

## Untersuchungen von parenteralen Fettemulsionen mittels Asymmetrischer Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)

**Judith Kuntsche**

*Pharmazeutische Technologie, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, 06120 Halle/Saale*

### Zusammenfassung

Die genaue Kenntnis der Partikelgröße sowie der Partikelgrößenverteilung ist eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung von kolloidalen Arzneistoffträgersystemen. Mit Hilfe der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4) können auch komplexe und heterogene Formulierungen über einen breiten Partikelgrößenbereich (wenige nm bis hin zu etwa 1 µm) aufgetrennt werden. Ist das Fraktionierungssystem mit einem Mehrwinkel-Lichtstredetektor (multi-angle laser light scattering, MALLS) gekoppelt, kann die Partikelgrößenverteilung akkurat bestimmt werden, da der Größenbestimmung ein Fraktionierungsschritt vorausgeht.

In der vorliegenden Studie wurden drei kommerzielle parenterale Fettemulsionen (Lipofundin 20 N, Lipofundin MCT 20 und Lipidem) mit AF4/MALLS und konventionellen Lichtstreuverfahren (dynamische Lichtstreuung, Laserdiffraktometrie mit submikron Instrumentierung) analysiert. Die Ergebnisse, die mit den verschiedenen Methoden erhalten wurden, zeigen insgesamt eine gute Übereinstimmung, wobei jedoch mit der dynamischen Lichtstreuung kleinere mittlere Partikeldurchmesser erhalten wurden. Von den drei untersuchten Emulsionen weist Lipofundin N die größte mittlere Partikelgröße und die breiteste Verteilung auf. Die Unterschiede zwischen Lipofundin MCT und Lipidem waren im Gegensatz dazu nur gering, wurden jedoch auch von allen Methoden erfasst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die parenteralen Fettemulsionen mit hoher Reproduzierbarkeit mittels AF4/MALLS aufgetrennt und analysiert werden konnten. Die hohe Trennkapazität und Reproduzierbarkeit der Methode wurde in Messungen einer Mischung von Polystyren-Standard-Nanopartikeln (nominelle Durchmesser von 50, 100, 200, 300 und 500 nm) gezeigt. Die AF4 bietet des Weiteren die Möglichkeit, Probenfraktionen mit hoher Homogenität zu erhalten, die für weitere Untersuchungen eingesetzt werden können.

## 1. Einleitung

Kolloidale Trägersysteme wie zum Beispiel Mizellen, Nanopartikel und Liposomen werden intensiv als Trägersysteme für Arzneistoffe erforscht [1,2]. Mit einer Partikelgröße im nm-Bereich ermöglichen sie die Formulierung schwer wasserlöslicher Arzneistoffe in einem wässrigen Medium und somit auch eine intravenöse Applikation, die physiologische Verträglichkeit der Bestandteile vorausgesetzt. Erfolgt die Freisetzung des Arzneistoffs aus den Trägerpartikeln nach Applikation der Formulierung nur langsam, so wird – im Idealfall – die Verteilung des Arzneistoffs im Organismus durch das Trägersystem bestimmt. Dies eröffnet die Möglichkeit der passiven oder auch spezifischen Anreicherung von Arzneistoffen im erkrankten Gewebe (drug targeting), was die therapeutische Effizienz deutlich erhöht. Die passive Anreicherung von Nanopartikeln mit geeigneter Partikelgröße und Oberflächeneigenschaften in erkrankten Geweben (beispielsweise Tumoren) aufgrund einer gestörten Endothelstruktur ist in der Literatur gut dokumentiert [3]. Eine gezielte Anreicherung im Zielgewebe kann durch Kopplung von Strukturen, die spezifisch an Rezeptoren im Zielgewebe binden, an die Partikeloberfläche erreicht werden [4]. Für die Entwicklung solcher Trägersysteme ist eine genaue Kenntnis der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung, der Struktur der Nanopartikel, der Verteilung des Arzneistoffs in den Trägerpartikeln sowie dessen Freisetzungseigenschaften von entscheidender Bedeutung.

