

Untersuchungen zur Herstellung von sterilen Emulsionen mittels des Premix-Membranemulgier-Verfahrens

G.G. Badolato; H. Schubert; H.P. Schuchmann

Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik der Universität Karlsruhe (TH)

Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik

D-76131 Karlsruhe

Kurzfassung

In dieser Arbeit wurde das gleichzeitige Herstellen und Sterilisieren von Emulsionen mittels Premix-Membranemulgieren am Beispiel parenteraler Emulsionen untersucht. Die verwendeten Membranen hatten eine mittlere Porengröße von 0,2 µm und 0,45 µm. Die Ergebnisse zeigen, dass man mit einem zweistufigen Premix-Membranverfahren sowohl sterile als auch hinreichend feine Emulsionen in einem Schritt herstellen kann. Daher ist dieses Verfahren zur Produktion parenteraler Emulsionen geeignet, die steril sein müssen und keine Tropfen größer als 3 µm enthalten dürfen.

Einleitung

Viele Emulsionen haben hohe Herstellungs- und Stabilitätsanforderungen. Parenterale Emulsionen müssen z.B. steril sein und dürfen keine Partikel oder Tropfen mit einem Durchmesser größer als 3 µm nach ihrer Herstellung und nach der Lagerungszeit enthalten, da größere Tropfen zu Embolien führen können. Die Lagerungszeit ist in der Regel zwei Jahre [1].

Parenterale Emulsionen werden direkt in das Blut von Patienten injiziert, wenn der Magen-Darmtrakt umgangen werden muss. Diese Emulsionen dienen zur Ernährung von Patienten oder als Trägersysteme für nicht und schlecht wasserlösliche Arzneimittel.

Normalerweise werden parenterale Emulsionen mittels Hochdruckhomogenisatoren hergestellt. Sie werden durch Wärmebehandlung kombiniert mit Filtration sterilisiert. Ausnahmen bestehen für wirkstoffhaltige Emulsionen, bei denen der Wirkstoff thermisch empfindlich ist. Derartige Emulsionen enthalten üblicherweise einen Dispersphasenanteil von 10 %. Sie benötigen spezielle Materialien für die parenterale Anwendung, zum Beispiel spezielles Lecithin als Emulgator und besonders gereinigtes Pflanzenöl.

Im vorangegangenen Projektjahr wurden unter dem Titel „Untersuchungen zur Herstellung von Emulsionen mit Flachmembranen“ systematische Untersuchungen zum Herstellen von Emulsionen mit Flachmembranen nach der Premix-Methode nach Suzuki [2] durchgeführt. Mittels Premix-Membranemulgieren kann man Emulsionen mit engeren Tropfengrößenverteilungen und geringeren spezifischen Energieeinträgen als mit konventionellen Emulgierprozessen herstellen. Im Vergleich zum klassischen Membranemulgieren erhält man einen höheren Flux. Bei diesem Verfahren wird eine zuvor hergestellte Rohemulsion durch die Poren einer mikroporösen Flachmembran gepresst. Polyamid-Membranen mit einer mittleren Porengröße von 0,8 µm wurden für die

früheren Untersuchungen zum Herstellen von Öl-in-Wasser (O/W)-Emulsionen mit einem Dispersphasenanteil von 30 % eingesetzt.

Die Ergebnisse des ersten Projektjahrs zeigen, dass zur Herstellung einer stabilen Emulsion mit enger Tropfengrößenverteilung eine 2- bis 3-fache Rezirkulation gewählt werden sollte. Der mittlere Tropfendurchmesser (Sauterdurchmesser) der feinen Emulsion liegt nach 3-fachem Emulgieren bei ca. dem doppelten Porendurchmesser der Membran. Einen nur geringen Einfluss auf den Tropfendurchmesser der Feinemulsion hat im Vergleich zum Mehrfachemulgieren die Erhöhung der Druckdifferenz an der Membran im Untersuchungsbereich von 3 bis 12 bar. Für das Premix-Membranemulgier-Verfahren waren entgegen Literaturangaben [2] keine speziellen Emulgatoren notwendig.

