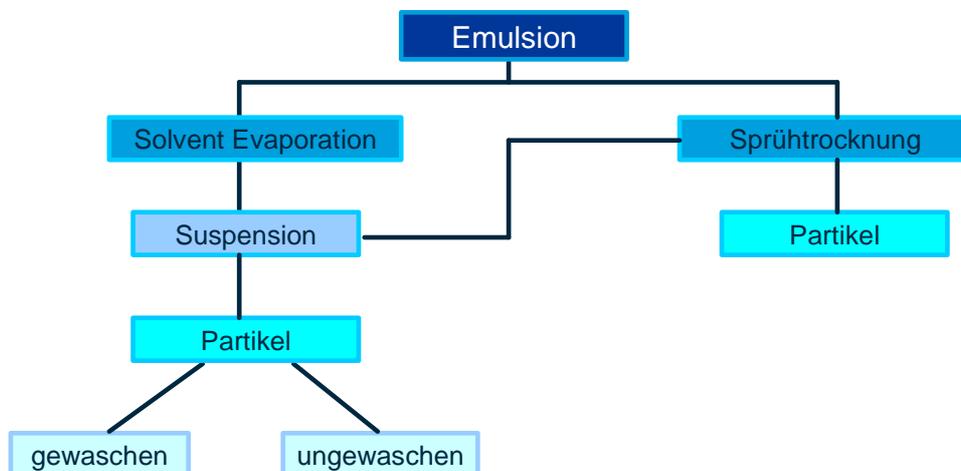


Abb. 43 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus von Polystyrol und MSCP

Die nach Formulierungsvorschrift erhaltene Emulsion wird entweder direkt der Sprühtrocknung zugeführt oder es wird mit dem Solvent Evaporation Verfahren durch Verdampfen des Lösemittels eine Suspension erhalten. Aus dieser können gewaschene und ungewaschene Partikel erhalten werden, aber auch ein Versprühen der Suspension wird getestet. Durch diesen umfassenden Versuch kann gezeigt werden, welche Herstellungsmethode und Vorgehensweise für die Formulierung optimal ist.

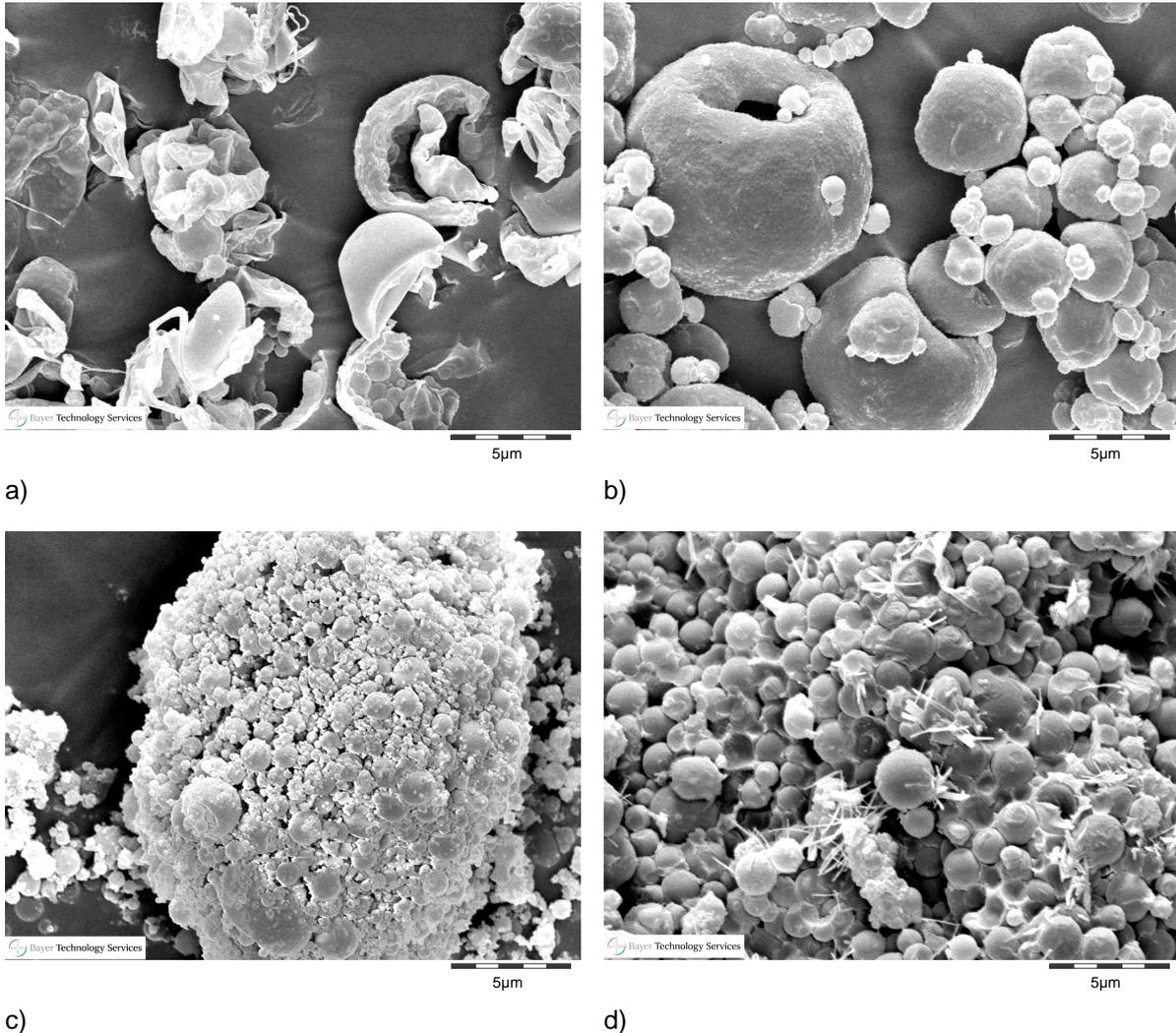
**Tabelle 22 Zusammensetzung der Formulierungen für die nachfolgenden Versuche**

Probe	Zusammensetzung
7a	Polystyrol 5 % (m/m bezogen auf die organische Phase) MSCP 14 28 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 9 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)
9a	Polystyrol 5 % (m/m bezogen auf die organische Phase) MSCP 50 33 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 9 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)
10b	Polystyrol 5 % (m/m bezogen auf die organische Phase) MSCP 14 17 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 13 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Bei der Probe 7a führt der Einsatz des Microfluidizer zu keiner homogenen Emulsion, die Tröpfchen werden jedoch kleiner. Wird die Emulsion sprühgetrocknet (7a\_ST) zeigen sich unter dem Elektronenmikroskop viele zusammengefallene Partikel, schalenartige Strukturen und nur wenige sphärische Partikel (Abb. 44). Das Partikel scheint außen so schnell auszuhärten, dass Lösemittel im Partikel eingeschlossen wird, welches dann im weiteren Verlauf der Trocknung dafür sorgt, dass das Partikel platzt. Die Größenverteilung, die durch Laserdiffraktometrie ermittelt wird, zeigt ein ebenso inhomogenes Bild. Die Partikel sind bis zu 12 µm groß (D(99)-Wert). Wird dagegen erst die Suspension hergestellt und dann sprühgetrocknet (7a\_EE\_ST), entstehen meist sphärische Partikel mit einer rauen Oberfläche (Abb. 44). Die Größenverteilung scheint optisch inhomogen, vor allem die großen Partikel sind häufig hohl, was unerwünscht ist. Ebenso wie bei der Sprühtrocknung der Emulsion werden auch hier, bei der Trocknung der Suspension, die im Überschuss eingesetzten Edukte getrocknet und fallen als Nebenkomponente zu den eigentlichen Partikeln an. In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme kann jedoch kein Unterschied zwischen gewünschtem Produkt und unerwünschter Nebenkomponente gemacht werden. Die Größenmessung mittels Laserdiffraktometrie zeigt eine homogene Verteilung mit einem D(90)-Wert von 2,06 µm (Tabelle 23). Die Inhomogenitäten, die in der REM-Aufnahme zu sehen sind, tauchen nicht auf. Es ist davon auszugehen, dass sich der Teil der Probe, der von dem überschüssigen Emulgator gebildet wird, bei der Messung der Partikelgröße im wässrigen Medium auflöst. Das als Emulgator eingesetzte Copolymer

Styrol-Maleinsäureanhydrid 86/14 ist zu einem gewissen Teil in Wasser löslich. Wird dagegen ganz auf die Sprühtrocknung verzichtet und die Partikel nach dem Solvent Evaporation Verfahren gewaschen oder ungewaschen zur Trockne gebracht, verhalten sich die Partikel sehr typisch, wie in C.1.3 beschrieben. Die ungewaschenen Partikel lassen sich sehr gut redispergieren. Ihr elektronenmikroskopisches Bild zeigt deutlich den Überschuss an Emulgator (Abb. 44). Bei den gewaschenen Partikeln (7a\_EE gewaschen) dagegen ist kein Emulgatorüberschuss erkennbar. Das Partikelkontingent ist sphärisch mit einem großen Feinanteil. Eine Redispergierung und damit Singularisierung der Partikel ist nicht trivial. Teilweise bleiben große Agglomerate zurück (Tabelle 22). Diese Agglomeratbildung kann umgangen werden, wenn die gewaschenen Partikel nicht getrocknet, sondern sofort nach dem Waschschrift redispergiert werden.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe werden beispielhaft an der Probe 7a durch die Darstellung der REM-Aufnahmen in Abb. 44 und die Ergebnisse der Laserdiffraktometrie in Tabelle 23 visualisiert.



**Abb. 44** Eine Formulierung (7a), verschiedene Verfahren a) Sprühtrocknung der Emulsion; b) Sprühtrocknung der Suspension; c) Emulsion Evaporation, Partikel gewaschen; d) Emulsion Evaporation, Partikel ungewaschen

**Tabelle 23** Partikelgrößenanalyse

Probe	D(10) [µm]	D(50) [µm]	D(80) [µm]	D(90) [µm]	Bild Abb. 44
7a_ST	0,806	3,588	6,780	8,598	a)
7a_EE_ST	0,685	1,208	1,733	2,056	b)
7a_EE Suspension	0,659	1,210	1,783	2,137	
7a_EE gewaschen	0,724	1,785	13,911	24,377	c)
7a_EE ungewaschen	0,655	1,272	1,955	2,393	d)

Bei der Probe 9a zeigt sich ein sehr ähnliches Bild. Die Partikel an sich sind minimal kleiner und die Menge der unerwünschten Komponenten, die bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme der ungewaschenen Partikel zu sehen sind, ist größer. Beide Beobachtungen sind

auf den höheren Emulgatoranteil dieser Probe zurückzuführen. Trotz des Einsatzes des Copolymers Styrol-Maleinsäureanhydrid 50/50 ändern sich keine offensichtlichen Eigenschaften der Emulsion.

Auch Probe 10b verhält sich sehr ähnlich zu 7a und 9a. Hier sind die Partikel im Gesamten jedoch etwas größer, was mit dem geringeren Emulgatoranteil zusammenhängt (vgl. C.2.1.3).

Die durchgeführten Versuche zeigen deutlich, dass das Verfahren der Sprühtrocknung für Polystyrolpartikel nicht gut geeignet ist. Es ist kaum möglich kleine, sphärische und gleichzeitig massive Partikel zu erzeugen. Dagegen zeigen sich die Formulierungen im Emulsion Evaporation Verfahren als unkompliziert. Sphärische Partikel  $< 2 \mu\text{m}$  sind einfach in ihrer Herstellung. Weitere Optimierungen und Variationen werden daher im Emulsion Evaporation Verfahren getestet.

### **C.2.4 Zusammenfassung Polystyrol**

Abschließend zu den Arbeiten mit Polystyrol soll kurz zusammengefasst werden, welchen Einfluss Formulierungsvariationen und –bestandteile auf die erhaltenen Partikel nehmen. Grundsätzlich kann gesagt werden, dass das Emulsion Evaporation Verfahren die für Polystyrol bevorzugte Herstellungsmethode ist. Als Emulgator und zur Modifizierung der Partikeloberfläche eignet sich Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer. Versuche mit Eudragiten<sup>®</sup> führen nur zu suboptimalen Ergebnissen. Eine Erhöhung des Wirkstoffanteils bewirkt keine Vergrößerung der Partikel, jedoch wird bei einem höheren Gehalt eine schnellere Freisetzung beobachtet. Eine Steuerung der Freisetzung kann auch über das Molekulargewicht des Matrixpolymers geschehen. Mit steigendem Molgewicht und damit verbundenen Anstieg der Glasübergangstemperatur, sinkt die freigesetzte Menge Flumethrin. Zudem verringert sich die erhaltene Partikelgröße mit dem Molgewicht. Die Größenverteilung kann ebenfalls durch die eingesetzte Emulgatormenge beeinflusst werden. Ein großer Anteil Emulgator ist in der Lage eine große Oberfläche abzusättigen. Die Partikelgröße sinkt demnach mit steigendem Emulgatoranteil. Das Freisetzungsprofil kann über Molgewicht, Wirkstoffgehalt und Partikelgröße gesteuert werden. [32; 68] Gewünschte Eigenschaften lassen sich so kombinieren und zusammenstellen. Eine optimierte Formulierung ist in G.1 hinterlegt.

## C.3 PMMA

### C.3.1 Emulsion Evaporation Verfahren

Grundlage für die Sprühtrocknung und das Emulsion Evaporation Verfahren ist eine stabile Emulsion. Die erhaltenen stabilen Systeme werden teilweise beiden Verfahren zugeführt. So kann ein direkter Vergleich beider Verfahren erreicht werden.

Für das Emulsion Evaporation Verfahren werden die emulgierenden Eigenschaften folgender Substanzen in der Kombination mit PMMA weiter untersucht: Eudragit® S 100, Eudragit® RS 100, Eudragit® E 100 und Eudragit® L 100.

Eine Standardzusammensetzung der Formulierungen mit PMMA ist Tabelle 24 zu entnehmen.

**Tabelle 24 Grundformulierung zur Herstellung von PMMA-Partikeln**

Substanz	Menge
PMMA	3,70 g (m/m bezogen auf die organische Phase) $\triangleq$ 6,5 %
Eudragit®	0,74-2,64 g (m/m bezogen auf Polymermasse) $\triangleq$ 17-42 %
Flumethrin	0,44-2,64 g (m/m bezogen auf Feststoffgehalt) $\triangleq$ 9-30 %
Wasser	160 ml
Dichlormethan	40 ml

#### C.3.1.1 Eudragit® RS 100

Eudragit® RS ist permanent kationisch geladen und kann dadurch nicht über einen Linker an den Antikörper gebunden werden. Dennoch ist auch hier eine Anbindung an das Hundefell möglich. Das Haar ist mit einer negativen Oberflächenladung versehen. [28; 49] Durch elektrostatische Wechselwirkungen haftet das Eudragit® RS am Hundehaar. Ein Verschmelzen mit oder auch ein Kleben an dem Hundehaar, begünstigt durch die Filmbildeigenschaften des Eudragit® RS, kann zu einer verbesserten Haftung führen. Beachtet werden muss, dass es nicht zu einer zu schnellen Freisetzung des Wirkstoffs aus der Matrix kommt, und dass kein sichtbares Verkleben von Fellpartien auftritt. Die Freisetzung kann durch entstehende Poren oder Quellen kontrolliert stattfinden. [31; 46]

Eine Formulierung von PMMA mit Eudragit® RS überzeugt durch ihre Eigenschaften, sodass sie im Tierversuch (C.6) eingesetzt wird.

### C.3.1.1.1 Formulierung

Mit PMMA bildet Eudragit® RS stabile Emulsionen, die durch ihre niedrige Viskosität auffallen und die Emulsion nicht stabil erscheinen lassen. Der Einsatz des Microfluidizer führt zu einer Verbesserung des Partikelbildes. Ein Aufschäumen der Emulsion, wie es bei den anderen Eudragiten® der Fall ist, kann beim Abzug des Lösemittels nicht beobachtet werden. Die erhaltenen Suspensionen überzeugen durch sehr kleine Partikel mit einer augenscheinlich homogenen Größenverteilung. Das Filtrieren der Lösung, zur weiteren Aufreinigung, ist aufgrund der kleinen Partikelgrößen schwierig, über eine Zentrifugation ist eine Waschung jedoch möglich. Ein Emulgatorüberschuss, wie er bereits beschrieben wurde, liegt hier jedoch nicht vor. Eudragit® RS ist nicht wasserlöslich, kann somit nicht als Überschuss in der Wasserphase vorliegen. Eine pH-Wert-Neutralisierung muss auch nicht vorgenommen werden, da der Versuch im neutralen pH-Bereich stattfindet. Die Zusammensetzung ist Tabelle 25 zu entnehmen.

**Tabelle 25 Zusammensetzung der PMMA - Eudragit® RS - Partikel**

Substanz	Menge [%]
PMMA	6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® RS	17 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Filtrierte, getrocknete Partikel lassen sich schlecht redispergieren. Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt zudem unförmige Partikelagglomerate, die auf eine Verschmelzung der Partikel hindeuten. Dies ist auf die guten Filmbildeigenschaften des Eudragits® zurückzuführen. Eine Filmbildung kann durch ein sofortiges Redispergieren der Partikel nach der Waschung verhindert werden.

Eine Messung der Größenverteilung ist Tabelle 26 zu entnehmen.

**Tabelle 26 Laserdiffraktometriemessung der PMMA - Eudragit® RS - Partikel**

Probe	D(10) [µm]	D(50) [µm]	D(80) [µm]	D(90) [µm]
12-1-1	0,177	0,605	0,891	1,030

Wie bereits erwähnt sind die Partikel sehr klein. Dies könnte limitierend für die Wirkdauer sein, da die enthaltene Wirkstoffmenge geringer ist und eine Diffusion aus den Partikeln durch die größere Oberfläche begünstigt wird. [52]

Die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) liegt für diese Formulierung bei 67,5 °C. Das reine PMMA hat eine  $T_g$  von 102,9 °C. Dies zeigt, wie schon bei den Polystyrolpartikeln ermittelt, dass der Wirkstoff Flumethrin als Weichmacher fungiert und die Glasübergangstemperatur herabsetzt.

### C.3.1.1.2 Freisetzung

Die Freisetzung dieser Formulierung wird wie in C.1.4 erläutert in Methanol / Wasser im Verhältnis 70/30 getestet. Dabei wird die Probe in 5 ml der Methanol-Wasser-Mischung bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Freisetzung verläuft über einen Zeitraum von sieben Tagen. Der Flumethringehalt wird analytisch mittels HPLC ermittelt. Eine graphische Darstellung der Freisetzung ist in Abb. 45 zu sehen.

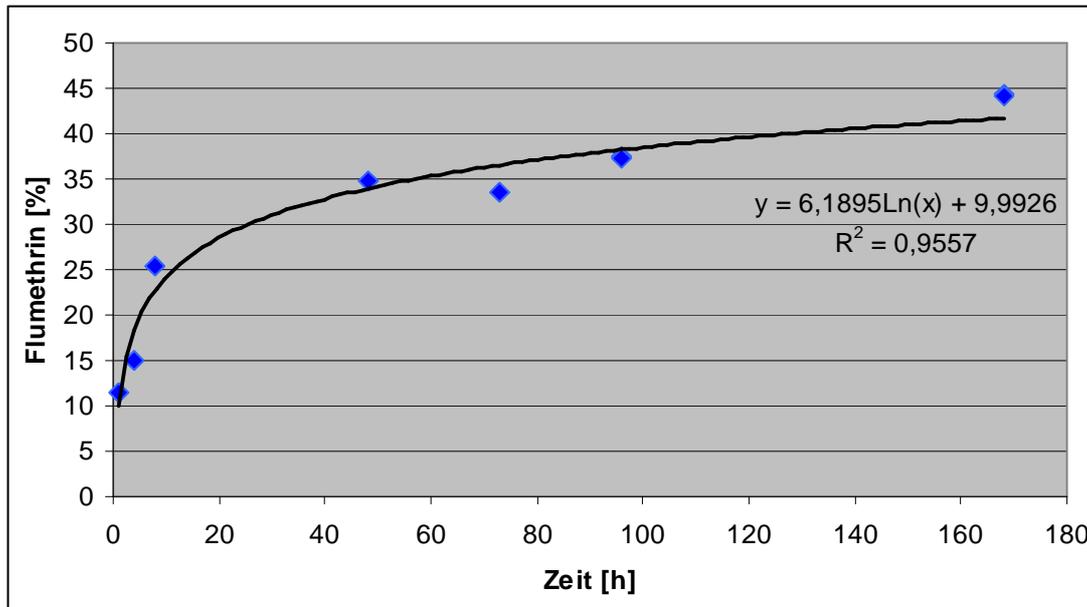


Abb. 45 Freisetzung Flumethrin bezogen auf den Flumethringehalt der Partikel

Die Freisetzung beginnt mit einem Burst-Effekt von ~ 10 %. Danach wird der Wirkstoff gleichmäßig freigesetzt. In der logarithmischen Darstellung wird eine Gerade erhalten, deren Bestimmtheitsmaß mit einem Wert von  $R^2 = 0,9557$  in einem guten Bereich liegt. Die Freisetzungskurve zeigt, dass nach sieben Tagen (168 h) ca. 45 % des enthaltenen Wirkstoffs freigesetzt wird. Die Freisetzungsrage erreicht hier ein leichtes Plateau. Ob noch genügend Wirkstoff für eine ausreichende Wirkung freigesetzt wird, muss der Tierversuch zeigen (C.6). Eine ausreichende Wirksamkeit kann in dem hier angewendeten Versuchsaufbau nicht nachvollzogen werden, da keine realitätsnahen Versuchsbedingungen herrschen.

### C.3.1.2 Eudragit® L 100

Eudragit® L und S gehören zu den anionischen Eudragiten® und unterscheiden sich lediglich durch ihren Carboxylgruppenanteil. Eudragit® L 100 hat einen Methacrylsäureanteil von 50 %, Eudragit® S 100 dagegen nur 30 %. [22] Dies spiegelt sich in der Hydrophilie der beiden Stoffe wider. Eudragit® L 100 ist besser wasserlöslich und sollte durch die höhere Carboxylgruppensdichte die Partikeloberfläche mit einem höheren Anteil an Säuregruppen besetzen können. Dies ist für eine spätere, effektive Ankopplung der Partikel an das

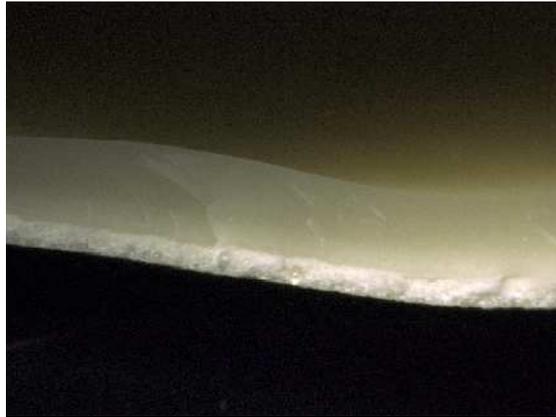
Hundehaar vorteilhaft. Jedoch zeigt sich in Versuchen mit Eudragit<sup>®</sup> L 100, dass die Wasserlöslichkeit zwar verbessert ist, die Affinität zur organischen Phase aber nicht ausreichend groß ist, um ein stabiles System zu bilden. Die erhaltene Emulsion scheint stabil, bricht jedoch nach längerem Stehen. Eine Optimierung durch Erhöhung des Emulgatoranteils kann versucht werden, aber angesichts der Tatsache, dass Emulsionen mit dem strukturähnlichen Eudragit<sup>®</sup> S als emulgierenden Bestandteil sehr stabil sind, wird auf eine weitere Optimierung verzichtet.

### **C.3.1.3 Eudragit<sup>®</sup> S 100**

Wie bereits in B.3.5 erwähnt, ist Eudragit<sup>®</sup> S ein anionisches Polymer. Sein Methacrylsäureanteil liegt bei 30 %. Die hydrophilen und hydrophoben Anteile dieses amphiphilen Moleküls sind so ausgeglichen, dass eine ausreichende Löslichkeit sowohl in der organischen als auch in der Wasserphase gegeben ist. Hieraus resultieren gute Emulgatoreigenschaften. Die erhaltenen Emulsionen sind äußerst stabil und zeigen eine gute Reaktion auf den Einsatz des Microfluidizer.

Formulierungen mit Eudragit<sup>®</sup> S und PMMA werden vermehrt in der Sprühtrocknung verarbeitet (weiteres hierzu siehe C.3.2.1) Auch hier ist eine stabile Emulsion die Voraussetzung für ein gelungenes Produkt. Im Emulsion Evaporation Verfahren wird analog Herstellungsvorschrift in E.2.1 verfahren. Einige Besonderheiten dieser Formulierungen sollen an dieser Stelle hervorgehoben werden:

Eudragit<sup>®</sup> S besitzt solch ausgeprägte tensidische Eigenschaften, dass es beim Verdampfen des Lösungsmittels zu einer extremen Schaumbildung kommt. Ein Überkochen kann durch vorsichtiges Aufheizen und Rühren der Lösung verhindert werden. Nach Abzug des Lösungsmittels bilden sich häufig glasartige, sandkorngroße Agglomerate, sowie Polymerablagerungen am Rührfisch. Die Emulsion ist nur mit einem Überschuss an Emulgator zu stabilisieren. Dieser kann durch Filtration als Waschschrift entfernt werden. Geschieht dies nicht, sondern werden die Partikel durch Abdampfen der wässrigen Phase bei Raumtemperatur erhalten, so bildet sich eine glasartige, harte, meist leicht gelbliche Schicht auf den Partikeln. Je nach Formulierung kann unter dieser Schicht eine weiße, leicht zu mörsernde, da poröse Partikelschicht gefunden werden (Abb. 46).



**Abb. 46** PMMA - Eudragit<sup>®</sup> S - Partikel nach Verdampfen der wässrigen Phase bei RT; Partikel- (unten) und Emulgatorschicht (oben) sind deutlich erkennbar

Diese Beobachtung zeigt, dass ein Waschschriff notwendig ist. Bei den PMMA Eudragit<sup>®</sup> S Partikeln ist jedoch eine Filtration, ebenso wie eine Zentrifugation, aufgrund der Konsistenz der erhaltenen Suspension meist nicht praktikabel. Im Emulsion Evaporation Verfahren können mit PMMA in der Kombination mit Eudragit<sup>®</sup> S keine Partikel der geforderten Eigenschaften erhalten werden.

#### **C.3.1.3.1 Einfluss des Hochdruckhomogenisators**

Ohne Einsatz des Microfluidizer werden Partikel  $< 5 \mu\text{m}$  erhalten, die sich ungewaschen gut redispergieren lassen. Mit Einsatz des Microfluidizer werden so feine Partikel erhalten, dass ein Waschschriff nicht mehr möglich ist, da sich die Partikel nicht filtrieren lassen.

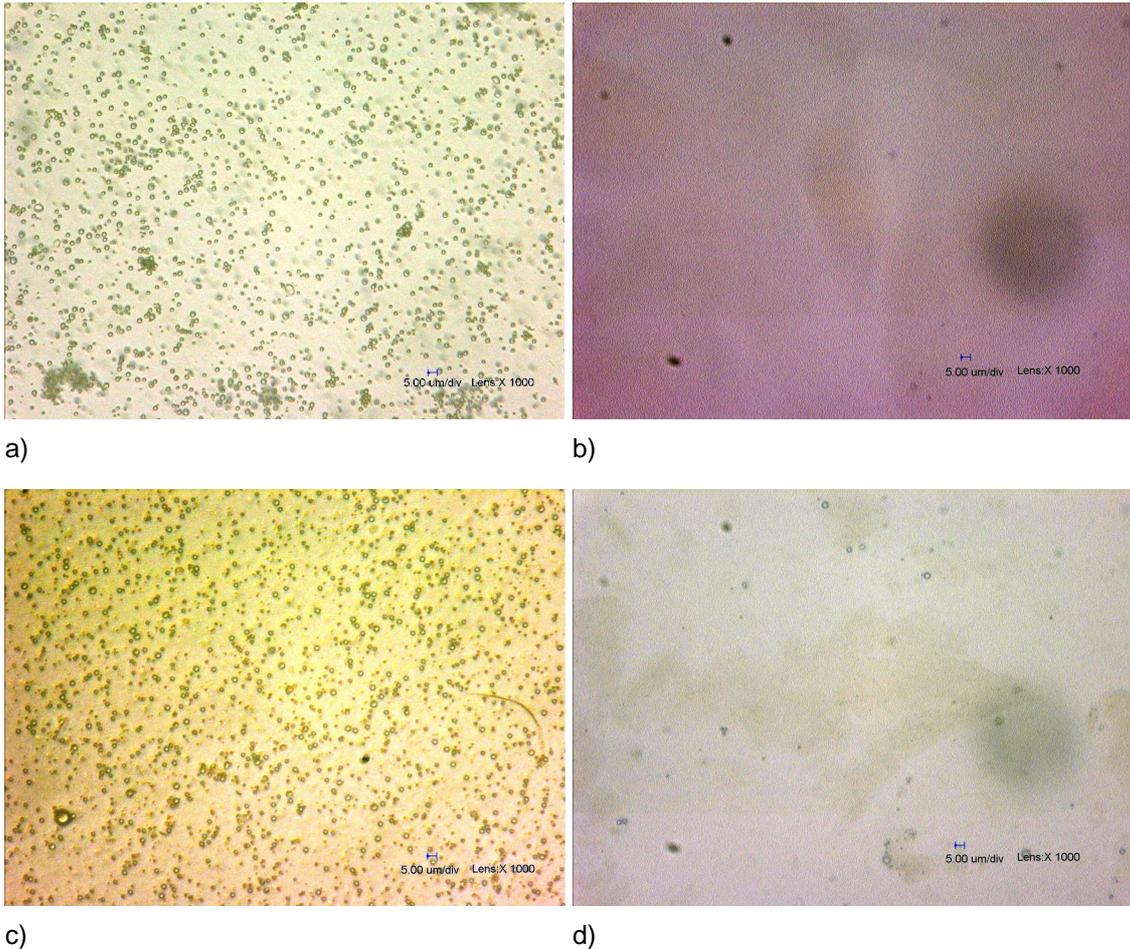
Für einen Vergleich werden verschiedene Formulierungen einmal mit dem Hochdruckhomogenisator behandelt und einmal nicht. Die erhaltenen Emulsionen und Suspensionen werden nach ihrem optischen Erscheinungsbild und nach einer Analyse mit Hilfe der Laserdiffraktometrie beurteilt.