Formulierungen basierend auf physiologischen Lipiden (zum Beispiel Triglyceride, Lecithin) weisen Ähnlichkeit mit physiologischen Transportvehikeln für hydrophobe Stoffe (beispielsweise Lipoproteine) auf und erscheinen insbesondere im Hinblick auf ihre physiologische Verträglichkeit gegenüber anderen kolloidalen Trägersystemen wie zum Beispiel Polymer-Nanopartikeln von Vorteil. Parenterale Fettemulsionen werden seit langem für die parenterale Ernährung eingesetzt und können auch als Trägersysteme für lipophile Arzneistoffe dienen [5]. Um die Stabilität und insbesondere die Freisetzungseigenschaften eingearbeiteter Arzneistoffe zu verbessern, wurden verschiedene lipidbasierte kolloidale Formulierungen entwickelt und untersucht, beispielsweise feste Lipid-Nanopartikel (solid lipid nanoparticles, SLN [6]), nanostrukturierte Lipid-Carrier (nanostructured lipid carrier, NLC [7,8]) und unterkühlte smektische Lipid-Nanopartikel [9]. Diese Formulierungen sind häufig sehr heterogen und neben den Lipid-Nanopartikeln können andere kolloidale Strukturen (Vesikel, Mizellen), die aufgrund des Stabilisatorüberschusses gebildet werden, gefunden werden [10]. Auch die Lipid-Nanopartikel selbst können in unterschiedlichen Morphologien in derselben Formulierung vorhanden sein [9,10].

Die Feld-Fluss-Fraktionierung und insbesondere die Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung stellt eine sehr vielversprechende Methode für die Auftrennung und Analyse von solchen komplexen Systemen dar [11-13]. In der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung erfolgt die Auftrennung von Molekülen beziehungsweise Partikeln in Abhängigkeit von ihrer Größe (Größenbereich von ca. 10 kDa bis hin zu ca. 1 µm) durch einen Querfluss, der senkrecht zum

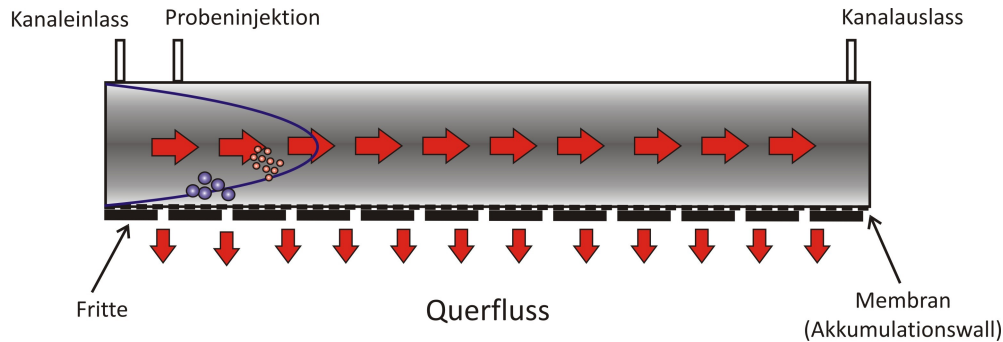


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Trennprinzips in einem AF4-Kanal. Unter gegebenen Querflussbedingungen akkumulieren kleinere Partikel in höherem Abstand von der Membran (Akkumulationswall) als größere und eluieren daher zuerst.

Fluss der Trägerflüssigkeit in einem Kanal mit definierter Geometrie angelegt wird. Unter gegebenen Querflussbedingungen befinden sich kleinere Partikel mehr in der Mitte des Kanals, da sie aufgrund ihrer höheren Brown'schen Diffusionsgeschwindigkeit im stärkeren Ausmaß dem Querfluss entgegen diffundieren können als größere Partikel, die stärker durch den angelegten Querfluss beeinflusst und näher an die Membran (Akkumulationswall) gedrückt werden. Aufgrund des parabolischen Flussprofils im Kanal nimmt die Fließgeschwindigkeit mit zunehmendem Abstand von der Membran zur Mitte des Kanals zu und kleinere Partikel eluieren daher vor den größeren (Abbildung 1). Bei der Auftrennung von Proben mit einer breiten Partikelgrößenverteilung kann ein Querflussgradient angelegt werden, um die Probe in einer angemessenen Zeit zu eluieren. Wird das Fraktionierungssystem mit einem Mehrwinkel-Lichtstreuungsdetektor gekoppelt, kann die Partikelgröße über die gesamte Elutionszeit der Probe bestimmt werden. Auf diese Weise können Partikelgrößenverteilungen auch von heterogenen Formulierungen akkurat ermittelt werden.

