



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Optimierung des Herstellungsprozesses einer innovativen
Arzneimittelformulierung aus acetyliertem Inulin und
5-Aminosalicylsäure“

verfasst von / submitted by

Lisa Maria Granig BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2022 / Vienna 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Kurzfassung

Der humane Gastrointestinaltrakt (GIT) hat neben wichtigen Versorgungsfunktionen nicht zuletzt auch die Aufgabe, den menschlichen Organismus vor pathogenen Erregern und Toxinen zu schützen. Die kommensale Darmflora bietet einerseits eine gewisse Schutzfunktion der Darmschleimhaut und beeinflusst andererseits auch das darmassoziierte Immunsystem. Geraten diese Faktoren aus dem Gleichgewicht, sind oft eine Reihe von Erkrankungen, so auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, die Folge. Die konkrete Pathogenese für CED ist bislang ungeklärt. Die antiphlogistische remissionsinduzierende Therapie von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn erfolgt durch die orale Gabe von Glucocorticoiden, Acetylsalicylaten und Immuntherapeutika. Durch die Verwendung von Pro- und Präbiotika kann eine Remissionserhaltung erzielt werden. Eine Behandlung mit Acetylsalicylaten – allen voran 5-Acetylsalicylsäure (Mesalazin^{INN}) – ist derzeit nur in sehr hohen Dosen (bis zu 4 g/d) möglich.

Eine Kombination des Wirkstoffes 5-Acetylsalicylsäure mit dem Präbiotikum Inulin als Trägermaterial bietet sich an, um neben einer gesteuerten Wirkstofffreisetzung sowohl einen antiphlogistischen Effekt als auch einen positiven Nutzen für die gestörte Darmflora zu erzielen. Aufgrund des hohen hydrophilen Charakters und der dadurch frühzeitigen unerwünschten Wirkstoffabgabe im Magensaft kann eine chemische Modifikation von Inulin in Form einer Acetylierung durchgeführt werden. Mit einer einfachen Methode können schließlich Pellets hergestellt und ihre Wirkstofffreisetzung in vitro untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Herstellung von Pellets durch bereits bekannte Arbeitsschritte weiter zu vereinfachen. Anstelle von Dimethylsulfoxid (DMSO) soll der Nutzen weiterer Lösungsmittel ermittelt werden. Die unterschiedlich hergestellten wirkstoff-haltigen Pellets sollen außerdem in Bezug auf ihre Beladungskapazität und ihr Freisetzungsvermögen in künstlichen Magen-Darm-Medien untersucht und miteinander verglichen werden.

Die zielgerichtete Freisetzung des Wirkstoffs erhöht die Effektivität der Therapie und verringert gleichzeitig das Risiko für mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Der gleichzeitige Einsatz eines Präbiotikums stellt einen weiteren Angriffspunkt für die Eindämmung der CED dar. Eine Vereinfachung der Herstellung von wirkstoffbeladenen Pellets mit ungefährlichen Lösungsmitteln hat nicht nur Vorteile für die großtechnische Produktion, sondern ist auch wesentlich kostengünstiger und umweltschonender.

Abstract

In addition to important supply functions, the human gastrointestinal tract (GIT) has also the assignment for protecting the human organism from pathogens and toxins. On the one hand, the commensal intestinal flora provides a certain protective function of the intestinal mucosa and, on the other hand, it also influences the intestine-associated immune system. If these factors are out of balance, several diseases can result, including chronic inflammatory bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis and Crohn's disease. The specific pathogenesis for IBD is still unclear. Antiphlogistic remission-inducing therapy for ulcerative colitis and Crohn's disease is achieved by oral administration of glucocorticoids, acetylsalicylates and immunotherapeutics. Remission maintenance can be achieved by use of pro- and prebiotics. Treatment with acetylsalicylates - especially 5-acetylsalicylic acid (Mesalazine^{INN}) - is currently only applied in very high doses (up to 4 g/d).

A combination of the active ingredient 5-acetylsalicylic acid and the prebiotic inulin as a carrier material is an option to combine both, an antiphlogistic effect and a positive benefit for the disturbed intestinal flora in addition to a controlled release of the active ingredient. Due to the high hydrophilic character and the resulting unwanted early release of the active ingredient in gastric juice, inulin can be chemically modified by acetylation. Applying a simple method, pellets can finally be produced, and their active agent-release tested in vitro.

The aim of this work is to further simplify the production process of pellets using already known steps. Instead of dimethyl sulphoxide (DMSO) the usefulness of other solvents is to be estimated. The pellets containing the active ingredient, which are produced in different ways, will also be tested in terms of their loading capacity and release capacity in artificial gastrointestinal media and compared with each other.

The targeted release of the active ingredient increases the effectiveness of the therapy and at the same time reduces the risk of possible adverse drug reactions. The simultaneous use of a prebiotic represents another target for the containment of IBD. Simplifying the production of drug-loaded pellets with non-hazardous solvents not only offers advantages for large-scale production but is also much more cost-effective and environmentally friendly.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die ausgezeichnete Betreuung meiner Masterarbeit, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie die stets anregenden und äußerst interessanten Gespräche auch außerhalb der Forschungsarbeit danken.

Mein Dank gilt auch dem Studienprogrammleiter ao. Univ.-Prof. Mag. Pharm. Dr. Michael Wirth, der mich vor allem gegen Studienende immer wieder mit ermutigenden Worten und positiven Ratschlägen unterstützt und neu motiviert hat.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Dr. Barbara Hufnagel, MSc bedanken. Ihre Geduld, der rege fachliche Austausch und das große Vertrauen in mich und mein selbstständiges Arbeiten, haben mich beim Vorankommen in dieser Arbeit entscheidend unterstützt.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern Anita und Franz, die mir diesen Lebensweg ermöglicht und mir im Studium von Anfang an immer zur Seite gestanden haben - vor allem für ihre psychische, aber auch finanzielle Unterstützung und ihre Bereitschaft sich stets auf intensive fachliche Diskussionen einzulassen. Danken möchte ich in diesem Sinne auch meinem Bruder Martin, der mich ebenfalls zu jedem Zeitpunkt unterstützt hat.

Mein abschließender Dank gilt meinem Freund Andreas, der mir mit konstruktiver Kritik und ermutigenden Worten immer wieder die Zuversicht gegeben hat auch in schwierigen Phasen des Studiums nicht aufzugeben und meine Ziele konsequent weiterzuverfolgen.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
5-ASA	5-Acetylsalicylsäure
Ac.St.	Acetylierungsstufe
ATR-FT-IR	Abgeschwächte-Totalreflektions-Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrophotometrie
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
cm ⁻¹	Wellenzahl
d	(pro) Tag
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Degree of Polymerisation; Polymerisationsgrad
EA	Essigsäureanhydrid
EE	Encapsulation Efficiency; Verkapselungseffizienz
ENS	enterisches Nervensystem
EtOH	Ethanol
EuAB	Europäisches Arzneibuch
GIT	Gastrointestinaltrakt
HCl	Salzsäure
IL	Interleukin
InAc	Acetyliertes Inulin
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LC	Loading Capacity; Beladungskapazität
LC _{max}	maximal Loading Capacity; maximale Beladungskapazität

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase; MAP-Kinase
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear Faktor κ B
nm	Nanometer
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter Rezeptor gamma
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor; Muster-Erkennungs-Rezeptor
SEC	Size Exclusion Chromatography; Größenausschlusschromatographie
TH-17	T-Helferzellen-17
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
U	Unit; Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Ziel der Arbeit	10
1.2	Wissenschaftliche Fragestellung	10
2	Allgemeiner Teil	11
2.1	Der Gastrointestinaltrakt und das Mikrobiom	11
2.1.1	Anatomie und Physiologie des Darms	12
2.1.2	Die Darmflora	14
2.1.3	Pathophysiologie des Darms	14
2.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	15
2.2.1	Morbus Crohn	16
2.2.2	Colitis ulcerosa	16
2.2.3	Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	17
2.2.4	Die Bedeutung von Aminosalicylaten in der Therapie von CED	18
2.3	Inulin	19
2.3.1	Die Verwendung von Inulin als Präbiotikum	20
2.4	Pharmazeutische Technologie: Drug Delivery	21
2.4.1	Inulin als Trägersubstanz	21
2.4.2	Der Vorteil von Mikropartikeln für Colon-Drug Delivery	21
3	Materialien und Methoden	23
3.1	Herstellung und Charakterisierung von acetyliertem Inulin	23
3.1.1	ATR-FT-IR (Abgeschwächte-Totalreflektions-Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie von acetyliertem und nativen Inulin	24
3.1.2	Schmelzpunktbestimmung von acetyliertem und nativen Inulin	24
3.2	Herstellung von wirkstoffbeladenen Pellets mit acetyliertem Inulin	25
3.2.1	Optimierung der Herstellung von Pellets mit InAc	26
3.2.2	Herstellung von wirkstoffbeladenen Pellets mit Ethanol als Lösungsmittel	27
3.3	Bestimmung des Wirkstoffgehalts der InAc Pellets	27
3.4	Freisetzung von 5-ASA aus InAc-Pellets in künstlichem Magen-Darmsaft	29
3.4.1	Herstellung der Freisetzungsmedien	29
3.4.2	Durchführung des in vitro Freisetzungsversuchs	31

3.4.3	Gehaltsbestimmung von 5-ASA in künstlichem Magen-Darmsaft	31
4	Ergebnisse und Diskussion.....	33
4.1	Herstellung und Charakterisierung von acetyliertem Inulin	33
4.1.1	Acetylierungsgrad und Ausbeute	33
4.1.2	Interpretation der ATR-FT-IR-Spektren	35
4.1.3	Schmelzpunktbestimmung von nativem und acetyliertem Inulin.....	36
4.2	Herstellung von wirkstoffbeladenen Pellets.....	37
4.2.1	Pelletherstellung mit EtOH	37
4.2.2	5-ASA-Gehalt der mit EtOH und DMSO hergestellten Pellets	38
4.3	Freisetzung von 5-ASA aus den Pellets.....	39
4.3.1	Auswirkung von Inulinase auf den Freisetzungsversuch	41
5	Schlussfolgerungen.....	43
	Literaturverzeichnis	45
	Abbildungsverzeichnis	47
	Tabellenverzeichnis	48

1 Einleitung

Für eine zielgerichtete Wirkstofffreisetzung im Bereich des Darms werden aus dem Arzneistoff 5-Aminosalicylsäure und dem Präbiotikum Inulin wirkstoffbeladene Pellets hergestellt. Das Inulin wird zunächst chemisch modifiziert (acetyliert), um die Wasserlöslichkeit herabzusetzen und eine damit einhergehende frühzeitige Wirkstoffabgabe im Magen zu vermeiden.

1.1 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Pelletherstellung unter Verwendung weiterer Lösungsmittel zu optimieren. Die herkömmlich und neu produzierten Pellets werden anschließend sowohl anhand ihrer Beladungskapazität als auch der Wirkstoff-Freisetzung in vitro in simulierten Magen-Darm-Medien charakterisiert und verglichen.

1.2 Wissenschaftliche Fragestellung

- Durch welche Lösungsmittel kann DMSO bei der Pelletherstellung ersetzt werden und inwiefern müssen bereits bekannte Arbeitsschritte angepasst werden?
- Welchen Einfluss haben eine hohe und eine geringe Acetylierungsstufe auf die Herstellung von wirkstoffbeladenden Pellets mit unterschiedlichen Lösungsmitteln?
- Welche Unterschiede geben sich bei der in vitro Freisetzung zwischen Pellets aus unterschiedlichen Inulinen und deren Herstellungsarten?
- Treten Unterschiede in der in vitro-Wirkstoff-Freisetzung in Anwesenheit des bakteriellen Enzyms Inulinase auf?

2 Allgemeiner Teil

2.1 Der Gastrointestinaltrakt und das Mikrobiom

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) zählt zu den wichtigsten Organsystemen des Menschen. Zu seinen Aufgabengebieten zählen die Energieaufnahme, Aufspaltung und Absorption von lebensnotwendigen Nährstoffen sowie die Entsorgung von Abfallstoffen. Der GIT besitzt ein eigenes Nervensystem, das enterische Nervensystem (ENS), welches ein motorisches und sekretorisches Zusammenspiel von Magen und Darm ermöglicht. Indem der Magen-Darm-Trakt pathogene Fremdstoffe abwehrt und unschädlich macht, trägt er ebenfalls seinen Teil zum Immunsystem bei. Im Darmtrakt ist das Mikrobiom angesiedelt, welches sowohl Einfluss auf die Spaltung und Aufnahme von Nahrungsbestandteilen als auch auf die Besiedelung des Kolons mit pathogenen Erregern hat (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015). *Abbildung 1* zeigt eine einfache Übersicht des Verdauungstraktes.

