



Entwicklung und Herstellung geschmacksmaskierter Zubereitungen von Methylenblau-Resinaten zur Behandlung von Kindern mit Malaria

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eva Christina Schornick

aus Karlsruhe

Düsseldorf, Januar 2011

aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz
Koreferent: Prof. Dr. Peter Kleinebudde

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen	VII
A Einleitung und Ziel der Arbeit	1
1. Einleitung	1
2. Ziel der Arbeit	6
B Allgemeiner Teil	7
1. Methylenblau	7
2. Ionenaustauscherharze	10
C Ergebnisse und Diskussion	13
1. Vorausgehende Entwicklungsarbeiten	13
2. Optimierungsansätze	17
2.1 Einleitung	17
2.2 Ergebnisse	17
2.2.1 Vorquellung und Aktivierung der Ionenaustauscher	17
2.2.2 Waschen des Resinats mit einem aprotischem Lösungsmittel ..	18
2.3 Schlussfolgerung	20
3. Entwicklung wässriger Zubereitungen von Methylenblau-Resinat	20
3.1 Einleitung	20
3.2 Festlegung der Dosierung	21
3.3 Auswahl von Darreichungsform und Hilfsstoffen	21
3.4 Ansatz in Simple Sirup USP	24
3.5 Ansatz auf HPMC, HEC und MC Basis	25
3.6 Ansatz auf Maltitol Basis	25
3.7 Ansatz ohne Trocknung des Resinats	25
3.8 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	26
4. Entwicklung wasserfreier Zubereitungen von Methylenblau-Resinat	26
4.1 Einleitung	26
4.2 Ansatz auf Basis mittelkettiger Triglyzeride	27
4.3 Rheologie	28

4.4	Geschmacksuntersuchungen von wirkstofffreien Zubereitungen mit Probanden.....	30
4.5	Schlussfolgerung.....	33
5.	Herstellung und Charakterisierung einer ersten GMP-Charge für klinische Prüfmuster	34
5.1	Einleitung	34
5.2	Charakterisierung.....	34
5.3	Vergleichende Untersuchungen mit anderen Resinat-Chargen und deren Zubereitungen.....	38
5.3.1	UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen.....	38
5.3.2	Untersuchungen mittels HPLC mit UV/VIS-Detektion.....	41
5.4	Schlussfolgerung.....	43
6.	Identifizierung der Nebenprodukte	43
6.1	Einleitung	43
6.2	Untersuchungen mittels HPLC mit UV/VIS-Detektion	43
6.3	Untersuchungen mittels HPLC mit massenspektrometrischer Detektion	45
6.4	Schlussfolgerung.....	47
7.	Untersuchungen zur Zersetzungsreaktion und Optimierung der MB-Resinat-Qualität.....	47
7.1	Einleitung	47
7.2	Beladung und Desorption.....	47
7.2.1	Aufreinigung des Ionenaustauschers.....	47
7.2.2	Einfluss des Ionenaustauschertyps	48
7.2.3	Einfluss des Puffertyps	52
7.2.4	Einfluss des pH-Wertes	57
7.2.5	Einfluss des Trocknungsvorgangs.....	59
7.2.6	Einfluss der Wirkstoff-Qualität des MB	60
7.2.7	Hypothese für den Reaktionsmechanismus der Zersetzung von MB	63
7.3	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	66
7.4	Röntgendiffraktometrische Untersuchungen	67
7.5	Dynamische Wasserdampfsorption.....	71
7.6	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	73
8.	Herstellung und Charakterisierung der zweiten GMP-Charge	73
8.1	Einleitung	73
8.2	Entwicklung der Rezeptur	73
8.3	Charakterisierung.....	76

8.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	76
D Zusammenfassung	78
1. Zusammenfassung in deutscher Sprache	78
2. Zusammenfassung in englischer Sprache.....	81
E Experimenteller Teil	83
1. Substanzen	83
1.1 Methylenblau	83
1.2 Ionenaustauscher	86
1.3 Analytische Standards.....	87
1.4 Hilfsstoffe und Laborchemikalien.....	87
2. Herstellungsmethoden.....	89
2.1 Herstellung der Resinate	89
2.2 Herstellung der Suspensionen im Labormaßstab.....	89
2.3 Herstellung der Suspensionen im Pilot-Maßstab.....	90
3. Untersuchungsmethoden	91
3.1 UV/VIS-Spektroskopie.....	91
3.2 HPLC mit UV/VIS-Detektion (DAD)	92
3.2.1 Methodenauswahl.....	92
3.2.2 Herstellung der Zersetzungsproben.....	94
3.2.3 Probenvorbereitung.....	94
3.3 HPLC mit massenspektrometrischer Detektion	95
3.4 Atomabsorptionsspektroskopie.....	96
3.5 Gaschromatographie zur Restlösemittelbestimmung	98
3.6 Rheologische Untersuchungen.....	100
3.7 Dichtebestimmung	101
3.8 Rasterelektronenmikroskopie	101
3.9 Röntgendiffraktometrie	101
3.10 Nachweis von Formaldehyd mittels Chromotropsäure-Reaktion	101
3.11 Wasserbestimmung.....	102
3.11.1 Karl Fischer-Titration, volumetrisch.....	102
3.11.2 Karl Fischer-Titration mit Stickstoff-Begasung, coulometrisch ..	102
3.11.3 Bestimmung nach USP-Methode	103
3.11.4 Bestimmung nach Ph. Eur.-Methode	103
3.11.5 Bestimmung mit Infrarot-Trocknungswaage.....	103

INHALTSVERZEICHNIS

3.12	Dynamische Wasserdampfsorption.....	103
3.13	Untersuchungen mit Probanden.....	104
3.14	pH-Wert-Messung	104
3.15	Stabilitätsprüfungen	104
3.15.1	Anbruchstabilität	104
3.15.2	Lagerstabilität	105
F	Literaturverzeichnis/Quellen	106
G	Danksagung	114
H	Selbsttätigkeitserklärung	115

Abkürzungen

A	Absorption
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ADI	Acceptable Daily Intake
Al	Aluminium
API	Active Pharmaceutical Ingredient
AUC	Area Under The Curve
BE	Belgien
BP	British Pharmacopoeia
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
Cd	Cadmium
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
Cl	Chlorid
CPMP	Committee on Proprietary Medicinal Products
Cr	Chrom
CRS	Chemische Referenzsubstanz
Cu	Kupfer
d	Tag
DAD	Diodenarray Detektor
DE	Deutschland
d. h.	das heißt
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	European Medicines Agency
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Eisen
FR	Frankreich
g	Gramm
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GB	Grossbritannien
GIT	Gastrointestinal-Trakt
GK	Grenzkonzentration
GMP	Good Manufacturing Practice
GRAS	Generally recognized as safe
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

ABKÜRZUNGEN

HCl	Salzsäure
HEC	Hydroxyethylcellulose, Hyetellose (Ph. Eur.)
Hg	Quecksilber
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose, Hypromellose (Ph. Eur.)
ICH	International Conference on Harmonization
IgG	Immunglobulin G
IN	Indien
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
JP	Japan
JPE	Japanese Pharmaceutical Excipients
K	Kalium
KF	Karl Fischer
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
m	Masse
M	Molar
mAU*s	milli Absorption Units * Sekunde
MB	Methylenblau
MC	Methylcellulose
MCPBA	m-Chlorperbenzoesäure
MCT	Mittelkettige Triglyzeride
min	Minuten
mL	Milliliter
m/m	Verhältnis Masse zu Masse
mM	Millimolar
Mn	Mangan
Mo	Molybdän
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Anzahl an Einzelexperimenten; Stoffmenge
Na	Natrium
Na-CMC	Natrium-Carboxymethylcellulose, Carmellose-Natrium (Ph. Eur.)
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NaOH	Natriumhydroxid
Ni	Nickel
NOEL	No Observed Effect Level
ODT	Orodispersible Tablette
VIII	

Pb	Blei
PDE	Permitted Daily Exposure
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration und damit ein Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PIP	Paediatric Investigation Plan
pk _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstanten K _s , ein Maß für die Stärke einer Säure
ppm	parts per million
PUMA	Paediatric Use Marketing Authorization
PVP	Polyvinylpyrrolidon, Povidon (Ph. Eur.)
R	Reagenz des Europäischen Arzneibuchs
R2	Bestimmtheitsmaß
rF	relative Feuchte
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
sec	Sekunden
Sn	Zinn
T _{Vol}	Volumenteile
TD	Tagesdosis
u. a.	unter Anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
US	Vereinigte Staaten von Amerika
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
USP	United States Pharmacopoeia
USP/NF	United States Pharmacopoeia, National Formulary
UV/VIS	Ultraviolettes und sichtbares Licht
V	Volumen
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink
%	Prozent
®	Registriertes Warenzeichen
™	Trademark

A Einleitung und Ziel der Arbeit

1. Einleitung

Malaria ist eine seit Jahrtausenden bekannte und gefürchtete Krankheit (Hempelmann et al., 2009). Trotz ständiger Forschung und neuer Erkenntnisse, Arzneimitteln, Eradikations-Programmen und Prophylaxe-Maßnahmen ist sie auch heute noch die bedeutendste und eine der am weitesten verbreiteten parasitären Infektionskrankheiten des Menschen weltweit (Holzgrabe, 2009; Frimmel et al., 2009).

Im Jahr 2008 gab es international geschätzte 243 Millionen Neuerkrankungen mit bis zu einer Million Todesfällen. 85% der Neuerkrankungen und 89% der Todesfälle treten im subsaharischen Afrika auf. 88% der Todesfälle ereignen sich in der Altersgruppe von Kindern unter fünf Jahren (WHO, 2009); jeden Tag sterben 1700 Kinder unter fünf an Malaria (WHO, 2010a).

Erwachsene in Endemie-Gebieten haben in aller Regel bereits eine Malaria-Erkrankung überlebt und verfügen über eine gewisse Immunsisierung. Kinder unter sechs Monaten verfügen über den sogenannten „Nestschutz“ in Form von plazentär übertragenen IgG-Antikörpern der Mutter sowie einem hohen Anteil an fetalem Hämoglobin, der sie vor einer Erkrankung schützt. Dieser Nestschutz geht innerhalb der ersten sechs Monate nach der Geburt verloren und die Kinder sind anfällig für eine Erkrankung (Mockenhaupt, 2005).

Malaria wird von einzelligen Parasiten der Gattung Plasmodium hervorgerufen, die durch den Biss weiblicher Moskitos der Gattung Anopheles übertragen werden. Zurzeit sind fünf verschiedene humanpathogene Plasmodium-Arten bekannt, mit unterschiedlich gravierenden Krankheitsverläufen. Plasmodium vivax und Plasmodium ovale, die die Malaria tertiana verursachen, und Plasmodium malariae, die für die Malaria quartana verantwortlich ist, zählen zu den benignen Plasmodium-Arten, deren Infektionen in der Regel keine lebensbedrohlichen Erkrankungen darstellen. Plasmodium knowlesi verursacht hauptsächlich Infektionen bei Makaken und ist momentan ausschließlich in Südostasien zu finden, steht aber seit Kurzem in der Diskussion, auch beim Menschen Erkrankungen auszulösen. Die bei weitem gefährlichste und gleichzeitig häufigste Art ist Plasmodium falciparum, das die potentiell tödlich verlaufende Malaria tropica verursacht (Frimmel et al., 2009).

Infektionen mit Plasmodien werden unterschieden in unkomplizierte und schwere zerebrale Malaria. Symptome der unkomplizierten Malaria sind Fieber, Gelenk- und Kopfschmerzen. Charakteristisch für schwere zerebrale Malaria sind Bewusstseins-trübung oder Koma, starke Erschöpfungszustände, wiederholte Fieberkrämpfe,

Atemnot aufgrund von metabolischer Acidose, schwere Hypoglykämie und Hyperparasitämie. 1 - 2 % der infizierten Kinder entwickeln eine schwere zerebrale Malaria, mit einer Sterblichkeitsrate von 15 - 50 %. Bei 10 % der Überlebenden bleiben neurologische Schäden zurück. Nahezu alle schweren Fälle der Malaria werden von Plasmodium falciparum verursacht. Bei erkrankten Erwachsenen treten diese Komplikationen durchschnittlich nach fünf bis sieben Tagen auf, bei erkrankten Kindern nach nur ein bis zwei Tagen (Bell et al., 2005; Gilles, 1991). Diese Tatsache unterstreicht die Wichtigkeit einer schnell verfügbaren und flächendeckenden, für die Pädiatrie geeigneten Therapie für Malaria tropica.

In Anbetracht der weiten Verbreitung der Malaria und ihrer Bedeutung als Infektionskrankheit, stehen vergleichsweise wenig effektive Wirkstoffe für Therapie und Prophylaxe zur Verfügung (Schlitzer, 2009). Zunehmende Resistenzbildungen, Nebenwirkungen und mangelnde Verfügbarkeit der Arzneimittel in den primär betroffenen Gebieten stellen weitere gravierende Einschränkungen dar. Die globale Klimaerwärmung könnte mit zunehmender geographischer Verbreitung der Erreger bzw. ihrer Vektoren, sowie erhöhten Erkrankungsfällen in bereits betroffenen Gebieten, die Situation zusätzlich verschärfen (Frimmel et al., 2009).

Bemühungen der Forschung, einen Impfstoff gegen Malaria zu entwickeln, waren in den letzten 70 Jahren erfolglos. Kürzlich waren zwar erste Erfolge mit einem neu entwickelten Impfstoff in einer klinischen Studie Phase IIb zu verzeichnen, allerdings wurde die Studie in einem nicht endemischen Gebiet in Afrika durchgeführt. Die Ergebnisse sind zwar prinzipiell ermutigend, aber eine flächendeckende Immunisierung, insbesondere der Bevölkerung in den primär betroffenen Gebieten, bleibt bis auf weiteres ungewiss (Holzgrabe, 2009). Somit ist und bleibt eine wirksame medikamentöse Therapie mit vorhandenen oder neuen Wirkstoffen für viele Menschen überlebenswichtig.

Mit Ausnahme der Tetracycline gibt es für die verfügbaren Wirkstoffe keine Beweise für spezifische schwerwiegende Toxizität bei Kindern älter als zwölf Monate, aber auch keine zuverlässigen, auf Fakten basierenden Empfehlungen für Kinder (WHO, 2010b). Zur Pharmakokinetik bei Kleinkindern sind nur sehr begrenzt Daten verfügbar, was fundierte Dosierungsempfehlungen praktisch unmöglich macht. Darüber hinaus gibt es kaum für die Pädiatrie geeignete Darreichungsformen. Meist werden nach WHO-Empfehlung für Erwachsene entwickelte Tabletten geteilt oder pulverisiert verabreicht. Konsequenzen sind schwankende oder falsche Dosierungen mit zahlreichen Gefahren wie ungenügende Wirksamkeit, Toxizität und Resistenzbildung, mangelnde Geschmacksmaskierung und potentielle Nebenwirkungen durch ungeeignete Hilfsstoffe.

Auch in der Europäischen Union wurden die Bedürfnisse von Kindern in der Arzneimittelentwicklung lange Zeit nicht berücksichtigt. Im praktischen Alltag von Kinderärzten ist somit aus Mangel an Alternativen die nicht zulassungskonforme Verordnung von für Erwachsene entwickelten Arzneimitteln („off-label use“) sowie die Verordnung eines Rezepturarzneimittels durch die Apotheke („unlicensed use“) an der Tagesordnung (Breitkreutz, 2009). Pädiatrische Dosierungen werden aufgrund von Erfahrungen angepasst oder, bezogen auf Körpergewicht oder Körperoberfläche, heruntergerechnet. Kinder sind aber keineswegs „kleine Erwachsene“, sondern haben aufgrund ihres Entwicklungsstandes sehr unterschiedliche und spezielle Bedürfnisse, sowohl in Bezug auf die eingesetzten Arznei- und Hilfsstoffe als auch auf die Darreichungsform.

Kinder als Patienten sind eine sehr heterogene Subpopulation, die sich in mehrere Altersgruppen mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften und Bedürfnissen aufspaltet. Ergänzend zur Leitlinie E 11 der Internationalen Harmonisierungskonferenz (ICH) unterscheidet das Reflection Paper „Formulations of choice for the paediatric population“ der EMA, zusammen mit dem „Committee For Medicinal Products For Human Use“ (CHMP) (EMA 2006) insgesamt sechs Gruppen:

1. Frühgeborene
2. Neugeborene (0 - 27 Tage)
3. Säuglinge und Kleinkinder (1 - 23 Monate)
4. Vorschulkinder (2 - 5 Jahre)
5. Schulkinder (6 - 11 Jahre)
6. Jugendliche (12 - 16/18 Jahre)

Die Einteilung trägt diversen anatomischen, physiologischen und pharmakokinetischen Faktoren Rechnung, wie z. B. juvenile Wachstums- und Entwicklungsphasen, Körperfett-/Körperwasser-Verhältnis, dem Verhältnis von Körpergewicht zu Körperoberfläche, Proteinbindungsrate, renale Eliminationsrate oder Reifegrad des enzymatischen Metabolismus.

Im Januar 2007 trat die Europäische Verordnung „Better Medicines for Children“ in Kraft und setzte neue Maßstäbe für die Entwicklung von Arzneimitteln (EU Verordnung, 2006). Ziel ist es, die Qualität der pädiatrischen Arzneimittelversorgung durch Anforderungen und Anreize für die pharmazeutische Industrie zu verbessern. Anforderungen sind z. B. die pädiatrischen Prüfkonzeppte (Paediatric investigation plans, = PIPs), die für jeden neuen Arzneistoff zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt dem Pädiatrischen Komitee der EMA zur Überprüfung und Genehmigung vorgelegt werden müssen. Anreize für die Industrie stellen ergänzende Zertifikate zum Produkt-

schutz bei neuen Arzneistoffen und sogenannte PUMAs (paediatric use marketing authorisation) dar. Firmen können für patentfreie Wirkstoffe spezielle Darreichungsformen entwickeln, deren Eignung für die Pädiatrie bezüglich Wirksamkeit, Unbedenklichkeit, Dosierung, Applikationsform und Verabreichung durch klinische Studien belegt werden muss. Ein solches Produkt erlangt eine zehnjährige Markt-exklusivität für die Anwendung bei Kindern (EU Verordnung, 2006).

Bei Arzneimitteln für Krankheiten in armen Ländern der Welt spielen weitere Kriterien eine wichtige Rolle, die in dem Akronym BONARIA zusammengefasst werden. „BON“ steht hier für *gut*, im Sinne von sicher, effektiv und kombinierbar; „A“ steht für *affordable*, also bezahlbar auch für die Ärmsten der Welt; „R“ für *registered*, d. h. zumindest in einem Land für mindestens eine Indikation bereits zugelassen, und „IA“ steht für *internationally available*, sprich weltweit in ausreichender Menge verfügbar (Schirmer, 2004).

In dem Bestreben, notwendige Arzneimittel zu erschwinglichen Preisen zur Verfügung zu stellen, setzte die WHO in gemeinsamem Bemühen mit ersten Vertretern der Pharmaindustrie das Kostenziel von 1 US-Dollar pro Behandlungszyklus eines Kindes (Rollbackmalaria, 2010). Diese Bedingung stellt eine weitere Herausforderung für die Arzneimittelentwicklung in der Pharmaindustrie dar, nicht nur im Hinblick auf die Kosten des Wirkstoffs. Auch die Wahl der Darreichungsform stellt eine nicht unerhebliche Variabilität hinsichtlich Kosten der eingesetzten Hilfsstoffe, Herstellungsprozesse und Verpackungsformen dar.

Der Phenothiazin-Farbstoff Methylenblau (MB) ist schon seit dem Ende des 19. Jahrhunderts als wirksamer Arzneistoff gegen *Malaria tropica* bekannt und wurde bei Erwachsenen und Kindern in unterschiedlichen Feldversuchen erfolgreich in Europa und Südamerika eingesetzt (Guttman et al., 1891; Ferreira, 1893). Nach fast hundert Jahren Vergessenheit wurde MB kürzlich als neuer Hoffnungsträger gegen *Malaria* wiederentdeckt. Im Jahr 2007 schien MB den BONARIA-Kriterien zu entsprechen (Becker et al., 2007). MB besitzt in den USA eine „federal trademark registration“ in der Kategorie „Lederprodukte unter Ausschluss von Kleidung“ und wird als Harnwegsdesinfizienz sowie als Anregungsmittel für Schleimhäute geführt. Tabletten mit MB als Wirkstoff sind in USA u. a. unter dem Namen Urolene blue[®] im Handel. Aktuelle klinische Studien belegen eine zuverlässige Wirkung und Unbedenklichkeit bei Erwachsenen und auch Kindern. Die Therapien in den klinischen Studien konnten durchgeführt werden, ohne die Kostenanforderungen der WHO zu überschreiten. Allerdings waren die stark färbenden Eigenschaften und der bitter-metallische Geschmack ein erheblicher Nachteil, der einen Erfolg der Therapie besonders bei Kindern gefährdete (Walter-Sack et al., 2009).

Zurzeit gibt es keine orale Darreichungsform mit MB auf dem Markt, die für Kinder geeignet ist. Einige klinische Studien an Erwachsenen wurden mit MB Tabletten (Urolene blue[®]) durchgeführt, die für andere Indikationen zugelassen sind. Andere Studien, auch die mit Kindern, fanden unter Gabe wässriger MB-Lösungen zur peroralen Anwendung statt (Zoungrana et al., 2008; Walter-Sack et al., 2009). Bei der Verabreichung der bitter-metallischen Flüssigkeit an Kinder traten Schwierigkeiten auf, wie Einnahmeverweigerung, Übelkeit und Erbrechen. Die Entwicklung einer geschmacksmaskierten Darreichungsform mit MB für die Pädiatrie ist unerlässlich, um eine sichere Verabreichung und möglichst vollständige Bioverfügbarkeit sicherzustellen.

In der Entwicklung einer neuen Arzneizubereitung von MB sollten neben Bioverfügbarkeit und Geschmacksmaskierung noch weitere Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen sollte die Darreichungsform für alle Altersgruppen zwischen sechs Monaten und fünf Jahren anwendbar sein, sowohl in Hinblick auf die enthaltenen Hilfsstoffe als auch auf Form und Konsistenz der Zubereitung. Zudem sollten die Stabilität und die Applikationsfähigkeit für den Einsatz in den primär betroffenen tropischen Gebieten gewährleistet sein sowie der Kostenvorgabe der WHO entsprechen.

Die erfolgreiche Entwicklung einer neuen Arzneizubereitung, die diesen Anforderungen entspricht, wäre ein wichtiger Schritt im weiteren Kampf gegen die Malaria.

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer pädiatrischen Arzneizubereitung mit dem Wirkstoff MB zur Behandlung der unkomplizierten Malaria tropica bei Kindern im Alter zwischen sechs Monaten und fünf Jahren.

Als Basis der vorliegenden Arbeit diente ein zuvor von Gut et al. (2008) entwickelter MB-Ionenaustauscher-Komplex (MB-Resinat) mit dem Ziel, die färbenden Eigenschaften zu reduzieren und den bitter-metallischen Geschmack zu maskieren.

Die pädiatrische Zubereitung mit MB-Resinat als Wirkstoffkomplex sollte in ihren Eigenschaften charakterisiert und wichtige Einflussgrößen auf die rheologischen Eigenschaften, den Geschmack und das Mundgefühl der Zubereitung aufgeklärt werden.

Verschiedene Hersteller-Qualitäten von MB Ausgangssubstanzen, unterschiedliche Ionenaustauscher sowie deren entsprechende MB-Resinate sollten auf ihre Eigenschaften sowie ihre Eignung für eine pädiatrische Zubereitung hin untersucht und charakterisiert werden.

Für die unter bestimmten Prozessbedingungen beobachtete Zersetzung des MB wurden verschiedene Hypothesen zum Reaktionsmechanismus untersucht, als auch Möglichkeiten aufgezeigt, die Zersetzung während des Herstellungsprozesses zu unterbinden.

Für klinische Studien zur Pharmakokinetik der Zubereitung bei Kindern sollten zwei Klinikchargen unter GMP Bedingungen hergestellt werden. Die Anbruchstabilität und die Lagerstabilität bei zwei unterschiedlichen Klimabedingungen sollten geprüft werden.

B Allgemeiner Teil

1. Methylenblau

3,7-Bis(dimethylamino)phenazathioniumchlorid oder Methylthioniniumchlorid, besser bekannt als Methylenblau (MB) (Abbildung 1), ist ein Farbstoff mit Phenothiazin-Struktur. Es liegt meist als Chlorid-Salz vor, und enthält bei den üblichen Lagerbedingungen in der Regel drei Mol Hydratwasser. Ursprünglich für die Textilfärbung entwickelt, erscheint es trocken laut Ph. Eur. entweder als dunkelblaue Kristalle mit kupferfarbenem Glanz oder dunkelgrüne Kristalle mit bronzefarbenem Glanz. Die wässrige Lösung ist tiefblau, auch schon bei sehr geringen Konzentrationen. Unter reduzierenden Bedingungen wird MB in seine farblose Leukobase (Leuko-MB) umgewandelt.

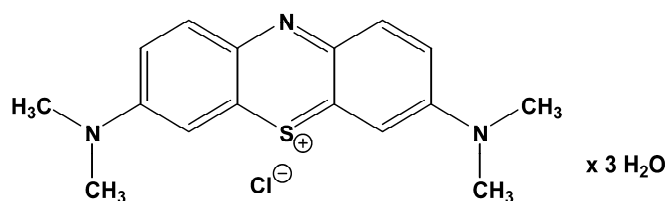


Abbildung 1: Strukturformel von MB

Der pK_s -Wert von MB liegt zwischen 0 und -1, folglich liegt MB im gesamten pH-Bereich des GIT-Traktes (pH 1-8) vollständig ionisiert vor (DiSanto et al., 1972b). Stoffwechselprodukte des MB sind sowohl das Leuko-MB (DiSanto et al., 1972b) als auch N-demethylierte Homologe des MB wie Azur A und Azur B (Warth et al., 2009). MB zeigt sowohl nach intravenöser als auch nach oraler Verabreichung eine komplexe multikompartimentelle Pharmakokinetik mit unterschiedlicher Organ-Verteilung. Bei intravenöser Administration reichert sich MB bevorzugt im zentralen Nervensystem und Gehirn an, bei oraler Einnahme eher in Leber und Darmwand. Neuere Untersuchungen zeigen außerdem eine Anreicherung im Myokard (Peter et al., 2000; Warth et al., 2009). Die terminale Plasma-Halbwertszeit nach intravenöser Applikation wird mit 5 - 6 h angegeben (Peter et al., 2000). Die orale Absorption liegt zwischen 53 % und 97 %, mit einem Konzentrationsmaximum im Plasma nach 30 - 60 Minuten (Faber et al., 2005).

MB ist das älteste synthetische Chemotherapeutikum der Geschichte. Es wurde 1876 erstmals synthetisiert und wurde von Guttman und Ehrlich zur selektiven Färbung von Zellen angewandt. Da lebende Zellen angefärbt werden können, zählt MB zu den

Vitalfarbstoffen. MB ist allerdings kein effizienter Farbstoff für normale Erythrozyten, wohl aber für von Plasmodien befallene rote Blutkörperchen. Aufgrund der Erkenntnis, dass MB auch physiologische Prozesse in Bakterien und Protozoen beeinflussen kann, bewiesen Guttman und Ehrlich, dass MB auch als Chemotherapeutikum dienen kann und behandelten erfolgreich Fälle der Malaria, wenn Chinin nicht zur Verfügung stand (Guttman et al., 1891).

Die intensive Blaufärbung verhinderte allerdings, dass MB als Malaria-Therapeutikum weiterverfolgt wurde. Es diente im Folgenden als Leitsubstanz für die Entwicklung weiterer Antiprotozoika. Durch Seitenkettenerweiterungen oder Chromophorvariationen entstanden antiplasmodische Wirkstoffe wie Chloroquin, Quinacrin, Pamaquin oder Primaquin. Auch moderne Wirkstoffe wie Amodiaquin oder Tafenoquin beruhen auf der Grundstruktur von MB. Das Neuroleptikum Chlorpromazin ist ebenfalls strukturverwandt mit MB und zeigt sowohl in vitro als auch in vivo antiplasmodische Wirkung (Wainwright et al., 2005).

MB geriet als Antimalariamittel durch modernere Alternativen in Vergessenheit, wird aber in anderen Gebieten der medizinischen Diagnostik und Therapie eingesetzt. Heute sind die Haupteinsatzgebiete von MB Sentinel-Lymphknoten-Mapping bei verschiedenen Tumorarten (Chu et al., 2009), Pathogen-Inaktivierung von Plasma (Seghatchian et al., 2008), Behandlung von akuter und chronischer Methämoglobinämie (Mehta, 2006) und von Ifosfamid-induzierter Enzephalopathie (Pelgrims et al., 2000). In den USA wird MB als Harnwegsdesinfizienz angewandt (Urolene blue®).

Im Zuge neuer Erkenntnisse bezüglich des Wirkmechanismus von MB bei Malaria erfährt der Wirkstoff neues Interesse im Bereich der medizinischen und pharmakologischen Forschung (Becker et al., 2007). MB zeigt in Untersuchungen nur sehr geringfügige Tendenz zur Entwicklung von Resistenzen. Diese fehlende Resistenzbildung könnte durch die pleiotrope Wirkung von MB erklärt werden, da zwei verschiedene Wirkmechanismen für MB beschrieben werden (Buchholz, 2008):

1. Heranwachsende Parasiten im Erythrozyten ernähren sich von Proteinen wie Hämoglobin. Zusätzlich installieren sie Transporter in der Zellmembran, um sie permeabel für benötigte essentielle Aminosäuren zu machen. Dies wiederum ermöglicht zuvor ausgeschlossenen hydrophilen Stoffen wie MB den Zutritt in die Zellen (Wainwright et al., 2005). Das beim Hämoglobinabbau freiwerdende, für den Parasiten toxische Häm, wird vom Parasiten zum Hämozoin kristallisiert und somit detoxifiziert. MB interferiert mit der Polymerisation von Häm in Hämozoin in der Nahrungsvakuole des Parasiten. Auch gibt es Hinweise in der Literatur, dass eher Methämoglobin als Hämoglobin das Substrat der parasitären Proteasen ist, und dass MB den (Met)hämoglobin-Abbau und somit auch das Wachstum der Parasiten hemmt (Akompong et al., 2000; Schirmer et al., 2003). Da die beschriebenen Angriffspunkte

Methämoglobin und Hämозoin nicht durch das Plasmodium-Genom reguliert werden können, ist eine Resistenzbildung unwahrscheinlich (Buchholz, 2008).

2. Der Lebenszyklus von Plasmodien besteht aus mehreren Phasen. In fast allen Entwicklungsstadien, besonders in der erythrozytären Phase, sind die Plasmodien oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aus unterschiedlichen Stoffwechselquellen ausgesetzt. Aus diesem Grund verfügen sie über ein Netzwerk verschiedener antioxidativer Proteine, mit denen sie sich von den ROS schützen. Eines von mehreren Schlüsselenzymen dieses antioxidativen Netzwerks ist die Glutathionreduktase. Diese hält im Plasmodium ein reduzierendes Milieu durch geringe Mengen an Glutathion aufrecht, welches wiederum MB zu Leuko-MB reduziert. MB als autoxidierender Redoxpendler produziert in jedem enzymkatalysiertem Redoxzyklus zytotoxisches, also in diesem Fall parasitotoxisches H_2O_2 (siehe Abbildung 2). Aufgrund dieser Eigenschaft wird MB auch als Sabotage-Inhibitor bezeichnet, da der Schutzmechanismus des Parasiten zu dessen Selbsterstörung genutzt wird (Becker et al, 2007).

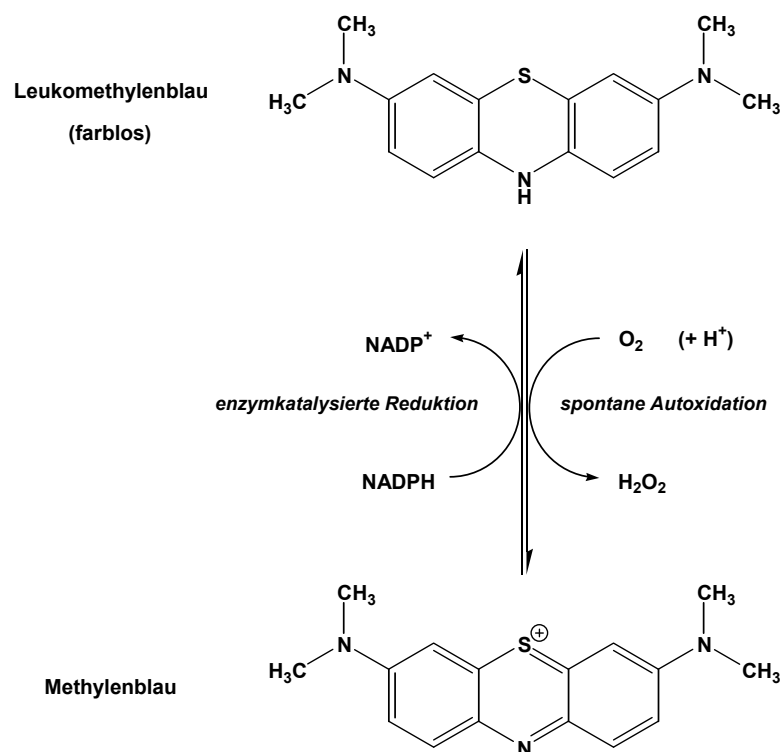


Abbildung 2: MB als autoxidierender Redoxpendler, adaptiert nach Becker et al., (2007)

Für die Funktion der Glutathionreduktase wird NADPH als Cofaktor benötigt. NADPH entsteht im Zuckerstoffwechsel (Pentosephosphat- oder Hexosemonophosphat-Zyklus), bei dem das Enzym Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PD) Glukose-6-phosphat in D-glucono-1,5-lacton-6-phosphat umwandelt, unter Umsetzung von $NADP^+$ zu NADPH. G6PD wird somit für die Regenerierung von NADPH aus $NADP^+$ benötigt und ist letztendlich für die Aufrechterhaltung der antioxidativen Kapazitäten

sowohl im Menschen als auch im Plasmodium verantwortlich, da der Parasit das NADPH der Wirtszelle (Erythrozyt) für das eigene antioxidative Netzwerk nutzt. Ein angeborener G6PD-Mangel geht mit einer reduzierten Verfügbarkeit von NADPH einher und kommt beim Menschen in unterschiedlich starken Ausprägungen vor, von beschwerdefreiem Verlauf bis hin zur lebensgefährlichen hämolytischen Krise. Die genetisch veranlagte Krankheit kommt vorwiegend in Teilen der Welt vor, in denen Malaria endemisch ist. Eine Coevolution ist wahrscheinlich, da der G6PD-Mangel einen gewissen Schutz vor Malaria verleiht (Buchholz, 2008).

MB wurde mit Fällen schwerer Hämolyse bei Menschen mit G6PD-Mangel in Verbindung gebracht. Eine Sicherheits-Studie jedoch hat die potentielle Gefahr relativiert und bescheinigt MB ein positives Risiko-Nutzen-Verhältnis (Mandi et al., 2005).

Neben Malaria ist MB als potentieller Wirkstoff noch für weitere Indikationen interessant. So zeigt sich MB bei der Therapie des dementiellen Alzheimer Syndroms erfolgversprechend (Oz et al., 2009). auch für die Behandlung einer Infektion mit dem Hepatitis C Virus wurden bereits klinische Studien durchgeführt (Smith, 2006). MB zeigt als sogenannter Photosensitizer breitgefächerte antiinfektiöse (antibakteriell, antiviral, antimykotisch) sowie antiinflammatorische und antitumorale Wirkungen (Čulo et al., 1991, Harris et al., 2005). Diese Vielzahl an Eigenschaften bietet ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten für MB als Wirkstoff. Dabei ist zu erwähnen, dass zumindest bei einigen Eigenschaften nicht restlich geklärt ist, ob MB selbst oder eines bzw. mehrere seiner Stoffwechselprodukte für die Wirkungen verantwortlich ist (Čulo et al., 1991). Dieser Frage wird zurzeit in mehreren Untersuchungen nachgegangen.

2. Ionenaustauscherharze

Jedes Material, das die Fähigkeit besitzt, Ionen aus einer Lösung zu entfernen unter simultaner Freigabe anderer Ionen in ladungsäquivalenten Mengen, kann als Ionenaustauscher bezeichnet werden (Kunin, 1960). Ionenaustauscher können natürlich vorkommen oder synthetisiert werden. Beispiele für natürlich vorkommende Ionenaustauscher sind Bentonit, Zeolithe oder Montmorillonit (Kunin, 1972), wobei diese Tonminerale auch chemisch modifiziert vorliegen können.

Synthetische Ionenaustauscher sind in der Regel unlösliche, quervernetzte Copolymere. Hergestellt werden sie durch radikalische Polymerisation von Acrylsäure, Methacrylsäure, Styrol oder substituierten Styrolen, oder auch Kombinationen hieraus. Typische Substituenten sind z. B. Sulfonat- oder Aminogruppen. Durch Reaktion mit Divinylbenzol wird eine Quervernetzung und daraus resultierende Unlöslichkeit des

so genannten Ionenaustauscherharzes erreicht. In diese Grundstruktur können verschiedene funktionelle Gruppen eingeführt werden (Kunin, 1960).

Ionenaustauscher kommen in großpartikulärer Form (beads), in Pulverform oder in Gelform mit nicht permanenten Porenstrukturen vor. Die in dieser Arbeit verwendeten Ionenaustauscher sind feine Pulver mit Partikelgrößen $< 150 \mu\text{m}$.

Die Vielfalt an Ionenaustauschern kann in vier Gruppen eingeteilt werden. Es gibt die so genannten starken und schwachen sauren Kationenaustauscher sowie die starken und schwachen basischen Anionenaustauscher. Die unlösliche Polymer-Kette, an der die funktionellen Gruppen angefügt sind, wird zur Vereinfachung der Schreibweise in der Regel mit R abgekürzt. Folglich kann ein starker Kationenaustauscher, der seine Austauschaktivität durch Sulfonsäure-Gruppen ausübt, mit $\text{R-SO}_3\text{H}$ beschrieben werden. Normalerweise liegen diese Ionenaustauscher in der neutralisierten Natriumsalz-Form vor ($\text{R-SO}_3\text{Na}$). Schwache Kationenaustauscher werden mit ihren funktionellen Carboxyl-Gruppen als R-COOH , oder in neutralisierter Kaliumsalz-Form als R-COOK bezeichnet. Schwache Anionenaustauscher stellen beispielsweise R-NH_2 dar, starke Anionenaustauscher $\text{R-N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Kationenaustauscher verwendet. Beispielhaft werden in Abbildung 3 die Polymerstrukturen von drei der verwendeten Kationenaustauscher gezeigt: Amberlite IRP[®] 64, ein schwacher Kationenaustauscher mit freier Säuregruppe (links), Amberlite IRP[®] 88, ein schwacher Kationenaustauscher mit neutralisierter Säuregruppe (Mitte) sowie Amberlite IRP[®] 69, ein starker Kationenaustauscher mit neutralisierter Säuregruppe (rechts).

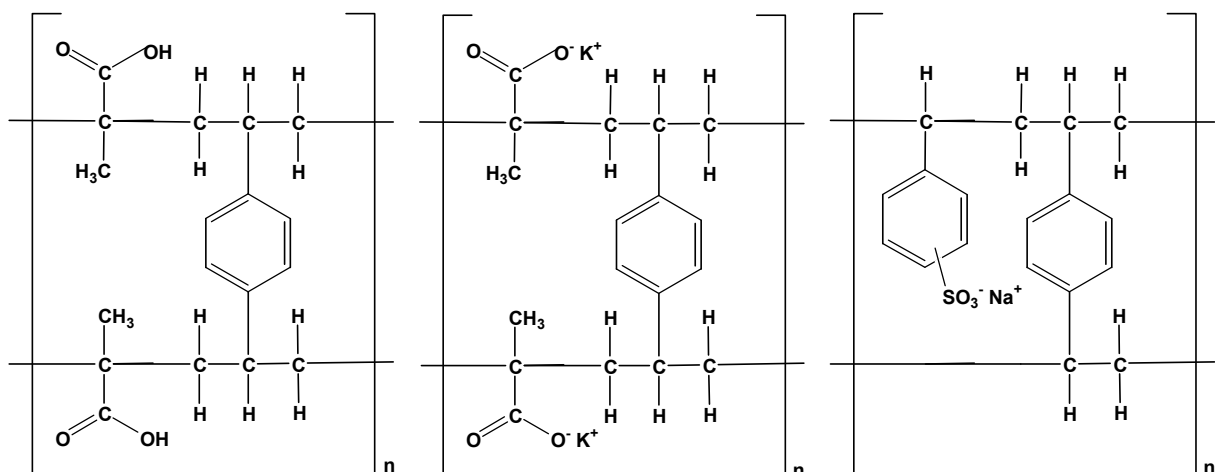


Abbildung 3: Strukturelemente von verschiedenen Ionenaustauschern. Links: Amberlite IRP[®] 64, Mitte: Amberlite IRP[®] 88, Rechts: Amberlite IRP[®] 69

Die so genannte Gesamt-Beladungskapazität („total available capacity“) ist ein Maß für die Konzentration der ionenaustauschenden Gruppen in einer Volumen- oder Masseneinheit des Ionenaustauschers (Kunin, 1960). Sie kann nur analytisch

bestimmt werden und gibt die theoretisch maximale Austauschkapazität an. Sie ist nicht mit der so genannten „operating capacity“ zu verwechseln, die die praktische Beladungskapazität beschreibt und in der Praxis die relevante Größe ist. Die operating capacity ist in aller Regel geringer als die total capacity, und wird beeinflusst durch Parameter wie z. B. Ladungsdichte, Ionen-Konzentration, Regenerationsreagenz und -konzentration, Temperatur, pH-Wert, Spezifität etc. (Kunin, 1960). Bei der Beladung von größeren Molekülen wie z. B. Arzneistoffen kommen zusätzlich noch sterische Behinderungen hinzu, je nach Größe und Beweglichkeit des Polymernetzwerks und des Arzneistoffmoleküls.

Unbeladene Ionenaustauscher werden auch Harze oder Resine genannt, wobei die IUPAC die Bezeichnung „Resin“ nicht unterstützt. Beladene Ionenaustauscher, also Stoff-Ionenaustauscher-Komplexe, werden als Resinate bezeichnet.

Die Einsatzbereiche von Ionenaustauschern sind vielfältig. So kommen Ionenaustauscher z. B. im Bereich der Wasseraufbereitung zum Einsatz, wie Wasserenthärtung, Demineralisierung, Entfernung bzw. Rückgewinnung von Metallen sowie Reinigung von Abwasser. Aufreinigungsschritte bei der Herstellung von Reagenzien, Lösungsmitteln, Metallen, Zuckern oder Biologicals können von Ionenaustauschern übernommen werden. Auch in der organischen Synthese werden Ionenaustauscher eingesetzt, indem sie als heterogene katalytische Plattform z. B. für Veresterungen, Kondensationen, Acylierungen und Zucker-Inversion dienen (Kunin, 1967).

Im medizinischen und pharmazeutischen Bereich werden Ionenaustauscher sowohl als Hilfsstoff als auch als Wirkstoff eingesetzt. Als Wirkstoff dienen sie zur Natrium- oder Kalium-Reduktion, als Antazidum, zur Diagnostik, bei Hautproblemen oder als Antidot zur Entfernung von Toxinen. Als Hilfsstoff dienen sie z. B. als Sprengmittel für Tabletten, zur Veränderung von Freisetzungsprofilen, zur Stabilisierung von labilen Substanzen und nicht zuletzt zur Geschmacksmaskierung von wasserlöslichen, ionischen Stoffen (Kunin, 1967).

Ionenaustauscher können auch zur selektiven Freisetzung von Wirkstoffen an spezifischen Orten im Körper genutzt werden, z. B. zum Schutz des Arzneistoffs (Säurelabilität) oder bestimmter Organe (Schutz der Magenschleimhaut). Kationenaustauscher binden kationische Arzneistoffe und geben diese im sauren pH-Milieu im Austausch gegen H^+ wieder frei, d. h. es erfolgt eine Freisetzung in die Magenflüssigkeit. Anionenaustauscher binden anionische Arzneistoffe. Bei diesen Resinaten erfolgt eine Desorption im pH-neutralen Milieu des Darmtraktes, meist im Austausch gegen Cl^- . Ein bekanntes Beispiel für eine pharmazeutische Darreichungsform mit Ionenaustauscher ist Voltaren Resinat[®] der Firma Novartis mit dem Antirheumatikum Diclofenac-Natrium als gebundenem Wirkstoff.

C Ergebnisse und Diskussion

1. Vorausgehende Entwicklungsarbeiten

Dieser Arbeit voraus gingen mehrere klinische Studien mit MB unserer multi-disziplinären Arbeitsgruppe mit der Universität Heidelberg in endemischen Gebieten im subsaharischen Afrika. Diese Studien zeigten, dass MB als Therapeutikum gegen Malaria sicher und effizient eingesetzt werden kann, sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern mit und ohne G6PD-Mangel (Rengelshausen et al., 2004; Mandi et al., 2005; Meissner et al., 2005; Meissner et al., 2006). Eine anthropologische Studie vorab ergab keinerlei Hinweise auf Ablehnung eines Medikamentes, welches als stets auftretende Nebenwirkung eine Blaufärbung des Urins zeigt. Auch die traditionellen Waschpraktiken konnten die blauen Verfärbungen in der Kleidung der Kinder und Mütter erfolgreich entfernen, so dass auch dies die Akzeptanz des MB nicht beeinträchtigte (Müller et al., 2007).

Die größten Herausforderungen bei der Therapie mit MB sind der bitter-metallische Geschmack, der besonders bei Kindern zu Erbrechen und Therapieverweigerung führt, sowie die lang anhaltende Blaufärbung des Mundraumes (Meissner et al., 2005; Walter-Sack et al., 2009; Gut et al., 2008).

Neben Standardmethoden zur Geschmacksverbesserung von Arzneimitteln, wie dem Einsatz von überdeckenden Aromastoffen und Süßungsmitteln oder dem Überziehen von monolithischen Darreichungsformen mit physikalischen Barrieren wie Zucker oder Polymeren, stehen zur Geschmacksmaskierung eine Reihe weiterer technologischer Verfahren zur Verfügung. So gibt es z. B. Mikroverkapselung, Assoziation mit Polymeren oder Gerbstoffen, Inklusions-Komplexe z. B. mit Cyclodextrinen, Festfettextrusion oder Resinatbildung durch Bindung eines ionischen Moleküls an einen unlöslichen Ionenaustauscher (Sharma et al., 2010; Krause, 2008).

Zur Geschmacksmaskierung des kationisch geladenen MB schien die Ionenaustausch-Technologie erfolgversprechend und wurde von Gut et al. (2008) untersucht. Mehrere Ionenaustauscher wurden getestet, darunter fünf schwache Kationentauscher mit Carboxyl-Funktion, und zwei starke mit Sulfonat-Funktion. Bei vier der fünf schwachen Kationentauschern (Indion[®] 234, Indion[®] 234S, Indion[®] 294, IRP[®] 88) sind die Carboxylgruppen mit dem Gegenion K⁺ neutralisiert, bei einem (IRP[®] 64) liegt die freie Säuregruppe vor. Die Sulfonatgruppen der starken Kationentauscher (Indion[®] 254, IRP[®] 69) tragen als Gegenion Na⁺.