Im Folgenden werden zwei Formulierungen näher betrachtet. Beide werden jeweils einmal mit dem Microfluidizer homogenisiert und einmal nicht. Dabei spiegeln die Ergebnisse dieser Proben das Verhalten aller, auf diese Art geprüften Formulierungen wider. Die Zusammensetzung der Formulierungen ist Tabelle 27 zu entnehmen.

**Tabelle 27 Probenzusammensetzung für Versuche mit dem Hochdruckhomogenisator**

Probe	Zusammensetzung
PMMA_7-1_EE	PMMA 6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® S 42 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)
PMMA_7-2_EE	PMMA 6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® S 28 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

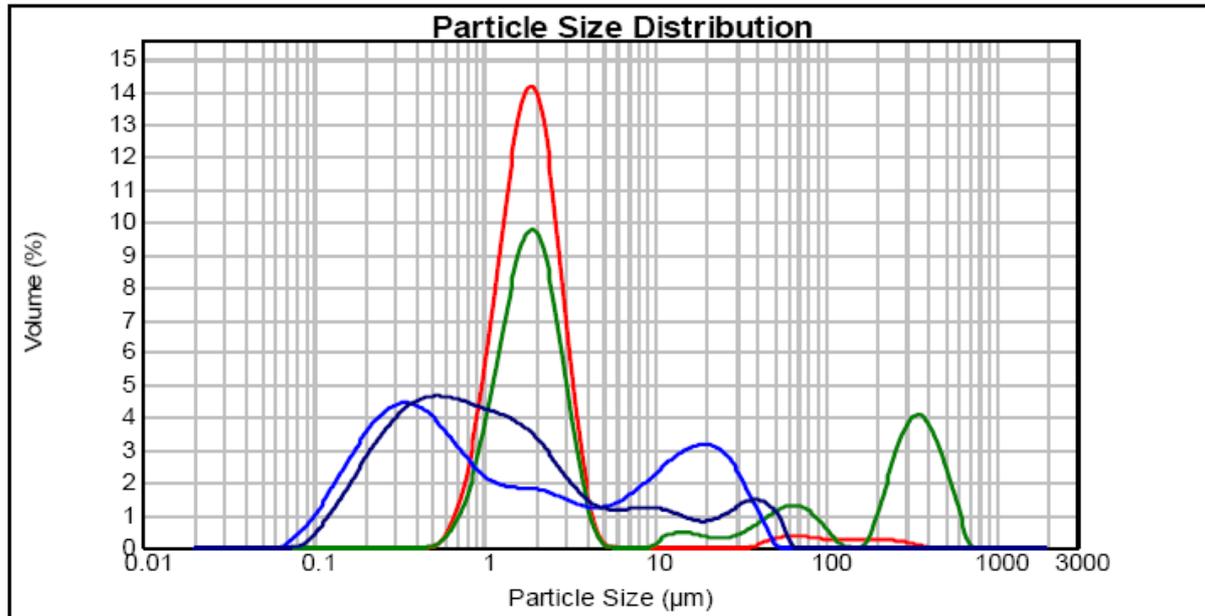
Bei beiden Formulierungen entstehen stabile Emulsionen mit max. Tröpfchengrößen von ~ 5 µm. Nach Einsatz des Microfluidizer (MF) werden Emulsionen mit sehr kleinen Tropfen erhalten. Die daraus resultierenden Suspensionen zeigen Partikel, die unter dem Lichtmikroskop nur als Rauschen erkennbar sind. Teilweise sind jedoch auch sandkorngroße Partikel vorhanden. Solche großen Partikelagglomerate finden sich auch bei den Suspensionen, die ohne Microfluidizer hergestellt werden. Hier kommt es auch zu kleineren Polymerausfällungen. Das Partikelkontingent insgesamt scheint jedoch homogen. Aufgrund der schlechten Filtrierbarkeit der Suspensionen werden die Partikel durch Abzug der wässrigen Phase bei Raumtemperatur erhalten. So fällt der Emulgatorüberschuss neben den Partikeln an und bildet die bereits beschriebenen, glasartigen Filme aus. Die erhaltenen, trockenen Partikel sind von einer leicht gelben Farbe. Aufgrund der Filmbildung des Emulgators lassen sich die Proben, im Besonderen die nicht zusätzlich homogenisierten, schlecht mörsern. Harte, glasartige Verschmelzungen bleiben erhalten. Das getrocknete Partikelsediment ist spröde, sehr hart und weiß-gelblich. Ist ein Abtrennen des Emulgatorüberschusses nicht möglich, sind die Partikel für einen Einsatz im Tierversuch nicht geeignet. Hier wird dennoch so verfahren, um den Einfluss des Hochdruckhomogenisators zu erläutern. Werden die Partikel redispersiert, welches aufgrund der Löseeigenschaften des Eudragits® möglich ist, ist folgendes zu erkennen (Abb. 47):



**Abb. 47 PMMA Partikel, redispergiert, hergestellt im Emulsion Evaporation Verfahren;**  
**a) PMMA 7-1\_ EE ohne MF; b) PMMA 7-1 mit MF; c) PMMA 7-2\_ EE ohne MF;**  
**d) PMMA 7-2\_ EE mit MF**

Abb. 47 zeigt keine augenscheinlichen Verschiedenheiten zwischen der Probe PMMA 7-1\_ EE und PMMA 7-2\_ EE (Bild a) und c)). Diese divergieren lediglich in ihrem Emulgatoranteil. Es ist jedoch ein großer Unterschied zwischen der mit dem Microfluidizer behandelten und nicht behandelten Probe zu erkennen (a) und b) bzw. c) und d)). Durch den Einsatz des Hochdruckhomogenisators sind die Partikel so klein, dass unter dem Lichtmikroskop nur noch ein Rauschen zu sehen ist. Einzelne Partikel lassen sich nicht mehr erkennen. Der dunkle Fleck im rechten Teil des Bildes ist auf eine Verunreinigung des Mikroskops zurückzuführen. Der Versuch durch die Druckeinstellung des Microfluidizer das gewünschte Partikelbild zu erhalten, schlug bereits bei einer Polystyrolformulierung fehl. Feineinstellungen sind über den Hochdruckhomogenisator kaum möglich. Dies wird hier nicht erneut getestet.

Die Partikelgrößenmessungen mittels Laserdiffraktometrie lassen sowohl für die mit dem Microfluidizer behandelten als auch nicht behandelten eine homogene Größenverteilung erwarten, die im Fall b) und d) einer Verschiebung nach links, zu kleineren Partikeln hin, unterliegt.



**Abb. 48** Partikelgrößenverteilung der Suspensionen; rot: PMMA 7-1\_EE ohne MF; hellblau: PMMA 7-1\_EE mit MF; grün: PMMA 7-2\_EE ohne MF; dunkelblau: PMMA 7-2\_EE mit MF

Abb. 48 bestätigt zum Teil die vorhergesagten Vermutungen über die Partikelgrößenverteilung. Die Formulierungen, die einem zusätzlichen Homogenisationsschritt unterworfen werden (hellblau und dunkelblau), zeigen eine große Anzahl Partikel in einem sehr kleinen Größenbereich. Die Verteilung ist jedoch nicht homogen. Es werden viele größere Partikel und Agglomerate erfasst. Die Größenverteilung ist damit sehr breit angelegt und reicht von 0,1-50 µm. Die Formulierungen, die nicht mit dem Microfluidizer behandelt werden, liegen in einem etwas höheren Partikelgrößenbereich und zeigen dort eine gleichmäßige, homogene Verteilung. Jedoch sind auch hier größere Partikel vorhanden, die soviel größer sind, dass sie als eigener Peak im rechten Teil der Grafik erscheinen. Bei der Probe PMMA 7-2\_EE (grün) ist dieses Phänomen stärker ausgeprägt. Die bereits erwähnten sandkorngroßen Agglomerate werden hier erfasst. Erwähnenswert ist jedoch die Tatsache, dass die Partikelgrößenmessung eine volumenbasierte Verteilung darstellt. Wenige große Partikel fallen wesentlich stärker ins Gewicht als viele kleine. Dies bedeutet, dass der recht große Peak bei 500 µm nur von sehr wenigen Partikel erzeugt wird. Durch den Einsatz des Microfluidizer werden die Partikel zwar kleiner, aber in diesem Fall wird keine Verbesserung des Partikelkontingents erzielt. Ohne zusätzliche Aufarbeitung entsteht eine meist homogene Größenverteilung, bei der sich die großen Agglomerate abtrennen lassen sollten. Jedoch liegt der D(90)-Wert bei der Probe PMMA 7-1\_EE bei 3,2 µm, welches für eine optimale Anbindung schon zu groß ist.

### C.3.1.3.2 Änderung des Emulgatoranteils

Für die Untersuchung der Änderung des Emulgatoranteils werden zum einen die unter C.3.1.3.1 erwähnten Formulierungen betrachtet, zum anderen werden Formulierungen verglichen, bei denen sich der Feststoffgehalt nicht ändert, sondern lediglich das Verhältnis PMMA zu Eudragit® S.

In C.3.1.3.1 lässt sich in Abb. 48 erkennen, dass die Formulierung PMMA 7-1\_EE mit dem größeren Emulgatoranteil nicht so sehr zu einer Agglomeratbildung neigt (vergleiche Graph rot und grün). Bei Betrachtung der Graphen, die durch den zusätzlichen Einsatz des Hochdruckhomogenisators entstehen (hellblau und dunkelblau), zeigt sich ein fast gegenteiliges Bild. Hier wird bei der Probe mit dem höheren Emulgatorgehalt ein deutlicher Anteil größerer Agglomerate beobachtet. Trotz des sehr unterschiedlichen Anteils an Emulgator fallen die Suspensionen nicht sehr verschieden aus. Dies deutet darauf hin, dass bei einer Überschreitung einer Mindestkonzentration keine weitere Verbesserung des Partikelbildes durch den Emulgator erzielt werden kann.

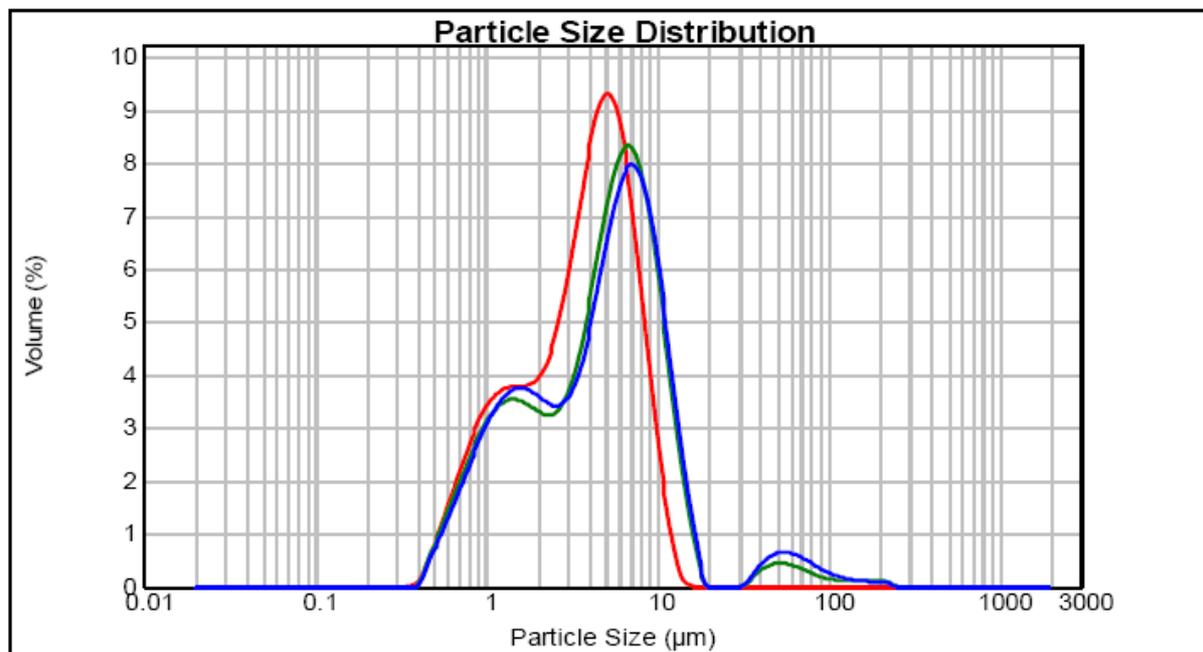
Bei weiteren Versuchen zur Variation des Emulgatoranteils werden drei Formulierungen mit sinkendem Emulgatoranteil, jedoch gleichbleibendem Flumethrin- und Feststoffgehalt, untersucht. Gleichbleibender Feststoffgehalt bedeutet, dass mit sinkendem Emulgatoranteil der PMMA-Anteil steigt. Die Zusammensetzungen der Formulierungen sind Tabelle 28 zu entnehmen.

**Tabelle 28 Zusammensetzung der Partikel mit sinkendem Emulgatoranteil**

Probe	Zusammensetzung
PMMA 9 EuS 17	PMMA 9 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® S 17 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)
PMMA 9,4 EuS 13	PMMA 9,4 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® S 13 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)
PMMA 9,8 EuS 9	PMMA 9,8 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® S 9 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Suspensionen zeigen keinen optisch erkennbaren Unterschied der einzelnen Formulierungen. Einzig die Tatsache, dass bei der Probe PMMA 9 EuS 17 die geringste Polymerablagerung zu finden ist, deutet darauf hin, dass diese Emulsion auch am stabilsten ist. Genauerer Aufschluss über Unterschiede der drei Formulierungen soll eine Partikelgrößenanalyse der redispergierten Partikel geben. Dazu

werden die ungewaschenen Partikel in Wasser redispersiert und im Laserdiffraktometer vermessen.



**Abb. 49** Laserdiffraktometer Messung von PMMA 9 EuS 17 (rot); PMMA 9,4 EuS 13 (grün) und PMMA 9,8 EuS 9 (blau)

Mit steigendem Emulgatoranteil ist eine leichte Verbesserung der Partikelgrößenverteilung zu erkennen (Abb. 49). Bei einem Emulgatoranteil von 9 bzw. 13 % bleiben nicht singularisierbare Partikelagglomerate zurück (Graph grün und blau). Das Partikelbild bei PMMA 9 EuS 17 ist ebenfalls nicht optimal. So sind hier Agglomerate zwar nicht mehr sichtbar, aber die Partikel sind zu groß. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass diese Formulierungen ohne zusätzliche Homogenisierung, welches eine weitere Verkleinerung der Partikelgrößen zur Folge hat, hergestellt werden, und keine Agglomerate sichtbar sind, ist eine Mindestkonzentration des Emulgators von 17 % als sinnvoll einzustufen.

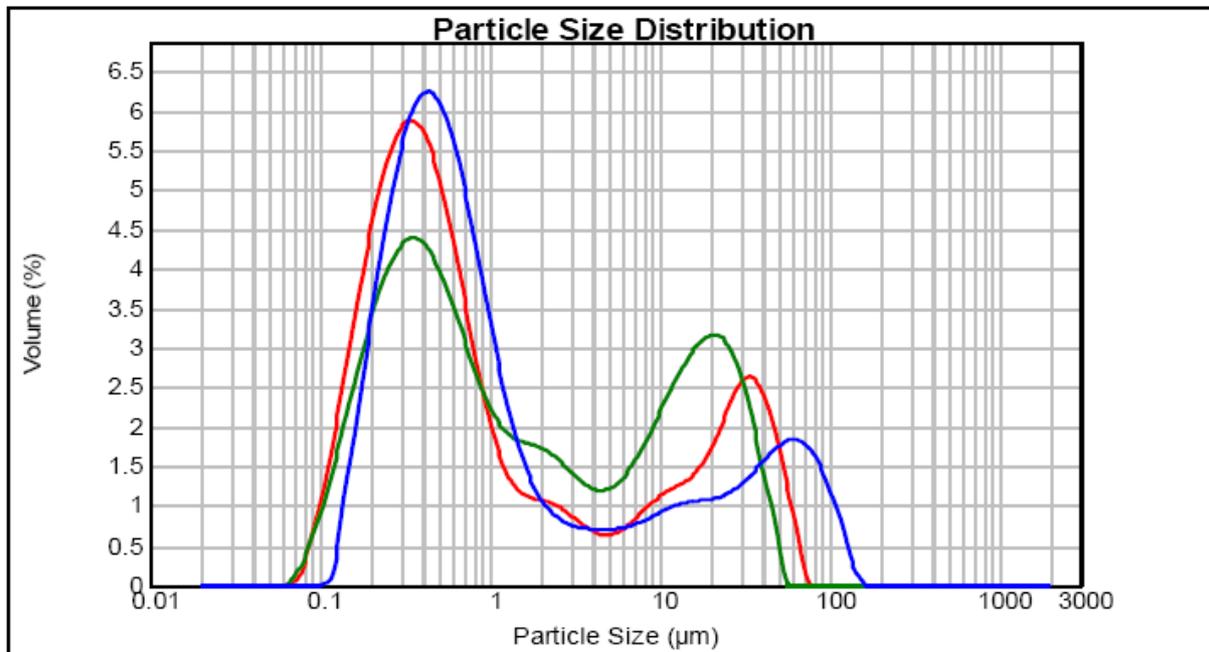
### C.3.1.3.3 Änderung des Wirkstoffgehalts

Zur Beurteilung des Wirkstoffeinflusses auf die Formulierung wird eine Versuchsreihe mit verschiedenen Wirkstoffgehalten durchgeführt. Dabei werden drei Formulierungen mit 30, 17 und 9 % Flumethrin getestet. Die Emulsionen werden einer weiteren Homogenisierung durch den Microfluidizer unterzogen. Die erhaltenen Suspensionen werden anhand ihres lichtmikroskopischen Bildes und der Analyse des Laserdiffraktometers beurteilt. Die Grundzusammensetzung ist Tabelle 29 zu entnehmen.

**Tabelle 29 Zusammensetzung der Formulierung zur Beurteilung des Einflusses des Wirkstoffgehalts**

Substanz	Menge [%]
PMMA	6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® S	42 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	9, 17, 30 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Nach der Homogenisierung mittels Microfluidizer wird in allen Fällen eine sehr feine Tröpfchenverteilung erzielt. Die erhaltenen Suspensionen zeigen ein ebenso kleines Partikelbild. Jedoch sind hier auch einige größere Partikel sichtbar. Eine bessere Übersicht liefert das Ergebnis des Laserdiffraktometers (Abb. 50).



**Abb. 50 Partikelgrößenanalyse bei steigendem Wirkstoffgehalt: 9 % (blau); 17 % (grün) und 30 % (rot) Flumethrin**

Die Messung der Laserdiffraktometrie zeigt deutlich, dass sehr kleine Partikel erhalten werden, aber auch große Agglomerate vorhanden sind. Die Partikelgrößenverteilung ist bei jeder der drei Proben leicht unterschiedlich. Es ist jedoch nicht erkennbar, dass der steigende Wirkstoffgehalt die Partikelgröße in eine bestimmte Richtung beeinflusst.

Da sich die Suspensionen kaum filtrieren lassen, werden die Partikel über das Abdampfen der wässrigen Phase bei Raumtemperatur erhalten. Bei allen Proben bildet sich auf der Oberfläche eine harte, spröde milchige Schicht, die sich sehr schlecht mörsern lässt. Diese Vorgehensweise ist nicht optimal, die erhaltenen Suspensionen lassen jedoch keine andere Handhabung zu. Im Falle von 17 und 30 % Wirkstoffgehalt sind die Proben gelblich, wie Flumethrin, gefärbt. 9 % Wirkstoff lassen sich ohne Gelbfärbung der Partikel verkapseln. Die

gelbliche Tönung lässt an einer sicheren Verkapselung des Wirkstoffs zweifeln. Im Sprühtrocknungsverfahren ist eine solche Färbung nicht zu beobachten (vgl. C.3.2). Die erhaltenen Partikel sind gut redispergierbar und wegen ihrer geringen Größe unter dem Lichtmikroskop nur als Rauschen erkennbar.

### **C.3.1.4 Eudragit® E 100**

Eudragit® E gehört zu der Klasse der kationischen Eudragite®. An seine Aminogruppe kann ein Linker angebunden werden, der in der Lage ist den Antikörper zu koppeln, und somit eine Bindung ans Hundehaar ermöglicht. Bei Formulierungen von Eudragit® E mit PMMA zeigt sich ein inhomogenes Bild der Emulsion. Die Tröpfchengrößenverteilung unterliegt einer sehr breiten Verteilung und auch die erhaltene Suspension zeigt bereits Agglomerate und eine inhomogene Größenverteilung. Aufgrund der Tatsache, dass Eudragit® S zu sehr stabilen Emulsionen führt, wird die Optimierung des Eudragit® E - PMMA Systems nicht weiter verfolgt. Dennoch wird für den Nachweis, dass eine inhomogene Emulsion auch in der Sprühtrocknung zu einem nicht hinreichenden Ergebnis führt, ein Versprühen der Emulsion getestet (siehe C.3.2.3).

### **C.3.2 Sprühtrocknung**

Formulierungen mit PMMA lassen sich meist problemlos in einem Sprühtrocknungsverfahren verarbeiten. Eine Bildung von Polymerfäden, wie es beim Polystyrol teilweise zu beobachten ist, tritt hier nicht auf. Einige Produkte zeigen jedoch eine starke elektrostatische Aufladung. Voraussetzung für die Anwendung des Sprühtrocknungsverfahrens ist eine stabile Polymeremulsion. Neben den Prozessparametern hat auch das eingesetzte Lösemittel einen Einfluss auf die entstehenden Partikel (siehe C.3.2.3). [21] Nach den Vorversuchen (siehe auch C.3.1) zeigt sich, dass Eudragit® RS schon im Emulsion Evaporation Verfahren gute Ergebnisse liefert. Eine Testung in der Sprühtrocknung steht daher außer Frage. Für eine Antikörperanbindung muss die Partikeloberfläche jedoch kationisierbar oder anionisierbar sein. Hierfür stehen Eudragit® S, L und E zur Verfügung. Eudragit® S und L sind beide anionisch. Da Eudragit® S in den Vorversuchen besser abschneidet, wird auch dieses für die Sprühtrocknung verwendet. Das protonierbare Eudragit® E zeigt in den Vorversuchen keine überzeugenden Ergebnisse, soll aber dennoch im Sprühtrocknungsverfahren getestet werden. Untersucht wird neben den verschiedenen Copolymerzusätzen der Einfluss des Emulgatoranteils, des Wirkstoffs und des Molekulargewichts des Polymers.

### C.3.2.1 Eudragit® S

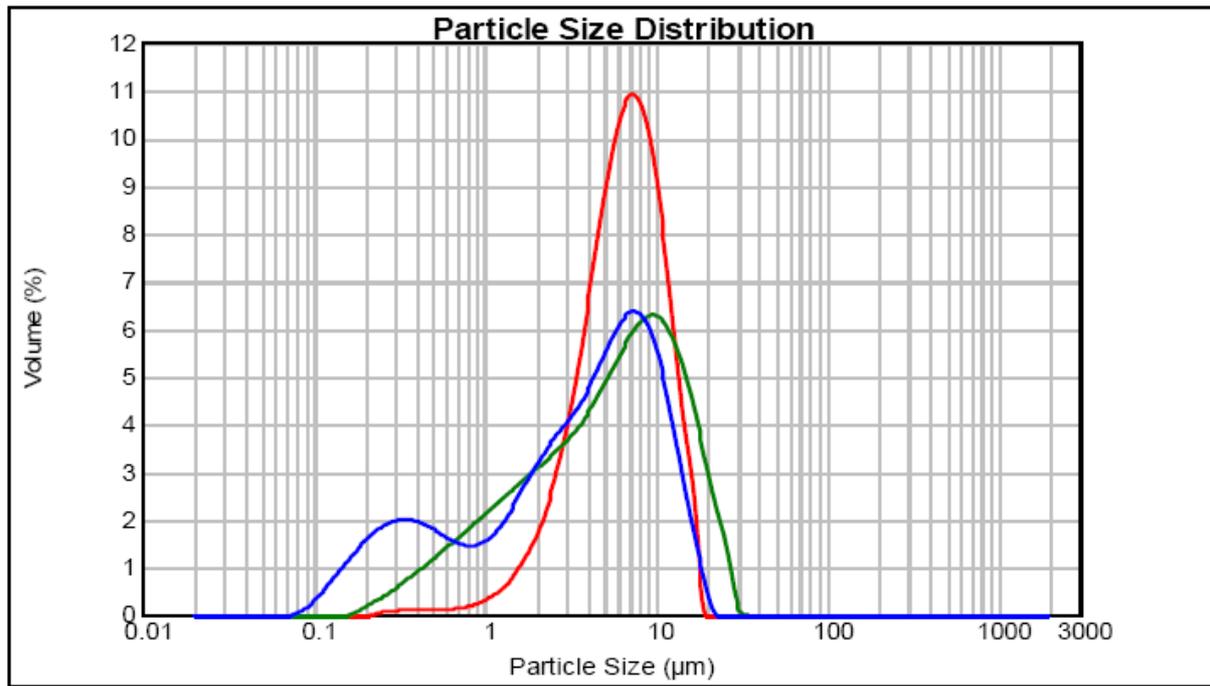
#### C.3.2.1.1 Wirkstoffgehalt

Neben dem eingesetzten Emulgator soll auch hier geprüft werden, welchen Einfluss der Wirkstoffanteil auf das System ausübt. Dazu werden drei Formulierungen gleicher Zusammensetzung, jedoch mit unterschiedlichen Wirkstoffgehalten, näher untersucht. Die Grundzusammensetzung der mit dem Microfluidizer homogenisierten Formulierungen ist Tabelle 30 zu entnehmen.

**Tabelle 30 Grundzusammensetzung der Formulierungen mit steigendem Flumethringehalt**

Substanz	Menge [%]
PMMA	6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® S	42 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	0, 17, 30 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

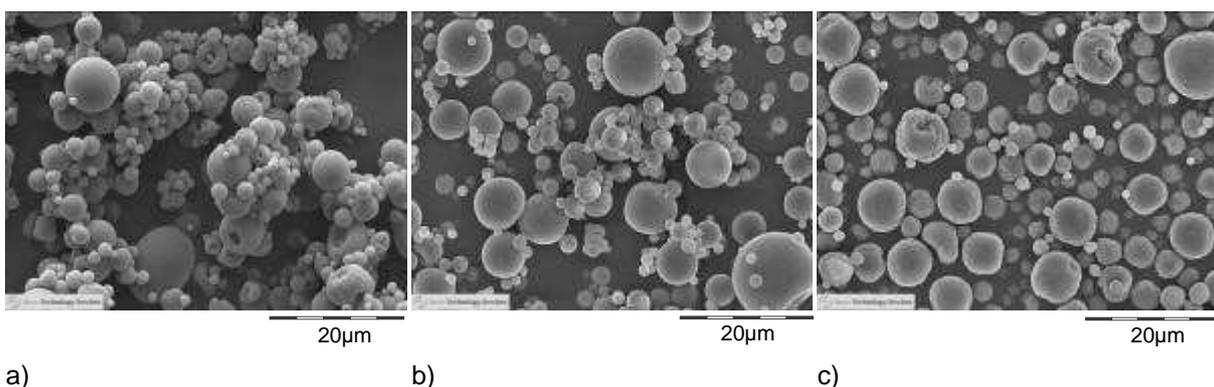
Die nach Homogenisierung mit dem Microfluidizer erhaltenen Emulsionen zeigen ein sehr feines Tropfenbild. Einzelne Tropfen sind in den mikroskopischen Aufnahmen kaum noch auszumachen, lediglich bei der Probe mit 30 % Wirkstoff sind noch einige sehr große Emulsionstropfen vorhanden. Nach Versprühen der Emulsionen zeigen sich in allen Fällen sehr feine, weiße Pulver. Mikroskopische Aufnahmen der in Wasser redispergierten Partikel deuten bei einem Wirkstoffgehalt von 30 % auf vorhandene große Partikel oder Agglomerate hin. Bei 17 % Flumethrin ist die Größenverteilung sehr fein, bis auf wenige große Partikel. Ohne Wirkstoff sind die Partikel kaum noch unter dem Mikroskop zu erkennen. Eine genauere Analyse bietet eine Messung der Laserdiffraktometrie.