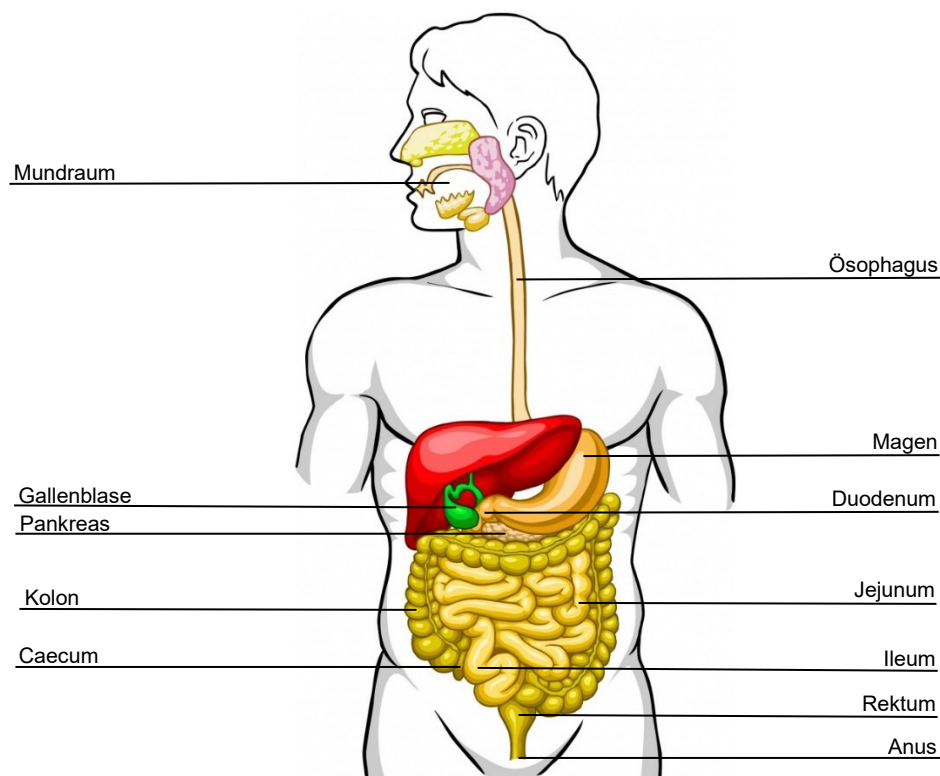


Abbildung 1: Einfache Übersicht über den Gastrointestinaltrakt (Dreamstime 2022)

2.1.1 Anatomie und Physiologie des Darms

Der Darm macht den unteren Teil des GIT aus und lässt sich grob in den Dünndarm und den Dickdarm einteilen. Der Dünndarm besteht wiederum aus drei Abschnitten: dem Duodenum (Zwölffingerdarm), dem Jejunum (Leerdarm) und dem Ileum (Krummdarm) (*Abbildung 1*) (Schmidt, Lang und Heckmann 2010). Die Schleimhaut des Dünndarms hat eine spezielle Struktur, mit der eine starke Oberflächenvergrößerung einhergeht. Diese Vergrößerung ist in erster Linie auf das Vorkommen von zirkulären Schleimhautfalten (sog. Ring- oder Kerckringfalten) zurückzuführen, auf denen sich wiederum ca. 1 mm hohe, fingerförmige Zotten befinden, die nochmals für eine Oberflächenzunahme sorgen. Dieses Zottenepithel besteht primär aus Enterozyten (sog. Saumzellen), zwischen denen vereinzelt Becherzellen, welche Schleim produzieren, zu finden sind. Luminal tragen die Enterozyten die sogenannten Mikrovilli, dicht nebeneinanderstehende Fortsätze, die für eine weitere Vergrößerung der Darmoberfläche maßgebend sind. Durch diese speziellen morphologischen Strukturen ist die lumenbegrenzende Oberfläche um das sechshundertfache vergrößert und ergibt für den Dünndarm eine Fläche von ca. 200 m² (*Abbildung 2*) (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015).

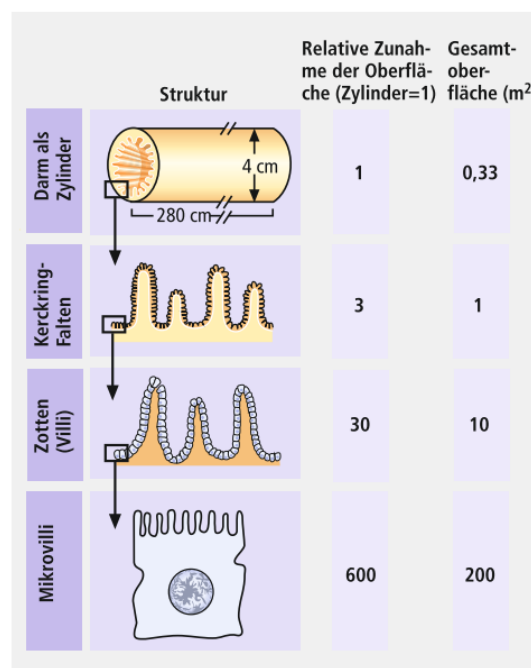


Abbildung 2: Morphologie und Vergrößerung der Schleimhautoberfläche des Dünndarms (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015).

Direkt unter der Epithelzellschicht befindet sich ein engmaschiges Kapillarnetz, welches die Zotten versorgt und insbesondere der Aufnahme von absorbierten Stoffen dient. Während die Zahl der Schleimhautfalten im Ileum abnimmt, kommen dort erheblich mehr schleimproduzierende Becherzellen vor und die Zotten sind verdickt (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015).

In der digestiven Phase (Verdauungsphase) wird der Darminhalt (Chymus) im Dünndarm durch rhythmische Segmentationen und Pendelbewegungen bewegt und dabei intensiv mit den Verdauungssäften des Pankreas (Bauchspeicheldrüse) und mit Galle vermischt.

Peristaltische Wellen sorgen für einen Weitertransport des Nahrungsbreies und verhindern gleichzeitig ein Zusammenballen von unverdaulichen Materialien im Darm.

Am Ende des Dünndarms kontrolliert ein tonisch kontrahierter Sphinkter den Übertritt des Darminhaltes in den Dickdarm und verhindert gleichzeitig einen Reflux in höher gelegene Abschnitte (Schmidt, Lang und Heckmann 2010).

Den untersten und letzten Abschnitt des Darms stellt der Dickdarm dar, der sich in drei Abschnitte gliedert: Caecum (Blinddarm) mit dem Appendix (Wurmfortsatz), Kolon (Grimmdarm) und Rektum (Mastdarm/Enddarm) (*Abbildung 1*). Im Gegensatz zum Dünndarm besitzt der gesamte Dickdarm keine Zotten. Durch Faltenbildungen und Aussackungen (Krypten und Haustren) entsteht aber auch hier eine vergrößerte Oberfläche der Schleimhaut. Das Epithel der Krypten und der Darmschleimhaut ist dabei vorwiegend mit schleimproduzierenden Becherzellen ausgekleidet und besitzt an manchen Stellen einen Bürstensaum, welcher der Absorption von Nährstoffen dient (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015).

Hauptort der Durchmischung, Eindickung und Speicherung des Darminhaltes ist das Kolon (gegliedert in Aufsteigendes Kolon, Querkolon, Absteigendes Kolon). Um eine ausreichende Absorption von Wasser, Elektrolyten und Produkten aus bakteriellem Aufschluss zu gewährleisten, verweilt der Darminhalt über einen längeren Zeitraum in den Aussackungen des Dickdarms, wo durch eine Ringmuskelkontraktion ein Widerstand entsteht, der verhindert, dass der Nahrungsbrei zu schnell in den letzten Abschnitt des Darmes gelangt. Nach Einnahme energiereicher Mahlzeiten wird der Darminhalt vom Kolon in Richtung Rektum verschoben (Schmidt, Lang und Heckmann 2010).

2.1.2 Die Darmflora

Als Lebensraum für eine Vielzahl von Mikroorganismen bietet der GIT zahlreiche selektive Nischen für komplexe Mikrobiota und stellt diesen eine zu ihrer Kolonisierung ideale Umgebung bereit. Umgekehrt beteiligt sich das intestinale Mikrobiom an der Energiegewinnung aus der Nahrung, greift regulierend in den Metabolismus seines Wirtes ein und schützt den Verdauungstrakt vor einer Ansiedelung mit pathogenen Erregern (Stallmach und Vehreschild 2016).

Die Mehrheit der im Kolon angesiedelten Mikroorganismen besteht vorwiegend aus obligaten Anaerobiern, welche unverdauliche, pflanzliche Nahrungsbestandteile wie Cellulose und Inulin aufspalten, die für den Menschen selbst unverdaulich sind. Eine weitere fundamentale Aufgabe des kommensalen Mikrobioms stellt die Synthese von Vitaminen insbesondere B-Vitamine, Biotin, Vitamin K₂ und der dadurch protektive Effekt auf das Immunsystem für den Wirtorganismus dar (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015). Einige Beispielorganismen der Darmflora sind Vertreter der Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Mycobacterium* und viele weitere (Fritsche 2016).

Eine funktionierende Interaktion zwischen dem menschlichen Wirt und dessen Mikrobiom ist für die metabolische und immunologische Homöostase des Organismus von zentraler Bedeutung. Die Störung dieses empfindlichen Gleichgewichts, die sowohl durch diverse innerliche als auch durch äußerliche Faktoren verursacht wird, kann aktiv zur Entstehung von Entzündungen und malignen Krankheitsprozessen beitragen (Stallmach und Vehreschild 2016).

2.1.3 Pathophysiologie des Darms

Erkrankungen des unteren GIT sind häufig multifaktorieller Genese, die bis heute noch nicht vollständig geklärt sind. In den meisten Fällen geht mit einer Erkrankung auch eine Störung der Normalflora des Darmes einher - mithilfe von Medikamenten und vor allem Nahrungsergänzungsmitteln (Probiotika, Präbiotika, Synbiotika) versucht man dieses sensible Gleichgewicht wiederherzustellen (Fritsche 2016).

Neben Assimilationsstörungen wie Maldigestion, Malabsorption, Obstipation, Diarrhoe, infektiösen Enteritiden, gastrointestinalen Blutungen und Tumoren gewinnen vor allem die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) immer mehr an Bedeutung, da die Inzidenz bei jungen Menschen stark ansteigt (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015).

2.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die Ursachen der CED sind multifaktoriell und bisher nicht gänzlich erforscht. Wie bei vielen Erkrankungen spielen Genetik, Umweltfaktoren und der Lebensstil eine nicht unerhebliche Rolle. Als grundlegender Mechanismus der CED ist eine fehlgesteuerte Regulation von Mukosa-assoziierten Immunzellen anerkannt - dabei ist das Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren gestört. Diese Mediatoren und Effektorzellen haben einerseits die Aufgabe, den Schutz gegenüber potenziellen Krankheitserregern und Toxinen zu garantieren, andererseits aber auch die physiologische Darmflora in ihrer Funktion nicht zu beeinträchtigen und dadurch ständige Entzündungsreaktionen im Darm zu verhindern (Häussinger 2018).

Bei den CED werden aufgrund von Mutationen der sog. Mustererkennungs-Rezeptoren (PRR pattern recognition receptors) wie NOD2, welches dem angeborenen Immunsystem angehört, bestimmte Bakterienantigene der gesunden Darmflora als fremd erkannt. Dies führt zur Zerstörung des Mikrobioms und geht mit einer geschwächten Mukosabarriere einher. Eine weitere Entgleisung des Immunsystems durch Mutationen von IL-23 und TH17-Zellen, sowie im IL-10-System trägt zu einer CED-Erkrankung und ihrer Progredienz bei (Aktories, et al. 2017).

Die beiden Hauptformen von CED umfassen vor allem Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Eine eindeutige Diagnose und Unterscheidung der beiden Krankheitsformen lässt sich nur nach eingehenden Untersuchungen, dem klinischen Erscheinungsbild selbst, sowie dem Krankheitsverlauf stellen und die beiden Erkrankungen dadurch voneinander abgrenzen (Kucharzik, et al. 2018). Eine klare Differenzierung der beiden Erkrankungen ist insbesondere für die anschließende Therapie (Kapitel 2.2.3) wichtig. Beide Formen treten schubförmig und vor allem im jungen Erwachsenenalter auf, können aber in jeder Lebensphase vorkommen. Neben einem hohen Leidensdruck kann auch die Lebensqualität der betroffenen Patienten schwer beeinträchtigt sein.

Viele Fragen sind aus medizinischer Sicht noch offen: bisher gibt es keine Heilung für die Erkrankung an CED. Viele Therapiemöglichkeiten sind noch nicht ausgereift und/oder umfassend untersucht. Daher werden eine Remissionserhaltung, Symptomlinderung und Komplikationsprävention für Betroffene angestrebt (Lammert, Lynen Jansen und Lerch 2019).

2.2.1 Morbus Crohn

Morbus Crohn beginnt meist mit vorerst harmlosen Schleimhautgeschwüren, welche später zu Fissuren, Fisteln, Abszessen und Granulomen ausarten können. Die Erkrankung kann dabei diskontinuierlich im gesamten Verdauungstrakt von der Mundhöhle bis zum Rektum auftreten und betrifft dabei sämtliche Wandschichten (*Abbildung 3*). Besonders betroffen sind das terminale Ileum und proximale Colon (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015). Zu den Beschwerden gehören insbesondere anhaltender wässriger oder breiiger Durchfall, Gewichts- und Elektrolytverlust, Fieber und krampfartige Abdominalschmerzen nach der Nahrungsaufnahme. Aufgrund des systemischen Krankheitscharakters ist auch ein extraintestinales Übergreifen auf Haut, Gelenke oder Augen möglich (Mertens-Keller, et al. 2014).