Bei der Bildung eines Resinats aus unlöslichem Ionenaustauscher und MB in wässriger Lösung kommt es zu folgenden Gleichgewichtsreaktionen (Abbildung 4):

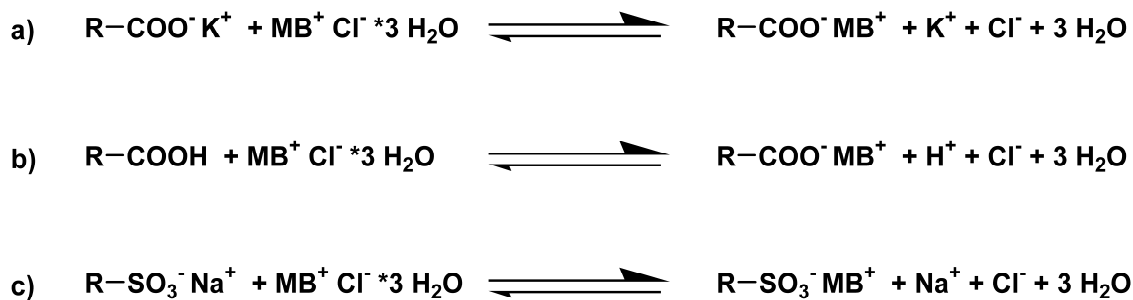


Abbildung 4: Gleichgewichtsreaktionen bei der Beladung verschiedener Kationentauscher mit MB
a) Indion[®] 234, Indion[®] 234S, Indion[®] 294, IRP[®] 88; b) IRP[®] 64; c) IRP[®] 69

Die Gleichgewichtskonzentrationen liegen überwiegend auf der rechten Seite des gebildeten Resinates. Im Resinat wird MB ohne Hydratwasser und ohne Chlorid-Gegenion gebunden. Das Gegenion des Harzes (K⁺, H⁺, Na⁺) fehlt im Resinat ebenfalls, im molaren Verhältnis 1:1 zu MB⁺. Dies muss bei der Berechnung, wie viel % des im Resinat gebundenen MB bei saurem pH-Wert desorbiert wird, bedacht werden, und ist insbesondere bei der Auswertung von Gehaltsbestimmungen und Freisetzungsversuchen essentiell.

Zur Verdeutlichung wird folgendes Rechenbeispiel herangezogen:

1000 mg Indion[®] 234 (R-COO⁻ K⁺) binden 2162 mg MB⁺ Cl⁻ 3 H₂O (Ergebnis nach Gut et al., 2008). Die Summe der Einwaagen ergäbe 3162 mg MB-Indion[®] 234-Resinat.

ABER:

2162 mg MB⁺ Cl⁻ 3 H₂O (373,9 g/mol) entsprechen 1644 mg MB⁺ (284,4 g/mol). Bei der Bildung des Resinates werden die Kationen MB⁺ und K⁺ im molaren Verhältnis 1:1 ausgetauscht. 1644 mg MB⁺ entsprechen 5,78 mmol MB⁺ (n = m/M), d. h. 5,78 mmol K⁺ (39,10 g/mol) werden vom Ionenaustauscher gelöst. 5,78 mmol K⁺ (39,10 g/mol) entsprechen 226 mg K⁺ (m = n * M), so dass von den anfangs eingesetzten 1000 mg Indion[®] 234 226 mg K⁺ abgezogen werden müssen. Im Resinat gebunden sind also die resultierenden 774 mg Indion[®] 234⁻ und die 1644 mg MB⁺, die Summe ergibt 2418 mg MB-Resinat.

⇒ um 2162 mg desorbiertes MB⁺ Cl⁻ 3 H₂O zu erhalten, müssen nicht 3162 mg MB-Resinat eingesetzt werden, sondern nur 2418 mg MB-Resinat

(Voraussetzung: 100 % Desorption)

Bei Dispergierung des MB-Resinats in pH-saurem Milieu, in vorliegenden Untersuchungen 0,1 M Salzsäure als künstliche Magenflüssigkeit, kommt es wiederum zu folgenden Gleichgewichtsreaktionen, die, analog zu den Gleichungen in Abbildung 4, in Abbildung 5 aufgeführt werden

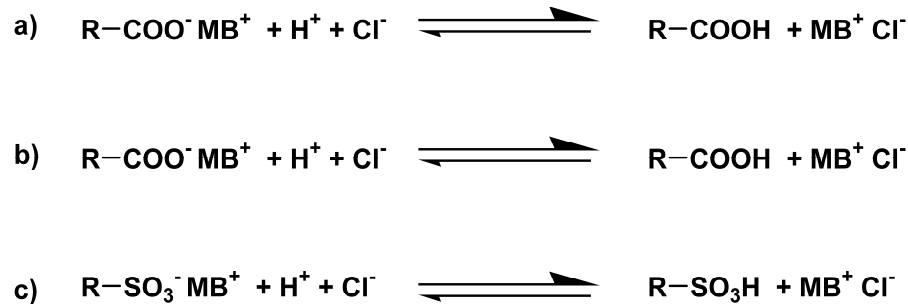


Abbildung 5: Gleichgewichtsreaktionen bei der MB-Desorption von verschiedenen Resinat-Typen
a) Indion[®] 234, Indion[®] 234S, Indion[®] 294, IRP[®] 88; b) IRP[®] 64; c) IRP[®] 69

Bei dem sauren Desorptions-Schritt liegt das Gleichgewicht bei pH 1 auf der rechten Seite. Das im Resinat gebundene MB wird durch H⁺ ersetzt und liegt wieder frei in Lösung vor. Die Harze werden protoniert und somit quasi regeneriert. Das Gleichgewicht wird durch den pH-Wert der Desorptionslösung beeinflusst, so dass bei weniger saurem pH-Milieu das Gleichgewicht weiter links liegt. Entsprechend weniger MB wird durch H⁺ ersetzt (desorbiert).

Aus diesen Gleichgewichtsreaktionen lässt sich folgern, dass der pH-Wert der Magenflüssigkeit eine wesentliche Rolle für die Massenbilanz des im Resinat gebundenen und des desorbierten MB spielt.

Der pH-Wert der Magenflüssigkeit unterliegt besonders bei Kindern starken Schwankungen. Bei der Geburt hat die Magenflüssigkeit einen pH-Wert von 6 - 8. Der Zeitraum, bis der pH-Wert dem eines Erwachsenen ähnelt, wird kontrovers diskutiert. Die Angaben schwanken zwischen einigen Stunden und einigen Wochen. Spätestens im Alter von vier bis sechs Wochen wird die Salzsäure-Produktion gesteigert und ermöglicht pH-Werte von 1,5 - 3, vergleichbar mit der Magenflüssigkeit Erwachsener (pH 1,5 - 2,5). Erhöhte Speichelproduktion im Kindesalter führt allerdings zur Verdünnung des Magensaftes und so zu leicht erhöhten pH-Werten der Magenflüssigkeit, auch in nüchternem Zustand (de Zwart et al., 2002).

Der Charakter der Motilität und Entleerung des Magens hat Einfluss auf die durchschnittliche Verweilzeit von Arzneiformen im Magen, und damit auf das zur Verfügung stehende Zeitfenster für die Desorption des MB. Bei Neugeborenen und Babys ist die Motilität des Magens im Vergleich zu Erwachsenen stark verlangsamt, wobei die Art der zugeführten Nahrung auch einen Einfluss hat. Ein daraus resultierendes verlängertes Zeitfenster für die Desorption im Magen könnte sich positiv auf die

desorbierte, und damit zur Resorption zur Verfügung stehende, Menge des MB auswirken. Es gibt kaum zuverlässige Daten über das durchschnittliche Alter, in dem sich Motilität und Entleerungszeit den Werten von Erwachsenen annähert. Einige Untersuchungen deuten jedoch an, dass diese Angleichung im Alter von sechs bis acht Monaten stattfindet (de Zwart et al., 2002). Somit ist nicht zu erwarten, dass ein signifikant verlängertes Zeitfenster für die Desorption des MB vom Resinat bei Kleinkindern zur Verfügung steht.

Ein erhöhter pH-Wert der Magenflüssigkeit kann jedoch zu einer gesteigerten Resorption von basischen Stoffen führen, mit resultierenden erhöhten Plasmakonzentrationen der basischen Stoffe im Vergleich zu älteren Kindern und Erwachsenen (de Zwart et al., 2002). Somit könnte eine reduzierte Desorption von MB vom Resinat, bedingt durch erhöhten pH-Wert der Magenflüssigkeit, teilweise oder ganz kompensiert werden durch eine gesteigerte Resorption des freigesetzten MB im Magen. Allerdings findet Resorption von Stoffen generell hauptsächlich im Dünndarm statt und nicht im Magen. Im Dünndarm herrschen in der Regel wieder deutlich höhere pH-Werte als im Magen. Das durch die Magensäure protonierte (regenerierte) Harz wird nicht resorbiert und gelangt ebenfalls in den Dünndarm. Inwieweit das Harz bei nahezu neutralen pH-Werten im Darm noch nicht resorbiertes MB erneut abfängt, bindet und somit der Resorption wieder entzieht, kann in vitro nur schwer nachvollzogen werden. Da es sich bei Adsorption und Desorption von MB um Gleichgewichtsreaktionen handelt, ist bei wechselnder MB-Konzentration möglicherweise auch nur ein kinetischer Unterschied gegeben.

Für am besten geeignet für die Weiterentwicklung einer pädiatrischen Zubereitung wurde von Gut et al. (2008) der Ionenaustauscher Indion[®] 234 beurteilt, da er in den durchgeführten Untersuchungen die höchste Beladungskapazität für MB zeigte und bei Freisetzung in 0,1 M HCl das gebundene MB wieder quantitativ freisetzte. Mit diesem von Gut et al. (2008) entwickelten MB-Indion[®] 234-Resinat sollte nun eine für die Pädiatrie geeignete Darreichungsform entwickelt werden, mit dem Ziel einer klinischen Studie zur MB-Pharmakokinetik bei Kindern. In dieser Studie sollte, vor dem Hintergrund der zuvor diskutierten physiologischen Zusammenhänge, die Bioverfügbarkeit des im Resinat gebundenen MB bei Kindern zwischen sechs Monaten und fünf Jahren ermittelt werden.

Sämtliche quantitativen Bestimmungen von MB wurden von Gut et al. (2008) photometrisch bei 600 nm gemessen. Diese Methode wurde zunächst in der vorliegenden Arbeit übernommen.

2. Optimierungsansätze

2.1 Einleitung

Die ionischen Bindungen im Resinat unterliegen den bereits diskutierten Gleichgewichtsreaktionen. Eigentlich sollte das Gleichgewicht in pH-neutralem Milieu so weit auf der Seite des Resinates liegen, dass die gebundenen kationischen Stoffe praktisch ausschließlich in pH-saurem Medium wieder desorbiert werden.

Bei dem MB-Indion[®] 234-Resinat kommt es allerdings auch in pH-neutralem Milieu spontan zur Desorption von signifikanten Mengen von MB. Abhängig von der Menge an Desorptionsmedium (Wasser) und dem Zeitpunkt der Messung, schwankt der bei neutralem pH-Wert desorbierte Anteil im Vergleich zur gesamten gebundenen Menge an MB zwischen 11 % und 47 %. Da MB auch schon in sehr geringen Konzentrationen stark bitter ist, sollte durch in der Literatur beschriebene Vorbehandlungen (Vorquellung und Aktivierung) des Ionenaustauschers (Pisal et al., 2006) die spontane Desorption in pH-neutralem Milieu reduziert oder möglichst ganz unterbunden werden.

MB-Indion[®] 234-Resinate bilden bei der Trocknung sehr stabile, harte Agglomerate. Zur Desagglomeration reichen Siebvorgänge allein nicht aus, um die Primärteilchen zu erhalten. Die Agglomerate müssen gemahlen werden. Dies würde einen zusätzlichen Prozessschritt bei der industriellen Herstellung bedeuten, was wiederum die Produktionskosten erhöht. Aufgrund der Vermutung, dass Spuren von Wasser im Resinat für die Agglomeration verantwortlich sind, wurde beim Waschen des Resinates im letzten Waschgang eine Spülung mit dem polar-aprotischen Lösungsmittel Aceton durchgeführt, um Wasserrückstände zu entfernen.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Vorquellung und Aktivierung der Ionenaustauscher

Pisal et al. (2006) beschreiben verschiedene Methoden zur Beladungsmaximierung bei Indion[®] 234-Resinaten. In einer Versuchsreihe wurde Indion[®] 234, vor dem Beladungsprozess mit Ciprofloxacin HCl, für unterschiedliche Zeiträume in demineralisiertem Wasser vorgequollen. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Ionenaustauscher mit 1 M HCL, 1 M KOH oder einer kombinierten Behandlung der beiden Lösungen im Verhältnis 1:1 aktiviert. Aktivierung bedeutet in diesem Zusammenhang das Spülen mit dem Aktivierungsreagenz und anschließende Waschung mit demineralisiertem Wasser bis zur pH-Neutralität des Waschwassers.

Die funktionellen Gruppen des Ionenaustauschers liegen im trockenen, ungequollenen Zustand in der Polymermatrix nach innen gerichtet vor und sind weniger aktiv, mit der Folge reduzierter Beladungskapazität. Die vorgeschaltete Quellung und Aktivierung hat die Aufgabe, die funktionellen Gruppen zu exponieren und so die Beladungskapazität zu erhöhen (Pisal et al., 2006).

Diese Vorbehandlungsschritte wurden für Indion[®] 234 vor der Beladung mit MB durchgeführt. Einerseits galt es festzustellen, ob die Beladungskapazität für MB noch weiter erhöht werden kann. Andererseits sollte untersucht werden, ob die Exponierung der funktionellen Gruppen für die Beladung die spontane Desorption von MB in pH-neutralem Milieu reduzieren kann. Hintergrund für den Versuch war die Überlegung, dass möglicherweise ein Anteil des beladenen MB am ungequollenen bzw. nicht aktivierten Ionenaustauscher nicht ionisch gebunden wird, sondern z. B. über Dispersionskräfte, und somit nicht dem pH-abhängigen Bindungs-Desorptions-Gleichgewicht unterliegt. Durch Quellung und/oder Aktivierung ändert sich möglicherweise die Konformation des Ionenaustauschers, wodurch dem MB prozentual mehr funktionelle Gruppen zur Verfügung gestellt werden.

In den durchgeführten Experimenten konnte die MB-Beladung allerdings weder durch Vorquellung noch durch Aktivierung des Harzes Indion[®] 234 erhöht werden. Auch die spontane Desorption von MB im neutralen pH-Bereich wurde in allen Fällen nicht verhindert und auch nicht in nennenswertem Umfang reduziert.

2.2.2 Waschen des Resinats mit einem aprotischem Lösungsmittel

Der Beladungsvorgang für MB und Indion[®] 234 wurde wie beschrieben durchgeführt. Im letzten Waschgang wurde mit Aceton gespült. Nach Trocknung des Resinates waren die Agglomerate des Resinates sehr locker und instabil, so dass sie bereits bei geringster Belastung (z. B. vorsichtiges Streichen durch ein Sieb) spontan zerfielen. Das Desorptionsverhalten im pH-neutralen Milieu blieb unverändert.

Der Restlösemittelgehalt an Aceton im Resinat beträgt laut Analyse mittels Head-space-Gaschromatographie 4376 ppm. Aceton ist laut Ph. Eur. ein Lösungsmittel der Klasse 3 mit einem zugelassenen Grenzwert (PDE, permitted daily exposure) von 50 mg pro Tag. Die Angaben beziehen sich auf die ICH-Leitlinie für Lösungsmittelrückstände (CPMP/ICH/283/95), die bei der Risikobewertung von Lösungsmitteln einen Erwachsenen mit 50 kg KG zugrunde legt. PDE-Werte werden aus NOEL-Grenzwerten (No observed effect level, = Grenzwert ohne beobachtete Wirkung, Einheit mg/kg KG/d) berechnet, unter Berücksichtigung von Körpergewicht sowie diverser Sicherheitsfaktoren. Unter der Annahme, dass sich der PDE-Wert für Aceton über das KG umrechnen lässt, entspricht das für ein sechs Monate altes Kind mit fünf kg KG laut der Formel

$$PDE_{\text{Päd}} = \frac{KG}{50} PDE_{\text{Ph. Eur.}}$$

$PDE_{\text{Päd}}$	Zumutbare tägliche Belastung für Kinder [mg/d]
KG	Körpergewicht [kg]
$PDE_{\text{Ph. Eur.}}$	Zumutbare tägliche Belastung für Erwachsene [mg/d]

einen PDE-Wert von 5 mg Aceton. Bei einer Einnahme von ca. 112 mg Resinat pro Tag würde das Kind nur ca. 0,5 mg Aceton zu sich nehmen, so dass der PDE-Wert in jedem Fall eingehalten werden würde. Mit dem für den kindlichen Organismus angepassten PDE-Wert von Aceton kann sich gleichzeitig auch die Grenzkonzentration ändern, in der Aceton im MB-Resinat vorhanden sein darf. Im Ph. Eur. wird eine Gleichung angegeben, mittels der aus dem PDE-Wert und der verabreichten Dosis die für den Verwendungszweck geeignete Grenzkonzentration für Aceton im MB-Resinat abgeschätzt werden kann.

$$GK = \frac{1000}{TD} \times PDE_{\text{Päd}}$$

GK	Grenzkonzentration im Produkt [ppm]
TD	Tagesdosis (≤ 20) [g]
$PDE_{\text{Päd}}$	Zumutbare tägliche Belastung für Kinder [mg/d]

Die beispielhaften Berechnungen für Kinder mit einem KG zwischen 5 und 20 kg sind in Tabelle 1 dargestellt.

KG [kg]	max. TD [g/d]	$PDE_{\text{Päd}}$ [mg/d]	Berechnete GK [ppm]	eingegenommenes Aceton [mg/d]
5	0,112	5	44643	0,5
7,5	0,168	7,5	44643	0,7
10	0,224	10	44643	0,9
12,5	0,280	12,5	44643	1,2
15	0,336	15	44643	1,5
20	0,448	20	44643	2,0

Tabelle 1: Berechnungen zur Abschätzung der Grenzkonzentration für Aceton in MB-Resinat für die Verwendung bei der Behandlung von Malaria bei Kindern zwischen sechs Monaten und fünf Jahren

Die Grenzkonzentration ändert sich in diesem Fall nicht, da die Dosierung sich mit dem Körpergewicht linear erhöht. In sämtlichen Fällen würde die Grenzkonzentration sowie der PDE-Wert für Aceton eingehalten. Da sich Kinder aber, wie bereits diskutiert, in physiologischer, pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Hinsicht von Erwachsenen unterscheiden, ist eine direkte Umrechnung des PDE-Wertes mittels KG nicht wissenschaftlich begründet. Untersuchungen zur Verträglichkeit und Unbedenklichkeit von Aceton bei Kleinkindern liegen bisher nicht vor.

2.3 Schlussfolgerung

Sämtliche Ansätze, die Qualität des MB-Indion[®] 234-Resinates aus der Arbeit von Gut et al. (2008) in Hinblick auf die Beladungskapazität und insbesondere die spontane Desorption in pH-neutralem Milieu zu optimieren, führten nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

Die Waschung mit Aceton führte zwar durch Verhinderung der Agglomeratbildung zu einer prozesstechnischen Verbesserung, aber der hohe Restlösemittelgehalt bei unbekannter Toxizität für Kleinkinder spricht gegen dieses Vorgehen. Somit bleibt das Mahlen der Resinat-Agglomerate ein notwendiger Prozessschritt.

Im Rahmen der Formulierungsentwicklung wurde nun darauf fokussiert, die Bitterkeit des durch spontane Desorption frei vorliegenden MB-Anteils zu reduzieren.

3. Entwicklung wässriger Zubereitungen von Methylenblau-Resinat

3.1 Einleitung

In der Entwicklung von Arzneizubereitungen muss fallspezifisch festgelegt werden, welche Darreichungsform am besten geeignet ist und welche Hilfsstoffe zum Einsatz kommen sollen. Dabei muss eine Reihe von Faktoren berücksichtigt werden: Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes, Verträglichkeit und Sicherheit, Stabilität von Wirkstoff und Zubereitung sowie einfache, korrekte und reproduzierbare Dosierung, die im optimalen Falle stufenlos zu steigern oder zu reduzieren ist. Auch das zu applizierende Dosisvolumen ist zu beachten. Zu geringe Volumina erschweren die Dosiergenauigkeit bei flüssigen Darreichungsformen, zu große Volumina erschweren die Einnahme. Die pädiatrische Arzneizubereitung ist bezüglich dieser Größen ein Spezialfall mit besonderen Anforderungen.

Bei Arzneimitteln, die für die armen Länder der Welt vorgesehen sind, spielen darüber hinaus noch finanzielle Aspekte eine wichtige Rolle, sodass einige Darreichungs-

formen aufgrund von teuren Hilfsstoffen oder Herstellungsprozessen allein deshalb nicht in Frage kommen. Diese weiteren Kriterien werden im folgenden Kapitel erörtert und wurden bei der Entwicklung der MB-Zubereitungen beachtet.

3.2 Festlegung der Dosierung

Die therapeutische Dosierung von MB liegt bei 10 mg pro kg KG. Diese Dosis wird zweimal pro Tag über drei Tage verabreicht. Das Reflection Paper „Formulations of choice for the paediatric population“ der EMA, zusammen mit dem “Committee For Medicinal Products For Human Use” (CHMP) empfiehlt für Kinder unter fünf Jahren ein Einzeldosisvolumen von ≤ 5 mL, für Kinder ab fünf Jahren und älter ein Dosisvolumen von ≤ 10 mL. Je besser der Geschmack der Zubereitung ist, umso größere Volumina werden auch darüber hinaus akzeptiert (EMA, 2006).

Die Zieldosierung für die pädiatrische MB-Zubereitung wurde auf 20 mg MB pro mL festgelegt. Mit 2,5 mL als Einzeldosis für ein sechs Monate altes Kind mit durchschnittlich 5 kg KG liegt die Zubereitung im von der EMA empfohlenen Bereich. Europäische Kinder wiegen im Alter von fünf Jahren im Durchschnitt 20 kg. Dies würde ein Einzeldosisvolumen von bereits 10 mL bedeuten. Kinder in armen Ländern haben allerdings oft ein geringeres Körpergewicht (Dullinger et al., 2009), so dass die Zubereitung mit dieser Dosierung für den Altersbereich der Studie angemessen erschien.

3.3 Auswahl von Darreichungsform und Hilfsstoffen

Hilfsstoffe werden im Allgemeinen definiert als die „pharmakologisch nicht aktiven Bestandteile“ in einer Arzneizubereitung. Sie gelten somit als inert und damit als unbedenklich und sicher für die Anwendung beim Menschen. Definitionsgemäß dienen sie der Formgebung und Stabilität der Zubereitung sowie der Verbesserung der Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs.

Diese Definition darf jedoch nicht verallgemeinert werden, da für einige Hilfsstoffe bereits bekannt ist, dass sie für Erwachsene zwar tatsächlich unbedenklich sind, bei Kindern jedoch gravierende unerwünschte Wirkungen entfalten. So wurden z. B. für die Lösungsvermittler Propylenglykol und Diethylenglykol unerwünschte Ereignisse mit Todesfolge beschrieben, sowie auch für das Konservierungsmittel Benzylalkohol und Sulfid-Verbindungen als Antioxidantien. Konservierungsstoffe aus der Gruppe der para-Hydroxybenzoesäure-Ester (Parabene) sind wegen ihres Allergisierungspotentials sehr umstritten. Verschiedene Farbstoffe werden mit Kontaktdermatitis sowie Hyperaktivität bei Kindern in Verbindung gebracht (Breitkreutz, 2009; American Academy of Pediatrics, 1997).

Für Hilfs- und Zusatzstoffe gibt es Einsatzkriterien wie z. B. den GRAS-Status der FDA (generally recognized as safe), oder die ADI-Werte des WHO/FAO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA). Der ADI-Wert (acceptable daily intake) bezeichnet die akzeptable Tagesdosis eines Stoffes, in mg pro kg Körpergewicht (KG) pro Tag, die ein Mensch täglich sein Leben lang ohne nennenswerte Gesundheitsrisiken zu sich nehmen kann. Die ADI-Werte beruhen auf den Ergebnissen von verschiedenen Tierversuchen (mindestens drei verschiedene Tierspezies), wobei die Versuchsdauer von der mittleren Lebenserwartung der Versuchstiere abhängig ist. Ziel der Studien ist die Beurteilung von akuten, subchronischen und chronischen toxischen sowie reproduktionstoxischen Effekten. Zunächst wird der NOEL-Wert bestimmt. Durch die Verknüpfung von verschiedenen Sicherheitsfaktoren mit dem NOEL-Wert wird der ADI-Wert berechnet.

$$\text{ADI} = \frac{\text{NOEL}}{f_1 \times f_2 \times f_3 \times f_4} \text{ [mg/kg KG/d]}$$

Es gibt einen Sicherheitsfaktor für die Interpolation zwischen den Spezies ($f_1 = 10$), einen weiteren für die interindividuellen Unterschiede innerhalb einer Spezies ($f_2 = 10$), einen dritten für Toxizitätsstudien, die nur mit einer kurzzeitigen Belastung durchgeführt wurden ($f_3 \geq 1$), und einen vierten für schwerwiegende Toxizitäten wie z. B. Kanzerogenität oder Teratogenität ($f_4 \geq 1$). Allerdings kann der ADI-Wert nicht ohne weiteres auf Senioren, Kranke, Schwangere und Kinder übertragen werden. Die Bewertungen und Berechnungen, die den ADI-Werten zugrunde liegen, beziehen z. B. abweichende Enzymmuster, Organ- und Stoffwechselfunktionen des kindlichen Organismus nicht in ausreichendem Maße mit ein (Breitkreutz 2004). Daher ist ein bestehender ADI-Wert zwar ein erster Anhaltspunkt für den sicheren Einsatz eines Stoffes, dieser muss aber von Fall zu Fall beurteilt werden.

Auch sind nicht alle Darreichungsformen für Kinder geeignet. Bisherige Erkenntnisse bezüglich einiger Hilfsstoffe sowie geeigneter Applikationswege und Darreichungsformen sind im EMA Reflection Paper aufgeführt. Für jede der Altersgruppen werden geeignete, weniger geeignete und ungeeignete Darreichungsformen definiert, sowie die Arzneiform der Wahl. So sind z. B. flüssige Darreichungsformen für Kinder bis fünf Jahre als am besten geeignet eingestuft, da Tabletten, sogar mit vergleichsweise kleinem Durchmesser von 4 mm, von Kindern unter fünf Jahren trotz Übung selten erfolgreich geschluckt werden können (Breitkreutz, 2009). Nachteile von flüssigen gegenüber festen Darreichungsformen sind jedoch in der Regel eine kürzere Haltbarkeit und geringere Stabilität, sowie die häufige Notwendigkeit von Zusätzen kritisch eingestufte Hilfsstoffe wie z. B. Konservierungsstoffe und Antioxidantien. Bei

Suspensionen ist ein weiteres potentiell Problem die reproduzierbare Dosierbarkeit durch Sedimentation mit Caking oder Flotation von Partikeln.

Nicht zuletzt spielt auch der Geschmack der Arzneizubereitung eine wichtige Rolle. Besonders kleine Kinder sind für rationale Argumente hinsichtlich Geschmack und Wirkung des Arzneimittels nicht zugänglich. In der Natur indiziert Bitterkeit Gefahr durch Giftigkeit. Die natürliche Abneigung gegen bitteren Geschmack schützt Lebewesen vor Vergiftung, wie z. B. vor bitter schmeckenden, toxischen Alkaloiden. Ekel durch einen unangenehmen Geschmack kann auch noch Stunden nach der Einnahme Übelkeit mit resultierendem Erbrechen verursachen. Wenn ein Kind ein schlecht schmeckendes Arzneimittel erbricht, ausspuckt oder die Einnahme verweigert, kann eine erfolgreiche Therapie nicht gewährleistet werden. Deshalb ist eine wirkungsvolle Geschmacksmaskierung, insbesondere bei Arzneizubereitungen für die Pädiatrie, essentiell.

Für die pädiatrische Zubereitung des MB-Resinates wurde aus mehreren Gründen eine flüssige Darreichungsform gewählt. Für Kinder im Alter zwischen sechs Monaten und fünf Jahren, die ein Großteil der Zielgruppe dieser Arbeit waren, erschienen Tabletten nicht geeignet. Die Herstellung multipartikulärer Darreichungsformen, wie Pellets und Minitabletten, oder moderner ODTs führte nach Überschlagsrechnungen aufgrund von relativ hohen Prozesskosten und/oder Hilfsstoffpreisen zur Überschreitung der maximal von der WHO akzeptierten Kosten für einen Behandlungszyklus.

Da das MB-Resinat aufgrund der Polymerstruktur des Ionenaustauschers unlöslich ist, stellen die entwickelten flüssigen Zubereitungen in jedem Fall eine Suspension dar. Um die Suspension zu stabilisieren, können natürliche oder synthetische Polymere eingesetzt werden, die die Viskosität der Zubereitung erhöhen. Gelbildner haben zusätzlich die Eigenschaft, den Kontakt des bitteren Stoffes mit den Geschmacksrezeptoren in den Geschmacksknospen der Zunge zu mindern und erzielen somit einen gewissen geschmacksmaskierenden Effekt. Bei manchen Polymeren kann dieser Effekt durch Adsorptions- oder Inklusionseffekte noch verstärkt werden. Es gibt anionische Polymere, wie Carmellose-Natrium (Na-Carboxymethylcellulose, Na-CMC) oder Xanthangummi, und nichtionische Polymere, wie z. B. Hyetellose (Hydroxyethylcellulose, HEC), Hypromellose (Hydroxypropylmethylcellulose, HPMC), Methylcellulose (MC), Povidon (Polyvinylpyrrolidon, PVP). Anionische Polymere bilden mit Kationen, hier also mit dem frei vorliegenden Anteil an kationischem MB, schwerlösliche Polymer-Assoziate (Polymer-Simplexe) die gefällt werden, daher sind sie für den gegebenen Zweck ungeeignet. Für die Entwicklung der Suspensionen wurden deshalb ausschließlich nichtionische Polymere gewählt.

Auf Konservierungsmittel sollte nach Möglichkeit verzichtet werden, aufgrund der zuvor angesprochenen möglichen Unverträglichkeiten bei Kindern.

Generell können ionische Zusatzstoffe wie z. B. Peptisatoren, Süßstoffe wie Natrium-cyclamat oder Saccharin-Natrium oder Puffersubstanzen das elektrolytempfindliche Beladungs-Gleichgewicht des Resinates beeinflussen. Daher sollte ihr Einsatz nach Möglichkeit vermieden oder zumindest begrenzt werden.

Verschiedene Versuchsansätze wurden im 50 mL Maßstab mit wässrigen Zubereitungen hergestellt und auf Tauglichkeit für weiterführende Entwicklungen untersucht. Geschmacksuntersuchungen wurden im Eigenversuch unternommen. Die Versuchsansätze werden im Folgenden beschrieben.

3.4 Ansatz in Simple Sirup USP

Der Simple Syrup nach USP NF 24 beinhaltet 850 g Saccharose auf 1000 mL gereinigtes Wasser und kann entweder durch Lösen in kochendem Wasser oder durch Perkolation bei Raumtemperatur hergestellt werden. Laut USP-Monographie soll er ein (dort nicht näher benanntes) Konservierungsmittel enthalten, wenn er nicht zum sofortigen Gebrauch hergestellt wird. Da der osmotische Druck des Sirups allerdings sehr hoch ist, und diese Eigenschaft bereits mikrobielles Wachstum unterbinden kann, wurde untersucht, ob diese Eigenschaft, kombiniert mit der antimikrobiellen Potenz des frei vorliegenden MB, ausreicht, um den Einsatz von Konservierungsmitteln zu umgehen.

Es wurde je ein Ansatz Simple Syrup durch Perkolation und durch Lösen in kochendem Wasser hergestellt. MB-Indion[®] 234-Resinat, entsprechend einer Dosis von 20 mg MB pro mL, wurde dispergiert. Alternativ zum rein süßen Sirup wurden Ansätze mit zugesetztem Zitronenaroma hergestellt. Das Geschmacksempfinden wurde im Eigenversuch getestet und der mikrobielle Verderb über 4 Wochen optisch untersucht.

Der Geschmack war zwar etwas besser als die reine MB-Lösung, allerdings nach wie vor sehr bitter, mit starker Blau-Färbung und einem lang anhaltenden pelzig-tauben Gefühl auf der Zunge, welches mit dem Empfinden von leicht schmerzdem Wundsein einherging. Das Zitronenaroma minderte die Bitterkeit des MB etwas mehr als der reine Syrup, das wund-pelzige Gefühl im Mundraum war aber nach wie vor vorhanden. Der Ansatz mit perkolierem Zuckersirup zeigte bereits nach zwei Wochen Schimmelbefall. Der Ansatz mit erhitztem Sirup zeigte nach vier Wochen noch keine optischen Anzeichen von Schimmel.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wurde auf eine Weiterentwicklung dieser Zubereitungen verzichtet.

3.5 Ansatz auf HPMC, HEC und MC Basis

Wässrige Gele mit Hypromellose, Hyetellose und Methylcellulose wurden hergestellt, in denen MB-Resinat entsprechend einer Dosis von 20 mg MB pro mL dispergiert wurde. Dabei erwies sich bei dem HPMC-Gel eine Konzentration von 1,5 % als optimal für die Konsistenz, bei HEC 1% und bei MC 1,5 %. Aspartam wurde als nichtionisches Süßungsmittel eingesetzt, wobei die Einhaltung des ADI-Wertes für alle Alters- bzw. Gewichtsklassen sichergestellt wurde. Zusätzlich wurde alternativ zum Zitronen-Aroma Himbeer-Aroma eingesetzt, um festzustellen, ob diese Geschmacksrichtung die Bitterkeit von MB besser überdeckt.

Innerhalb von vier Wochen waren keine optischen Anzeichen für Verkeimung zu erkennen, aber der Geschmack war bei allen drei Ansätzen sehr bitter. Auch die starke Blaufärbung und das wund-pelzige Gefühl im Mundraum blieben vorhanden.

Auf eine Weiterentwicklung dieser Zubereitungen wurde aufgrund dieser Eigenschaften verzichtet.

3.6 Ansatz auf Maltitol Basis

Eine wässrige Zubereitung mit 40 % gereinigtem Wasser und 60 % Maltitol-Sirup wurde hergestellt und MB-Resinat entsprechend einer Dosis von 20 mg MB pro mL dispergiert.

Innerhalb von vier Wochen waren keine optischen Anzeichen für Verkeimung zu erkennen, aber der Geschmack war sehr bitter. Auch die starke Blaufärbung und das wund-pelzige Gefühl im Mundraum blieben vorhanden.

Auch diese Zubereitung wurde nicht weiterentwickelt.

3.7 Ansatz ohne Trocknung des Resinats

Da bei Dispergierung von getrocknetem Resinat in pH-neutral-wässrigem Milieu eine erhebliche Menge an MB spontan desorbiert und den Geschmack signifikant beeinflusst, wurde untersucht, ob eine Feuchtdispergierung des Resinats direkt nach Beladung und Waschung zu einem besseren Ergebnis führt.

Bei diesem Ansatz ist folgendes zu beachten: Der Ionenaustauscher Indion[®] 234 bindet nie das gesamte MB in der Beladungslösung, auch wenn MB im Unterschuss vorliegt. Somit konnte keine in situ-Beladung durchgeführt werden, wie in kommerziellen Resinat-Zubereitungen anderer Arzneistoffe. Das bedeutet, dass die Beladungslösung nicht für die Zubereitung weiterverwendet werden konnte, da sich noch ungebundenes MB in der Lösung befand und entsprechend weniger MB am Ionenaustauscher gebunden war. Das Resinat musste nach der Beladung

gewaschen werden und unverzüglich quantitativ in ein Suspensionsvehikel überführt werden.

MB-Indion[®] 234-Resinat wurde wie oben beschrieben hergestellt. Dazu wurde eine Menge an Ionenaustauscher verwendet, die laut Voruntersuchungen genau die Menge MB bindet, um in einem 50 mL Ansatz eine Dosierung von 20 mg MB pro mL zu ergeben. Das Resinat wurde gewaschen und noch feucht in durch Erhitzen hergestellten Simple Syrup USP dispergiert.

Die spontane Desorption des MB im pH-neutral-wässrigen Milieu wurde durch den fehlenden Trocknungsschritt des Resinates verzögert, jedoch nicht unterbunden. Nach 72 h lag bereits wieder eine erhebliche Menge an MB frei vor und der Geschmack war stark bitter. Auch das wund-pelzige Gefühl im Mundraum blieb vorhanden.

Die Feuchtdispergierung des MB-Indion[®] 234-Resinates wurde für eine Weiterentwicklung der Zubereitung nicht in Betracht gezogen.

3.8 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Eine wässrige Zubereitung mit dem MB-Indion[®] 234-Resinat war hinsichtlich Geschmacksmaskierung nicht in zufriedenstellender Qualität darstellbar. Die spontane Desorption von MB in pH-neutralem wässrigen Milieu ließ sich nicht in ausreichendem Maße unterbinden und auch nicht geschmacklich überdecken. Die Verarbeitung des Resinats ohne Trocknungsschritt brachte keine geschmackliche Verbesserung, zudem beinhaltete sie das Risiko für Dosisschwankungen.

Die Verkeimung der Zubereitungen wurde im Rahmen der Voruntersuchungen nur optisch und damit rein qualitativ beurteilt, was durch die stark dunkelblaue Färbung erschwert wurde. Auf weitergehende mikrobiologische Untersuchungen wurde verzichtet, da die organoleptischen Eigenschaften der Zubereitungen unbefriedigend waren.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Entwicklung wässriger Systeme mit MB-Indion[®] 234-Resinat eingestellt.

4. Entwicklung wasserfreier Zubereitungen von Methylenblau-Resinat

4.1 Einleitung

Da die Versuche, eine stabile und geschmacksmaskierte flüssige Darreichungsform auf wässriger Basis zu entwickeln, nicht zu dem gewünschten Ergebnis führten, wurde eine wasserfreie Zubereitung auf Ölbasis entwickelt, in der die spontane

Desorption von MB vom MB-Indion[®] 234-Resinat durch das wasserfreie Vehikel unterbunden wird.

4.2 Ansatz auf Basis mittelkettiger Triglyzeride

Als Vehikel für die wasserfreie Zubereitung wurden mittelkettige Triglyzeride (MCT, Miglyol[®] 812) ausgewählt. Grundsätzlich kommen verschiedene Öle für die orale Einnahme in Frage. Pflanzliche Öle wie z. B. Sonnenblumen-, Mandel-, Maiskeim-, Raps- oder Distelöl haben einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren wie Linol- oder Linolensäure, die mittels radikalischer Oxidation durch Luftsauerstoff zu Hydroperoxiden umgesetzt werden. Diese können den Wirkstoff angreifen oder zu Gewebsreizungen führen. Der Zusatz eines Antioxidans wäre in Hinblick auf die Stabilität von MB ungünstig, da MB in Gegenwart von reduzierenden Substanzen in seine Leukobase umgewandelt werden kann, möglicherweise auch in seiner im Resinat gebundenen Form.

Miglyol[®] 812 enthält Triglyzeride der fraktionierten pflanzlichen C_{8:0} und C_{10:0} Fettsäuren, Caprinsäure und Caprylsäure, im Verhältnis 50 - 65 zu 30 - 45. Spuren an anderen gesättigten Fettsäuren (C_{6:0}, C_{12:0}, C_{14:0}) können vorhanden sein, nicht jedoch ungesättigte Fettsäuren (C_{18:2}, Linolsäure). Dadurch ist Miglyol[®] 812 resistent gegenüber oxidativen Prozessen. Durch den sehr niedrigen Wassergehalt ist Miglyol[®] 812 unempfindlich gegenüber hydrolytischer und mikrobiologischer Zersetzung. Miglyol[®] 812 ist nicht hitzeempfindlich und muss auch in Gebieten mit heißem Klima nicht gekühlt werden. Bei niedrigen Temperaturen können Anteile der Triglyzeride auskristallisieren, dieser Vorgang ist jedoch komplett reversibel. Miglyol[®] 812 besitzt GRAS-Status und entspricht den Arzneibuch-Monographien Ph. Eur. und USP/NF (Medium Chain Triglycerides), BP 1999 (Fractionated Coconut Oil), und JPE (Caprylic/Capric Triglyceride) (Miglyol[®] Product Information, CONDEA).

Die Applikation von Ölen kann bei Kindern in seltenen Fällen durch Aspiration zu einer Lipoid-Pneumonie führen (Zanetti et al. 2007). Durch Strukturierung des Öls, z. B. durch Einarbeitung von Gelbildnern, wird diese Gefahr jedoch minimiert.

Um die Viskosität des Öls zu erhöhen und Sedimentierung der suspendierten Resinat-Partikel zu behindern, wurde hochdisperses hydrophiles Siliziumdioxid (Aerosil[®] 200) eingesetzt. Aluminiumstearat ist ebenfalls ein bekannter Gerüstbildner für Oleogele, wurde jedoch wegen der unerwünschten Zufuhr von Aluminium nicht verwendet. Mit Siliziumdioxid strukturierte Oleogele besitzen eine ausgeprägte Thixotropie und sind temperaturunempfindlich. Diese Eigenschaften sind für die Zubereitung in Hinblick auf Applikation und Stabilität in tropischen Gebieten von Vorteil.

Zur Süßung des Oleogels wurden verschiedene Zucker und Süßstoffe auf ihre Wirkung getestet. Da derzeit kein Süßungsmittel kommerziell verfügbar ist, das in Öl löslich ist,

wurden pulverisierte Saccharose, Fruktose und der Süßstoff Sucralose in dem Oleogel-Vehikel dispergiert. Sucralose hat erwartungsgemäß eine deutlich höhere Süßkraft und konnte niedriger dosiert werden als die Zucker. Durch den stark reduzierten Feststoffanteil (0,2 %) tritt jedoch der ölige Geschmack bzw. das ölige Mundgefühl stärker in den Vordergrund. Der hohe Feststoffanteil bei den Zubereitungen mit Zuckern (16 %) kompensiert das ölige Gefühl und das Mundgefühl ist angenehmer. Fruktose wurde aufgrund von etwas erhöhter Süßkraft im Vergleich zu Saccharose ausgewählt (Saccharose = 1, Fruktose = 1,2). Fruktose ist als α -Hydroxy-Ketose ein reduzierender Zucker, wirkt aber nur in alkalischem Milieu reduzierend. Hereditäre Fruktoseintoleranz, die als angeborener Enzymdefekt mit gravierenden Gesundheitsproblemen eine Kontraindikation wäre, tritt im Gegensatz zur weitaus weniger kritischen Fruktose-Malabsorption ausgesprochen selten auf (Fiedler Lexikon der Hilfsstoffe). Da aber auch die Fruktose-Malabsorption, je nach Ausprägung, zu (ungefährlichen) Verdauungsbeschwerden führen kann, erfordert das Fertigarzneimittel einen entsprechenden Warnhinweis auf den Bestandteil Fruktose.

Nach Entwicklung verschiedener Zubereitungsansätze wurde folgende Rezeptur als besonders geeignet beurteilt:

MB-Indion 234 [®] -Resinat (entsprechend 20 mg/mL MB-Cl * 3H ₂ O)	ca. 2,44 g
Fruktose	16,00 g
Aerosil [®] 200	2,00 g
Miglyol [®] 812	79,56 g

	100,00 g

Die relative Dichte der Suspension beträgt 1 g/cm³, d. h. 1 mL entspricht 1 g Suspension.

4.3 Rheologie

Eine oral zu applizierende Suspension muss verschiedenen Anforderungen gerecht werden. Sie soll einfach, genau und reproduzierbar zu dosieren sein, entweder mittels Messbecher oder Dosierspritze. Auch soll sie möglichst keine Sedimentation oder Flotation der suspendierten Partikel zeigen. Wenn die suspendierten Partikel sich doch am Boden des Gefäßes absetzen, sollen sie leicht redispergierbar sein, d. h. die Suspension soll durch kurzes Aufschütteln wieder Homogenität aufweisen. So genanntes Caking des Sedimentes, also mangelnde Redispergierbarkeit durch Ver-

festigung des Sedimentes, führt zu Fehldosierung des Arzneimittels und ist deshalb in einer Zubereitung zu vermeiden. Gute Dosierbarkeit und Unterbindung der Sedimentation kann unter anderem durch die Größen Viskosität und Fließgrenze des plastischen Systems eingestellt werden.

Nurofen® Junior Fiebersaft ist eine geschmacksmaskierte Ibuprofen-Suspension, die in diesen Kriterien gute Eigenschaften aufweist und somit als Vorbild fungieren kann. Barnscheid (2008) stellte fest, dass eine theoretische Fließgrenze von 10 - 15 Pa anzustreben ist, um Sedimentation zu verhindern und gute Dosierbarkeit zu erlauben.

Es wurden verschiedene Oleogele hinsichtlich ihrer rheologischen Eigenschaften untersucht. Zunächst wurden reine Miglyol® 812-Aerosil® 200-Gele mit 1 %, 2 %, 4 % und 6 % (m/m) hergestellt. Die Gele mit 4 % und 6 % Aerosil® zeigten nach Ruhephase eine stabile Gelstruktur, die durch kurzes Schütteln zerstört wurde. Es trat rasch Verflüssigung ein. Der erneute Aufbau der festen Gelstruktur jedoch dauerte, je nach Konzentration von Aerosil® 200, 60 min bis zu 24 h. Die Zubereitung zeigte somit eine ausgeprägte Thixotropie.

Durch Einarbeitung der Feststoffe Fruktose und MB-Indion 234®-Resinat zeigte sich eine starke zusätzliche Verfestigung, so dass der Gehalt an Aerosil® 200 gesenkt werden musste. Eine Konzentration von 2 % Aerosil® bezogen auf die Endmasse zeigte in der Zubereitung die gewünschten rheologischen Eigenschaften.

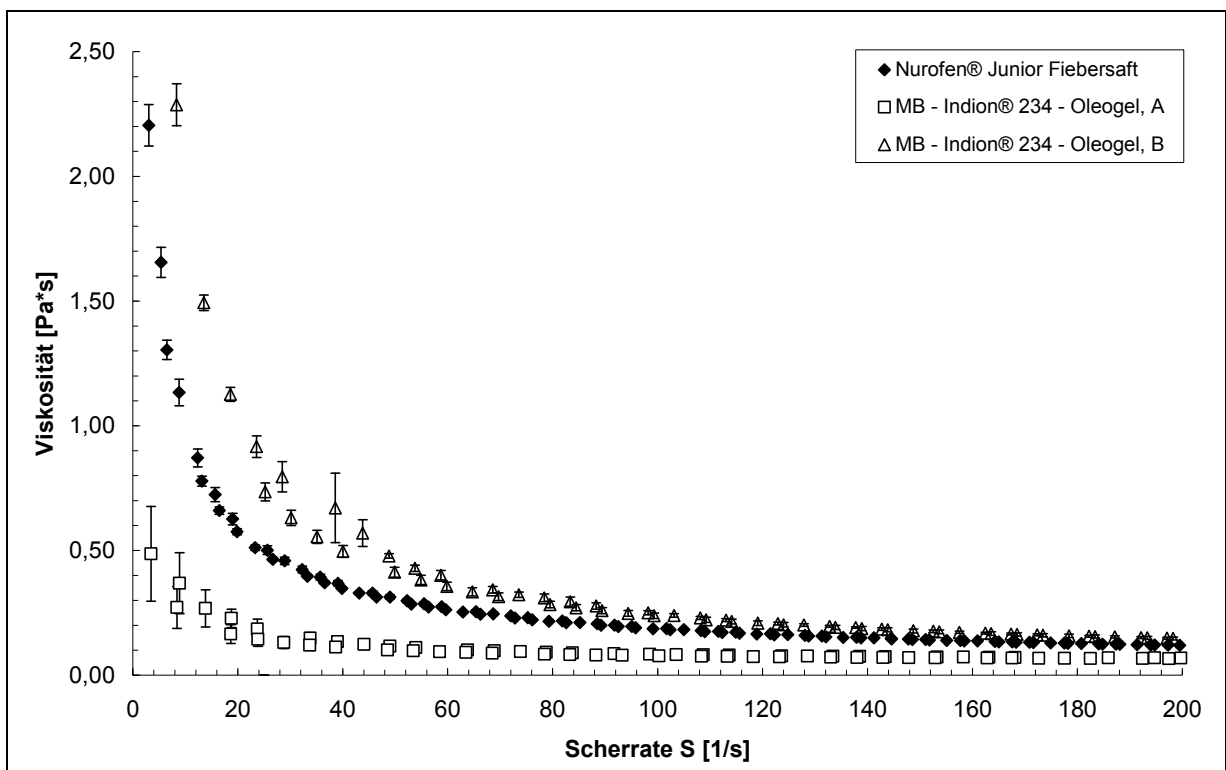


Abbildung 6: Viskositäten von Nurofen® Junior Fiebersaft im Vergleich zu den MB-Indion 234®-Oleogel-Chargen A und B (MW ± s, n = 3)

Abbildung 6 lässt erkennen, dass der Nurofen[®] Saft im Ruhezustand eine höhere Viskosität hatte als das MB-Indion 234[®]-Oleogel A. Dies zeigen auch die berechneten theoretischen Fließgrenzen, die für Nurofen[®] bei ca. 15 Pa ($14,64 \pm 0,46$ Pa, Barnscheid, 2008) lag, für das MB-Indion 234[®]-Oleogel A jedoch bei 3 Pa ($2,99 \pm 0,04$ Pa, MW \pm s, n = 3). Diese lag deutlich unter der anzustrebenden Fließgrenze und man erkannte bei Lagerung auch Sedimentationstendenzen. Jedoch war das Oleogel zu jeder Zeit über einen Zeitraum von drei Monaten durch Aufschütteln einwandfrei redispergierbar, so dass die Sedimentation in diesem Fall akzeptiert werden konnte. Die Viskosität des MB-Indion 234[®]-Oleogels A zeigte bei Scherung nur minimale Unterschiede zu der Viskosität des Nurofen[®] Saftes, so dass eine vergleichbar gute Dosierbarkeit gewährleistet war.