**Abb. 51 Partikelgrößenanalyse von PMMA - Eudragit® S - Partikeln mit steigendem Wirkstoffgehalt: 0 % (grün); 17 % (blau); 30 % Flumethrin (rot)**

Die Analyse der Laserdiffraktometrie (Abb. 51) zeigt ein etwas anderes Bild als durch die mikroskopischen Aufnahmen erwartet wird. Die Placebo Partikel (ohne Wirkstoff) erscheinen hier größer als die Partikel mit 17 % Flumethrin. Wird der Wirkstoffgehalt auf 30 % erhöht, so werden zwar absolut keine größeren Partikel erhalten, jedoch verschiebt sich die Verteilung zu Gunsten der größeren Partikel.

REM-Aufnahmen sollen der weiteren Charakterisierung der Partikelproben dienen. Diese sind Abb. 52 zu entnehmen.



**Abb. 52 REM-Aufnahmen von PMMA - Eudragit® S - Partikeln mit steigendem Wirkstoffgehalt; a) 0 %; b) 17 % und c) 30 % Flumethrin**

Die Partikelproben in Abb. 52 zeigen eine inhomogene Größenverteilung. Neben vielen kleinen Partikeln sind auch sehr große sichtbar. Wie für das Verfahren der Sprühtrocknung nicht ungewöhnlich, sind auch Partikel mit Loch erkennbar. Wie viele Partikel jedoch

tatsächlich nicht massiv sind, muss ein Querschnitt zeigen. Anhand der REM-Aufnahmen kann kein Unterschied zwischen den einzelnen Proben festgestellt werden. Lediglich die Oberflächenstruktur der Partikel ohne Wirkstoff (a)) ist etwas glatter als die der anderen Proben. Somit scheint der Wirkstoffgehalt auf die Struktur der Partikel keinen großen Einfluss zu nehmen.

#### **C.3.2.1.2 Epoxidharzeinbettung**

Die Sprühtrocknung ist ein schnelles und einfaches Verfahren, um aus einer Emulsion trockene Partikel zu erhalten. Nachteilig ist, dass Verunreinigungen nicht direkt entfernt werden können und neben den Partikeln anfallen. Zudem ist das Verfahren durch den schnellen Trocknungsvorgang für die Entstehung der Partikel nicht sehr schonend. Das schnelle Verdampfen des Lösemittels birgt die Gefahr, dass aufgeplatzte, hohle, dennoch sphärische Partikel entstehen oder, wenn die äußere Hülle nicht genügend Stabilität aufweist, dass die Partikel wieder in sich zusammenfallen und unregelmäßig zusammengefaltete Formen ausbilden. Möglich ist auch, dass das Lösemittel die gelösten Polymerbestandteile beim Verdampfen mit nach außen an die Partikelhülle zieht. So entsteht ein hohler Partikel der von außen unversehrt aussieht. Solche Partikel sind nicht erwünscht, da sie bei der Freisetzung eine stark vergrößerte Oberfläche aufweisen, welches zu einer schnelleren Freisetzung führen kann.

Hat das Partikel ein Loch, wird dies im Elektronenmikroskop sichtbar, wenn das Loch in die Betrachtungsrichtung zeigt. Ansonsten lassen sich hohle Partikel nicht von massiven unterscheiden. Zur Identifizierung solcher Partikel, wird eine Partikelprobe mit einem Epoxidharz gemischt. Nach dessen Aushärtung wird ein Querschnitt angefertigt. Dieser Querschnitt kann nun unter dem Elektronenmikroskop betrachtet werden. Hier sind nicht nur die Epoxidharzmatrix zu sehen, sondern auch die darin befindlichen Partikel. Durch den Querschnitt ist es möglich, hohle Partikel zu identifizieren und die Güte der Partikelprobe zu bestimmen.

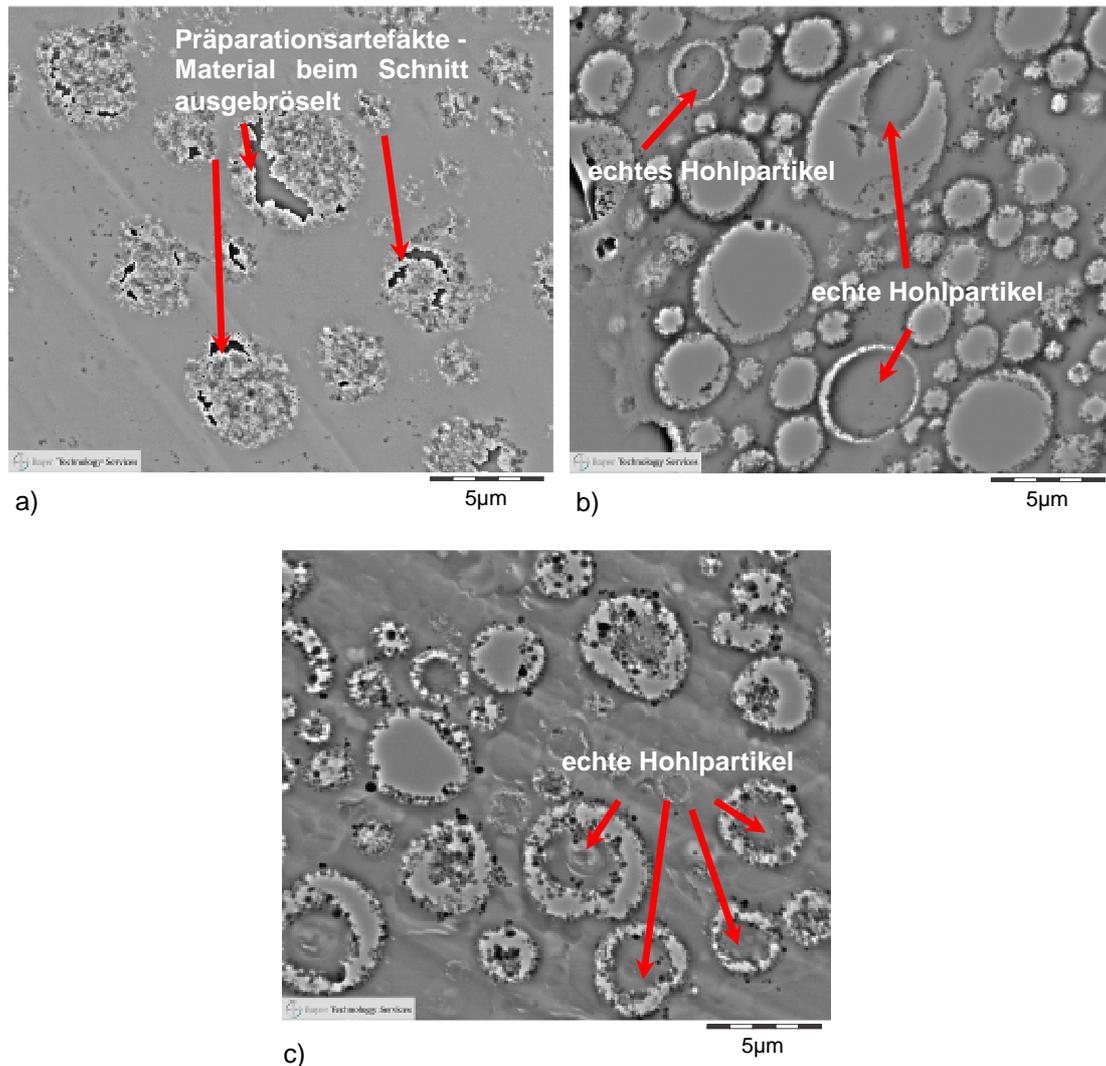
Drei PMMA Eudragit® S Formulierungen werden in diesem aufwendigen Verfahren präpariert. Alle Formulierungen, deren Zusammensetzungen Tabelle 31 zu entnehmen sind, werden zur besseren Homogenisierung mit dem Microfluidizer bearbeitet. Die erhaltenen Emulsionen werden durch ein feines, homogenes Tröpfchenbild charakterisiert.

**Tabelle 31 Zusammensetzung der Proben der Epoxidharzeinbettung**

Probe	Zusammensetzung
PMMA 6-1-1	PMMA 9 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® S 42 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 29 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)
PMMA 7-1-1	PMMA 9 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® S 42 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)
PMMA 9-1-1	PMMA 9 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® S 17 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Die Proben werden bewusst nach großen Unterschieden in der Formulierung ausgesucht. So wird erhofft, dass durch die Formulierung bedingte, unterschiedliche Ergebnisse stärker hervortreten und so besser zugeordnet werden können. Für eine wirklich aussagekräftige Analyse reichen drei Proben nicht aus. Dies ist aber ein Anfang, um die Formulierungen frühzeitig besser einordnen und charakterisieren zu können.

a) zeigt massive Partikel, die jedoch in ihrer Struktur inhomogen aussehen. a) enthält den höchsten Anteil an Emulgator und Wirkstoff. Bei b) ist erneut ein inhomogenes Größenbild der Partikel erkennbar. Neben vielen massiven sind auch einige hohle Matrices vorhanden. Die Partikel sehen von ihrer Struktur jedoch viel homogener aus als bei a). Der Unterschied zwischen a) und b) besteht lediglich in der eingesetzten Wirkstoffmenge, die bei 29 bzw. 17 % liegt. Bei c) sind einige hohle Partikel erkennbar. Die Partikelränder scheinen porös und inhomogen. Die massiven Partikel besitzen eine gleichmäßige Färbung.



**Abb. 53** REM-Aufnahmen der Partikelquerschnitte a) 6-1-1; b) 7-1-1; c) 9-1-1

Bei Betrachtung der hier erhaltenen Ergebnisse kann festgehalten werden, dass die Formulierung mit einem hohen Emulgatoranteil und einem geringen Wirkstoffgehalt die besseren Partikel liefert (b) 7-1-1). Diese sind homogen im Aussehen, obgleich sie in der Größe inhomogen und auch hohle Partikel vorhanden sind. Als optimal kann keine der hier aufgeführten Formulierungen bezeichnet werden.

Auch muss beachtet werden, dass die in der Sprühtrocknung erhaltenen Partikel nicht aufgereinigt sind. Der Überschuss an Emulgator wird mitversprüht und getrocknet. Ein Entfernen dieses Überschusses, der im Hundefell zu unerwünschten Verklebungen führen kann, ist somit notwendig, aber schwierig.

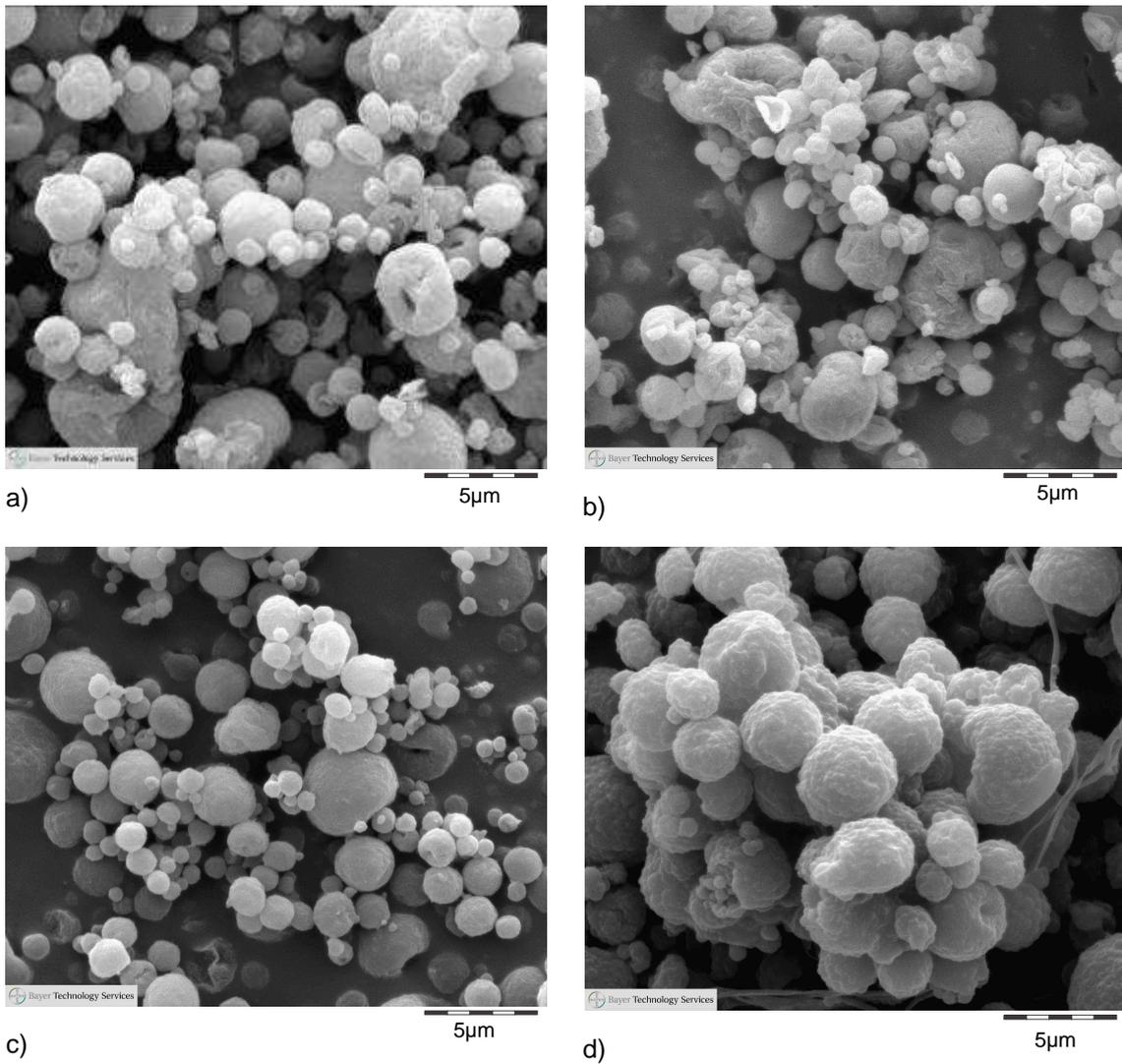
### C.3.2.1.3 Einfluss des Molekulargewichts

Wie bereits mit Polystyrol in C.2.1.2 ausführlich bearbeitet und diskutiert, soll auch für das Polymer PMMA der Einfluss des Molekulargewichts getestet werden. Hierzu wird folgende Formulierung mit Polymeren verschiedenen Molgewichts sprühgetrocknet (Tabelle 32).

**Tabelle 32 Grundzusammensetzung der Formulierung bei verändertem Molekulargewicht des Polymers**

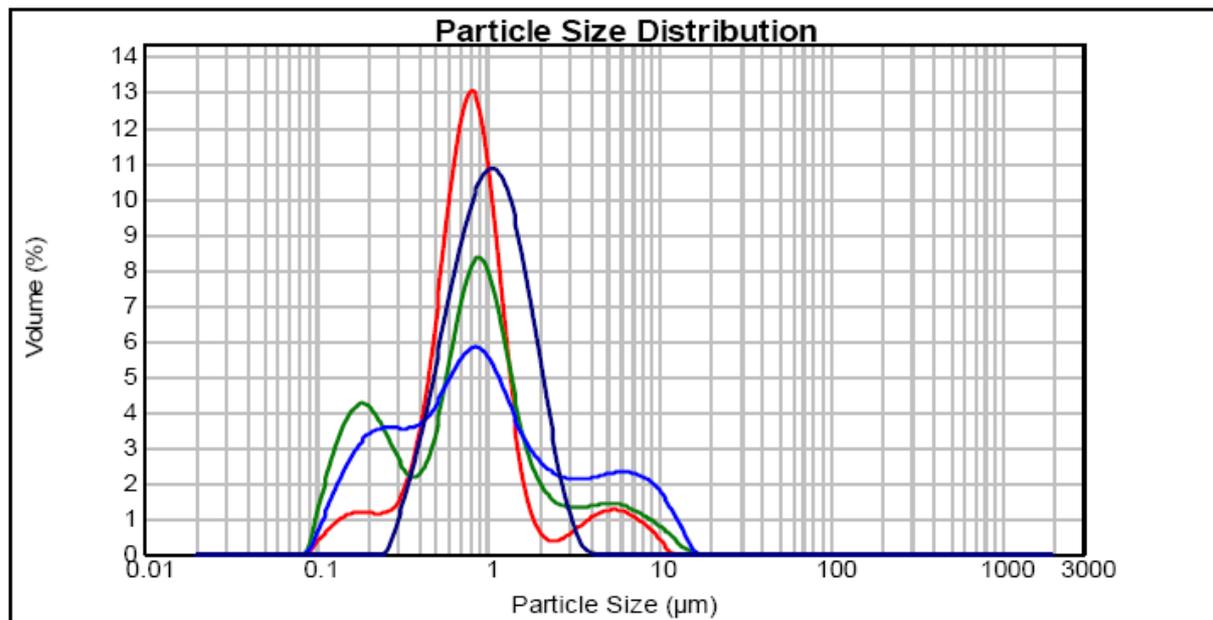
Substanz	Menge [%]
PMMA (2.000; 12.000; 80.000; 600.000 Da)	6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® S	28 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Die erhaltenen Emulsionen sind stabil. Die Emulsionstropfen sind inhomogen in der Größe, werden aber mit sinkendem Molekulargewicht kleiner. Nach Einsatz des Microfluidizer sind bei der Formulierung mit PMMA 600.000 Da noch große Emulsionstropfen vorhanden. Die Formulierungen der übrigen Molgewichte zeigen nach der zusätzlichen Homogenisierung ein deutlich kleineres und homogeneres Bild. Alle Formulierungen lassen sich versprühen und ergeben ein feines, weißes Pulver. Bei der Emulsion mit PMMA 600.000 Da kommt es zu einer Ablagerung des Produktes im Zyklon. Die erhaltenen Partikel sind rein optisch und auch redispergiert mit Hilfe des Lichtmikroskops nicht zu unterscheiden. Sie scheinen sehr klein, homogen und nicht agglomeriert. Um eventuelle Unterschiede erkennen zu können, werden die Proben im Rasterelektronenmikroskop betrachtet (Abb. 54).



**Abb. 54** REM-Aufnahmen der Formulierungen mit steigendem Molekulargewicht a) PMMA 2.000 Da; b) PMMA 12.000 Da; c) PMMA 80.000 Da; d) PMMA 600.000 Da

Abb. 54 zeigt im Falle von 2000, 12.000 und 80.000 Da ein recht ähnliches Partikelbild. Es sind sowohl sehr kleine, als auch größere Teilchen vorhanden. Teilweise ist die Oberfläche rau, teilweise sind Partikel mit einem für die Sprühtrocknung typischen Loch versehen. Das Partikelkontingent der Probe mit dem höchsten Molekulargewicht von 600.000 Da zeigt insgesamt etwas größere Partikel mit einer rauhen Oberfläche. Da eine REM-Aufnahme nur einen sehr kleinen Probenausschnitt darstellen und eine Bewertung des Partikelkontingents nicht rein objektiv erfolgen kann, soll eine Analyse mittels Laserdiffraktometrie weiteren Aufschluss liefern.



**Abb. 55 Partikelgrößenanalyse bei Formulierungen mit steigendem Molgewicht 2.000 Da (rot); 12.000 Da (grün); 80.000 Da (hellblau); 600.000 Da (dunkelblau)**

Abb. 55 zeigt, dass die Molgewichte 2.000, 12.000 und 80.000 Da eine leichte Verschiebung nach links in den kleineren Partikelbereich aufweisen. Je nach Formulierung ist ein mehr oder weniger ausgeprägter Feinanteil, sowie an Anteil mit größeren Partikeln vorhanden. Eine gleichmäßige, homogene Verteilung zeigt dagegen die Formulierung mit PMMA 600.000 Da. Es ist kein Feinanteil zu erkennen, ebenso wie größere Partikel. Dennoch sind die Partikel in ihrer Gesamtheit zu groß. Sehr kleine Partikel können unerwünscht sein, da sie nicht viel Wirkstoff enthalten und durch ihre größere Oberfläche diesen auch schneller wieder abgeben. Große Partikel dagegen können nicht so gut angebunden werden, fallen ab und stehen so für eine ektoparasitizide Wirkung nicht mehr zur Verfügung.

Des Weiteren soll untersucht werden, wie sich das steigende Molekulargewicht auf die Glasübergangstemperatur auswirkt. Dazu werden zuerst die reinen Polymere mittels DSC vermessen (Abb. 56).

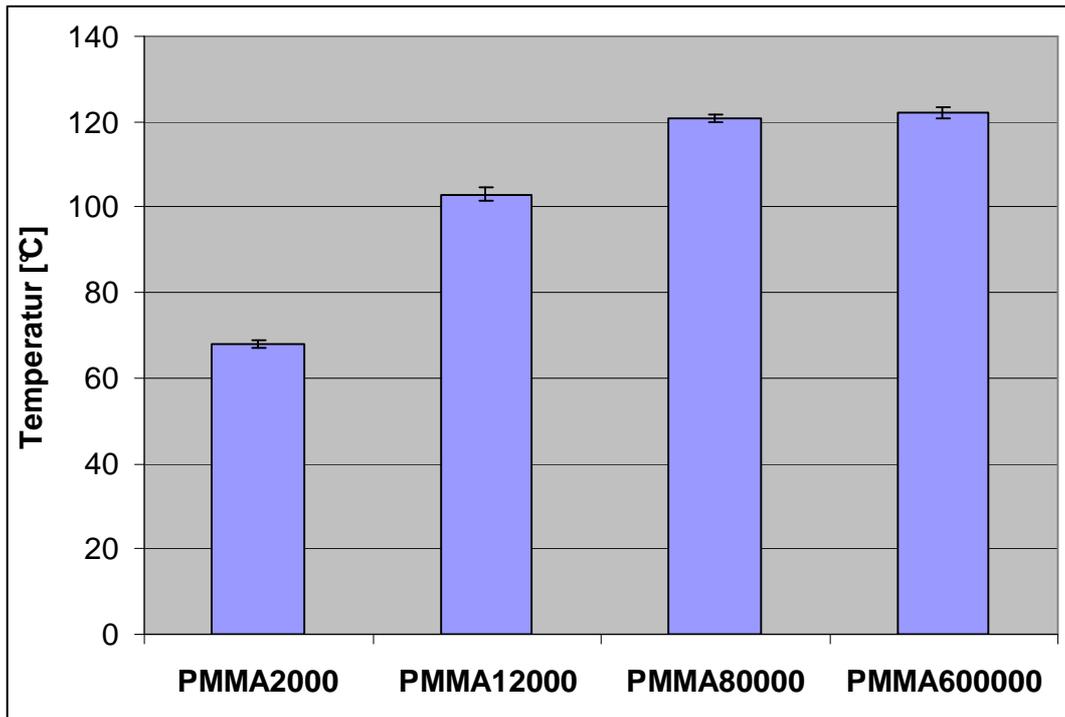
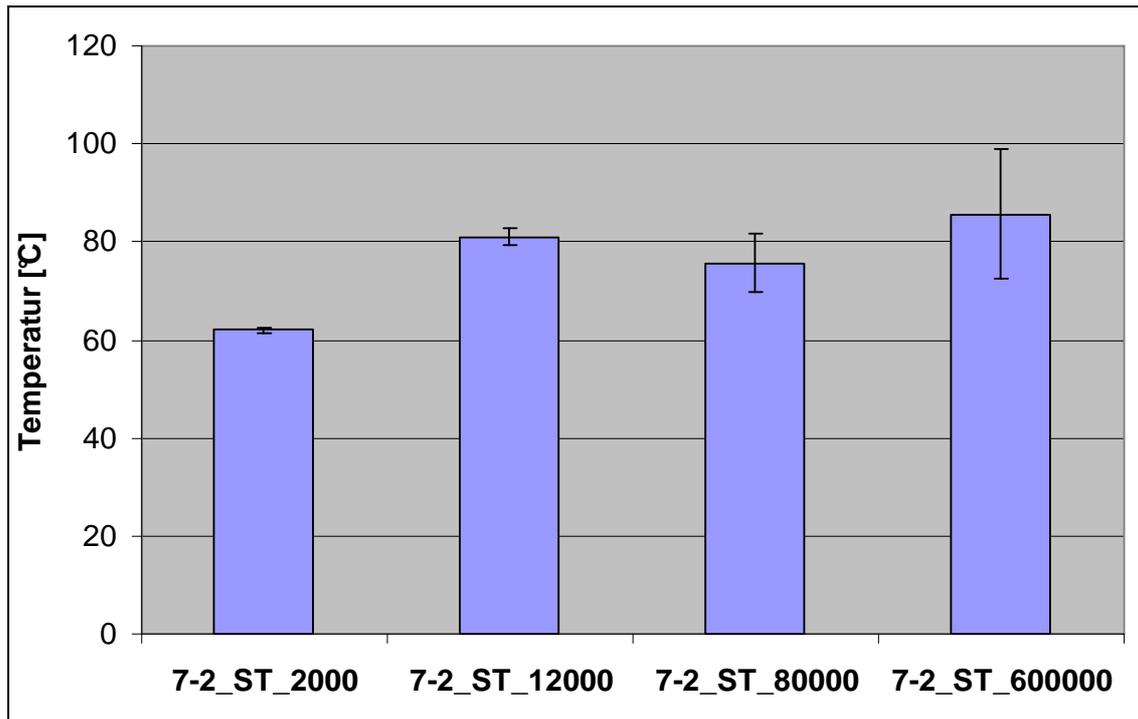


Abb. 56 Einfluss des Molekulargewichts auf die  $T_g$

Abb. 56 zeigt, dass mit steigendem Molekulargewicht auch die Glasübergangstemperatur steigt (vgl. C.2.1.2.3). Bei den Molgewichten 80.000 und 600.000 Da ist ein Unterschied in der  $T_g$  kaum festzustellen. Beide Polymere liegen bei ~ 120 °C. PMMA 12.000 Da hat eine  $T_g$  bei ~ 100 °C Die größte Temperaturdifferenz ist zu PMMA 2.000 Da erkennbar. Dieses hat eine Glasübergangstemperatur von lediglich ~ 70 °C.

Da alle Polymere in der gleichen Formulierung verarbeitet werden, lässt sich durch eine Messung der Glasübergangstemperatur der erhaltenen Partikel der Einfluss von Wirkstoff und Emulgator bestimmen. Die gemessenen Glasübergänge sind Abb. 57 zu entnehmen.



**Abb. 57** Glasübergangstemperaturen der Formulierungen mit steigendem Molgewicht des Matrixpolymers

In allen Fällen ist eine Erniedrigung der Glasübergangstemperatur zu erkennen. Im Vergleich zum reinen Polymer zeigt sich bei 7-2\_ST\_2.000 die geringste Abweichung zu PMMA 2.000 Da von nur 6 °C. Die übrigen Formulierungen zeigen eine deutlich größere Depression der Glasübergangstemperatur. Bei PMMA 12.000 Da sinkt die  $T_g$  um 20 °C. Bei PMMA 80.000 Da und PMMA 600.000 Da sind es dagegen ~ 40 °C. Wie bereits in C.2.1.1.2 beschrieben hat der Wirkstoff Flumethrin eine weichmachende Eigenschaft. Er bewirkt durch eine Mischung mit dem Matrixpolymer eine Senkung der Glasübergangstemperatur.

### C.3.2.2 Eudragit® RS

Eudragit® RS bildet mit PMMA stabile Emulsionen, die sich problemlos versprühen lassen. Die REM-Aufnahme zeigt ein inhomogenes Bild. Neben sehr kleinen sphärischen Partikeln (< 0,3 µm) sind sehr große Partikel (~ 5 µm) zu sehen. Auch sind schalenartige Strukturen und Verklebungen sichtbar. Eine Homogenisierung der Emulsion mittels Microfluidizer führt möglicherweise durch eine bessere Dispergierung auch zu einer gleichmäßigeren Tröpfchenverteilung, welches Auswirkungen auf die erhaltenen Partikel hat. So könnte ein homogeneres Partikelbild und eine Minimierung der schalenartigen Strukturen erreicht werden. Dies wird jedoch nicht weiter verfolgt.

Getestet wird zum einen der Einfluss des Wirkstoffgehalts auf die Partikel und zum anderen der Einfluss des Emulgatoranteils.

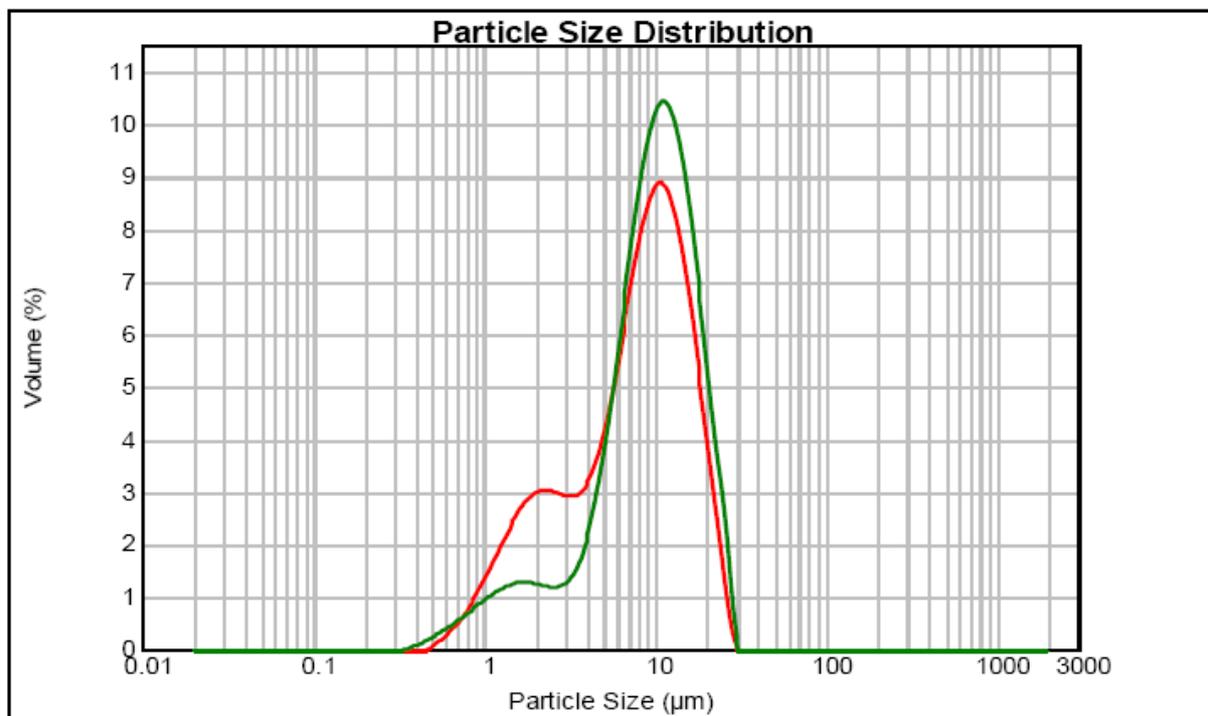
### C.3.2.2.1 Einfluss des Wirkstoffgehalts

Um den Einfluss des Wirkstoffgehalts auf die Formulierung zu testen, stehen zwei Formulierungen zur Verfügung (Tabelle 33).