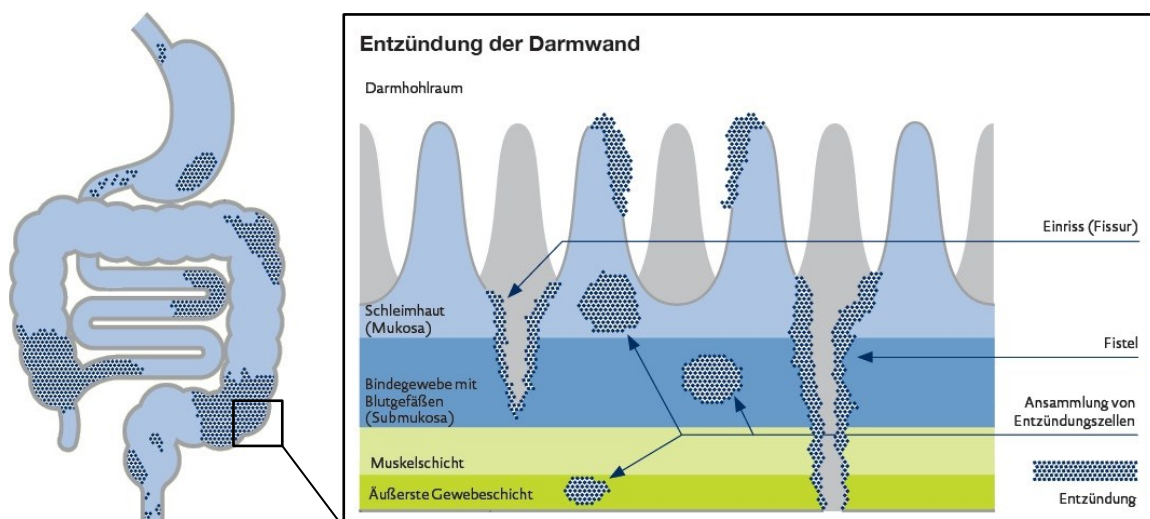


Abbildung 3: Lokalisation der Entzündungsherde bei Morbus Crohn (AbbVie Deutschland GmbH & Co.KG 2015)

2.2.2 Colitis ulcerosa

Als klinisches Leitsymptom und Unterscheidungskriterium gegenüber Morbus Crohn ist das Auftreten von blutig-schleimigem Durchfall bei Colitis ulcerosa maßgeblich. Betroffene Patienten klagen zusätzlich über Abdominalschmerzen, Fieber, sowie Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. Es tritt ein erhöhtes Risiko für Tumorerkrankungen im Colon auf. Die Entzündungsprozesse beschränken sich im Gegensatz zu Morbus Crohn auf die Mukosa und Submukosa und kommen in der Regel nur im Bereich des Colons ausgehend vom Enddarm vor (*Abbildung 4*) (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015).

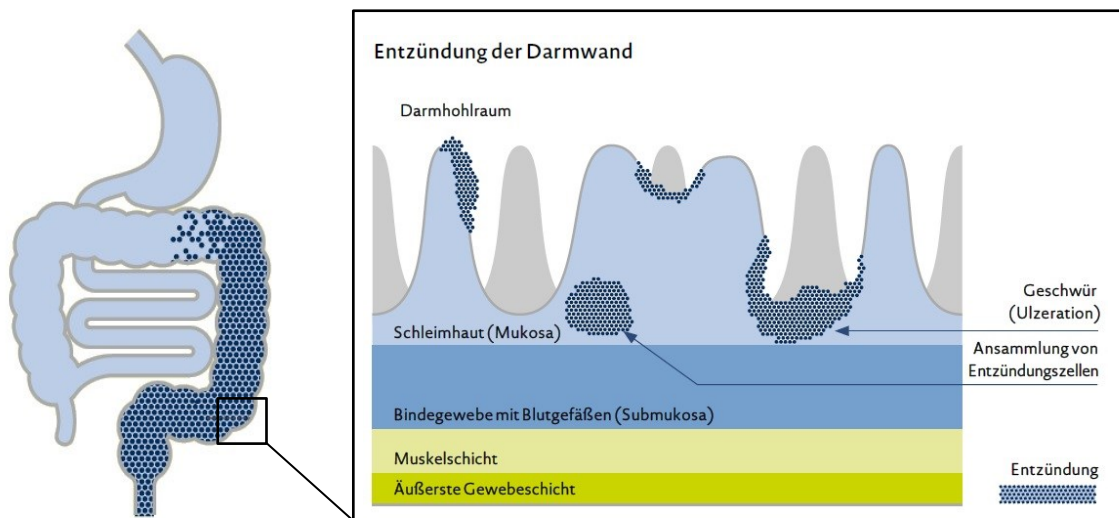


Abbildung 4: Lokalisation der Entzündungsherde bei Colitis ulcerosa (AbbVie Deutschland GmbH & Co.KG 2018)

2.2.3 Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Für eine Erkrankung an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ist nach heutigem Wissensstand derzeit keine Heilung möglich. Viel mehr wird unter Verwendung verschiedener Medikamentengruppen eine spezifische Entzündungshemmung angestrebt. Die Therapie der CED erfolgt abhängig von der Diagnose, des Schweregrades und der Häufigkeit des Auftretens einer Entzündungsaktivität (sog. Schub). Für eine remissions-induzierende Behandlung stehen systemische und lokale Glukokortikoide, Aminosalicylate (5-Aminosalicylsäure) und in schweren Fällen auch Biologika (Immunsuppressiva, Antikörper) zur Verfügung. Die Therapie mit NSAIDs (non steroidal antiinflammatory drugs) ist kontraindiziert, da diese zu einer verstärkten Symptomatik führen; in einigen Fällen müssen aber andere Schmerzmittel (Metamizol, Opioide) zusätzlich verabreicht werden. Treten sehr schwere Verlaufsformen und eine Therapieresistenz auf, besteht außerdem die Möglichkeit einer Kolektomie (vor allem bei Colitis ulcerosa).

Zur Remissionserhaltung haben sich vor allem Aminosalicylate, Immunsuppressiva und eine Antikörpertherapie bewährt. Eine weitere Behandlungsoption stellt auch der Einsatz von Probiotika und Präbiotika dar, deren remissionserhaltender Nutzen bereits in mehreren klinischen Studien belegt werden konnte und welche Gegenstand der aktuellen Forschung sind (Aktories, et al. 2017).

2.2.4 Die Bedeutung von Aminosalicylaten in der Therapie von CED

Die Aminosalicylate Mesalazin, Sulfasalazin und Olsalazin werden vor allem zur Therapie der Colitis ulcerosa, aber auch zur Therapie des Morbus Crohn herangezogen. Dabei ist der eigentliche Wirkstoff 5-Acetylsalicylsäure (5-ASA). Dieser kommt in Mesalazin als einzelnes Molekül (*Abbildung 5A*) und in Olsalazin in Form von zwei 5-ASA-Molekülen (*Abbildung 5B*) vor. In Sulfasalazin ist ein 5-ASA-Molekül mit dem Sulfonamid Sulfapyridin (*Abbildung 5C*) über eine Azobrücke verknüpft.

Mesalazin wird in Form einer magensaftresistenten Retardformulierung verabreicht, um eine vorzeitige Resorption im oberen Ileum zu verhindern und eine pH-abhängige Freisetzung erst in tieferen Darmabschnitten zu gewährleisten. Nach der Aufnahme von Olsalazin und Sulfasalazin in den Körper wird deren Azobrücke via Biotransformation durch Kolonbakterien gespalten. Der Wirkstoff 5-ASA wird im Darmlumen freigesetzt und wirkt nun im direkten Kontakt mit der Darmmukosa entzündungshemmend. Diesem Effekt liegt ein komplexer Wirkmechanismus zugrunde: durch Aktivierung des Peroxisomen-Proliferator-aktivierenden Rezeptors γ (PPAR γ) wird die Aktivität des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B umfassend gehemmt. In weiterer Folge wird die Synthese von Entzündungsmediatoren insbesondere IL-1, IL-6, TNF- α und einigen weiteren blockiert. Auch die Aktivität von bestimmten Signaltransduktionswegen in der Entzündungskaskade (z.B. MAPK) wird weitläufig unterbunden. Somit zählen die Aminosalicylate zum festen Therapiebestandteil bei allen Formen der Colitis ulcerosa und bei einem akuten Schub bei Morbus Crohn (Aktories, et al. 2017).

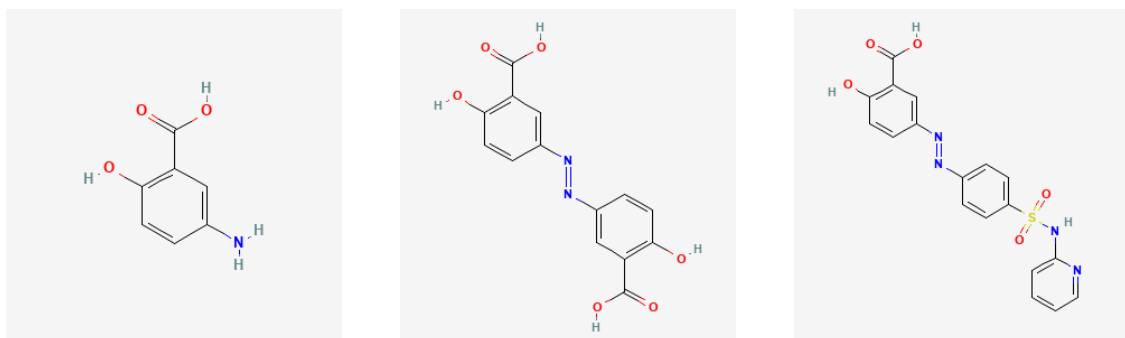


Abbildung 5: Chemische Struktur der Wirkstoffe Mesalazin (A), Olsalazin (B) und Sulfasalazin (C) (PubChem 2022)

2.3 Inulin

Inulin ist ein lineares β -(2 $\rightarrow$ 1) gebundenes Fructan, welches aus einem Gemisch von Polysacchariden (Fructosemoleküle) besteht und einen endständigen Glucoserest aufweist. Die Kettenlänge ist je nach Herkunft des Inulin unterschiedlich (*Abbildung 6*). Eine Charakterisierung erfolgt vorzugsweise über den Polymerisationsgrad (DP; degree of polymerisation) – dieser variiert meist zwischen 2 und 60 (Roberfroid 2005).

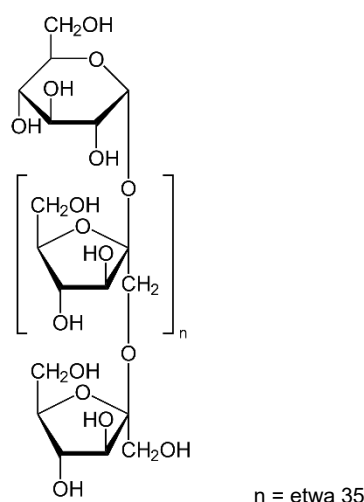


Abbildung 6: Chemische Struktur von Inulin in der Darstellung nach Haworth (Wikipedia 2022)

Inulin wird als Reservestoff von Pflanzen gebildet und kommt in hohen Mengen vor allem in Chicorée, Topinambur und Dahlien vor. Die Süßkraft des Fructans liegt bei etwa 10% im Vergleich zu Sucrose. (Shoaib, et al. 2016)

Für diesen Versuch wurde Inulin aus Chicorée verwendet – die Zusammensetzung einer Chicorée-Wurzel (laut Hersteller) ist in *Tabelle 1* dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung einer Chicorée-Wurzel (Cosucra 2022)

Bestandteil	Anteil [%]
Wasser	74
Inulin	16
getrocknete Chicoree-Wurzel	7
weitere unlösliche Zucker	3

2.3.1 Die Verwendung von Inulin als Präbiotikum

Inulin und Oligofructose gehören zu den am besten untersuchten und etablierten Präbiotika. Im menschlichen Verdauungstrakt ist Inulin aufgrund der β -Konfiguration des anomeren C2 der Fructosemonomere durch Hydrolyse bekannter Verdauungsenzyme nicht spaltbar, kann aber in tieferen Darmabschnitten mithilfe von bakteriellen Enzymen der Darmflora abgebaut werden (Roberfroid 2005).

Inulinasen gehören zu einer Gruppe von Hydrolasen, welche ausschließlich bakteriellen Ursprungs sind und Inulin sowohl vom Ende her, als auch Verbindungen zwischen den Fructosen spalten können. Vor allem Bakterienstämme wie Lactobacillus- und Bifidobakterien-Arten, die im menschlichen Verdauungstrakt vorkommen (Probiotika), besitzen die Eigenschaft Inulinase zu bilden und zugeführtes Inulin durch Spaltung für die eigene bakterielle Nährstoffversorgung optimal zu nutzen (Shoaib, et al. 2016, Boger, Lammerts van Bueren und Dijkhuizen 2018).

Aus den verstoffwechselten Kohlenhydraten werden von den Präbiotika kurzkettige Fettsäuren, wie Acetat, Propionat und Butyrat produziert, welche wiederum einen großen gesundheitlichen Nutzen für den menschlichen Körper bringen. (Boger, Lammerts van Bueren und Dijkhuizen 2018)

Vor allem das durch Inulin induzierte Wachstum von etwaig gesundheitsfördernden Bifidobakterien führt zu einer umfassenden Veränderung des Mikrobiom-Musters durch eine Verdrängung von potenziell pathogenen Bakterienstämmen (Roberfroid 2005).

Präbiotika wie Inulin bewirken neben positiven Veränderungen im Darmepithel selbst, eine stimulierte Krypten-Proliferation, wodurch sich die Konzentration an Polyaminen erhöht, welche die Zusammensetzung der am Darmepithel anhaftenden Mucine günstig beeinflussen. Daneben zeigt sich auch ein positiver Effekt auf die immunologische und endokrine Funktion des Darms – so wurden bereits in mehreren Studien positive Effekte auf den Insulinspiegel und den Cholesterinspiegel beim Menschen erfolgreich untersucht und ein bedeutender Nutzen vor allem für entzündliche Darmerkrankungen festgestellt (Roberfroid 2005, Mensink, et al. 2015)

Präbiotika wie Inulin sind also eine essenzielle Nahrungsquelle für das gesunde Mikrobiom, welches dadurch eine synergistische Wirkung auf die allgemeine Gesundheit des Menschen ausübt.