MB-Indion 234[®]-Oleogel B wurde zu einem anderen Zeitpunkt in identischer Zusammensetzung hergestellt. Oleogele mit einer Gelstruktur aus Siliziumdioxid zeigen eine starke Abhängigkeit der Viskosität vom Feuchtigkeitsgehalt; schon geringe Mengen an Wasser verstärken das Gelgerüst und erhöhen die Festigkeit. Das im MB-Indion 234[®]-Oleogel B verwendete MB-Resinat wies mit 3,5 % einen geringfügig höheren Restfeuchtegehalt auf als das Resinat im MB-Indion 234[®]-Oleogel A mit 2,9 %. Die Viskosität bei Scherung lag jedoch sehr nah an der Viskosität des Nurofen[®] Junior Fiebersaftes. Die theoretische Fließgrenze des MB-Indion 234[®]-Oleogels B lag erwartungsgemäß höher als die des MB-Indion 234[®]-Oleogels A, aber mit einem Wert von 18 Pa ($18,11 \text{ Pa} \pm 0,27 \text{ Pa}$, MW \pm s, n = 3) immer noch in einem akzeptablen Bereich.

4.4 Geschmacksuntersuchungen von wirkstofffreien Zubereitungen mit Probanden

Um die Eignung des gesüßten Oleogels als Vehikel für eine pädiatrische Darreichungsform zu charakterisieren, wurden Geschmacksuntersuchungen an einer wirkstofffreien Zubereitung mit freiwilligen Probanden durchgeführt. Sie sollten zunächst die Süßkraft der suspendierten Fruktose beurteilen, in dem sie die empfundene Süße der Zubereitung mit sechs verschiedenen wässrigen Fruktoselösungen verglichen. Da sich bei der Oleogel-Zubereitung die Fruktosekristalle im Mund zunächst noch auflösen müssen, wurden die Probanden gebeten, auch den Zeitpunkt der höchsten Süßkraft (t_{\max}) festzuhalten.

Die zur suspendierten Fruktose im Oleogel korrespondierende Süßkraft besitzt eine wässrige Fruktoselösung mit durchschnittlich 11,25 g pro 100 mL \pm 5,59 g (MW \pm s, n = 20). t_{\max} wird mit 7,2 sec. \pm 2,8 sec. (MW \pm s, n = 20) angegeben.

Das Ergebnis zeigt, dass sich die im Oleogel dispergierte Fruktose ausreichend gut und schnell löst, um eine geeignete Süßkraft zu entwickeln. Das MB-Indion 234[®]-Resinat wird im Mundraum durch das Oleogel zwar gut abgeschirmt, trotzdem kann sich bei Kontakt mit wässrigem, elektrolythaltigem Speichel etwas MB lösen und

seinen bitteren Geschmack entfalten. Die verzögerte t_{max} der suspendierten Fruktose ist hier vorteilhaft, da sie erst im kritischen Zeitraum der MB-Desorption ihre maximale Süßkraft und damit die geschmacksmaskierende Potenz entfaltet. Wässrige Fruktoselösungen würden sofort durch Speichel verdünnt, und damit auch ihre Süßkraft reduziert. Einige Probanden empfanden den Geschmack der Fruktose im öligen Vehikel sogar als angenehmer als in wässriger Lösung.

Im nächsten Teil der Versuchsreihe sollten die Probanden die Oleogel-Zubereitung hinsichtlich Mundgefühl und Geschmackserlebnis (palatability) beurteilen. Die Kategorien wurden unterteilt in öliges Mundgefühl (Öligkeit), partikulär sandig-/ griesiges Mundgefühl durch die suspendierten Feststoffe (Sandigkeit) sowie Gesamteindruck. Dabei standen ihnen jeweils fünf Bewertungsmöglichkeiten zur Verfügung. Die fünf Bewertungsstufen wurden in die Noten 1 bis 5 umgerechnet, wobei 1 die beste und 5 die schlechteste Note darstellt. Abbildung 7 fasst die Ergebnisse zusammen.

Insgesamt wurde nie die Note 4 oder 5 vergeben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Oleogel-Zubereitung kein unangenehm öliges Mundgefühl verursachte, unter anderem auch aufgrund des hohen Feststoffanteils. Trotz des hohen Feststoffanteils wurde die Zubereitung jedoch nicht als partikulär bzw. sandig empfunden. Die Partikel waren homogen, ausreichend klein und durch das strukturierte Oleogel zusätzlich abgeschirmt. Insgesamt wurde die Zubereitung mit der Durchschnittsnote $2,1 \pm 0,6$ als angenehm empfunden (MW \pm s, n = 20).

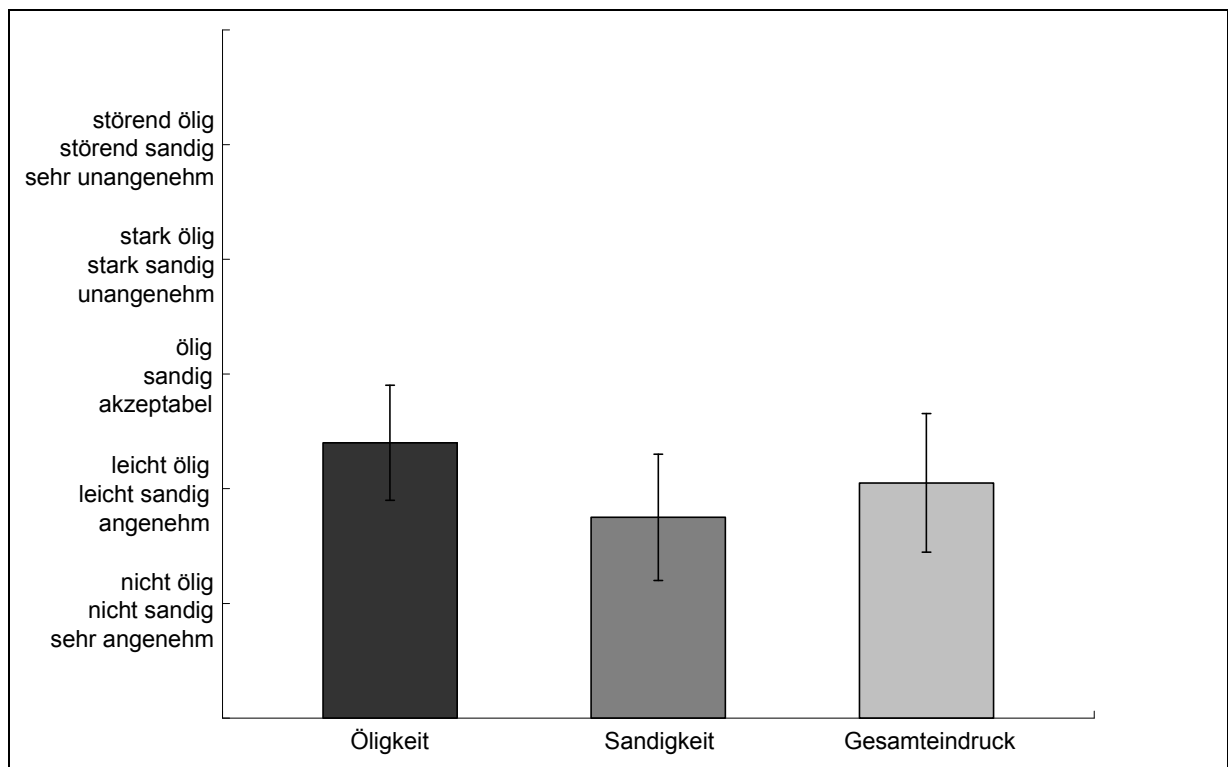


Abbildung 7: Ergebnisse der Probandenbefragung hinsichtlich Geschmack und Mundgefühl der wirkstofffreien Oleogel-Zubereitung

Im letzten Teil der Versuchsreihe sollten die Probanden die wirkstofffreie Zubereitung mit drei weiteren Rezepturen vergleichen, die jeweils mit unterschiedlichen Aromen versetzt waren. Die Geschmacksrichtungen entsprachen Tutti-Frutti (Multivitamin/Multifrukt), Cassis (schwarze Johannisbeere) und Orange. Die Auswahl der Aromen hatte folgenden Hintergrund: Kinder mögen in der Regel am liebsten Geschmacksrichtungen, die sie bereits kennen, und Geschmacksstudien mit Kindern in Tansania ergaben eine Präferenz für die Aromen Multifrukt und Orange (Gabriëls et al., 2004). Andererseits erkennen Kinder Geschmacksrichtungen am besten, wenn sie mit der passenden Farbe assoziiert sind, z. B. Erdbeere mit rot und Zitrone mit gelb. Wenn die Farbe nicht zum Aroma passt, erkennen sie das Aroma häufig gar nicht und lehnen es eher ab (EMA Reflection Paper). Das Ziel der besten Aroma-Farb-Korrelation führte zu der Wahl des Cassis-Aromas, da die Farbe des MB-Oleogels dunkel und bläulich ist.

In Abbildung 8 dargestellt sind die Häufigkeiten, mit denen wiederum die Noten 1-5 vergeben wurden, kodierend für „sehr angenehm“ bis „sehr unangenehm“. Auffällig ist, dass die neutral-süße Zubereitung als einzige weder mit der Note 4 noch 5 beurteilt wurde, jedoch auch nur selten mit 1. Mit Abstand am häufigsten wurde die Note 2 vergeben. Die anderen Zubereitungen wurden öfter mit 1 bewertet, allerdings ebenfalls mit 4 und 5. Die Durchschnittsnoten ergaben $2,3 \pm 0,6$ für die neutral-süße Zubereitung, $2,4 \pm 1,2$ für Tutti-Frutti, $2,3 \pm 1,3$ für Cassis und $2,5 \pm 0,9$ für Orange (MW \pm s, n = 20), d. h. die Bestnote mit der geringsten Standardabweichung wurde für die neutral-süße Zubereitung vergeben. Dies erklärt sich dadurch, dass Aromen bei den Probanden polarisierten. Einige Probanden empfanden bestimmte Aromen als sehr gut, andere wiederum assoziierten dasselbe Aroma z. B. mit einem antibiotischen Saft, der in der Kindheit bei ihnen Übelkeit verursachte, und empfanden das Aroma daher als sehr unangenehm.

Unerwünschte Nebenwirkungen durch Aromastoffe treten nicht sehr häufig auf, da sie meist in sehr geringen Mengen eingesetzt werden. Jedoch wurden einige allergische und pseudoallergische Reaktionen mit Aromastoffen in Verbindung gebracht. Aromastoffe können aus den verschiedensten Chemikalien mit GRAS Status hergestellt werden. Diese Zusammenstellungen an Inhaltsstoffen der Aromen sind meist Geschäftsgeheimnis und stehen Industrie und Öffentlichkeit oft nicht zur Verfügung. Die Bestimmung der Zusammensetzung der Aromastoffe ist oft kompliziert, da die verschiedensten Chemikalien als Hauptbestandteil vorkommen können. Auch können unterschiedliche Mischungen der gleichen Substanzen unterschiedliche Geschmacksrichtungen hervorrufen (Kumar et al., 1993). Eine systematische Risikobeurteilung für unerwünschte Wirkungen kann aufgrund dessen nur schwer durchgeführt werden. Daher ist es von großem Vorteil, dass laut der

Ergebnisse der Probandenbefragung auf den Zusatz von Aromastoffen verzichtet werden kann, ohne die Akzeptanz der Zubereitung zu schmälern.

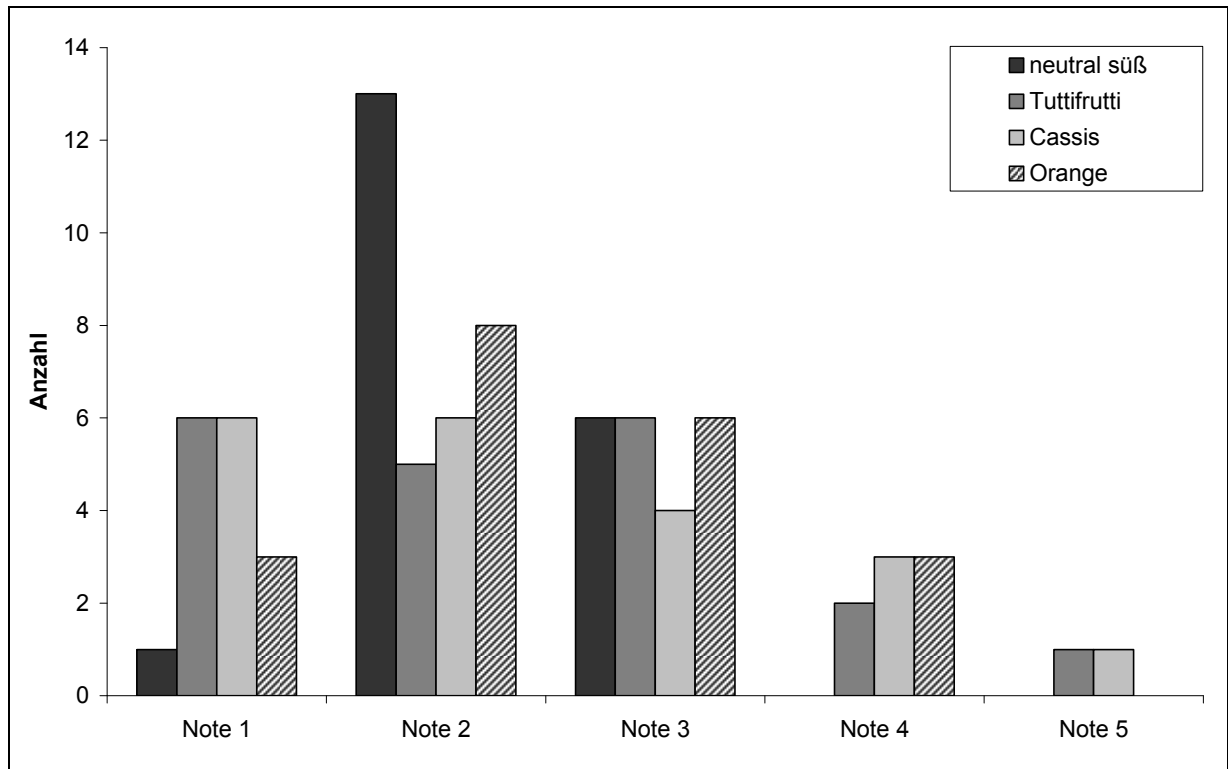


Abbildung 8: Ergebnisse der Probandenbefragung zu vier wirkstofffreien Oleogel-Zubereitungen mit verschiedenen Geschmacksrichtungen; Notenhäufigkeitsverteilung

4.5 Schlussfolgerung

Die Oleogel-Zubereitung auf Basis mittelkettiger Triglyzeride ist ein geeignetes Vehikel für das MB-Resinat. Die spontane Desorption des MB in pH-neutralem Milieu wird durch die Abwesenheit von Wasser unterbunden und somit ist der Geschmack auf zufriedenstellende Weise maskiert. Die rheologischen Eigenschaften sorgen sowohl für eine akzeptable Stabilität während der Lagerung als auch für einfache und zuverlässige Dosierung nach Scherung. Geschmack und Mundgefühl werden von erwachsenen Probanden als gut beurteilt. Die entwickelte Rezeptur enthält ausschließlich Hilfsstoffe mit positiver Nutzenbewertung bei Kindern. Eine Aromatisierung der Zubereitung ist nicht erforderlich und auch nicht ratsam, da die Akzeptanz der Zubereitung durch Aromatisierung sehr inhomogen wird und sich im Schnitt sogar verschlechtert. Auch die Nutzen/Risiko-Bewertung von Aromen ist bei Kindern nicht als positiv zu beurteilen, da essentielle Informationen zur chemischen Zusammensetzungen fehlen.

5. Herstellung und Charakterisierung einer ersten GMP-Charge für klinische Prüfmuster

5.1 Einleitung

Anhand der im Labor entwickelten Zubereitung wurde ein Ansatz von 50 kg für klinische Prüfmuster hergestellt, die für eine pharmakokinetische Studie bei Kindern verwendet werden sollte. Herstellung und Abfüllung erfolgten bei dem pharmazeutischen Unternehmen Pharbil Waltrip GmbH unter GMP-Bedingungen.

5.2 Charakterisierung

Das MB-Indion® 234-Oleogel der hergestellten Charge wies eine deutlich höhere Viskosität auf als die hergestellten Zubereitungen der Laborexperimente (siehe Abbildung 9). Die theoretische Fließgrenze der GMP-Charge lag bei 66 Pa (66,28 Pa \pm 2,14 Pa, MB \pm s, n = 3), und damit weit entfernt vom als geeignet beurteilten Bereich. Dies bestätigte sich in der praktischen Handhabung, da das Oleogel durch Schütteln der Verpackung kaum zu verflüssigen war.

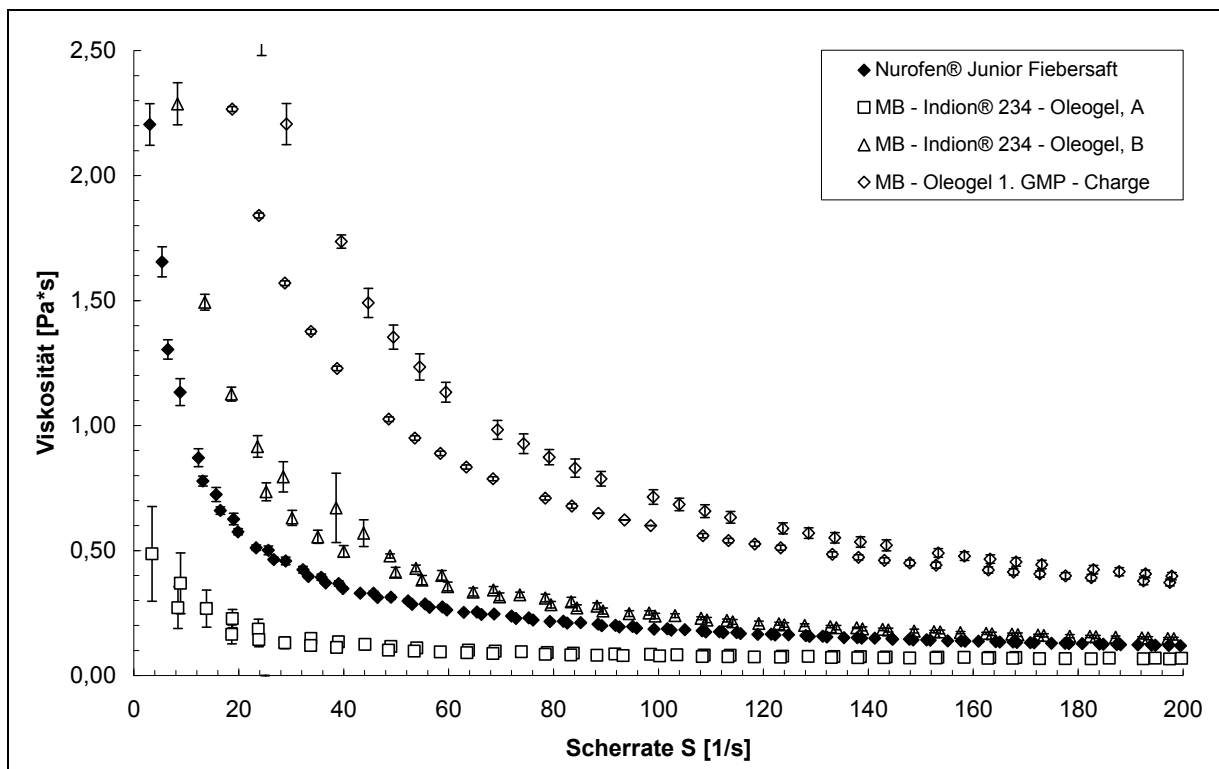


Abbildung 9: Viskositäten von Nurofen® Junior Fiebersaft, zweier MB-Indion® 234-Oleogel-Chargen im Labormaßstab sowie der ersten GMP-Charge (MB \pm s, n = 3)

Rheologische Experimente wurden mit verschiedenen neu hergestellten Hilfsstoffkombinationen und -anteilen durchgeführt, um die Einflussgrößen zu untersuchen. Die Zusammensetzung der geänderten Zubereitungen entsprach jeweils der Zusammensetzung des MB-Indion® 234-Oleogel im Hinblick auf Konzentration des

Gelbildners Aerosil[®] 200 sowie der Feststoffanteile. Insgesamt entsprach der Feststoffanteil immer dem gesamten Feststoffanteil des MB-Indion[®] 234-Oleogels, da der prozentuale Feststoffanteil im Oleogel an sich die Viskosität ebenfalls beeinflusst. So wurde z. B. bei der reinen Oleogel-Fruktose-Zubereitung die Einwaage an Fruktose, im Vergleich zur Fruktose-Einwaage im MB-Indion[®] 234-Oleogel, auf die Menge des gesamten Feststoffanteils im MB-Indion[®] 234-Oleogel erhöht. Der unbeladene Ionenaustauscher Indion[®] 234 sowie MB Ausgangssubstanz wurden jeweils entsprechend der Menge des MB-Indion[®] 234-Resinats eingewogen. Bei der Herstellung der geänderten Zubereitungen wurde auf konstante Scherrate sowie Scherzeit geachtet, um keine weiteren beeinflussenden Größen einzuführen. Da die Standardabweichungen der Viskositäten bei hoher Scherrate sehr gering sind, wurden folgende Messungen mit $n = 1$ durchgeführt. Die Ergebnisse der folgenden Experimente sind nur untereinander vergleichend zu bewerten, da ein anderes Rotationsviskosimeter mit abweichender Methode verwendet wurde. Die absoluten Werte der Viskositäten sind deshalb nicht mit den Ergebnissen der MB-Indion[®] 234-Oleogel-Laborchargen sowie der GMP-Charge zu vergleichen.

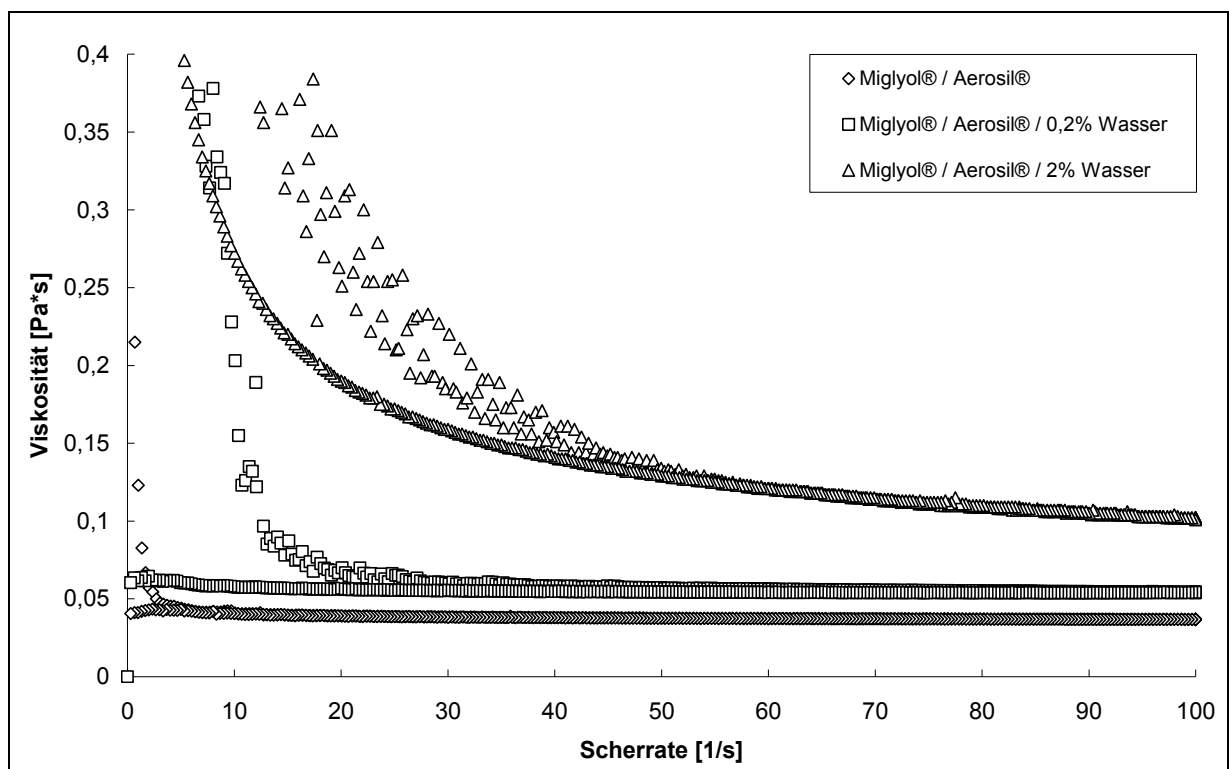


Abbildung 10: Einfluss von Wasser auf die rheologischen Eigenschaften des Oleogels

Der viskositätserhöhende Einfluss von Wasseranteilen im Oleogel ist bekannt, und in Abbildung 10 auch gut zu sehen. Dieser Faktor allein kann jedoch für die Viskositätserhöhung der GMP-Charge nicht verantwortlich sein.

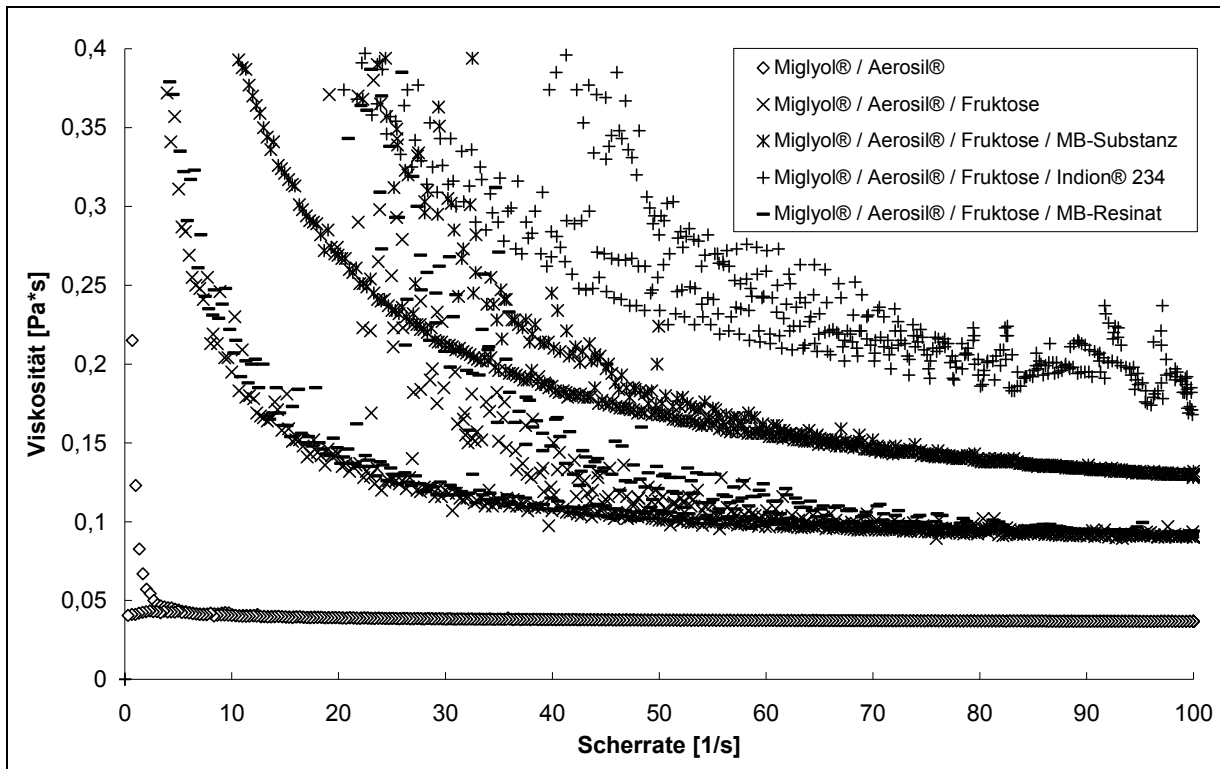


Abbildung 11: Einfluss von Rezepturbestandteilen auf die rheologischen Eigenschaften des Oleogels

In Abbildung 11 ist deutlich der verfestigende Einfluss des hohen Feststoffanteils zu erkennen. Zu weiterer Verfestigung führen offensichtlich unbeladene funktionelle Gruppen im Ionenaustauscher, erkennbar an der Viskosität der geänderten Rezeptur mit unbeladenem Indion® 234.

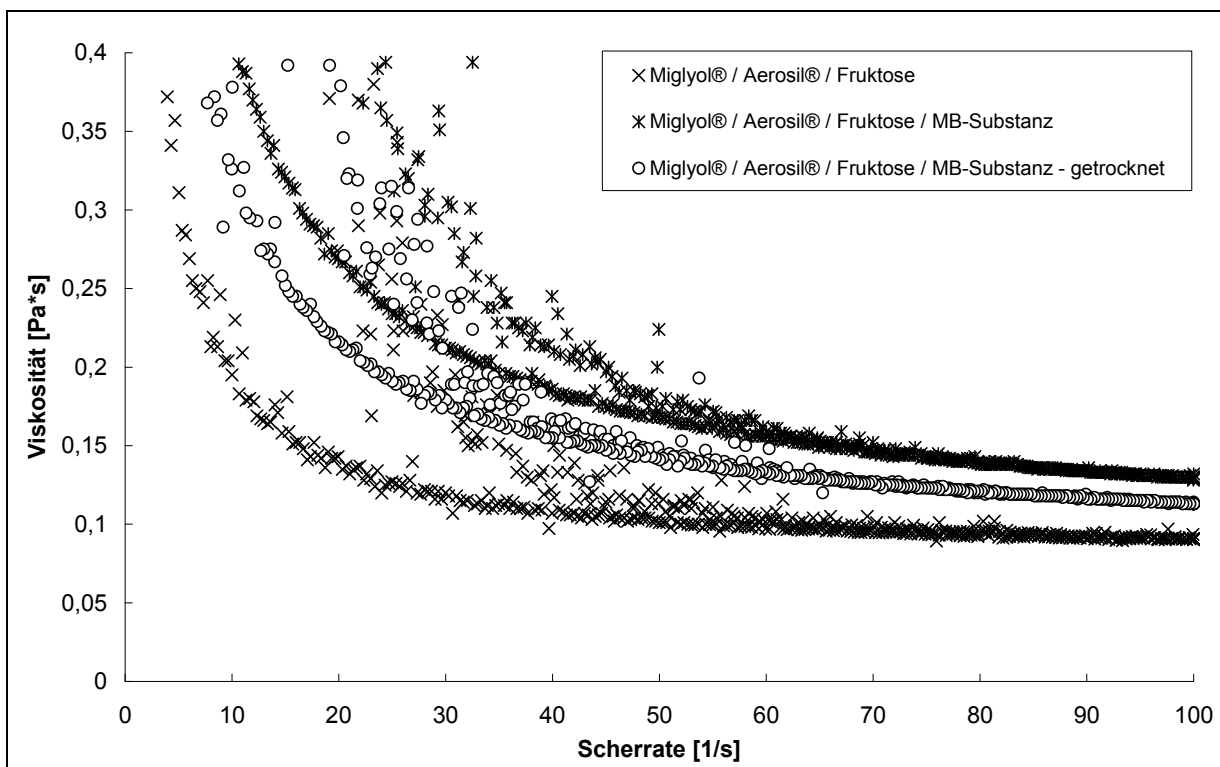


Abbildung 12: Einfluss von MB-Hydrat / -Anhydrat auf die rheologischen Eigenschaften des Oleogels

Einen ebenfalls großen Einfluss hat frei vorliegendes MB. Um festzustellen, ob die strukturverfestigende Eigenschaft von MB ausschließlich auf sein Hydratwasser zurückzuführen ist, werden vergleichende Untersuchungen mit vollständig getrockneter MB-Substanz durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen einen Einfluss von MB, der nicht auf dem Hydratwasser beruht.

Bei der Strukturverfestigung der GMP-Charge addierten sich offensichtlich mehrere Faktoren. Erstens war die Restfeuchte des MB-Indion® 234-Resinats durch unvollständigere Trocknung im Vergleich zu den im Labor hergestellten Chargen deutlich erhöht. Außerdem war der Waschprozess des MB-Indion® 234-Resinats der GMP-Charge weniger ergiebig, wie sich in der analytischen Charakterisierung zeigte. Das Zugeben des Waschwassers in den Beladungskessel erfolgte in kleinen Portionen, so dass in der Mitte des Kessels eine Art Trichter entstand. Das Waschwasser lief durch, ohne Resinat, das sich an den Rändern befand, vollständig zu waschen. Das auslaufende Waschwasser war nicht mehr blau gefärbt, was fälschlicherweise den Endpunkt der vollständigen Waschung vortäuschte. Aus diesem Grund waren die Färbung und der Geschmack des MB-Indion® 234-Oleogels der GMP-Charge auch bedeutend blauer bzw. bitterer als die der Labor-Chargen.

Mikrobiologische Prüfungen wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten bei verschiedenen Einlagerungsbedingungen durchgeführt. Probenmuster des MB-Resinat-Oleogels wurden im Originalbehältnis bei den Standardbedingungen 25 °C bei 60 % rF eingelagert, sowie zusätzlich bei 40 °C und 75 % rF, da die MB-Resinat-Zubereitung in tropischen Gebieten (Burkina Faso, Afrika) eingesetzt werden sollte. Auch die Anbruchsstabilität über drei Tage wurde entsprechend bei 40 °C und 75 % rF durchgeführt. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen entsprachen bei allen Einlagerungsbedingungen zu allen Analysezeitpunkten den Anforderungen des Arzneibuchs (Ph. Eur. 2.6.12, 2.6.13). Somit scheint eine Konservierung der MB-Zubereitung nicht notwendig. Dies spricht für die gute Eignung der Oleogel-Rezeptur für den Einsatz in der Pädiatrie auch in tropischen Gebieten, da aufgrund von möglichen Nebenwirkungen durch Konservierungsstoffe (Kumar et al., 1993) auf deren Zusatz in pädiatrischen Zubereitungen nach Möglichkeit verzichtet werden sollte.

Der Gehalt an MB wurde mittels einer von der Firma Pharbil entwickelten HPLC-Methode für die Stabilitätsuntersuchungen bestimmt. Die verwendete Methode beruht auf der HPLC-Methode für „verwandte Substanzen“ der Ph. Eur. Monographie „Methylthioniniumchlorid“. Die Analyse des Gehalts kam allerdings zu dem überraschenden Befund, dass im Endprodukt nur noch 36,5 % MB vorhanden waren. Gleichzeitig war der Gehalt der Verunreinigung A (Azur B), der in der Ausgangssubstanz MB laut Ph. Eur. Monographie auf maximal 5 % begrenzt wird, auf

33,1 % angestiegen. Die Summe aller weiteren Verunreinigungen, die laut Monographie des Ausgangsstoffes MB maximal 1 % betragen darf, war im Endprodukt ebenfalls erhöht und lag bei 35,9 %.

Es ist zu betonen, dass bei der durchgeführten klinischen Studie mit dem MB-Indion® 234-Oleogel kein einziges Kind einen gesundheitlichen Nachteil erfuhr. Es traten keine unerwünschten Nebenwirkungen auf, und die Verträglichkeit und Akzeptanz der Oleogel-Zubereitung waren im Vergleich zu den zuvor verabreichten wässrigen MB-Lösungen erhöht (unveröffentlichte Daten).

Überraschenderweise war zudem die antiplasmodische Wirkung der MB-Indion® 234-Oleogel-Zubereitung vergleichbar mit den Ergebnissen zuvor durchgeführter Studien mit MB bei Erwachsenen, obwohl der Gehalt an MB in der Oleogel-Zubereitung unter 40 % lag. Dieser Befund lässt die hypothetische Schlussfolgerung zu, dass die zusätzlich und/oder in erhöhten Mengen auftretenden Substanzen ebenfalls eine antiplasmodische Wirkung entfalten, oder dass MB möglicherweise im Körper als Prodrug fungiert, da Azur B auch als natürlicher Metabolit von MB auftritt. Die zusätzlich auftretenden Substanzen waren allerdings zu dem Zeitpunkt nicht identifiziert und auch die Ph. Eur. Monographie „Methylthioniniumchlorid“ gibt keine Hinweise auf ihre Identität.

Die Kriterien einer Ausgangssubstanz müssen sich nicht zwingend mit den Kriterien an eine diese Substanz enthaltende Arzneizubereitung decken, wie in vorliegendem Fall z. B. das prozentuale Verhältnis von Azur B zu MB. Es muss jedoch für jede Arzneizubereitung der Nachweis für Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit erbracht werden, und dies beinhaltet zunächst die Identifizierung der unbekannt und begrenzt zugelassenen Substanzen sowie die Kenntnis ihrer Eigenschaften bezüglich Wirksamkeit und Toxizität. Bis Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nicht zweifelsfrei bewiesen sind, gelten die Kriterien der Ausgangssubstanz. Daher wurden die Kriterien an die MB Ausgangssubstanz laut Ph. Eur. Monographie „Methylthioniniumchlorid“ im Rahmen dieser Arbeit als geltend betrachtet.

5.3 Vergleichende Untersuchungen mit anderen Resinat-Chargen und deren Zubereitungen

5.3.1 UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob die Erhöhung des Azur-B-Anteils sowie die Anwesenheit der zusätzlichen Substanzen ausschließlich bei der GMP-Charge auftraten, oder ob die zusätzlich und erhöht auftretenden Substanzen auch bei allen anderen bisher hergestellten Zubereitungen auftraten.

Es wurden UV/VIS-Spektren von wässrigen Lösungen der im Labor und bei der Herstellung der GMP-Charge eingesetzten MB Ausgangssubstanz der Firma Spectrum aufgezeichnet. Zum Vergleich wurden ebenfalls Spektren der Desorptionslösungen von verschiedenen MB-Indion[®] 234-Resinaten aufgenommen, die bisher zur photometrischen Bestimmung des Gehalts verwendet wurden. Die MB-Indion[®] 234-Resinate stammten aus den eigenen Laborexperimenten, aus der GMP-Charge sowie von Gut et al. (2008), die eine Probe ihrer Resinate für weitere Untersuchungen zur Verfügung stellten.

In Abbildung 13 ist die Übereinstimmung der Spektren der zwei MB-Ausgangssubstanzen deutlich zu erkennen, so dass ein Unterschied in der MB Ausgangssubstanz als Auslöser unwahrscheinlich erschien. Die Spektren der Desorptionslösungen der verschiedenen MB-Resinate zeigen, in leicht variiertes Ausprägung, ebenfalls ein untereinander vergleichbares UV/VIS-Spektrum.

Somit konnte man davon ausgehen, dass die bei der GMP-Charge auftretenden Veränderungen auch bei allen anderen MB-Resinaten auftraten, sowohl bei den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Resinaten als auch bei jenen von Gut et al. (2008).

Bei der Entwicklung einer Freisetzungsanalytik für MB-Indion[®] 234-Resinat in Oleogel-Zubereitungen trat das Phänomen von wiederholten Freisetzungsraten knapp oberhalb von 100 % auf, für die zunächst keine plausible Erklärung gefunden wurde.

Der Vergleich der jeweiligen Absorptionen bei 600 nm, der von Gut et al. (2008) gewählten Wellenlänge für quantitative Analytik, liefert den Grund für die angebliche Freisetzung von mehr als 100% MB (siehe Abbildung 13). Bei 600 nm zeigten die Lösungen der Desorptionsversuche durch das veränderte und hypsochrom verschobene Spektrum eine höhere spezifische Absorption als die beiden Ausgangssubstanzen von MB und simulierten damit eine höhere Konzentration der Lösung.

Die Wellenlänge 246 nm wird in der HPLC-Methode der Ph. Eur. Monographie „Methylthioniniumchlorid“ verwendet. Bei dieser Wellenlänge wäre anhand der rein photometrischen Quantifizierung vermutlich kein Unterschied zur Absorption der reinen MB Ausgangssubstanz aufgefallen. Eine rein UV/VIS-spektroskopische Methode zu Quantifizierungszwecken ohne chromatographische Trennung von Substanzen war somit in diesem Fall ungeeignet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

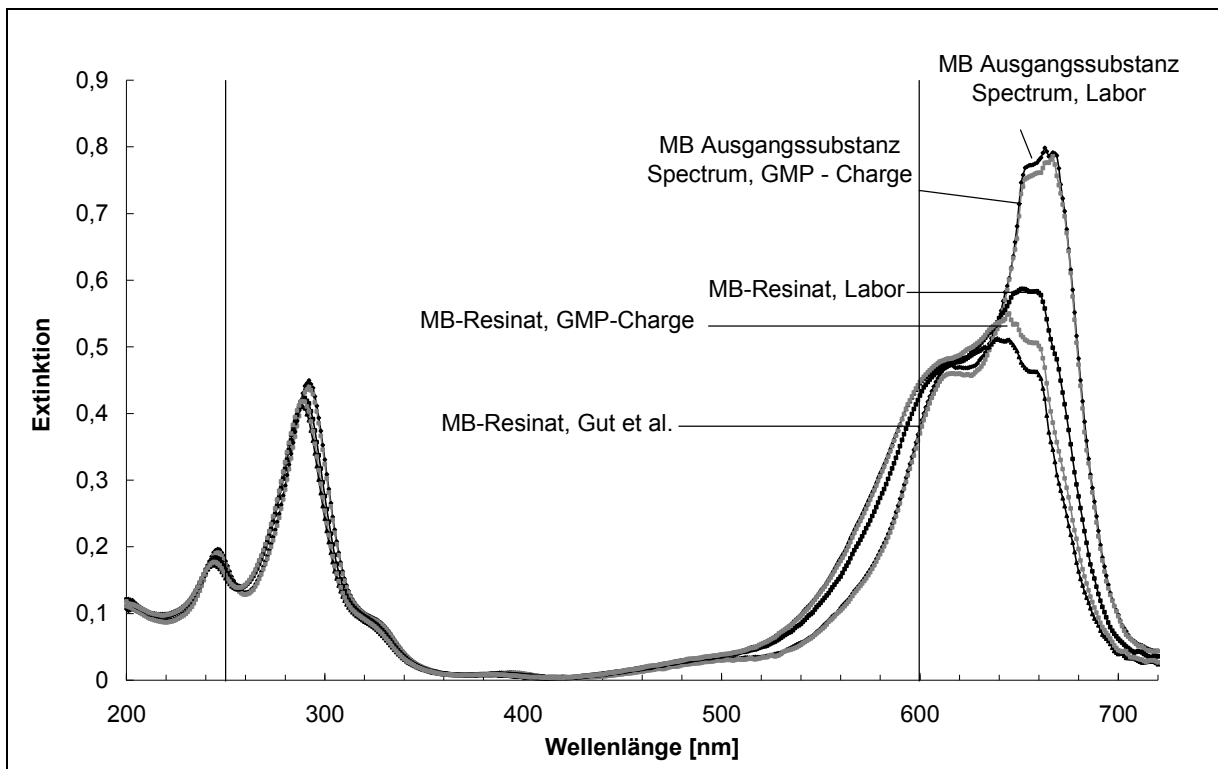


Abbildung 13: UV/VIS-Spektren verschiedener Chargen von MB Ausgangssubstanz sowie Desorptionslösungen verschiedener MB-Resinate

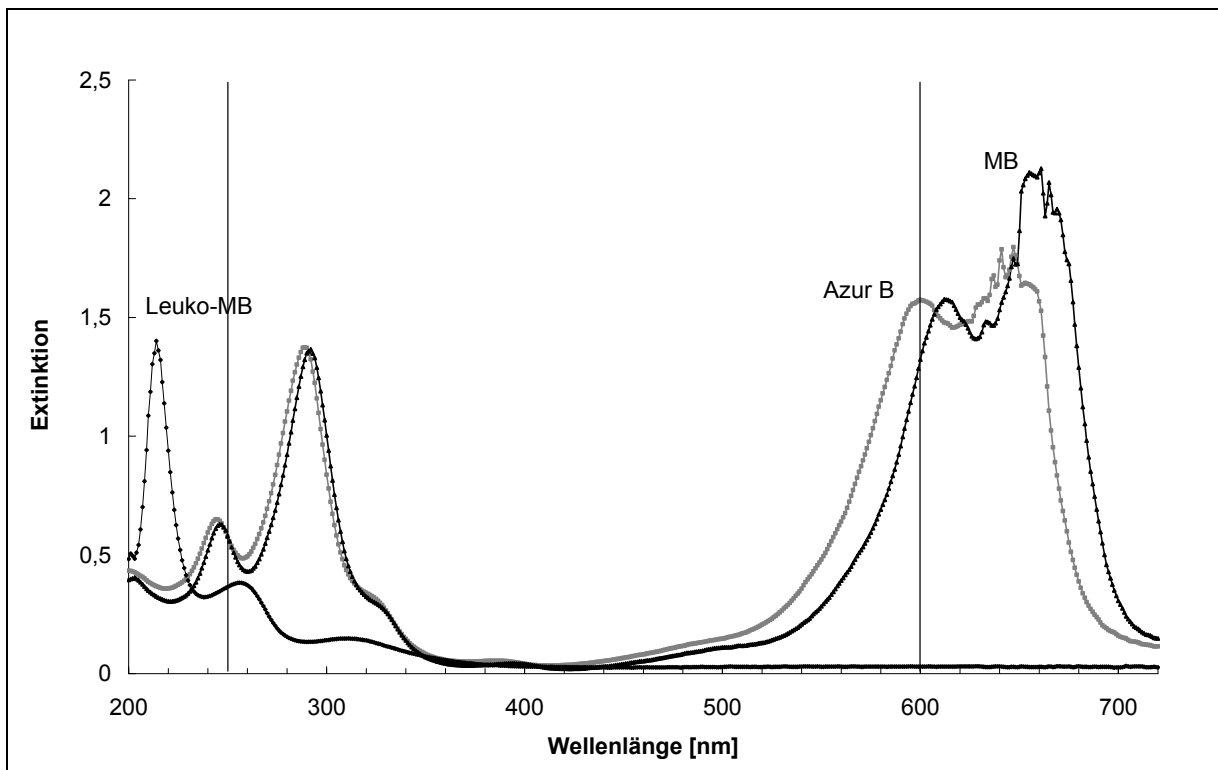


Abbildung 14: UV/VIS-Spektren von MB Ausgangssubstanz, Azur B CRS sowie Leuko-MB

Im Anschluss an diese Erkenntnisse wurde das äquimolare UV/VIS-Spektrum von Azur B CRS, des mono-N-demethylierten Homologen von MB („Verunreinigung A“ laut Ph. Eur.), aufgenommen. Durch Behandlung mit KOH und Fruktose als reduzierendem Zucker, wurde MB zu seiner Leukobase reduziert und von der Lösung ebenfalls ein Spektrum aufgezeichnet.

Die Spektren in Abbildung 14 zeigen, dass die veränderten Spektren der Resinat-Desorptionslösungen nicht durch eine Reduktion von MB entstanden sind, da das Spektrum des Leuko-MB keine Ähnlichkeit mit den Spektren der in der Desorptionslösung vorhandenen Substanzen aufweist. Die Spektren der Resinat-Desorptionslösungen zeigen dagegen eine deutliche Ähnlichkeit mit dem des Azur B, was sich durch die Gehaltsanalyse mittels HPLC der GMP-Charge bestätigt.

Über die weiteren auftretenden, unbekanntenen Verunreinigungen konnte allerdings anhand der Spektren keine Aussage getroffen werden.

5.3.2 Untersuchungen mittels HPLC mit UV/VIS-Detektion

Um die Desorptionslösungen genauer zu untersuchen, wurde eine chromatographische Analyse mittels HPLC durchgeführt.

Laut Ph. Eur. Monographie darf der prozentuale Anteil an Azur B, im Vergleich zur Hauptsubstanz MB, maximal 5 % betragen, die Summe aller anderen Substanzen maximal 1 %.