**Tabelle 33 Zusammensetzung der Formulierungen**

Substanz	Menge [%]
PMMA	6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® RS	42 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	0 % und 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Die Formulierung ohne Wirkstoff ergibt ein feines, weißes Pulver, welches nicht elektrostatisch ist. Mit Wirkstoff ist das Produkt flockig voluminös und leicht elektrostatisch. Werden die Partikel in Wasser redispersiert und mit dem Lichtmikroskop betrachtet, so sind bei beiden Formulierungen Partikelagglomerate erkennbar. Bei der wirkstofffreien Probe scheint die Menge der vereinzelt vorliegenden Partikel größer. Ihre Größe ist jedoch nicht optimal und liegt für die separat vorliegenden Partikel bei  $< 5 \mu\text{m}$ . Eine Partikelgrößenanalyse soll zeigen, ob ein Unterschied zwischen den beiden Formulierungen existiert (Abb. 58).



**Abb. 58 Partikelgrößenanalyse der Formulierung ohne Wirkstoff (rot) und mit 17 % Wirkstoff (grün)**

In Abb. 58 ist ein Unterschied bei einer Formulierung mit und ohne Flumethrin kaum zu erkennen. Der Feinanteil ist bei der Probe ohne Wirkstoff stärker ausgeprägt. Dies ist auf eine eventuell bessere Singularisierung der Partikel, welche schon unter dem Lichtmikroskop

sichtbar wird, zurückzuführen. Das Partikelkontingent ist in seiner Gesamtheit zu groß. Eine Anbindung an Hundehaar kann nicht optimal verlaufen.

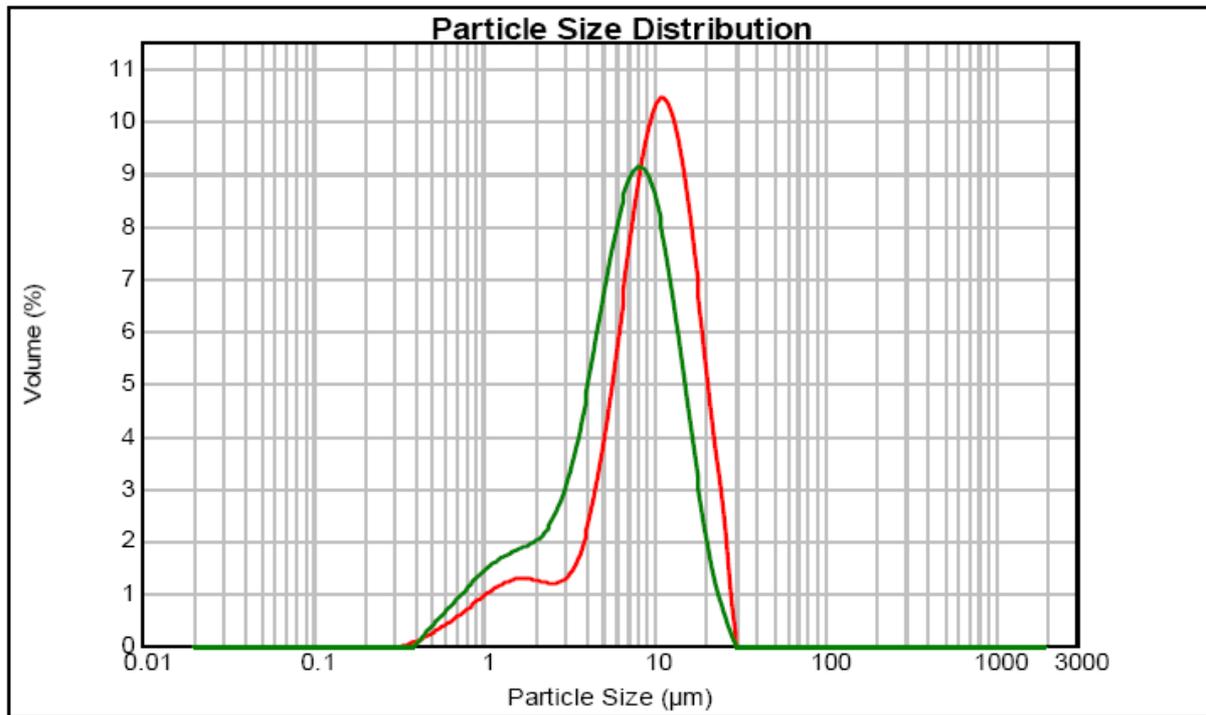
### C.3.2.2.2 Einfluss des Emulgatoranteils

Um eine Aussage über den Einfluss des Emulgatoranteils treffen zu können, werden zwei Formulierungen mit gleicher Zusammensetzung, jedoch unterschiedlichem Eudragit® RS Anteil, nach der Sprühtrocknung auf ihre Partikelgröße hin untersucht. Die Zusammensetzung der Formulierungen ist Tabelle 34 zu entnehmen.

**Tabelle 34 Zusammensetzung der Formulierungen**

<b>Substanz</b>	<b>Menge [%]</b>
PMMA	6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® RS	42 % und 17 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Bei beiden Formulierungen wird eine stabile Emulsion erhalten, die durch einen zusätzlichen Homogenisierungsschritt, wohl auch ein homogeneres Partikelbild erzeugen würde (vgl. C.3.2.2.1). Das Produkt ist in beiden Fällen flockig voluminös und leicht elektrostatisch. Die lichtmikroskopische Aufnahme der in Wasser redispergierten Partikel zeigt, dass sich beide Formulierungen nicht optimal benetzen lassen. Es entsteht der rein optische Eindruck, dass die Partikel mit dem geringeren Emulgatoranteil kleiner sind. Dies würde dem Ergebnis mit Polystyrol und MSCP 14 aus C.2.1.3 entgegenstehen, wo eine Partikelvergrößerung bei sinkendem Emulgatoranteil beobachtet wird. Die Analyse des Laserdiffraktometers soll hier weiteren Aufschluss geben (Abb. 59).



**Abb. 59** Partikelgrößenanalyse der Formulierung mit 42 % Eudragit<sup>®</sup> RS (rot) und mit 17 % Eudragit<sup>®</sup> RS (grün)

Abb. 59 zeigt, dass die Größenverteilung der Probe mit dem geringeren Emulgatoranteil tatsächlich nach links in den niedrigeren Größenbereich verschoben ist. Dieser Unterschied ist nicht sehr groß und kann von Charge zu Charge variieren. Dass ein Einfluss des Emulgators nicht deutlich erkennbar ist, kann mit den getesteten Emulgatorkonzentrationen zusammenhängen. Für das System existiert eine bestimmte Mindestkonzentration, die nötig ist, um eine stabile Emulsion zu bilden. Die Maximalkonzentration ist die, die die entstehenden Oberflächen so absättigt, dass das Optimum erreicht wird. Eine weitere Erhöhung der Emulgatorkonzentration ist ohne weiteres möglich, bringt aber keine weitere Verbesserung des Partikelbildes mit sich.

Das erhaltene Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass ein Zusatz von 17 % Emulgator genügt, um das Emulsionssystem ausreichend zu stabilisieren. Mehr Emulgator schadet dem System nicht, bringt aber auch keine Verbesserung mit sich.

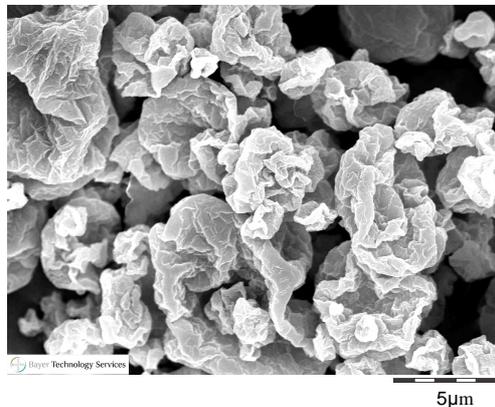
### C.3.2.3 Eudragit<sup>®</sup> E

Trotz der nicht sehr vielversprechenden Vorversuche soll Eudragit<sup>®</sup> E in einem Sprühtrocknungsversuch getestet werden. Dazu wird die Formulierung aus Tabelle 35 in der Büchi Sprühtrocknungsanlage nach einem Homogenisierungsschritt mit dem Microfluidizer versprüht.

**Tabelle 35 Zusammensetzung der in der Sprühtrocknung verarbeiteten Formulierung mit Eudragit® E**

Substanz	Menge [%]
PMMA	6,5 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Eudragit® E	28 % (m/m bezogen auf Polymermasse)
Flumethrin	25 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Das erhaltene Produkt ist ein sehr feines Pulver, das nicht elektrostatisch geladen ist. Die redispergierten Partikel sind wegen ihrer geringen Größe unter dem Lichtmikroskop kaum sichtbar. Einige Probenbereiche sind jedoch schlecht benetzbar, sodass sie als Agglomerate unter dem Mikroskop erkennbar sind. Die REM-Aufnahme des erhaltenen Produkts zeigt keine sphärischen Partikel (Abb. 60).



**Abb. 60 REM-Aufnahme von PMMA - Eudragit® E - Partikeln**

Es entsteht der Eindruck, dass die Kapseln in sich zusammengefallen sind. Dies kann mit einem Phänomen der Sprühtrocknung beschrieben werden, bei dem der Trocknungsvorgang nicht zum gleichmäßigen Aushärten der Partikel führt (siehe C.3.2.1.2).

Dieser Versuch zeigt, dass sich Eudragit® E nicht für eine Formulierung mit PMMA eignet. Weitere Versuche mit Eudragit® E werden aufgrund der ebenfalls schlechten Ergebnisse im Emulsion Evaporation Verfahren nicht durchgeführt.

### C.3.3 Zusammenfassung PMMA

Nach Abschluss der Arbeiten mit PMMA sollen die erhaltenen Ergebnisse kurz zusammengefasst werden. Die meisten der hergestellten Formulierungen lassen sich besser in der Sprühtrocknung verarbeiten, jedoch kann bei diesem Verfahren keine Formulierung entwickelt werden, die den gesuchten Anforderungen entspricht. Im Emulsion Evaporation Verfahren, welches für viele Formulierungen suboptimal ist, kann eine Formulierung mit PMMA und Eudragit® RS erarbeitet werden, die aufgrund ihrer positiven Eigenschaften zum Einsatz im Tierversuch (C.6) kommt. Neben den ionisierbaren Copolymeren Eudragit® E und

---

S wird das permanent kationische Eudragit<sup>®</sup> RS verwendet. Eudragit<sup>®</sup> E bildet in beiden Verfahren keine sphärischen Partikel der gewünschten Größe. Eudragit<sup>®</sup> S ist in der Kombination mit PMMA gut zu versprühen, jedoch kommt es bei der Redispergierung zu unerwünschten Lösungseffekten, sodass keine Partikel der gewünschten Größe  $D(90) < 2 \mu\text{m}$  erhalten werden können. Im Emulsion Evaporation Verfahren ist mit Eudragit<sup>®</sup> S eine schlechte Filtrierbarkeit der Suspensionen zu beobachten, auch ist das erhaltene Partikelkontingent suboptimal. PMMA und Eudragit<sup>®</sup> RS lassen sich in beiden Verfahren verarbeiten. Ein optimales System wird mit dem Emulsion Evaporation Verfahren entwickelt.

Allgemein ist festzustellen, dass die PMMA-Systeme sensibler und in ihren Eigenschaften schwerer steuerbar sind als die Polystyrolsysteme. Folgende Zusammenhänge können bei den PMMA Formulierungen beobachtet werden. Bei steigendem Wirkstoffgehalt ist im Emulsion Evaporation Verfahren keine Tendenz zum Partikelwachstum erkennbar. Bei Erhöhung des Emulgatoranteils ist beim gleichen Verfahren ebenfalls keine eindeutige Veränderung der Partikelgröße sichtbar. Der Einsatz des Microfluidizer dagegen zeigt eine deutliche Verkleinerung des Partikelkontingents im Emulsion Evaporation Verfahren. Dies ist dennoch nicht optimal, da die Partikel keine enge Verteilung besitzen und ein Großteil zu klein ist. Ohne Microfluidizer wird eine engere Größenverteilung erzielt, ein  $D(90)$ -Wert von  $< 2 \mu\text{m}$  kann jedoch nicht erreicht werden. So nehmen veränderte Verfahrensparameter Einfluss auf das Partikelkontingent. Diese Änderungen lassen sich in ihrer Wirkung jedoch noch nicht optimal steuern und erfordern weitere Untersuchungen. In der Sprühtrocknung kommt es erst bei einem sehr hohen Wirkstoffanteil zu einer leichten Partikelvergrößerung. Bei steigendem Molgewicht ist kaum eine Veränderung in der Größe der Partikel zu beobachten. Die Menge der sehr kleinen und sehr großen Partikel sinkt mit steigendem Molekulargewicht, die Verteilung wird enger, was durchaus positiv zu bewerten ist. Die Glasübergangstemperatur steigt mit dem Molgewicht und sinkt durch eine Verkapselung des Wirkstoffs. Partikel des Sprühtrocknungsverfahrens besitzen suboptimale Löseigenschaften, sind in ihrer Größe inhomogen und zudem oft hohl. Eine optimierte Formulierung ist in G.2 hinterlegt.

## C.4 Sonstige Polymere

Neben PMMA und Polystyrol werden verschiedene andere Polymere in Versuchen getestet. Aufgrund nicht optimaler Löseeigenschaften oder sonstigen Formulierungsschwierigkeiten werden die Versuche mit diesen Polymeren nicht weiter ausgebaut. Dennoch soll im Folgenden kurz erwähnt werden, welche sonstigen Versuche unternommen wurden, eine optimale Formulierung zu entwickeln. Untersucht werden Chitosan als natürliches Polymer und das bereits oft verwendete Eudragit® RS. Die Polymere bilden in diesem Fall nicht nur die Matrix, sie sind auch selbstemulgierend. Die Zugabe eines zusätzlichen Emulgators ist in diesen Fällen nicht nötig. Versuche mit Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon konnten aufgrund der zu guten Wasserlöslichkeit nicht weiter verfolgt werden.

### C.4.1 Eudragit® RS

Eudragit® RS wird erfolgreich in einer Formulierung mit PMMA eingesetzt (siehe C.3.1.1). Das Copolymer als alleiniges Matrixmaterial für die Herstellung der Partikel einzusetzen, wird durch die Tatsache unterstützt, dass Eudragit® RS nicht wasserlöslich ist. Das Polymer wird sowohl im Sprühtrocknungs- als auch im Solvent Evaporation Verfahren eingesetzt. In der Sprühtrocknung wird der Wirkstoffgehalt variiert und die Partikel auf eine massive Matrix untersucht. Versuche im Solvent Evaporation Verfahren sollen einen Vergleich von Sprühtrocknung und Solvent Evaporation ermöglichen.

#### C.4.1.1 Wirkstoffgehalt

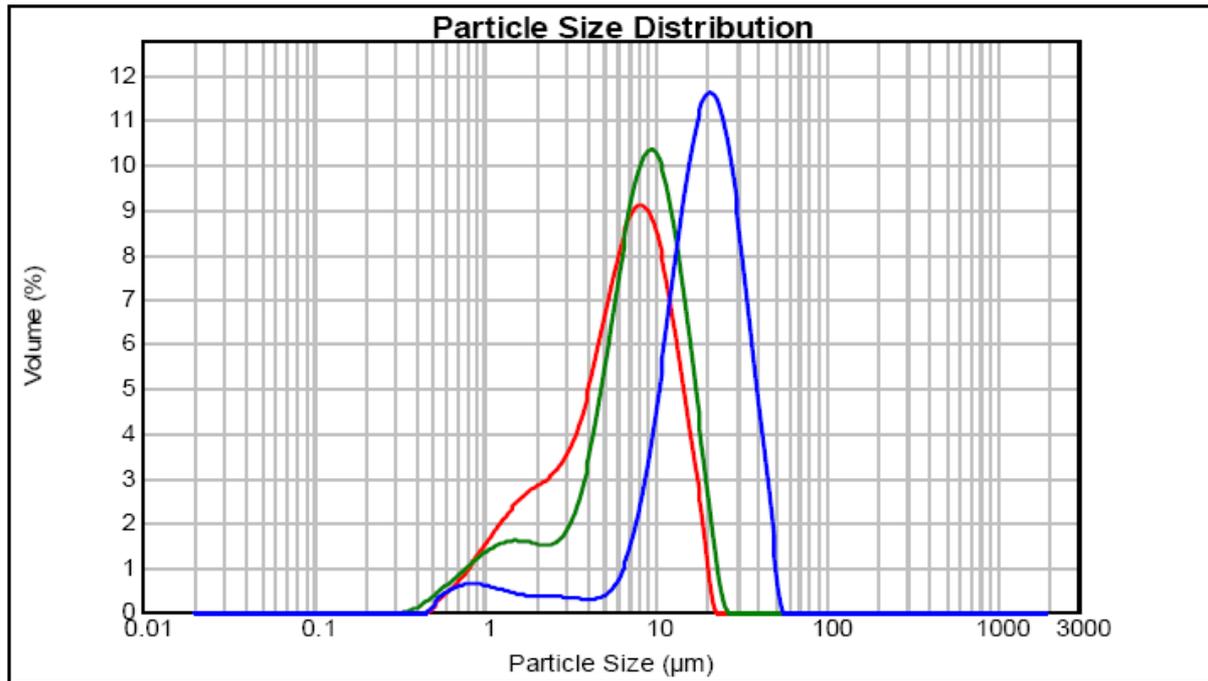
Um den Einfluss des Wirkstoffs auf das System zu testen, werden drei Formulierungen mit unterschiedlichem Wirkstoffgehalt sprühtrocknet. Neben den rein visuellen Eigenschaften, wird eine Partikelgrößenmessung durchgeführt und eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme angefertigt. Die Zusammensetzung der Proben ist Tabelle 36 zu entnehmen.

**Tabelle 36 Zusammensetzung der Formulierungen mit steigendem Wirkstoffgehalt**

Substanz	Menge [%]
Eudragit® RS	9 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Flumethrin	0, 17 und 33 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Alle nicht einem zusätzlichen Homogenisierungsschritt unterzogenen Emulsionen zeigen ein sehr ähnliches inhomogenes Bild. Neben vielen großen Emulsionstropfen sind auch kleine zu sehen. Nach Versprühen der Formulierungen wird in allen Fällen ein feines, weißes Pulver erhalten. Bei der Redispergierung in Wasser zeigt das Lichtmikroskop bei allen Formulierungen sphärische Partikel < 5 µm, jedoch sind auch Agglomerate sichtbar. Ob

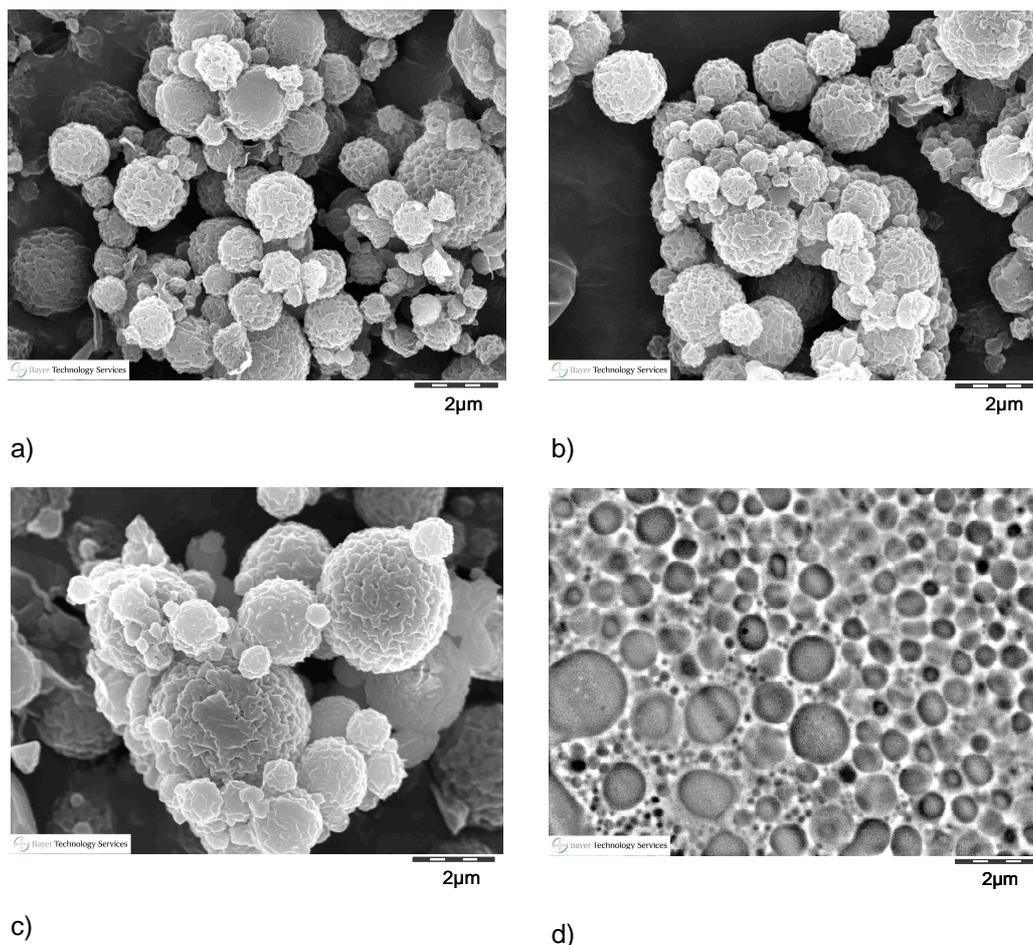
diese durch Ultraschallbehandlung singularisierbar sind, muss die Messung der Partikelgröße zeigen.



**Abb. 61 Partikelgrößenanalyse von Eudragit® RS Partikeln mit unterschiedlichem Wirkstoffgehalt: 0 % (rot); 17 % (grün); 33 % (blau)**

Abb. 61 zeigt die Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration. Die Größenverteilung lässt nicht auf große Partikelagglomerate schließen, jedoch ist in allen Proben ein Feinanteil zu sehen. Bis zu mindestens 17 % Wirkstoff scheinen keinen Einfluss auf die Partikelgröße zu nehmen. Eine Veränderung der Partikelgrößenverteilung ist praktisch nicht sichtbar. Bei einem Wirkstoffgehalt von 33 % ist jedoch eine klare Verschiebung in einen größeren Partikelbereich erkennbar.

Weiteren Aufschluss über die Proben soll eine REM-Aufnahme liefern. Dazu wird auch eine vergleichbare Probe mit 17 % Wirkstoff, die sich lediglich durch den Einsatz des Microfluidizer unterscheidet, in Epoxidharz eingebettet, um die Massivität der Partikel zu überprüfen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).



**Abb. 62 REM-Aufnahmen von Eudragit® RS Partikeln mit a) 0 %; b) 17 %; c) 33 % und d) 17 % (im Querschnitt) Wirkstoff Flumethrin**

Auch die REM-Aufnahmen zeigen, dass es zwischen 0 und 17 % Wirkstoff (a) und b)) optisch keinen Unterschied gibt. c) bildet etwas größere Partikel ab, welches ebenfalls durch die Mastersizer Analyse bestätigt wird. Die Partikelproben weisen eine raue, strukturierte Oberfläche auf. Die Betrachtung der Epoxidharzeinbettung macht deutlich, dass es sich hier um massive Partikel kleiner Größe handelt.

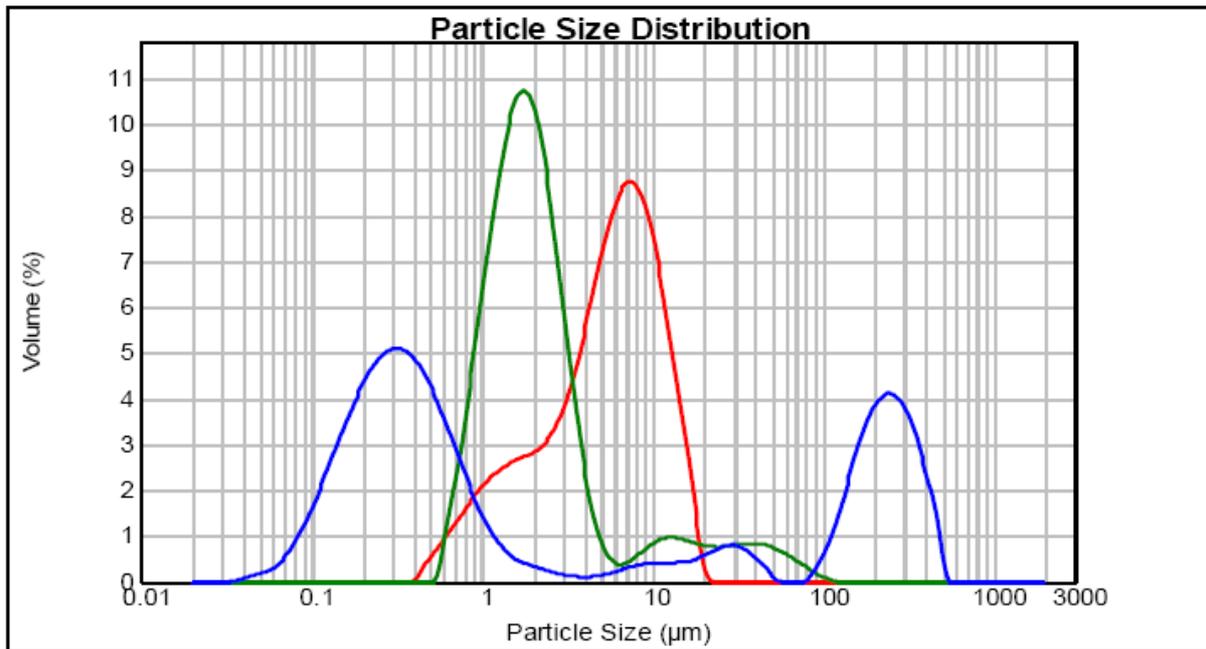
#### C.4.1.2 Vergleich Emulsion Evaporation und Sprühtrocknung

Für den direkten Vergleich beider Verfahren wird eine Formulierung ausgewählt, die in der Sprühtrocknung gute Handhabung zeigte. Die Zusammensetzung der Partikel ist Tabelle 37 zu entnehmen.

**Tabelle 37 Zusammensetzung der Formulierung zum Vergleich von Emulsion Evaporation und Sprühtrocknung**

Substanz	Menge [%]
Eudragit® RS	9 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Flumethrin	17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Diese Formulierung wird sowohl im Sprühtrocknungs- (ST) als auch im Emulsion Evaporation (EE) Verfahren getestet. Zudem wird im Emulsion Evaporation Verfahren nochmals der Einfluss des Microfluidizer getestet.

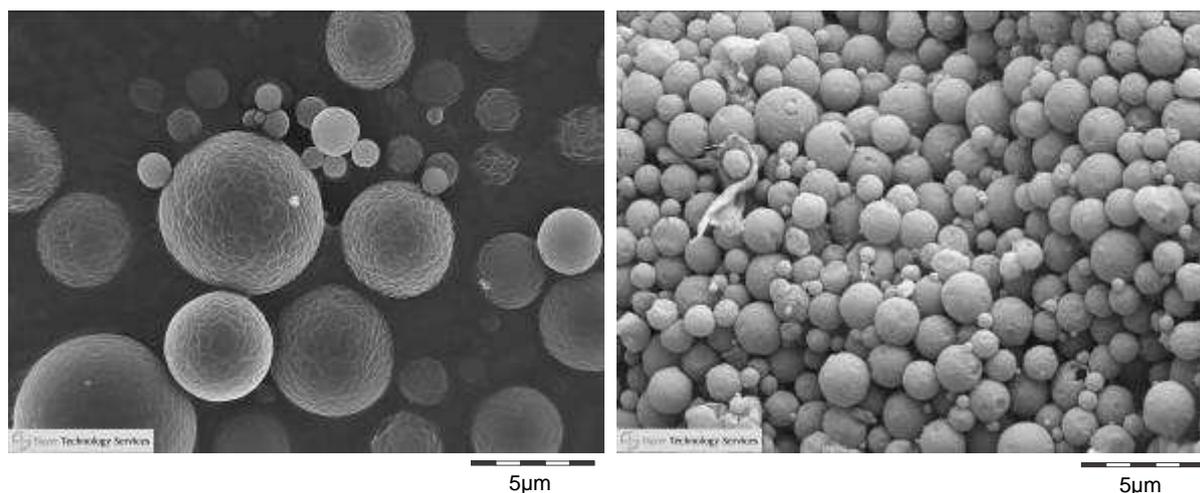


**Abb. 63** Partikelgröße einer Formulierung mit MF und ST (rot), mit MF und EE (blau) und ohne MF und EE (grün)

In Abb. 63 ist die Partikelgrößenverteilung einer Formulierung, die verschieden bearbeitet wird, zu sehen. Dass der Einsatz des Microfluidizer die Partikelgröße senkt, wird zum Teil bestätigt (Vergleich des blauen und grünen Graphen), jedoch ist erkennbar, dass durch den zusätzlichen Homogenisierungsschritt eine bimodale Verteilung aufgetreten ist (blau). So sind sehr kleine Partikel vorhanden ( $< 1 \mu\text{m}$ ), aber auch sehr große Agglomerate werden in der Laserdiffraktometrie sichtbar ( $> 100 \mu\text{m}$ ).