2.4 Pharmazeutische Technologie: Drug Delivery

2.4.1 Inulin als Trägersubstanz

In der pharmazeutischen Technologie versteht man unter dem Begriff Drug Delivery die Freisetzung eines Wirkstoffes am gewünschten Ort. Die Intention des Colon-Delivery ist es, eine bestimmte Menge des Arzneistoffes möglichst unverändert in die unteren Abschnitte des Verdauungstraktes zu transportieren und dort freizusetzen. Um dies zu gewährleisten, muss die Formulierung zunächst den Magen passieren, ohne dass durch Einwirken der Magensäure die Wirksamkeit herabgesetzt wird. Das bedeutet, dass die Arzneiform so formuliert werden muss, dass diese gegenüber Magensäure beständig ist, der Wirkstoff aber anschließend im Dünndarm- oder Dickdarmbereich möglichst vollständig freigesetzt wird (Walz, et al. 2018, Giri, Dutta und Giri 2021).

Diese Eigenschaften besitzen unter anderem auch β -(2 $\rightarrow$ 1) gebundene Kohlenhydrate wie Inulin, die als Naturstoffe in Pflanzen reichlich vorkommen und in verschiedenen Strukturen für biologische und chemische Modifizierungen günstig zur Verfügung stehen. Sie werden zu den unverdaulichen Kohlenhydraten gezählt und einige von ihnen sind nur durch bakterielle Verdauungsenzyme spaltbar (Kapitel 2.3.1) (Roberfroid 2005).

Aufgrund des ausgeprägten hydrophilen Charakters von Inulin kommt es bei Formulierungen mit nativem Inulin (z.B. Mikropartikel) bereits nach wenigen Minuten zu einer vorzeitigen unerwünschten Wirkstofffreisetzung im Magensaft. (Walz, et al. 2018)

Um die Verwendung des Inulin als Trägermaterial für 5-ASA zu ermöglichen, ist die Modifizierung des Inulin in Form von Acetylierung und eine damit resultierende verringerte Wasserlöslichkeit angebracht. Nur so kann eine verzögerte und verlängerte Wirkstofffreisetzung von therapeutischen Dosen im Bereich des Colons ermöglicht werden.

2.4.2 Der Vorteil von Mikropartikeln für Colon-Drug Delivery

Zu den Mikropartikeln gehören in der pharmazeutischen Technologie Partikel oder auch kleine Pellets mit einem Durchmesser von 1 – 1000 μm , einer Arzneiform im grobdispersen Bereich mit kugeliger Form. Von diesen abzugrenzen sind Nanopartikel, deren Größe maximal 1 μm beträgt und herkömmliche Granulate mit breitester Korngrößenverteilung und undefinierter Form.

Die Partikel können aus Wirkstoff allein bestehen oder mit Wirkstoffen beladen werden. Pellets eignen sich besonders für die freisetzungsgesteuerte Applikation eines Arzneimittels (welche zum Beispiel über eine Mischung von unterschiedlich überzogenen Pellets in einer Kapsel erreicht werden kann) oder eine Geschmacksmaskierung.

Nach der oralen Aufnahme der Mikropartikel gelangen diese rasch in den Magen, wo sie unabhängig von dessen Füllzustand aufgrund ihrer geringen Größe über den Pylorus direkt über den Zwölffingerdarm in den Dünndarm gelangen und dort ihren Wirkstoff freigeben. Diese Formulierung hat dabei den großen Vorteil, dass sie nicht von den Transitzeiten des Magens und einer etwaigen Nahrungsaufnahme abhängig ist (Kleinbudde 2004).

3 Materialien und Methoden

3.1 Herstellung und Charakterisierung von acetyliertem Inulin

Zur Herstellung von acetyliertem Inulin (InAc) werden in einem 500 mL Rundkolben 10 g Inulin (Fibruline XL, Fibrulose F97, Fibruline instant) in 100 mL Dimethylformamid (DMF) gelöst; anschließend werden 0,132 g Natriumacetat Trihydrat (0,05 %) hinzugefügt. Nach Zugabe von Essigsäureanhydrid (abhängig vom Inulintyp und Acetylierungsstufe - siehe *Tabelle 2*) wird die Reaktion am Rotationsverdampfer 24 Stunden bei 40°C, 250 mbar und 100 UpM rotiert.

Tabelle 2: Menge an Essigsäureanhydrid und Inulin für die jeweilige Acetylierungsstufe

	Fibrulose F97		Fibruline Instant	
	Essigsäureanhydrid [mL]	Inulin [g]	Essigsäureanhydrid [mL]	Inulin [g]
Stufe 1	50,6	10,0	34,9	10,0
Stufe 2	45,6	10,0	31,4	10,0
Stufe 3	40,5	10,0	27,9	10,0
Stufe 4	35,4	10,0	24,4	10,0
Stufe 5	30,4	10,0	20,9	10,0
Stufe 6	25,3	10,0	17,5	10,0

Zur Aufarbeitung von InAc werden 500 mL destilliertes Wasser (dH₂O) in einem 1000 mL Zentrifugenbecher vorgelegt, der gesamte InAc Ansatz hinzugefügt, mit dH₂O auf insgesamt 1130 g aufgefüllt und dicht verschraubt. Anschließend wird 30 Minuten bei 10 °C und 5500 UpM zentrifugiert (Rotor BIOFlex HC – Zentrifuge Sorvall LYNX 6000 Thermo Scientific). Der Überstand wird dekantiert, das entstandene Pellet in 50 mL Aceton gelöst, erneut mit dH₂O auf 1130 g aufgefüllt und zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes werden 100 mL Aceton zugegeben und mit dH₂O auf 1130 g aufgefüllt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen. Das gereinigte Pellet wird in einer Trocknungsschale 24 Stunden bei 40°C im Trocknungsschrank gelagert.

Es wurden von jedem Inulin jeweils 3 Ansätze der Acetylierungsstufe 1 und 6 hergestellt. Im Zuge der Herstellung wurde das Inulin Fibruline XL von der Versuchsreihe ausgeschlossen, da die Acetylierung einen zu hohen Essigsäureanhydrid-Verbrauch mit sich gezogen hätte.

3.1.1 ATR-FT-IR (Abgeschwächte-Totalreflektions-Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie von acetyliertem und nativen Inulin)

Das Infrarotspektrum von acetyliertem und nativem Inulin wird im ATR-FT-IR-Spektrometer (Tensor 27, Bio-ATR I Tool, Bruker Optik, Ettlingen, DE) mit flüssigstickstoffgekühltem Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektor registriert. Die Basislinie des Gerätes wird gegen Luft auf Null gestellt und die Probe auf den Zinkselenid-ATR-Kristall aufgebracht. Das Spektrum wird mit je 32 Scans im doppelseitigen Modus und einer Auflösung von 4 cm^{-1} im Bereich von 4000 cm^{-1} bis 850 cm^{-1} untersucht. Mithilfe der OPUS 5.5-Software (Bruker Optik, DE) werden vorhandene Peaks gekennzeichnet und die Absorptionsspektren qualitativ ausgewertet.

3.1.2 Schmelzpunktbestimmung von acetyliertem und nativen Inulin

Die Bestimmung der Schmelzpunkte der unterschiedlichen Inuline wird mit einem Schmelzpunktmessgerät (Stuart, Cole-Parmer, Staffordshire, UK) durchgeführt. Aufgrund fehlender Referenzwerte werden zuerst ungefähre Schmelzpunkte ermittelt: nach Einbringen der Probe wird das Messgerät auf eine gewisse Temperaturstufe eingestellt und diese anschließend rasch erhöht. Der festgestellte Schmelzpunkt wird nun als neue Plateautemperatur herangezogen und von dieser ausgehend schrittweise die Temperatur erhöht, bis die Schmelzpunkttemperatur erreicht wird. Diese Vorgehensweise wird bei allen Proben angewendet.

3.2 Herstellung von wirkstoffbeladenen Pellets mit acetyliertem Inulin

Die Pellets werden aus acetyliertem Inulin, dem Wirkstoff 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) und dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, wobei in dieser Versuchsreihe eine Wirkstoffbeladung von 50 % gewählt wird.

In der folgenden Tabelle (*Tabelle 3*) werden alle Reagenzien alphabetisch aufgelistet, die für die Acetylierung von nativem Inulin und zur Herstellung der InAc-Pellets verwendet wurden:

Tabelle 3: Auflistung der Reagenzien zur Herstellung von wirkstoffhaltigen InAc-Pellets

Substanz	Spezifikation	Hersteller
5-Aminosalicylsäure		Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Aceton		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
destilliertes Wasser		Universität Wien Eigenproduktion, AT
Dimethylsulfoxide	Reag. Ph. Eur. For analysis, ACS	PanReac AppliChem GmbH, ITW Reagents, Darmstadt, DE
Essigsäureanhydrid	≥ 99%, ReagentPlus®	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Ethanol	≥ 96% Ph. Eur.	VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Inulin Fibruline instant®	native inulin	Cosucra, Warcoing, BE
Inulin Fibruline XL®	long chain inulin	Cosucra, Warcoing, BE
Inulin Fibrulose F97®	oligofructose	Cosucra, Warcoing, BE
N,N-Dimethylformamid	ROTIPURAN® ≥ 99,8%, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumacetat Trihydrat	≥ 99,0% (NT), puriss. p.a. ACS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE

Eine Reibschale wird mit nativem Inulin ausgerieben und der Überschuss mit einem Pinsel entfernt. 500 mg InAc werden eingewogen, in der vorbereiteten Reibschale homogenisiert und mit 500 mg 5-ASA leige artis fein verrieben. Nach Zugabe von 600 µL DMSO wird erneut homogenisiert und die gelartige Mischung mithilfe eines Kartenblattes in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß gefüllt. Dieses wird 45 Minuten lang bei 40°C in einem Ultraschallbad gelagert, damit enthaltene Luft entweichen kann.

In ein 600 mL Becherglas wird dH₂O als Ausfäll-Medium gefüllt und bei 50 UpM gerührt. Der InAc/5-ASA/DMSO Ansatz im Mikroreaktionsgefäß wird in eine 1 mL Spritze überführt und mithilfe einer 0,4 mm Kanüle in das vorbereitete Becherglas am Magnetrührer eingetropft. Dabei ist ein Abstand von 5 cm zwischen Kanülenspitze und Wasseroberfläche und das Eintropfen in der Nähe der Becherglasrands zu beachten.

Nach 60 Minuten wird das Becherglas mit den Pellets vom Magnetrührer genommen, der Großteil der Flüssigkeit dekantiert und die Pellets in einen 250 mL Erlenmeyerkolben übergeführt. Der Erlenmeyerkolben wird mit dH₂O auf etwa 100 mL aufgefüllt und für 24 Stunden bei 200 UpM auf eine Schüttelplatte gestellt. In regelmäßigen Abständen werden die Pellets innerhalb dieser 24 Stunden fünfmal mit frischem dH₂O gewaschen. Anschließend wird das Medium entfernt, die Pellets in einer Kristallisierschale mindestens 120 Minuten bei - 80°C in einem Tiefkühlschrank gelagert und dann lyophilisiert. Die fertigen Pellets werden bei Kühlschranktemperatur in einem Gefäß lichtgeschützt gelagert.

3.2.1 Optimierung der Herstellung von Pellets mit InAc

Auf Grund von sich während des Up-Scaling des Herstellungsprozesses zeigenden Problemen wie Angriff des Schlauchsystems durch DMSO als Lösungsmittel, werden in dieser Arbeit weitere Lösungsmittel zur InAc-Pelletherstellung nach folgender Vorgehensweise untersucht:

Im Europäischen Arzneibuch (EuAB) werden die Grenzwerte für Lösungsmittelrückstände von Lösungsmitteln der Klasse 3 - gering toxisch - erfasst. Von diesen Lösungsmitteln werden jene ausgewählt, welche auch eine gute Wasserlöslichkeit haben, um dadurch die Waschschrte bei der Pelletherstellung zu vereinfachen.

In *Tabelle 4* sind einige Lösungsmittel der Klasse 3 laut EuAB angeführt. Der Einfachheit halber werden sehr leicht flüchtige Substanzen (Aceton, Propanol) aus dem Versuch ausgeschlossen. Die Versuchsreihe wird mit dem Lösungsmittel Ethanol weitergeführt.

Tabelle 4: Wasserlöslichkeit von einigen ausgewählten Klasse 3 Lösungsmitteln nach EuAB

	Aceton	Ethanol	Ethylacetat	Heptan	Pentan	Propanol
Wasser-löslichkeit	+	+	-	-	-	+

3.2.2 Herstellung von wirkstoffbeladenen Pellets mit Ethanol als Lösungsmittel

Die Herstellung der Pellets erfolgt mit acetyliertem Inulin, dem Wirkstoff 5-ASA und dem Lösungsmittel Ethanol (96%). Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine Wirkstoffbeladung von 50 % gewählt.

Nachdem eine Reibschale mit nativem Inulin ausgerieben, der Überschuss mit einem Pinsel entfernt, jeweils 500 mg InAc und 5-ASA eingewogen und leger artis fein verrieben wurden, werden 1700 µL EtOH (96%) zugesetzt und die Mischung mit dem Pistill mindestens zwei Minuten lang homogenisiert. Die Mischung wird in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß übergeführt und fünf Minuten lang bei Raumtemperatur in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wird die Mischung in eine 1 mL Spritze aufgezogen und eine 0,4 mm Kanüle aufgesetzt. Die Spritze wird vorsichtig über einem am Magnetrührer stehenden und mit dH₂O gefüllten Becherglas ausgedrückt und die entstandenen Pellets anschließend ca. 30 Minuten lang ausgehärtet. Das Eintropfmedium (dH₂O) wird vollständig entfernt. Die Pellets werden in einer Kristallisierschale 2 Stunden bei - 80°C gefroren und anschließend lyophilisiert.