Das erste Spektrum (Abbildung 15) zeigt das Chromatogramm der MB Ausgangssubstanz. Azur B als Verunreinigung liegt mit 4,26 % im vom Ph. Eur. akzeptierten Mengenbereich. Die Retentionszeit des MB liegt bei 5 Minuten, die des Azur B bei 4 Minuten.

Das zweite Chromatogramm (Abbildung 16) zeigt die Substanzen in der Desorptionslösung der Resinate, von denen MB und Azur B bekannt sind. Die weiteren Substanzen sind nicht identifiziert. Alle Substanzen zeigen einen erhöhten prozentualen Anteil im Vergleich zur Hauptsubstanz MB, der die Grenzen der Monographie für die Ausgangssubstanz weit überschreitet. Die UV/VIS-Spektren der unbekanntenen Substanzen zeigten ebenfalls Ähnlichkeit mit dem des MB.

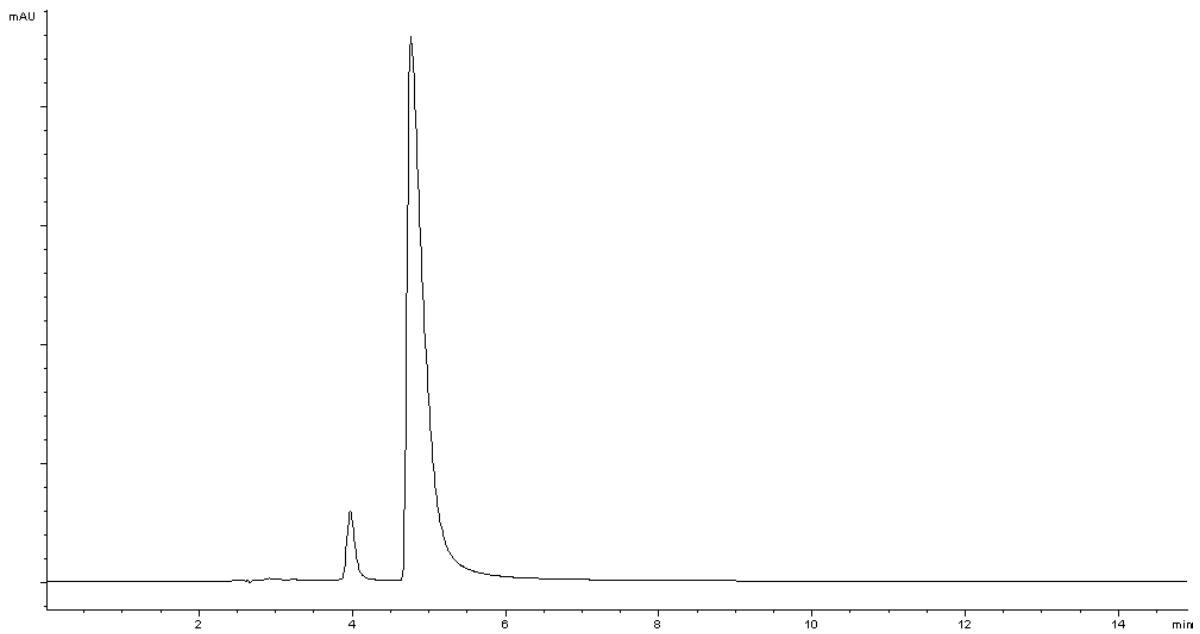


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm von MB Ausgangssubstanz der Fa. Spectrum (USP Qualität)

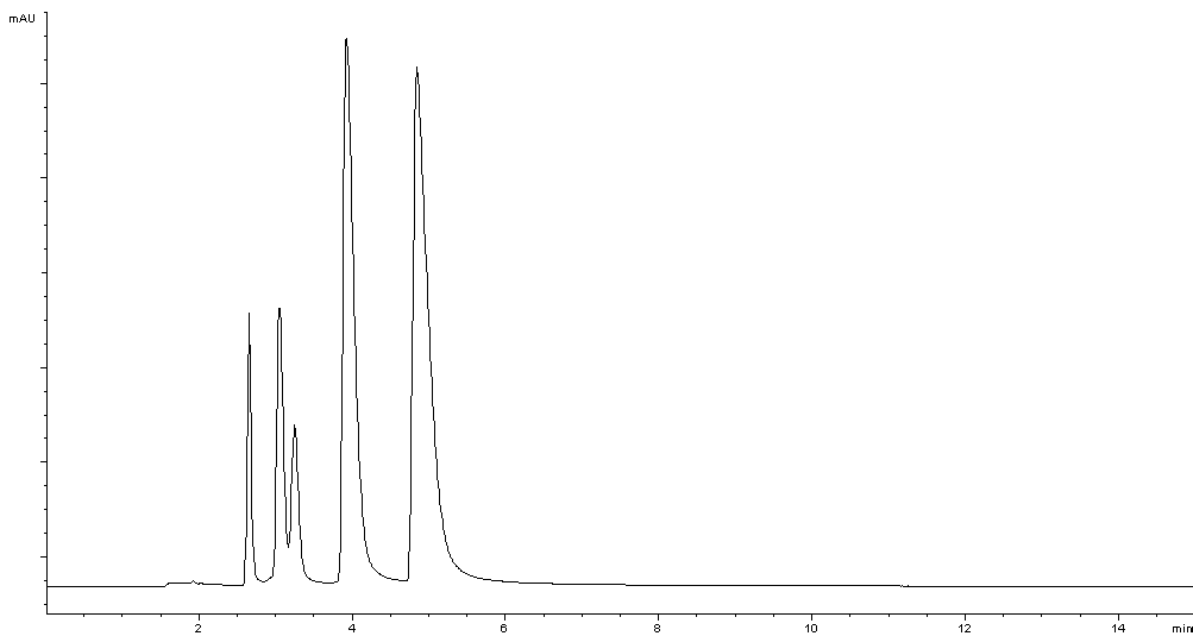


Abbildung 16: HPLC-Chromatogramm der Desorptionslösung von MB-Indion[®] 234-Resinat

5.4 Schlussfolgerung

Die zusätzlichen und in ihrer Menge erhöhten Substanzen traten nicht nur in der GMP-Charge auf, sondern bei allen bisher hergestellten Resinaten, denen von Gut et al. (2008) sowie den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Resinaten und ihrer Zubereitungen. Gleichzeitig konnte ein Einfluss der eingesetzten Hilfsstoffe des Oleogels ausgeschlossen werden, da die Desorptionslösungen der reinen MB-Resinate ohne Hilfsstoffe im HPLC-Chromatogramm dieselben Nebenprodukte aufwiesen. Eine reduzierende Reaktionskomponente schien unwahrscheinlich, da die Spektren der Desorptionslösungen keine Ähnlichkeit mit dem des Leuko-MB zeigten.

6. Identifizierung der Nebenprodukte

6.1 Einleitung

Alle im HPLC Chromatogramm der Desorptionsversuche auftretenden Substanzen zeigten ein vergleichbares UV/VIS-Spektrum, ähnlich dem des MB. Um Klarheit über die Identität der zusätzlich auftretenden Substanzen zu erhalten, wurden verschiedene Zersetzungsprodukte von MB synthetisiert, chromatographisch analysiert und mit Literaturdaten verglichen. Zur eindeutigen Identifikation der Nebenprodukte wurde die entsprechende HPLC-Analytik mit massenspektrometrischer statt photometrischer Detektion durchgeführt. Um die Substanzsignale im Chromatogramm zur Identifizierung besser voneinander zu trennen, wurde die isokratische HPLC-Methode nach Ph. Eur. durch eine daraus weiterentwickelte Methode mit Gradient ersetzt.

6.2 Untersuchungen mittels HPLC mit UV/VIS-Detektion

In Abbildung 17 und Abbildung 18 sind die Chromatogramme von unterschiedlich hergestellten Zersetzungsprodukten von MB dargestellt. Provoziert wurden eine pH-saure, eine pH-alkalische und eine oxidative Zersetzung mit H_2O_2 durch Erhitzen der Lösungen bis zum Siedepunkt, sowie eine pH-alkalische Zersetzung bei Umgebungstemperatur. Durch pH-Differenzen in den Probelösungen kam es teilweise zu Verschiebungen der Retentionszeiten.

Der Vergleich der Chromatogramme der synthetisierten Zersetzungsprodukte mit dem Chromatogramm der desorbierten Substanzen vom Resinat zeigt Ähnlichkeiten mit der pH-sauren Zersetzung bei Hitzeeinwirkung sowie der alkalischen Zersetzung bei Umgebungstemperatur. Auch die UV/VIS-Spektren der entstandenen Substanzen ähnelten dem des MB. Bei der pH-alkalischen Zersetzung bei Hitzeeinwirkung erkennt man ebenfalls das vorliegende Zersetzungs muster, allerdings ist hier die Zersetzung deutlich stärker fortgeschritten.

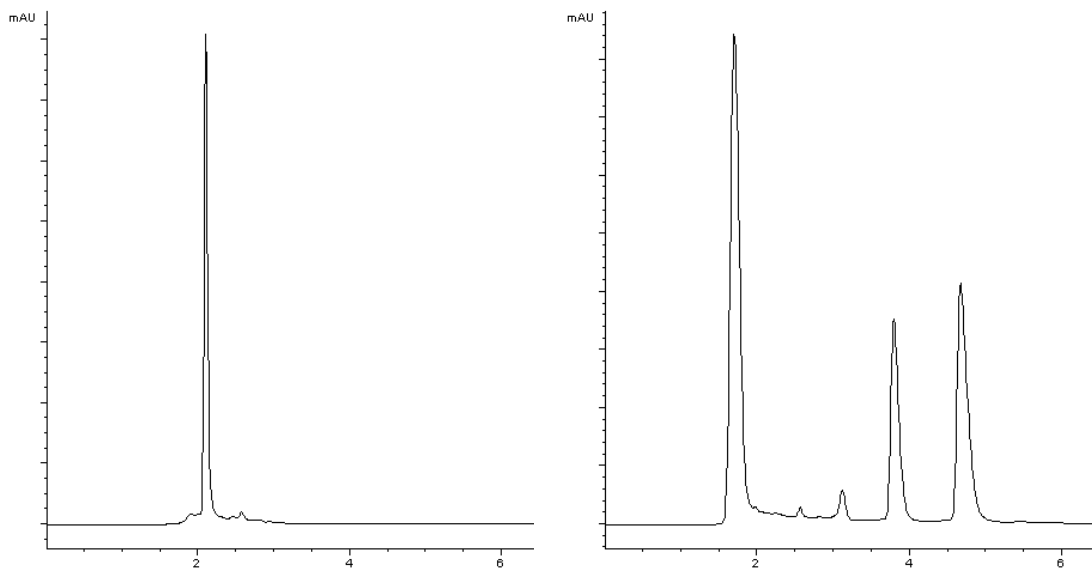


Abbildung 17: Chromatogramm der oxidativen (links) und pH-sauren Zersetzung unter Hitze- einwirkung (rechts) von MB

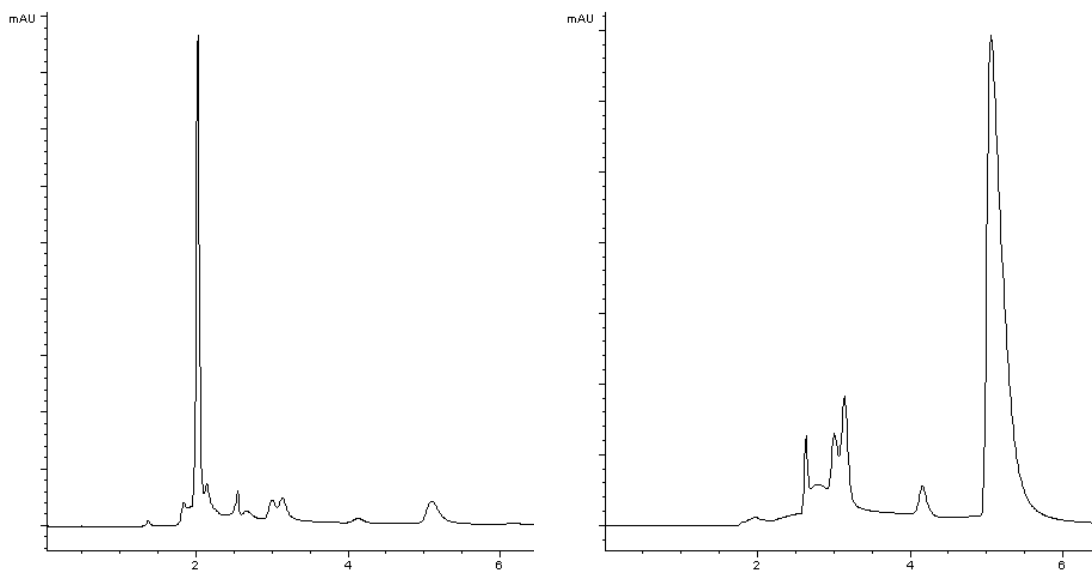


Abbildung 18: Chromatogramm der pH-alkalischen Zersetzung unter Hitze einwirkung (links) und pH-alkalischen Zersetzung bei Umgebungstemperatur (rechts) von MB

Die oxidative Zersetzung zeigt ein anderes Muster, und auch die UV/VIS-Spektren der Substanzen zeigten keine Ähnlichkeit mit dem des MB. Die Lösung war außerdem entfärbt, so dass die Zerstörung des farbgebenden Chromophors nahe liegt.

In der Literatur werden verschiedene Zersetzungen von MB beschrieben, die oft mit einer N-Demethylierung einhergehen. So findet man Berichte über N-Demethylierung von MB im Alkalischen (DiSanto et al., 1972a), im Säuren unter Hitze einwirkung sowie unter oxidierenden Bedingungen (Šušić et al., 1972). Auch photokatalytische N-Demethylierung in wässriger Lösung in der Gegenwart von TiO₂-Partikeln oder-Filmen wird geschildert (Zhang et al., 2001; Yogi et al., 2008).

6.3 Untersuchungen mittels HPLC mit massenspektrometrischer Detektion

Das aufgenommene HPLC-Chromatogramm der vom MB-Indion[®] 234-Resinat desorbierten Substanzen zeigt mit der Gradientenmethode sechs voneinander getrennte Substanzsignale, siehe Abbildung 19.

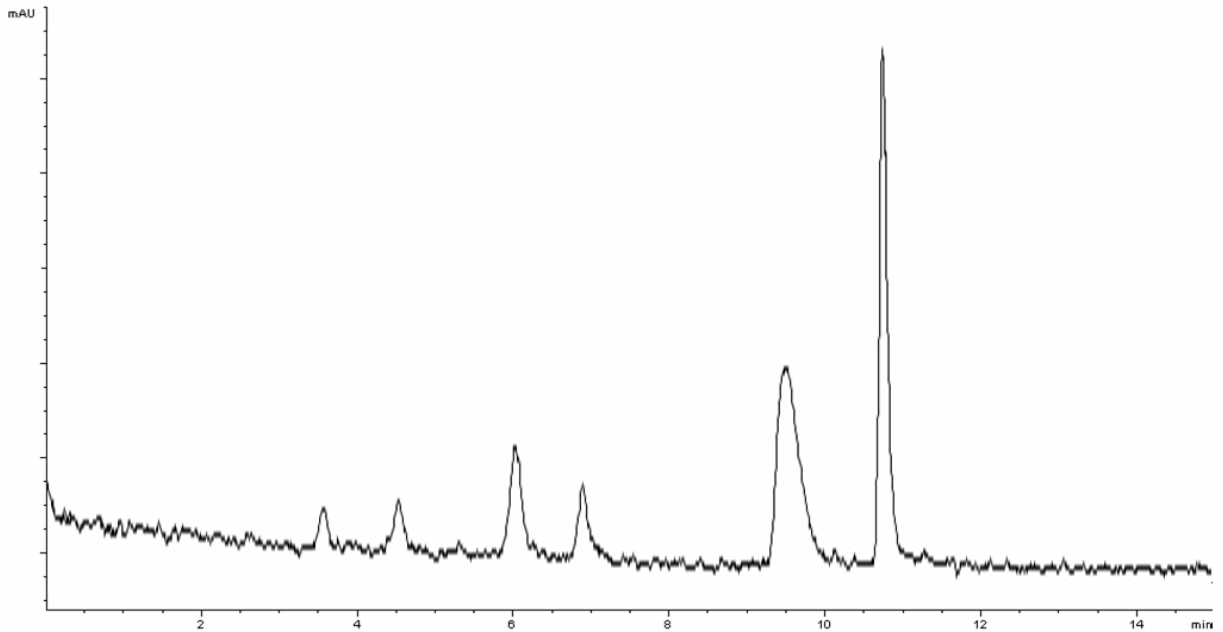


Abbildung 19: HPLC-Chromatogramm der Desorptionslösung von MB-Indion 234[®]-Resinat, Gradientenmethode

Den Substanzen im HPLC-Chromatogramm konnte mittels der Retentionszeiten ihrer Signale die massenspektrometrisch detektierte relative molare Masse der Substanzmoleküle zugeordnet werden. Das Beispiel für MB ist in Abbildung 20 dargestellt. Die relativen Molekülmassen aller weiteren Substanzen wurden in entsprechender Weise ermittelt.

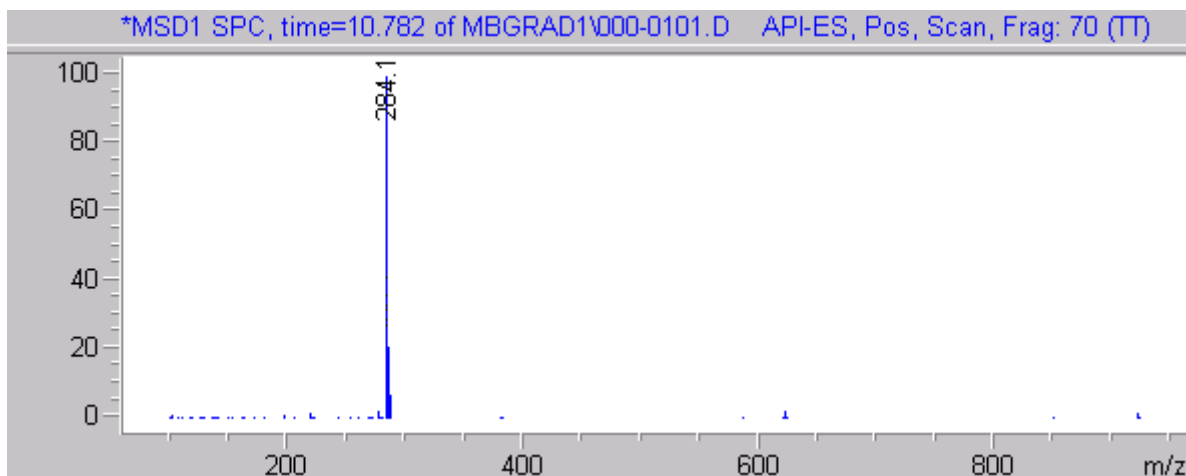


Abbildung 20: Massenspektrum für das Substanzsignal mit der Retentionszeit 10,782 im HPLC-Chromatogramm

Die mittels des Massenspektrometers identifizierten molaren Massen der Substanzen sind in Tabelle 2 dargestellt. Die laut Ph. Eur. bereits bekannten Substanzen im Chromatogramm sind benannt.

	Retentions-Zeit [min]	rel. molare Masse [g/mol]	Molekül in Abbildung 21	Name der Substanz (Ph. Eur.)
Peak 1	03.6	228	[6]	-
Peak 2	04.5	242	[5]	-
Peak 3	06.0	256	[3]/[4]	-
Peak 4	06.9	256	[3]/[4]	-
Peak 5	09.5	270	[2]	Verunreinigung A (Azur B)
Peak 6	10.8	284	[1]	Methylthioniumchlorid (MB)

Tabelle 2: Retentionszeiten, relative molare Molekülmassen und Zuordnung der Signale zu den Nebenprodukten in Abbildung 21

Unter der Berücksichtigung, dass die detektierten molaren Massen die Ionen in Lösung ohne Gegenion und Hydratwasser darstellen, konnten die relativen Molekülmassen den in Abbildung 21 gezeigten Molekülen zugeordnet werden:

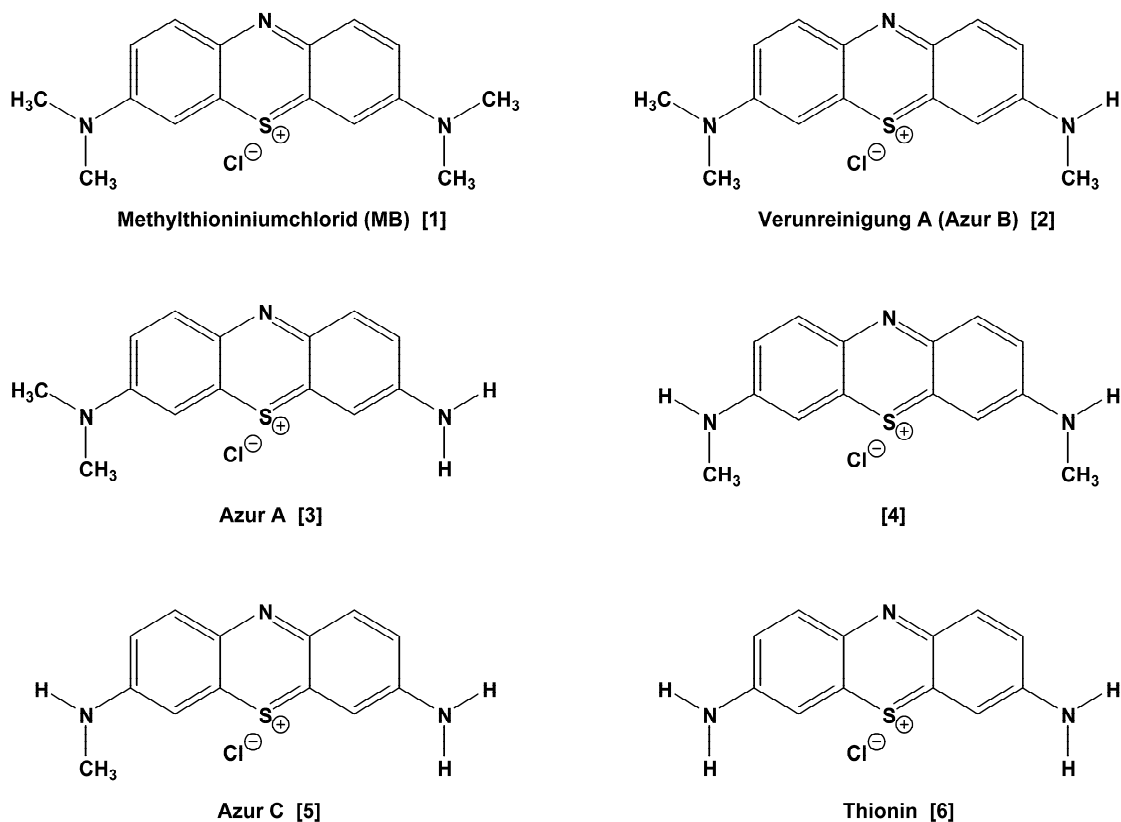


Abbildung 21: Strukturformeln von MB und seiner N-demethylierten Homologe

6.4 Schlussfolgerung

Neben MB traten sämtliche möglichen N-demethylierten Nebenprodukte des MB auf. Bei der Zersetzungsreaktion handelt es sich also offenbar um eine stufenweise Demethylierung der aromatischen Amino-Substituenten, ohne Zerstörung des Ringgerüsts von MB.

7. Untersuchungen zur Zersetzungsreaktion und Optimierung der MB-Resinat-Qualität

7.1 Einleitung

Nachdem die Nebenprodukte des MB identifiziert wurden, sollten nun die Ursachen für die Demethylierung aufgeklärt sowie Wege aufgezeigt werden, die Bildung der Nebenprodukte zu reduzieren oder sogar ganz zu unterbinden. Eine Reihe an systematischen Versuchen wurde durchgeführt, um diese Ziele zu erreichen.

7.2 Beladung und Desorption

7.2.1 Aufreinigung des Ionenaustauschers

7.2.1.1 Einleitung

Die erste Vermutung zum Mechanismus der beobachteten Demethylierung von MB betraf potentielle Verunreinigungen im Ionentauscher Indion[®] 234, z. B. aus dem Herstellungsprozess. Denkbar waren z. B. Spuren von Acrylsäure-Monomeren oder auch Metallionen. Die Herstellung von Polyacrylaten aus Acrylsäure läuft als radikalische Polymerisation ab, wobei als Radikalbildner in der Regel so genannte Azostarter oder Peroxide zum Einsatz kommen. Unter bestimmten Umständen ist es aber auch denkbar, dass Metallionen in Verbindung mit Luftsauerstoff, z. B. beim Trocknungsprozess des Resinats, eine Radikalbildung induzieren können.

7.2.1.2 Ergebnisse

Um mögliche Verunreinigungen aus dem Ionentauscher Indion[®] 234 zu entfernen, wurde eine Probe Indion[®] 234 in 100 mL 0,1 M wässriger EDTA-Lösung für 48 h bei Raumtemperatur und bei geringer Rührgeschwindigkeit dispergiert. Es wurde bewusst das Kaliumsalz des EDTA gewählt, da die Carboxylgruppen des Ionenaustauschers Indion[®] 234 mit K⁺ neutralisiert sind. Schwer kalkulierbare Veränderungen der Eigenschaften des Indion[®] 234 durch Ionenaustauschprozesse beim Einsatz des Natriumsalzes von EDTA sollten vermieden werden.

Hintergrund des Versuchs ist die Tatsache, dass das Monomer Acrylsäure gut wasserlöslich ist und durch den Waschvorgang entfernt werden kann. EDTA als chelatisierender Komplexbildner kann Metallionen binden und somit ebenfalls aus dem Ionenaustauscher entfernen.

Nach der Behandlung mit EDTA wurde die Probe mehrfach mit demineralisiertem Wasser gewaschen, um die EDTA-Lösung mit Verunreinigungen zu entfernen. Das Waschwasser wurde jeweils durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Das gewaschene Harz wurde bis zur Massenkonzanz über Orangegel getrocknet und daraufhin wie zuvor mit MB beladen. Nach Trocknung des resultierenden Resinats wurden die gebundenen Substanzen mit 0,1 M HCl desorbiert und die Desorptionslösung chromatographisch analysiert.

Das Chromatogramm zeigt im Vergleich zum Chromatogramm des Resinats aus nicht vorbehandeltem Harz keinerlei Reduktion des Zersetzungsgrades von MB.

7.2.1.3 Schlussfolgerung

Die Anwesenheit von Verunreinigungen im Indion[®] 234 ist nicht der Auslöser für die Zersetzung des MB.

In der Literatur wird die radikalisch-oxidative Fenton-Reaktion für MB beschrieben, die zur Zerstörung des Chromophors und somit zur Entfärbung von MB-Lösungen führt (Yang et al., 2009). Da die Zersetzungsprodukte bei den Resinaten noch farbig sind bekräftigt dies die Schlussfolgerung, dass bei der hier vorliegenden Zersetzungsreaktion keine radikalische Komponente maßgeblich beteiligt ist.

7.2.2 **Einfluss des Ionenaustauschertyps**

7.2.2.1 Einleitung

In der folgenden Versuchsreihe sollte festgestellt werden, ob die Bildung von Nebenprodukten ausschließlich in Verbindung mit Indion[®] 234 auftritt, oder ob sie ein generelles Phänomen bei der Verarbeitung von MB mit Kationenaustauschern ist.

7.2.2.2 Ergebnisse

Sechs verschiedene Ionenaustauscher wurden für diese Versuchsreihe eingesetzt. Neben dem bereits bekannten Indion[®] 234 wurden alle schwachen Ionenaustauscher verwendet, die auch von Gut et al. (2008) untersucht wurden: Indion[®] 234S, Indion[®] 294, IRP[®] 88 und IRP[®] 64, sowie der starke Ionenaustauscher, IRP[®] 69. Alle Ionenaustauscher wurden in wässriger Lösung wie zuvor mit MB beladen und die Desorptionslösungen der getrockneten Resinate chromatographisch analysiert.

Von dem MB-IRP[®] 69-Resinat konnten die gebundenen Substanzen nur zu einem geringen Anteil wieder desorbiert werden, durchschnittlich $9\% \pm 2\%$ ($MW \pm s$, $n = 3$). Da die Desorption gebundener Stoffe von Resinaten starker Kationentauscher nicht pH-abhängig ist, wurden Desorptionsversuche bei den drei zusätzlichen pH-Werten 2,2, 4,5 und 6,8 durchgeführt.

Bei keinem der pH-Werte konnte die Desorptionsrate weiter gesteigert werden. Die Chromatogramme der Desorptionslösungen zeigten allerdings keinen erhöhten Anteil von Nebenprodukten im Vergleich zum Chromatogramm der Ausgangssubstanz MB.

In den Chromatogrammen der Desorptionslösungen aller weiteren Resinate in 0,1 M HCl wurde in unterschiedlichem Ausmaß ein erhöhter Anteil von Nebenprodukten gegenüber der Ausgangssubstanz MB von Spectrum in USP-Qualität gefunden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 abgebildet.

Zum Vergleich werden die Ergebnisse der MB Ausgangssubstanz von Spectrum dargestellt, in der Azur B und die Summe der weiteren Substanzen den vom Ph. Eur. vorgegebenen Kriterien entsprechen.

Eine quantitative Aussage zum Ausmaß der Desorption des im Resinat gebundenen MB ist nicht möglich, da teilweise Zersetzung des gebundenen MB eintritt. Eine Quantifizierung der demethylierten Homologe von MB ist ebenfalls nicht möglich, da für keine der Substanzen eine Referenzsubstanz (außer Azur B CRS) zur Herstellung eines externen Standards in ausreichender Reinheit zur Verfügung steht. Die CRS von Azur B kann nur in so geringen Mengen erworben werden, dass sie als Quelle für die Herstellung eines stets frisch herzustellenden externen Standards im Rahmen dieser Arbeit nicht finanzierbar war.

Daher erfolgte die semiquantitative Auswertung der verwandten Substanzen, analog zur Ph. Eur. Monographie „Methylthioniniumchlorid“, prozentual im Verhältnis zu MB. So können z. B. Werte oberhalb von 100 % entstehen, wenn die Peakfläche der verwandten Substanz im Chromatogramm größer ist als die Peakfläche der Hauptsubstanz MB.

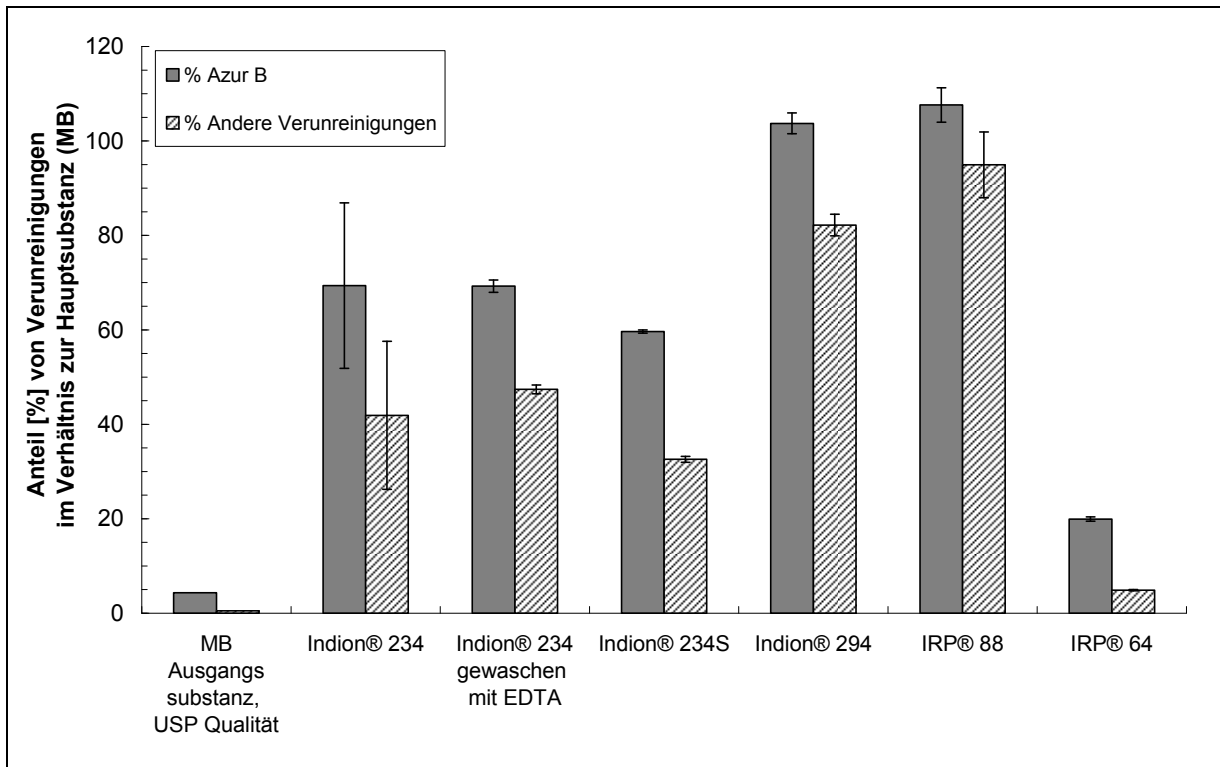


Abbildung 22: Verwandte Substanzen im prozentualen Verhältnis zu MB, Desorptionsexperimente in HCl von verschiedenen Resinaten nach Beladung in Wasser, n = 3, MW ± s

Einen hohen Grad an Nebenprodukten zeigten die MB-Resinate der Ionenaustauscher mit neutralisierter Säuregruppe. Das MB-IRP® 64-Resinat zeigte einen geringeren Grad an Nebenprodukten. IRP® 64 ist in den vorliegenden Untersuchungen der einzige Ionenaustauscher mit freier Säuregruppe.

Die Beladungs- und Desorptionsversuche wurden für alle Ionenaustauscher dreifach ausgeführt. Dabei zeigt Indion® 234 als einziger Ionenaustauscher eine hohe Standardabweichung bei den Messergebnissen. Die Ergebnisse des ersten Beladungs- und Desorptionsversuchs mit Indion® 234 weichen von denen des zweiten und dritten Versuchs signifikant ab. Wenn man die Ergebnisse des ersten Versuchs mit Indion® 234 als Ausreißer betrachtet, gleichen die Ergebnisse denen des Indion® 234S. Der einzige Unterschied zwischen Indion® 234 und Indion® 234S ist die durchschnittliche Partikelgröße. Folglich scheint die Partikelgröße der Ionenaustauscher in der Zersetzungsreaktion keine Rolle zu spielen. Eine mögliche Erklärung für den Ausreißer wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (Kapitel 7.2.7).

Das MB-Indion® 234-Resinat zeigte auch in demineralisiertem Wasser spontane Desorption der gebundenen Substanzen. Daher wurden Proben aller anderen Resinate ebenfalls in Wasser desorbiert und die Lösungen chromatographiert.

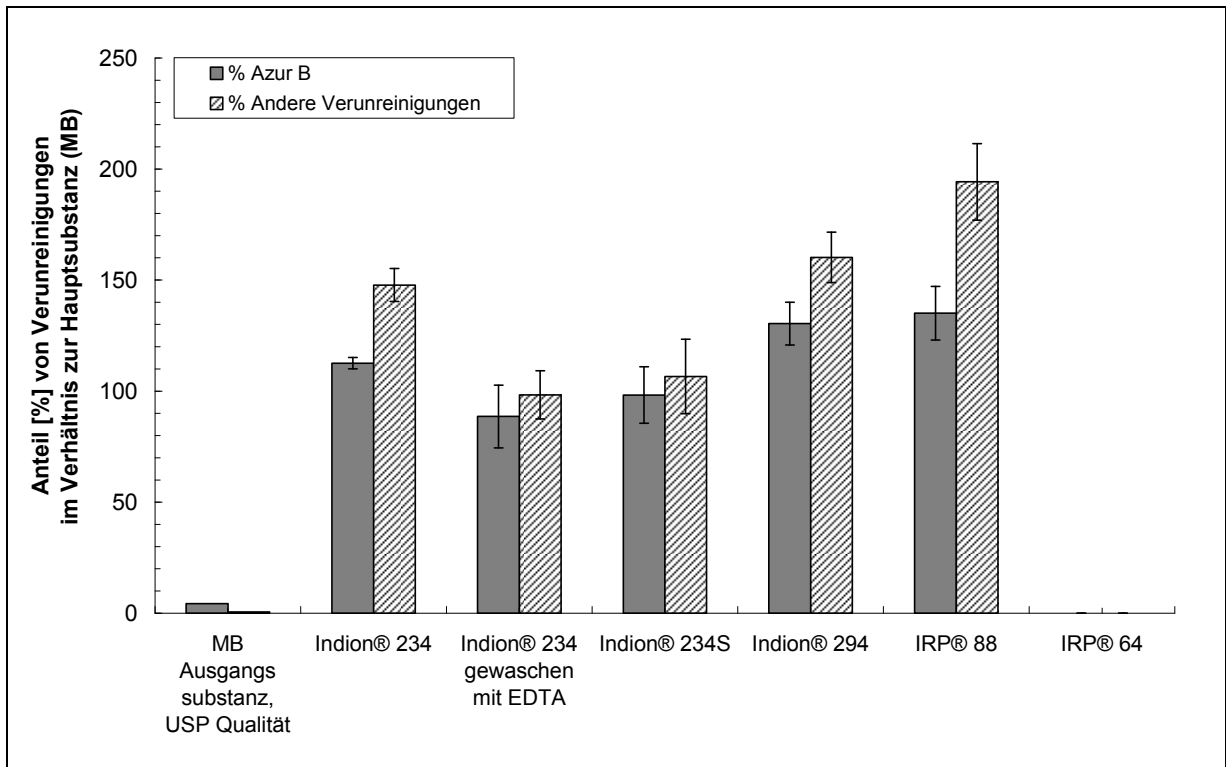


Abbildung 23: Verwandte Substanzen im prozentualen Verhältnis zu MB, Desorptionsexperimente in Wasser von verschiedenen Resinaten nach Beladung in Wasser, $n = 3$, $MW \pm s$

Bei der Desorption in Wasser (Abbildung 23) wurden die gebundenen Substanzen, absolut gesehen, in geringerem Ausmaß desorbiert als in HCl, laut photometrischer Schätzung zwischen 10 % und 50 % im Vergleich zur Desorption in 0,1 M HCl (s. Kapitel 2.1). In Wasser werden allerdings prozentual mehr demethylierte Homologe des MB desorbiert als in HCl (s. y-Skalierung Abbildung 22 im Vergleich zu Abbildung 23). Das MB-IRP® 64-Resinat zeigte keine spontane Desorption von MB im pH-neutralen Milieu.

Die für MB-Indion® 234-Resinate beschriebene Agglomeratbildung scheint für diesen Ionenaustauscher spezifisch zu sein, da dies bei keinem Resinat der anderen Ionenaustauscher (außer Indion® 234S) im gleichen Ausmaß stattfindet. Alle anderen MB-Resinate bildeten lockere, instabile Agglomerate, die leicht zerfallen.

7.2.2.3 Schlussfolgerung

Die Bildung von Nebenprodukten ist ein generelles Phänomen bei der Verarbeitung von MB mit schwachen Kationenaustauschern, zumindest bei den in dieser Arbeit untersuchten Resinaten.

MB-Resinate von Kationenaustauschern mit neutralisierter Säuregruppe zeigen einen besonders hohen Anteil an Nebenprodukten, ebenso wie eine spontane Desorption der gebundenen Substanzen im pH-neutralen Milieu. Das MB-Resinat des Ionenaustauschers IRP® 64 mit freier Säuregruppe zeigt einen geringeren Grad an Nebenprodukten. Es erfolgt keine spontane Desorption in Wasser, sehr wohl jedoch in HCl.

7.2.3 Einfluss des Puffertyps

7.2.3.1 Einleitung

Wenn man die Gleichgewichtsreaktionen der Resinat-Bildungen betrachtet (siehe Kapitel C1), erkennt man Unterschiede bei den Ionenaustauschern mit neutralisierter oder freier Säuregruppe.

Bei der Beladung der Ionenaustauscher mit neutralisierter Säuregruppe wird quasi Kaliumchlorid bzw. Natriumchlorid freigesetzt, die als Salze einer starken Säure und starken Base pH-neutral reagieren und somit den pH-Wert der Beladungslösung nicht beeinflussen. Bei der Beladung von IRP[®] 64 mit freier Säuregruppe wird quasi Salzsäure produziert, die den pH-Wert der Beladungslösung senkt.

Die pH-Werte der Beladungslösungen wurden nach Abschluss der Beladungszeit gemessen und mit dem pH-Wert der reinen MB-Lösung verglichen (Tabelle 3):

Lösung	pH Wert
MB Lösung 1 %	7.6
Indion [®] 234	7.6
Indion [®] 294	8.4
IRP [®] 88	8.6
IRP [®] 64	2.3

Tabelle 3: pH Werte von MB-Lösungen vor und nach dem Beladungsprozess

Die Beladungslösungen von IRP[®] 88 und Indion[®] 294 zeigten einen leicht erhöhten pH-Wert im Vergleich zur MB-Lösung. Dies ist zurückzuführen auf die leicht basische Reaktion der Ionenaustauscher in wässriger Umgebung (Gut et al., 2008).

Gleichzeitig wiesen ihre MB-Resinate auch den höchsten Grad an Demethylierung von MB auf. Die Beladungslösung des IRP[®] 64 hatte durch die Bildung von Salzsäure erwartungsgemäß einen deutlich niedrigeren pH-Wert. Sein Resinat zeigte den geringsten Grad an Demethylierung von MB.

Diese Ergebnisse indizieren einen möglichen Zusammenhang des pH-Wertes der Beladungslösung mit der Menge an Nebenprodukten im jeweilig entsprechenden Resinat. IRP[®] 64 ist außerdem der einzige Ionenaustauscher ohne Alkali-Metall als Gegenion.

Diese Ergebnisse implizieren, dass sowohl der pH-Wert der Beladungslösung als auch das Gegenion der funktionellen Gruppe des Ionenaustauschers im Demethylierungs-Mechanismus eine Rolle spielen könnten.

Aufgrund dessen wurden Beladungsexperimente mit allen schwachen Kationenaustauschern in verschiedenen Puffersystemen durchgeführt.

7.2.3.2 Ergebnisse

Wie bereits diskutiert, kann eine N-Demethylierung von MB sowohl unter pH-alkalischen als auch pH-sauren Bedingungen stattfinden. Daher wurde bei allen Puffersystemen ein pH-Wert von 4,5 eingestellt, der zwischen den resultierenden pH-Werten der rein wässrigen Beladungslösungen liegt.

Um auszuschließen, dass eine zu geringe Konzentration des Puffers Ergebnisse negativ beeinflusst, wurde bewusst eine hohe molare Konzentration von 1 mol/L gewählt. Die Löslichkeit von K-EDTA ließ nur eine Konzentration von 0,1 mol/L zu.

Zunächst wurden die Versuche nur mit dem Ionenaustauscher IRP[®] 64 durchgeführt, da hier die Tendenz zur Bildung von Nebenprodukten am geringsten war, und das Ziel nach wie vor eine stabile Zubereitung mit MB-Resinat war. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 24.

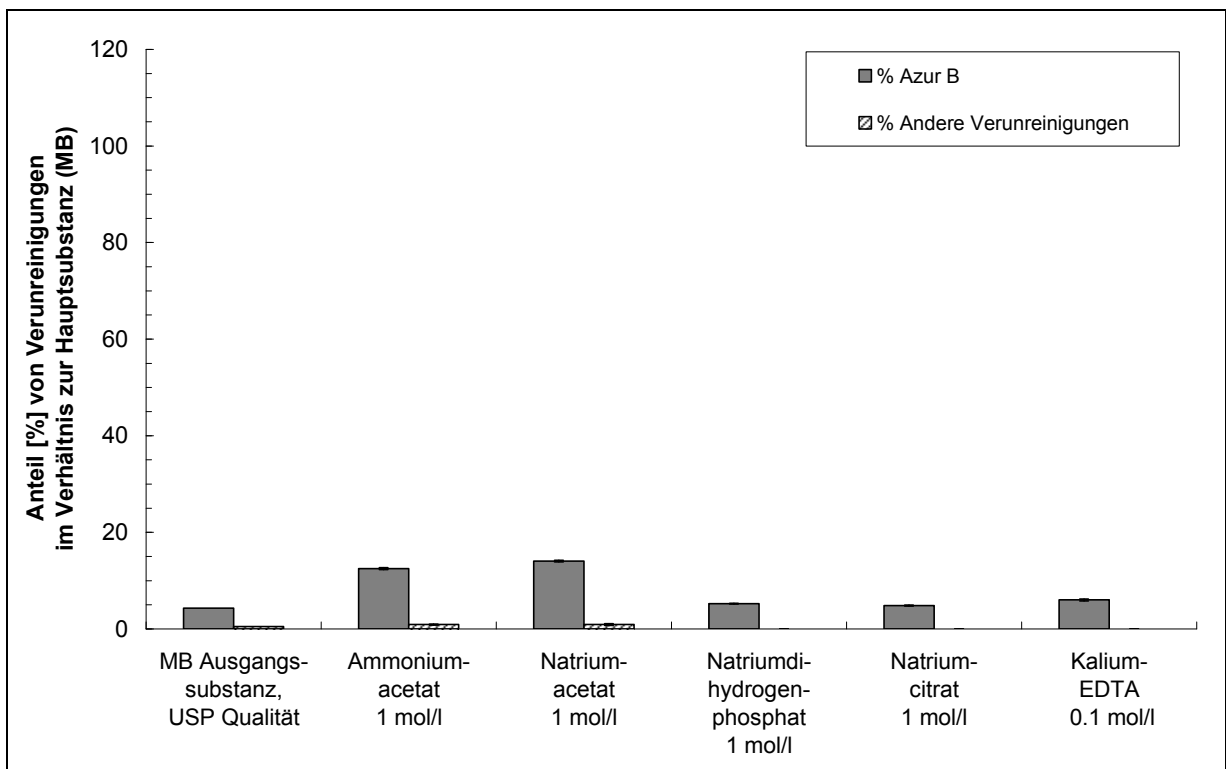


Abbildung 24: Einfluss verschiedener Beladungssysteme (Puffer, Salze) auf die Demethylierung von MB mit dem Ionenaustauscher IRP[®] 64, MW ± s, n = 3

Um die Ergebnisse besser beurteilen zu können, wird in Abbildung 25 ein detaillierter Ausschnitt der Ergebnisse dargestellt.

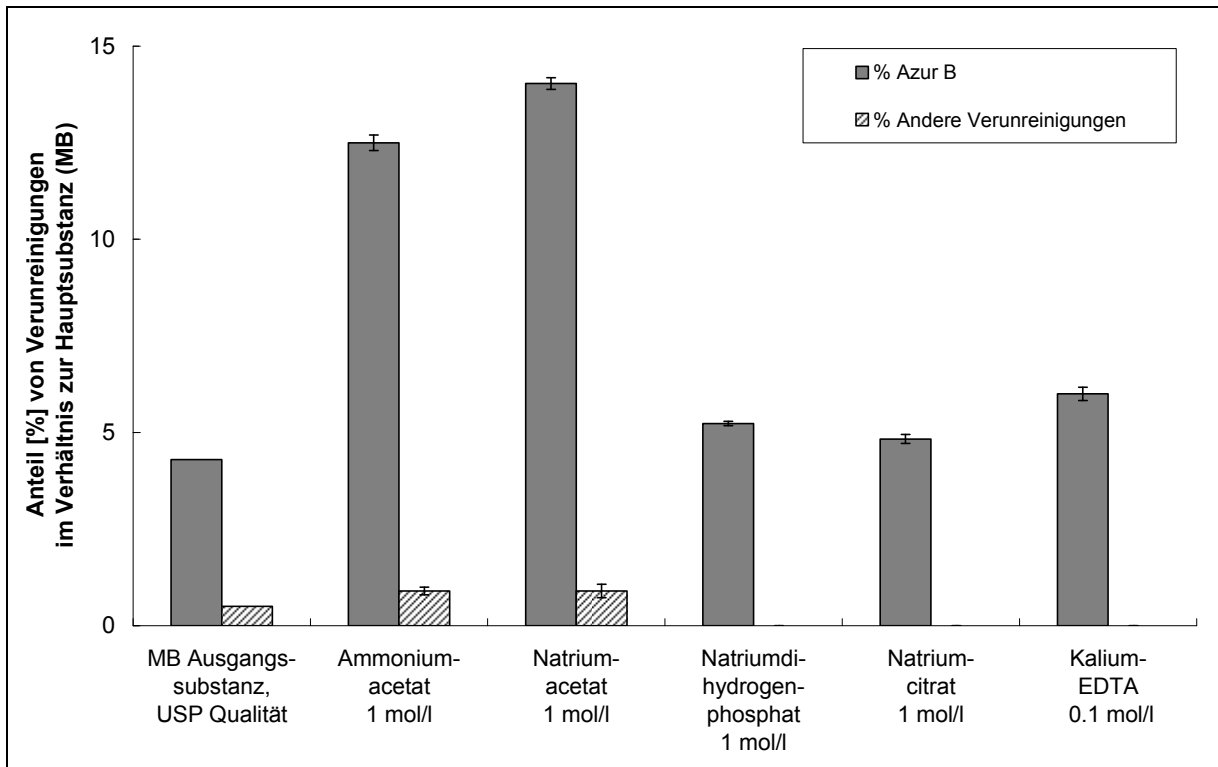


Abbildung 25: Einfluss verschiedener Beladungssysteme (Puffer, Salze) auf die Demethylierung von MB mit dem Ionenaustauscher IRP[®] 64, MW \pm s, n = 3; Detail-Ausschnitt der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass Alkaliionen keinen Einfluss ausübten, da die Beladung in Ammoniumacetat-Puffer die Bildung von Nebenprodukten nicht verhindern konnte.