Beim Vergleich der beiden Herstellungsverfahren zeigt sich, dass die Größenverteilung, die beim Emulsion Evaporation Verfahren ohne Microfluidizer erhalten wird (grün), die besseren Ergebnisse zeigt. Beim Sprühtrocknungsverfahren sind die erhaltenen Partikel größer (rot) und beim Emulsion Evaporation Verfahren mit Microfluidizer wird eine bimodale Verteilung erhalten (blau). Trotz einiger größerer Partikel im Emulsion Evaporation Verfahren, bleibt dies das bevorzugte Verfahren für diese Formulierung.

Für einen weiteren Vergleich werden REM-Aufnahmen der Partikel gemacht, die nach dem Sprühtrocknungsverfahren hergestellt werden und der Partikel, die ohne zusätzlichen Homogenisierungsschritt mittels Microfluidizer und Emulsion Evaporation Verfahren erhalten werden. Diese werden gewählt, da sie in ihrer Partikelgrößenverteilung in einem ähnlichen Bereich liegen, obgleich die Größenverteilung noch nicht optimal ausfällt. Die Formulierungen sind in Abb. 64 abgebildet.



a)

b)

**Abb. 64 REM-Aufnahme der Eudragit® RS – Partikel a) Produkt der Sprühtrocknung; b) Partikel des Emulsion Evaporation Verfahrens**

Die Partikel des Emulsion Evaporation Verfahrens scheinen insgesamt kleiner und homogener. Auch ist hier nicht diese raue Oberfläche zu sehen, wie sie für sprühgetrocknete Eudragit® RS-Partikel charakteristisch ist. Obwohl kein zusätzlicher Waschschriff vollzogen wurde, sind keine Eduktüberreste zu sehen. Dies macht Sinn, da die Formulierung keine wasserlöslichen Bestandteile enthält. Sämtliches Edukt muss sich demnach in der organischen Phase befinden, welche fein in der wässrigen Phase dispergiert ist. Wird die organische Phase verdampft, fallen die vorher gelösten Bestandteile in sphärischer Form wieder aus.

Eine weitere Optimierung, der Einsatz des Microfluidizer im Emulsion Evaporation Verfahren, bringt nicht das erhoffte Ergebnis (siehe Abb. 63). Ein feines Austarieren der einzelnen Parameter ist nötig, um Partikel im Größenbereich bis max. 2 µm zu erhalten. Weitere Optimierungen werden jedoch an dieser Stelle nicht durchgeführt.

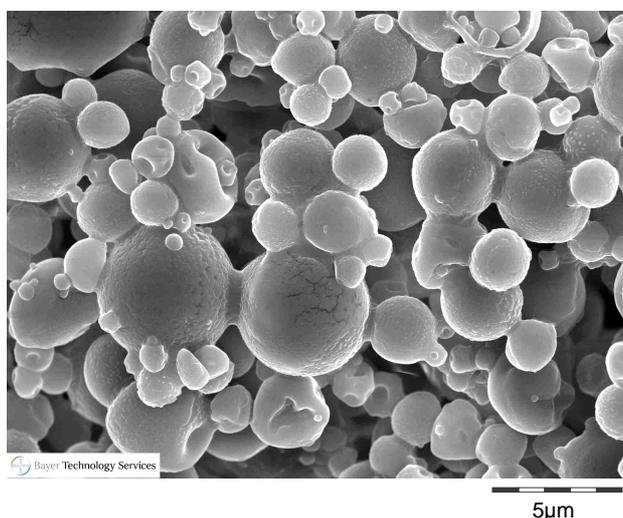
#### **C.4.2 Chitosan**

Chitosan quillt in Wasser, löst sich aber erst bei einem sauren pH auf. Sowohl der Quellungsschritt, als auch der Lösevorgang kann umgangen werden, wenn das Polymer nachträglich quervernetzt wird. [42] In der vorliegenden Arbeit wird keine Quervernetzung vorgenommen. Das Sprühtrocknungsverfahren soll bei dieser Formulierung zur Anwendung kommen. Um Chitosan in Lösung zu bringen, wird die wässrige Phase mit Essigsäureanhydrid auf einen pH-Wert von 4,2 gebracht. Flumethrin wird in Dichlormethan gelöst. Die Einsatzmengen sind Tabelle 38 zu entnehmen.

**Tabelle 38 Zusammensetzung der Flumethrin beladenen Chitosanpartikel**

Substanz	Menge [%]
Chitosan	3 % (m/m bezogen auf die organische Phase)
Flumethrin	9 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)

Die erhaltene Emulsion zeigt sehr kleine aber auch sehr große Emulsionstropfen. Eine Homogenisierung soll durch den Microfluidizer erreicht werden. Eine Optimierung kann nur teilweise erzielt werden. Die Größenverteilung ist wesentlich homogener, jedoch sind die Emulsionstropfen mit ~ 7 µm Durchmesser immer noch groß. Die so präparierte Emulsion wird anschließend in der Sprühtrocknungsanlage versprüht. Das erhaltene Produkt ist von leicht gelber Farbe, fein, klebt aber auch leicht. Der Versuch muss vorzeitig abgebrochen werden, da die Zweistoffdüse verstopft.

**Abb. 65 REM-Aufnahme von Chitosan Partikeln**

In Abb. 65 sind Chitosanpartikel zu sehen, die in ihrer Größe inhomogen sind und scheinbar Verklebungen aufweisen. Nicht alle Partikel sind sphärisch, auch eingedellte Strukturen sind sichtbar. Die so erhaltenen Partikel quellen in Wasser und sind für die hier gesuchte Anwendung nicht geeignet. Die bereits erwähnte Quervernetzung der Chitosan Strukturen sollte eine Quellung verhindern können.

Quervernetzte Chitosan Partikel werden nicht selbst hergestellt, liegen jedoch für weitere Versuche vor. Die Vernetzung wird mit Glutardialdehyd durchgeführt, das an die freien NH<sub>2</sub>-Gruppen des Chitosans bindet. [34; 35] Diese Amin-Gruppen stehen dann nicht mehr für eine Kopplungsreaktion für den Antikörper zur Verfügung. Es muss also gewährleistet sein, dass das Chitosanpartikel so stark quervernetzt ist, dass es weder quillt noch sich löst, und so wenig vernetzt ist, dass genügend Amin-Gruppen zur Verfügung stehen, damit eine Kopplungsreaktion durchgeführt werden kann. Es zeigt sich jedoch, dass auch die am

stärksten quervernetzten Partikel noch in Wasser quellen. Somit scheint ein Einsatz von Chitosanpartikeln als nicht praktikabel. Weitere Versuche mit Chitosan werden nicht unternommen.

### **C.4.3 Zusammenfassung Sonstige Polymere**

Eudragit® RS ist für eine Verarbeitung sowohl in der Sprühtrocknung als auch im Emulsion Evaporation Verfahren geeignet. Die erhaltenen Partikel sind in ihrer Größe noch suboptimal, jedoch besteht Optimierungspotenzial. Wichtig wird auch, das Freisetzungsverhalten dieser Partikel zu prüfen.

Chitosan ist für die gesuchten Eigenschaften nicht modifizierbar.

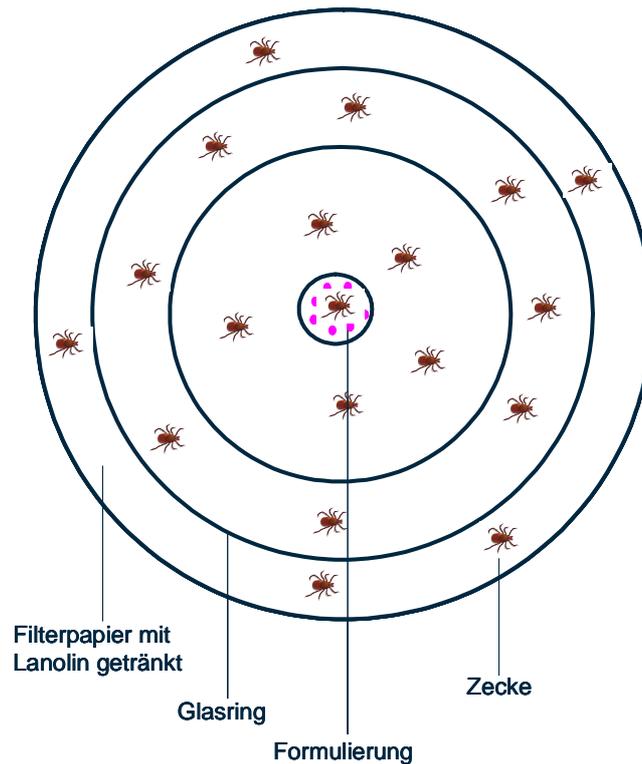
## C.5 Zecken-Filter-Versuche

Die ersten Zecken-Filter-Versuche sind nicht für einen Vergleich mit der Freisetzung auf dem Hundefell geeignet. Der Versuchsablauf ist wie folgt: Es werden einmal 500 ppm und einmal 1000 ppm Wirkstoff in Form einer wässrigen Partikelsuspension auf ein trockenes Filterpapier, Durchmesser 47 mm, aufgetragen. In erst wöchentlichen dann monatlichen Abständen werden je fünf Zecken auf das Filterpapier gesetzt. Selbst nach vier Monaten ist kein Wirkungsverlust erkennbar. Eine 100 %ige Wirkung konnte jedes Mal erzielt werden. Dieser Versuchsaufbau lässt Unterschiede in der Wirkdauer und –schnelligkeit kaum erkennen. Zudem kann nicht definiert werden, ob die Zecken mit den Partikeln in Kontakt kommen müssen, um eine tödliche Dosis zu erhalten oder ob der aus den Partikeln in die Umgebung diffundierte Wirkstoff für eine tödliche Wirkung ausreichend ist.

Die modifizierten Zecken-Filter-Versuche sollen dem besseren Verständnis der Freisetzung des Wirkstoffs aus den Partikeln dienen. Zudem kann hier ein besserer Vergleich zum Freisetzungsmedium Hund hergestellt werden. Die Freisetzung auf dem Hund wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, die in ihrer Komplexität in In vitro Versuchen schwer nachzustellen sind. Zum einen findet die Freisetzung bei erhöhter Temperatur, die die Raumtemperatur übersteigt, aber nicht die Körpertemperatur erreicht, statt. Die Werte hängen von den äußeren Bedingungen und von der Nähe des an das Haar gebundenen Partikels zur Hundehaut ab. Zum anderen ist das Freisetzungsmedium schwer definierbar. Es ist ölig und wird durch die natürliche Sebumschicht des Hundes gebildet. Die Zusammensetzung dieses Sebums ist abhängig von Rasse und Haltungsbedingungen des Hundes. Zudem ist der Hund ständig in Bewegung, ebenso wie das Fell. Auch die Sebumschicht unterliegt einem Fließvorgang, da sie ständig neu gebildet wird und sich gleichmäßig über das Fell verteilt.

Die Filterversuche sollen zeigen, inwieweit der Wirkstoff aus den Partikeln hindurchdiffundiert und sich mit Hilfe der Sebumschicht über das Hundefell verteilt. Dies hat den Vorteil, dass der Parasit nicht direkt mit dem Partikel in Kontakt kommen muss, um eine tödliche Dosis des Wirkstoffs zu erhalten. Nachteilig ist jedoch, dass das Partikel durch die gute Fettlöslichkeit des Wirkstoffs ausbluten und so schneller seine Wirksamkeit verlieren kann. Diese unter realen Bedingungen stattfindenden Vorgänge sind schwer unter definierten Bedingungen nachzustellen.

Die Filterversuche sind wie in Abb. 66 gezeigt aufgebaut. Dabei befindet sich das Filterpapier, auf einen Durchmesser von 145 mm zugeschnitten, in einer Petrischale ( $\varnothing = 150$  mm). Die aufgesetzten Glasringe besitzen einen Innendurchmesser von ca. 2, 7,5, 11 und 13,5 cm.



**Abb. 66** Schematische Darstellung der Zecken-Filter-Versuche

Das Filterpapier wird mit einer Dichlormethan–Lanolin–Mischung getränkt und anschließend getrocknet. Dabei ist darauf zu achten, dass das Filterpapier gleichmäßig durchtränkt ist und sich kein überschüssiges Lanolin ansammelt. Die Formulierung wird in der Mitte des Filterpapiers aufgetragen. Von hier aus soll der Wirkstoff nach außen diffundieren. Um verschiedene Formulierungen miteinander vergleichen zu können, richtet sich die Menge an aufgetragener Probe nach dem Flumethringehalt. Jedes Filterpapier soll mit der gleichen Menge Wirkstoff bestückt werden. In konzentrischen Kreisen um die Auftragung der Probe werden Glasringe aufgestellt, die das Filterpapier in einzelne Segmente unterteilt. Die Segmente werden mit Zecken bestückt, wobei der innerste Ring wegen seiner geringen Größe nur fünf Zecken enthält, die anderen Ringsegmente enthalten jeweils zehn Zecken. Die Wirkstoffdiffusion wird durch das Verhalten der Zecken auf dem Filterpapier angezeigt. Ist eine genügende Menge Wirkstoff vorhanden, sterben die Zecken oder werden zumindest in ihren motorischen Fähigkeiten sichtbar eingeschränkt. Eine Kontrolle der Probe findet nach 24 und 48 h statt. Ausgezählt werden tote, lebende und in ihrer Motorik stark eingeschränkte (Knock Down) Zecken. Bei der Auswertung werden die motorisch eingeschränkten Zecken mit den toten gleichgesetzt. Dies ist möglich, da diese Zecken nicht mehr in der Lage sind, sich in ihrem Wirt zu verbeißen. Dadurch sind sie ungefährlich und können als positiven Therapieerfolg gezählt werden.

Im ersten Versuch dieser Art werden erst 62 Tage nach Auftragen der Formulierung Zecken auf das Filterpapier gesetzt. Die Lagerung der Filterpapiere fand bei Raumtemperatur statt.

Eine Auszählung der Zecken findet hier nach 24, 48 und 72 h statt. Folgende Ergebnisse konnten so ermittelt werden (Tabelle 39).

**Tabelle 39 Ergebnisse des Zecken-Filter-Versuchs**

<b>7c-6+7_EE Polystyrol 18 % Flu</b>		<b>Mortalität [%]</b>	<b>12-1-1 PMMA 15 % Flu</b>		<b>Mortalität [%]</b>
<b>24 h</b>	Ring 1	100	<b>24 h</b>	Ring 1	100
	Ring 2	0		Ring 2	0
	Ring 3	0		Ring 3	0
	Ring 4	0		Ring 4	0
<b>48 h</b>	Ring 1	100	<b>48 h</b>	Ring 1	100
	Ring 2	60		Ring 2	10
	Ring 3	40		Ring 3	0
	Ring 4	0		Ring 4	0
<b>72 h</b>	Ring 1	100	<b>72 h</b>	Ring 1	100
	Ring 2	80		Ring 2	50
	Ring 3	40		Ring 3	0
	Ring 4	0		Ring 4	0

**Tabelle 40 Kontrollversuch, Filterpapier ohne Wirkstoffformulierung**

<b>Kontrolle</b>		<b>Mortalität [%]</b>			<b>Mortalität [%]</b>			<b>Mortalität [%]</b>
<b>24 h</b>	Ring 1	0	<b>48 h</b>	Ring 1	0	<b>72h</b>	Ring 1	0
	Ring 2	0		Ring 2	10		Ring 2	10
	Ring 3	0		Ring 3	0		Ring 3	0

Im ersten Zecken-Filter-Versuch werden eine Polystyrol- und eine PMMA- Formulierung, die im Emulsion Evaporation Verfahren hergestellt werden, untersucht. Aufgetragen werden ~ 2 mg Flumethrin je Formulierung. Tabelle 40 zeigt den Kontrollversuch, in dem die Zecken ohne Formulierung, lediglich auf das Lanolin getränkte Filterpapier gesetzt werden. Aufgrund dessen, dass die Zecken im Kontrollversuch überleben, kann das Ergebnis der Verumgruppen auf die Wirkung der Formulierung zurückgeführt werden. Die prompte Wirksamkeit im innersten Ring zeigt deutlich, dass der Wirkstoff aus den Partikeln diffundiert. Die Tatsache, dass eine abnehmende Wirksamkeit von Ring 1 über 2 und 3 bis Ring 4 (keine Wirkung) zu beobachten ist, setzt eine Verteilung und Diffusion des Wirkstoffs in das Lanolin getränkte Filterpapier voraus. Bei Betrachtung der Daten wird deutlich, dass die

Polystyrolformulierung eine bessere Wirksamkeit aufweist. Während hier im Ring 2 die Wirksamkeit auf 80 % und in Ring 3 auf 40 % ansteigt, so ist bei der PMMA-Formulierung lediglich eine letale Dosis bis Ring 2 zu finden. 50 % der Zecken sterben hier, während in Ring 3 keine Wirkung sichtbar ist. Nach 72 h werden die Zecken vom Filterpapier entfernt. Für den Nachweis, dass erneut Flumethrin aus den Partikeln in das Filterpapier diffundiert ist, werden nach 39 Tagen wieder Zecken auf die bereits getesteten Filterpapiere gesetzt. Jedoch kann dieses Mal keine Wirkung erzielt werden. Lediglich die Zecken im innersten Ring sterben. Grund für die ausbleibende Wirkung, kann eine ungenügende Diffusion in das Filterpapier sein, dadurch ist der Flumethringehalt auf dem Filter für eine letale Dosis zu gering. Auch ist es möglich, dass nicht mehr genügend Wirkstoff in den Partikeln vorhanden ist und der Wirkungsverlust so erklärt werden kann.

Ein erneuter Versuch soll zeigen, wie und ob sich die Wirksamkeit über die Zeit ändert. Dazu werden Polystyrolproben mit 10,9 % und 18,8 % Flumethrin eingesetzt. Es wird die Menge an Partikeln auf das Filterpapier aufgetragen, die einer Flumethrinmenge von 5 mg entspricht. Auch wenn die aufgetragene Menge Flumethrin gleich ist, so wird doch in Freisetzungsversuchen gezeigt, dass Polystyrolpartikel mit einem höheren Wirkstoffgehalt schneller freisetzen (vgl. C.2.1.1.3). Es ist also zu erwarten, dass Wirkungsunterschiede sichtbar werden. Da die aufgetragene Menge nicht unerheblich ist, wenn die Größe des inneren Ringes betrachtet wird, und Formulierungsreste in Ring 2 zu einem verfälschten Ergebnis führen, wird die Formulierung mit zusätzlichem Lanolin fixiert.

45 Stunden nach Auftrag der Formulierung werden die ersten Zecken auf das Filterpapier gesetzt. Eine Auszählung der Tiere findet nach 24 und 48 h statt. Danach werden die Zecken vom Filter entfernt. In einem Rhythmus von 14 Tagen werden nun Zecken auf die Filterpapiere gesetzt. Stellt sich dieser Zeitplan als nicht sinnvoll heraus wird dieser bei Bedarf geändert und Zeiträume verkürzt oder verlängert. Wobei letzteres wahrscheinlicher ist, da diffusive Vorgänge eine gewisse Zeit benötigen. An den Tagen, an denen der Versuch ruht, werden die Filter im Trockenschrank bei 30 °C aufbewahrt. Dies soll die Temperatur, die auf dem Hundefell vorherrscht, imitieren und die Diffusion unterstützen. Bei Versuchsbeginn kann davon ausgegangen werden, dass nicht in allen Ringen eine Wirkung zu sehen ist. Daher werden auch nicht alle Ringe mit Zecken bestückt. Fehlende Werte in den Tabellen deuten auf einen nicht besetzten Ring hin. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind Tabelle 41 zu entnehmen.

Tabelle 41 Ergebnisse des Zecken-Filter-Versuchs, Zugabe der Zecken 45 h, 2 und 4 Wochen nach Auftrag der Formulierung

<b>7a-7+8_EE</b> <b>10,9 %</b> <b>Flumethrin</b>		<b>Mortalität</b> <b>[%]</b>	<b>7c-8_EE</b> <b>18,8 %</b> <b>Flumethrin</b>		<b>Mortalität</b> <b>[%]</b>
<b>45 Stunden</b>			<b>45 Stunden</b>		
24 h	Ring 1	100	24 h	Ring 1	100
	Ring 2	0		Ring 2	0
	Ring 3	--		Ring 3	--
48 h	Ring 1	100	48 h	Ring 1	100
	Ring 2	0		Ring 2	0
	Ring 3	--		Ring 3	--
<b>2 Wochen</b>			<b>2 Wochen</b>		
24 h	Ring 1	100	24 h	Ring 1	100
	Ring 2	0		Ring 2	10
	Ring 3	0		Ring 3	0
48 h	Ring 1	100	48 h	Ring 1	100
	Ring 2	0		Ring 2	20
	Ring 3	10		Ring 3	0
<b>4 Wochen</b>			<b>4 Wochen</b>		
24 h	Ring 1	100	24 h	Ring 1	100
	Ring 2	0		Ring 2	10
	Ring 3	10		Ring 3	0
48 h	Ring 1	100	48 h	Ring 1	100
	Ring 2	20		Ring 2	30
	Ring 3	0		Ring 3	0

Wie bereits erwartet, zeigt Tabelle 41, dass bei einem Auftrag der Zecken nach 45 Stunden keine große Wirkung erreicht wird. Lediglich die Zecken, die direkt mit der Formulierung in Kontakt kommen, sterben. Ansonsten ist keine Wirkung erkennbar. Ring 3 wird nicht mit Zecken besetzt.

Bei den 2-Wochen Werten ist eine erste Wirkung, die auf die Diffusion zurückgeführt werden kann, sichtbar. Dabei ist, wie vermutet, die Formulierung mit dem höheren Wirkstoffgehalt wirksamer. Auch wenn nur eine Wirksamkeit von 20 % in Ring 2 erreicht wird, so wird doch deutlich, dass eine Diffusion stattgefunden hat. Die Mortalität von 10 % in Ring 3 nach 48 h

bei der Formulierung 7a-7+8\_EE, wobei in Ring 2 keine Wirkung zu sehen ist, deutet auf ein Messartefakt hin. Eine Wirkung des diffundierten Flumethrins kann hier nicht erwartet werden.

Nach 4 Wochen zeigt sich bei der Probe 7c-8\_EE eine leicht verbesserte Wirkung in Ring 2 nach 48 h mit einer Mortalität von 30 %. Bei 7a-7+8\_EE ist auch eine Wirkung in Ring 2 nach 48 h erkennbar, die bei 20 % liegt. Eine Wirkung in Ring 3 bei 24 h, die bei 48 h nicht wieder bestätigt wird, ist nicht möglich (siehe Probe 7a-7+8\_EE). Dies kann mit einer falschen Auszählung erklärt werden. Die beim Auftrag auf das Filterpapier recht agilen Zecken verfallen in eine Art Ruhephase. Zur Auszählung wird das Filterpapier auf eine Wärmeplatte gesetzt. So erhalten die Zecken das Gefühl, dass ein Wirt in ihrer Nähe ist, dessen Körpertemperatur sie spüren. Die ruhenden Zecken werden so wieder agil. Die Wärmeplatte muss vorsichtig bedient werden, um einerseits die Bewegungsfreude der Zecken anzuregen, aber andererseits die Zecken nicht durch übermäßige Wärme zu schädigen. So ist es möglich, dass eine lebende Zecke durch ungenügende Wärmezufuhr in ihrem Ruhezustand verbleibt und als tot identifiziert wird.

Für die Aussagekraft der durchgeführten Versuche ist eine Kontrollgruppe unerlässlich.

**Tabelle 42 Kontrollgruppe der Zecken-Filter-Versuche, Ring 1 fünf Zecken, Ring 2 zehn Zecken**

Kontrolle								
45 h		Mortalität [%]	2 Wochen		Mortalität [%]	4 Wochen		Mortalität [%]
24 h	Ring 1	60	24 h	Ring 1	0	24 h	Ring 1	0
	Ring 2	0		Ring 2	0		Ring 2	0
48 h	Ring 1	80	48 h	Ring 1	20	48 h	Ring 1	0
	Ring 2	10		Ring 2	0		Ring 2	0

Die erhaltenen Werte für die Kontrollgruppe fallen in Ring 1 sehr schlecht aus. Dies ist damit zu erklären, dass Ring 1 eine zusätzliche Menge an Lanolin erhält, wie auch die Verumgruppen zur Fixierung der Formulierung. Dieser Zusatz ist im Falle der Kontrollgruppe jedoch so groß ausgefallen, dass die Zecken in der Lanolinschicht kleben und wahrscheinlich ersticken. Für den 2-Wochen Wert wird der große Überschuss Lanolin entfernt, sodass das noch vorhandene Lanolin der Menge entspricht, die auch zusätzlich auf den Filterpapieren der Verumgruppen zu finden ist.

Dieses Versuchsmodell entstand in Anlehnung an Filterversuche, wie sie für die Spot ons Verwendung finden. [14] Ein Einsatz der bereits verwendeten Versuche ist für die Partikelformulierungen nicht möglich. Die modifizierten Filterversuche stehen noch am Anfang und bedürfen einer Optimierung. So wird in diesem Fall der Wirkstoff lediglich durch

das Sterben der Zecken angezeigt. In der späteren Anwendung wird der Hund am gesamten Körper mit der Partikelsuspension behandelt. Diffusive Vorgänge sind auch hier von Bedeutung. Diese werden jedoch durch die Bewegung des Hundes, die Neubildung der Sebenschicht und der erhöhten Temperatur weiter begünstigt. Möglicherweise sind die hier gewählten Diffusionsstrecken zu weit gewählt. Auch muss beachtet werden, dass Zecken den diffundierten Wirkstoff abgreifen, der so weiteren Diffusionsvorgängen nicht mehr zur Verfügung steht. So ist es auch denkbar, das Filterpapiersystem nach einer Inkubationszeit, in der sich diffusive Vorgänge ausbilden können, analytisch zu untersuchen. Ob und wie sich dieses Versuchsmodell für die Charakterisierung der Partikelformulierung eignet, müssen weitere Versuche und Analysen zeigen.

## C.6 Tierversuch In vivo

Zur praktischen Überprüfung der im Labor erarbeiteten Formulierungen werden zwei Partikelchargen im Tierversuch getestet. Hierzu stehen für jede Formulierung und für eine Kontrollgruppe je drei Hunde der Rasse Beagle zur Verfügung. Getestet werden die Mikropartikel in einer Spray-Formulierung, die auf den Hund gesprüht wird.

Für die Spot on Formulierung wird angenommen, dass 1 mg Wirkstoff pro Kilogramm Hund nötig ist, um eine Wirkdauer von vier Wochen zu erreichen. Dieser Wert beruht auf jahrelanger Erfahrung und zahlreichen Studien mit dem Wirkstoff Flumethrin. Eine explizite Studie zur Dosierungsfindung existiert nicht.

Ein Beagle wird mit einem durchschnittlichen Gewicht von 11 kg angegeben. Das bedeutet, dass 11 mg Wirkstoff für eine einmonatige Wirkung benötigt werden. Das gesteckte Ziel für die in dieser Arbeit zu entwickelnde Formulierung liegt bei 3-6 Monaten Wirkdauer. Daher wird in diesem Versuch eine Dosierung von 6 x 11 mg Wirkstoff pro Hund gewählt. Da keinerlei Erfahrungswerte in diese Richtung existieren muss sich im Versuch zeigen, inwieweit diese Dosierung sinnvoll ist. Zudem muss beachtet werden, dass der Wirkstoff Flumethrin bei Hautkontakt in einer zu hohen Konzentration zu schweren Hautläsionen führen kann (siehe B.2.1). Diese Läsionen sind bei der hier eingesetzten Wirkstoffmenge zu erwarten, wenn die Formulierung als Spot on aufgetragen wird. Da hier aber eine Retardierung erzielt werden soll, und der Wirkstoff nicht direkt auf der Haut aufgetragen wird, sollten keine Irritationen der Haut beobachtet werden. Zum Wohle der Hunde wird dieses jedoch in den ersten Stunden nach Auftrag der Versuchsformulierung intensiv überwacht.

Getestet werden zum einen Polystyrolpartikel, deren Oberfläche mit dem Antikörper gekoppelt wurde, zum anderen PMMA-Partikel, die durch ihre kationische Oberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen an das Haar binden sollen. Die Formulierungen sind Tabelle 43 zu entnehmen.