In der vorliegenden Studie wurden kommerziell erhältliche parenterale Fettemulsionen mit der AF4 insbesondere im Hinblick auf die Robustheit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens und als Basis für zukünftige Studien verschiedener lipidbasierter kolloidaler Formulierungen untersucht. Fettemulsionen für die parenterale Ernährung haben in der Regel eine recht breite Tropfengrößenverteilung [14,15] und sind auch aufgrund ihrer vergleichsweise homogenen Struktur (runde Emulsionstropfen) als Modellsysteme für die Methodenevaluierung sehr gut geeignet.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

Für die Untersuchungen wurden die kommerzielle Fettemulsionen Lipofundin 20 N (LF-N), Lipofundin MCT 20 (LF-MCT) und Lipidem der Firma B. Braun Melsungen verwendet. Die Emulsionen enthalten:

- 20 % unpolare Lipide (LF-N: 20 % Sojabohnenöl; LF-MCT: 10 % Sojabohnenöl und 10 % mittelkettige Triglyceride; Lipidem: 10 % mittelkettige Triglyceride, 8 % raffiniertes Sojabohnenöl und 2 % Omega-3-Fettsäuren),
- 1,2 % gereinigtes Eilecithin als Emulgator,
- 2,5 % Glycerol sowie
- $\alpha$ -Tocopherol, Natriumoleat und Wasser für Injektionszwecke.

Die Dispersionen von Polystyren-Standard-Nanopartikeln (1 % m/V) mit nominellen Durchmessern von 50, 100, 200 und 500 nm (Duke Scientific) wurden von DistriLab (Leuden) bezogen, die Nanopartikel mit einem Durchmesser von 300 nm von Beckman-Coulter.

### 2.2. Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung

Für die Untersuchungen wurde eine AF4 Anlage (Eclipse F, Wyatt, Dernbach) mit einem trapezförmigen Trennkanal (Länge 265 mm, größte Breite von 21 mm an der Injektionsstelle, Höhe 350  $\mu$ m [16]), der mit einer Membran aus regenerierter Cellulose (mittlere Porengröße 5 kDa, Microdyn-Nadir, Wiesbaden) ausgestattet war, eingesetzt. Die Intensitäten des an den Partikeln gestreuten Laserlichts wurden mit einem Mehrwinkel-Lichtstredetektor (DAWN EOS, Wyatt) in einem Messintervall von 1 s unter 15 verschiedenen Winkeln gemessen [16]. Doppelt destilliertes, konserviertes (0,02 % m/V Natriumazid) und filtrierte (Porengröße 0,1  $\mu$ m) Wasser wurde als Trägerflüssigkeit und zur Probenverdünnung verwendet.

Wenn nicht anders angegeben, wurden 100  $\mu$ l der 1:2000 (V/V) verdünnten Emulsionen im Fokus-Modus (Fokus-Fluss 2 ml/min) über 2 min mit ca. 0,2 ml/min injiziert und nach Beendigung der Injektion weiter für 1 min fokussiert. Die Proben wurden dann mit einem konstanten Detektorfluss von 1 ml/min und verschiedenen Querflussraten wie folgt eluiert:

- abnehmender Querfluss von 1,0 ml/min auf 0,3 ml/min innerhalb von 5 min,
- abnehmender Querfluss von 0,3 auf 0,05 ml/min innerhalb von 30 min,
- konstanter Querfluss von 0,05 ml/min für 10 min und
- abnehmender Querfluss von 0,05 ml/min auf 0 ml/min innerhalb von 10 min.

Die Elution wurde dann für weitere 10-15 min ohne Querfluss fortgesetzt, um das System zu spülen.

Polystyren-Standard-Nanopartikel mit nominellen Durchmessern von 50, 100, 200, 300 und 500 nm wurden in einem Verhältnis von 40:6:1:1:1 gemischt und zur Etablierung der Trennkapazität und im Rahmen der Methodenevaluierung verwendet.

Die Datenauswertung erfolgte mit der Astra-Software Version 4.90 (Wyatt) im Partikel-Modus unter Annahme von kompakten, sphärischen Partikeln [16]. Die primäre Größeninformation der statischen Lichtstreuung ist der so genannte Gyrationradius („root mean square radius“, RMS radius [16-18]). Für sphärische kompakte Partikel kann der geometrische Durchmesser nach folgender Formel berechnet werden [17]:

$$d_{geom} = 2 \cdot \sqrt{\frac{5}{3}} \cdot RMS$$

Der massengewichtete mittlere Durchmesser wurde aus dem massengewichteten RMS Radius (bestimmt über den gesamten Probenpeak) berechnet. Die charakteristischen Durchmesser D10, D50 (Median) und D90 wurden aus der massengewichteten kumulativen Partikelgrößenverteilung ermittelt.