Ein interessantes Ergebnis ist, dass sowohl der Phosphatpuffer als auch der Citratpuffer die Demethylierung von MB, im Vergleich zur Ausgangssubstanz, praktisch gänzlich unterband. Auch das Ergebnis mit K-EDTA-Lösung war akzeptabel.

Mit K-EDTA-Lösung, Phosphat- und Citratpuffer als Basis der Beladungslösung wurden nun entsprechende Versuche mit jenen Ionenaustauschern durchgeführt, die einen hohen Grad an Zersetzung von MB aufwiesen.

Da sowohl Indion[®] 234, Indion[®] 294 als auch IRP[®] 88 schwache Kationentauscher mit neutralisierter Säuregruppe sind und sie alle ein vergleichbares Muster an Nebenprodukten von MB aufwiesen, wurden die Experimente für jeden Ionenaustauscher einmal durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt in Abbildung 26.

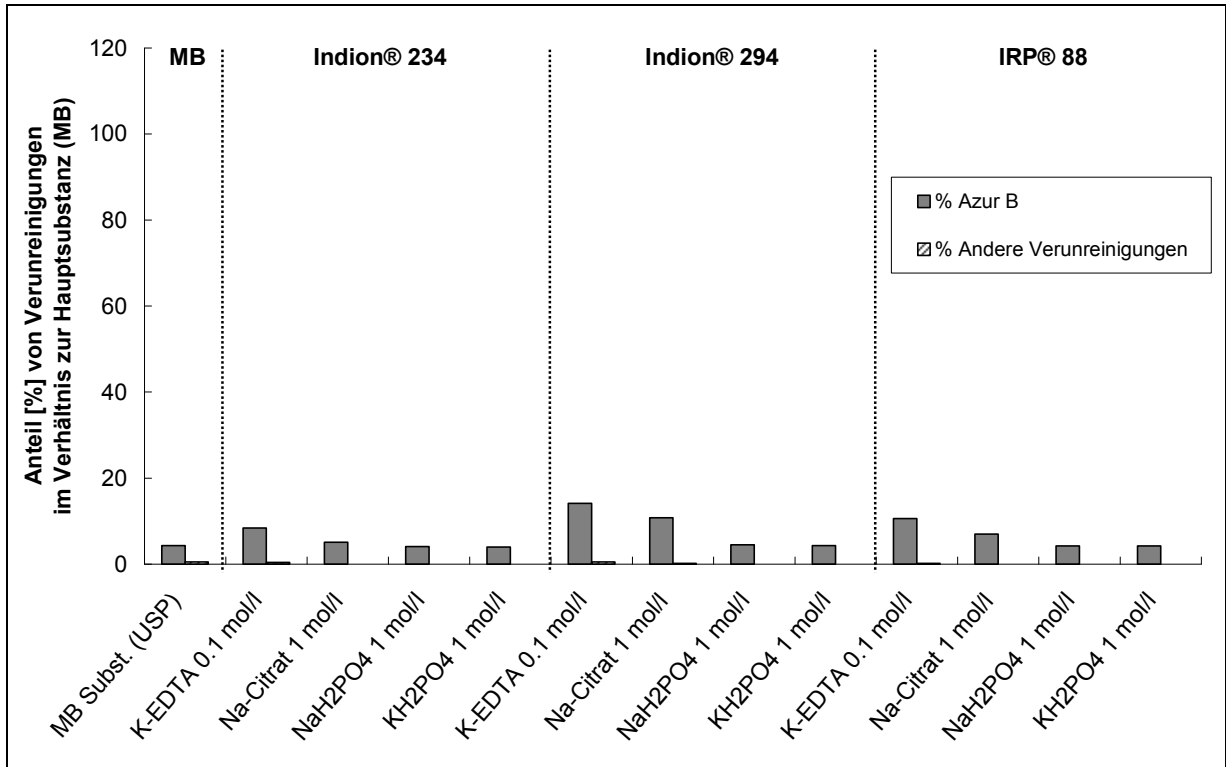


Abbildung 26: Einfluss von Phosphat, Citrat und K-EDTA in den Beladungslösungen auf die Demethylierung von MB bei den Ionenaustauschern Indion® 234 Indion® 294 und IRP® 88

Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wird in Abbildung 27 wiederum ein Detail-Ausschnitt der Graphik dargestellt:

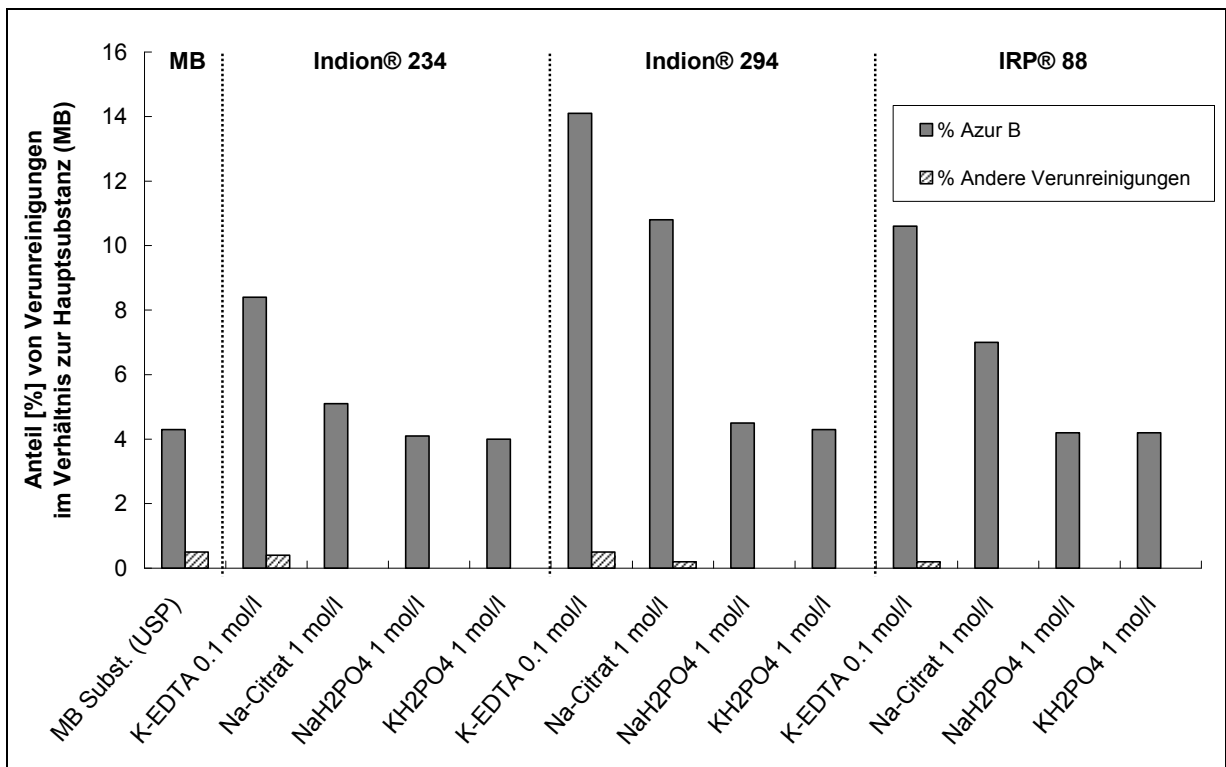


Abbildung 27: Einfluss von Phosphat, Citrat und EDTA in den Beladungslösungen auf die Demethylierung von MB bei den Ionenaustauschern Indion® 234, Indion® 294 und IRP® 88; Detail-Ausschnitt der Ergebnisse

Die Beladungsversuche in Phosphatpuffer wurden bewusst sowohl mit Natriumdihydrogenphosphat als auch mit Kaliumdihydrogenphosphat durchgeführt. Die Säuregruppen der hier untersuchten Ionenaustauscher sind mit K^+ neutralisiert. Prinzipiell wäre es denkbar, dass es durch Einführung eines Fremdions (Na^+) zu zusätzlichen Ionenaustauschprozessen kommt, die die Eigenschaften der Ionenaustauscher und somit die Ergebnisse beeinflussen. Der Typ des Alkaliions im Puffersystem scheint jedoch keinen Einfluss zu haben, da sich die Ergebnisse mit Natriumdihydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Die Ergebnisse bestätigten die der vorangegangenen Experimente. Auffällig ist die Tatsache, dass alle Beladungs-Puffersysteme oder -Lösungen (Phosphat, Citrat, EDTA), deren Resinate keinen oder nur einen sehr geringen Anteil an Nebenprodukten aufwiesen, bekannt sind für ihre metallbindenden Eigenschaften, entweder durch Fällung als schwerlösliches Salz oder durch Komplexbildung (Nikovskaya, 2002; Labanowski, 2008; Quina, 2010). MB als Substanz kann verschiedene Metalle als Spuren aus dem Syntheseprozess enthalten. Laut Ph. Eur. Monographie sind dies Aluminium (Al), Cadmium (Cd), Chrom (Cr), Kupfer (Cu), Zinn (Sn), Eisen (Fe), Mangan (Mn), Quecksilber (Hg), Molybdän (Mo), Nickel (Ni), Blei (Pb) und Zink (Zn).

Bemerkenswert ist außerdem, dass die oben beschriebenen Resinate, die keine Demethylierung von MB zeigten, auch keine spontane Desorption von MB in neutralem pH-Milieu aufwiesen.

7.2.3.3 Schlussfolgerung

Durch Beladung von MB an Kationenaustauscher in verschiedenen Puffersystemen bei pH 4,5 konnte die Bildung von Nebenprodukten reduziert werden.

Insbesondere Systeme mit Metall-komplexierenden oder Metall-fällenden (im Folgenden allgemein als metallbindend bezeichnete) Eigenschaften führten zu guten Ergebnissen, indem sie die Bildung von Nebenprodukten nahezu vollständig unterbanden. Diese Ergebnisse deuten indirekt darauf hin, dass Metalle an den Vorgängen beteiligt sind. Beteiligte Metalle können in der MB Ausgangssubstanz synthesebedingt vorhanden sein.

Die Resinate der Ionenaustauscher, die nach Beladung in reinem Wasser einen hohen Anteil an Nebenprodukten sowie spontane Desorption der gebundenen Substanzen in pH-neutralem Milieu aufwiesen, zeigten bei Beladung in metallbindenden Systemen weder zusätzliche Nebenprodukte noch spontane Desorption von MB im neutralen pH-Bereich. Die spontane Desorption von

gebundenen Substanzen im neutralen pH-Bereich hängt offensichtlich ursächlich mit der Bildung der Nebenprodukte zusammen.

7.2.4 Einfluss des pH-Wertes

7.2.4.1 Einleitung

Um zwischen pH-Wert-Einfluss und Auswirkung von Spuren von Metallen im Reaktionsmechanismus endgültig unterscheiden zu können, wurden erneut Beladungsversuche in Phosphatpuffer bei pH 4,5 (Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4), und zum Vergleich, ebenfalls bei pH 7,5 (Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4) durchgeführt.

7.2.4.2 Ergebnisse

pH 7,5 entspricht dem pH-Wert von MB Substanz in 1 %iger Lösung, sowie der Beladungslösung von Indion[®] 234 in reinem Wasser.

Die Löslichkeit von Na_2HPO_4 ließ nur eine Pufferkonzentration von 0,5 mol/L zu. Deshalb wurde der Beladungsversuch mit NaH_2PO_4 bei pH 4,5 mit einer Konzentration von 0,5 mol/L wiederholt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

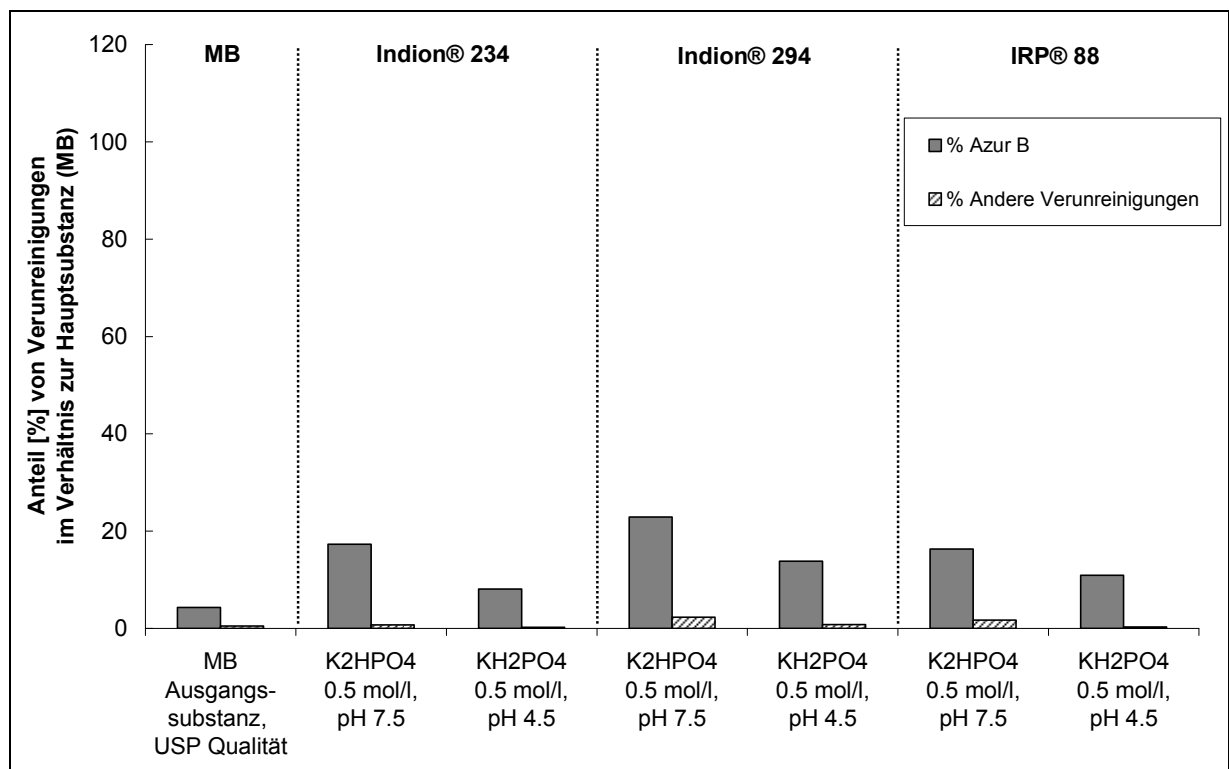


Abbildung 28: Einfluss des pH-Wertes des Phosphatpuffers in den Beladungslösungen auf die Demethylierung von MB bei den Ionenaustauschern Indion[®] 234 Indion[®] 294 und IRP[®] 88

In Abbildung 29 ist ein Detail-Ausschnitt der Ergebnisse dargestellt.

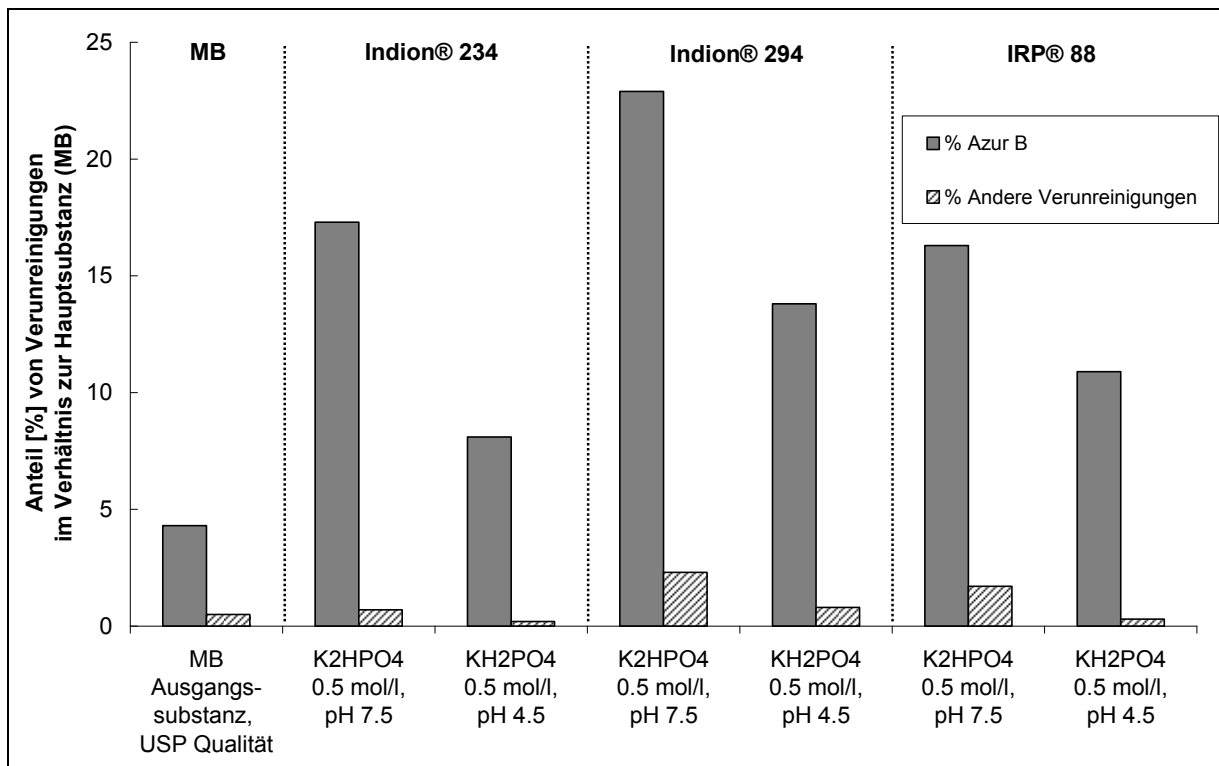


Abbildung 29: Einfluss des pH-Wertes des Phosphatpuffers in den Beladungslösungen auf die Demethylierung von MB bei den Ionenaustauschern Indion® 234 Indion® 294 und IRP® 88; Detail-Ausschnitt der Ergebnisse

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, scheint die Konzentration des Puffers eine wichtige Rolle zu spielen, da die Ergebnisse bei pH 4,5 mit einer Pufferkonzentration von 1 mol/L in allen Fällen besser waren als mit 0,5 mol/L.

Der Vergleich der Ergebnisse bei den pH-Werten 4,5 versus 7,5 zeigt, dass der pH-Wert Einfluss auf die Bildung von Nebenprodukten hat. Der Vergleich der Ergebnisse der Beladungen in Wasser mit den Beladungen in Phosphatpuffer bei pH 7,5 beweist den entscheidenden Einfluss von Phosphat, stellvertretend für weitere metallbindende Substanzen, auf das Ausmaß der Demethylierung von MB.

7.2.4.3 Schlussfolgerung

Der pH-Wert in der Beladungslösung hat einen Einfluss auf den Grad der Demethylierung von MB. Ein pH-Wert im neutralen pH-Bereich fördert dies in größerem Maße als pH-Werte im leicht sauren Bereich.

Die Ergebnisse der Resinat-Bildung in metallbindendem Phosphatpuffer bei neutralem pH-Wert, verglichen mit der Resinat-Bildung in reinem Wasser, legen indirekt die Beteiligung von Metallionen am Reaktionsmechanismus nah.

7.2.5 Einfluss des Trocknungsvorgangs

7.2.5.1 Einleitung

Um den Reaktionsmechanismus der Demethylierung von MB besser verstehen zu können, ist die Kenntnis des Zeitintervalls der Reaktion, wie Beladungs-, Wasch- oder Trocknungsphase des MB-Resinats, von Bedeutung.

Hierzu wurde in weiteren Experimenten bewusst auf den Trocknungsschritt des MB-Resinats verzichtet, indem alle Ionenaustauscher wie zuvor beschrieben mit MB beladen wurden und die gebundenen Substanzen direkt nach dem Waschen des Resinats mit 0,1 M HCl desorbiert wurden.

Zusätzlich wurden Beladungen mit einer Beladungszeit von 24 Stunden durchgeführt. Dies diente der Aufklärung, ob die Demethylierung ausschließlich während bestimmter Teilschritte der Resinat-Produktion stattfindet, oder ob eine grundsätzliche Reaktionszeit nötig ist, unabhängig von der Herstellphase.

Die Desorptionslösungen wurden wie zuvor chromatographiert und analysiert. Gleichermaßen wurde mit den Beladungslösungen verfahren, die nach dem Beladungsvorgang noch den Überschuss an MB Substanz enthielten.

Zusätzlich wurden Proben getrockneter Resinate über einen Zeitraum von 8 Wochen regelmäßig desorbiert und die Desorptionslösungen analysiert.

Um die Rolle des Ionenaustauschers bei der Zersetzung zu ermitteln, wurde MB Ausgangssubstanz in Wasser zu einer Paste aufgeschlämmt, entsprechend den Resinaten über Orangegel getrocknet, in Wasser gelöst und chromatographiert.

7.2.5.2 Ergebnisse

Die Beladungslösungen mit dem ungebundenen Überschuss an MB zeigten keinen erhöhten Anteil an Demethylierungsprodukten.

Auch die Desorptionslösungen der noch feucht desorbierten Resinate direkt nach dem Waschprozess ohne Trocknungsphase zeigten keinen erhöhten Anteil an Demethylierungsprodukten, weder nach 2 h noch nach 24 h Beladungszeit.

Die trockenen Resinate wiesen über einen Zeitraum von 8 Wochen keine weitere Zunahme der Demethylierungsprodukte auf.

Angefeuchtete und getrocknete MB Ausgangssubstanz ohne Kontakt zu Ionenaustauschern enthielt keinerlei zusätzliche Demethylierungsprodukte.

7.2.5.3 Schlussfolgerung

Die Demethylierungs-Reaktion beginnt mit der Trocknungsphase des MB-Resinats, und ist mit Trocknung des MB-Resinats zur Massenkonzanz über Oranengel abgeschlossen.

In Abwesenheit der Ionenaustauscher fand keine Demethylierung von MB statt. Ihre Anwesenheit scheint also für den Ablauf der Reaktion notwendig.

7.2.6 Einfluss der Wirkstoff-Qualität des MB

7.2.6.1 Einleitung

Proveblue™ ist eine neue Qualität von MB Ausgangssubstanz der Firma Provepharm, mit erhöhter Reinheit durch reduzierten Gehalt an Metallen sowie Azur B. Proveblue™ ist die einzige MB Ausgangssubstanz, die offiziell den Kriterien des Ph. Eur. entspricht. Das HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 30 dargestellt.

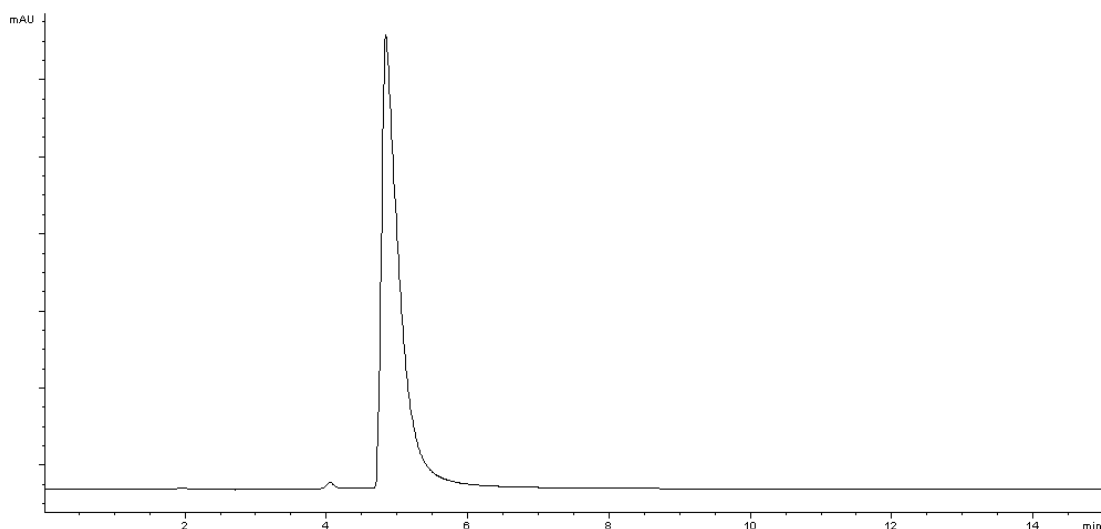


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm von Proveblue™

Zum Vergleich wurde der Gehalt an Metallen der bisher verwendeten MB Ausgangssubstanz von Spectrum mit USP Qualität nach Ph. Eur. bestimmt, sowie auch der der Proveblue™ Ausgangssubstanz mit Ph. Eur. Qualität. Die Analyse erfolgte mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma (ICP-OES) (Vista Pro, Varian, Darmstadt, DE). Die Messungen wurden von der Firma Currenta in Leverkusen, DE durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Metall	Metall-Gehalt des MB Spectrum [ppm]	Metall-Gehalt des Proveblue™ MB [ppm]	Grenzen für Metall-Gehalt entsprechend der USP Monographie [ppm]	Grenzen für Metall-Gehalt entsprechend der Ph. Eur. Monographie [ppm]
Al	3	< 1	n. a.	1.00 × 10 ²
Cd	2	< 1	n. a.	1.0
Cr	< 1	< 1	n. a.	1.00 × 10 ²
Cu	17	< 1	200	3.00 × 10 ²
Fe	15	< 1	n. a.	2.00 × 10 ²
Hg	< 1	< 1	n. a.	1.0
Mn	1	< 1	n. a.	10.0
Mo	< 1	< 1	n. a.	10.0
Ni	< 1	< 1	n. a.	10.0
Pb	< 1	< 1	n. a.	10.0
Sn	< 1	< 1	n. a.	10.0
Zn	53	< 1	200	1.00 × 10 ²

Tabelle 4: Metall-Gehalt von MB Ausgangssubstanz von Spectrum (USP Qualität) und Proveblue™ (Ph. Eur. Qualität), bestimmt gemäß Ph. Eur. Monographie „Methylthioniniumchlorid“

Die Analysenergebnisse der Metall-Spurenanalytik bestätigen die Angaben von Provepharm in Hinblick auf reduzierten Gehalt an Metallspuren in Proveblue™. Auch das HPLC-Chromatogramm zeigt mit 0,6 % einen signifikant reduzierten prozentualen Anteil an Azur B in der MB Ausgangssubstanz, im Vergleich zur MB Ausgangssubstanz von Spectrum mit USP Qualität (4,26 %).

Die MB Ausgangssubstanz von Spectrum erfüllte die Anforderungen des Ph. Eur. in allen Fällen außer Cadmium, jedoch überstiegen mehrere Werte die von Proveblue™.

Zur Verifizierung der Vermutungen aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurden Beladungen derjenigen drei Ionenaustauscher mit Proveblue™ durchgeführt, die den höchsten Grad an Demethylierung von MB zeigten.

7.2.6.2 Ergebnisse

Die Beladungen wurden in Wasser durchgeführt, ohne Zusatz metallbindender Substanzen. Die Resinate wurden getrocknet und gebundene Substanzen mit 0,1 M HCl wieder desorbiert. Die Desorptionslösungen wurden chromatographiert und analysiert.

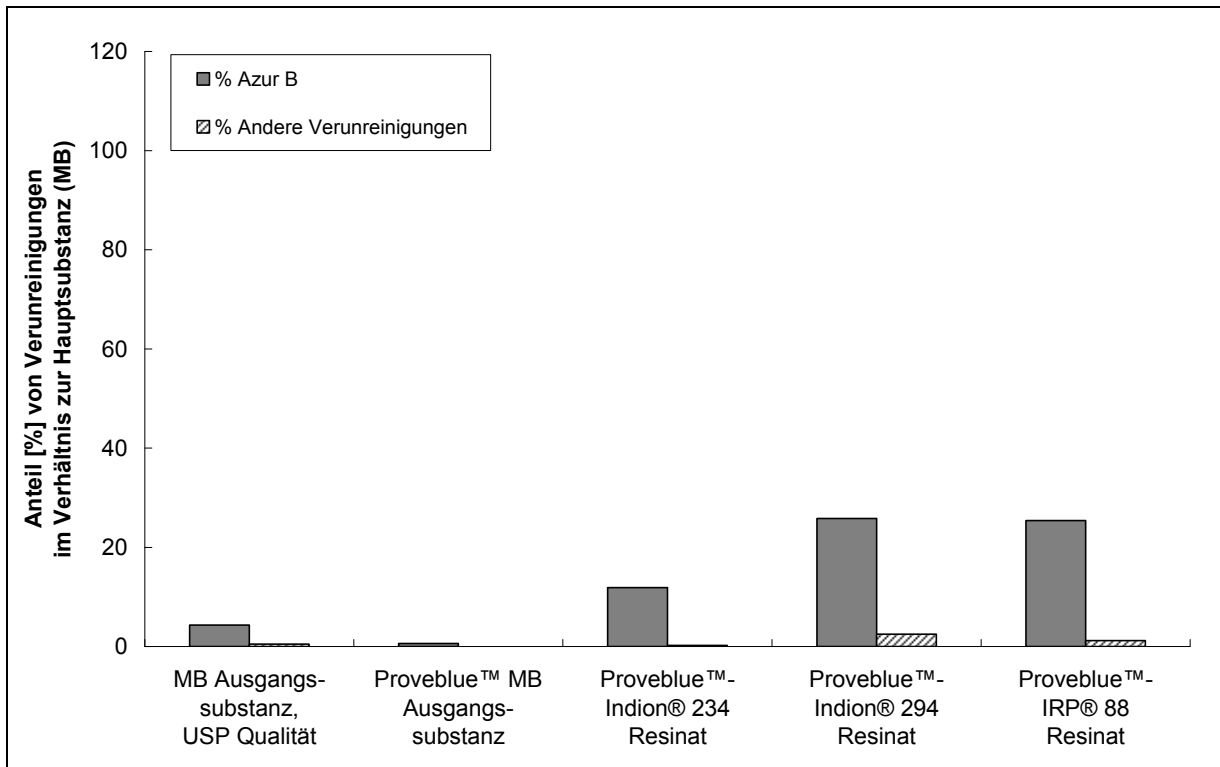


Abbildung 31: Einfluss der Qualität der MB Ausgangssubstanz auf die Demethylierung in Kombination mit verschiedenen Kationenaustauschern

In Abbildung 32 ist wiederum ein Detail-Ausschnitt der Ergebnisse dargestellt.

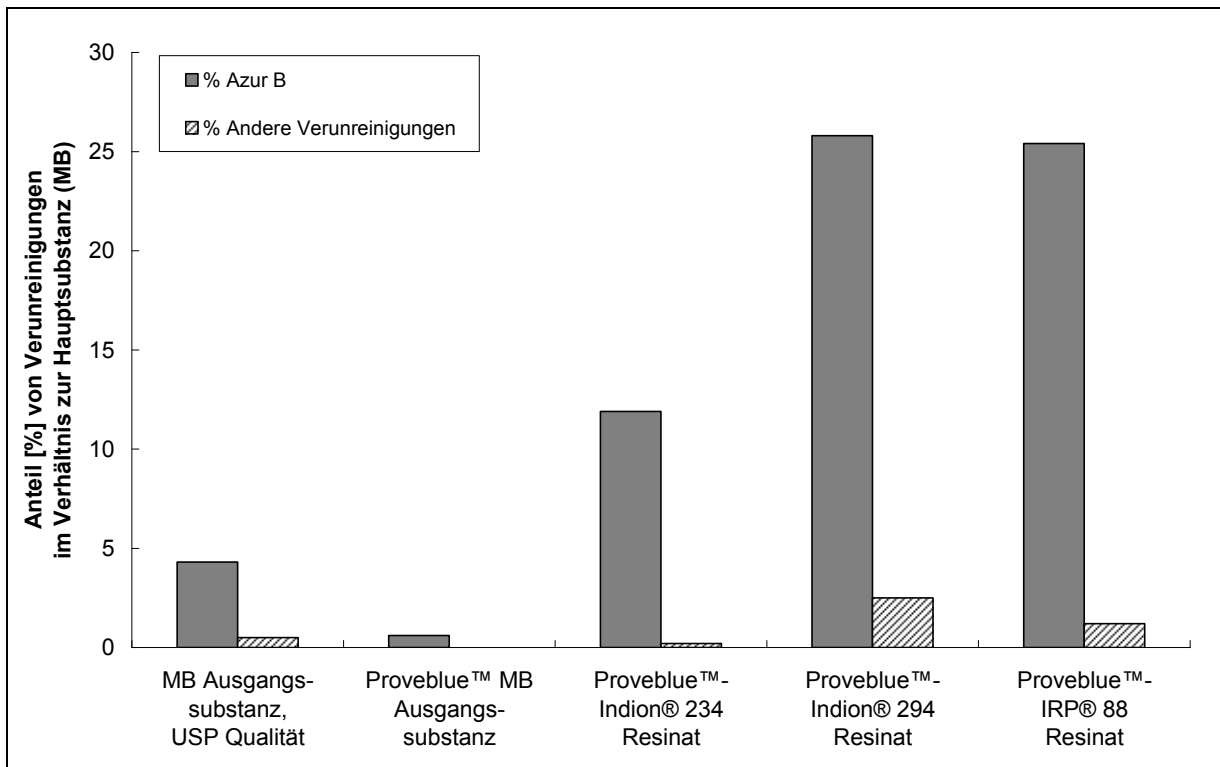


Abbildung 32: Einfluss der Qualität der MB Ausgangssubstanz auf die Demethylierung in Kombination mit verschiedenen Kationenaustauschern; Detail-Ausschnitt der Ergebnisse

7.2.6.3 Schlussfolgerung

Die Resinate mit Proveblue™ zeigen signifikant geringere Demethylierung des gebundenen MB im Vergleich zu analog hergestellten MB-Resinaten mit MB Ausgangssubstanz von Spectrum (siehe Abbildung 31). Dies bestätigt die zuvor aufgestellte Hypothese zur Beteiligung der Metalle in MB Substanz an der Demethylierungs-Reaktion.

Die Anwesenheit von Metallen oder Metallionen allein führen allerdings nicht zu einer Demethylierung von MB, da der simulierte Trocknungsvorgang in Abwesenheit des Ionenaustauschers zu keiner Zersetzung führte (siehe Kapitel 7.2.5). Offenbar müssen Metalle und Ionenaustauscher gleichzeitig vorliegen um die Demethylierung von MB zu induzieren. Wenn die Metalle in ionischem Zustand als Kationen vorliegen, werden sie höchstwahrscheinlich von den Kationenaustauschern ionisch gebunden und somit immobilisiert. Es ist bekannt, dass Liganden unterschiedlicher Struktur die katalytische Aktivität von Metallionen initiieren können (Shriver et al., 1992). Die Kationenaustauscher scheinen in vorliegendem Fall die Rolle eines solchen Liganden einzunehmen.

Die Analyse der Metallspuren zeigt auch für die MB Ausgangssubstanz von Spectrum (USP Qualität) eine Einhaltung der Anforderungen des Ph. Eur., mit Ausnahme von Cadmium. Offensichtlich können sogar geringe Spuren von Metallen innerhalb der erlaubten Arzneibuch-Grenzen Probleme bei der Verarbeitung von MB verursachen, in diesem Fall zur Demethylierung führen, wie die Ergebnisse der Versuche zeigen.

7.2.7 Hypothese für den Reaktionsmechanismus der Zersetzung von MB

Das C1-Fragment, das bei der Demethylierung aus den abgespaltenen Methylgruppen entsteht, konnte durch Analyse der Trocknungsluft des Resinates mittels Chromotrop-säure-Reaktion als Formaldehyd identifiziert werden, welches während der Trocknung des Resinats entweicht. Die Summe aller Ergebnisse kann im Reaktionsschema in Abbildung 33 zusammengefasst werden:

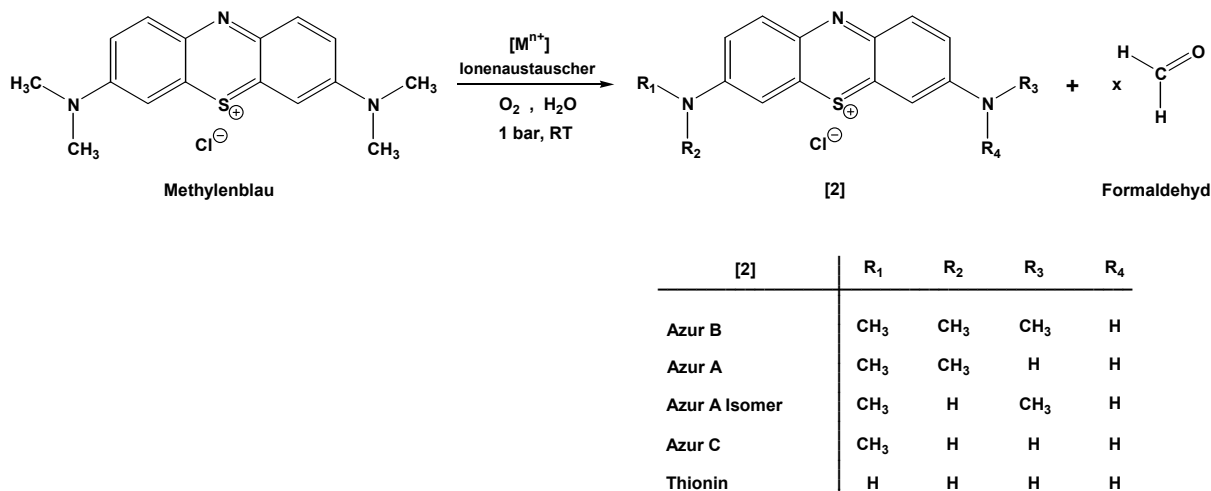


Abbildung 33: Reaktionsschema für die Demethylierung von MB

Über die Intermediate der Demethylierung kann nur spekuliert werden. Die Reaktion könnte möglicherweise nach dem Schema einer Polonovski-Reaktion in drei charakteristische Stufen ablaufen: Die Bildung eines N-Oxids, dessen Umwandlung zu einem Iminium-Kation und subsequente Spaltung zum demethylierten Amin und Formaldehyd. Bei der klassischen Polonovski-Reaktion werden typischerweise Reagenzien wie Acylchloride, Säureanhydride und Chloroformester eingesetzt (Kok et al., 2010), was eher wenig Parallelen zu vorliegender Reaktion zeigt. Nichtklassische Polonovski-Reaktionen werden allerdings auch unter anderen Bedingungen beschrieben (McCamley et al., 2003), anhand derer, sowie aufgrund vorliegender Versuchsergebnisse, ein plausibel erscheinender Mechanismus formuliert wird, siehe Abbildung 34 (Mechanismus A):

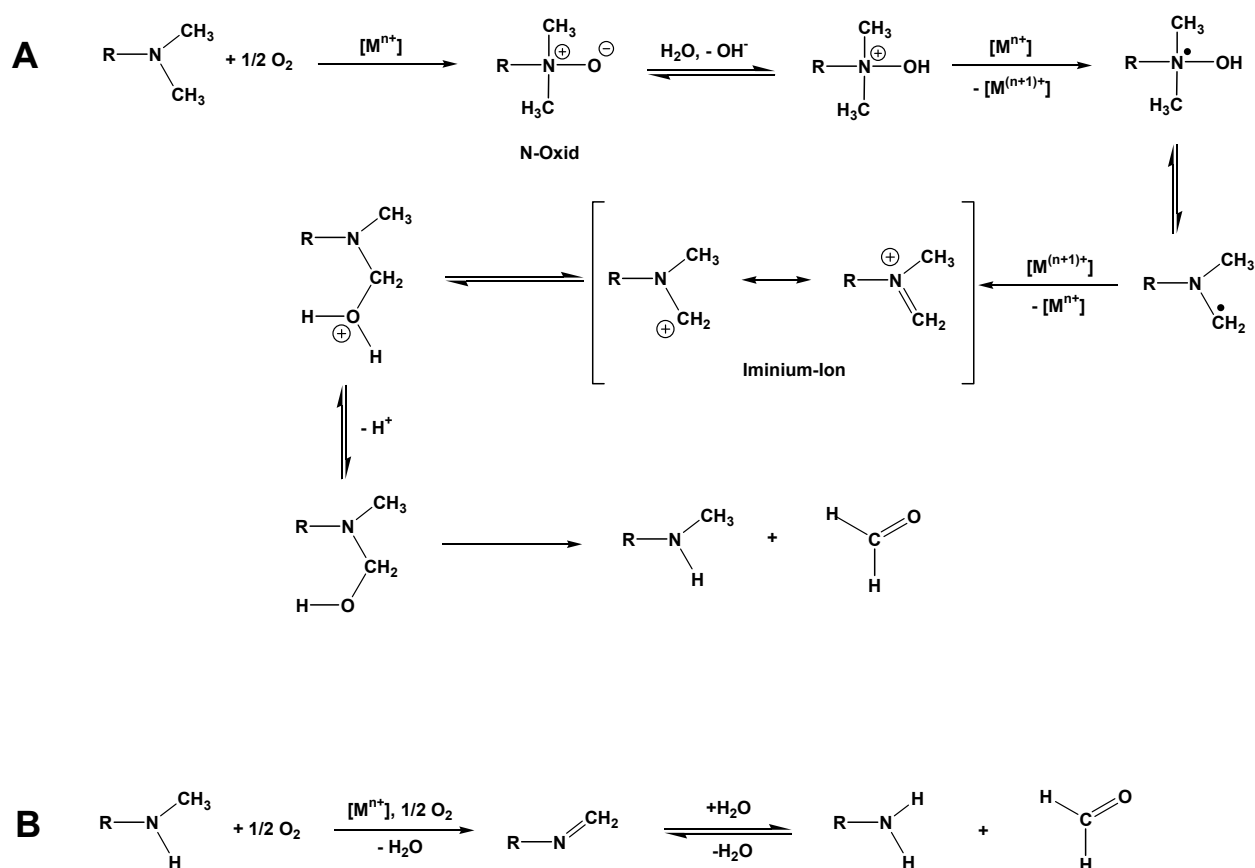


Abbildung 34: Vorschlag für Reaktionsmechanismen der Demethylierung von MB: Demethylierung von tertiären Aminogruppen (A) und sekundären Aminogruppen (B)

Tertiäre Amine können aber unter bestimmten Umständen auch direkt zum Iminium-Kation reagieren, ohne den Zwischenschritt des N-Oxids (Rousselet et al., 1995).

Die initialen Schritte scheinen metallkatalysiert zu sein, da die Reaktion nach Entfernen der Metallionen durch die Puffer nicht mehr abläuft. Die Metallanalytik der MB Ausgangssubstanz von Spectrum impliziert eine Beteiligung von Al, Cd, Cu, Fe oder Zn an der Reaktion, oder einer beliebigen Kombination der genannten Metalle.

Nichtklassische Polonovski-Reaktionen in wässrigem Medium in Anwesenheit von Fe-Ionen werden in der Literatur beschrieben, allerdings ist immer die Zugabe eines oxidierenden Reagens nötig, wie z. B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder m-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) (Kok et al., 2009; Kok et al., 2010).

Kürzlich wurde die Bildung eines N-Oxids aus tertiären Aminen auf heterogenen Gold-Katalysatoren unter milden Bedingungen beschrieben (Pina et al., 2007). Dies zeigt, dass der initiale Schritt, die Bildung des N-Oxids von MB, während des Trocknungsschritts in Anwesenheit von heterogenen Katalysatoren und Luftsauerstoff als Oxidans stattfinden könnte, ohne weiteren Zusatz eines Oxidans wie H_2O_2 oder MCPBA.

Der Mechanismus für die Oxidation der sekundären Amine, wie Azur B, läuft vermutlich in leichter Variation ab, bildet aber ebenfalls Formaldehyd unter Demethylierung zu primären Aminen (Mechanismus B) (Aschwanden et al., 2009).

Die pH-Abhängigkeit der nichtklassischen Polonovski-Reaktion wurde noch nicht im Detail aufgeklärt. Verschiedene Reaktionsbedingungen bei unterschiedlichen pH-Werten zeigen variierende Ergebnisse. In einigen Fällen scheinen saure Bedingungen von Vorteil (McCamley et al., 2003), im Fall der selbst erzielten Ergebnisse begünstigen offenbar neutrale bis leicht alkalische Bedingungen die Reaktion. Das gleiche gilt auch für die metall-katalysierte Bildung von N-Oxiden, wo die Ergebnisse von der Art des Metalls, der Art des Liganden oder ihrer Kombinationen beeinflusst werden (Pina et al., 2007).

Der zuvor erwähnte Ausreißer bei den MB-Indion[®] 234-Resinaten beladen in Wasser (siehe Kapitel 7.2.2.2) kann folgendermaßen erklärt werden:

Das erste Beladungsexperiment des MB-Indion[®] 234-Resinats wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt. Die zwei Folgenden wurden, wie alle anderen dreifach durchgeführten Beladungsversuche, zeitgleich ausgeführt, mit entsprechend identischen Prozessbedingungen. Besonders hervorzuheben sind hier die Trocknungsbedingungen, mit entsprechend identischem Zustand des Orangegels und resultierendem Zeitrahmen der Trocknungsphase. Somit erklären sich die kleinen Standardabweichungen aller anderen Versuche sowie die abweichenden Ergebnisse des ersten Versuchs mit Indion[®] 234.

Dies zeigt, dass der Grad des Reaktionsablaufs durch die Länge der Trocknungszeit deutlich beeinflusst werden kann.

7.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Um erkennen zu können, ob sich die Oberflächenstrukturen unbeladener und mit MB beladener Ionenaustauscher unterscheiden, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Im Rahmen dessen wurde überprüft, ob Hinweise auf die spontane Desorption der gebundenen Substanzen zu erkennen sind. Abbildung 35 bis Abbildung 39 fassen die Ergebnisse zusammen.