**Tabelle 43 Zusammensetzung der Proben für den Tierversuch**

Probe	Zusammensetzung	Ermittelter Wirkstoffgehalt [%]
PMMA 12-1-1	PMMA 9 % (m/m bezogen auf die organische Phase) Eudragit® RS 17 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)	15,0
7c-6+7_EE	PS 5 % (m/m bezogen auf die organische Phase) MSCP 14 28 % (m/m bezogen auf Polymermasse) Flumethrin 17 % (m/m bezogen auf Feststoffgehalt)	18,05

Über den genauen Wirkstoffgehalt wird die Menge der Partikel errechnet, die auf den Hund aufgetragen werden muss, um 66 mg Flumethrin aufzusprühen. Es muss davon ausgegangen werden, dass ein gewisses Volumen in der Sprühflasche verbleibt. Um eine Dosisverringern durch dieses Totvolumen zu vermeiden, werden 2 ml zusätzlich in die Sprühflaschen gefüllt. Das Applikationsvolumen beträgt 30 ml (additiv 2 ml). Dieses Volumen ist als maximal applizierbare Menge zu sehen, da der Hund sonst zu nass wird und die Versuchsformulierung heruntertropfen könnte. Wird das Volumen minimiert, so steigt die Konzentration der Suspension und damit die Gefahr, dass der Sprühkopf verstopft. Den Versuchsformulierungen werden Fluoreszenzpartikel zugesetzt, die die gleiche Zusammensetzung wie die Verumpartikel haben, es wird lediglich der Wirkstoff gegen einen Fluoreszenzfarbstoff (Uvitex<sup>®</sup> OB) ausgetauscht. Eine Menge von je 100 mg Fluoreszenzpartikeln wird beiden Formulierungen beigemischt. Diese haben keine Wirkung und dienen lediglich einer schnellen und einfachen Visualisierung der Partikel auf dem Fell. So kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops überprüft werden, ob sich noch Partikel auf dem Fell befinden.

### **C.6.1 Versuchsdurchführung**

Neun Hunde der Rasse Beagle, sowohl weiblich als auch männlich stehen zur Verfügung. Die Tiere sind 21-30 Monate alt und wiegen zwischen 8,8 und 15,5 kg. Die Identifizierung findet über die Ohr Tattoo Nummern statt. Die Hunde sind ohne klinischen Befund in einem gesunden Zustand und an die Haltungsbedingungen, wie sie während des Versuchs herrschen, gewöhnt. Kommt es zu unerwarteten Reaktionen auf die Versuchsformulierung oder erkrankt ein Tier aus einem anderen Grund, so wird es aus der Studie herausgenommen. Gehalten werden die Hunde in Einzelkäfigen, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die Hunde werden nach einem gefertigten Schema mit je 25 weiblichen und männlichen Zecken der Gattung *Rhipicephalus sanguineus* (braune Hundezecke) bestückt. Um ein besseres Beißen der Zecken zu gewährleisten, werden die Hunde zu diesem Zweck narkotisiert. Der Zeitplan der Studie ist Tabelle 44 zu entnehmen.

Tabelle 44 Zeitplan des Vorgehens im Tierversuch

Woche	Wochentag	Studientag	Datum	Aktivität
0	Mo	-2	11. Aug 2008	- physische Überprüfung zur Aufnahme - Wiegen der Hunde
	Di	-1	12. Aug 2008	- Infestation mit Zecken
	Mi	0	13. Aug 2008	- Zeckenzählung vor Behandlung - Einteilung der Hunde in Behandlungs- und Kontrollgruppe - Behandlung - klin. Überprüfung (vorher, 2 und 4 h nach Behandlung)
	Do	1	14. Aug 2008	- klin. Überprüfung
	Fr	2	15. Aug 2008	- klin. Überprüfung - Zeckenzählung
1	Mo	5	18. Aug 2008	- Infestation mit Zecken
	Mi	7	20. Aug 2008	- detaillierte generelle Gesundheitsüberwachung - Zeckenzählung
2	Mo	12	25. Aug 2008	- Infestation mit Zecken
	Mi	14	27. Aug 2008	- detaillierte generelle Gesundheitsüberwachung - Zeckenzählung
3	Mi	21	3. Sept 2008	- Infestation mit Zecken
	Fr	23	5. Sept 2008	- detaillierte generelle Gesundheitsüberwachung - Zeckenzählung
6	Mo	40	22. Sept 2008	- Infestation mit Zecken
	Mi	42	24. Sept 2008	- detaillierte generelle Gesundheitsüberwachung - Zeckenzählung
7	Di	48	30. Sept 2008	- Infestation mit Zecken
	Do	50	2. Okt 2008	- detaillierte generelle Gesundheitsüberwachung - Zeckenzählung
9	Mo	61	13. Okt 2008	- Infestation mit Zecken
	Mi	63	15. Okt 2008	- detaillierte generelle Gesundheitsüberwachung - Zeckenzählung
Vorzeitiger Abbruch				

---

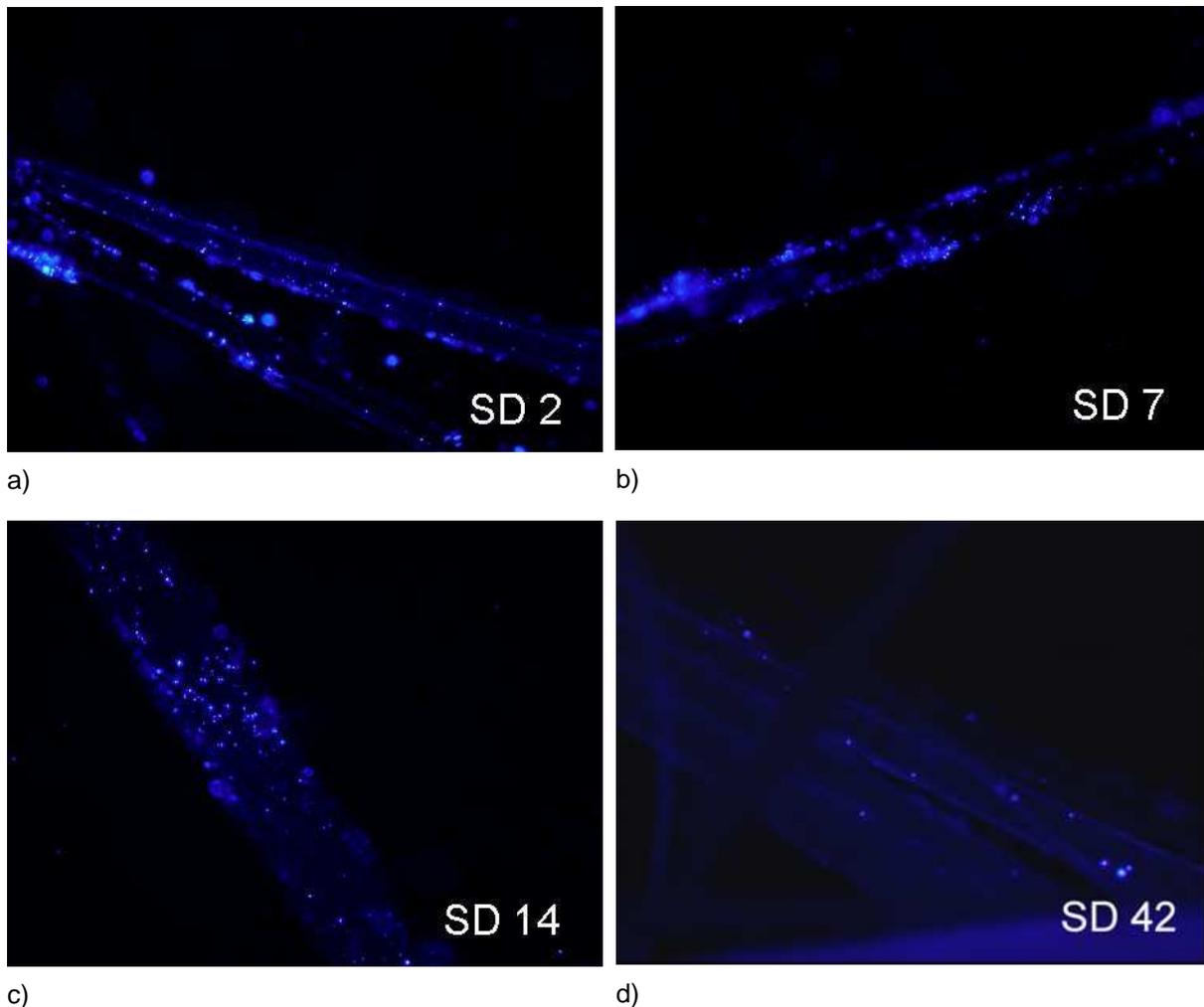
24 h vor Behandlungsbeginn (Studientag = Study Day= SD -1) werden die Zecken auf die Hunde gesetzt. Kurz vor Beginn des Versuchs (SD 0) werden die auf dem Hund verbliebenen Zecken gezählt und notiert. Eine Einteilung der Tiere in Behandlungs- und Kontrollgruppe wird nach der Anzahl der auf den Hunden befindlichen Zecken vorgenommen. Jede Gruppe soll bei Versuchsbeginn ungefähr gleich viele Zecken haben, um möglichst gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Die Hunde in der Behandlungsgruppe werden mit der Versuchsformulierung am gesamten Körper gleichmäßig eingesprüht. Die Kontrollgruppe wird nicht behandelt. Aus Sicherheitsgründen werden die Hunde 2 und 4 h nach der Applikation auf ihren Gesundheitszustand untersucht. Flumethrin ist sehr wirksam, benötigt jedoch eine gewisse Latenzzeit. Daher erfolgt die Auszählung und Entfernung der noch am Hund befindlichen Zecken 48 h nach Auftrag der Formulierung. Wird eine Zecke übersehen, so fällt dies beim nächsten Zeckenzählen auf, da diese Zecke dann mehr Blut gesaugt haben wird als die übrigen. Eine Überprüfung der Wirkung soll bei Woche 0, 1, 2, 6, 10, 14 und 18 erfolgen, bzw. so lange, wie eine Wirkung festzustellen ist. Dieser Versuchsplan musste den aktuellen Ergebnissen angepasst werden und ist nun in Tabelle 44 zu finden. Danach werden die Hunde an SD -1, 5, 12, 21, 40, 48 und 61 mit je 50 Zecken (25 weibliche und 25 männliche) infestiert. Eine Auszählung und Entfernung der Zecken findet an SD 2, 7, 14, 23, 42, 50 und 63 statt. Eine unplanmäßige Infestation mit Zecken findet an SD21 und 48 statt, da an den geplanten Auszählungen (SD 14 und SD 42) so wenige Zecken in der Kontrollgruppe zu finden sind, dass eine aussagekräftige Auswertung nicht möglich ist.

Zu den Tagen SD 2, 7, 14, 42 und 63 werden den Hunden Haarproben entnommen. Dazu werden dem Hund insgesamt ~ 100 mg Haare entfernt. Um eine repräsentative Aussage über den Verbleib von Flumethrinpartikeln auf dem Hund treffen zu können, werden die Fellproben an verschiedenen Körperstellen entnommen. Einzelne Haare werden zum einen mikroskopisch betrachtet. Im Fluoreszenzmikroskop werden die Placebo Partikel sichtbar, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Uvitex<sup>®</sup> OB beladen sind. Zum anderen werden die Fellproben mit Acetonitril überschichtet, sodass das in den Partikeln verbliebene Flumethrin herausgelöst wird und analytisch mittels HPLC bestimmt werden kann (vgl. E.2.4.3).

### **C.6.2 Ergebnisse**

Sowohl die mikroskopischen Aufnahmen als auch die HPLC-Analyse des Fells sollen zusätzliche Informationen zu dem durchgeführten Versuch liefern. Die hauptsächliche Beurteilung der Studie ist mit dem Vorhandensein der Zecken auf dem Hund verbunden. Die Zecken dienen als Indikator für die Wirkung. Mikroskopische Aufnahmen und HPLC-Analyse sorgen für eine zusätzliche Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse. Zwei Formulierungen werden getestet. Zum einen Polystyrolpartikel, die über den spezifischen Antikörper an das

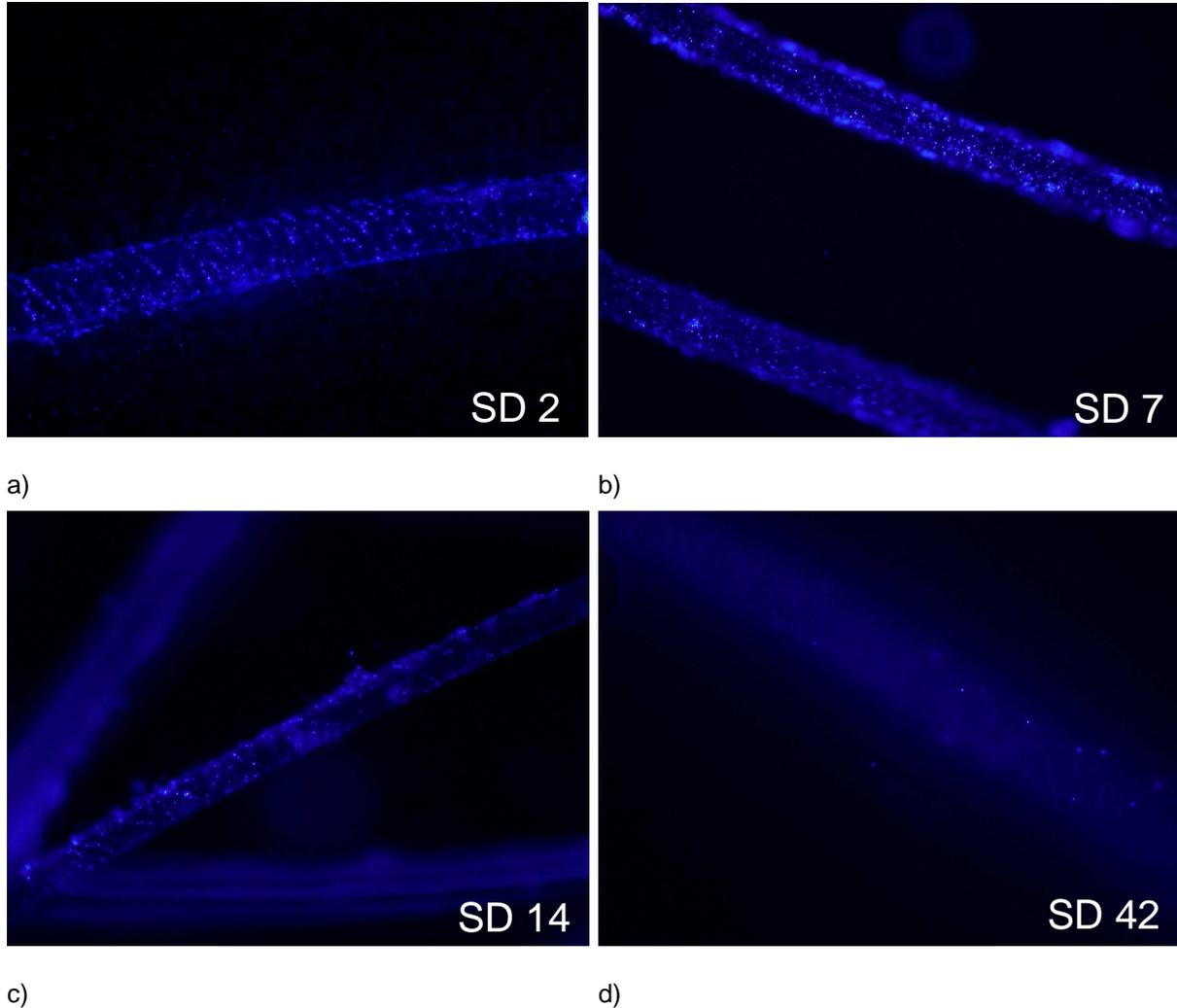
Fell geheftet werden, und zum anderen PMMA Partikel, die über elektrostatische Wechselwirkungen an das Haar haften. Die mikroskopischen Bilder der Polystyrolpartikel sind in Abb. 67 zu sehen.



**Abb. 67** Mikroskopische Aufnahmen der Probe 7c-6+7\_EE auf Hundehaaren an a) SD 2; b) SD 7; c) SD 14; d) SD 42

Abb. 67 zeigt Hundehaare unter dem Fluoreszenzmikroskop mit anhaftenden Mikropartikeln, die über den spezifischen Antikörper angebinden werden. Die Partikelmenge nimmt im Verlauf des Versuchs ab (von a) bis d)). Zu Beginn lassen sich noch viele Fluoreszenzpartikel auf dem Fell finden. Bei SD 42 dagegen sind kaum noch Partikel sichtbar. Eine Aufnahme von SD 63 wird nicht eingefügt, da hier keine Partikel sichtbar werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass diese Aufnahmen nicht das gesamte Partikelkontingent widerspiegeln, sondern lediglich den Teil, der mit Fluoreszenzfarbstoff beladen ist. Es ist davon auszugehen, dass neben den Fluoreszenzpartikeln auch die wirkstoffbeladenen Partikel an Menge abnehmen, und dass die durch den Farbstoff sichtbaren Partikel eine Indikatorfunktion besitzen.

In der zweiten Verumgruppe werden die Partikel nicht über einen Antikörper angebunden, sondern haften durch elektrostatische Wechselwirkungen auf dem Fell. Die Polymermatrix wird von PMMA gebildet, die oberflächenmodifizierende Substanz ist Eudragit® RS. Hier werden ebenfalls Fellproben der Hunde mikroskopisch und analytisch untersucht (Abb. 68).

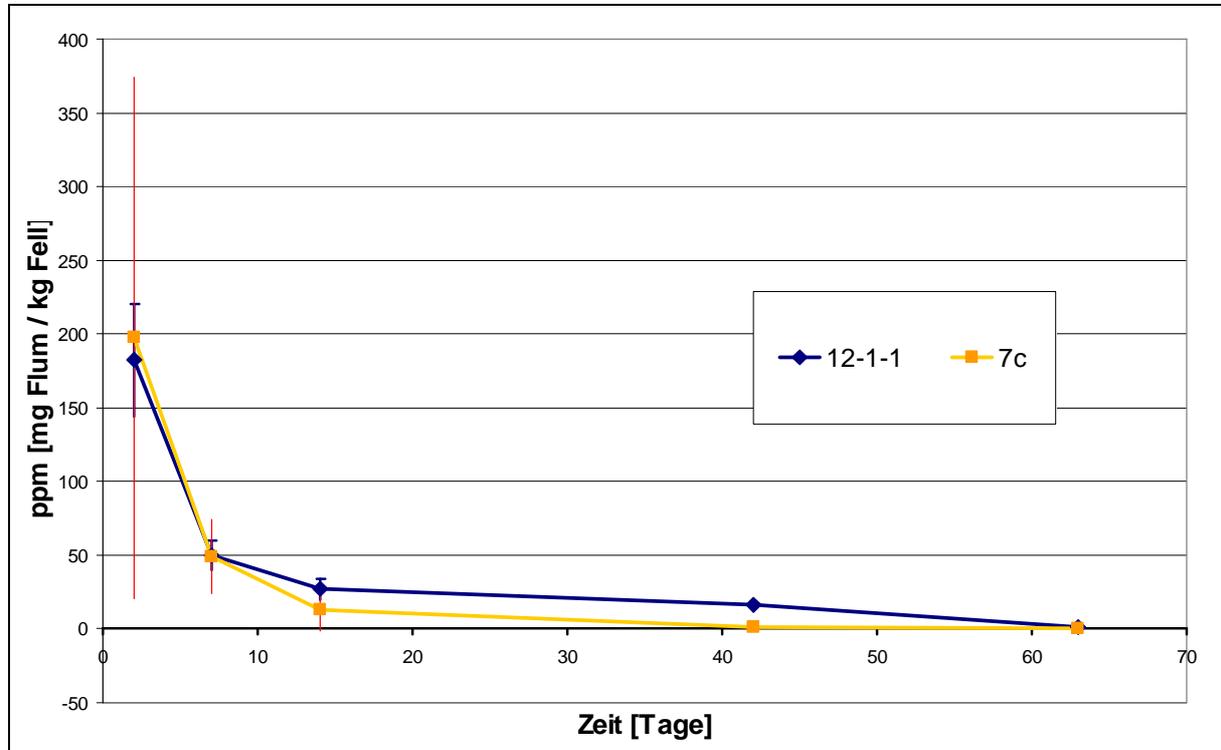


**Abb. 68** Mikroskopische Aufnahmen der Probe 12-1-1 auf Hundehaaren an a) SD 2; b) SD 7; c) SD 14; d) SD 42

Abb. 68 zeigt die Fluoreszenzpartikel auf dem Hundehaar, die über elektrostatische Wechselwirkungen auf dem Fell haften, zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs. Die Aufnahmen machen deutlich, dass im Verlauf des Versuchs die Partikelzahl nachlässt, ebenso wie es auch bei den Partikeln zu beobachten ist, die über den Antikörper angebunden werden. Auch hier gilt wieder, dass die fluoreszierenden Partikel nur eine Indikatorfunktion haben. Die Verumpartikel können bei dieser Darstellungsweise nicht abgebildet werden.

Die mikroskopischen Aufnahmen dienen lediglich einer anschaulichen Darstellungsweise und einer schnellen und einfachen Überprüfung von Partikeln auf dem Haar. Für eine Bewertung der Anhaftung von Partikeln auf dem Fell sind die mikroskopischen Daten nicht

hinreichend. Eine analytische Aufarbeitung der Proben soll hier Aufschluss geben. Dazu werden die Fellproben mit 5 ml Acetonitril überschichtet. Über Nacht wird so der Wirkstoff Flumethrin aus den auf dem Fell verbliebenen Partikeln extrahiert. Ein Teil des Acetonitrils wird filtriert und mittels HPLC-Analyse aufgearbeitet (E.2.4.3). Die erhaltenen Daten sind Abb. 69 zu entnehmen.



**Abb. 69** Änderung des Flumethringehalts auf dem Fell im Verlauf des Versuchs

Abb. 69 zeigt die Veränderung des Flumethringehalts über den Zeitraum des Versuchs. In der Grafik sind auch die Fehlerbalken aufgetragen, die bei SD 2 noch sehr groß sind und dann im Verlauf des Versuchs abnehmen. Dies ist damit zu erklären, dass die Fellproben inhomogen sind. Es wird zwar Fell von verschiedenen Körperteilen des Hundes genommen, um eine möglichst repräsentative Probe zu erhalten, dennoch ist es bei dem ungleichen Verhältnis von Haare zu Flumethrin schwierig, eine 100 mg Probe zu erhalten, die den Flumethringehalt auf dem gesamten Hund widerspiegelt. Eine Verringerung der Abweichungen erklärt sich durch den abnehmenden Wirkstoffgehalt oder durch die Abdiffusion des Wirkstoffs in die Sebumschicht des Hundes, die auf die Verteilung ausgleichend wirkt. Ist nur wenig Wirkstoff vorhanden fallen auch die gemessenen Unterschiede geringer aus. Aufgetragen wird die Zeit gegen die Menge Flumethrin in ppm. Flumethrin ist ein sehr potenter Wirkstoff. In einem Kontakttest, d. h. die Zecken kommen mit dem reinen Wirkstoff in Kontakt, kann gezeigt werden, dass noch 0,0575 ppm zu einer 100 %igen Wirkung bei adulten Zecken führen. [10] Es ist deutlich erkennbar, dass sich der Wirkstoffgehalt von innerhalb nur 5 Tagen halbiert. Schon an SD 14 ist so wenig Flumethrin

vorhanden, dass ein Wirkungsverlust vermutet werden kann. Bei SD 63 erreicht der Wirkstoffgehalt die Detektiergrenze. Während der Wirkstoffgehalt anfangs bei beiden Formulierungen sehr ähnlich ist, so zeigt sich nach SD 7 bei der Probe 7c-6+7\_EE ein größerer Wirkstoffverlust als bei der Probe 12-1-1. Abb. 69 legt die Vermutung nahe, dass die Anbindung über die Antikörper weniger stabil ist, als eine Anbindung über elektrostatische Wechselwirkungen. Dies kann durch die im Versuch ausgezählten Zecken jedoch nicht bestätigt werden. Genaueres müssen jedoch weitere Versuche zu den Anbindungseigenschaften liefern.

Die Analyse des Fells mittels mikroskopischer Aufnahmen und HPLC-Messung dient, wie bereits erwähnt, dem besseren Verständnis der erhaltenen Ergebnisse. Die Hauptauswertung des Versuchs läuft über die auf dem Hund verbliebenen Zecken. Diese werden 48 h nach Infestation, an SD 2, 7, 14, 23, 42, 50 und 63, gezählt und entfernt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 45.

**Tabelle 45 Zeckenauszahlung und Berechnung der Effizienz für die einzelnen Studientage**

Study Group	Dog ID	SD 0	SD 2	SD 7	SD 14	SD 23	SD 42	SD 50	SD 63
<b>7c-6+7_EE Polystyrol 18,05 % Flumethrin</b>	4751	21	0	0	0	1	0	5	1
	1487	20	2	0	0	0	0	3	7
	4707	15	0	0	0	0	1	0	14
	geom. Mittel		0,4	0	0	0,3	0,3	1,9	5,2
	Effizienz		97,2	100	100	97,4	86,2	78,3	56,2
<b>12-1-1 PMMA 15,0 % Flumethrin</b>	4641	20	4	1	0	2	0	1	7
	6520	14	4	3	0	5	4	0	6
	8918	19	6	0	0	2	0	1	17
	geom. Mittel		4,6	1	0	2,8	0,7	0,6	9
	Effizienz		71,2	89,8	100	72,3	62,3	93,2	24,3
<b>Kontroll- gruppe unbehandelt</b>	6231	10	10	2	1	4	5	9	6
	4596	18	25	37	6	14	3	12	27
	4586	20	16	10	0	17	0	6	10
	geom. Mittel		15,9	9,8	1,4	10,1	1,9	8,7	11,9

Tabelle 45 gibt die Anzahl der ausgezählten Zecken an den jeweiligen Studientagen für die einzelnen Hunde (Dog ID = Hunde Identifikationsnummer; die letzten vier Ziffern der

Ohrtätowierung) wider. Das daraus resultierende geometrische Mittel (Gl. 14) und die Effizienz (Gl. 15) ergeben sich aus der Zeckenzahl wie folgt:

$$\bar{x}_{geom} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot \dots \cdot x_n} \quad (\text{Gl. 14})$$

$$\text{Effizienz\%} = \frac{N_2 - N_1}{N_2 \cdot 100} \quad (\text{Gl. 15})$$

*N1*      Geometrisches Mittel der Zeckenzählung der Verumgruppe  
*N2*      Geometrisches Mittel der Zeckenzählung der Kontrollgruppe

SD 0 ist der Tag an dem die Hunde mit der Partikelformulierung eingesprüht werden. An SD 2 werden die noch auf dem Hund befindlichen Zecken ausgezählt. Im weiteren Verlauf des Versuchs kommt es zu weiteren Infestationen der Hunde mit Zecken und einer Auszählung dieser nach 48 h. Ein erneutes Einsprühen der Hunde mit der Versuchsformulierung erfolgt nicht. Die Wirkdauer soll untersucht werden. SD 14 und SD 42 sind in der Tabelle hellgrau hinterlegt, da die Daten dieser Studientage nicht auszuwerten sind. Aufgrund der geringen Zeckenzahl in der Kontrollgruppe kann die Wirkung der Verumgruppe nicht ausreichend beurteilt werden. Zusätzliche Infestationen erfolgen daher an SD 48 und SD 61. Die Effizienz ist in Tabelle 45 grau hinterlegt. Die Wirksamkeit bei der Gruppe 7c ist gleichbleibend gut bei ca. 100 %, bis zum Studientag SD 50, wo eine erste merkliche Minimierung der Wirkung sichtbar wird. Diese sinkt bei SD 63 auf nur noch 56,2 %. Dies ist für eine ausreichende Wirkung zu gering. Ein weiterer Wirkungsverlust ist zu erwarten. Die Gruppe 12-1-1 startet nicht so erfolgreich in den Versuch. Die Effizienz liegt hier lediglich zwischen 70 und 90 %, obwohl bei der analytischen Aufarbeitung der Fellproben bei 12-1-1 ein höherer Flumethringehalt festgestellt werden kann als bei 7c-6+7\_EE. Der Wert von 93,2 % bei SD 50 scheint erstaunlich hoch. Bei SD 63 kann dann auch nur eine Wirksamkeit von 24,3 % verzeichnet werden.

Die abnehmende Effizienz lässt eine Weiterführung des Versuchs als nicht sinnvoll erscheinen. Die Studie wird an SD 63 aufgrund des Wirkungsverlustes der Versuchsformulierungen abgebrochen.

Die durchgeführten HPLC-Analysen bestätigen die beobachteten Ergebnisse. Bei SD 63 erreicht die noch vorhandene Wirkstoffmenge die Nachweisgrenze. Eine noch für Zecken letale Dosis lässt sich hier nicht erwarten. Unstimmig scheint die Tatsache, dass bei der Gruppe 12-1-1 eine höhere Flumethrinmenge im Fell gefunden werden kann, jedoch die Effizienz in dieser Gruppe geringer ist.