3.3 Bestimmung des Wirkstoffgehalts der InAc Pellets

Der Wirkstoffgehalt der hergestellten Pellets wird unter Verwendung eines UV-Vis-Spektrophotometers (Tecan INFINITE M200 Mikrotiterplatten-Photometer; Tecan Trading AG, Schweiz) bestimmt, wozu das Absorptionsmaximum von 5-ASA in DMSO wird im Bereich von 300 nm bis 400 nm ermittelt wird.

Für die Erstellung einer Kalibrationsgerade wird unter Lichtschutz eine Stammlösung hergestellt: 3,125 mg 5-ASA werden in einem 10,0 mL Messkolben eingewogen und in DMSO gelöst. Anhand eines Pipettierschemas (Tabelle 5) werden in lichtgeschützten

Mikroreaktionsgefäßen serielle Verdünnungen der Stammlösung angefertigt und in eine Mikrotiterplatte pipettiert.

Es werden jeweils 200 µL pro Well (Dreifachbestimmung) auf die Platte aufgetragen. Dabei dient DMSO als Leerwert. Der 5-ASA-Gehalt wird spektralphotometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 366 nm detektiert.

Für die Gehaltsbestimmung werden zehn Pellets einzeln in lichtgeschützte Mikroreaktionsgefäße eingewogen und jeweils in 1,0 mL DMSO gelöst. Damit der Gehalt an 5-ASA im messbaren Bereich liegt wird eine Verdünnung (1:20) hergestellt: 50 µL Lösung werden mit 950 µL DMSO gemischt und dreimal je 200 µl in einer Mikrotiterplatte bei 366 nm gemessen.

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung einer Kalibrationsgerade zur Gehaltsbestimmung von 5-ASA.

Faktor	V [µL]	von	V [µL]	von	5-ASA [mg/mL]	Bezeichnung
1:2	1500	Stammlösung	1500	DMSO	0,15625	A
1:2	2000	A	2000	DMSO	0,078125	1
1:1.5	1000	1	500	DMSO	0,05208333	2
1:2	1000	1	1000	DMSO	0,0390625	3
1:2	1000	3	1000	DMSO	0,01953125	4
1:2	1000	4	1000	DMSO	0,00976563	5
1:2	1000	5	1000	DMSO	0,00488281	6
1:2	1000	6	1000	DMSO	0,00244141	7
1:2	1000	7	1000	DMSO	0,0012207	8

Für die Auswertung der Rohdaten wird das Programm Tecan i-control™ verwendet und der Wirkstoffgehalt anschließend anhand der Kalibrationsgerade und Microsoft Excel errechnet.

3.4 Freisetzung von 5-ASA aus InAc-Pellets in künstlichem Magen-Darmsaft

In Anlehnung an eine mögliche in vivo-Anwendung der Pellets wird ein Freisetzungsversuch in vitro in künstlichem Magen-/Darmsaft durchgeführt. Hierfür wird in definierten Zeitabständen der 5-ASA-Gehalt in den unterschiedlichen Medien bestimmt.

3.4.1 Herstellung der Freisetzungsmedien

Im Freisetzungsversuch wird ein simulierter Magensaft, ein simulierter Dünndarmsaft, ein simulierter Dickdarmsaft mit Inulinase und ein simulierter Dickdarmsaft ohne Inulinase eingesetzt.

a) Simulierter Magensaft:

Eine 0,04 M HCl – Stammlösung mit pH 1,4 wird hergestellt: in einem 1000,0 mL Messkolben wird dH₂O vorgelegt, 3,312 mL HCl (37%) zugesetzt und mit dH₂O auf 1000,0 mL aufgefüllt. Für 100 mL künstlichen Magensaft werden in einem 100 mL Messkolben 0,25 g Triton-X und 0,2 g NaCl in etwa 80 mL 0,04 M HCl gelöst und über Nacht stehen gelassen. Am Tag des Versuchs werden 0,32 g Pepsin zugegeben und mit 0,04 M HCl auf 100,0 mL aufgefüllt.

b) Simulierter Dünndarmsaft:

Es wird ein 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 hergestellt: In einen 1000,0 mL Messkolben werden 27,6 g 0,2 M KH₂PO₄ eingewogen und mit dH₂O bis zur Messmarkierung aufgefüllt. In einem weiteren 1000,0 mL Messkolben werden 53,62 g von 0,2 M K₂HPO₄ eingewogen und mit dH₂O bis zur Markierung aufgefüllt. 51,0 mL KH₂PO₄-Lösung, 49,0 mL K₂HPO₄ -Lösung und 100 mL dH₂O werden miteinander vereinigt, der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Pro 100 mL künstlichen Dünndarmsaft werden 1 g Pankreatin eingewogen und mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 in einem 100 mL Messkolben gelöst.

c) Simulierter Dickdarmsaft ohne Inulinase:

Als künstlicher Dickdarmsaft wird der bereits hergestellte 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 in der Versuchsreihe eingesetzt.

d) Simulierter Dickdarmsaft mit Inulinase:

In einem 50 mL Reaktionsgefäß werden 3,9 mg Inulinase in 10,764 mL 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 gelöst und anschließend noch 32,292 mL 0,1 M Kaliumphosphatpuffer zugesetzt, um insgesamt 43,056 mL einer 1:4 Verdünnung zu erhalten.

In der folgenden Tabelle (*Tabelle 6*) werden alle in den Freisetzungsversuchen verwendeten Substanzen alphabetisch aufgelistet:

Tabelle 6: Auflistung der Reagenzien für die Herstellung von simulierten Magen-Darm-Medien

Substanz	Spezifikation	Hersteller
dH ₂ O		Eigenherstellung, Universität Wien, AT
HCl	37%, reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Inulinase	27,6 U/mL	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
K ₂ HPO ₄	ACS reagent, ≥ 98%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
KH ₂ PO ₄	≥ 98%, Ph. Eur., USP, BP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
NaCl	≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Pankreatin	API, PH.EUR. 8.0	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, DE
Pepsin	≥ 0,5 Ph. Eur. – E/mg für die Biochemie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Triton™-X100	X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE

3.4.2 Durchführung des in vitro Freisetzungsversuchs

Es werden zwei Versuchsreihen jeweils mit und ohne Inulinase im simulierten Dickdarmsaft parallel in je vierfacher Ausführung, mit zusätzlich je 2 mg InAc (Leerwert Pellet) und 1 mg 5-ASA als Referenzwerte durchgeführt. Hierfür wird je ein Pellet in ein 12 mL Reaktionsgefäß genau eingewogen und 5,0 mL simulierter Magensaft zugegeben. Die Reaktionsgefäße (acht Proben- und vier Referenz-Reaktionsgefäße) werden fest verschlossen und in einem Heizschrank bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 15 Minuten auf einem Rotator bei etwa 10 UpM (dient der Verhinderung der Bildung von Konzentrationszonen) befestigt. Nach Ablauf der Zeit wird eine Gehaltsbestimmung durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.3) und das gesamte Medium entfernt.

Dann werden die Pellets mit 5 mL simuliertem Dünndarmsaft versetzt (5-ASA wird neu eingewogen) und auf dem Rotator bei 10 UpM bewegt. Alle 30 Minuten wird eine Gehaltsbestimmung durchgeführt und die entnommene Probenmenge durch frisches Medium ergänzt. Ab zwei Stunden Inkubation wird die Probenentnahme nur mehr stündlich durchgeführt, bis insgesamt sechs Stunden abgelaufen sind. Das gesamte Medium wird abpipettiert und die Pellets werden über Nacht bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Der Versuch wird am nächsten Tag fortgeführt.

Die gelagerten Pellets werden aufgetaut (5-ASA wird jeweils neu eingewogen) und eine Versuchsreihe wird mit simuliertem Dickdarmsaft ohne Inulinase, eine zweite mit simuliertem Dickdarmsaft mit Inulinase durchgeführt. Während der Inkubation am Rotator bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ werden stündlich Proben entnommen und eine Gehaltsbestimmung durchgeführt. Die entnommene Probenmenge wird durch frisches Medium ersetzt. Nach Ablauf von sechs Stunden erfolgt eine letzte Gehaltsbestimmung am nächsten Tag nach insgesamt 24 Stunden und der Versuch ist damit beendet.

3.4.3 Gehaltsbestimmung von 5-ASA in künstlichem Magen-Darmsaft

Zur Gehaltsbestimmung von 5-ASA werden vor der Messung Kalibrationsgeraden für die jeweiligen Freisetzungsmedien erstellt, um eine spätere Berechnung des Wirkstoffgehaltes zu ermöglichen. Hierfür wird in einem Spektrophotometer (Tecan INFINITE M200 Mikrotiterplatten-Photometer; Tecan Trading AG, Schweiz) das jeweilige Absorptionsmaximum von 5-ASA in simuliertem Magensaft, Dünndarmsaft und Dickdarmsaft (mit und ohne Inulinase) in einem Wellenlängenscan von 250 – 400 nm ermittelt. Das photometrische

Absorptionsmaximum für das jeweilige Versuchsmedium (*Abbildung 7*) ist in *Tabelle 7* aufgelistet.

Die Vorgehensweise zur Erstellung der Kalibrationsgeraden und den Messungen während des Freisetzungsvorgangs ist dem Kapitel 3.2.2 mit der zugehörigen

Tabelle 5 zu entnehmen. Dabei ist anstelle von DMSO das jeweilige Freisetzungsmittel zu verwenden. Die Messung erfolgt in Dreifachbestimmung mit je 200 µL pro Well und dem jeweiligen Medium als Leerwert.

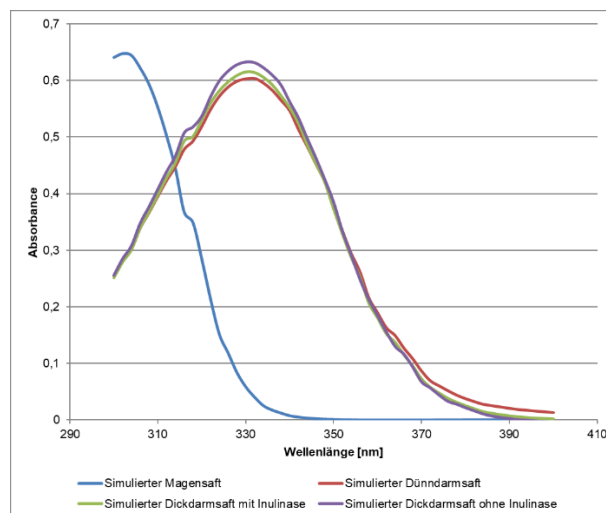


Abbildung 7: Bestimmung der Absorptionsmaxima verwendeter Freisetzungsmitteln

Tabelle 7: Absorptionsmaxima von 5-ASA in den Freisetzungsmitteln

simuliertes Freisetzungsmittel	Absorptionsmaximum [nm]
Magensaft	302
Dünndarmsaft	332
Dickdarmsaft	330
Dickdarmsaft + Inulinase	330

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung und Charakterisierung von acetyliertem Inulin

4.1.1 Acetylierungsgrad und Ausbeute

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Acetylierungsstufen 1 und 6 als Acetylierungsgrad ausgewählt. Dabei entspricht die Acetylierungsstufe 1 einer Acetylierung der Mehrzahl von OH-Gruppen des Inulins und eine damit einhergehende geringere Wasserlöslichkeit. Stufe 6 bedingt einen geringeren Acetylierungsgrad und die damit auch verbundene bessere Wasserlöslichkeit.

In einem vorangegangenen Versuch wurden $2,7 \pm 0,3$ Acetylgruppen pro Fructose-Einheit der Acetylierungsstufe 1 und $2,3 \pm 0,3$ Acetylgruppen pro Fructose-Einheit für Acetylierungsstufe 6 gemessen (Müllner 2020).

Zur Bestimmung des Polymerisationsgrades (DP) des verwendeten nativen Inulins diente die Größenausschlusschromatographie (SEC). Anhand dieser Ergebnisse wurden die für die unterschiedlichen Acetylierungsstufen benötigten Mengen an Essigsäureanhydrid (EA) berechnet. Da die benötigte Menge an Reagens für das Fibruline XL[®] mehr als 1000 mL für eine Acetylierung von 10g nativem Inulin beträgt, wurde dieses aus dem Versuch ausgeschlossen.

Tabelle 8: Vergleich des Polymerisationsgrades laut Herstellerangaben und SEC sowie die daraus resultierenden Mengen an Essigsäureanhydrid für die Acetylierung von 10 g nativen Inulin und deren Ausbeute.

Inulin-Typ	Angaben lt. Hersteller [DP]	SEC - Ergebnis [DP]	Menge EA Ac. St. 1 [mL]	Ausbeute InAc St. 1 [g]	Menge EA Ac. St. 6 [mL]	Ausbeute InAc St. 6 [g]
Fibrulose F97 [®]	15 - 20	20	50,6	$5,4 \pm 0,6$	25,3	$1,0 \pm 0,2$
Fibruline instant [®]	10 - 15	25	51,7	$9,4 \pm 0,3$	25,8	$5,6 \pm 0,1$

Der DP laut SEC und Herstellerangaben für das Fibruline instant[®] divergierte ausgeprägt. Die Ergebnisse der Acetylierung des Fibruline instant[®] ergaben jedoch aufgrund stark unterschiedlicher Ausbeuten im Vergleich mit Fibrulose F97[®], dass die SEC durch ungeeignete Standards oder nicht korrekte Kalibrierung inkorrekte Ergebnisse lieferte

(Tabelle 8). Infolgedessen wurde auf die Molmasse laut Herstellerangaben zurückgegriffen und die erforderliche Menge an Essigsäureanhydrid für die Acetylierungsstufen 1 und 6 neu berechnet.