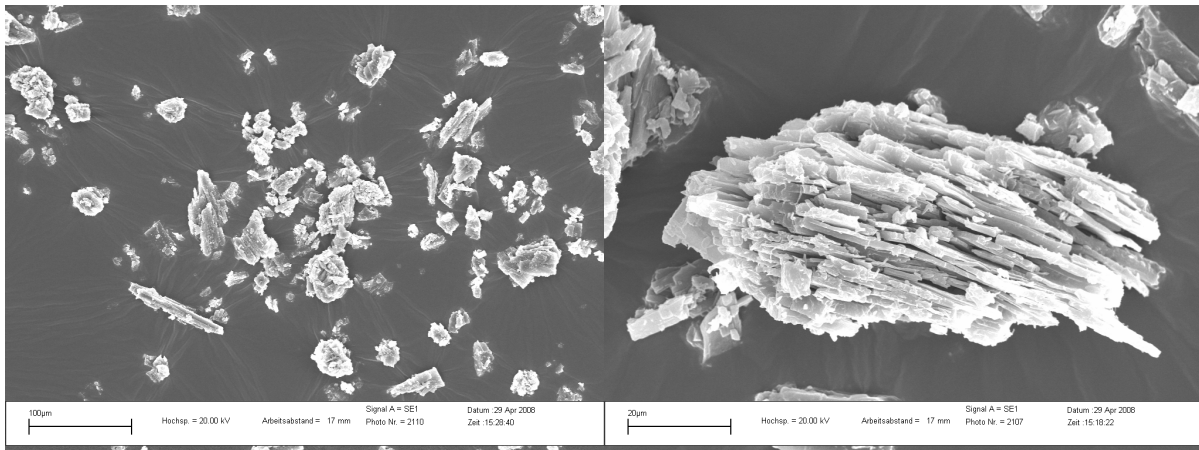


Abbildung 35: MB Ausgangssubstanz von Spectrum, USP Qualität

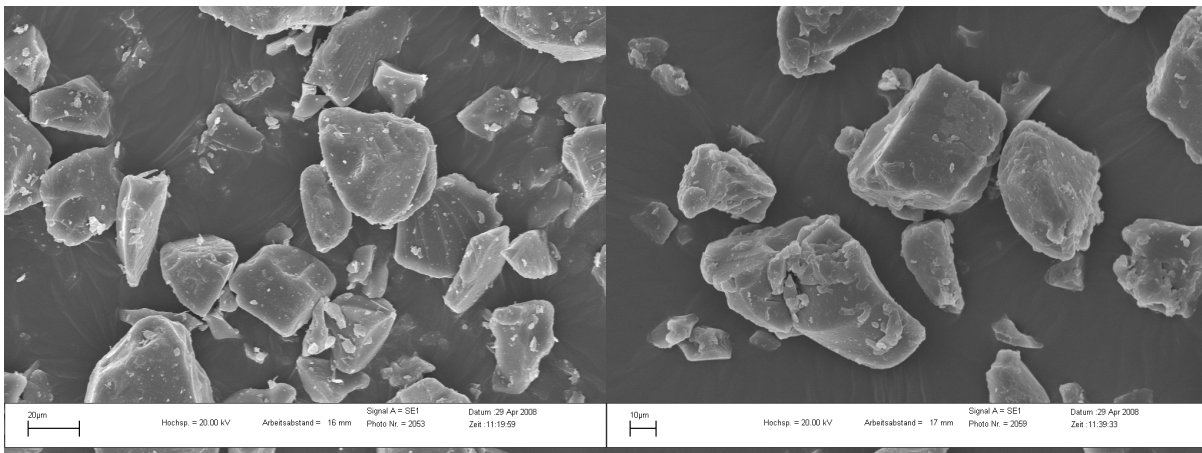


Abbildung 36: Indion® 234 unbeladen (links) und beladen (rechts)

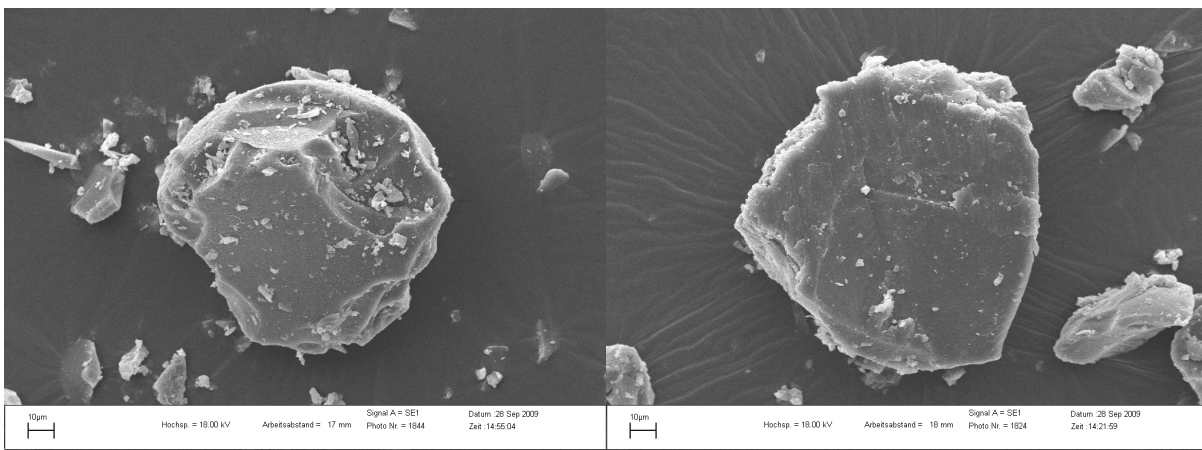


Abbildung 37: Indion® 294 unbeladen (links) und beladen (rechts)

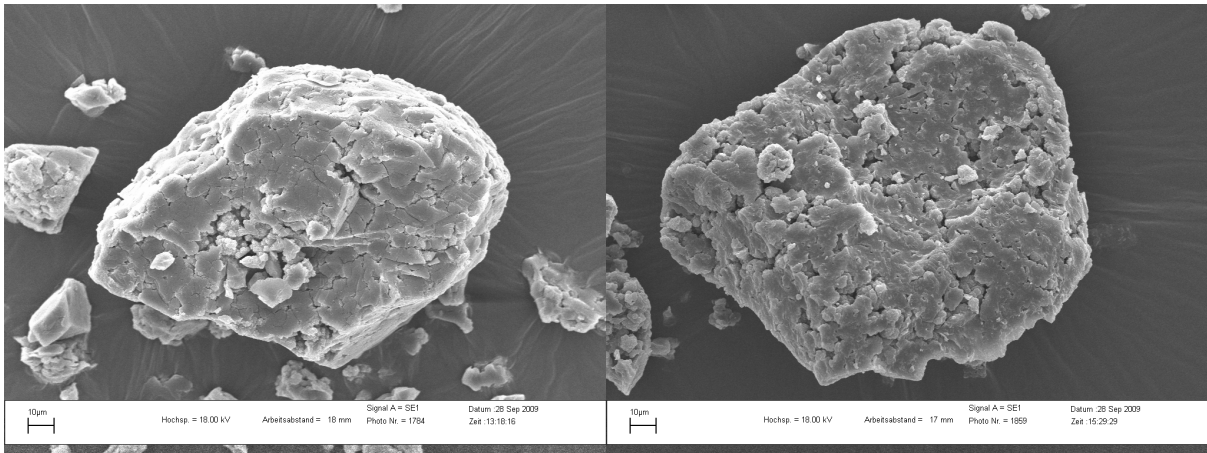


Abbildung 38: IRP[®] 88 unbeladen (links) und beladen (rechts)

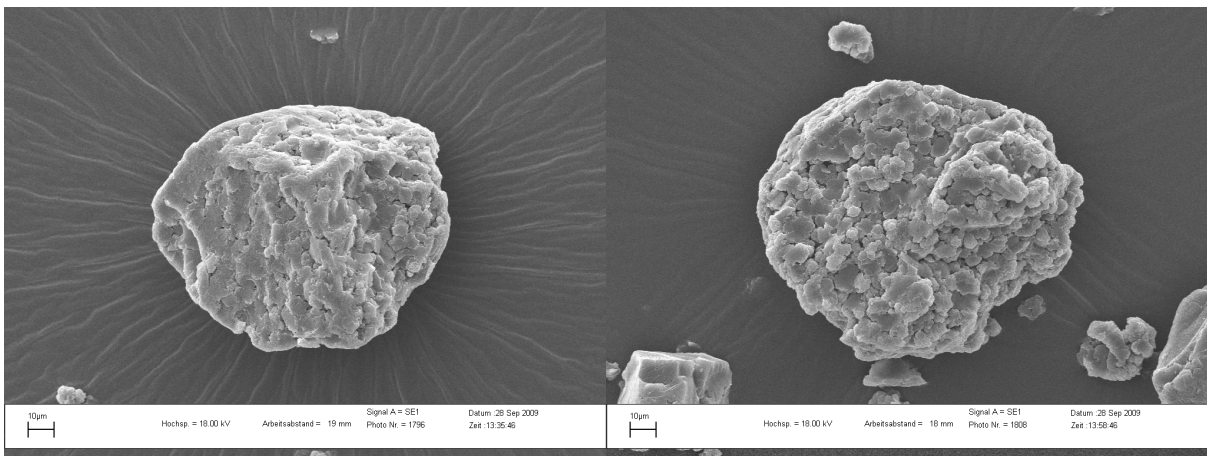


Abbildung 39: IRP[®] 64 unbeladen (links) und beladen (rechts)

MB zeigt eine schichtförmige Struktur, bzw. Agglomerate von Nadeln oder Plättchen. Die Harze zeigen eine überwiegend sphärische Geometrie, die durch die Beladung mit MB nicht verändert wird. Auch auf den Oberflächen sind durch die Beladung keine Veränderungen zu beobachten.

7.4 Röntgendiffraktometrische Untersuchungen

Um der spontanen Desorption von MB im neutralen Milieu nachzugehen, wurden röntgendiffraktometrische Analysen von MB Ausgangssubstanz von Spectrum und unbeladener Kationenaustauscher, ihrer physikalischen Mischungen sowie unterschiedlich beladener MB-Resinate durchgeführt.

Beispielhaft werden hier die MB-Resinate aus Beladung in reinem Wasser, im Vergleich zu Resinaten beladen in Citratpuffer, gezeigt. Abbildung 40 bis Abbildung 44 fassen die Ergebnisse zusammen.

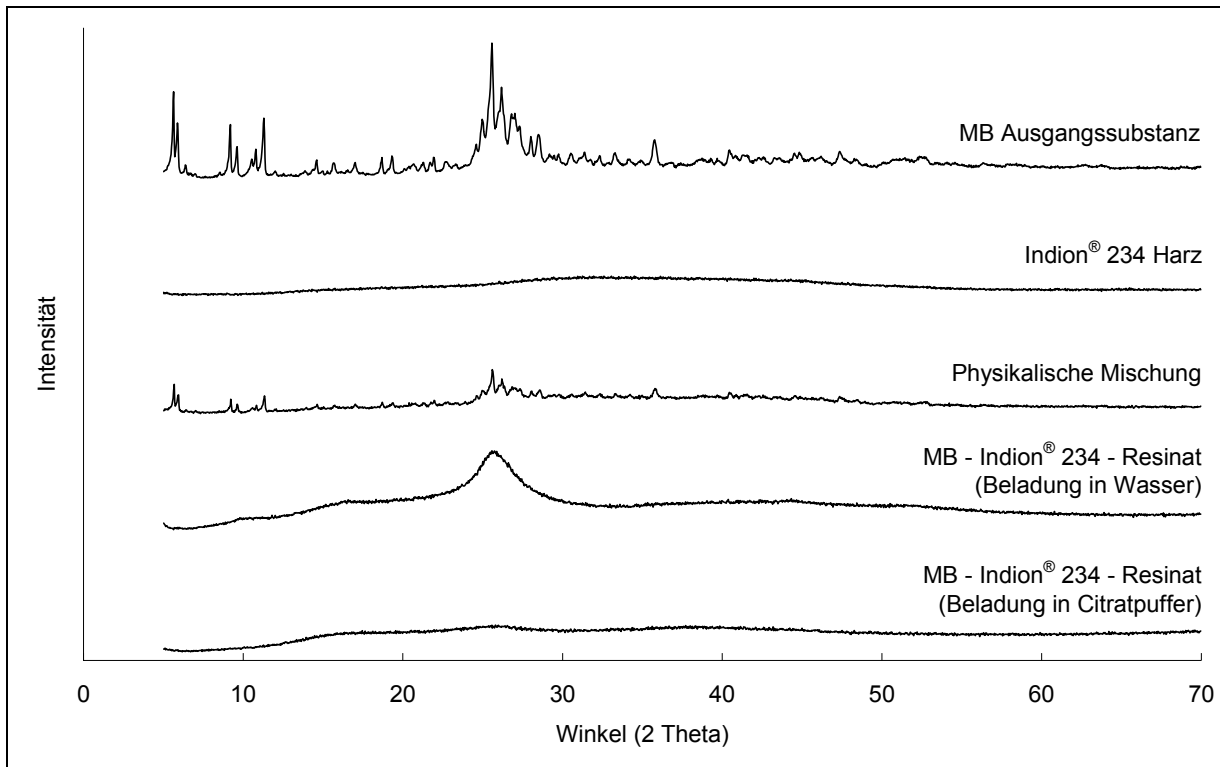


Abbildung 40: Vergleichende Übersicht röntgendiffraktometrischer Spektren von Indion® 234 Derivaten

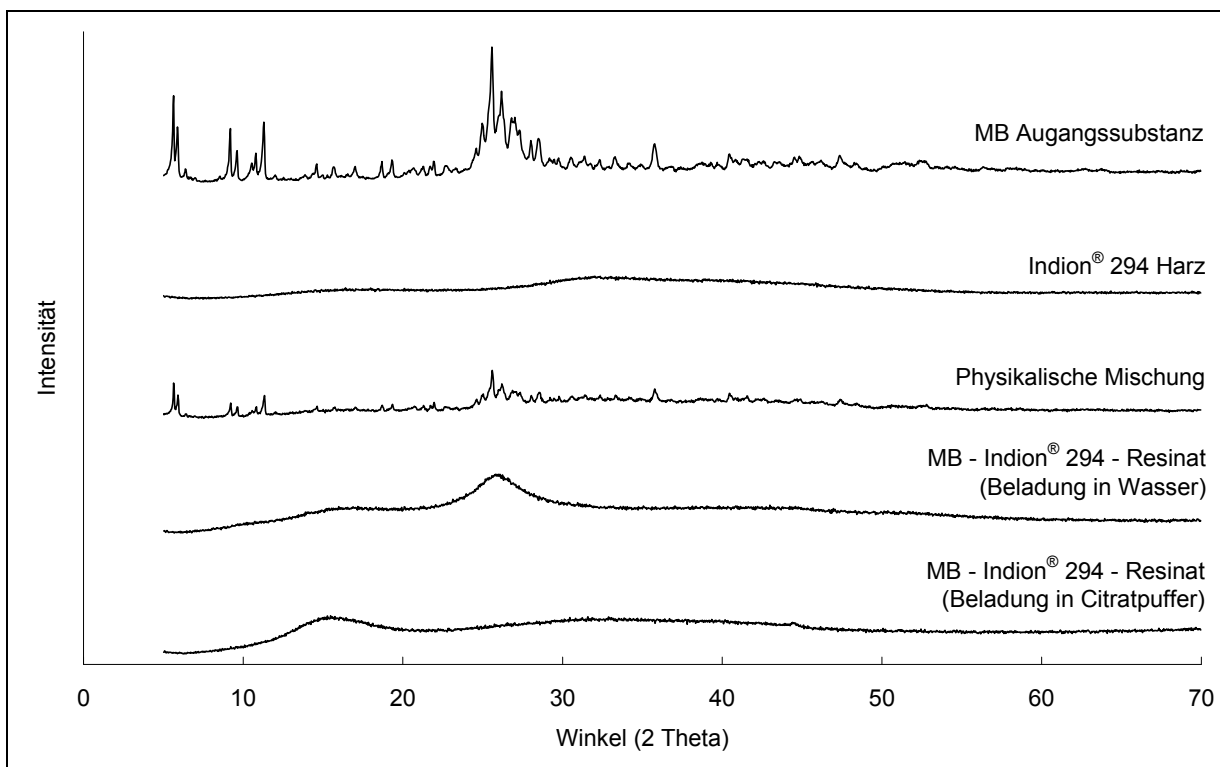


Abbildung 41: Vergleichende Übersicht röntgendiffraktometrischer Spektren von Indion® 294 Derivaten

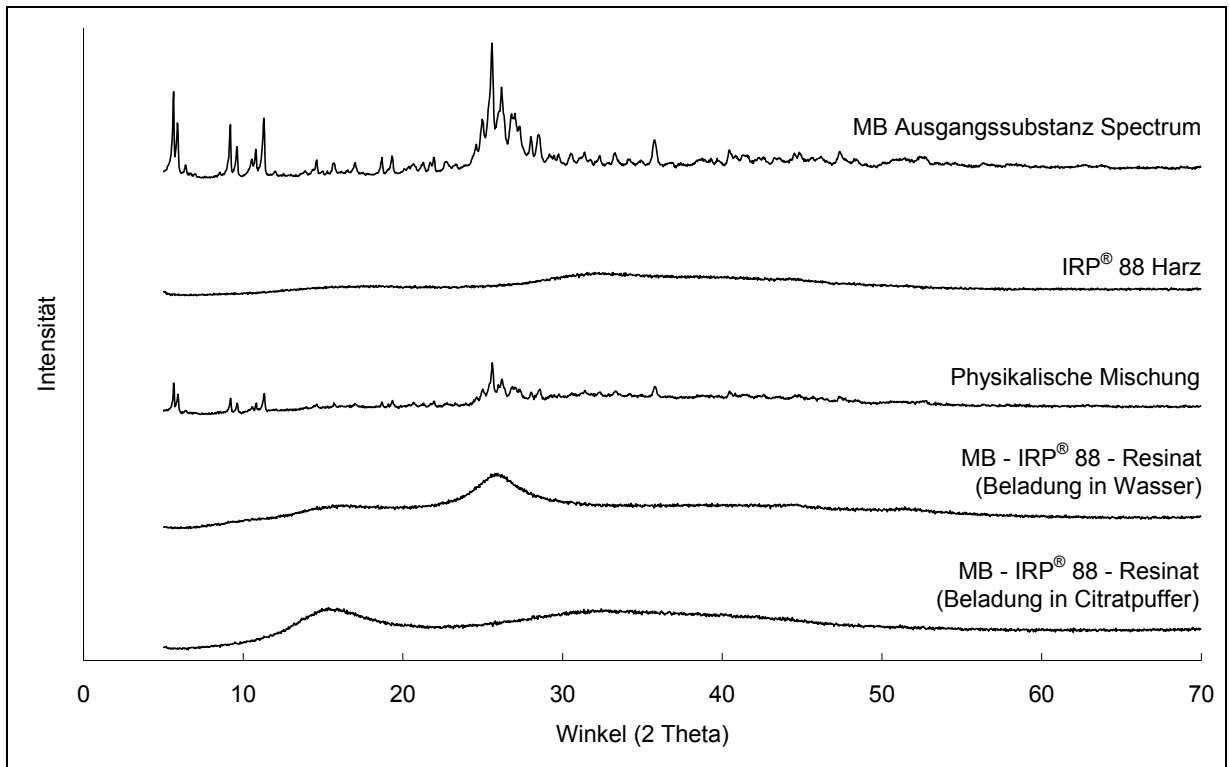


Abbildung 42: Vergleichende Übersicht röntgendiffraktometrischer Spektren von IRP[®] 88 Derivaten

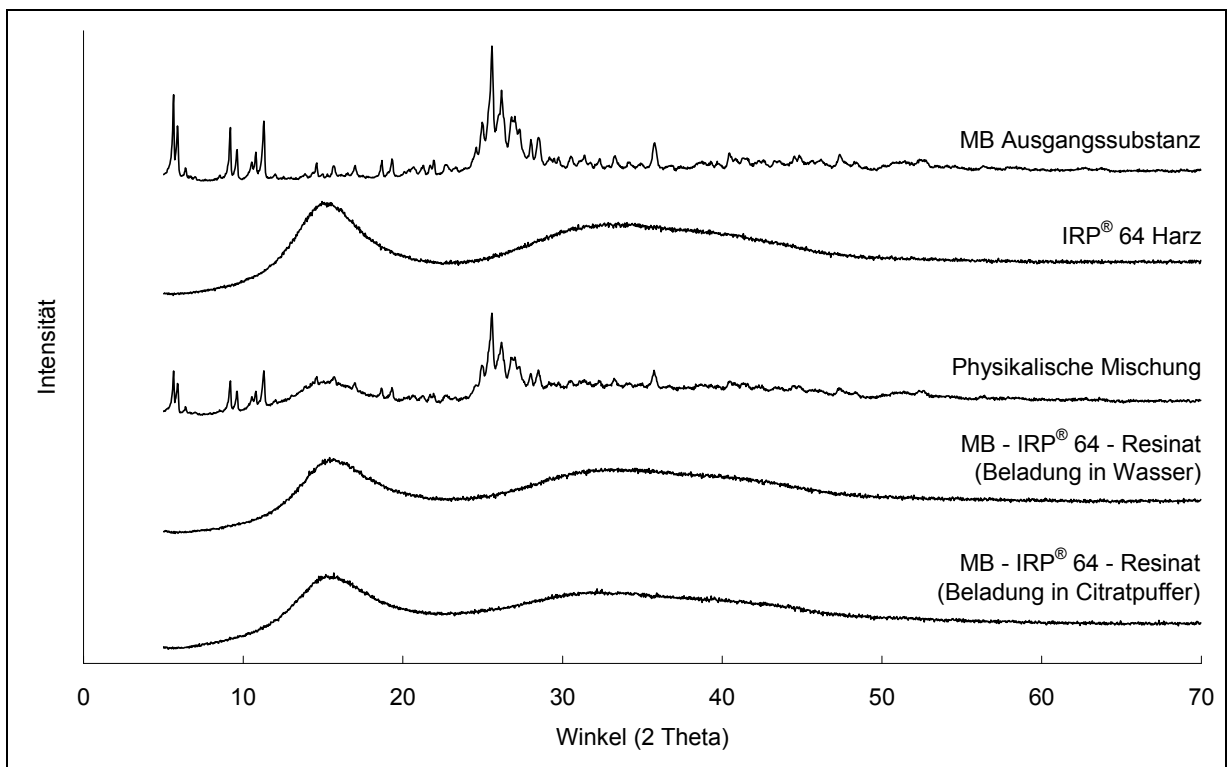


Abbildung 43: Vergleichende Übersicht röntgendiffraktometrischer Spektren von IRP[®] 64 Derivaten

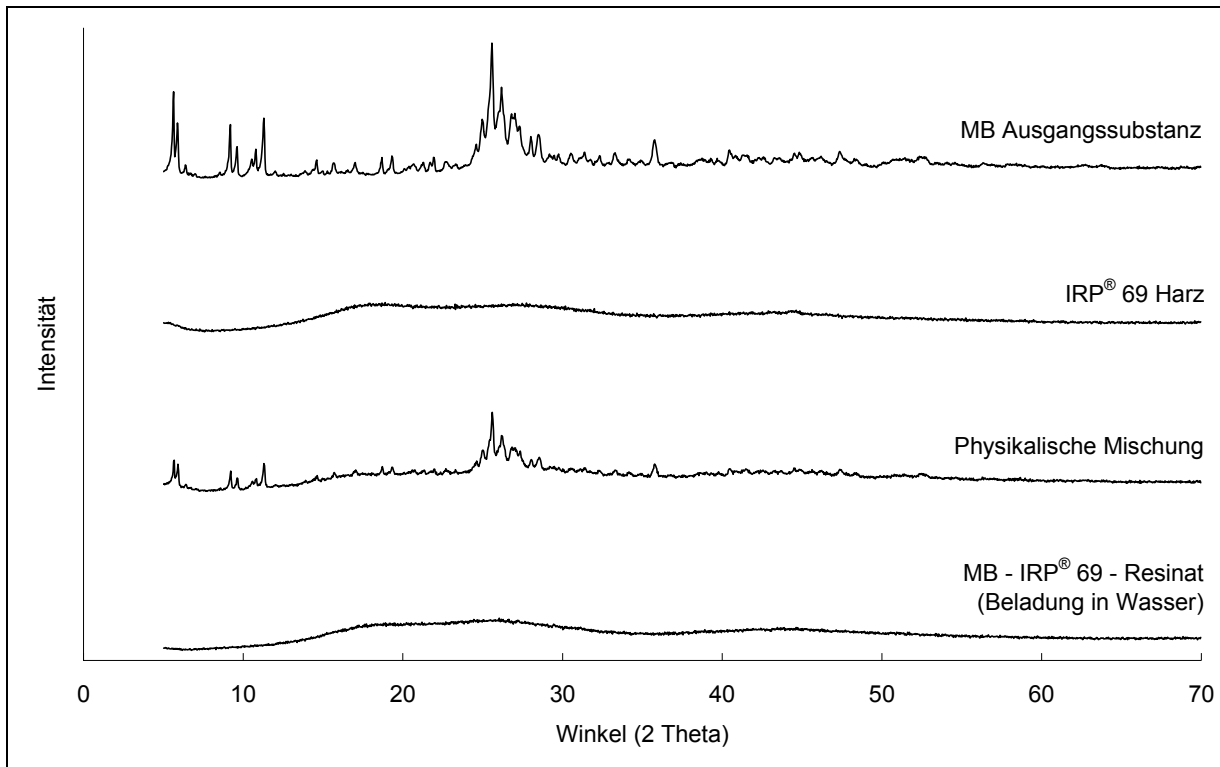


Abbildung 44: Vergleichende Übersicht röntgendiffraktometrischer Spektren von IRP® 69 Derivaten

Bei allen MB-Resinaten beladen in Wasser, die spontane Desorption von MB in pH-neutralem Milieu aufwiesen (Indion® 234, Indion® 294, IRP® 88, Abbildung 40, Abbildung 41, Abbildung 42), zeigt sich ein kristalliner Anteil von MB. Dies sind auch gleichzeitig die Resinate mit erhöhter Demethylierung von MB.

Die MB-Resinate von IRP® 64 (Abbildung 43) und IRP® 69 (Abbildung 44) zeigten keine spontane Desorption im Neutralen, sowie auch keine (IRP® 69) bzw. einen deutlich reduzierten Grad an Demethylierung von MB (IRP® 64).

Bei Beladung der Ionentauscher mit hohem Zersetzungsgrad der gebundenen Substanzen in Citratpuffer zeigte sich bei den MB-Resinaten keine spontane Desorption im pH-neutralen Milieu. Gleichzeitig ist die Demethylierung von MB nahezu vollständig unterbunden. Im Diffraktogramm dieser Resinate zeigt sich kein kristalliner Anteil von MB.

Die Resinate aus unterschiedlicher Beladungslösung, mit Ausnahme des metallbindenden Puffers in der Beladungslösung, wurden gleich behandelt in Hinblick auf Waschung, Trocknung und Desorption der gebundenen Substanzen. Für alle MB-Resinate wurde mittels atomabsorptionsspektroskopischer Messungen der Beladungslösungen ein äquimolarer Austausch gegen K^+ festgestellt, so dass zum Zeitpunkt der Beladung jedes Molekül MB ionisch gebunden vorliegt. Was am Ionenaustauscher während des Trocknungsprozesses stattfindet, so dass ein Teil des gebundenen MB wieder kristallisiert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Festzuhalten ist, dass dieses Phänomen im Rahmen der durchgeführten

Experimente ausschließlich in Kombination mit dem metallinduzierten katalytischen Prozess auftrat, der zu der N-Demethylierung führte, da bei Entfernung der Metallionen durch z. B. Citrat weder eine Demethylierung noch eine Rekristallisation von MB stattfand.

In vorliegendem Fall zeigte sich die röntgendiffraktometrische Analyse als schnelle und einfache Screening-Methode, um ein Indiz für oder gegen katalytische Aktivität im Resinat zu erhalten. Möglicherweise kann diese Screening-Methode auch für Resinate anderer Wirkstoffe eingesetzt werden. Dazu müssten aber weitere Untersuchungen an Resinaten anderer Wirkstoffe durchgeführt werden, um festzustellen, ob spontane Desorption dieser Art tatsächlich ein charakteristisches Phänomen für Zersetzungsmechanismen ist.

7.5 Dynamische Wasserdampfsorption

Die dynamische Wasserdampfsorption von allen verwendeten Kationenaustauschern wurde untersucht, um die Sorptionseigenschaften der Resine zu charakterisieren und möglicherweise eine Korrelation zu ihrer katalytischen Aktivität zu finden.

Es wurden zwei Sorptions- und zwei Desorptions-Zyklen aufgenommen, um potentiell auftretende Abweichungen der Kurven durch Veränderungen der Substanzeigenschaften feststellen zu können. Da die Kurven des ersten und zweiten Zyklus genau übereinander lagen und keinerlei Abweichungen zeigten, wird hier zugunsten der Übersichtlichkeit nur ein Zyklus dargestellt (Abbildung 45).

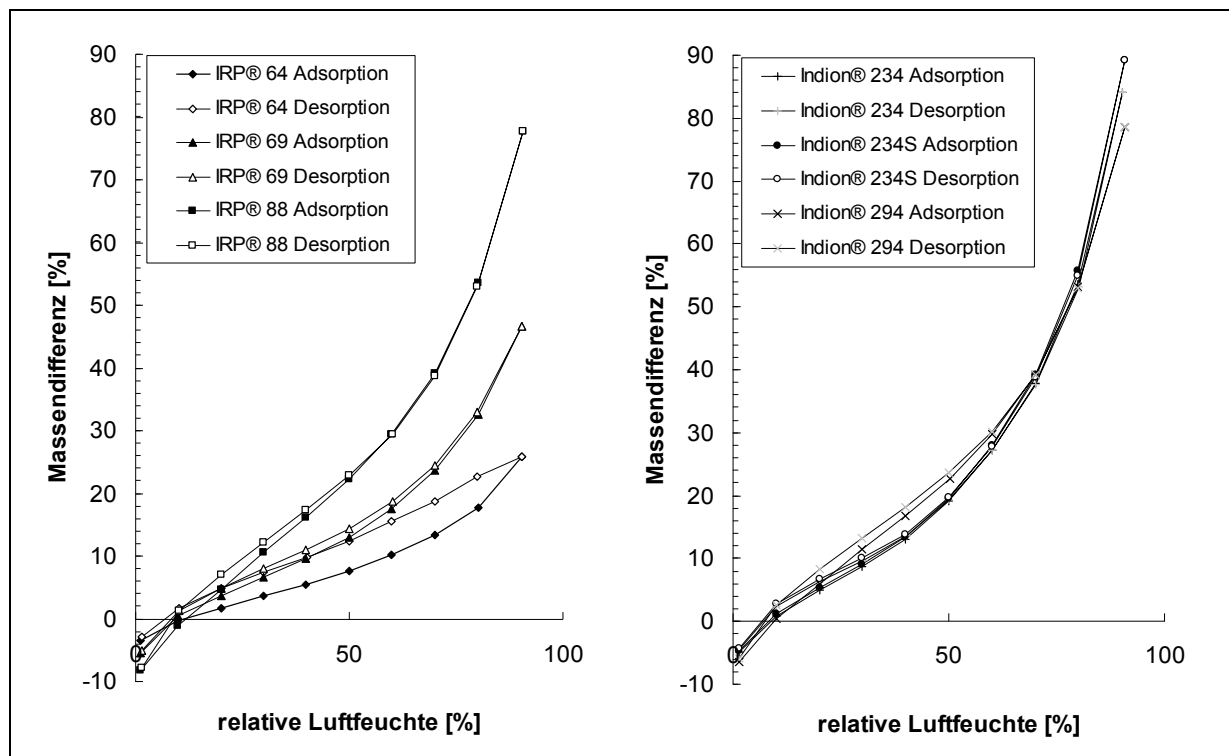


Abbildung 45: Wasserdampfsorptions-Isothermen der verwendeten Ionenaustauscher

Zu erkennen ist, dass die Ionenaustauscher der Resinate mit hohem Zersetzungsgrad (Indion® 234, Indion® 234S, Indion® 294, IRP® 88) eine sehr hohe Wasserdampfsorption aufweisen, zwischen 80 % und 90 % Massenzuwachs. Die Korrelation zum Grad der Demethylierung wird allerdings unterbrochen durch den Grad der Wasserdampfsorption von IRP® 69 und IRP® 64. IRP® 69 zeigt eine höhere Wasserdampfsorption als IRP® 64, obwohl IRP® 64 im Resinat eine höheren Zersetzungsgrad von MB aufweist als IRP® 69.

IRP® 64 ist der einzige Ionenaustauscher, der zwischen Sorptions- und Desorptionskurve eine nennenswerte Hysterese zeigt. Dies hängt offensichtlich zusammen mit den frei vorliegenden Säuregruppen, die bei allen anderen Ionenaustauschern in Salzform neutralisiert vorliegen.

Beim Vergleich der Wasserdampfsorptionsisotherme von unbeladenem Indion® 234 und MB-beladenem Indion® 234 (Resinat) in Abbildung 46 zeigt sich ein signifikant unterschiedlicher Verlauf. Der Sorptionsgrad beim Resinat ist deutlich niedriger als beim unbeladenen Ionenaustauscher, allerdings zeigt sich eine Hysterese. Bei dem hier untersuchten Resinat handelt es sich um das ursprünglich hergestellte Indion® 234-Resinat durch Beladung in Wasser, also mit Demethylierung von MB sowie kristallinem Anteil an MB im Resinat. Wenn man die Wasserdampfsorptionsisotherme des kristallinen MB betrachtet, sieht man eine starke Hysterese durch starke Bindung von Hydratwasser oberhalb von 20 % rF.

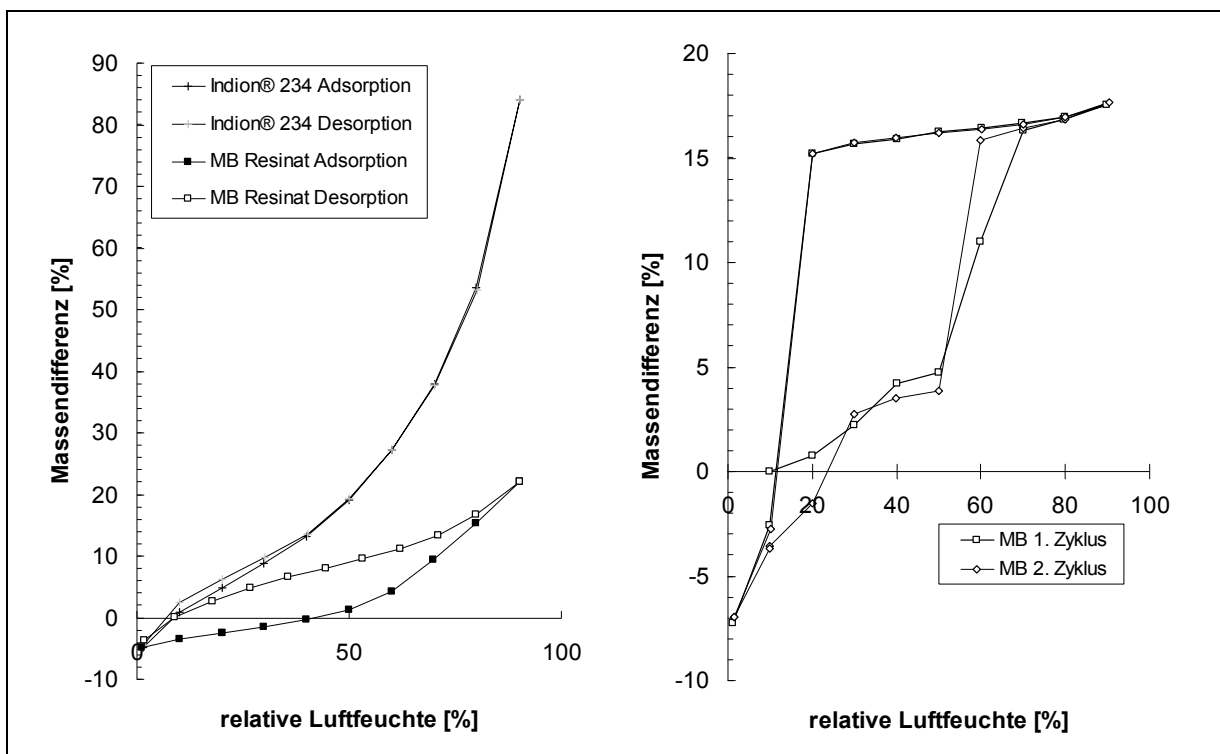


Abbildung 46: Wasserdampfsorptions-Isothermen von Indion® 234, MB und Indion® 234 Resinat

Möglicherweise beruht die Hysterese beim MB-Resinat auf dem freien kristallin vorliegenden Anteil von MB. Dies wäre zu verifizieren oder zu widerlegen durch die Analyse der Wasserdampfsorptions-Isotherme eines MB-Indion® 234-Resinates ohne Demethylierung von MB sowie frei vorliegendem kristallinem MB-Anteil. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Aufgrund dieser Analysen kann man aber die Aussage treffen, dass MB gebunden im Resinat ein gänzlich anderes Verhalten zeigt als kristallines MB. Für die Verarbeitung auch in festen Darreichungsformen wie Tabletten erscheint MB-Resinat erfolgversprechend, da das komplexe Verhalten des kristallinen MB hinsichtlich Hydratbildung und Hydratverlust problematisch sein kann.

7.6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Bei der Herstellung von MB-Resinaten kommt es zu einer heterogen-katalytischen N-Demethylierung von gebundenem MB während des Trocknungsprozesses des Resinates. Es entstehen sämtliche N-demethylierte Homologe des MB. Die heterogene Katalyse wird durch Metalle induziert, die simultan mit dem Ionenaustauscher auftreten müssen, um katalytisch aktiv zu sein. Vermutlich liegen sie in ionisch gebundener Form und so am Ionenaustauscher immobilisiert vor, so dass die Ionenaustauscher die Rolle eines aktivierenden Liganden einnehmen. Schwache Kationenaustauscher mit neutralisierter Säuregruppe zeigen eine besonders hohe katalytische Aktivität in Kombination mit Metallionen. Die Demethylierung kann durch metallbindende Substanzen in der Beladungslösung unterbunden werden. Die spontane Desorption von am Resinat gebundener Substanzen findet nur in Verbindung mit der katalytischen Demethylierung statt.

8. Herstellung und Charakterisierung der zweiten GMP-Charge

8.1 Einleitung

Zur Herstellung einer neuen GMP-Charge unter GMP-Bedingungen wurde eine neue Rezeptur auf Basis der ersten GMP-Charge entwickelt, unter Berücksichtigung aller, im Kapitel 7 diskutierten, neu erworbenen Kenntnisse zur Resinat-Bildung mit MB.

8.2 Entwicklung der Rezeptur

Ionenaustauscher der Wahl für das zu produzierende MB-Resinat war IRP® 64, da er von allen schwachen Ionenaustauschern die schwächste katalytische Tendenz für die N-Demethylierung von MB zeigte. Wie bei allen anderen MB-Resinaten ohne Zersetzungserscheinungen konnten vom MB-IRP® 64-Resinat über 90 % des

gebundenen MB mit 0,1 M HCl desorbiert werden. Starke Ionenaustauscher, wie IRP[®] 69, scheinen zwar keine heterogen-katalytische Demethylierung von MB zu induzieren, setzen aber das gebundene MB bei keinem untersuchten pH-Wert in ausreichendem Maße wieder frei, und sind somit für die Rezeptur weniger geeignet.

Sowohl in Citratpuffer als auch in Phosphatpuffer beladene Ionenaustauscher entwickelten keine katalytische Aktivität zur N-Demethylierung von MB, da beide Puffersysteme die für die Katalyse notwendigen Metallionen aus MB Ausgangssubstanz binden. Ihre Wirkung beruht aber auf den unterschiedlichen Prinzipien Komplexierung und Fällung.

Phosphat bildet mit den meisten Metallionen schwerlösliche Salze, die infolgedessen schon bei geringen Konzentrationen in Lösung ausfallen (Ausnahmen sind Salze mit Alkaliionen). Bei der Beladung mit Phosphatpuffer würden entsprechend die Schwermetall- oder Übergangsmetall-Phosphate ausfallen und beim Waschprozess vom feinmaschigen Filtermaterial zusammen mit dem MB-Resinat zurückgehalten werden. Auf diesem Wege bestünde die Möglichkeit, dass man Schwermetallphosphate mit dem MB-Resinat in die pädiatrische Zubereitung mit einbringt. Bei der Therapie mit der Oleogel-Zubereitung würden diese dann von den pädiatrischen Patienten eingenommen.

Für die Beladung des IRP[®] 64 in der GMP-Charge wurde Citratpuffer gewählt, da Citrat die Metallionen in einer löslichen Form komplexiert. Somit werden die komplexierten Metallionen beim Waschprozess des Resinats entfernt. Dies ist auch ein entscheidender Vorteil gegenüber dem Einsatz der MB Ausgangssubstanz als solche, die bisher mit entsprechender Metallbelastung verabreicht wurde. Die Metalle Hg, Pb, Cd und Al, die alle in MB Substanz vorkommen können, werden mit der Entwicklung von Autismus bei Kindern in Verbindung gebracht. Sie reichern sich im Gehirn an und führen dort zu strukturellen Veränderungen. Aluminium potenziert außerdem u. a. die Glutamat-Excitotoxizität, die ihrerseits Läsionen im Gehirn verursacht und auf die das unreife, kindliche Gehirn vierfach empfindlicher reagiert als das erwachsene Gehirn (Blaylock, 2009).

Da die bisherigen Beladungsversuche bewusst mit sehr hochkonzentrierten Puffersystemen durchgeführt wurden (1 mol/L), wurden analoge Beladungen mit reduzierten Konzentrationen des Citratpuffers durchgeführt, um festzustellen, ob man die Konzentration bei der GMP-Charge reduzieren kann. Die Puffersysteme wurden, analog der zuvor durchgeführten Experimente, auf pH 4,5 eingestellt. Beladungen wurden in 0,25 M sowie in 0,1 M Citratpuffer durchgeführt. Bei beiden reduzierten Pufferkonzentrationen war keine zusätzliche Zersetzung zu detektieren.

Die Beladung des Ionenaustauschers mit MB bei der GMP-Charge wurde, im Gegensatz zu den Laborchargen, in einem Edelstahlkessel durchgeführt. Dadurch

erhöht sich die Metallkonzentration in der Beladungslösung in unbekanntem Maße. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der Citratpuffers auf 0,25 mol/L festgelegt, in der Annahme dass die überschüssige Pufferkapazität potentiell herausgelöste Metallionen aus dem Edelstahlkessel ebenfalls bindet.

Da die Trocknung des Resinates bei der ersten GMP-Charge langwierig, problematisch sowie nicht vollständig war, wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich Trocknungsbedingungen durchgeführt. MB-IRP[®] 64-Resinat wurde in 0,25 M Citratpuffer beladen, gewaschen und bei vier verschiedenen Bedingungen getrocknet: bei 30 °C unter Vakuum (< 5 mm Hg, = < 66,5 mbar Luftdruck), bei 45 °C und 60 °C im Trockenschrank sowie bei Umgebungstemperatur über Orangegel wie zuvor, als Vergleichswert. Für die Trocknungsversuche wurde eine größere Charge Resinat hergestellt und geteilt, um identische Ausgangswerte sicherzustellen. Bei der Vergleichscharge mit Trocknung bei Umgebungstemperatur über Orangegel sowie bei Trocknung bei 30 °C unter Vakuum war keine zusätzliche Zersetzung feststellbar. Bei Trocknung bei 45 °C und 60 °C war ein erhöhter Zersetzungsgrad von MB vorhanden. Da zur Trocknung der GMP-Charge kein Vakuumtrockenschrank zur Verfügung stand, wurde wie zuvor bei der ersten GMP-Charge bei 25 °C im Hordentrockenschrank getrocknet

Die Beladung des MB-IRP[®] 64-Resinates lag bei 250 mg MB-Cl * 3 H₂O pro g IRP[®] 64. Damit war sie im Vergleich zur ursprünglichen Beladung des IRP[®] 64 in Wasser höher, was durch den erhöhten pH-Wert der Beladungslösung zu erklären ist. Im Vergleich zum MB-Indion[®] 234-Resinat der 1. GMP-Charge war die Beladung allerdings deutlich reduziert. Aufgrund dessen musste die Dosierung des Resinates in der Oleogel-Zubereitung erhöht werden, um die Zieldosierung von 20 mg MB-Cl * 3 H₂O pro mL Zubereitung zu gewährleisten.

Aus der Umrechnung auf die Bindung im MB-Resinat ohne Gegenionen resultierte eine notwendige Einwaage von ca. 10 g Resinat pro 100 mL Zubereitung.

Folgende Rezeptur wurde für die 2. GMP-Charge verwendet:

MB-IRP64 [®] -Resinat (entsprechend 20 mg/mL MB-Cl * 3H ₂ O)	ca. 10,00 g
Fruktose	16,00 g
Aerosil [®] 200	2,00 g
Miglyol [®] 812	82,00 g

	110,00 g

Durch die erhöhte Einwaage von Resinat erhöhte sich die Dichte der Zubereitung auf $1,1 \text{ g/cm}^3$, was bei der volumenbezogenen Dosierung mittels Dosierspritze bedacht werden muss. Die Viskosität der Zubereitung wurde durch den höheren Feststoffanteil nicht signifikant erhöht.

Da dieses Resinat keine festen Agglomerate bildete, die in einem gesonderten Prozessschritt zermahlen werden mussten, unterblieb der Mahlungsschritt bei dieser GMP-Charge. Voruntersuchungen im Labor ergaben, dass die Dispergierung mittels des Ultraturrax alle lockeren Agglomerate in seine Primärpartikel trennt und man eine gleichmäßige Suspension erhält.

8.3 Charakterisierung

Der Grad an Zersetzung von MB war in der zweiten GMP-Charge, im Vergleich zur ersten, signifikant niedriger. In der Gehaltbestimmung wurden über 80 % MB wiedergefunden. Trotzdem war offensichtlich, im Gegensatz zu den Laborchargen, wieder eine Demethylierungsreaktion induziert worden.

Eine plausible Erklärung dafür ist die unzureichende Pufferkonzentration in der Beladungslösung. Offenbar wurden durch die Kontaktzeit im Edelstahlkessel Metallionen in einer Menge herausgelöst, die die Bindungskapazität des Puffers überstieg. Darüber hinaus lief die Trocknung des Resinates im Hordentrockner über mehrere Tage, so dass sich ein großes Zeitfenster für die Trocknungsphase und damit für die Zersetzungsreaktion ergab.

Möglicherweise würde eine „Blitz-Trocknung“ des gewaschenen, feuchten Resinats in der Wirbelschicht eine Zersetzung des gebundenen Resinates verhindern, indem das Reaktionszeitfenster in Form der Trocknungszeit auf ein Minimum reduziert wird.

8.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Herstellung der zweiten GMP-Charge führte zu einem besseren Ergebnis als die erste GMP-Charge. Allerdings reichte das Ergebnis nicht an die Qualität der vorausgehenden Laborchargen heran. Hauptursache schien der Kontakt mit Edelstahlbehältnissen zu sein, der die Metallbelastung des Systems erhöht.

Der Trocknungsprozess ist ebenfalls weiterhin optimierungsbedürftig, da die Trocknung bei 25°C im Hordenschrank nur sehr langsam bis unvollständig vonstatten geht. Die gesteigerte Demethylierung von MB bei erhöhten Trocknungstemperaturen kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass die metallbindenden Puffer die Metallionen nur annähernd quantitativ aber nicht vollständig binden. Die wenigen Metallionen, die trotz allem am Ionentauscher gebunden vorliegen, entwickeln bei erhöhten Temperaturen eine ebenfalls erhöhte katalytische Aktivität. Eine schnelle

Wirbelschichttrocknung des Resinates wäre wohlmöglich eine interessante Alternative. Dabei wäre aber der Einfluss der Trocknungstemperatur zu untersuchen.

Wie zuvor erwähnt, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Arzneibuch-Kriterien der MB Ausgangssubstanz bezüglich Gehalt an verwandten Substanzen an die MB-Resinat-Zubereitungen angelegt. In dieser Hinsicht gilt auch die zweite GMP-Charge als nicht zulassungskonform. Die Therapieerfolge der ersten GMP-Charge waren in Hinblick auf den geringen Gehalt an MB allerdings überraschenderweise vergleichbar mit zuvor durchgeführten Studien mit MB Ausgangssubstanz oder im Handel befindlichen Fertigarzneimitteln (Urolene[®] Blue). Unter anderem aufgrund der Ergebnisse der klinischen Studie mit dem MB-Indion[®] 234-Resinat-Oleogel sowie den weiteren Resultaten dieser Arbeit erregen nun die N-demethylierten Homologe des MB als potentielle antiplasmodische Wirkstoffe die Aufmerksamkeit klinischer Forscher. Eine gewisse antiplasmodische Wirkung wurde für die N-demethylierten Homologe von MB und weitere Phenothiazin-Derivate anhand von invitro Untersuchungen bereits nachgewiesen (Vennerstrom et al., 1995). Erneute Untersuchungen mit Azur B an Zellkulturen wurden nun durchgeführt und zeigen erfolgversprechende Ergebnisse (unveröffentlichte Daten). Klinische Studien mit Azur B als Malaria-Therapeutikum werden zurzeit angestrebt und befinden sich in Vorbereitung.

D Zusammenfassung

1. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Darreichungsform zur oralen Einnahme mit dem kationischen Phenothiazin-Farbstoff MB (MB) als Arzneistoff entwickelt. MB als erstes synthetisches Chemotherapeutikum wird seit einiger Zeit erneut, im Rahmen von klinischen Studien, erfolgreich zur Therapie der Malaria tropica angewandt.