### **2.3. Laserdiffraktometrie mit submikron Ausstattung**

Die Messungen erfolgten mit einem Mastersizer 2000 (Malvern, Herrenberg) mit einer automatischen Dispergiereinheit (Hydro 2000 S, Malvern) in gereinigtem Wasser bei Raumtemperatur [16]. Für jede Messung wurden 5 Einzelmessungen über 10 s durchgeführt und die Einzelergebnisse gemittelt. Alle Messungen wurden bei einer Laserabschwächung von ca. 5 % (entsprechend einer Abschwächung des blauen Lichts von ca. 10-12 %) durchgeführt. Die volumengewichteten Partikelgrößenverteilungen wurden mit Hilfe der Mie-Theorie (Brechungsindices der Emulsionspartikel, der Polystyren-Nanopartikel und des Dispersionsmediums Wasser von 1,45; 1,59 bzw. 1,33; Absorption 0,01) berechnet. Gegebene Mittelwerte beziehen sich auf voneinander unabhängige Messungen der Proben.

### **2.4. Dynamische Lichtstreuung (DLS)**

Die Proben wurden nach geeigneter Verdünnung mit gereinigtem und filtriertem (Porengröße 0,22 µm) Wasser bei 25 °C mit einem HPPS Gerät (Malvern) in Rückstreuung (173 °) gemessen [16]. Für jede Probenpräparation wurden 5 Einzelmessungen mit 10-14 Durchgängen über jeweils 10 s durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser (Z-average) and Polydispersitätsindices (PDI) wurden mit Hilfe der Kumulantenanalyse errechnet. Angegebene Mittelwerte beziehen sich auf voneinander unabhängige Messungen der Proben.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Analytische AF4

Die Probenfraktionierung sowie Bestimmung der Partikelgrößen mittels AF4/MALLS soll zunächst anhand der Messungen der Mischung der Polystyren-Standard-Nanopartikel (Abbildung 2) erläutert werden:

Der erste Schritt einer AF4 Analyse ist die Injektion und Fokussierung der Probe. Im Fokus-Modus strömt die Trägerflüssigkeit von beiden Enden in den Kanal ein und verlässt ihn ausschließlich über die Membran (Querfluss). Der Einstrom der Trägerflüssigkeit ist so geregelt, dass die Probe zu einer mehr weniger schmalen Bande hinter der Injektionsstelle fokussiert wird. Ein Teil der Trägerflüssigkeit wird direkt in den Detektor geleitet, also ohne den Kanal zu passieren. Während der Fokussierung akkumulieren die Partikel in Abhängigkeit vom angelegten Querfluss und entsprechend ihrer Größe in definierten Abständen über der Membran (Akkumulationswall), wobei größere Partikel stärker durch den angelegten Querfluss beeinflusst und näher an die Membran gedrückt werden (Abbildung 1 [11-13]). Direkt nach Umschalten in den Elutions-Modus wird charakteristischerweise der so genannte „Void“-Peak beobachtet, bevor die Partikel entsprechend

ihrer Größe – beginnend mit den kleineren Partikel, die sich mehr in der Kanalmitte befinden – aus dem Kanal eluiert werden (Abbildung 2 oben). Obwohl keine Basislinientrennung der einzelnen Partikelfractionen unter den verwendeten Querflussbedingungen erzielt wurde, sind die einzelnen monomodalen Fraktionen deutlich anhand der Stufen in den errechneten Partikeldurchmessern über die Elutionszeit der Probe zu erkennen. Mit Ausnahme der 500-nm-Partikel wurden die Durchmesser der einzelnen Nanopartikel-Fractionen akkurat bestimmt (Tabelle 1). Der größere errechnete Durchmesser für die 500-nm-Partikel ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der Rayleigh-Gans-Debye Näherung für die Partikelgrößenberechnung hier nicht mehr vollständig erfüllt sind [16,18]. Ist die Struktur der Partikel bekannt

(hier: kompakte Kugeln), kann aus den zu jeder Elutionszeit berechneten Partikelgrößen sowie den