Aufgrund der ähnlichen Ausbeute von Fibruline instant® AcSt. 6 und Fibrulose F97® AcSt. 1 wurde Fibruline instant® AcSt. 6 fortan als AcSt. 1 herangezogen, während die ursprüngliche Fibruline instant® AcSt. 1 als Stufe 0 bezeichnet wurde und zu Übungs- und Versuchszwecken weiterverwendet wurde. Für Fibruline instant® AcSt. 6 wurde ein neuer Ansatz ausgehend vom Polymerisationsgrad 14 berechnet und mit 10 g nativem Inulin hergestellt. Die endgültige Ausbeute kann Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Endgültige Ausbeute an Inulinacetat für den Acetylierungsgrad 1 und 6. Die angegebenen Mengen an Essigsäureanhydrid entsprechen 10g nativem Inulin.

Inulin-Typ	Menge EA Ac. St. 1 [mL]	Ausbeute InAc St. 1 [g]	Menge EA Ac. St. 6 [mL]	Ausbeute InAc St. 6 [g]
Fibrulose F97®	50,6	5,4 ± 0,6	25,3	1,0 ± 0,2
Fibruline instant®	34,9	5,8 ± 0,1	17,5	1,5 ± 0,1

Während der Pelletherstellung mit EtOH 96% (Kapitel 3.2.2) stellte sich heraus, dass die zu Übungszwecken verwendete AcSt. 0 optimal für die Pelletherstellung (Kapitel 4.2.1) ist. Dies steht wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Zugabe eines Essigsäureanhydrid-Überschusses bei der Herstellung des acetylierten Inulins und die dadurch einhergehende geringe Wasserlöslichkeit, da sich Inuline mit niedrigeren Acetylierungsstufen als zu gut wasserlöslich erwiesen. In weiterer Folge wurde eine neue Charge von acetylierten Inulinen mit einem Überschuss an Essigsäureanhydrid und der Bezeichnung AcSt. 0 hergestellt (Tabelle 10) und der Versuch damit fortgeführt.

Tabelle 10: Menge an Essigsäureanhydrid für 10 g Inulin und Ausbeute von InAc Stufe 0

	Menge EA Ac. St. 0 [mL]	Ausbeute InAc St. 0 [g]
Fibrulose F97®	75,9	7,4 ± 0,3
Fibruline instant®	52,4	8,3 ± 0,2

4.1.2 Interpretation der ATR-FT-IR-Spektren

Die ATR-FT-IR-Spektroskopie wird durchgeführt, um mit wenig Aufwand qualitativ eine erfolgreiche Acetylierung der Inuline nachzuweisen.

Typisch für das Spektrum von Oligofructose ist eine breite Bande im Bereich 3350 cm^{-1} . Allgemein sind im Bereich $1200 - 900\text{ cm}^{-1}$ starke Banden zu erwarten, da diese auf C-C, C-O-Streckschwingung und C-O-H-, C-O-C-Deformationsschwingungen zurückzuführen sind. Die intensivste Bande ist dabei um den Bereich 1080 cm^{-1} zu finden. Zwischen $3000 - 2700\text{ cm}^{-1}$ zeigen Kohlenhydrate sowohl symmetrische als auch asymmetrische Banden, die einer C-H-Schwingung von CH_2 und CH_3 zugeordnet werden können (Grube 2002).

Bei acetyliertem Inulin verursachen die Acetylgruppen durch Carbonyl-, Methyl- und Acetat-C-O-Streckschwingung Peaks in den Bereichen 1750 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} und 1230 cm^{-1} (Poulain 2003).

In den nachfolgend dargestellten Spektren (*Abbildung 8*) werden die Unterschiede zwischen nativem Inulin und acetyliertem Inulin der Acetylierungsstufen 0, 1 und 6 dargestellt.

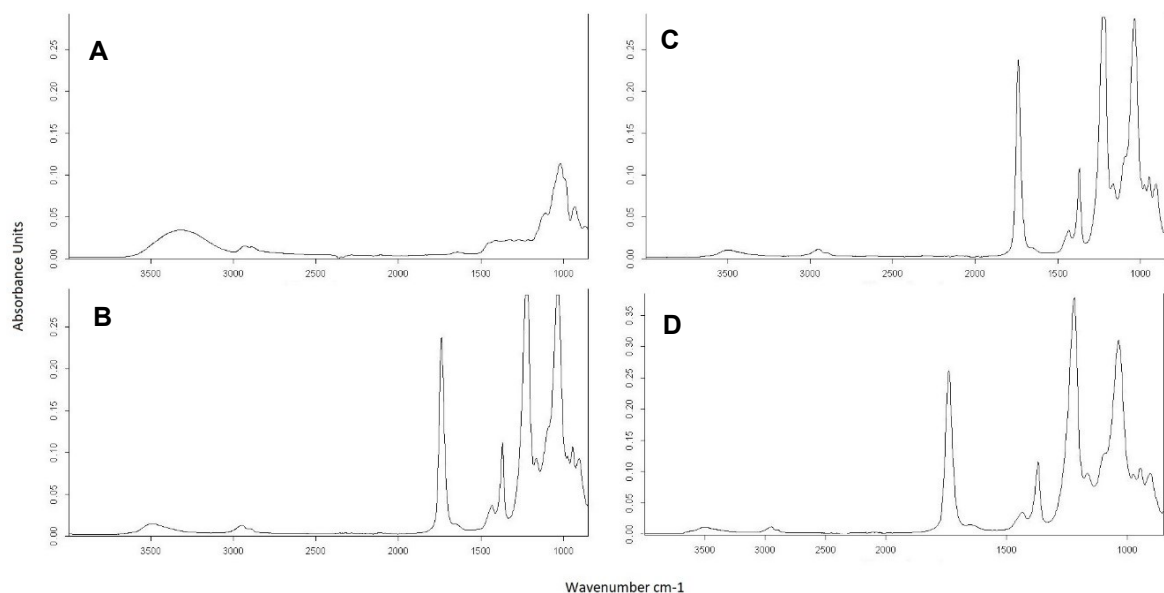


Abbildung 8: ATR FT-IR Spektren von nativem Fibruline instant® (A), Fibruline instant® Ac.St. 6 (B), 1 (C) und 0 (D).

Die bereits genannten Charakteristika für eine Oligofructose und damit auch für das native Inulin werden in *Abbildung 7A* erfüllt. Zu sehen ist eine breite symmetrische Bande im

Bereich um 3350 cm^{-1} , eine C-H-Schwingung im Bereich 2930 cm^{-1} und eine intensive Bande bei 1020 cm^{-1} . Die *Abbildungen 7B-D* zeigen die unterschiedlichen Acetylierungsstufen im Vergleich. Im Bereich 1230 cm^{-1} tritt eine intensive Acetat-C-O-Streckschwingung auf. Nahe 3500 cm^{-1} fallen die auftretenden Banden im Vergleich zu nativem Inulin wesentlich schwächer aus und sind nach links verschoben. Abhängig vom Acetylierungsgrad sind diese mehr (AcSt.6) oder weniger (AcSt.1) bis fast gar nicht mehr (AcSt.0) zu erkennen.

4.1.3 Schmelzpunktbestimmung von nativem und acetyliertem Inulin

Die gemessenen Schmelzpunkte sind in

Tabelle 11 dargestellt. Dabei unterscheiden sich die Schmelzpunkte der verschiedenen Acetylierungsstufen des jeweiligen Inulins untereinander als auch die der nativen Inuline in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad: Fibrulose F97® AcSt. 0 weist den niedrigsten Schmelzpunkt auf, während dieser mit sinkender Acetylierungsstufe und damit Acetylierungsgrad ansteigt. Demselben Schema folgt auch Fibruline instant, wobei aber hier das native Inulin einen weit höheren Schmelzpunkt aufweist. Dabei besitzt Fibrulose F97® mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad 20 einen geringeren Schmelzpunkt als das kleinere Molekül Fibruline instant mit einem Polymerisationsgrad von 14.

Tabelle 11: Gemessene Schmelzpunkte von nativen und acetylierten Inulinen.

Inulin	Acetylierungsstufe	Schmelzpunkt θ [°C]
Fibrulose F97®	nativ	$91,1 \pm 1,0$
	0	$75,4 \pm 0,3$
	1	$78,4 \pm 0,2$
	6	$85,0 \pm 0,2$
Fibruline instant®	nativ	$117,6 \pm 1,0$
	0	$82,9 \pm 0,3$
	1	$87,7 \pm 0,5$
	6	$99,0 \pm 0,5$

4.2 Herstellung von wirkstoffbeladenen Pellets

Die Herstellung von Pellets mithilfe des Lösungsmittels DMSO gelang mit allen Inulinen und ihren entsprechenden Acetylierungsderivaten.

4.2.1 Pelletherstellung mit EtOH

Zu Beginn wurde dieselbe Vorgehensweise der Pelletherstellung wie bei der Herstellung mit DMSO (Kapitel 3.2) versucht: der fein verriebenen InAc/5-ASA-Mischung wurden 600 μL EtOH zugesetzt und gut homogenisiert. Erst nach zwei Minuten intensiver Homogenisation konnte eine zufriedenstellende Vermengung der beiden Phasen erreicht werden. Nach der Entgasung im Ultraschallbad und der Überführung in eine 2 mL Spritze mit passender Kanüle erwies sich die Masse jedoch als zu fest, da sich keine Tröpfchen an der Kanülenspitze formten und somit nur fadenartige Gebilde im Ausfällungsbad entstanden. In weiteren Versuchen mit 1000, 1200 oder 1500 μL EtOH war die Konsistenz der Mischungen ebenfalls zu fest. Erst der Zusatz von 1700 μL EtOH ergab eine optimale Beschaffenheit zur Tröpfchenformung und Pelletbildung. Ein höheres Lösungsmittelvolumen hingegen erwies sich aufgrund einer zu hohen Fließfähigkeit und einer beginnenden Entmischung der Masse als nicht zielführend. Ein vorheriges Anreiben der Pulvermischung mit Aceton zur Verbesserung der Mischbarkeit brachte keine erkennbaren Vorteile. Da eine Variation der Entgasungszeiten im Ultraschallbad keine sichtbaren Auswirkungen hatte wurde eine fünfminütige Inkubation im Ultraschallbad ausgewählt. Die Temperatur wurde jedoch während des gesamten Herstellungsprozesses unter 30°C gehalten.

Für die oben beschriebenen Versuche wurde wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, das stark acetylierte Fibruline instant® der Acetylierungsstufe 0 verwendet. Die Acetylierungsstufen 1 und 6 der beiden Inuline waren jedoch für die Pelletherstellung mit EtOH ungeeignet. Beim Eintropfen der 5-ASA/InAc/EtOH-Mischung wurden die Tropfen aus der Kanüle beim Aufprall auf die Wasseroberfläche teilweise zerstört. Jene Tröpfchen, die tatsächlich zu festen Pellets wurden, wurden jedoch nach kurzer Zeit im Ausfällungsmedium angelöst und zeigte sich in einer mit der Zeit zunehmenden Trübung des Ausfällungsmediums und einer Abnahme der Pelletgröße und Formveränderung. Eine Reduktion der Lösungsmittelmenge hatte hingegen zur Folge, dass sich keine Tröpfchen an der Kanülenspitze bildeten.

Um die Theorie zu beleuchten, dass die Pelletherstellung aufgrund einer zu hohen guten Wasserlöslichkeit der Inuline misslingt, wurden die beiden nativen Inuline mit einem Überschuss an Essigsäureanhydrid (siehe Kapitel 3.2.2) acetyliert.

Die Pelletherstellung mit den neu hergestellten Inulinen der Acetylierungsstufe 0 gelang ohne weitere Schwierigkeiten. Die fertigen Pellets konnten ohne weitere Waschschr tte nach einer kurzen Aushärtungszeit im Ausf llungsmedium lyophilisiert und gelagert werden.

Im direkten Vergleich mit den Pellets, die mithilfe von DMSO hergestellt wurden, sollten die mit Ethanol hergestellten Pellets vorsichtiger behandelt werden, da sie eine geringere Stabilität und einen höheren Abrieb aufwiesen.

4.2.2 5-ASA-Gehalt der mit EtOH und DMSO hergestellten Pellets

Bereits makroskopisch unterschieden sich die Pellets und ließen den Typ des nativen Inulins erkennen. Aus Fibruline instant[®]-hergestellte Pellets waren größer und auch um etwa 110 – 140% schwerer als Fibrulose F97[®]-Pellets. Insgesamt weisen diese auch eine bessere Beladungskapazität und eine damit einhergehende Verkapselungseffizienz auf. Der Typ des nativen Inulins spielt bei der Pellet-Herstellung mit DMSO keine Rolle und führt in beiden Fällen zu einem Gehalt von etwa 0,35 mg/mg Pellets.

Ein signifikanter Unterschied lässt sich zwischen den mit DMSO hergestellten und den mit EtOH hergestellten Pellets erkennen. Es zeigt sich, dass die EtOH-Pellets eine höhere Beladungskapazität aufweisen und damit bei der Verkapselungseffizienz (EE) annähernd 100% erreichen, während bei den DMSO-Pellets die Verkapselungseffizienz knapp bei einem Viertel liegt. Aufgrund der gemessenen Daten kann in Bezug auf die Wirkstoff-Verkapselung eine klare Überlegenheit der mit Ethanol hergestellten Pellets gegenüber DMSO-Pellets beobachtet werden.