Als Basis der Entwicklung diente ein von einer anderen Forschungsgruppe entwickeltes MB-Resinat. Hier diente die Ionenaustausch-Technologie mit dem schwachen Kationenaustauscher Indion[®] 234 zur Reduzierung der gewebefärbenden Eigenschaften sowie des bittermetallischen Geschmacks von MB, der besonders bei pädiatrischen Patienten zu Erbrechen und Einnahmeverweigerung führt. Da die Darreichungsform für Kinder im Alter zwischen sechs Monaten und fünf Jahren geeignet sein sollte, wurde eine flüssige Suspension mit MB-Indion[®] 234-Resinat als Wirkstoffkomplex entwickelt.

Prinzipiell sollten an schwache Kationenaustauscher gebundene Stoffe ausschließlich in saurem Milieu desorbiert werden, so z. B. im Magen. Das MB-Indion[®] 234-Resinat zeigte jedoch eine signifikante spontane Desorption von MB auch in pH-neutralem Milieu. Schon geringe Mengen an MB in Lösung schmecken sehr bitter. Diverse Entwicklungsversuche, die spontane Desorption von MB zu reduzieren oder in wässriger Zubereitung den frei vorliegenden Anteil von MB durch Süßungsmittel und Aromen zu überdecken, führten nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Daraufhin wurde eine wasserfreie Suspension des MB-Indion[®] 234-Resinates auf Basis mittelkettiger Triglyzeride entwickelt. Die Triglyzeride wurden mit hydrophilem Siliziumdioxid zu einem Oleogel strukturiert, das mit pulverisierter Fruktose in suspendierter Form gesüßt wurde. Durch die Abwesenheit von Wasser wurde die spontane Desorption von MB vollständig unterbunden, was in einer optimalen Geschmacksmaskierung resultierte. Die Zubereitung wurde zum Patent angemeldet und eine erste Klinikcharge wurde unter GMP-Bedingungen für eine klinische Studie zur Pharmakokinetik bei Kindern hergestellt.

Die Oleogel-Zubereitung weist günstige rheologische Eigenschaften für gute Lagerstabilität sowie einfache und reproduzierbare Dosis-Applikation auf. Sie war bei den Lagerungsbedingungen 25 °C / 60 % rF und 40 °C / 75 % rF ohne Zusatz eines Konservierungsmittels über einen sechsmonatigen Prüfzeitraum mikrobiologisch stabil und ist nicht temperaturempfindlich, wodurch sie sich für den Einsatz in

tropischen Gebieten optimal eignet. Freiwillige erwachsene Probanden empfanden die Oleogel-Zubereitung hinsichtlich Geschmack und Mundgefühl als angenehm, da der hohe Feststoffanteil das ölige Mundgefühl unterbindet, ohne ein sandig-griesiges Gefühl hervorzurufen.

Im Verlauf der Entwicklung stellte sich mit Hilfe von HPLC-Analytik heraus, dass nach Desorption des gebundenen MB vom Resinat mehrere Nebenprodukte in größerer Menge auftraten. MB Ausgangssubstanz kann geringe Mengen Azur B enthalten. Das mono-N-demethylierte Homologe von MB wird vom Europäischen Arzneibuch als „Verunreinigung A“ bezeichnet und mit einem zugelassenen prozentualen Gehalt von maximal 5 % im Verhältnis zu MB begrenzt. Der prozentuale Anteil an Azur B war nach Desorption vom Resinat mit ca. 70 % deutlich erhöht. Zusätzlich traten weitere, bisher unbekannte Nebenprodukte auf, die massenspektrometrisch als sämtliche N-demethylierte Homologe des MB identifiziert werden konnten. Es fand also eine stufenweise Demethylierung der aromatischen Aminogruppen des MB statt, ohne Zerstörung des Ringgerüsts. Der Vergleich der Ergebnisse von Beladungsexperimenten mit weiteren Kationenaustauschern legte einen prinzipiellen Zusammenhang von Resinatbildung und Demethylierung von MB nahe.

Beladungsexperimente in verschiedenen Puffersystemen bei pH 4,5 ergaben meist vollständige Unterbindung der Demethylierungsreaktion durch metallbindende Phosphat- und Citratpuffer sowie EDTA-Lösung. Da in MB Ausgangssubstanz synthesebedingt Spuren von verschiedenen Metallen vorkommen, legte dieser Fund eine Beteiligung von Metallen an der Demethylierungs-Reaktion nahe. Durch weiterführende Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Metallionen gleichzeitig mit dem Ionenaustauscher vorliegen müssen, um ihre katalytische Aktivität zu entfalten. Da die Metalle höchstwahrscheinlich ionisch vorliegen, werden sie vermutlich durch den Kationenaustauscher ionisch gebunden und somit immobilisiert. Das Zeitfenster der Demethylierung konnte auf die Trocknungsphase des Resinats eingegrenzt werden. Die vorliegende Demethylierungs-Reaktion von MB kann folglich als heterogene metall-katalysierte N-Demethylierung unter Beteiligung von Wasser und Luftsauerstoff bei Normdruck beschrieben werden, wobei der heterogene Katalysator, bestehend aus den Metallionen immobilisiert durch die funktionellen Gruppen der unlöslichen Ionenaustauscher, in situ entsteht. Die spontane Desorption in pH-neutralem Milieu findet bei Unterdrückung der Demethylierung nicht mehr statt, so dass ein kausaler Zusammenhang nahe liegt.

Mit dem Ionenaustauscher IRP[®] 64, der die geringste Tendenz zu katalytischer Aktivität zeigt, wurde, unter Berücksichtigung aller neu erworbenen Kenntnisse, eine neue Rezeptur einer Oleogel-Zubereitung mit MB-IRP[®] 64-Resinat entwickelt, anhand der eine weitere Klinikcharge unter GMP-Bedingungen produziert wurde. Die Qualität der zweiten GMP-Charge war bezüglich des Gehaltes an MB deutlich verbessert,

allerdings fand erneut eine geringfügige Demethylierung von MB statt. Diese wurde vermutlich ausgelöst durch den Herstellprozess in Edelstahlbehältern, der die Metallbelastung im System erhöhte und die metallkomplexierende Kapazität des Puffers überstieg. Zusammenfassend kann die Oleogel-Zubereitung mit MB-Resinat als geschmacksmaskierendem Wirkstoffkomplex als erfolgsversprechende Rezeptur zur Behandlung von Malaria bei Kindern bezeichnet werden, wobei der Herstellprozess im Scale-Up weiterhin zu optimieren ist.

2. Zusammenfassung in englischer Sprache

In the present work, a novel dosage form for oral administration with the cationic phenothiazine dye stuff methylene blue (MB) as the active ingredient (API) was developed. MB was the first synthetic chemotherapeutic agent and has recently been used again successfully as an antimalarial agent within clinical studies.

The formulation development was based upon a MB resinate developed by another research group. In this case, the ion-exchange-technology with the weak cation exchange resin Indion[®] 234 was used to reduce the tissue-colouring properties as well as the bitter metallic taste of MB, which leads to vomiting and poor compliance especially with paediatric patients. Since the formulation was supposed to be applicable for children between the age of six months and five years, a liquid suspension with MB-Indion[®] 234-resinate as API-complex was developed.

As a matter of principle, substances bound to a cation exchange resin should solely be released from the resinate in acidic environment, e. g. the stomach. However, MB-Indion[®] 234-resinate showed significant spontaneous desorption of MB under neutral pH-conditions. Even small amounts of MB in solution exhibit bitter taste. Various developmental approaches were conducted in order to reduce the spontaneous desorption of MB as well as to mask the desorbed fraction of MB with sweeteners and flavours in aqueous formulations, however none of them yielded satisfactory results. Consequently, a nonaqueous suspension with MB-Indion[®] 234-resinate as API on the basis of medium chain triglycerides was developed. The triglycerides were structured with colloidal silicon dioxide and were sweetened with powdered fructose in suspended form. Due to the absence of water, the spontaneous release of MB was completely suppressed, with the result of optimal taste masking. The formulation was patented and a first pilot batch was produced under GMP conditions, with the objective of a clinical study for pharmacokinetics with children.

The oleogel formulation exhibits advantageous rheological behaviour for good storage stability as well as easy and reproducible dose administration. Under the storage conditions of 25 °C / 60 % rF and 40 °C / 75 % rF it was microbiologically stable without the addition of a preservative during a test period of six months and it is nonsensitive to temperature variation. Due to these properties the oleogel-formulation is well suitable for the use in tropical regions. Adult volunteers in taste panel tests perceive the oleogel-formulation as palatable regarding taste and mouthfeel, as the high solid fraction suppresses the oily sensation without evoking a grindy mouthfeel.

During the development stage, HPLC analysis revealed that, after desorption of the bound MB from the resinate, a variety of by-products appeared in rather high

amounts. MB substance can contain small amounts of azure B due to its synthesis. The mono-N-demethylated homologue of MB is termed "impurity A" by the European Pharmacopoeia, and is limited to a maximum content of 5 % in relation to MB. After desorption from the resinate, the percentaged amount of azure B had increased considerably to about 70 %. Additionally, further hitherto unknown by-products appeared, which could be identified by mass spectroscopy as all N-demethylated homologues of MB. Obviously, a stepwise demethylation of the aromatic amines of methylene blue took place, without destruction of the aromatic ring structure. Upon comparison of results from loading experiments with further cation exchange resins, a causal relationship between production of MB resinsates and demethylation of MB seemed likely.

Loading experiments in various buffers at pH 4.5 yielded a mostly complete suppression of the demethylation-reaction through substances with metal-binding properties (phosphate buffer, citrate buffer, EDTA solution). The fact that MB substance can contain traces of several metals from its synthesis substantiates the hypothesis of a participation of metals in the demethylation mechanism. Further experiments revealed that the metals must be simultaneously present with the ion exchange resin in order to become catalytically active. As the metals are presumably present in their cationic form, they are most likely ionically bound by the cation exchange resin and thus immobilized. The timeframe of the demethylation mechanism could be narrowed down to the drying phase of the resinate. Consequently, the present demethylation mechanism of MB can be summarized as a heterogeneous metal-catalyzed N-demethylation with participation of water and oxygen under ambient pressure, while the heterogeneous catalyst, consisting of the metal ions immobilized by the functional groups of the insoluble ion exchange resin, is formed in-situ. The spontaneous desorption under neutral pH-conditions did not take place when the demethylation reaction was suppressed, implicating a causal relationship.

Using the cation exchange resin IRP[®] 64, which showed the lowest tendency for catalytic activity, a new formulation was developed, in consideration of all newly acquired knowledge concerning the formation of MB resinsates. On the basis of the new formulation another pilot batch was produced under GMP-conditions. The quality of the second pilot batch was improved considerably concerning the content of MB, however a marginal demethylation of MB took place again. This was presumably induced through the production process in tanks made of stainless steel, which increased the metal burden in the system and exceeded the metal-binding capacity of the buffer. In summary the oleogel-formulation with MB-resinate as tastemasked API-complex can be described as a promising formulation for the treatment of Malaria in children, whereas the production process in scale-up needs further optimization.

E Experimenteller Teil

1. Substanzen

1.1 Methylenblau

Methylthioniniumchlorid, besser bekannt als Methylenblau (MB) (CAS Nummer 7220-79-3 Trihydrat, CAS Nummer 61-73-4 Anhydrat) ist ein heterozyklischer aromatischer Farbstoff mit Phenothiazin-Grundstruktur. Von der USP wird es als Trihydrat mit der Summenformel $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3 H_2O$ definiert. Unter bestimmten Bedingungen kann der Hydrat-Anteil variieren, aus diesem Grund gibt das Ph. Eur die Summenformel als $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot x H_2O$ an. MB ist kationisch und liegt in der Regel als Chloridsalz vor. Seine molare Masse ist 373,9 g/mol berechnet für das Chloridsalz als Trihydrat, 319,85 g/mol als Chloridsalz Anhydrat, bzw. 284,4 g/mol für das Kation. Die Schüttdichte liegt bei 0,4-0,6 g/cm³. der Schmelzpunkt des Trihydrats liegt bei ca. 190 °C, der des Anhydrats bei 105 °C, wobei Zersetzung eintritt. Mit ca. 50 g/L ist MB mäßig löslich in Wasser. Eine 1 %ige wässrige Lösung hat einen pH-Wert von 7,6. In reduzierendem Milieu wird MB in seine farblose Leukobase umgewandelt, die in Gegenwart von Sauerstoff wieder spontan oxidiert.

Die Synthese von MB kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Im Patent der Badischen Anilin- und Sodafabrik (heute BASF SE) von 1877 wird MB synthetisiert durch Nitrosylierung von Dimethylanilin mit folgender Reduktion zu N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzol und anschließender oxidativen Kupplung in Anwesenheit von Schwefelwasserstoff und Eisen(III)chlorid. Eine weitere abgewandelte Synthese von MB erfolgt mehrstufig aus N,N-Dimethyl-p-phenyldiamin unter Zusatz von Oxidationsmitteln und Addition von N,N-Dimethylanilin. Eine anschließende Oxidation führt zum Bindschedlers Grün, welches in Anwesenheit eines Katalysators mit Schwefelwasserstoff zyklisiert wird. Kürzlich wurden auch weitere Herstellungsmethoden für MB beschrieben (Maleki et al., 2009; Wischik et al., Patent US 2009/0259040 A1, 2009). Folgende Qualitäten von MB Ausgangssubstanzen wurden in dieser Arbeit verwendet.

Substanz	Bezeichnung	Qualität	Charge	Hersteller
MB	ME 141	USP	WA 1376	Spectrum Lab Products, Gardena, CA, US
MB	Proveblue™	Ph. Eur.	HT LVY 01024	Provepharm, Marseilles, FR

Tabelle 5: Verwendete MB-Qualitäten

Für die MB Ausgangssubstanz von Spectrum, die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Substanz, wurde der Gehalt entsprechend der USP Monographie photometrisch bei 663 nm gegen den vorgegebenen USP-Standard überprüft. Der prozentuale Gehalt m_U von MB in der zu bestimmenden Substanz, der laut Monographie zwischen 98 % und 103 % liegen muss, wird wie folgt berechnet,

$$m_U [\%] = 50 [mL/\mu g] c_S [\mu g/mL] (A_U/A_S)$$

wobei c_S die Konzentration in $\mu g/mL$ des wasserfreien MB in der Standardlösung ist. A_U und A_S sind die Absorptionen der MB-Probeflösung und der MB-Standard-Lösung. Nach dieser Methode betrug der Gehalt der verwendeten MB Ausgangssubstanz 100,14 % und entsprach somit den Vorgaben der Monographie.

Entsprechend der Ph. Eur. Monographie „Methylthionium Chloride“ wurde das Verhältnis der verwandten Substanzen im Vergleich zur Hauptsubstanz MB mittels HPLC bestimmt. Laut Monographie darf die Peakfläche der Verunreinigung A (Azur B, mono-N-demethyliertes Homologes von MB) maximal 5 % der Fläche des Hauptpeaks (MB) betragen. Die Peakflächen aller weiterer unidentifizierter Verunreinigungen dürfen einzeln maximal 0,5 % betragen, deren Summe maximal 1,0 %. Bei der MB Ausgangssubstanz von Spectrum mit USP-Qualität lag der prozentuale Anteil des Azur B bei 4,26 %, der Anteil aller weiteren Verunreinigungen lag einzeln unter 0,5 %, deren Summe bei 0,47 %. Damit entsprach die Spectrum-Ware der Prüfung „Verwandte Substanzen“ der Ph. Eur. Monographie. Bei Proveblue™, der MB Ausgangssubstanz von Provepharm mit Ph. Eur. Qualität, war der Anteil der verwandten Substanzen noch signifikant geringer. Der prozentuale Anteil des Azur B lag bei 0,6 %, der Anteil einer einzelnen weiteren Verunreinigung bei 0,45 %. Somit entsprach Proveblue™ ebenfalls den Ph. Eur. Kriterien zur Reinheit bezogen auf die verwandten Substanzen.

Zur Bestimmung des gebundenen Hydratwassers bei den vorliegenden Lagerbedingungen wurden verschiedene Methoden der Wasserbestimmung durchgeführt. Die USP und das Ph. Eur. schreiben unterschiedliche Messverfahren vor, um das gebundene Wasser zu bestimmen. Beide Methoden wurden durchgeführt, so wie auch noch drei weitere. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

	Karl Fischer Titration volumetrisch	Karl Fischer Titration coulometrisch	Bestimmung nach EuAB	Bestimmung nach USP	Bestimmung mittels IR-Trocknungswaage
% Masseverlust	16,07 ± 0,87	16,00	16,43 ± 0,08	12,38 ± 0,01	14,93 ± 0,06

Tabelle 6: Bestimmungen des Wassergehalts von MB Ausgangssubstanz von Spectrum, MW ± s, n = 3; KF-Titration coulometrisch n = 1

In der Annahme, dass das gesamte gebundene Wasser von MB Chlorid * x H₂O erfasst wird, würde rechnerisch ein Massenverlust von 14,44 % 3 Mol Wasser entsprechen, 16,45 % Masseverlust entspricht 3,5 Mol Wasser. Bei den Ergebnissen der verschiedenen Analysemethoden fällt auf, dass drei der fünf erhaltenen Werte für einen Hydratwasseranteil von 3,5 Mol pro Mol MB Chlorid sprechen, insbesondere das Ergebnis nach Ph. Eur. Die Bestimmung mittels IR-Trocknungswaage ergab zwar einen niedrigeren Wert, allerdings trotzdem höher als er für 3 Mol Hydratwasser sein dürfte. Daher ist anzunehmen, dass das Hydratwasser gegen Ende der Messung so langsam entwich, dass das Gerät zu früh Massenkonstanz detektierte und die Messung abbrach. Der Massenverlust nach USP fiel, bei sehr geringer Standardabweichung, signifikant zu niedrig aus; der Wert entspricht einem Verlust von 2,5 Mol Wasser (rechnerisch entsprechen 12,33 % Masseverlust 2,5 Mol Wasser).

Obwohl die USP, aufgrund von veröffentlichten analytischen Ergebnissen aus dem Jahr 1923 (Wales et al., 1923), in der Monographie einen Hydratwasseranteil von 3 Mol Wasser pro Mol MB Chlorid angibt, wird der Bereich des möglichen Wasserverlustes weit gefasst, er liegt bei 8 % - 18 % Massenverlust (ca. 1,5 - 4 Mol Wasser). In der Monographie des Ph. Eur. wird der Bereich ohne konkrete Angabe des Hydratwasser-Anteils mit 8 % bis 22 % sogar noch weiter gefasst (ca. 1,5 bis 5 Mol Wasser). Da bisherige Studienergebnisse sich grundsätzlich auf MB-Chlorid Trihydrat beziehen, wurden in dieser Arbeit ebenfalls alle Ergebnisse als MB-Chlorid Trihydrat berechnet.

Um festzustellen, wie sich MB bei verschiedenen Klimabedingungen verhält, insbesondere in Bezug auf relative Luftfeuchte, wurde eine dynamische Wasserdampfsorptionsisotherme erstellt. Sie weist auf stöchiometrische Hydratwasserbindung hin, erkennbar an der großen Hystereseffläche zwischen Adsorptionskurve und Desorptionskurve sowie dem plötzlichen Abfall unter 20 % rF (Abbildung 47).

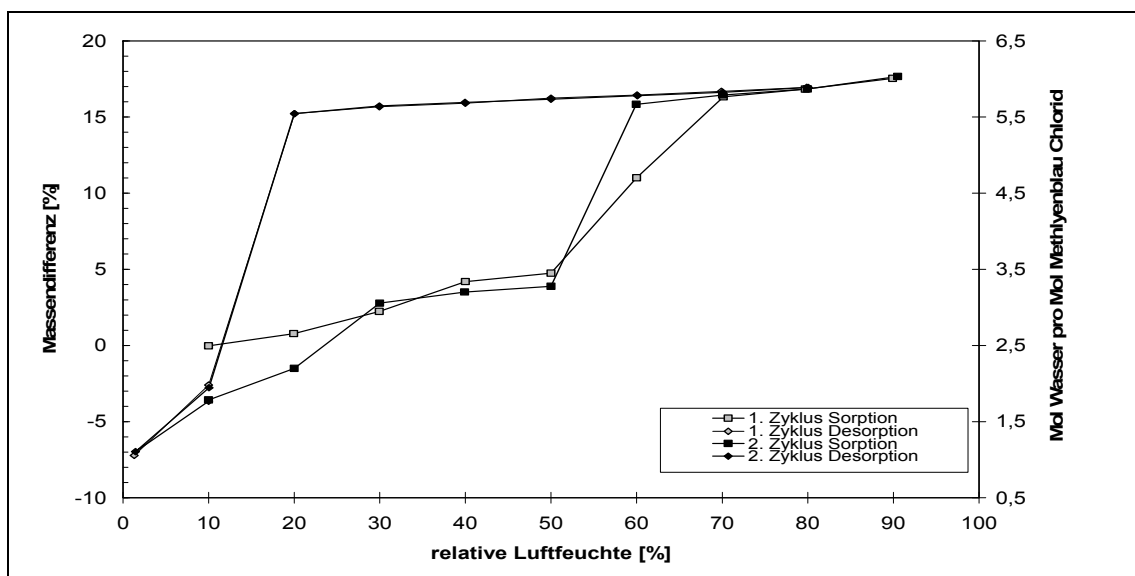


Abbildung 47: Wasserdampfsorptionsisotherme der MB Ausgangssubstanz von Spectrum, MW, n = 2

Der Sorptions-Verlauf im 2. Zyklus weicht von Sorptions-Verlauf des 1. Zyklus ab. Dieser abweichende Verlauf war in beiden Proben auf identische Weise zu erkennen, so dass man ein Artefakt in der Messung ausschließen kann. Diese Abweichung könnte ein Indiz für polymorphe Umwandlungsprozesse sein und sollte bei der Entwicklung fester Arzneiformen mit kristallinem MB, in Hinblick auf physikalische und pharmakokinetische Eigenschaften sowie Stabilität, bedacht werden.

1.2 Ionenaustauscher

Verschiedene Kationentauscher wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um MB-Resinate herzustellen. Mit der Ausnahme von IRP[®] 69, einem starken Kationentauscher, sind alle anderen schwache Kationentauscher.

Bezeichnung	Qualität	Matrix	funkt. Gruppe	Gegen-ion	Partikel-größe	Charge	Hersteller
Indion [®] 234	pharm. grade	Polyacrylat quer- vernetzt	-COO ⁻	K ⁺	≤ 0,15 mm	24/2005	Ion Exchange India Ltd., Ankleshwar, IN
Indion [®] 234S	pharm. grade	Polyacrylat quer- vernetzt	-COO ⁻	K ⁺	≤ 0,075 mm	n. a.	Ion Exchange India Ltd., Ankleshwar, IN
Indion [®] 294	USP	Divinyl- benzol/Met hacryl- säure Copolymer	-COO ⁻	K ⁺	≤ 0,15 mm	n. a.	Ion Exchange India Ltd., Ankleshwar, IN
IRP [®] 64	pharm. grade	Divinyl- benzol/Met hacryl- säure Copolymer	-COO ⁻	H ⁺	≤ 0,15 mm	000147 1873	Dow Chemical Company, Midland, US
IRP [®] 88	USP	Divinyl- benzol/Met hacryl- säure Copolymer	-COO ⁻	K ⁺	≤ 0,15 mm	000123 0315	Dow Chemical Company, Midland, US
IRP [®] 69	pharm. grade	Sulfoniertes Styrol/Divin yl-benzol Copolymer	-SO ₃ ⁻	Na ⁺	≤ 0,15 mm	000157 4537	Dow Chemical Company, Midland, US

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Ionenaustauscher

1.3 Analytische Standards

Zur Qualifizierung der eingesetzten Substanzen und der analytischen Bestimmungsmethoden mittels HPLC wurden folgende analytische Standards eingesetzt:

Substanz	MB	MB	Azur B
Bezeichnung	Methylene Blue	Methylthioniumchlorid	Methylthioniumchlorid Impurity
Qualität	CRS	CRS	CRS
Charge	G	1a	2a
Hersteller	USP, Rockville, US	Ph. Eur., Straßburg, FR	Ph. Eur., Straßburg, FR

Tabelle 8: Analytische Standards für MB und verwandte Substanzen

1.4 Hilfsstoffe und Laborchemikalien

Substanz	Bezeichnung	Qualität	Charge	Hersteller
Aceton	Normapur®	p. a.	0603855	VWR Fontenay s. Bois, FR
Acetonitril	Chromanorm®	HPLC isocratic grade	divers	VWR, Leuven, BE
Acetonitril	---	HPLC gradient grade	O889262	Acros organics, Geel, BE
Ammoniumacetat	---	Ph. Eur.	10150	Riedel-de Haën, Seelze, DE
Aroma Cassis	BC 501017 A	---	18934473	Firmenich, Kerpen, DE
Aroma Himbeer	---	---	9/025448	Dragoco, Holzminden, DE
Aroma Orange	O 501202 T	---	18711300	Firmenich, Kerpen, DE
Aroma Tutti-Frutti	TF 501103 A7	---	18746555	Firmenich, Kerpen, DE
Aroma Zitrone	---	---	9/055620	Dragoco, Holzminden, DE
Aspartam	---	Ph. Eur.	06/07-N03	Fagron, Barsbüttel, DE
Demineralisiertes Wasser	---	Ph. Eur.	n. a.	Selbsterstellung Umkehrosmose
Destilliertes Wasser	---	Ph. Eur.	n. a.	Selbsterstellung Labor-Destillation
Dikaliumhydrogenphosphat	---	p. a.	9061	Grüssing, Filsum, DE
Essigsäure	---	p. a.	41151235	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethylcellulose	---	pharm. grade	41775	Hercules, Aqualon, Wilmington, US

EXPERIMENTELLER TEIL

Substanz	Bezeichnung	Qualität	Charge	Hersteller
Fructose	---	Ph. Eur.	71432257	Caesar & Loretz, Hilden, DE
Hydroxypropylmethylcellulose	Metolose® 65SH-1500	Ph. Eur.	109650	Syntapharm, Mülheim/Ruhr, DE
Kaliumchlorid	---	Ph. Eur.	4E001643	KMF, Lohmar, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	---	p. a.	9065	Grüssing, Filsum, DE
Kalium-EDTA	---	p. a.	K36263519 845	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumhydroxid	---	p. a.	B828333114	Merck, Darmstadt, DE
KF-Formamid	Hydranal®-Formamid	Ph. Eur.	7022A 6025A	Riedel-de Haën, Seelze, DE
KF-Kalibrierlösung	Hydranal®-Water Standard	Ph. Eur.	71770 61640	Riedel-de Haën, Seelze, DE
KF-Methanol	Hydranal®-Methanol dry	Ph. Eur.	7249B 6235A	Riedel-de Haën, Seelze, DE
KF-Titrator-Reagenz	Hydranal®-Composite 5	Ph. Eur.	7232D 7022D	Riedel-de Haën, Seelze, DE
Methylcellulose	Tylopur®	pharm. grade	DEAC097557	Shin-Etsu, Tokyo, JP
Natriumacetat Trihydrat	---	p. a.	A013053401	Acros Organics, Geel, DE
Natriumchlorid	---	puriss. p. a.	41460	Riedel-de Haën, Seelze, DE
Natriumdihydrogenphosphat	---	p. a.	K92915142 906	Merck, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	---	p. a.	B231098243	Merck, Darmstadt, DE
Neutralöl	Miglyol® 812	pharm. grade	divers	Sasol, Witten, DE
ortho-Phosphorsäure 85 %	---	puriss. p. a.	134717053907 128	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Saccharose	---	Ph. Eur.	n. a.	Caesar & Loretz, Hilden, DE
Salzsäure 1 mol/l	---	p.a.	divers	Merck, Darmstadt, DE
Siliziumdioxid, hochdispers, hydrophil	Aerosil® 200 VV Pharma	Ph. Eur. USP/NF	23.8014.0002. 00	Evonik Degussa, Essen, DE
Sucralose	Inntense™ SL 6210	---	20051101	Innosweet, Braunschweig, DE
Zitronensäure Anhydrat	---	Ph. Eur.	621556	Lohmann, Emmerthal, DE

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

2. Herstellungsmethoden

2.1 Herstellung der Resinate

Für Beladungsversuche wurde eine 1 %ige MB Lösung hergestellt, in dem 1,00 g MB Substanz in ein 250 mL Becherglas gewogen wurde. 100 mL demineralisiertes Wasser wurde hinzu gegeben und die Mischung 60 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um sicherzustellen dass das gesamte MB gelöst ist. Das Becherglas wurde abgedeckt, um Volumenänderung durch Verdunstung zu vermeiden.

Für die Beladungsversuche mit verschiedenen Pufferlösungen wurden die benötigten Mengen an Puffersalzen, entsprechend der gewünschten molaren Konzentration, abgewogen und in ungefähr 90 % der benötigten Wassermenge gelöst. Der pH-Wert wurde mit den jeweils korrespondierenden Säuren und Basen eingestellt, um die Einschleppung von Fremdionen zu vermeiden (z. B. Natriumhydroxid und Phosphorsäure für Natriumdihydrogenphosphat-Puffer). Die eingestellten Pufferlösungen wurden zu 100 mL in einem Maßkolben aufgefüllt und der finale pH-Wert überprüft. 1,00 g MB Substanz wurden abgewogen und in der Pufferlösung im Ultraschallbad gelöst.

Die Resinate wurden auf Basis der Bindungsversuche von Gut et al. 2008 hergestellt. Eine Menge an Ionentauscher, für die eine Beladungskapazität von 1 g MB bestimmt wurde, wurde geringfügig reduziert, damit in der Beladungslösung MB im leichten Überschuss vorlag. Diese reduzierte Menge an Ionentauscher wurde der zuvor hergestellten MB-Lösung (1 %) hinzugefügt und intensiv gerührt (Beladungsphase). Laut Gut et al. 2008 wird das Beladungsgleichgewicht, also die maximale Beladungskapazität für MB, bereits nach 15 min. erreicht. Um die Beeinflussung durch variable Parameter wie Umgebungstemperatur und Rührintensität zu vermeiden, wurde die Beladungszeit immer auf 120 min. erhöht.

Nach der Beladungsphase wurde das frisch beladene Resinat durch Zentrifugation von der Beladungslösung getrennt. Der pH-Wert der Beladungslösung (Überstand) wurde bestimmt und die Lösung gesammelt. Das Resinat wurde in demineralisiertem Wasser dispergiert (= gewaschen), erneut zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis die Konzentration von MB im letzten Waschgang unter der Bestimmungsgrenze lag. Die Überstände wurden vereint und analysiert. Das gewaschene Resinat wurde bei Umgebungstemperatur unter Lichtausschluss über Orangeel bis zur Massenkonstanz getrocknet.

2.2 Herstellung der Suspensionen im Labormaßstab

Das zur Massenkonstanz getrocknete Resinat wurde durch ein Sieb der Maschenweite 315 µm gegeben, um Agglomerate zu trennen. Einige Chargen mussten vor der

Siebung mit Mörser und Pistill gemahlen werden, da die Agglomerate zu hart sind um bei der Siebung getrennt zu werden. Fruktose wurde gemahlen und durch ein Sieb der Maschenweite 315 µm gegeben. Der Siebdurchgang wurde verwendet.

Mittelkettige Triglyzeride (Miglyol® 812) wurden mit einer entsprechenden Menge hochdispersen hydrophilen Siliziumdioxids (Aerosil® 200) mit einem Ultra-Turrax® Typ TP 18/10 (IKA-Werke, Janke & Kunkel KG, Staufen, DE) homogenisiert, um eine zweiprozentiges Oleogel zu erhalten. Fruktose und MB-Resinat als Wirkstoffkomplex wurden abgewogen und in dem Oleogel dispergiert.

2.3 Herstellung der Suspensionen im Pilot-Maßstab

Zur Herstellung der ersten Charge im Pilot-Maßstab von 50 kg unter GMP-Bedingungen wurden 50 kg gereinigtes Wasser in einem Edelstahl-Rührwerksbehälter (Gebrüder Hagemann GmbH & Co. KG, Beckum, DE) mit einem Volumen von 150 L vorgelegt. Eine dem Ansatz entsprechende Menge MB wurde abgewogen und im vorgelegten Wasser bei 100-300 Upm gelöst. Ein dem Ansatz entsprechende Menge Ionentauscher Indion® 234 wurde hinzugegeben und bei 100-300 Upm 120 Minuten gerührt (Beladungsphase).

Nach der Beladung wurde die Beladungslösung durch eine an den Rührwerksbehälter angeschlossene Edelstahlfiltrationseinheit abgelassen. Die Filtrationseinheit enthielt eine Seitz Filterplatte K 900, um das pulverförmige Resinat zurückzuhalten. Das Resinat wurde gewaschen, in dem gereinigtes Wasser auf das Resinat im Rührwerksbehälter gegeben und durch die Filtrationsanlage geleitet wurde. Zeitweise wurde leichtes Vakuum an die Filtrationseinheit gelegt, um den Filtrationsprozess zu beschleunigen.

Das Resinat wurde so lange gewaschen bis das am Ende der Filtrationseinheit aufgefangene Waschwasser farblos war. Anschließend wurden die Filterplatten mit dem Resinat aus der Filtrationseinheit entfernt und das Resinat in einem Hordentrockenschrank mit Umluft getrocknet.

Fruktose und das MB-Resinat wurden in einer Kugelmühle gemahlen und durch ein Sieb der Maschenweite 315 µm gegeben. Der Siebdurchgang wurde verwendet.

Der Gehalt an MB im Resinat wurde bestimmt, indem MB vom fertigen Resinat mit Salzsäure desorbiert und die desorbierte Menge chromatographisch bestimmt wurde. Aufgrund des Ergebnisses konnte die erforderliche Einwaage an MB-Resinat bestimmt werden, um den festgelegten Gehalt an MB in der Suspension zu erhalten.

Die Suspension wurde hergestellt, indem die abgewogenen Hilfsstoffe Mittelkettige Triglyzeride (Miglyol® 812), hochdisperses hydrophiles Siliziumdioxid (Aerosil® 200)

und pulverisierte Fruktose sowie das MB-Resinat in einer Salbenprozessanlage (Unimix 200 SRC, EKATO Systems GmbH, Schopfheim, DE) homogenisiert wurden.

Die fertige Suspension wurde über eine Abfüllanlage in 50 mL Braunglasflaschen mit Sicherheitsdrehverschluss abgefüllt und zusammen mit einer Dosierspritze verpackt.

Der gesamte Herstellungsprozess wurde konform zu GMP-Richtlinien durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden geeignete Inprozesskontrollen durchgeführt, um den korrekten Verlauf des Prozesses zu kontrollieren.

Zur Herstellung der zweiten Charge im Pilot-Maßstab von 50 kg wurden 60 kg gereinigtes Wasser in einem Edelstahl-Rührwerksbehälter (Gebrüder Hagemann GmbH & Co. KG, Beckum, DE) mit einem Volumen von 150 L vorgelegt. Da bei dieser Charge in Citratpuffer beladen wurde, wurden zunächst Citronensäure und Natriumhydroxid im vorgelegten Wasser gelöst, um einen 0,25 molaren Citratpuffer mit pH 4,5 zu erhalten.

Der weitere Herstellungsprozess verlief analog der ersten Charge.

3. Untersuchungsmethoden

3.1 UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen wurden mit einem UV-Spektrometer (Spekol 1200, Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Es wurden Spektren über den gesamten Wellenlängenbereich (225-725 nm) aufgenommen und Einzelmesswerte bei Wellenlängen von 246, 292 und 600 nm aufgezeichnet. Die Probenmessungen wurden mit einer Quarzküvette mit 1 cm Spaltbreite durchgeführt.

Zur Bestimmung des linearen Messbereichs von MB wurden 10 verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0,5 bis 25 µg/mL vermessen. Es ergibt sich folgende Geradengleichung:

$$y \text{ [mAU*s]} = 0,1026x \text{ [µg/mL]} - 0,0357$$

mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9992$. Zu vermessende Proben wurden verdünnt bis ihre Konzentrationen im linearen Bereich lagen und wurden gegen einen frisch hergestellten externen Standard von 5 µg/mL vermessen. Der externe Standard wurde immer im gleichen Lösungsmittel mit entsprechenden Konzentrationen gelöst wie die Probe (Wasser, HCl, Pufferlösungen).

3.2 HPLC mit UV/VIS-Detektion (DAD)

3.2.1 Methodenauswahl

Die Chromatogramme wurden mit einem Hochleistungs-Flüssigchromatographen (Hewlett-Packard 1090 Series II, Agilent, Böblingen, DE) erzeugt. Für die Einspritzung der Proben wurde eine Injektionsspritze (Microliter # 702, Hamilton, Reno, US) mit einem Volumen von 25 µL verwendet. Die Injektionsschleife (Modell 7125, Rheodyne, Alsbach, DE) mit einem Volumen von 20 µL wurde durch 15maliges Einspritzen der Probe überfüllt, um eine akzeptable Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die erzeugten Chromatogramme wurden mit Hilfe der zugehörigen Software (Hewlett-Packard ChemStation, Rev. A.06.03, Agilent, Böblingen, DE) ausgewertet.

Die verwendete Methode zur Bestimmung von MB und Azur B neben weiteren verwandten Verunreinigungen stammt aus dem Kapitel „verwandte Substanzen“ der Monographie „Methylthioniniumchlorid“ des Europäischen Arzneibuches und wurde aus gerätetechnischen Gründen geringfügig verändert. Die Parameter-Einstellungen der HPLC-Analytik sind in Tabelle 10 dargestellt.

Parameter	Einstellung
HPLC-Säule (stationäre Phase)	Nucleodur® Gravity RP 18, 5 µm, 25 cm * 4 mm
Fliessmittel (mobile Phase)	27 T _{Vol} Acetonitril R, 73 T _{Vol} 0,34 %ige Phosphorsäure
Flussrate	0,8 mL/min
Druck	ca. 160 bar
Ofentemperatur	40 °C
Messwellenlänge	246 nm
detektierter Wellenlängenbereich	200 nm-600 nm
Injektionsvolumen	20 µL
Analysenzeit	15 min
Equilibrationszeit	2 min
Detektor	UV/VIS Diodenarray

Tabelle 10: Analysenbedingungen der HPLC-Analytik

Die Identifikation der Substanzsignale erfolgte über die Retentionszeiten und die gleichzeitig aufgenommenen UV/VIS-Spektren, jeweils im Vergleich zu den primären Referenzstandards (CRS).

Die Methode wurde entsprechend den Vorgaben der „system suitability“ der Monographie überprüft sowie in Anlehnung an die ICH Guideline Q2 (R1) „Validation of Analytical Procedures“ validiert. Die Vorgabe für die Mindest-Auflösung der Substanzsignale im Chromatogramm beträgt 1.5 für Azur B und MB. In der abgeänderten Methode betrug die Auflösung der Peaks 4.38 und entsprach somit der Monographie.

Da die Konzentrationen der zu analysierenden Proben unbekannt waren, wurde eine Kalibrierreihe über einen großen Konzentrationsbereich erstellt. 12 verschiedene Konzentrationen zwischen 0,5 und 500 µg/mL (Werte entsprechen der Masse der gewogenen Substanz) wurden vermessen und ergeben folgende Geradengleichung:

$$y [\text{mAU*s}] = 58,907x [\mu\text{g/mL}] - 120.67$$

mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9999$. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für MB liegt bei 0,5 µg/mL. Um Azur B in derselben Probe quantifizieren zu können, liegt die Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei 50 µg/mL. Für Azur B liegt das Bestimmtheitsmaß zwischen 50 und 500 µg/mL bei $R^2 = 0,9926$. Die Präzision der Methode wurde durch sechsfache Injektion der gleichen Probe bestimmt. Die ermittelte relative Standardabweichung ergibt 1,07 % für MB und 3,26 % für Azur B.

Die Berechnung der Probenkonzentrationen erfolgte mittels eines externen MB Standards, der immer im gleichen Lösungsmittel wie die zu analysierende Probe gelöst wurde. Die Konzentration des externen Standards lag bei 150 µg/mL.

$$c_P = \frac{AUC_P \times c_S}{AUC_S} [\mu\text{g/mL}]$$

c_P	Konzentration der Probelösung [µg/mL]
c_S	Konzentration der externen Standardlösung [µg/mL]
AUC_P	Peakfläche des Signals der Probe im Chromatogramm [mAU*s]
AUC_S	Peakfläche des Signals des Standards im Chromatogramm [mAU*s]

Die Berechnung der absoluten Mengen an MB in der Probelösung erfolgte über die Kenntnis des Gesamtvolumens der Probelösung sowie der zuvor berechneten Konzentration der Probelösung.

$$m_P = c_P \times V_P [\mu\text{g}]$$

m_P	Masse der in der Probelösung enthaltenen Probe [µg]
c_P	Konzentration der Probelösung [µg/mL]
V_P	Volumen der Probelösung [mL]

Die semiquantitative Bestimmung der verwandten Substanzen erfolgte prozentual im Verhältnis zu MB, anhand der Peakflächen im Chromatogramm.

$$\text{AzurB} = \frac{\text{AUC}_{\text{AzurB}} \times 100}{\text{AUC}_{\text{MB}}} [\%]$$

$\text{AUC}_{\text{AzurB}}$ Peakfläche des Signals von Azur B im Chromatogramm [mAU*s]

AUC_{MB} Peakfläche des Signals von MB im Chromatogramm [mAU*s]

Entsprechend wurde mit allen weiteren Verunreinigungen/verwandten Substanzen von MB bzw. ihrer Summe verfahren.

3.2.2 Herstellung der Zersetzungsproben

Die Proben der Zersetzungsprodukte von MB wurden hergestellt, indem ein Überschuss an MB in 1 M Salzsäure (saure Zersetzung), 1 M NaOH (alkalische Zersetzung) und 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung (oxidative Zersetzung) über eine Stunde zum Sieden erhitzt wurde, wobei verdampfendes Wasser ergänzt wurde um ein Austrocknen und Verbrennen der Probe zu verhindern. Die eingeeengten Probelösungen wurden mit destilliertem Wasser verdünnt und chromatographiert. Zusätzlich wurde eine Zersetzungsprobe hergestellt, bei der ein Überschuss an MB in 0,1N NaOH ohne Hitzeeinwirkung gelöst und nach 24 Stunden chromatographiert wurde.

3.2.3 Probenvorbereitung

Für die Analyse der Beladungslösungen wurde das frisch beladene Resinat durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 3000 Upm von der Beladungslösung getrennt (Heraeus Biofuge primo R, Kendro Laboratory products GmbH, Langenselbold, DE). Die pH-Werte der Beladungslösungen wurden bestimmt und die Überstände wurden gesammelt.

Die Resinate wurden in demineralisiertem Wasser dispergiert und dadurch gewaschen, die Suspension zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Konzentration von MB im letzten Waschgang unter der Bestimmungsgrenze lag. Die gesammelten Überstände wurden vereint und das Volumen ermittelt. Die Konzentration der Lösung wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt, wobei durch Verdünnungsschritte die Einhaltung des Lambert-Beerschen Gesetzes gewährleistet wurde.

Zum Vergleich der Ergebnisse und zum Bestimmen des Verhältnisses von MB zu Azur B wurde die Lösung zusätzlich mittels HPLC analysiert. Durch die so ermittelte Konzentration und das bekannte Volumen der Lösung konnte die Menge des in der Beladungslösung zurückbleibenden MB berechnet werden. Die Differenz der so berechneten Menge MB zur ursprünglichen Einwaage ergab die im Resinat gebundene Menge MB, berechnet als MB-Chlorid Trihydrat.

Für die qualitative und quantitative Analyse der am Ionentauscher gebundenen Substanzen nach Desorption vom Resinat wurden 100 mg des auf Massenkonzanz getrockneten Resinats in 0,1 M Salzsäure dispergiert, um die gebundenen Kationen gegen H^+ auszutauschen. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis im letzten Desorptionsschritt die Konzentration von MB unter der Bestimmungsgrenze lag. Das Volumen der Lösung wurde für Berechnungszwecke bestimmt und die Lösung chromatographiert. Berechnungen erfolgten mittels eines externen Standards.

3.3 HPLC mit massenspektrometrischer Detektion

Die unter Punkt 3.2.1 beschriebene isokratische HPLC Methode wurde zu einer Gradienten-Methode abgewandelt, indem ein Zwischenschritt mit veränderter Fließmittel-Zusammensetzung eingeführt wurde. So wurden die Nebenprodukte in den Desorptionlösungen besser voneinander getrennt, um sie in der folgenden massenspektrometrischen Detektion eindeutig identifizieren zu können.

Folgende Tabelle zeigt die Parameter-Einstellung der Gradienten-Methode:

Zeit [min]	Acetonitril in mob. Phase [%]	Flussrate [mL/min]
00:00	20	1.0
06:00	20	1.0
06:05	27	1.0
15:00	27	1.0
15:30	20	1.0

Tabelle 11: Parametereinstellung Gradientenmethode

Das verwendete HPLC-Gerät entsprach dem Gerät beschrieben unter Punkt 2.2.1, wie auch die zugehörige Software. Das nachgeschaltete Massenspektrometer war mit Electropray-Interface ausgestattet (MSD-ESI 1100 Series Hewlett Packard, Agilent, Böblingen, DE). Die Analyse der molaren Massen der chromatographierten Substanzen erfolgte mit der zugehörigen Software (Hewlett Packard ChemStation, Rev. A.09.01[1206], Agilent, Böblingen, DE).

Die Messparameter für das Massenspektrometer wurden wie folgt eingestellt:

Source	Ion mode	Vcap	Nebulizer	Drying gas flow	Drying gas temp.	Scan range
ESI	Positive	3500 V	50 psig	120 l/min	350 °C	100-950 amu

Tabelle 12: Messparameter Massenspektrometer

3.4 Atomabsorptionsspektroskopie

Die Menge an ausgetauschten Kalium- und Natrium Ionen in den Beladungslösungen wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt (AAS-1100-B, Perkin Elmer, Überlingen, DE). Zur Zerstäubung der Proben wurde eine Acetylen/Luft-Gemisch Flamme mit einer Breite von 10 cm eingesetzt. Als Lichtquelle dienten Hohlkathodenlampen der jeweiligen Elemente. Für die Bestimmung von Kalium wurde eine Perkin Elmer Photron™ Hohlkathodenlampe (Nr. P941, Serien-Nr. HABE 0081, Überlingen, Deutschland) bei einem Lampenstrom von 15 mA eingesetzt. Die untersuchte Wellenlänge lag bei 766,5 nm, die Spaltbreite des Monochromators beträgt 0,7 nm. Für die Bestimmung von Natrium wurde eine Perkin Elmer Intensitron™ Hohlkathodenlampe (Nr. 3036065, Serien-Nr. 402606, Perkin Elmer, Überlingen, DE) bei einem Lampenstrom von 8 mA eingesetzt. Die untersuchte Wellenlänge lag bei 589,0 nm, die Spaltbreite des Monochromators bei 0,2 nm. Die linearen Messbereiche der Ionen wurden mit jeweils 16 wässrigen Referenzlösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 20 mg/L bestimmt.

Der lineare Messbereich für Kalium lag zwischen 0,1 und 8 mg/L und für Natrium zwischen 0,1 und 3 mg/L, mit folgenden Geradengleichungen:

$$\text{Kalium: } y = 0,1194x \text{ [mg/l]} - 0,0038 \quad (R^2 = 0,9992)$$

$$\text{Natrium : } y = 0,2875x \text{ [mg/l]} + 0,0466 \quad (R^2 = 0,9925)$$

Alle Probenlösungen wurden auf eine Konzentration verdünnt, die im linearen Messbereich der jeweiligen Metallionen liegt. Um den Gehalt an Metallionen in den Beladungslösungen zu berechnen, wurde eine externe Standardlösung des jeweiligen Metallions hergestellt und mehrfach über den gesamten Messzeitraum vermessen. Um eventuelle Drifteffekte zu detektieren und auszugleichen, wurde regelmäßig demineralisiertes Wasser als Nullwert vermessen.

Da in den zu untersuchenden Beladungslösungen auch gelöstes MB vorlag, wurden wässrige Referenzlösungen vermessen, die bei gleicher Kalium- bzw. Natriumkonzentration verschiedene Mengen an MB enthalten. MB erniedrigt die Absorption von Kalium und Natrium Ionen. Die Absorptions-Erniedrigung zeigte eine gewisse

Konzentrationsabhängigkeit, allerdings keine zuverlässige Linearität. Daher wurde bei allen zu vermessenden Probelösungen die Konzentration an MB photometrisch bestimmt und der externen Standardlösung die entsprechende Menge an MB zugesetzt.