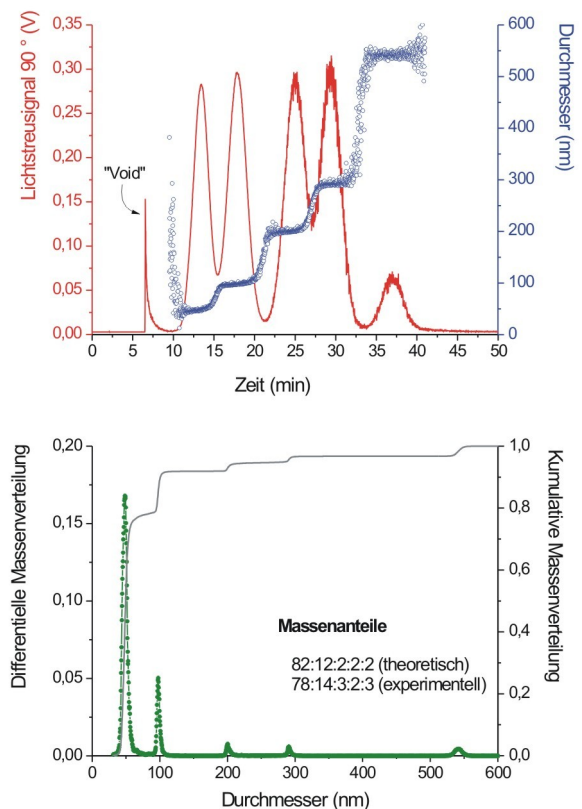


Abbildung 2: Elutionsprofil (oben) und berechnete Partikelgrößenverteilung (unten) einer Mischung von Polystyren-Standard-Nanopartikeln.

gemessenen Intensitäten des gestreuten Lichts die Partikelgrößenverteilung berechnet werden (Abbildung 2, unten [16,18]). Auch auf diese Weise konnten – mit Ausnahme der 500-nm-Partikel aus dem oben genannten Grund – die Durchmesser der einzelnen Nanopartikel-Fractionen akkurat bestimmt werden. Erwähnenswert ist auch die gute Übereinstimmung der experimentell aus der kumulativen Verteilung bestimmten Massenanteile mit den theoretischen Massenanteilen der Nanopartikel in der Mischung (Abbildung 2 unten).

Nomineller Durchmesser (nm)	AF4/MALLS		Dynamische Lichtstreuung		
	Mean (nm)	n	Z-average (nm)	PDI	n
50	49,9 ± 1,0	3	50,2 ± 0,4	0,02 ± 0,01	2
100	99,3 ± 0,7	3	101,9 ± 1,0	0,02 ± 0,01	2
200	201,8 ± 1,0	3	202,5 ± 0,7	0,03 ± 0,01	2
300	293,7 ± 2,5	3	290,4 ± 1,0	0,03 ± 0,01	2
500	541,9 ± 0,2	3	494 ± 1 (Mean Mastersizer)		3

Tabelle 1: Partikelgrößen der Polystyren-Standard-Nanopartikel bestimmt mittels AF4/MALLS und mittels Dynamischer Lichtstreuung bzw. dem Mastersizer 2000 für die einzelnen Standards.

Die Elutionsprofile der parenteralen Fett-emulsionen sowie deren Partikelgrößenverteilungen sind in Abbildung 3 gezeigt. Für alle drei Emulsionen wurde eine Fraktion von Emulsionstropfen mit Durchmessern > 500 nm detektiert (Elutionszeit > 35 min, Abbildung 3 oben). Diese Fraktion war insbesondere in Lipofundin N deutlich ausgeprägt. Erwartungsgemäß unterschied sich das Elutionsverhalten der Emulsionen generell nicht voneinander, das heißt, die zu den jeweiligen Elutionszeiten ermittelten Tropfendurchmesser waren für alle drei Emulsionen gleich (siehe übereinander liegende Durchmesser der drei Emulsionen über die gesamte Elutionszeit in Abbildung 3 oben).

Aufgrund der oben erwähnten Limitierung der Anwendbarkeit der Rayleigh-Gans-Debye Näherung für die Bestimmung von größeren Partikeln, muss auch für die Emulsionen von einer gewissen Überschätzung der Größe der