Tabelle 12: Ergebnis der Gehaltsbestimmung von DMSO- und Ethanol-Pellets

	Einwaage Pellet [mg]	Gehalt an 5- ASA/Pellet [mg/mg]	LC [%]	EE [%]
Fibrulose F97 [®] + DMSO	2,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	37,4 ± 1,3	74,8 ± 2,6
Fibrulose F97 [®] + EtOH96%	1,4 ± 0,3	0,6 ± 0,2	48,5 ± 1,4	97,0 ± 2,8
Fibruline instant [®] + DMSO	2,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1	38,2 ± 1,8	76,4 ± 3,6
Fibruline instant [®] + EtOH96%	2,5 ± 0,4	1,3 ± 0,2	48,9 ± 0,8	97,8 ± 1,8

4.3 Freisetzung von 5-ASA aus den Pellets

Die Vorgehensweise beim Freisetzungsversuch wurde bereits in Kapitel 3.4.2. und 3.4.3 beschrieben und die Ergebnisse sind in *Tabelle 7* und *Abbildung 7* dargestellt. Anschließend wurde je eine Kalibrationsgerade pro Freisetzungsmedium erstellt (Kapitel 3.3 und *Tabelle 5*).

Abbildung 9 zeigt das unterschiedliche Verhalten von Fibrulose F97®-Pellets im künstlichen Magen-Darmsaft im direkten Vergleich: besonders auffällig ist die %-ASA-Freisetzung aus den EtOH-Pellets nach bereits 15 Minuten im simulierten Magensaft ($8,0 \pm 1,0\%$) und eine anfangs deutlich höhere Wirkstofffreisetzung im Vergleich zu den DMSO-Pellets im simulierten Dünndarmsaft.

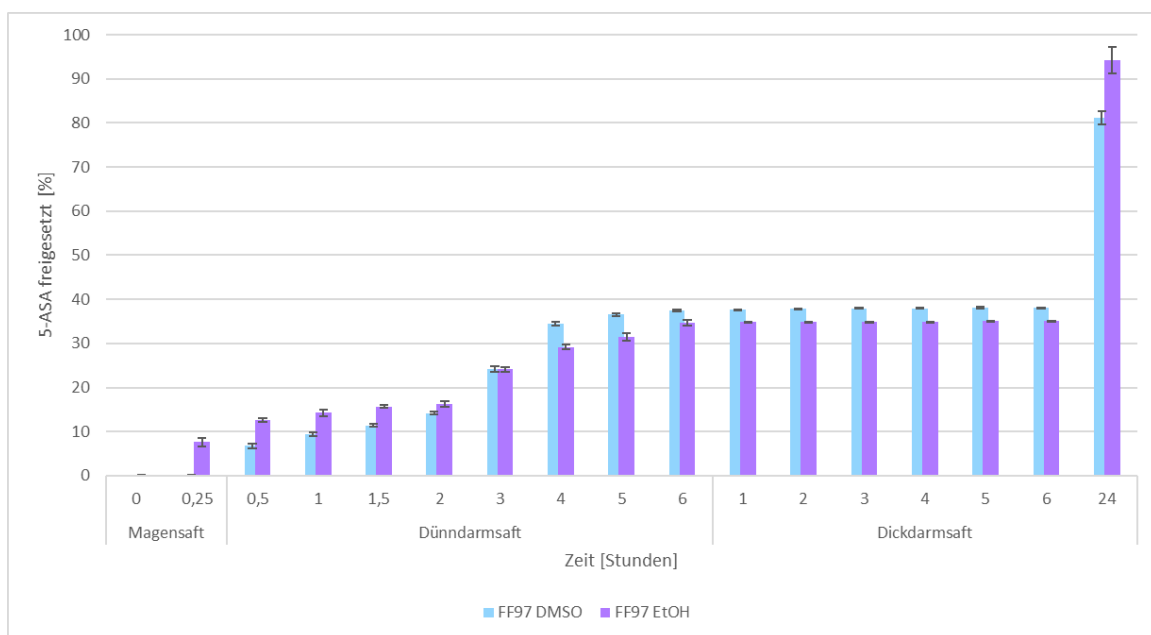


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Endauswertung des Freisetzungsversuchs von Fibrulose F97® DMSO-/EtOH-Pellets

Dieses Verhalten kann durch die geringere Stabilität und Festigkeit der EtOH-Pellets im Vergleich zu den DMSO-Pellets erklärt werden: Während die mit DMSO hergestellten Pellets im Magensaft anfänglich keine Wirkstofffreisetzung aufweisen, steigt die 5-ASA Abgabe aus den DMSO-Pellets im künstlichen Dünndarmsaft sowohl nach 30 Minuten im Medium als auch nach drei und vier Stunden stark an. Nach vier Stunden im Dünndarmsaft ist die Wirkstofffreisetzung bereits um 5,0% höher als die der EtOH-Pellets. Mehr als sechs

Stunden nach Versuchsbeginn stellt sich ein Gleichgewicht der 5-ASA-Freisetzung ein – eine Veränderung des Freisetzungsmilieus (Einbringen in simulierten Dickdarmsaft) wirkt sich nur marginal auf eine weitere Wirkstoffabgabe aus. Für die Dauer des Versuches wird eine maximale Wirkstoffabgabe der Pellets nach 12 Stunden im Freisetzungsmedium von $35,0 \pm 0,5\%$ für EtOH- und $38,0 \pm 0,5\%$ für DMSO-Pellets erreicht. Die DMSO-Pellets weisen überdies konstant eine höhere Freisetzung ab der 4. Stunde im simulierten Dünndarmsaft bis hin zur 6. Stunde im simulierten Dickdarmsaft auf. Nach 24 Stunden im Dickdarmsaft liegt die endgültige Wirkstofffreisetzung der EtOH-Pellets hingegen bei $94,0 \pm 2,0\%$ und die der DMSO-Pellets bei $81,0 \pm 1,0\%$. Die mit Ethanol hergestellten Pellets gaben im Freisetzungsvorversuch beinahe die gesamte Menge an 5-ASA in das Medium ab, während fast 20% des Wirkstoffes in den mit DMSO hergestellten Pellets zurückbleiben.

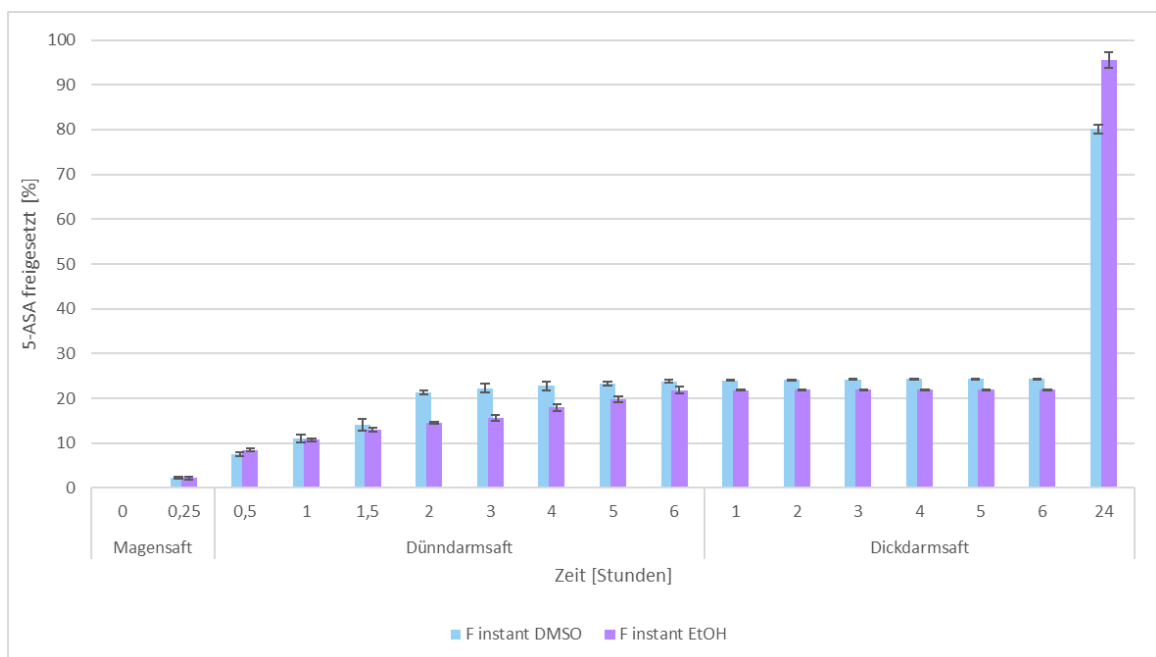


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Endauswertung des Freisetzungsvorversuchs von Fibruline instant® DMSO-/EtOH-Pellets

Abbildung 10 zeigt die Freisetzungsprofile von 5-ASA aus den mit Fibruline instant® hergestellten Pellets in simuliertem Magen-Darmsaft: Im künstlichen Magensaft werden bereits nach 15 Minuten mit $2,0 \pm 0,5\%$ kleine Mengen an 5-ASA sowohl aus den DMSO- als auch aus den EtOH-Pellets freigesetzt. Nach dem Medienwechsel steigt die Freisetzung aus beiden Pellet-Arten innerhalb der ersten halben Stunde im künstlichen

Dünndarmmedium auf $8,0 \pm 1,0\%$ steil an. Während bis zu 90 Minuten Inkubationsdauer das Freisetzungsprofil von beiden Pellet-Arten vergleichbar ist, steigt danach die Freisetzungsrate aus den DMSO-Pellets steil an als jene aus den EtOH-Pellets nur flach. Nach zwei Stunden im Dünndarmsaft beträgt die Freisetzung aus den DMSO-Pellets $21,0 \pm 0,5\%$ bei den DMSO-Pellets, danach steigt sie nur geringfügig auf $23,0 \pm 0,5\%$. Im Vergleich dazu steigt die Menge der freigesetzten 5-ASA der EtOH-Pellets konstant an bis diese nach sechs Stunden ein vorläufiges Maximum bei $21,0 \pm 0,5\%$ erreicht.

Im simulierten Dickdarmmedium wird aus beiden Pellet-Arten keine weitere Acetylsalicylsäure freigesetzt. Nach 24 Stunden Inkubation im Dickdarmmedium waren aus DMSO-Pellets $80,0 \pm 1,0\%$ 5-ASA freigesetzt, während innerhalb des gleichen Zeitraumes aus den EtOH-Pellets $95,0 \pm 1,0\%$ freier Wirkstoff vorliegen und damit nahezu die gesamte Menge an 5-ASA in den künstlichen Dickdarmsaft abgegeben wird. Dagegen verbleiben danach in den DMSO-Pellets noch $20,0 \pm 1,0\%$ des Wirkstoffs.

Der Vergleich der 5-ASA Freisetzungsprofile aus Fibrulose F97® und den Fibruline instant® Pellets in *Abbildung 9* und *Abbildung 10* zeigt innerhalb der üblichen Darmpassagezeiten einen vorteilhafteren Freisetzungsverlauf aus Fibrulose F97®-Pellets im Vergleich zu jenen aus Fibruline instant®. Aus Fibrulose F97®-Pellets wurden i im simulierten Magenmedium bis zu $9,0 \pm 1,0\%$ im simulierten Dünndarmsaft und Dickdarmsaft bis zu $35,0 \pm 0,5\%$ bzw. $38,0 \pm 0,5\%$ Aminosalicylsäure freigegeben. Die Freisetzungsraten aus den Fibruline instant® Pellets lagen weit darunter und erreichten maximal $2,0 \pm 0,5\%$ im künstlichen Magensaft und $21 \pm 0,5\% - 23 \pm 0,5\%$ im künstlichen Dünndarm- und Dickdarmmedium. Nach 24 Stunden sind jedoch die Freisetzungsraten aus beiden Inulin-Arten vergleichbar.

4.3.1 Auswirkung von Inulinase auf den Freisetzungsversuch

Das bakterielle Enzym Inulinase kommt im menschlichen Darm nicht vor, könnte aber als Supplement bei Inulin-basierten Arzneiformen eingesetzt werden. Inulinase ist eine Endohydrolase und katalysiert die Hydrolyse von β -(2,1)-D-fruktosidischen Bindungen. Ob durch Inulinase, welche dem künstlichen Dickdarmmedium zugesetzt wurde (Kapitel 3.4.1) eine theoretisch erhöhte Wirkstofffreisetzung infolge des verstärkten Abbaus der Pellethülle durch das bakterielle Enzym auftritt, sollte im folgenden Versuch untersucht werden.

In *Abbildung 11* ist das Resultat des Versuches am Beispiel von den Fibruline instant® EtOH-Pellets dargestellt – die weiteren dem Freisetzungsversuch zugehörigen Pellets verhalten

sich gleichartig und werden deshalb nicht extra angeführt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der 5-ASA-Freisetzung in Gegenwart von Inulinase und damit auch keine nennenswerten Vorteile. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf die hohe Wasserunlöslichkeit des acetylierten Inulins zurückzuführen, die den Angriff des Enzyms durch erschwerte Konformationsänderung des Substrates behindert und dadurch ein erschwertes oder im Verhältnis zu langsames Aufspalten des Kohlenhydrats bedingt.