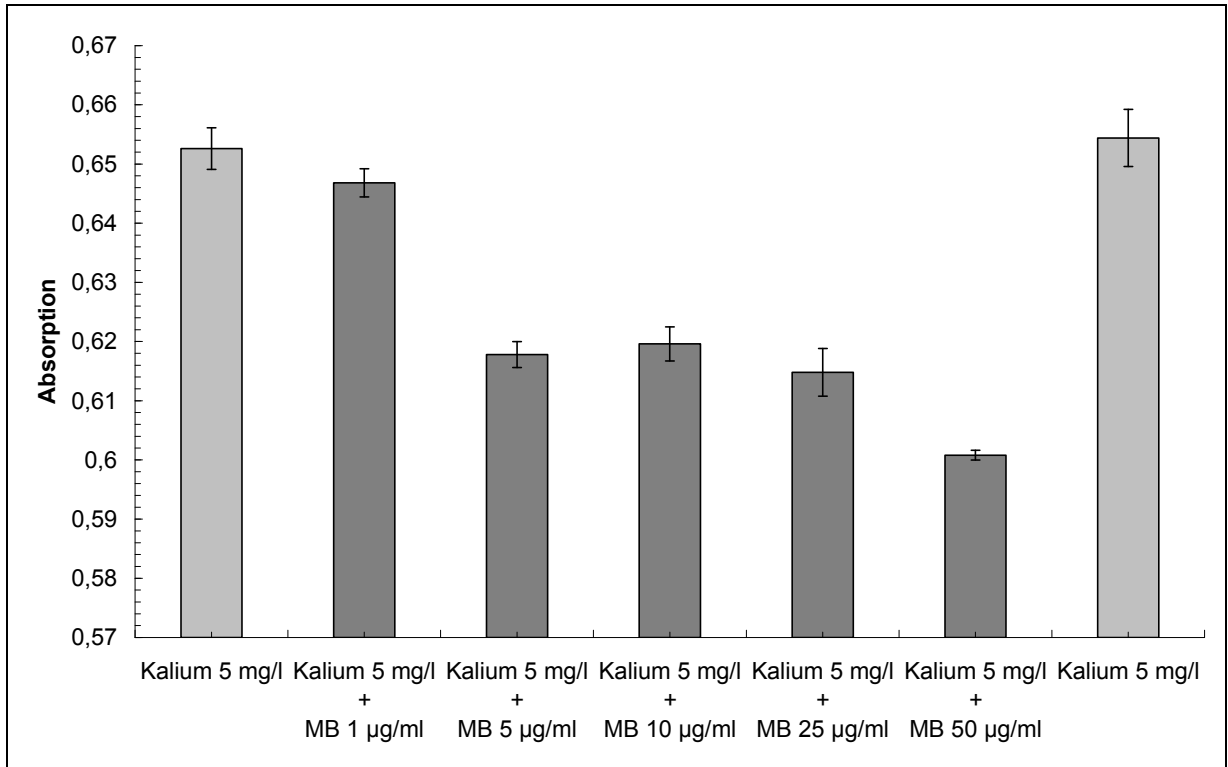


Abbildung 48: Einfluss von MB bei atomabsorptionsspektroskopischen Messungen von Kalium

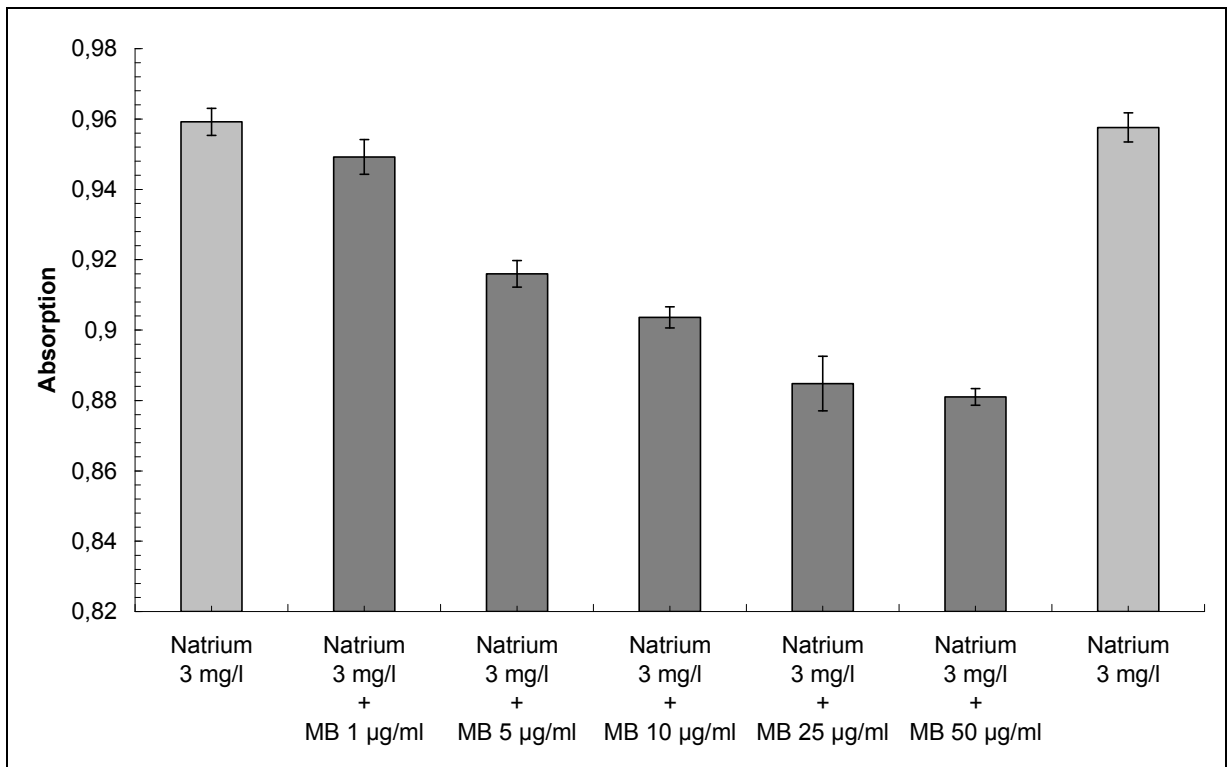


Abbildung 49: Einfluss von MB bei atomabsorptionsspektroskopischen Messungen von Natrium

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass MB unter anderem mit Chloridsalzen von Alkalimetallen Ionenpaare bildet, was wiederum die Intensität der Absorption bei konstanter Wellenlänge beeinflusst (DiSanto et al., 1, 1972; DiSanto et al., 2, 1972). UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen von Referenzlösungen gleicher MB-Konzentration mit variierender Kalium- oder Natrium-Konzentration ergaben im hier relevanten Konzentrationsbereich (0 bis 50 mg/L Kalium bzw. Natrium) keinen signifikanten Unterschied bei der Absorption von MB. Daher wurde der Einfluss einer möglichen Ionenpaarbildung bei diesen Messungen vernachlässigt.

3.5 Gaschromatographie zur Restlösemittelbestimmung

Die gaschromatographische Gehaltsbestimmung des Rest-Acetons im acetongewaschenen MB-Resinat wurde durchgeführt mit einem Turbomatrix40 Headspace, gekoppelt mit einem Clarus 500 Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, DE). Durchgeführt wurden die Messungen bei der Firma Grünenthal in Aachen, DE.

Ungefähr 300 mg Probe, auf zwei Kommastellen genau gewogen, wurde in Innerer-Standard-Lösung, bestehend aus 20 µL Isobutylketon in 1000 mL Wasser, dispergiert, wobei sich anhaftendes Aceton löst. 2 mL dieser Probenlösung wurden in einem Headspace-Vial auf 90 °C erhitzt und das equilibrierte Headspacegas in den Gaschromatographen injiziert. Der externe Standard bestand aus 10 µL Aceton in 500 mL Innerer-Standard-Lösung.

Die Headspace-Bedingungen sind in Tabelle 13 dargestellt:

Parameter	Einstellung
Ofentemperatur	90 °C
Nadeltemperatur	100 °C
Temperatur der Transferleitung	120 °C
Zeiteinstellung thermostating	50,0 min
Zeiteinstellung pressurizing time	2,0 min
Zeiteinstellung withdrawal time	0,2 min
Zeiteinstellung GC-cycle time	35,0 min
Zeiteinstellung injection time	0,04 min
Trägergas	Helium
Druckeinstellung	105 kPa

Tabelle 13: Analysebedingungen der Headspace Gaschromatographie

Die gaschromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 14 dargestellt:

Parameter	Einstellung
Kapillarsäule	6 % Cyanopropyl-phenyl-94 % Dimethylsiloxan; DB-1301-DF 1,0 µm; 30 m × 0,32 mm; Agilent Technol.
Trägergas	Helium
Initial Vordruck	80 kPa
Split Fluss	10 mL/min
Initial Ofentemperatur	40 °C
Initial Zeit	4,5 min
Rampe 1	10 °C/min → 120 °C/5 min
Rampe 2	40 °C/min → 200 °C/3 min
Gesamtzeit	22,5 min
Equilibrationszeit	2 min
Detektor	FID
Detektortemperatur	300 °C
Injektortemperatur	200 °C

Tabelle 14: Analysebedingungen der Gaschromatographie

Die Retentionszeit des Acetonpeaks betrug bei den Messbedingungen 2,25 Minuten.

Die quantitative Berechnung des Restlösemittels wurde wie folgt durchgeführt:

$$\text{Ratio}_{\text{Standard}} = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Analyt (Aceton)}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Innerer Standard}}}$$

$$\text{Ratio}_{\text{Probe}} = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Analyt (Aceton)}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Innerer Standard}}}$$

$$\text{Gehalt} = \frac{\text{Ratio}_{\text{Probe}} \times V_{\text{Analyt im Standard}} \times D_{\text{Analyt}} \times F_{\text{Standard}} \times V_{\text{Probe}} \times 1000 \text{ g}}{\text{Ratio}_{\text{Standard}} \times V_{\text{Standard}} \times W_{\text{Probe}} \times 1 \text{ kg}} \text{ [mg/kg]}$$

$V_{\text{Analyt im Standard}}$	Volumen des Analyten in der Standardlösung [µL]
D_{Analyt}	Dichte des Analyten (Aceton: 0,7906 mg/µL)
F_{Standard}	Gehaltsfaktor des Referenzstandards
V_{Probe}	Volumen der Probelösung [mL]
V_{Standard}	Volumen der Standardlösung [mL]
W_{Probe}	Einwaage der Probe [g]

Die relative Standardabweichung der Methode wurde durch viermalige Vermessung des Standards bestimmt, sie beträgt 0,58 %. Die Probe wurde einfach vermessen.

3.6 Rheologische Untersuchungen

Die rheologischen Untersuchungen wurden mit zwei unterschiedlichen Geräten durchgeführt. Beim Rotationsviskosimeter CV 20 (Haake, Karlsruhe, DE) wurde ein temperierbares Platte-Kegel-System (PK 45, Haake, Karlsruhe, DE) verwendet, mit dem die Messungen bei 25 °C durchgeführt wurden. Die Proben wurden auf dem Probenhalter vor Messbeginn 120 s temperiert. Während der Messungen wurde die Scherrate in einer Minute von 0 auf 200 /s erhöht und unmittelbar wieder in einer Minute von 200 auf 0 /s verringert. Die Messungen wurden dreifach durchgeführt.

Theoretische Fließgrenzen der Oleogele wurden bestimmt, indem die Regressionsgerade für die letzten fünf Messwerte der Hinkurve im Rheogramm berechnet wurde. Der Achsenabschnitt der Regressionsgeraden gilt als theoretische Fließgrenze. Ein Beispiel der Bestimmung ist in Abbildung 50 dargestellt.

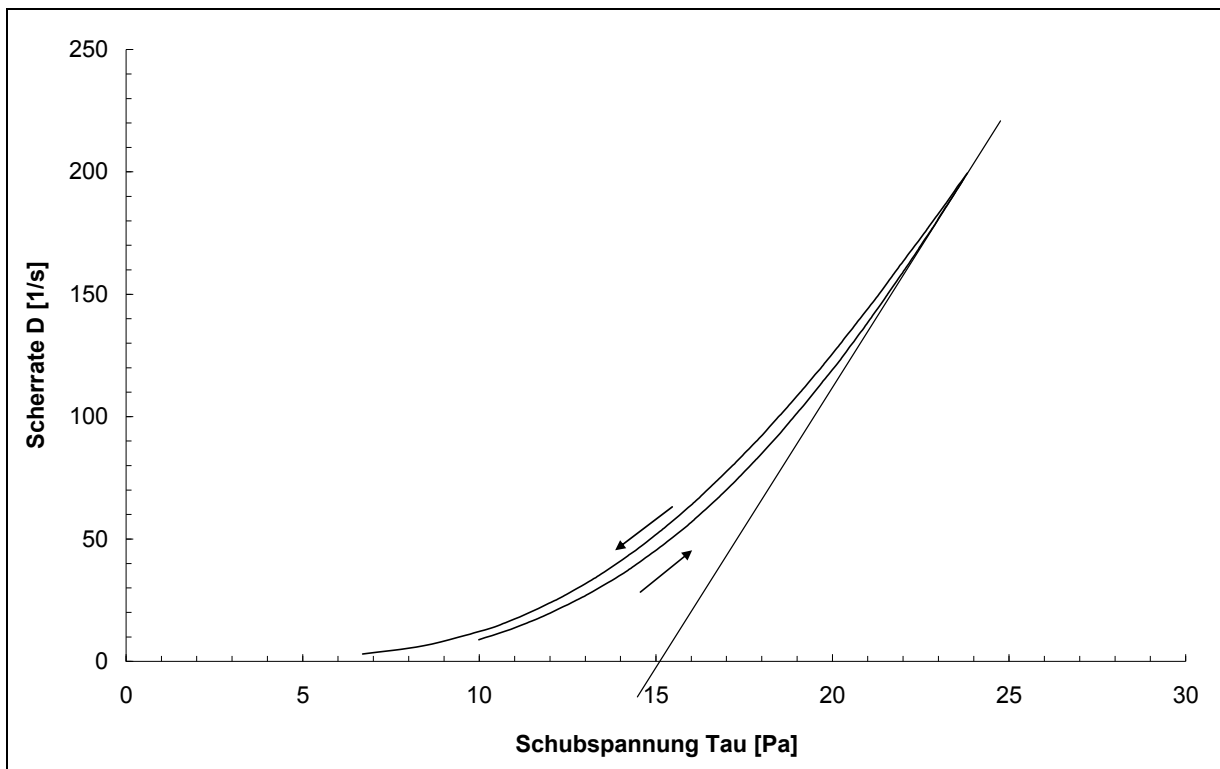


Abbildung 50: Bestimmung der Fließgrenzen im Rheogramm

Das zweite Rotationsviskosimeter (Haake Rheostress RS1, Thermo Scientific, Karlsruhe, DE) arbeitete mit Platte-Platte-System. Die Spaltbreite betrug 0,104 mm. Durchgeführt wurden die Messungen bei 20 °C, wobei die Proben auf dem Probenhalter vor Messbeginn 120 s temperiert wurden. Während der Messungen wurde die Scherrate innerhalb von 600 s von 0 auf 100 /s erhöht und dann die Scherrate 10 s konstant gehalten. Danach wurde wiederum die Scherrate innerhalb von 600 s von 100 auf 0 /s verringert. Die Proben wurden einfach vermessen.

3.7 Dichtebestimmung

Zur Bestimmung der Dichte der Oleogel-Zubereitungen wurde eine skalierte Dosierspritze mit 1 mL Gesamtvolumen mit einer Analysenwaage tariert. Genau ein mL Oleogel wurde aufgezogen und die Spritze erneut gewogen. Der Vorgang wurde zehnfach wiederholt. Der Quotient des Mittelwertes der bestimmten Massen und dem Volumen ergab die Dichte des Oleogels.

3.8 Rasterelektronenmikroskopie

Die im Exsikkator getrockneten Resine und Resinate in Pulverform wurden auf Probenträger aufgebracht. Nach erneuter Trocknung im Exsikkator über Nacht wurden sie in Argon-Atmosphäre 180 Sekunden lang mit Gold besputtert (Agar Manual Sputter Coater B7340, Agar Scientific, Stansted, GB), um leitfähige Oberflächen zu erhalten. Die Aufnahmen wurden bei 20 kV Hochspannung mit dem Rasterelektronenmikroskop (Leo 1430 VP, Leo Electron Microscopy, Cambridge, GB) erstellt, mit Vergrößerungen zwischen 100x und 2000x.

3.9 Röntgendiffraktometrie

Die Kristallinität der Proben wurde mit einem Röntgendiffraktometer (X'Pert-PRO, Almelo, NL) mit Cu-K α Strahlung untersucht. Eingestellt wurde eine Spannung von 45 kV sowie ein Röhrenstrom von 40 mA. Die Proben wurden in einem 2 θ Bereich kontinuierlich von 5 ° bis 70 ° gescannt, bei einer Schrittweite von 0,033 und 30 s pro Schritt. Die Probenträger der Autosampler-Einheit hatten einen Durchmesser von 16 mm, die Strahlbreite 12 mm.

3.10 Nachweis von Formaldehyd mittels Chromotropsäure-Reaktion

Zur nasschemischen Bestimmung von freigesetztem Formaldehyd während der Trocknungsphase des MB-Resinats wurde frisch beladenes, gewaschenes, noch feuchtes Resinat in einer Gaswaschflasche dünn ausgestrichen, um eine möglichst große Oberfläche zu erhalten. Die Gaswaschflasche wurde mit einer weiteren Gaswaschflasche verbunden, in der sich Chromotropsäure-Reagenz befand. Diese Gaswaschflasche wurde in ein beheizbares Wasserbad gestellt und mit einer Membranvakuumpumpe verbunden. Mittels der Vakuumpumpe wurde Umgebungsluft durch den Trocknungsraum des Resinats und daraufhin durch das beheizte Chromotropsäure-Reagenz geleitet. Das bei der Trocknung entstehende flüchtige Formaldehyd [1] reagierte mit dem Reagenz [2] zum spezifischen violett-farbenden Komplex [4], dargestellt in Abbildung 51. Ein durchgeführter Positiv-Test sowie eine negative Blindprobe bestätigten die Aussage des spezifischen Nachweises von Formaldehyd.

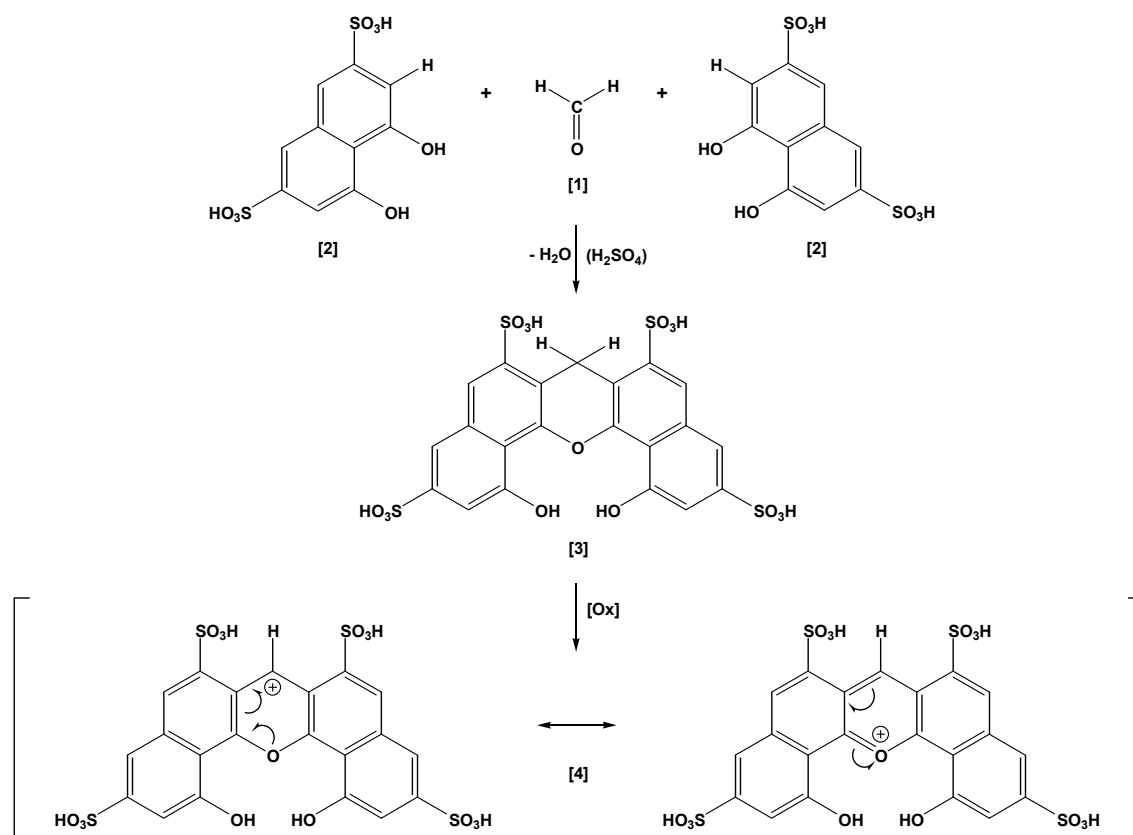


Abbildung 51: Reaktionsschema Chromotropsäure-Reaktion mit Formaldehyd

3.11 Wasserbestimmung

3.11.1 Karl Fischer-Titration, volumetrisch

Zur Bestimmung des Wassergehaltes in verschiedenen Proben wurde ein automatischer Titrator (DL 18, Mettler Toledo, Giessen, DE) eingesetzt. Als Arbeitsmedium wurde ein Gemisch aus Hydranal[®] Methanol dry und Hydranal[®]-Formamid zu gleichen Teilen verwendet. Die Titration wurde mit dem Einkomponentenreagenz Hydranal-Composite[®] 5 durchgeführt. Als Kalibrierlösung diente Hydranal-Water[®] Standard 10,0, wobei ein Gramm der Kalibrierlösung je nach Charge 10,03 mg oder 10,05 mg Wasser enthielt. Sämtliche Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Einwaage der Proben variierte zwischen 3 und 40 mg. Für alle Proben wurden 3 Messungen durchgeführt.

3.11.2 Karl Fischer-Titration mit Stickstoff-Begasung, coulometrisch

Zur Bestimmung des Wassergehaltes in verschiedenen Proben wurde ein coulometrisches Karl-Fischer-Feuchtigkeitsmeßsystem (CA-100, Mitsubishi Chemical Corporation, Chigasaki, JP) mit einem gekoppelten Verdampfer (VA124S, Mitsubishi Chemical Corporation, Chigasaki, JP) eingesetzt. Die Proben wurden mit einer Analysenwaage (Mettler AT261[®], Mettler Toledo, Giessen, DE) in eine Aluminiumschale eingewogen. Nach der Probeneinwaage wurde die Feuchtigkeit

durch Aufheizen auf 170 °C aus der Probe entfernt und mittels Stickstoffbegasung in die Karl-Fischer Messzelle überführt. Dort wurde durch Titration die ausgetriebene Wassermenge durch eine Einzelmessung quantitativ bestimmt.

3.11.3 Bestimmung nach USP-Methode

Die Bestimmung des Wassergehaltes von MB wurde nach der USP-Monographie durchgeführt: Eine gewogene Substanzprobe wurde bei 75 °C unter Vakuum (< 5 mm Hg, = < 66,5 mbar Luftdruck) vier Stunden getrocknet und der Massenverlust bestimmt. Die Probenbehältnisse wurden vor Einwaage der Probe bis zur Massenkonstanz getrocknet, wobei sie vor dem Wiegen in einem Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt wurden.

3.11.4 Bestimmung nach Ph. Eur.-Methode

Die Bestimmung des Wassergehaltes wurde nach Anleitung der Ph. Eur. Monographie durchgeführt: Eine gewogene Substanzprobe wurde in einem Trockenschrank bei 105 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet und der Massenverlust bestimmt. Die Probenbehältnisse wurden vor Einwaage der Proben bis zur Massenkonstanz getrocknet, und jeweils vor dem Wiegen in einem Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.11.5 Bestimmung mit Infrarot-Trocknungswaage

Verwendet wurde ein thermogravimetrisches Infrarot-Feuchtemessgerät (MA 100, Sartorius, Göttingen, DE). Die Proben wurden in zugehörige Probenhalter gewogen, bei 105 °C auf Massenkonstanz getrocknet und der Massenverlust ermittelt.

3.12 Dynamische Wasserdampfsorption

Die Wasserdampfsorptions-Eigenschaften verschiedener Stoffe wurden bei einer konstanten Messtemperatur von 25 °C und einer stufenweisen Änderung der relativen Luftfeuchtigkeit untersucht (SPS 11, Projekt Messtechnik, Ulm, DE). Die Erhöhung bzw. Senkung der relativen Luftfeuchten erfolgte in 10 % Schritten zwischen 0 % rF und 90 % rF, in zwei aufeinander folgenden Messzyklen. In Zeitabständen von 5 Minuten wurden die Proben automatisch gewogen. Ab einer Unterschreitung der Gewichtsänderung von 0,01 % in 30 Minuten, spätestens jedoch nach 48 Stunden erfolgte der Wechsel in die nächste Feuchtestufe. Der erste Zyklus begann bei 10 % rF, nachdem die Proben bei diesen Bedingungen bis zur Massekonstanz ca. 72 Stunden klimatisiert wurden. Die Einwaage der Proben lag bei ca. 300 mg, genau gewogen.

3.13 Untersuchungen mit Probanden

Die Probanden-Versuchsreihe beinhaltete Untersuchungen zur Akzeptanz von Placebo Zubereitungen in Hinblick auf Mundgefühl und Geschmack. Daran nahmen 20 Probanden im Alter zwischen 22 und 47 Jahren teil, von denen 13 weiblich waren und 7 männlich. Der Versuch bestand aus drei Teilen.

Im ersten Teil sollte die Süßkraft der Placebo Zubereitung untersucht werden. Die Zubereitung bestand aus mit hochdisperssem hydrophilen Siliziumdioxid strukturierten mittelkettigen Triglyzeriden, die mit pulverisierter Fruktose in suspendierter Form gesüßt waren. Die Probanden bekamen sechs verschiedene wässrige Fruktose-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 1 g/100mL und 30 g/100mL. Anschließend probierten sie das Placebo Oleogel und sollen angeben, nach welcher Zeit (in Sekunden) die Süßkraft am höchsten war, und welcher wässrigen Fruktose-Konzentration dieser Zeitpunkt am ehesten entsprach.

Im zweiten Teil der Versuchsreihe sollten die Probanden die Konsistenz und das Mundgefühl des wirkstofffreien Oleogels beurteilen. Da die Zubereitung aus einer öligen Grundlage mit suspendierten Pulverpartikeln bestand, gab es die Bereiche Öligkeit, Sandigkeit und Gesamteindruck mit je fünf Stufen, von denen die Probanden auswählen konnten.

Im dritten Teil bekamen die Probanden neben des neutral gesüßten wirkstofffreien Oleogels drei weitere, die mit je einer anderen Geschmacksrichtung angereichert waren. Die Geschmacksrichtungen entsprachen Tutti-Frutti (Multifrukt, Multivitamin), Cassis (schwarze Johannisbeere) und Orange. Die mit Geschmack angereicherten Placebo Oleogele sollten in Annehmbarkeit und Geschmack mit der neutral gesüßten Zubereitung verglichen werden.

3.14 pH-Wert-Messung

Messungen der pH-Werte von Lösungen wurden mit einem elektronischen pH-Meter (Knick Type 507, Knick, Berlin, DE) durchgeführt.

3.15 Stabilitätsprüfungen

3.15.1 Anbruchstabilität

Die erste der zwei unter GMP-Bedingungen hergestellten GMP-Chargen wurde von der herstellenden Firma Pharbil GmbH (Waltrop) verschiedenen Stabilitätsprüfungen unterzogen.

Die Anbruchstabilität stellt die Verwendung nach Anbruch des Originalbehältnisses über den vorgeschriebenen Einnahmezeitraum nach und untersucht die Zubereitung

daraufhin. Dabei wurde das Behältnis mit der Zubereitung, wie vorgeschrieben, geschüttelt um die Zubereitung zu homogenisieren, geöffnet, eine Probe gezogen und die Probe analysiert. Das geöffnete und wieder verschlossene Behältnis wurde drei Tage bei 40 °C und 75 % rF gelagert und daraufhin die Analytik, wie zuvor beschrieben, erneut durchgeführt. Die Wahl der Lagerungsbedingungen für die Anbruchstabilität beruhte auf der Tatsache, dass die Zubereitung in Gebieten mit tropischem Wechselklima angewendet werden sollte.

Untersuchte Parameter waren Aussehen, Dichte, Wassergehalt, Gehalt an MB, Gehalt an Verunreinigungen sowie eine mikrobiologische Prüfung nach Ph. Eur. 2.6.12 und 2.6.13 auf Hefen und Schimmelpilze, E. coli sowie Gesamtkeimzahl.

3.15.2 Lagerstabilität

Die erste der zwei unter GMP-Bedingungen hergestellten GMP-Chargen wurde von der herstellenden Firma Pharbil GmbH (Waltrop) verschiedenen Stabilitätsprüfungen unterzogen.

Die Lagerstabilität der Zubereitung wurde bei 25 °C und 60 % rF sowie bei 40 °C und 75 % rF durchgeführt. Dabei wurde zu den Zeitpunkten 0, 1, 3 und 6 Monate ein Originalbehältnis, wie vorgeschrieben, geschüttelt um die Zubereitung zu homogenisieren, geöffnet, eine Probe gezogen und die Probe analysiert.

Untersuchte Parameter waren Aussehen, Dichte, Wassergehalt, Gehalt an MB, Gehalt an Verunreinigungen sowie eine mikrobiologische Prüfung nach Ph. Eur. 2.6.12 und 2.6.13 auf Hefen und Schimmelpilze, E. coli sowie Gesamtkeimzahl.

F Literaturverzeichnis/Quellen

AKOMPONG T., GHORI N., HALDAR K., In vitro activity of riboflavin against the human malaria parasite plasmodium falciparum, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (2000), 88-96

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS: COMMITTEE ON DRUGS, Inactive ingredients in pharmaceutical products: Update (Subject review), *Pediatrics* 99 (1997), 268-278

ASCHWANDEN L., MALLAT T., KRUMEICH F., BAIKER A., A simple preparation of an efficient heterogeneous gold catalyst for aerobic amine oxidation, *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical* 309 (2009) 57-62

BARNSCHEID L., Kindgerechte Arzneizubereitungen mit diuretischen Wirkstoffen, Inaugural-Dissertationsschrift, Düsseldorf, 2007

BECKER K., SCHIRMER R. H., Antioxidative Enzyme des Malariaerregers als Drug-Targets, *Biospektrum* 02 (2007), 138-141

BELL D. J., WINSTANLEY A., The treatment of malaria in children, *Paediatric and Perinatal Drug Therapy* 6 (2005); 126-132

BLAYLOCK R. L., A possible central mechanism in autism spectrum disorders, part 3: the role of excitotoxin food additives and the synergistic effects of other environmental toxins, *Alternative Therapies in Health and Medicine* 15 (2009), 56-60

BREITKREUTZ J., Kindgerechte Arzneizubereitungen zur peroralen Anwendung, Habilitationsschrift, Münster, 2004

BREITKREUTZ J., Nach der EU-Reform-Arzneiformen für Kinder, *Pharmazie in Unserer Zeit* 1 (2009), 30-37

BUCHHOLZ K., Redoxnetzwerke des Malariaerregers Plasmodium: Validierung von Schlüsselenzymen für neue chemotherapeutische Ansätze, Inaugural-Dissertationsschrift, Gießen, 2008

CHU M., WAN Y., Sentinel lymph node mapping using near-infrared fluorescent methylene blue, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (2009), 455-459

- ČULO F., SABOLOVIĆ D., SOMOGYI L., MARUŠIĆ M., BERBIGUIER N., GALEY L., Anti-tumoral and anti-inflammatory effects of biological stains, *Agents and Actions* 34 (1991), 424-428
- DE ZWART L. L., HAENEN H. E. M. G., VERSANTVOORT C. H. M., SIPS A. J. A. M., Pharmacokinetics of ingested xenobiotics in children: A comparison with adults, RIVM report 623860011/2002
- DISANTO A. R., WAGNER J. G., 1, Pharmacokinetics of highly ionized drugs I: methylene blue-whole blood, urine and tissue assays, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61 (1972a); 598-602
- DISANTO A. R., WAGNER J. G., 2, Pharmacokinetics of highly ionized drugs II: methylene blue-absorption, metabolism and excretion in man and dog after oral administration, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61 (1972b); 1086-1090
- DULLINGER E. M., KREIBL A., WIDHALM K., Mangelernährung bei Kindern im ländlichen Guinea in Westafrika, *Journal für Ernährungsmedizin* 11 (2009), 3-4, 19
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA), Reflection paper: Formulations of choice for the paediatric population (2006), EMEA/CHMP/PEG/194810/2005
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6, Monographie "Methylthioninium Chloride"
- FABER P., RONALD A., MILLAR B. W., Review Article-Methylthioninium chloride: pharmacology and clinical applications with special emphasis on nitric oxide mediated vasodilatory shock during cardiopulmonary bypass, *Anaesthesia* 60 (2005), 575-587
- FERREIRA, Treatment of malaria with methylene blue, *The Lancet* 142 (1893) 821
- FRIMMEL S., HEMMER C. J., LÖBERMANN M., REISINGER E. C., Wegbereiter für die globale Ausbreitung tropischer Infektionskrankheiten? - Klimawandel und Globale Erwärmung, *Pharmazie in Unserer Zeit* 6 (2009), 492-498
- GABRIËLS M., PLAZIER-VERCAMMEN J., Experimental designed optimization and stability evaluation of dry suspensions with artemisinin derivatives for pediatric use, *International Journal of Pharmaceutics* 283 (2004), 19-34

- GILLES H. M., Management of severe and complicated malaria: A practical handbook; World Health Organization, Genf 1991
- GUT F., SCHIEK W., HAEFELI W. E., WALTER-SACK I., BURHENNE J., Cation exchange resins as pharmaceutical carriers for methylene blue: Binding and release, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 (2008), 582-587
- GUTTMANN P., EHRLICH P., Über die Wirkung des Methylenblau, *Berliner Klinische Wochenschrift* 39 (1891), 953-956
- HARRIS F., CHATFIELD L. K., PHOENIX D. A., Phenothiazinium based photosensitizers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications, *Current Drug Targets* 6 (2005), 615-627
- HEMPELMANN E., TESAROWICZ I., OLEKSYN B., Von Zwiebeln bis zum Artemisinin - Kurzgefasste Geschichte der Malaria-Chemotherapie, *Pharmazie in Unserer Zeit* 6 (2009), 500-507
- HOLZGRABE U., Neue Hoffnung auf eine Malaria-Impfung, *Pharmazie in Unserer Zeit* 6 (2009), 486-487
- KOK G., ASHTON T. D., SCAMMELS P. J., An improved process for the N-demethylation of opiate alkaloids using an iron(II) catalyst in acetate buffer, *Advanced Synthesis & Catalysis* 351 (2009) 283-286
- KOK G B., PYE C. C., SINGER R. D., SCAMMELS P. J., Two-Step Iron (0)-mediated N-demethylation of N-methyl-Alkaloids, *Journal of Organic Chemistry* 75 (2010), 4806-4811
- KRAUSE J., THOMMES M., BREITKREUTZ J., Immediate release pellets with lipid binders obtained by solvent-free cold extrusion, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71 (2009), 138-144
- KUMAR A., RAWLINGS R. D., BEAMAN D. C., The mystery ingredients: sweeteners, dyes, and preservatives in analgesic/antipyretic, antihistamine/decongestant, cough and cold, antidiarrheal, and liquid theophylline preparations, *Pediatrics* 91 (1993), 927-933
- KUNIN R., An introduction to ion exchange, *amber-hi-lites* 55 January (1960), 94-96

- KUNIN R., Applications of ion exchange part X-industrial applications (introductory remarks), *amber-hi-lites* 101 September (1967), 217-218
- KUNIN R., *Ion Exchange Resins*, Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, N. Y., USA (1972)
- LABANOWSKI J., MONNA F., BERMOND A., CAMBIER P., FERNANDEZ C., LAMY I., VAN OORT F., Kinetic extractions to assess mobilization of Zn, Pb, Cu, and Cd in a metal-contaminated soil: EDTA vs. citrate, *Environmental Pollution* 152 (2008) 693-701
- MALEKI A., NEMATOLLAHI D., An efficient electrochemical method for the synthesis of methylene blue, *Electrochemistry Communications* 11 (2009), 2261-2264
- MANDI G., WITTE S., MEISSNER P., COULIBALY B., MANSMANN U., RENGELSHAUSEN J., SCHIEK W., JAHN A., SANON M., WÜST K., WALTER-SACK I., MIKUS G., BURHENNE J., RIEDEL K-D., SCHIRMER H., KOUYATÉ B., MÜLLER O., Safety of the combination of chloroquine and methylene blue in healthy adult men with G6PD deficiency from rural Burkina Faso, *Tropical Medicine and International Health* 10 (2005), 32-38
- MCCAMLEY K., RIPPER J. A., SINGER R. D., SCAMMELLS P. J., Efficient N-demethylation of opiate alkaloids using a modified nonclassical Polonovski reaction, *Journal of Organic Chemistry* 68 (2003) 9847-9850
- MEHTA M., Drug therapy in congenital methaemoglobinaemia, *Anaesthesia and Intensive Care* 34 (2006), 828-829
- MEISSNER P. E., MANDI G., WITTE S., COULIBALY B., MANSMANN U., RENGELSHAUSEN J., SCHIEK W., JAHN A., SANON M., TAPSOBA T., WALTER-SACK I., MIKUS G., BURHENNE J., RIEDEL K. D., SCHIRMER H., KOUYATÉ B., MÜLLER O., Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young children of Burkina Faso, *Malaria Journal* 4 (2005), 45
- MEISSNER P. E., MANDI G., COULIBALY B., WITTE S., TAPSOBA T., MANSMANN U., RENGELSHAUSEN J., SCHIEK W., JAHN A., WALTER-SACK I., MIKUS G., BURHENNE J., RIEDEL K. D., SCHIRMER R. H., KOUYATÉ B., MÜLLER O., Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine, *Malaria Journal* 5 (2006), 84

MIGLYOL® 812 PRODUCT INFORMATION 26.13.035e/03.00, CONDEA Chemie GmbH, Witten, D

MOCKENHAUPT F. P., Bedeutung von Wirts-und Parasitenfaktoren für die Manifestationsformen der Infektion mit Plasmodium falciparum, Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin (2005)

MÜLLER O., MEISSNER P., SCHIRMER H., Methylenblau in der Malariatherapie-Eine Alternative für Afrika?, Flugmedizin, Tropenmedizin, Reisemedizin 14 (2007), 1, Tropenmedizin 33

NIKOVSKAYA G. N., UL'BERG Z. R., KOVAL' L. A., NADEL L. G., STRIZHAK N. P., Some colloidal and chemical aspects of biotransformation of heavy metal citrate complexes, Colloid Journal 64 (2002) 466-471

OZ M., LORKE D. E., PETROIANU G. A., Methylene blue and Alzheimer's disease, Biochemical Pharmacology 78 (2009), 927-932

PELGRIMS J., DE VOS F., VAN DEN BRANDE J., SCHRIJVERS D., PROVÉ A., VERMORKEN J. B., Methylene Blue in the treatment and prevention of ifosfamide-induced encephalopathy: report of 12 cases and a review of the literature, British Journal of Cancer 82 (2000), 291-294

PETER C., HONGWAN D., KÜPFER A., LAUTERBURG B. H., Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue, European Journal of Clinical Pharmacology 56 (2000), 247-250

PINA C. D., FALLETTA E. F., ROSSI M., Selective oxidation of tertiary amines on gold catalysts, Topics in Catalysis 44 (2007) 325-329

PISAL S., ZAINNUDDIN R., NALAWADE P., MAHADIK K., KADAM S., Molecular properties of ciprofloxacin-Indion® 234 complexes, American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech 5 (2006), Article 62

QUINA M. J., BORDADO J. C. M., QUINTA-FERREIRA R. M., Chemical stabilization of air pollution control residues from municipal solid waste incineration, Journal of Hazardous Materials 179 (2010) 382-392

- RENGELSHAUSEN J., BURHENNE J., FRÖHLICH M., TAYROUZ Y., SINGH S. K., RIEDEL K. D., MÜLLER O., HOPPE-TICHY T., HAEFELI W. E., MIKUS G., WALTER-SACK I., Pharmacokinetic interaction of chloroquine and methylene blue combination against malaria, *European Journal of Clinical Pharmacology* 60 (2004), 709-715
- ROLL BACK MALARIA PARTNERSHIP: MALARIA AND CHILDREN, Infosheet 6 (www.rollbackmalaria.org/cmc_upload/0/000/015/367/RBMInfosheet_6.htm)
- ROUSSELET G., CAPDEVIELLE P., MAUMY M., Copper-induced synthesis of iminiums: trimethylamine oxidation or amine N-oxide conversion, *Tetrahedron Letters* 36 (1995), 4999-5002
- SCHIRMER R.H., *Medikamente für die Armen*, *Spektrum der Wissenschaft* Dezember (2004), 110-113
- SCHIRMER R. H., COULIBALY B., STICH A., SCHEIWEIN M., MERKLE H., EUBEL J., BECKER K., BECHER H., MÜLLER O., ZICH T., SCHIEK W., KOUYATÉ B., Methylene blue as an antimalarial agent, *Redox Report* 8 (2003), 272-275
- SCHLITZER M., Wirk- und Resistenzmechanismen - Medizinische Chemie der Wirkstoffe gegen Malaria, *Pharmazie in Unserer Zeit* 6 (2009), 512-520
- SEGHATCHIAN J., WALKER W. H., REICHENBERG S., Updates on pathogen inactivation of plasma using Theraflex methylene blue system, *Transfusion and Apheresis Science* 38 (2008), 271-280
- SHARMA S., LEWIS S., Taste masking technologies: a review, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2 (2010), 6-13
- SHRIVER D. F., ATKINS P. W., LANGFORD C. H., *Anorganische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 1992
- SMITH R. E. T., Hepatitis C virus therapies, *Nature Reviews* 5 (2006), 715-716
- ŠUŠIĆ M., PETRANOVIĆ N., MIOČINOVIĆ B., Investigation of occluded and nonoccluded synthetic zeolites - Base-catalyzed demethylation of tetramethylthionine-methylene blue on a denitrated zeolite, *Journal of Inorganic Nuclear Chemistry* 34 (1972), 2349-2356

UNITED STATES PHARMACOPOEIA Monographie „Methylene Blue“, 28 (2005)

UROLENE BLUE[®] BEIPACKZETTEL, Hersteller Contract Pharmacal Corp., Hauppauge, NY, USA; Vertrieb Esprit Pharma, East Brunswick, NJ, USA

VENNERSTROM J. L., MAKLER M. T., ANGERHOFER C. K., WILLIAMS J. A., Antimalarial Dyes Revisited: Xanthenes, Azines, Oxazines, and Thiazines, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39 (1995), 2671-2677

VERORDNUNG (EC) NO. 1901/2006, Regulation on medicinal products for paediatric use, Official Journal of the European Union 49, L378, (2006), 1-19

WALES H., NELSON O. A., Adsorbed moisture and water of crystallization in certain common dyes, Journal of American Chemical Society 45 (1923), 1657-1666

WAINWRIGHT M., AMARAL L., Review: The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs, Tropical Medicine and International Health 10 (2005) 501-511

WALTER-SACK I., RENGELSHAUSEN J., OBERWITTLER H., BURHENNE J., MÜLLER O., MEISSNER P., MIKUS G., High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous formulation, European Journal of Clinical Pharmacology 65 (2009), 179-189

WARTH A., GOEPPERT B., BOPP C., SCHIRMACHER P., FLECHTENMACHER C., BURHENNE J., Turquoise to dark green organs at autopsy, Virchows Archiv 454 (2009), 341-344

WISCHIK C. M., MERVYN J., STOREY D., MARSHALL C., SINCLAIR J. P., BADDELEY T. C., Methods of synthesis and/or purification of diaminothiazinium compounds, US 2009/0259040 A1 (Jul. 10., 2007)

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO), Malaria Report (2009)

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO), 10 facts on children and medicines (2010a) (www.who.int/childmedicines/facts/en/index.htm)

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO), Malaria Treatment Guidelines (2010b)

- YANG S., HE H., WU D., CHEN D., MA Y., LI X., ZHU J., YUAN P., Degradation of methylene blue by heterogeneous fenton reaction using titanomagnetite at neutral pH values: process and affecting factors, *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48 (2009), 9915-9921
- YOGI C., KOJIMA K., WADA N., TOKUMOTO H., TAKAI T., MIZOGUCHI T., TAMIAKI H., Photocatalytic degradation of methylene blue by TiO₂ film and Au particles-TiO₂ composite film, *Thin Solid Films* 516 (2008), 5881-5884
- ZANETTI G., MARCHIORI E., GASPARETTO T. D., ESCUISSATO D. L., SOUZA JR. A. S., Lipoid pneumonia in children following aspiration of mineral oil used in the treatment of constipation: high resolution CT findings in 17 patients, *Pediatric Radiology* 37 (2007), 1135-1139
- ZHANG T., OYAMA T., AOSHIMA A., HIDAHA H., ZHAO J., SERPONE N., Photooxidative N-demethylation of methylene blue in aqueous TiO₂ dispersions under UV-irradiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology A - Chem* 140 (2001), 163-172
- ZOUNGRANA A., COULIBALY B., SIÉ A., WALTER-SACK I., MOCKENHAUPT F. P., KOUYATÉ B., SCHIRMER H., KLOSE C., MANSMANN U., MEISSNER P., MÜLLER O., Safety and efficacy of methylene blue combined with artesunate or amodiaquine for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso, *Public Library of Science One* 3 (2) (2008)

G Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz danke ich für die gemeinsame Suche nach Möglichkeiten der Stellenfinanzierung und die darauf folgende freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas, sowie die konstruktive Betreuung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Peter Kleinebudde danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut und die Übernahme des Koreferats.

Ich danke DSM Fine Chemicals, Linz, Österreich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Bei Dr. Jürgen Burhenne vom Institut für Klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie des Klinikums der Universität Heidelberg und Prof. Dr. med. Olaf Müller vom Institut für Public Health des Klinikums der Universität Heidelberg möchte ich mich bedanken für die Stiftung von Proben und Substanzen aus ihren Studien sowie für ihre konstruktive Hilfsbereitschaft.

Der Firma Pharbil in Waltrop, insbesondere Dr. Wolfgang Wiedey und Dr. Kathrin Bartscher danke ich für ihren Einsatz und ihr Entgegenkommen bei der Produktion der zwei GMP-Chargen, sowie für die Durchführung von rheologischen Messungen.

Karin Matthée danke ich für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dr. Markus Thommes danke ich für seine allgegenwärtige Hilfsbereitschaft und seinen unerschöpflichen Vorrat an hilfreichen Ideen und Vorschlägen.

Dr. Lutz Barnscheid danke ich für die geduldige Einweisung in die HPLC-Analytik, seine Hilfsbereitschaft bei allen möglichen Fragen und Problemen, für die Einlieferung in die Notaufnahme zusammen mit Carsten Bresges und die vielen lustigen Stunden in Balkonien auf U2, bevor ich selbst U2-Bewohner wurde.

Dr. Verena Garsuch und Eva Hoffmann möchte ich danken für die schöne gemeinsame Zeit im „Technikum Trocknen“ auf U2, ihr wart die besten Bürokollegen die man sich wünschen kann!

Weiterhin danke ich allen aktuellen und ehemaligen Angehörigen des Institutes für eine tolle Zeit.

Dr. Dejan Djuric danke ich für das Lesen der Arbeit, seine vielen hilfreichen Kommentare und Vorschläge sowie die Unterstützung während Düsseldorfer und Ludwigshafener Zeiten.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinem Mann Alex ganz herzlich danken für fachliche Diskussionen, das Lesen der Arbeit, die seelisch-moralische Unterstützung und den immerwährenden bedingungslosen Rückhalt.

H Selbsttätigkeitserklärung

Die hier vorgelegte Arbeit habe ich eigenständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die vorgelegte Dissertation wurde in der vorgelegten Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den _____

(Eva Schornick)