In diesem Versuch kann zwar keine Wirkung über die gewünschten 3-6 Monate erzielt werden, jedoch ist eine Wirkung über ~ 8 Wochen zu verzeichnen. Dies übersteigt bereits die Wirkdauer der Spot on Formulierungen. Eine Retardierung ist somit gelungen. Als

ebenfalls positiv zu bemerken ist die Tatsache, dass keine Hautläsionen bei den Hunden auftreten, obwohl die 6-fache Dosierung verabreicht wird. Dies deutet wiederum auf eine Retardierung der Wirkstofffreigabe hin. Dennoch stellt sich die Frage, warum es zu einem Wirkungsverlust bereits nach 8 Wochen kommt. Eine mögliche Ursache kann die zu rasche Entleerung der Partikel sein. Aufgrund der Sebumschicht des Hundes und der erhöhten Temperatur könnte der sehr lipophile Wirkstoff schneller als erwartet aus den Partikeln diffundiert sein. Dem steht entgegen, dass keine Hautläsionen zu beobachten sind, die entstehen, wenn die Wirkstoffkonzentration zu hoch wird. Auch wäre dann eine bessere Wirkung bei der Gruppe 12-1-1 zu erwarten. Vorteil dieser Formulierungen ist auch, dass der Wirkstoff nicht auf die Haut aufgetragen wird, sondern im Fell des Hundes, welches ebenfalls das Risiko von Hautirritationen senkt. Des Weiteren ist es möglich, dass die Anbindung der Partikel auf dem Haar nicht ausreichend ist und die beladenen Partikel nach kurzer Zeit abfallen und für eine ektoparasitizide Wirkung nicht mehr zur Verfügung stehen. Demnach ist zu vermuten, dass beide Anbindungsmethoden suboptimal sind. Ein weiterer wichtiger Punkt ist der natürliche Fellwechsel der Tiere. Während der Versuchsdauer kann beobachtet werden, dass einige Tiere stark haaren und ihr Fell wechseln. Da die Partikel im Fell haften, gehen diese mit den ausfallenden Haaren verloren. Dies würde sich auf beide Proben gleichermaßen auswirken.

In welchem Maße die wirkungsmindernden Faktoren ins Gewicht fallen, muss weiter geprüft werden. Dazu werden die Bindungs- und Freisetzungseigenschaften weiter untersucht. Zudem ist ein weiterer Tierversuch geplant mit einem größeren Kontingent an Versuchstieren, um eine Aussage größerer Genauigkeit zu erzielen. Es soll jedoch festgehalten werden, dass dieser erste Versuch zeigt, dass die Mikropartikel die gewünschte retardierende Wirkung haben, das System effizient ist. Eine ektoparasitizide Wirkung ist vorhanden und die Hunde vertragen die hohe Dosierung durch die Verkapselungstechnik gut.

## D Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit werden Polymerpartikel mit einem ektoparasitiziden Wirkstoff beladen. Dabei kommen zwei Herstellungsverfahren zum Einsatz. Zum einen das Sprühtrocknungs- und zum anderen das Emulsion Evaporation Verfahren. Die vornehmlich verwendeten Polymere sind Polystyrol und Polymethylmethacrylat (PMMA). Die erhaltenen Partikel sollen topisch angewendet auf dem Hundefell haften. Dies kann zum einen über elektrostatische Wechselwirkungen geschehen, zum anderen über eine Antikörper-Antigen-Bindung. Dabei bindet der verwendete Antikörper spezifisch an bestimmte Strukturen des Hundehaars. Beide Anbindungsmethoden setzen voraus, dass die Oberfläche des Partikels modifiziert ist. Im Falle der elektrostatischen Anbindung wird auf der Partikeloberfläche Eudragit<sup>®</sup> RS verankert, welches durch seine permanent kationische Ladung mit dem negativ geladenen Haar wechselwirken kann. Für eine Anbindung des Antikörpers ist das Vorhandensein von funktionellen Gruppen, wie Carboxylgruppen, notwendig. Dies wird mit Hilfe von Eudragit<sup>®</sup> S oder Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer verwirklicht. Die Größe des Partikels ist von essentieller Bedeutung. Ist das Partikel zu klein, so wird es sich, aufgrund seiner größeren Oberfläche, und der durch die Größe bedingten geringeren enthaltenen Wirkstoffmenge, schneller entladen. Ist das Partikel dagegen zu groß, reichen die Anbindungskräfte nicht mehr aus und das Partikel fällt ab. Zudem sollen die Partikel nicht sichtbar sein. Eine Größe von  $< 2 \mu\text{m}$  wird angestrebt. Durch die Variation verschiedener Formulierungsparameter soll eine Optimierung der Formulierung und der erhaltenen Partikel erzielt werden. Neben der Kombination verschiedener Edukte, steht die mengenmäßig unterschiedliche Zusammensetzung der Formulierungsbestandteile im Vordergrund. Variiert wird der Wirkstoffgehalt, die Menge des eingesetzten Emulgators, das Mengenverhältnis organische Phase zur wässrigen Phase und das Molekulargewicht des Matrixpolymers. Es kann festgestellt werden, dass eine Erhöhung des Wirkstoffgehalts keine Vergrößerung der Partikel mit sich bringt, die Freisetzung jedoch mit dem Wirkstoffgehalt steigt. Durch eine Verringerung des Emulgatoranteils ist ein Anstieg der Partikelgröße zu beobachten. Die Mindestmenge Emulgator, die für die Bildung einer stabilen Emulsion notwendig ist, stellt immer noch einen Überschuss dar. So wird auch bei dieser Formulierung Emulgator im Waschwasser gefunden. Eine Vergrößerung der organischen Phase wirkt sich negativ auf die Partikelgröße aus. Bei der Erhöhung der Menge der organischen Phase wird die prozentuale Zusammensetzung in Bezug auf diese beibehalten. Dies bedeutet, dass die Einwaagen an Polymer, Emulgator und Wirkstoff steigen.

Wird das Molekulargewicht des eingesetzten Polymers variiert, so steigt zum einen die Partikelgröße mit steigendem Molekulargewicht, zum anderen sinkt bei höheren Molekulargewichten die Freisetzungsrates. Es zeigt sich, dass Polystyrol besser im Emulsion

---

Evaporation Verfahren zu verarbeiten ist, PMMA sich dagegen komplikationslos versprühen lässt. Es kann jedoch keine Formulierung mit dem Sprühtrocknungsverfahren entwickelt werden, die die gewünschten Partikelgrößen liefert. Im Emulsion Evaporation Verfahren dagegen wird sowohl eine Formulierung mit Polystyrol als auch mit PMMA entwickelt, die den gegebenen Anforderungen genügt. Diese gehen zur weiteren Testung in einen Tierversuch. Die ausgewählten Partikelproben werden, in wässriger Phase dispergiert, gleichmäßig auf dem Hund der Rasse Beagle appliziert. Zum Nachweis der Wirksamkeit werden die Hunde mit Zecken bestückt. Eine Infestation der Tiere mit Zecken findet nach einem angefertigten Versuchsprotokoll zu angegebenen Zeitpunkten statt. Die Wirksamkeit wird über das Verhältnis der vorhandenen Zecken auf der Verumgruppe und der Kontrollgruppe errechnet. So kann eine Wirkung über einen Zeitraum von acht Wochen nachgewiesen werden. Dies erreicht noch nicht die Vorgabe von 3-6 Monaten, zeigt jedoch eine längere Wirkung als die sog. Spot on Formulierungen, bei denen eine erneute Applikation nach vier Wochen empfohlen wird. [12]

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass das Emulsion Evaporation Verfahren für die Herstellung von Mikropartikeln der hier gestellten Anforderungen geeignet ist. Sowohl eine PMMA- als auch eine Polystyrolformulierung werden soweit optimiert, dass ein Einsatz im Tierversuch möglich ist. Die Aufgabenstellung dieser Arbeit kann somit für diesen Teil erfüllt werden. Die Wirkdauer ist jedoch noch suboptimal. Das gesteckte Ziel von einem Wirkzeitraum über 3-6 Monate wird nicht erreicht. Ursachen hierfür sind nicht eindeutig auszumachen und bedürfen einer genaueren Analyse. Eine Wirkverlängerung der bereits im Handel befindlichen Systeme zeigt jedoch, dass eine Retardierung der Wirkstofffreisetzung erzielt werden kann. Dies stimmt positiv, dass durch ein besseres Verständnis der Vorgänge auf dem Fell eine Optimierung der Wirkdauer möglich ist.

## E Experimenteller Teil

### E.1 Material

#### E.1.1 Chemikalien

**Tabelle 46** Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien mit genauer Bezeichnung und Herkunft

Substanz	Abkürzung/Synonym	Hersteller/Lieferant	Chargenbezeichnung
Aceton	k.A.	Merck	diverse
Acetonitril	ACN	Merck	diverse
Chitosan low molecular weight	k.A.	Aldrich	13604PC
Dichlormethan	Methylenchlorid	Aldrich	diverse
Ethanol absolut	EtOH	Aldrich	diverse
Ethanol 96%	EtOH	Aldrich	diverse
Essigsäureanhydrid	k.A.	Merck	K22720341 636
Essigsäureethylester	Ethylacetat	Aldrich	U 07749-425
Eudragit® E 100	EuE	Röhm GmbH	8360801021
Eudragit® L 100	EuL	Röhm GmbH	1930603501
Eudragit® RS 100	EuRS	Röhm GmbH	08-90374
Eudragit® S 100	EuS	Röhm GmbH	1931005501
Flumethrin	k.A.	Bayer Crop Science	TK 003E210
Imidacloprid	k.A.	Bayer Crop Science	230024420
Lanolin	k.A.	Fluka	1409552
Methanol	MeOH	Riedel-de Haën	92030
Milli-Q®-Wasser	dem. Wasser	Eigenherstellung	diverse
Natriumhydroxid Plätzchen	NaOH	KMF	3A08503
Polymethylmethacrylat 2.000 Da	PMMA 2.000	PSS GmbH	mm2k
Polymethylmethacrylat 12.000 Da	PMMA 12.000	PSS GmbH	mm13k
Polymethylmethacrylat 80.000 Da	PMMA 80.000	PSS GmbH	mm85k

Polymethylmethacrylat 600.000 Da	PMMA 600.000	PSS GmbH	mm650k
Polymethylmethacrylat Terez <sup>®</sup> PMMA 5003	PMMA	Ter Hell Plastics GmbH	k.A.
Polystyrol PS158	PS	BASF	diverse
Polystyrol 110.000 Da	PS 110.000	PSS GmbH	ps120k
Polystyrol 15.000 Da	PS 15.000	PSS GmbH	ps16k
Polystyrol 2.000 Da	PS 2.000	PSS GmbH	ps2k
Polystyrol 500.000 Da	PS 500.000	PSS GmbH	ps560k
Tetrahydrofuran	THF	Aldrich	S41123-457
Salzsäure 1mol/l	HCl	KMF	52340
Styrol- Maleinsäureanhydrid 50/50	MSCP 50	ABCR GmbH & Co. KG	1003630
Styrol- Maleinsäureanhydrid 7%wt.	MSCP 7	Aldrich	05119PC
Styrol- Maleinsäureanhydrid 86/14	MSCP 14	ABCR GmbH & Co. KG	1002508
Trichlormethan	Chloroform	KMF	53260
Tween <sup>®</sup> 20	Polysorbat 20	Fluka	1337618
Uvitex <sup>®</sup> OB	k.A.	Ciba	014759.8S
Wasser	H <sub>2</sub> O, dem. Wasser	k.A.	k.A.

## E.2 Methoden und Geräte

### E.2.1 Herstellungsvorschrift Solvent Evaporation Verfahren

In 160 ml Wasser wird der Emulgator dispergiert. Bei Eudragit<sup>®</sup> L und S, sowie Styrol-Maleinsäureanhydrid 86/14 und 50/50 wird die wässrige Phase mit NaOH Plätzchen auf einen basischen pH-Wert eingestellt (pH ~ 11). Bei Eudragit<sup>®</sup> E wird mit Salzsäure angesäuert, bei Chitosan mit Essigsäureanhydrid (auch Essigsäure ist hier möglich). Eudragit<sup>®</sup> RS und MSCP 93/7 werden in 40 ml der organischen Phase gelöst. In dieser wird erst der Wirkstoff, dann das Polymer und ggf. Eudragit<sup>®</sup> RS oder MSCP 93/7 gelöst. Unter Einsatz des UltraTurrax mit 9500-13500 rpm wird die organische Phase langsam zur wässrigen Phase hinzugegeben. Für eine hinreichende Dispergierung wird zwei Minuten bei gleichbleibender Drehzahl homogenisiert. Die erhaltene Emulsion kann zur Verbesserung der Tröpfchengrößen mit dem Microfluidizer behandelt werden, ansonsten kann das Lösemittel auch direkt nach der Dispergierung der organischen in der Wasserphase abgezogen werden. Dazu wird die Emulsion unter ständigem Rühren mittels Magnetrührer langsam auf maximal 60 °C erhitzt. Kommt es dabei zu einer vermehrten Schaumbildung muss sowohl das Aufheizen als auch das Rühren verlangsamt werden. Das Lösemittel ist nach ca. 30 min. vollständig verdampft, kontrolliert werden sollte der Vorgang jedoch über das Gewicht, um sicher zu stellen, dass sämtliches Lösemittel entwichen ist. Die erhaltene Suspension ist so lagerfähig, kann aber auch direkt dem nächsten Verfahrensschritt der Aufreinigung zugeführt werden.

#### E.2.1.1 Microfluidizer

Der Microfluidizer dient der Homogenisierung und Tröpfchengrößenverkleinerung von Emulsionen. Hierzu wird die Probe mit pulsatilem Druck durch zwei Keramik gefüllte Interaktionskammern gedrückt. Durch den Druck und die Porengröße der Keramikfüllung kommt es zu einer Homogenisierung und gleichzeitigen Verkleinerung der Tröpfchen. Eine Optimierung der Partikelgrößenverteilung kann so erreicht werden.

##### Microfluidizer:

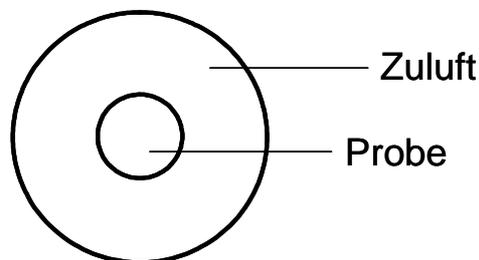
Firma:	Microfluidics
Model:	M-110Y
Interaktionskammern:	Porengröße 200 µm und 100 µm
Druck:	max. 1900 bar (standardmäßig verwendet: 500 bar)

## E.2.2 Herstellungsvorschrift Sprühtrocknungsverfahren

Für das Sprühtrocknungsverfahren gilt die gleiche Vorgehensweise wie beim Solvent Evaporation Verfahren (vgl. E.2.1). Die erhaltene Emulsion wird im Sprühtrockner versprüht. Ein versprühen der Suspension ist auch möglich, jedoch kann hier über die Verfahrensparameter kein Einfluss mehr auf die Partikelbildung genommen werden.

### E.2.2.1 Büchi Sprühtrockner

Im Rahmen dieser Arbeit wird mit zwei verschiedenen Sprühtrocknungsanlagen gearbeitet. Zum einen der Büchi B190 und zum anderen der Büchi B290, wobei letzterer das Nachfolgemodell ist. Soll der Unterschied beider Anlagen nur kurz beschrieben werden, so ist die präzisere Bedienung aufgrund einer Digitalisierung der Bedienungseinheiten zu nennen und die Möglichkeit die Einspritzdüse zu temperieren. Dies hat den Vorteil, dass die eingespritzte Lösung nicht schon in der Zuleitung zum Sprühturm erwärmt wird, sondern tatsächlich erst dann, wenn sie versprüht wird. Ein vorzeitiges Erwärmen ist nachteilig, wenn das eingesetzte Lösemittel einen sehr niedrigen Siedepunkt besitzt. So kann es zu einem frühzeitigen Verdampfen des Lösemittels kommen, welches die Bildung der Partikel negativ beeinflusst. Der Büchi B290 ermöglicht auch eine Lösemittelrückgewinnung. So können Ressourcen geschont werden. Beide Sprühtrocknungsanlagen besitzen eine Zweistoffdüse, die wie folgt aufgebaut ist (Abb. 70):



**Abb. 70** Schematische Darstellung der Zweistoffdüse

Die Probe wird aus dem Zentrum der Düse versprüht. Die Menge der Zuluft (Flow) regelt die feine Versprühung der Emulsion. Je höher der Flow, umso feinere Tröpfchen bilden sich beim Versprühen. So kann durch die Einstellung der Flow-Rate Einfluss auf die Partikelgröße genommen werden. Die Inlet Temperatur gibt dabei die Temperatur der eingespeisten Zuluft an. Die Temperatur, die gemessen wird, wenn die Zuluft nach dem Trocknungsvorgang das System verlässt, nennt sich Outlet Temperatur. Der Sprühturm des B290 ist im Vergleich zum B190 größer. Dies hat den Vorteil, dass es zu weniger Luftverwirbelungen kommt und ein Kontakt des Produkts mit dem Sprühturm verhindert oder vermindert wird. Produktablagerungen im Sprühturm werden so unterbunden.

In der hier vorliegenden Arbeit werden standardmäßig sehr kleine Sprühraten und niedrige Temperaturen eingestellt. So kann eine minimale Belastung für die entstehenden Partikel während des Sprühvorgangs erreicht werden.

### Sprühtrockner:

Firma: Büchi Labortechnik GmbH  
Model: B190 und B290

### Versuchsparameter:

Sprührate: 1 – 2 ml/min  
Inlet Temperatur: 40 – 45 °C  
Outlet Temperatur: 25 – 34 °C  
Flow: 800 l/h

## **E.2.3 Partikelcharakterisierung**

Die über beide Verfahren (Emulsion Evaporation und Sprühtrocknung) hergestellten Partikel werden sowohl in der Suspension als auch im redispergierten Zustand auf ihre Größe und äußere Beschaffenheit hin untersucht. Auch Gehalt und Oberfläche werden teilweise ermittelt. Dafür stehen verschiedene Verfahren und Messtechniken zur Verfügung.

### **E.2.3.1 Mikroskopie**

Die Mikroskopie dient der genaueren Charakterisierung und Beschreibung der Suspension, der Emulsion, vor und nach Microfluidizer Einsatz, der redispergierten Partikel und der Kontrolle im Tierversuch, wie viele Partikel sich im Hundehaar wiederfinden. Zwei Mikroskope kommen hier zum Einsatz:

#### Mikroskop:

Firma: Keyence  
Model: VHX-100, digitales Mikroskop

Firma: Keyence  
Model: Biozero, BZ-8100E, digitales Fluoreszenz-  
mikroskop

### **E.2.3.2 Laserdiffraktometrie – Mastersizer**

Mit Hilfe der Laserdiffraktometrie werden die Suspensionen und die redispergierten Partikel weiter charakterisiert und auf Agglomerate hin untersucht.

Laserdiffraktometer:

Firma:	Malvern Instruments Ltd., UK
Modell:	Mastersizer 2000
Messprinzip:	Fraunhofer Beugung
Lichtquellen:	Rote Lichtquelle: Helium-Neon-Laser, 633 nm Blaue Lichtquelle: Festkörperlichtquelle, 450 nm

**E.2.3.3 Rasterelektronenmikroskop - REM**

Die Rasterelektronenmikroskopie dient der genaueren Betrachtung der Partikel, vor allem deren Oberfläche. Hierzu werden die Partikel im Hochvakuum mit Gold bedampft, damit ihre Oberfläche elektrisch leitende Eigenschaften erhält. Mit einem Elektronenstrahl wird die Probe abgerastert. Der Detektor registriert sowohl Rückstreu- als auch Sekundärelektronen. Über den Winkel mit dem die Elektronen die Probe verlassen und den Detektor erreichen, wird die topographische Struktur der Probe visualisiert.

REM:

Firma:	Fei
Modell:	Quanta 400
Elektronenkanonenkammer:	Wolfram-Haarnadelektrode
Spannung:	500-30.000 V

**E.2.3.4 DSC**

Die Glasübergangstemperatur dient der weiteren Charakterisierung der erhaltenen Partikel. Hierzu werden ~ 3-5 mg Partikelprobe in einem 40 µl Standardaluminiumtiegel eingewogen. Gemessen wird in einem offenen Tiegel. Dazu wird der Deckel des Tiegels vor dem Verschließen mit der beiliegenden Nadel durchstoßen. Probe und Referenz werden mit der gleichen Heizrate aufgeheizt. Verändert sich die Probe durch Glasübergänge, Schmelzen oder Verdampfen, so kommt es zu einem Wärmeverbrauch oder Wärme wird frei. Diese endo- und exothermen Vorgänge sorgen für eine Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz. Der Temperaturunterschied ist proportional zum Wärmestrom. Gegen das Temperatur-Zeit-Programm wird dieser in der Einheit Watt graphisch dargestellt. Durch Extrapolation der Basislinie können Onset und Endset Temperatur erhalten werden. Die zweite Aufheizkurve wird zur Bestimmung der  $T_g$  herangezogen. Aus dem arithmetischen

Mittel von Onset- ( $T_{\text{onset}}$ ) und Endset- ( $T_{\text{endset}}$ ) Temperatur kann die Glasübergangstemperatur ermittelt werden (Gl. 16). [26]

$$T_g = \frac{T_{\text{onset}} + T_{\text{endset}}}{2} \quad (\text{Gl. 16})$$

DSC:

Firma:	Mettler Toledo GmbH
Modell:	DSC 822 <sup>e</sup>
Software:	StAR <sup>e</sup> System Version 6.0
Probentiegel:	Standardaluminiumtiegel; 40 µl; Deckel gelocht
Referenztiegel:	Leerer Standardaluminiumtiegel; 40 µl; Deckel gelocht
Temperaturprogramm:	20 bis 200 °C, Aufheizen – Abkühlen – Aufheizen
Heizrate:	10 °C/min

### E.2.3.5 Oberflächenbestimmung

Die Bestimmung der Oberfläche geschieht über die Adsorption von Gasmolekülen an die Festkörperoberfläche. Die spezifische Oberfläche wird aus dem Quotienten von Oberfläche und Masse des Festkörpers errechnet. Die Adsorption von Gasen an die Oberfläche wird durch die Adsorptionsisotherme charakterisiert. Sie stellt die Abhängigkeit der adsorbierten Gasmenge vom Gasdruck dar. Es werden zwei Bindungsarten des Adsorbats an eine Oberfläche unterschieden. Die Physisorption beschreibt eine reversible Bindung von Gasmolekülen an eine Oberfläche, die durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen gebildet wird. Bei der Chemisorption werden die Gasmoleküle durch eine chemische Reaktion irreversibel an der Oberfläche gebunden. [2] Die adsorbierte Gasmenge ist bei der Chemisorption vergleichbar einfach zu bestimmen, da das Adsorbat nicht abdiffundieren kann und sich durch diese Art der Bindung nur eine monomolekulare Schicht aufbaut. Bei der Physisorption stehen freie und adsorbierte Gasmenge in einem dynamischen Gleichgewicht.

Bei der Physisorption werden Adsorptions- und Desorptionsvorgänge durch die Adsorptionsisotherme beschrieben. Adsorption und Desorption befinden sich im Gleichgewicht. Die Adsorptionsgeschwindigkeit ist dabei proportional zum Gasdruck und zur Zahl der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche. Die Desorptionsgeschwindigkeit ist

proportional zur Zahl der adsorbierten Moleküle. Im Gleichgewichtszustand ändert sich der Bedeckungsgrad nicht mehr. Aus diesen Zusammenhängen wird die Langmuir-Isotherme (Gl. 17) erhalten, die dann gilt, wenn die Oberfläche einheitlich, lediglich eine Monolage Gasmoleküle auf der Oberfläche zu finden ist und keine Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Molekülen bestehen. [2]

$$\theta = \frac{Kp}{1 + Kp} \quad \text{mit} \quad K = \frac{k_{Ad}}{k_{De}} \quad (\text{Gl. 17})$$

$\theta$	<i>Bedeckungsgrad = Anzahl der besetzten Adsorptionsstellen / Anzahl der besetzten Adsorptionsstellen</i>
$p$	<i>Druck</i>
$k_{Ad}$	<i>Geschwindigkeitskonstante Adsorption</i>
$k_{De}$	<i>Geschwindigkeitskonstante Desorption</i>

Wenn die Adsorption nicht bei einer Monoschicht adsorbierter Moleküle stehenbleibt, wird eine Multischicht-Adsorptionsisotherme angewendet. Diese Isotherme ist nach ihren Entwicklern Stephen Brunauer, Paul Emmett und Edward Teller benannt. [18]

Bei der BET-Messung wird Stickstoff an die Oberfläche adsorbiert. Die adsorbierte Gasmenge ist von der Temperatur und vom Gasdruck des verwendeten Gases abhängig. Die Arbeitsweise des Messgerätes basiert auf einer Tieftemperatur-Stickstoff-Adsorption. Dazu werden zwei volumengleiche Gefäße eingesetzt, wobei das eine die Probe enthält und das andere leer oder mit großen Glaskugeln (Durchmesser 3-6 mm) gefüllt ist. Nach dem Evakuieren beider Gefäße werden diese in flüssigem Stickstoff eingetaucht, bevor sie mit einer definierten Menge Stickstoff befüllt werden. Durch die Adsorption des Gases an die Probenoberfläche muss das Probengefäß mit mehr Stickstoff befüllt werden als das Referenzgefäß, um die Druckdifferenz beider Gefäße auf Null zu halten. Aus der Differenz der Stickstoffmengen und dem Gleichgewichtsdruck im Messgefäß wird die Stickstoffisotherme im Bereich von 0,05 bis 0,30 p/p<sub>0</sub> ermittelt. Dabei ist p der Druck im Messgefäß und p<sub>0</sub> der Druck im Referenzgefäß. Aus der Steigung der aus diesem Punkten gebildeten Regressionsgeraden und der Probeneinwaage wird nun die spezifische Oberfläche berechnet. [15]

Physisorptionsmessgerät:

Firma:	Micromeritics GmbH
Modell:	Gemini 2360
Messbereich:	0,1-1000 m <sup>2</sup> /g

## E.2.4 Freisetzung

### E.2.4.1 Waschvorgang für Freisetzung

Für den Versuch werden die Proben wie folgt aufbereitet:

Die nach Verdampfen des Lösungsmittels erhaltene Suspension wird in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, bei 13000 rpm 20 min in der Biofuge zentrifugiert, um den Überstand abnehmen zu können. 1 ml Wasser wird hinzupipettiert, der Bodensatz wird redispergiert, bevor wieder 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert wird. Dieser Waschschrift wird wiederholt, bevor die Partikel in Wasser aufgenommen werden und für weitere Versuche zur Verfügung stehen.

#### Zentrifuge:

Firma:	Hereaus Instruments
Modell:	Biofuge 13
Max. Drehzahl:	13000 rpm

### E.2.4.2 Versuchsaufbau

Für die Freisetzung muss der Feststoffgehalt der gewaschenen, konzentrierten Partikelsuspensionen bestimmt werden. Auf der Grundlage dieser Bestimmung wird eine sinnvolle Menge in das Kunststoffgefäß für die Freisetzung überführt (~ 250 µl). Dazu wird das Freisetzungsmittel (Ethanol / Wasser bzw. Methanol / Wasser) hinzugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 5 ml erhalten wird. Die Probengefäße werden dicht verschlossen in waagerechter Position in die Schüttelmaschine eingespannt und bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Probenziehung erfolgt nach folgenden Zeitpunkten: 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 und 168 h. Zu diesen Zeiten werden die entsprechenden Proben mit Hilfe eines PET-Spritzenvorsatzfilters (Chromafil® PET-20/25, Fa. Macherey-Nagel) in ein HPLC-Vial filtriert und können nun analytisch ausgewertet werden.

Um auszuschließen, dass Wirkstoff an der Filtermembran adsorbiert wird und so das analytische Ergebnis verfälscht, wird ein HPLC-Standard einmal mit dem Filter filtriert und einmal unfiltriert vermessen. Findet keine Adsorption statt, so müssen beide Proben den gleichen Wirkstoffgehalt aufweisen. Dies kann nachgewiesen und so ein verfälschender Einfluss des Filters auf das Freisetzungsergebnis ausgeschlossen werden.