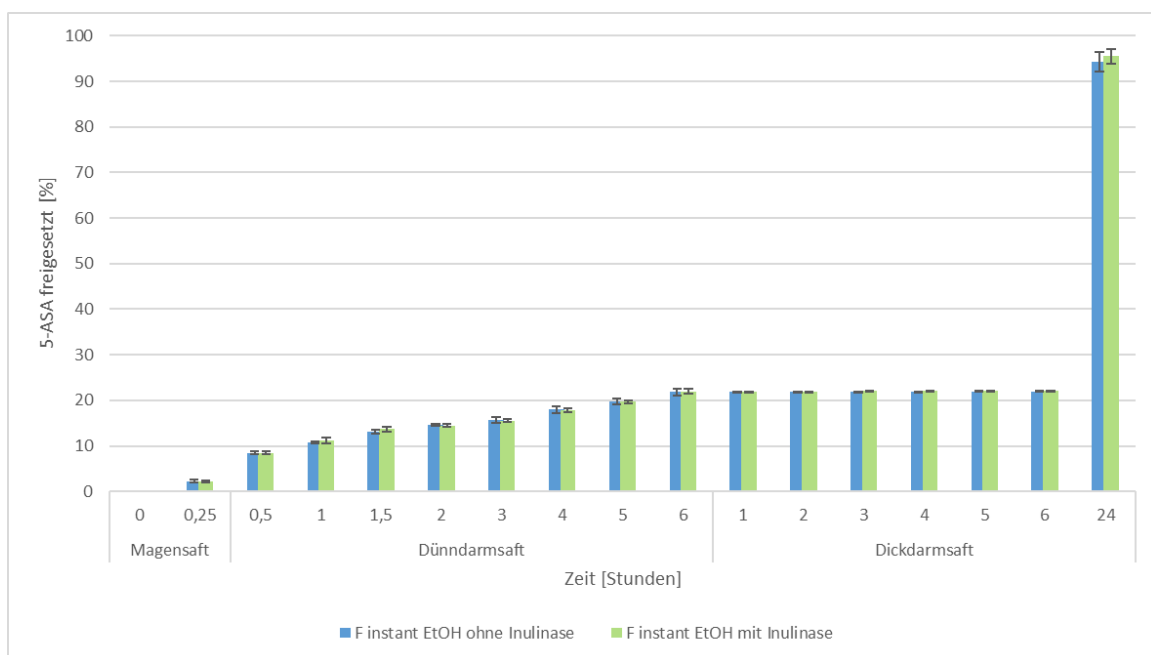


Abbildung 11: Freisetzungsprofil von 5-Aminoslicylsäure aus Fibruline instant® EtOH-Pellets in artifiziellem Magensaft, Dünndarmsaft und Inulinase-supplementiertem Dickdarmsaft.

5 Schlussfolgerungen

Um das Potential von Inulin als Matrix für die gezielte Abgabe des Wirkstoffes 5-Aminosalicylsäure im Darm abzuschätzen, wurden in dieser Arbeit zwei Inuline mit dem Polymerisationsgrad 14 und 20 durch Acetylierung in Hilfsstoffe mit geringerer Wasserlöslichkeit übergeführt. Die Herstellung von wirkstoffbeladenen Pellets mit dem Lösungsmittel DMSO gelang mit beiden Inulinen unabhängig von der Acetylierungsstufe, mit Ethanol als Lösungsmittel konnten aber nur Pellets aus hochacetyliertem Inulin hergestellt werden.

Freisetzungsuntersuchungen des Wirkstoffes in künstlichen Magen- und Darmmedien ergaben, dass die Gesamtfreisetzung nach 24 Stunden aus Ethanol-Pellets 95%, aus DMSO-Pellets nur 80% Wirkstoff beträgt. Im Rahmen dieser Versuchsreihen zeigten jene Pellets, die aus dem acetylierten Inulin Fibrulose F97® (DP20) und Ethanol hergestellt wurden, eine rascher einsetzende Wirkstofffreisetzung als mit DMSO produzierte Pellets. Nach drei Stunden Inkubation war die Freisetzungsrate des Wirkstoffes aus den DMSO-Pellets mit einem Unterschied von 3% im Dünndarmmedium bzw. 2% im Dickdarmmedium aus beiden Pellet-Arten vergleichbar.

Der hohe Acetylierungsgrad von Inulin, welcher wesentlich für die erfolgreiche Herstellung von Ethanolpellets ist, besitzt den Nachteil eines erhöhten Reagenzbedarfes. Die Vorteile der Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel gegenüber DMSO liegen andererseits in der stark verkürzten Herstellungszeit, dem Verzicht auf langwierige Waschschrte und nicht zuletzt in der Schonung von Materialien, die zur Herstellung verwendet werden wie Kunststoffschläuchen und Gefäßen. Mit dem initialen Anstieg der Wirkstofffreisetzung und die insgesamt hohe Wirkstofffreisetzungsrte unterstreicht das Freisetzungsprofil die Anwendbarkeit von Ethanolpellets, welche mit acetylierter Fibrulose F97® hergestellt wurden. Die vorzeitige, möglicherweise unerwünschte Freisetzung von 5-Aminosalicylsäure im Magen könnte durch technologische Modifikationen wie magensaftresistentem Überzug oder Abfüllung in Kapseln verhindert und dadurch die Ethanolpellets weiter optimiert werden. Zusätzlich sollten weitere Modifikationen erfolgen, die eine raschere Wirkstofffreisetzung im Bereich des Darms ermöglichen.

Insgesamt eröffnet die Kombination eines antiphlogistischen Wirkstoffs mit einem präbiotisch wirksamen Kohlenhydrat neue und innovative Therapiestrategien zur

Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Die Optimierung der Herstellung von Mikropartikeln mit Ethanol ist dabei ein erster Schritt für eine vereinfachte, ökologische und kostengünstige Produktion im großen Maßstab.

Literaturverzeichnis

- AbbVie Deutschland GmbH & Co.KG. „Colitis ulcerosa; Erklären, Erkennen, Behandeln, Informieren.“ Wiesbaden, 12 2018.
- . „Morbus Crohn; Erklären, Erkennen, Behandeln, Informieren.“ Wiesbaden, 11 2015.
- Aktories, Klaus, Ulrich Förstermann, Franz Hofmann, und Klaus Starke. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Elsevier GmbH, Deutschland, 2017.
- Boger, Markus C. L., Alicia Lammerts van Bueren, und Lubbert Dijkhuizen. „Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular exo-Inulinase of *Lactobacillus paracasei* Strain W20.“ *Applied and Environmental Microbiology*, 2018.
- Cosucra. *Cosucra*. 2022. <https://www.cosucra.com/natural-raw-material/about-chicory-root/> (Zugriff am 10. 03 2022).
- Dreamstime. 2022. <https://de.dreamstime.com/lizenzfreie-stockfotos-menschliches-verdauungssystem-image4230818> (Zugriff am 30. 10 2020).
- Fritsche, Olaf. *Kompaktwissen Biologie, Mikrobiologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 2016.
- Giri, Saumyakanti, Pallobi Dutta, und Tapan Kumar Giri. „Inulin-based carriers for colon drug targeting.“ *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021.
- Grube, M., Bekers, M., Upite, D., & Kaminska, E. „Infrared spectra of some fructans.“ *Spectroscopy* 16, Januar 2002: 289-296.
- Häussinger, Dieter. *Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Kompendium und Praxisleitfaden*. Düsseldorf, Berlin/Boston: Walter De Gruyter, 2018.
- Kleinbudde, Peter. „Pharmazeutische Pellets; Herstellung, Eigenschaften und Anwendung.“ *Jahrbuch Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, 2004: 161-174.
- Kucharzik, Torsten, Emile Rijcken, Dominik Bettenworth, und Norbert Senninger. *Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen*. Berlin/Boston: Walter De Gruyter GmbH, 2018.
- Lammert, Frank, Petra Lynen Jansen, und Markus M Lerch. *Weissbuch Gastroenterologie 2020/2021*. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH, 2019.

- Mensink, Maarten A., Henderik W. Frijlink, Kees van der Voort Maarschalka, und Wouter L. J. Hinrichs. „Inulin, a flexible oligosaccheride. II: Review of its pharmaceutical applications.“ *Carbohydrate Polymers*, 2015: 418-428.
- Mertens-Keller, Damaris, Matthias Hoffmann, Olaf Rose, und Hartmut Derendorf. „Kampf gegen die chronische Entzündung; Pharmakotherapie des Morbus Crohn.“ *Deutsche Apothekerzeitung DAZ 2014 Nr.29*, 2014: 48.
- Müllner, Verena. „Characterisation of acetylated inulin as potential excipient for the production of 5-amino salicylic acid loaded pellets.“ Universität Wien, Wien, 2020.
- Poulain, N., Dez, I., Perrio, C., Lasne, M. C., Prud'homme, M. P., & Nakache, E. „Microspheres based on inulin for the controlled release of serine protease inhibitors: Preparation, characterization and in vitro release.“ *Journal of Controlled Release* 92, 24. Januar 2003: 27-38.
- PubChem. *PubChem National Center for Biotechnology Information*. 2022.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4075>;
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/387144959>;
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5339> (Zugriff am 10. 03 2022).
- Roberfroid, Marcel B. „Introducing inulin-type fructans.“ *British Journal of Nutrition*, 2005: 13-25.
- Schmidt, Robert F., Florian Lang, und Manfred Heckmann. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010.
- Shoaib, Muhammad, et al. „Inulin: Properties, health benefits and food applications.“ *Carbohydrate Polymers* 147; *Elsevier Review*, 2016: 444-454.
- Stallmach, Andreas, und Maria J.G.T. Vehreschild. *Mikrobiom, Wissensstand und Perspektiven*. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH, 2016.
- Vaupel, Peter, Hans-Georg Schaible, und Ernst Mutschler. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2015.
- Walz, Michael, Diana Hagemann, Marcus Trentzsch, Achim Weber, und Thomas Henle. „Degradation studies of modified inulin as potential encapsulation material for colon targeting and release of mesalamine.“ *Carbohydrate Polymers*, 2018: 102-108.
- Wikipedia. 01. 02 2022. <https://de.wikipedia.org/wiki/Inulin> (Zugriff am 10. 03 2022).

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Einfache Übersicht über den Gastrointestinaltrakt (Dreamstime 2022)	11
<i>Abbildung 2:</i> Morphologie und Vergrößerung der Schleimhautoberfläche des Dünndarms (Vaupel, Schaible und Mutschler 2015).....	12
<i>Abbildung 3:</i> Lokalisation der Entzündungsherde bei Morbus Crohn (AbbVie Deutschland GmbH & Co.KG 2015)	16
<i>Abbildung 4:</i> Lokalisation der Entzündungsherde bei Colitis ulcerosa (AbbVie Deutschland GmbH & Co.KG 2018)	17
<i>Abbildung 5:</i> Chemische Struktur der Wirkstoffe Mesalazin (A), Olsalazin (B) und Sulfasalazin (C) (PubChem 2022).....	18
<i>Abbildung 6:</i> Chemische Struktur von Inulin in der Darstellung nach Haworth (Wikipedia 2022).....	19
<i>Abbildung 7:</i> Bestimmung der Absorptionsmaxima verwendeter Freisetzungsmedien	32
<i>Abbildung 8:</i> ATR FT-IR Spektren von nativem Fibruline instant® (A), Fibruline instant® Ac.St. 6 (B), 1 (C) und 0 (D).	35
<i>Abbildung 9:</i> Graphische Darstellung der Endauswertung des Freisetzungsversuchs von Fibrulose F97® DMSO-/EtOH-Pellets	39
<i>Abbildung 10:</i> Graphische Darstellung der Endauswertung des Freisetzungsversuchs von Fibruline instant® DMSO-/EtOH-Pellets	40
<i>Abbildung 11:</i> Freisetzungsprofil von 5-Aminosilicysäure aus Fibruline instant® EtOH-Pellets in artifiziellem Magensaft, Dünndarmsaft und Inulinase-supplementiertem Dickdarmsaft. .	42

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i> Zusammensetzung einer Chicorée-Wurzel (Cosucra 2022)	19
<i>Tabelle 2:</i> Menge an Essigsäureanhydrid und Inulin für die jeweilige Acetylierungsstufe	23
<i>Tabelle 3:</i> Auflistung der Reagenzien zur Herstellung von wirkstoffhaltigen InAc-Pellets	25
<i>Tabelle 4:</i> Wasserlöslichkeit von einigen ausgewählten Klasse 3 Lösungsmitteln nach EuAB ..	27
<i>Tabelle 5:</i> Pipettierschema zur Herstellung einer Kalibrationsgerade zur Gehaltsbestimmung von 5-ASA	28
<i>Tabelle 6:</i> Auflistung der Reagenzien für die Herstellung von simulierten Magen-Darm-Medien	30
<i>Tabelle 7:</i> Absorptionsmaxima von 5-ASA in den Freisetzungsmedien	32
<i>Tabelle 8:</i> Vergleich des Polymerisationsgrades laut Herstellerangaben und SEC sowie die daraus resultierenden Mengen an Essigsäureanhydrid für die Acetylierung von 10 g nativen Inulin und deren Ausbeute.	33
<i>Tabelle 9:</i> Endgültige Ausbeute an Inulinacetat für den Acetylierungsgrad 1 und 6. Die angegebenen Mengen an Essigsäureanhydrid entsprechen 10g nativem Inulin.	34
<i>Tabelle 10:</i> Menge an Essigsäureanhydrid für 10 g Inulin und Ausbeute von InAc Stufe 0	34
<i>Tabelle 11:</i> Gemessene Schmelzpunkte von nativen und acetylierten Inulinen.	36
<i>Tabelle 12:</i> Ergebnis der Gehaltsbestimmung von DMSO- und Ethanol-Pellets	38