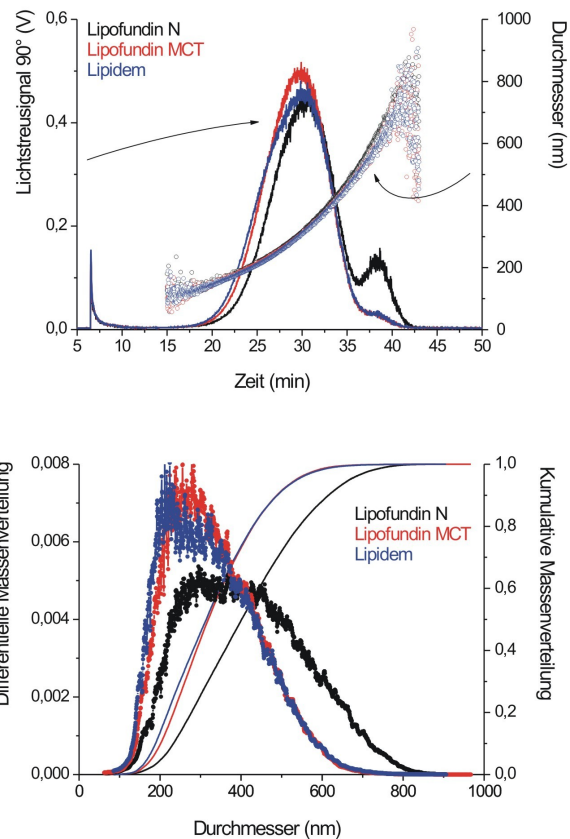


Abbildung 3: Elutionsprofile (oben) und berechnete Partikelgrößenverteilungen (unten) der parenteralen Fett-emulsionen.

Tropfenfraktion mit Durchmessern > 500 nm ausgegangen werden, allerdings im Vergleich zu den Polystyren-Nanopartikeln (Brechungsindex 1,59) in einem geringeren Ausmaß aufgrund des kleineren Brechungsindex der Emulsionstropfen (Brechungsindex 1,45 [16,18]).

	D10 (nm)	Median (nm)	Mean (nm)	D90 (nm)
<i>Mastersizer 2000 (n = 3)</i>				
LF-N	223 ± 3	371 ± 4	397 ± 4	610 ± 3
LF-MCT	192 ± 1	309 ± 1	329 ± 1	492 ± 1
Lipidem	182 ± 5	302 ± 2	234 ± 1	497 ± 7
<i>AF4/MALLS (n = 6)</i>				
LF-N	233 ± 1	402 ± 0	423 ± 7	617 ± 2
LF-MCT	203 ± 1	320 ± 0	399 ± 8	490 ± 2
Lipidem	189 ± 1	314 ± 1	397 ± 7	489 ± 2

Tabelle 2: Charakteristische Partikelgrößen der parenteralen Fettemulsionen, die mittels Mastersizer 2000 und AF4/MALLS bestimmt wurden.

Zum Vergleich wurden die Partikelgrößen auch mit konventionellen Methoden bestimmt. Während die Ergebnisse der AF4/MALLS Messungen mit denen des Mastersizers in guter Übereinstimmung waren (Tabelle 2), wurden mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung geringere mittlere hydrodynamische Durchmesser erhalten. Für Lipofundin N, Lipofundin MCT und Lipidem wurden Z-average Durchmesser von  $311 \pm 3$ ;  $256 \pm 3$  und  $250 \pm 6$  nm mit Polydispersitätsindices von  $0,18 \pm 0,02$ ;  $0,12 \pm 0,01$  und  $0,13 \pm 0,01$  erhalten (n = 3). Alle drei Methoden weisen jedoch auf eine größere mittlere Partikelgröße in Lipofundin N hin, was in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten ist [14,15]. Auch der vergleichsweise geringe Unterschied in den Partikelgrößen zwischen Lipofundin MCT und Lipidem wurde mit allen drei Methoden detektiert (Tabelle 2).

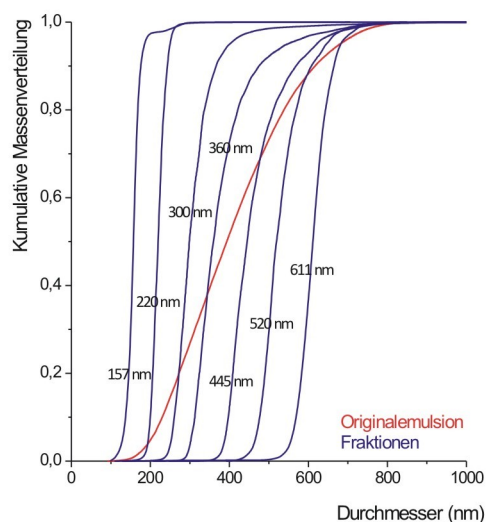


Abbildung 4: Kumulative Partikelgrößenverteilungen (AF4/MALLS) von Lipofundin N (rote Kurve) sowie ausgewählter Fraktionen, die während der Fraktionierung der Originalemulsion aufgefangen wurden (blaue Kurven zusammen mit den D50-Durchmessern). Zur Sammlung der Fraktionen wurde die Originalemulsion in einer Verdünnung von 1:200 unter folgenden Bedingungen vermessen: abnehmender Querfluss von 1,0 auf 0,25 ml/min innerhalb von 5 min, konstanter Querfluss von 0,25 ml/min für 32 min, abnehmender Querfluss von 0,25 auf 0,05 ml/min innerhalb von 5 min und abnehmender Querfluss von 0,05 auf 0 ml/min innerhalb von 5 min.