Freisetzungsgefäß:

Firma:	Fisher Scientific
Gefäß:	Zentrifugenröhrchen, Polystyrol, rund, steril, Art. Nr. 9477425, (Charge: 096272)
Volumen:	10 ml

Schüttelmaschine:

Firma:	Lab-Line Instruments
Modell:	Multi Wrist® Shaker
Modellnr.:	3589-1
Einstellung:	Stufe 7, waagerechte Probenanordnung

**E.2.4.3 HPLC-Analyse**

Für die HPLC-Analyse liegen die Proben in verschiedenen Lösungsmitteln vor. Bei einem Freisetzungsversuch in Ethanol / Wasser oder Methanol / Wasser und bei einer Gehaltsbestimmung in Acetonitril oder Tetrahydrofuran. Die Proben werden durch einen Spritzenaufsatzfilter (Chromafil® PET-20/25, Fa. Macherey-Nagel) in das HPLC-Vial gespritzt, um Polymerreste zu entfernen. Folgende Analysenparameter werden eingestellt:

HPLC:

Firma:	Agilent Technologies, Inc
Modell:	Agilent 1100 Series

Methode:

Säule:	LiChroCart 125-4; RP-18 (5 µm); Lot. L750917
Temperatur:	32 °C
Fließmittel:	Isokratisch; ACN / H <sub>2</sub> O ; 80 / 20
Detektor:	DAD (Dioden Array Detektor); 268 nm
Fluss:	1 ml/min
Laufzeit:	12 min, Flumethrinpeak bei ~ 7,9 min

**E.2.5 Zecken – Filter – Versuch**

Die Filterpapiere werden so vorbereitet, dass sie in die dafür vorgesehenen Petrischalen passen. Außerdem werden mit Bleistift die Positionen der Glasringe markiert. Eine ca. 25 %ige (m/m) Lösung von Lanolin in Dichlormethan hilft, das Fett gleichmäßig zu verteilen. Es wird soviel Lösung auf das Filterpapier aufgetragen, bis dieses vollständig benetzt ist. Ein

Überschuss an Lanolin sollte vermieden werden, da dieses durch seine weiche Konsistenz die Zecken in ihrer Mobilität beeinflussen kann. Nach Verdampfen des Dichlormethans, was bei Raumtemperatur geschieht, kann durch ein Wiegen vor und nach dem Auftrag der Lanolinlösung die genaue Menge Lanolin ermittelt werden, die sich auf dem Filterpapier befindet. In die Mitte des Filters wird nun die Formulierung aufgetragen. Sauberes Arbeiten ist hier wichtig, um eine Kontamination des restlichen Filterpapiers mit Flumethrin zu vermeiden. Die Petrischale dient der Aufbewahrung und der Vermeidung von Verschmutzung des Filters. Die talcumierten Glasringe werden nur zu Versuchszeiten auf den Filter gesetzt. Die Zecken werden nun in die Zwischenräume der Glasringe gegeben. Dabei befinden sich im innersten Ring fünf, in allen anderen zehn Zecken. Die Auswertung erfolgt nach 24 h und 48 h. Dafür werden die Filter auf eine Wärmeplatte gesetzt. Dies muss mit Vorsicht geschehen, um die Zecken nicht zu schädigen oder sogar zu töten. Zecken, die sich vorher in einem Ruhezustand befanden, werden dann wieder agil. Gezählt werden die lebenden, toten und durch den Wirkstoff geschädigten Zecken.

Welche Lagerungszeit notwendig ist, um eine Diffusion des Wirkstoffs zu erkennen, und in welchen Abständen es sinnvoll ist Zecken aufzutragen, ist abschließend noch nicht geklärt. In dieser Arbeit wird schließlich ein Rhythmus von zwei Wochen eingehalten, um die Filterpapiere mit Zecken zu bestücken. In den Zwischenzeiten werden die Filterpapiere in einem Trockenschrank bei 30 °C gelagert. Dies soll der Freisetzung auf dem Hund näher kommen, da auch im Fell eine erhöhte Temperatur herrscht.

### Zecken-Filter-Versuch:

Filterpapier:	Rundfilter 589/3; Ø=150 mm; Whatman GmbH
Petrischale:	150x20 mm; mit Nocken; Sarstedt-Nr. 82.1184
Glasringe:	Ø (innen)= 2; 7,5; 11; 13,5 cm

### **E.2.6 Tierversuch In vivo**

Der Tierversuch wird wie in C.6.1 beschrieben durchgeführt. Bei den Spot on Formulierungen wird 1 mg Flumethrin pro Kilogramm Körpergewicht appliziert. Bei einem Durchschnittsgewicht der Beagle von 11 kg entspricht dies einer Menge von 11 mg Flumethrin pro Hund. Da in diesem Versuch eine Wirkung von optimalerweise 6 Monaten erreicht werden soll und die Spot ons eine Wirkung über lediglich einen Monat zeigen, muss sechsfach überdosiert werden. Dies entspricht 66 mg Flumethrin pro Hund. Über den genauen Wirkstoffgehalt der Partikel kann nun die Menge an Partikeln bestimmt werden, die eben diese 66 mg Wirkstoff beinhaltet. Die so errechnete Partikelmenge wird mit einem

6,6 %igen Aufschlag (dies entspricht in der fertigen Lösung 2 ml) versehen, und, ggf. nach Kopplung mit dem Antikörper, in 30 ml einer wässrigen, 0,01 %igen Tween<sup>®</sup> 20 Lösung dispergiert. 100 mg Fluoreszenzpartikel, die in genau 2 ml Lösung enthalten sind, werden als Indikatorpartikel unter die Verumpartikel gemischt. Es werden demnach 32 ml einer Partikelsuspension erhalten, die 100 mg Fluoreszenzpartikel und 70,4 mg Flumethrin in Partikeln verkapselt enthält. So werden 32 ml Partikelsuspension erhalten, obwohl nur 30 ml appliziert werden sollen. Die zusätzlichen 2 ml dienen der Kompensation der Lösung, die aus technischen Gründen am Ende des Sprühvorgangs in der Sprühflasche und im Sprühkopf zurückbleibt. Der Tween<sup>®</sup> 20 Zusatz sorgt für eine bessere Benetzbarkeit des Fells und soll ein Abperlen der aufgesprühten Lösung verhindern. Unmittelbar nach der Zusammenstellung der Sprühlösung wird diese auch appliziert, um mögliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bestandteilen zu vermeiden. Die Hunde werden gleichmäßig mit der Formulierung am gesamten Körper besprüht.

Sprühflasche:

Firma: Stölzle-Oberglas GmbH  
Modell: Boston Medizinflasche; Braunglas  
Größe: Ø= 32,5 mm; Höhe = 78,6 mm

Sprühkopf:

Firma: MeadWestvaco Calmar GmbH  
Modell: MISTETTE Mark VII<sup>™</sup>  
Sprühvolumen: 0,21 ml pro Sprühstoß

## F Literaturverzeichnis

- [1] **Adler, M., Pasch, H., Meier, C., Senger, R., Koban, H. G., Augenstein, M., Reinhold, G.:** *Molar mass characterization of hydrophilic copolymers, 2 Size exclusion chromatography of cationic (meth)acrylate copolymers.* e-polymers 2005 057 2005. ISSN/ISBN: 1618-7229.
- [2] **Atkins, P. W., Paula de, J.:** *Physikalische Chemie.* 4., vollständig überarbeitete Auflage S. 858-868. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. ISSN/ISBN: 3-527-31546-2.
- [3] **Baker, R. W.:** *Controlled Release of Biologically Active Agents.* New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc., 1987. ISSN/ISBN: 0-471-83724-5.
- [4] **BASF:** *GPC-Analyse PS 158.* Editors: michael-gerrit.herting@basf.com. 1999.
- [5] **BASF:** *SDB Polystyrol 158 K.* 11-7-2005. [http://www.plasticsportal.net/wa/EU~de\\_DE/Catalog/ePlastics/pi/BASF/prodline/polystyrol](http://www.plasticsportal.net/wa/EU~de_DE/Catalog/ePlastics/pi/BASF/prodline/polystyrol)
- [6] **BASF:** *Styropor.* 2009. [http://worldaccount.basf.com/wa/AP~en\\_GB/Catalog/BASFFoams/pi/BASF/prodline/styropor](http://worldaccount.basf.com/wa/AP~en_GB/Catalog/BASFFoams/pi/BASF/prodline/styropor)
- [7] **Bauer, K. H., Frömring, K.-H., Führer, C.:** *Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie.* 7. Auflage S. 370-390. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2002. ISSN/ISBN: 3-8047-1825-6.
- [8] **Bayer AG:** *SDB Ethylacetat.* 12-2-2003. <http://by-uwsi.bayer-ag.com/uwsi/java/Dispatcher?STATE=querySdb&NAVIGATION=true>
- [9] **Bayer Animal Health GmbH Intern:** *Löslichkeiten Flumethrin.* 2006.
- [10] **Bayer Animal Health GmbH Intern, BAH-R&D-PARA-APR:** *Kontakttest mit adulten Zecken mit dem Wirkstoff Flumethrin.*
- [11] **Bayer CropScience:** *Imidacloprid.* Bayer CropScience, 14-3-2007.
- [12] **Bayer HealthCare AG:** *Advantix.* 30-1-2009. <http://www.advantix.info/Application.3185.0.html>
- [13] **Bayer HealthCare AG, Hofmann, S., Hamann, H. J., Fischer, R., Schillberg, S., Vogel, S., Schinkel, H.:** *Antibodies which bind selectively to hair of animals and an antibody based drug delivery system for animals.* (WO 2009/056280 A1), 7-5-2009.
- [14] **Bayer HealthCare Animal Health Division:** *Parasitizide Prüfverfahren: Larvenpaketttest mit Boophilus microplus oder Rhipicephalus sanguineus.* 15-2-2006.

- 
- [15] **Bayer Technology Services:** Messung der spezifischen Oberfläche eines Feststoffes analog DIN ISO 9277. 1-2-2009.
- [16] **Bayer Vital GmbH:** *Remedia Veterinaria*. 2006.
- [17] **Brandrup, J., Immergut, E. H., Grulke, E. A.:** *Polymer Handbook, Volume 2*. Fourth Edition(2), New Jersey, USA : Wiley-Interscience, 1999. ISSN/ISBN: 0-471-48172-6.
- [18] **Brunauer, S., Emmett, P. H., Teller, E.:** *Adsorption of Gases in Multimolecular Layers*. Journal of the American Chemical Society 60(2), S. 309-319. 1938.
- [19] **Coombes, A. G. A., Yeh, M. K., Lavelle, E. C., Davis, S. S.:** The control of protein release from poly(-lactide co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method. Journal of Controlled Release 52(3), S. 311-320. 31-3-1998. ISSN/ISBN: 0168-3659. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3D-3SBNJJF-8/2/48bfe755c6491b9100687bbbdd1eb7d8>
- [20] **Domininghaus, H.:** *Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften*. Editors: Eyerer, P., Elser, P., and Hirth, T. 6., neu bearbeitete und erweiterte Auflage Berlin Heidelberg : Springer Verlag, 2005. ISSN/ISBN: 3-540-21410-0.
- [21] **Esposito, E., Roncarati, R., Cortesi, R., Cervellati, F., Nastruzzi, C.:** Production of Eudragit Microparticles by Spray-Drying Technique: Influence of Experimental Parameters on Morphological and Dimensional Characteristics. Pharmaceutical Development and Technology 5(2), S. 267-278. 2000.
- [22] **Evonik Industries:** *Eudragit Application Guidelines* . 10th Edition Darmstadt, Germany : Evonik Industries AG, 2008.
- [23] **Faisant, N., Akiki, J., Siepmann, F., Benoit, J. P., Siepmann, J.:** *Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory*. International Journal of Pharmaceutics 314(2), S. 189-197. 18-5-2006. ISSN/ISBN: 0378-5173. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7W-4JCCJS8-4/2/b3178e70be791f5f8352fd3504641ac8>
- [24] **Flegler, S. L., Heckman, J. W., Klomparens, K. L.:** *Elektronenmikroskopie Grundlagen Methoden Anwendung*. Heidelberg Berlin Oxford : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1995. ISSN/ISBN: 3-86025-341-7.
- [25] **Gebler, H., Kindl, G.:** *Pharmazie für die Praxis*. 4. Auflage S. 198. Stuttgart : Deutscher Apotheker Verlag, 2000. ISSN/ISBN: 3-7692-2605-4.
- [26] **Grützmann, R.:** Zum Mechanismus der Anionenwirkung auf die Permeabilität kationischer Polymethacrylatüberzüge. 2005.

- [27] **Hemminger, W. F., Cammenga, H. K.:** *Methoden der thermischen Analyse*. Editors: Fresenius, W., Huber, J. F. K., Pungor, E., Rechnitz, G. A., Simon, W., Tölg, G., and West, Th. S. Band 24 S. 100-198. Berlin Heidelberg New York : Springer Verlag, 1989. ISSN/ISBN: 3-540-15049-8.
- [28] **Heymann, E.:** *Haut, Haar und Kosmetik - Eine chemische Wechselwirkung*. S. 81-83. Stuttgart : S. Hirzel Verlag, 1994. ISSN/ISBN: 3-7776-0556-5.
- [29] **Higuchi, T.:** Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52(12), S. 1145-1149. 1963. ISSN/ISBN: 1520-6017.
- [30] **Higuchi, T.:** *Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50(10), S. 874-875. 1961. ISSN/ISBN: 1520-6017.
- [31] **Hombreiro-Pqrez, M., Siepmann, J., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Hoffman, M., Bodmeier, R., Maincent, P.:** Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling. *Journal of Controlled Release* 88(3), S. 413-428. 26-3-2003. ISSN/ISBN: 0168-3659. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3D-4845M0D-5/2/1eacf50b5a28d6628ac2b198b63a258c>
- [32] **Huang, X., Brazel, C. S.:** *On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems*. *Journal of Controlled Release* 73(2-3), S. 121-136. 15-6-2001. ISSN/ISBN: 0168-3659. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3D-438BNXR-1/2/2fad9a809399f2e7b28c04adc025e05c>
- [33] **Jaehde, U., Radziwill, R., Mühlebach, S., Schunack, W.:** *Lehrbuch der Klinischen Pharmazie*. 2., neu bearbeitete und erweiterte Auflage S. 73 ff. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2003. ISSN/ISBN: 3-8047-1939-2.
- [34] **Jameela, S. R., Jayakrishnan, A.:** Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials* 16(10), S. 769-775. 1995. ISSN/ISBN: 0142-9612. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-3Y5FNSY-36/2/35fa3146faed87a5212f1aa3ca6bd1c6>
- [35] **Jameela, S. R., Kumary, T. V., Lal, A. V., Jayakrishnan, A.:** *Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system*. *Journal of Controlled Release* 52(1-2), S. 17-24. 2-3-1998. ISSN/ISBN: 0168-3659.

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3D-3S4XP7T-2/2/f84a86c865e9205d951e1702978cc0d2>
- [36] **Killtarslan, M., Baykara, T.:** *The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres.* International Journal of Pharmaceutics 252(1-2), S. 99-109. 18-2-2003. ISSN/ISBN: 0378-5173. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7W-47MSNNT-2/2/39ed29945324719ab67bf895cbb57ca7>
- [37] **Kleppmann, W.:** *Taschenbuch Versuchsplanung - Produkte und Prozesse optimieren.* Editors: Brunner, F. J.(4. Auflage), S. 72 ff.München Wien : Carl Hanser Verlag, 2006. ISSN/ISBN: 978-3-446-40617-9.
- [38] **Kraeber GmbH & Co:** *Chitosan - Produktinformation.* 2009. <http://www.kraeber.de/products/biopharma/chitosan/>
- [39] **Krämer, F., Mencke, N.:** *Flea Biology and Control.* - The Biology of the Cat Flea: Control and Prevention with Imidacloprid in Small Animals.Berlin Heidelberg : Springer, 2001. ISSN/ISBN: 3-540-41776-1.
- [40] **Löscher, W., Ungemach, F. R., Kroker, R.:** *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.* 4. AuflageBerlin : Parey Buchverlag, 1999.
- [41] **Malvern Instruments:** *Operators Guide.* England : Malvern Instruments Ltd. 1998, 1999.
- [42] **Martinez, L., Agnely, F., Leclerc, B., Siepmann, J., Cotte, M., Geiger, S., Couarraze, G.:** *Cross-linking of chitosan and chitosan/poly(ethylene oxide) beads: A theoretical treatment.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 67(2), S. 339-348. 2007. ISSN/ISBN: 0939-6411. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6C-4N49VHV-1/2/229d986a72efa301974a151a876ef31b>
- [43] **Mehlhorn, H.:** *Encyclopedic Reference of Parasitology.* - Biology Structure Function. Second Edition S. 608-609 (638).Berlin Heidelberg : Springer Verlag, 2001. ISSN/ISBN: 3-540-66819-5.
- [44] **Mehlhorn, H., Piekarski, G.:** *Grundriß der Parasitologie.* - Parasiten des Menschen und der Nutztiere. 6., überarb. und erw. AuflageHeidelberg Berlin : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002. ISSN/ISBN: 3-8274-1158-0.
- [45] **Merial:** *Frontline Broschüre [online].* 20-8-2008. <http://frontline.de.merial.com/>
- [46] **Moustafine, R. I., Zaharov, I. M., Kemenova, V. A.:** Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit« E PO/Eudragit« L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 63(1), S. 26-36. 2006. ISSN/ISBN: 0939-6411.

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6C-4HWXKY2-1/2/28ea622b48f3e1d64a417ac25ff0cd38>
- [47] **Müller, R. H., Schuhmann, R.:** *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Band 38 S. 17-99. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1996. ISSN/ISBN: 3-8047-1490-0.
- [48] **Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M.:** *Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage S. 921. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001. ISSN/ISBN: 3-8047-1763-2.
- [49] **Nowak, G. A.:** *Die kosmetischen Präparate*. 3. Auflage(2), S. 523-524. Augsburg : Verlag für chem. Industrie H. Ziolkowsky KG, 1984. ISSN/ISBN: 3 87846 114 3.
- [50] **Orienti, I., Gianasi, E., Zecchi, V.:** Effect of loading method on NSAIDs release from ethylene glycol dimethacrylate crosslinked poly(2-hydroxyethyl methacrylate microspheres. *Il Farmaco* 48(11), S. 1577-1595. 1993.
- [51] **Pignatello, R., Vandelli, M. A., Giunchedi, P., Puglisi, G.:** *Properties of tolmetin-loaded Eudragit RL 100 and Eudragit RS 100 microparticles prepared by different techniques*. *STP Pharma Sciences* 7(2), S. 148-157. 1997.
- [52] **Qiu, X., Leporatti, S., Donath, E., Mohwald, H.:** *Studies on the Drug Release Properties of Polysaccharide Multilayers Encapsulated Ibuprofen Microparticles*. *Langmuir* 17(17), S. 5375-5380. American Chemical Society, 21-7-2001. ISSN/ISBN: 0743-7463. <http://dx.doi.org/10.1021/la010201w>
- [53] **Rajesh, K. S., Bhowmik, B. B., SA\*, B.:** *Effect of Polyvinylpyrrolidone on Physical Characteristics of Ketoprofen-loaded Polystyrene Microparticles*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 65(5), S. 526-529. 2003.
- [54] **Reithmeier, H., Herrmann, J., Göpferich, A.:** *Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides*. *Journal of Controlled Release* 73(2-3), S. 339-350. 15-6-2001. ISSN/ISBN: 0168-3659. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3D-438BNXR-M/2/fc3e11a62e53a68ad65b1e997ab0c2ce>
- [55] **Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G.:** *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. - Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysemethoden. 3. Auflage S. 384-466. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001. ISSN/ISBN: 3-8047-1739-X.
- [56] **SA\*, B., Chakraborty, S.:** Development and evaluation of furosemide - loaded polystyrene microparticles. *Bolletino Chimico Farmaceutico* 1999.

- [57] **SA\*, B., Mondal, U. K., Prasad, N. R., Jha, T.:** *Development of Indomethacin- and Ibuprofen-loaded Polymethylmethacrylate Microparticles.* *Pharmaceutical Sciences* 2 S. 209-213. 1996.
- [58] **Saravanan, M., Dhanaraju, M. D., Sridhar, S. K., Ramachandran, S.:** *Preparation, Characterization and In Vitro Release Kinetics of Ibuprofen Polystyrene Microspheres.* *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 66(3), S. 287-292. 2004.
- [59] **Siepmann, F., Le Brun, V., Siepmann, J.:** *Drugs acting as plasticizers in polymeric systems: A quantitative treatment.* *Journal of Controlled Release* 115(3), S. 298-306. 27-10-2006. ISSN/ISBN: 0168-3659. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3D-4KSRV32-1/2/9c71c31c8183e9a94c473ae4e85a75df>
- [60] **Siepmann, J., Faisant, N., Akiki, J., Richard, J., Benoit, J. P.:** *Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory.* *Journal of Controlled Release* 96(1), S. 123-134. 16-4-2004. ISSN/ISBN: 0168-3659. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3D-4BVNY40-1/2/5ce946c06af059f3105d55ce1433247a>
- [61] **Siepmann, J., Siepmann, F.:** *Mathematical modeling of drug delivery.* *International Journal of Pharmaceutics* 364(2), S. 328-343. 8-12-2008. ISSN/ISBN: 0378-5173. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7W-4TDVMCV-3/2/83c00bbacbf01aefa2dcdb66a6f6d44d>
- [62] **Sigma-Aldrich:** *Chloroform.* 2009. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=C2432|SIAL&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=C2432|SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- [63] **Sigma-Aldrich:** *Dichlormethan.* 2009. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=270997|SIAL&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=270997|SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- [64] **Sigma-Aldrich:** *Ethylacetat.* 2009. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=270989|SIAL&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=270989|SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- [65] **TAMILVANAN, S., SA\*, B.:** Effect of production variables on the physical characteristics of ibuprofen-loaded polystyrene microparticles. *Journal of Microencapsulation* 16(4), S. 411-418. 1999.
- [66] **TAMILVANAN, S., Sa, B.:** *Studies on in vitro release behaviour of indomethacin-loaded polystyrene microparticles.* *International Journal of Pharmaceutics* 201(2), S. 187-197. 25-5-2000. ISSN/ISBN: 0378-5173. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7W-40KR6CK-5/2/58d0d8676f3db5aeddcd2879bdb3da4>

- [67] **Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P.:** *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. 5. Auflage S. 759. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999. ISSN/ISBN: 3-8047-1616-4.
- [68] **Yamada, T., Onishi, H., Machida, Y.:** *Sustained release ketoprofen microparticles with ethylcellulose and carboxymethylethylcellulose*. *Journal of Controlled Release* 75(3), S. 271-282. 10-8-2001. ISSN/ISBN: 0168-3659. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3D-43MBKF7-4/2/af22c0588dfe23e5f98f4fcac0df71dc>

## G Anhang

### G.1 Optimierte Formulierung Polystyrol

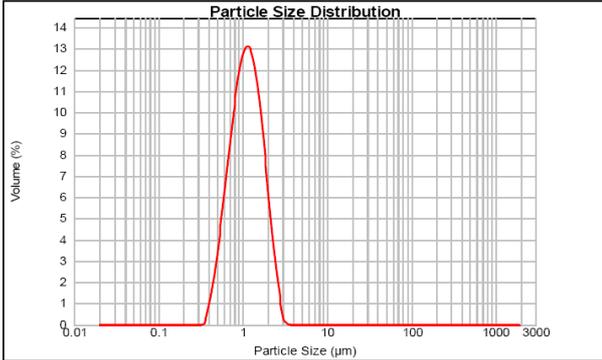
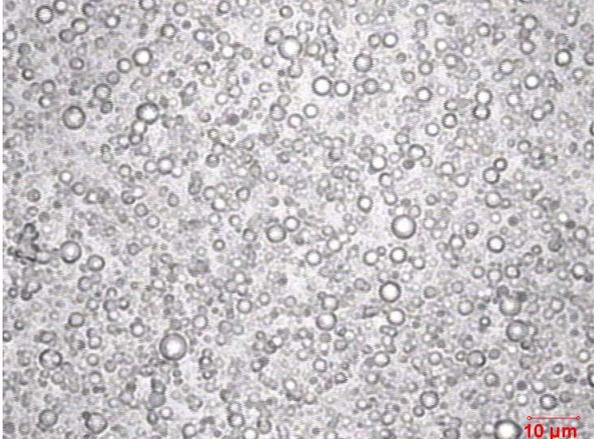
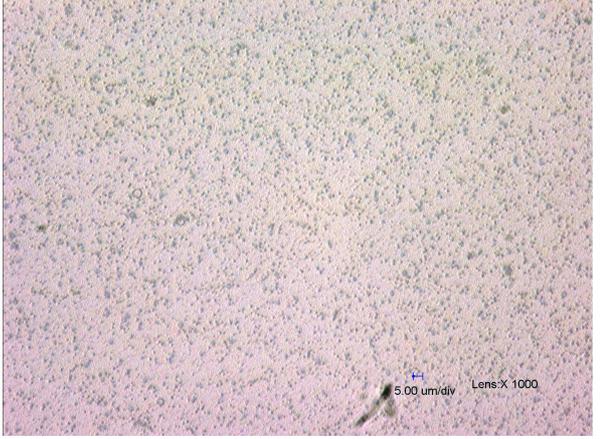
Eine für das Matrixpolymer Polystyrol optimierte Formulierung wird mit dem Emulsion Evaporation Verfahren hergestellt. Zur Modifizierung der Oberflächenladung zeigt sich Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer 86/14 als am besten geeignet. Eine möglichst hohe Beladung mit dem Wirkstoff Flumethrin soll eine lange Wirkdauer gewährleisten. Die Zusammensetzung der Formulierung ist Tabelle 47 zu entnehmen.

**Tabelle 47 Zusammensetzung der optimierten Polystyrol Formulierung**

Substanz	Menge
Polystyrol	2,64 g (m/m bezogen auf die organische Phase) ± 5 %
Styrol-Maleinsäureanhydrid Copolymer (MSCP14)	1,05 g (m/m bezogen auf Polymermasse) ± 28 %
Flumethrin	0,75 g (m/m bezogen auf Feststoffanteil) ± 17 %
Wasser	160 ml
Dichlormethan	40 ml

Die Herstellung erfolgt analog der Herstellungsvorschrift E.2.1. So werden Partikel mit folgenden Eckdaten erhalten (als Beispiel dient 7c-5\_EE) (Tabelle 48).

**Tabelle 48 Eigenschaften der erhaltenen Polystyrolpartikel**

<p><b>Partikelgröße:</b></p>	<p>D(10) = 0,618 µm D(50) = 1,110 µm D(90) = 1,921 µm</p>	 <p>The graph shows a narrow, unimodal distribution of polystyrene particles. The x-axis represents particle size in micrometers on a logarithmic scale from 0.01 to 3000. The y-axis represents volume percentage from 0 to 14. The distribution peaks at approximately 1.1 µm with a volume percentage of about 13.5%.</p>
<p><b>Emulsion:</b></p>	<p>Mit Microfluidizer</p>	 <p>A phase-contrast micrograph showing a dense population of small, spherical polystyrene particles. The particles appear uniform in size and are well-dispersed. A scale bar in the bottom right corner indicates 10 µm.</p>
<p><b>Suspension:</b></p>		 <p>A micrograph showing a dense field of small particles, likely the same polystyrene particles as in the emulsion. The particles are very small and densely packed. A scale bar in the bottom right corner indicates 5.00 µm/div and the magnification is Lens X 1000.</p>
<p><b>Glasübergangstemperatur:</b></p>	<p>63,44 °C</p>	
<p><b>Wirkstoffgehalt:</b></p>	<p>19,1 %</p>	

## G.2 Optimierte Formulierung PMMA

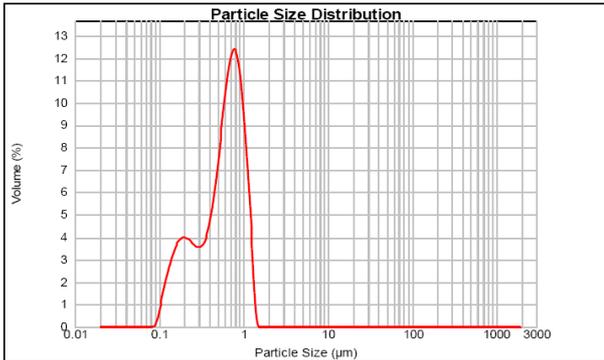
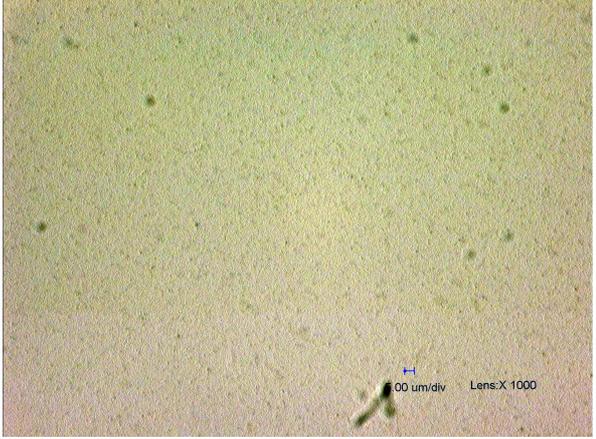
Auch wenn sich PMMA meist besser im Sprühtrocknungsverfahren verarbeiten lässt, wird eine optimierte Formulierung nur mit dem Emulsion Evaporation Verfahren erhalten. Für das Matrixpolymer PMMA zeigte sich das permanent kationische Eudragit® RS geeignet. Die Formulierung ist Tabelle 49 zu entnehmen.

**Tabelle 49 Zusammensetzung der optimierten PMMA Formulierung**

Substanz	Menge
PMMA	3,70 g (m/m bezogen auf die organische Phase) $\triangleq$ 6,5 %
Eudragit® RS	0,74 g (m/m bezogen auf Polymermasse) $\triangleq$ 17 %
Flumethrin	0,88 g (m/m bezogen auf Feststoffgehalt) $\triangleq$ 17 %
Wasser	160 ml
Dichlormethan	40 ml

Die Herstellung erfolgt analog der Herstellungsvorschrift E.2.1. So werden Partikel mit folgenden Eckdaten erhalten (als Beispiel dient 12-1-1) Tabelle 50.

**Tabelle 50 Eigenschaften der erhaltenen PMMA Partikel**

<p><b>Partikelgröße:</b></p>	<p>D(10) = 0,177 µm D(50) = 0,605 µm D(90) = 1,030 µm</p>	
<p><b>Emulsion:</b></p>	<p>Mit Microfluidizer</p>	
<p><b>Suspension:</b></p>		
<p><b>Glasübergangstemperatur:</b></p>	<p>67,50 °C</p>	
<p><b>Wirkstoffgehalt:</b></p>	<p>15,0 %</p>	