### 3.2. Präparative AF4

Neben der akkuraten Bestimmung der Partikelgrößenverteilung (analytische AF4) erscheint die Feld-Fluss-Fraktionierung auch für präparative Zwecke interessant, da Probenfraktionen mit hoher



Homogenität und mit definierter Partikelgröße beziehungsweise Partikelgrößenverteilung erhalten werden können. Lipofundin N wurde mittels AF4 aufgetrennt und über die gesamte Elutionszeit der Emulsion wurden die Fraktionen der eluierenden Probe aufgefangen (Intervall 1 min). Ausgewählte Fraktionen wurden dann erneut mittels AF4/MALLS vermessen (Abbildung 4). Die Ergebnisse zeigen deutlich die Homogenität der einzelnen Fraktionen (starker Anstieg der kumulativen Größenverteilung, blaue Kurven) über den gesamten Größenbereich der Originalemulsion (rote Kurve).

### 3.3. Methodenoptimierung

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden verschiedene Bedingungen der Probenfokussierung untersucht. Unter den Standardbedingungen (Fokussierung für insgesamt 3 min) wurde immer ein vergleichsweise großes „Void“-Signal beobachtet (Abbildungen 2, 3 und 5 links). Des Weiteren deutet ein kleines Signal nach Beendigung der Elution und erneutem Öffnen der Injektionsleitung (Abbildung 5 links) auf einen geringfügigen Probenrückstand im Injektionssystem hin. Durch Verlängerung der Probenfokussierung (Fokussierung für insgesamt 7 min) konnte das „Void“-Signal deutlich verringert werden (Abbildung 5 Mitte). Nach erneutem Öffnen der Injektionsleitung während der Fokussierung (Gesamtfokussierungszeit 6 min) war auch das Signal nach erneutem Öffnen der Injektionsleitung nach Beendigung der Elution kaum noch sichtbar (Abbildung 5 rechts). Obwohl kein Einfluss der Fokussierungsbedingungen auf die errechnete Partikelgrößenverteilung gefunden wurde, erscheint eine ausreichend lange Fokussierung als auch ein Spülen der Injektionsleitung insbesondere im Hinblick auf quantitative Messungen notwendig.

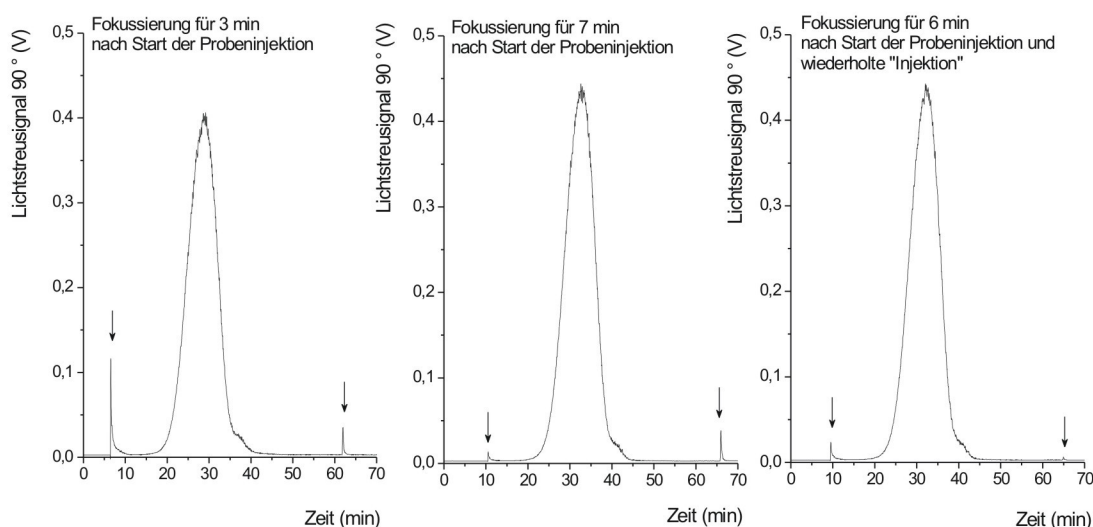


Abbildung 5: Einfluss der Fokussierungsbedingungen auf das Elutionsprofil von Lipofundin N.  
 Links: Probeninjektion über 2 min und weitere Fokussierung für 1 min (Standardbedingungen).  
 Mitte: Probeninjektion über 2 min und weitere Fokussierung für 5 min.  
 Rechts: Probeninjektion über 2 min und weitere Fokussierung über 4 min. Hierbei wurde die Injektionsleitung erneut für 2 min geöffnet.

#### 4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen deutlich die gute Trennkapazität der AF4 als auch die Möglichkeit der akkuraten Bestimmung von Partikelgrößenverteilungen, wenn das Trennsystem mit einem Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor gekoppelt ist. Dies wurde insbesondere bei der Analyse der Mischung von Polystyren-Standard-Nanopartikeln deutlich, wobei auch das Massenverhältnis der Nanopartikel mit guter Genauigkeit aus der kumulativen massengewichteten Partikelgrößenverteilung bestimmt werden konnte. Alle AF4 Messungen waren sehr gut reproduzierbar und es wurden keine deutlichen Membraneffekte (zum Beispiel Probenverluste durch Adsorption von Partikeln an der Membran) beobachtet. Eine weitere interessante Möglichkeit ergibt sich aus der Gewinnung von homogenen Fraktionen von komplexen Formulierungen, die dann weiter im Detail in Hinblick auf die Partikelmorphologie beziehungsweise ihrer chemischen Zusammensetzung untersucht werden können.

#### Danksagung

Ich danke der Firma B. Braun Melsungen für die Bereitstellung der parenteralen Fettemulsionen und Katrin Klaus für ihre Mitarbeit an diesem Projekt im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

#### Literatur

- [1] T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* 303 (2004) 1818-1822.
- [2] P. Couvreur, C. Vauthier, Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 23 (2006) 1417-1450.
- [3] H. Maeda, G.Y. Bharate, J. Daruwalla, Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 409-419.
- [4] J.D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug. Del. Rev.* 60 (2008) 1615-1626.
- [5] H. Bunjes, Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 62 (2010) 1637-1645.
- [6] J. Kuntsche, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles (SLN) for drug delivery. In: V. Torchilin, M.M. Amiji (Eds.), *Handbook of Materials for Nanomedicine*, Pan Stanford Publ., Singapore, 2011, pp. 383-443.
- [7] R.H. Müller, M. Radke, S.A. Wissing, Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 242 (2000) 121-128.
- [8] K. Jores, W. Mehnert, M. Drechsler, H. Bunjes, C. Johann, K. Mäder, Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J. Control. Rel.* 95 (2004) 217-227.
- [9] J. Kuntsche, K. Westesen, M. Drechsler, M.H.J. Koch, H. Bunjes, Supercooled smectic nanoparticles: A potential novel carrier system for poorly water soluble drugs. *Pharm. Res.* 21 (2004) 1834-1843.

- [10] J. Kuntsche, M.H.J. Koch, F. Steiniger, H. Bunjes, Influence of stabilizer systems on the properties and phase behavior of supercooled smectic nanoparticles. *J. Colloid Interf. Sci.* 350 (2010) 229-239.
- [11] W. Fraunhofer, G. Winter, The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 369-383.
- [12] G. Yohannes, M. Jussila, K. Haronen, M.L. Riekkola, Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. *J. Chromatogr. A*, in press (doi: 10.1016/j.Chroma.2010.12.110).
- [13] T. Otte, T. Klein, E. Moldenhauer, Feldflussfraktionierung – ein universelles Trennprinzip zur Charakterisierung von Makromolekülen und Partikeln. *Analytik News Flash*, Fachbeitrag 2010, [www.analytik-news.de](http://www.analytik-news.de).
- [14] R.H. Müller, S. Heinemann, Fat emulsions for parenteral nutrition II: Characterisation and physical long-term stability of Lipofundin MCT/LCT. *Clin. Nutr.* 12 (1993) 298-309.
- [15] S. Levin, E. Klausner, Measurements of size distribution and density of a pharmaceutical fat emulsion, using field-programmed sedimentation field-flow fractionation (SdFFF). *Pharm. Res.* 12 (1995) 1218-1224.
- [16] J. Kuntsche, K. Klaus, F. Steiniger, Size determinations of colloidal fat emulsions: A comparative study. *J. Biomed. Nanotechnol.* 5 (2009) 384-395.
- [17] O. Stauch, R. Schubert, G. Savin, W. Burchard, Structure of artificial cytoskeleton containing liposomes in aqueous solution studied by static and dynamic light scattering. *Biomacromol.* 3 (2002) 565-578.
- [18] P.J. Wyatt, Submicrometer particle sizing by multiangle light scattering following fractionation. *J. Colloid Interf. Sci.* 197 (1998) 9-20.