Im Berichtszeitraum wurde das Premix-Membranemulgieren als ein alternatives Verfahren für das gleichzeitige Herstellen und Sterilisieren von Emulsionen untersucht. Um eine ausreichende Sterilfiltration erreichen zu können, wurden Membranen mit mittleren Porengrößen von 0,2 µm und 0,45 µm eingesetzt. Als Modellemulsionen dienten einfache O/W-Emulsionen. Zur Beurteilung der Eignung des Verfahrens wurde überprüft, ob die Emulsionen steril sind und ob sie keine Tropfen größer als 3 µm enthalten.

Versuchdurchführung

Für das Herstellen von parenteralen Emulsionen sind spezielle Pflanzenöle sowie spezielle Emulgatoren erforderlich [3]. Für die hier gewählten Modellemulsionen wurde als Emulgator Soja-Lecithin S75 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen) in einer Konzentration von 1,2 % eingesetzt. Das Lecithin wurde in der öligen Phase der Emulsion bei 60°C gelöst. Als ölige Phase wurde gereinigtes Sojaöl 700 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen) gewählt. Der Dispersphasenanteil wurde mit 10 % konstant gehalten. Die wässrige Phase bestand aus bidestilliertem Wasser mit 2,2 % Glycerin. Alle Konzentrationen sind in Prozentanteilen der Gesamtmasse angegeben. Die ölige Phase wurde zunächst in die wässrige Phase mit Hilfe eines Propellerrührers (Umfangsgeschwindigkeit $u = 1,5 \text{ m/s}$, Zeitdauer $t = 3 \text{ min}$) dispergiert und anschließend mit einem Rotor-Stator-System (Ultra-Turrax®, $u = 8,5 \text{ m/s}$, $t = 7 \text{ min}$) behandelt. Die so hergestellte Premix-Emulsion wurde in den Behälter der Anlage (vgl. Abb.3) eingebracht und durch Überlagerung mit Druck-Stickstoff durch die Membran gepresst. Es wurden Polyamid-Membranen (Whatman, Intl. Ltd., Maidstone, England) mit zwei verschiedenen mittleren Porengrößen (0,2 µm und 0,45 µm) eingesetzt. Der Prozess kann durch Rezirkulation der Emulsion mehrmals wiederholt werden. Die transmembrane Druckdifferenz wurde mit 12 bar für alle Versuche konstant gehalten.

Tropfengrößenverteilung

Für die Analyse der Tropfengrößenverteilung der O/W-Emulsionen wurden die Proben mit demineralisiertem Wasser verdünnt und mittels des Weitwinkel-Laserlichtbeugungsspektrometers Coulter LS230 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) mit PIDS-Technologie (polarization intensity differential scattering) vermessen. Als Kennwerte der Tropfengrößenverteilung wurden der Sauterdurchmesser $x_{1,2}$ als mittlerer Tropfendurch-

messer und der maximale Tropfendurchmesser $x_{3,99}$ gewählt; $x_{3,99}$ ist die Tropfengröße, bei der die Summenvolumenverteilung 99 % beträgt.

Untersuchung der physikalischen Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität wurden die Emulsionen bei Raumtemperatur, bei 37°C und 45°C gelagert. Es wurden Proben von jeder Emulsion während der Lagerungszeit genommen und ihre Tropfengrößendichteverteilung ermittelt. Erfahrungsgemäß reicht es für eine Aussage über die physikalische Stabilität aus, wenn die Emulsion einen Monat lang bei 45°C gelagert wird. Zeigt die Emulsion während dieser Zeit keine Zeichen von Phasentrennung und gibt es keine Veränderung der Tropfengrößenverteilung, kann die Emulsion als stabil angesehen werden.

Untersuchung der mikrobiologische Stabilität

Mittels des Premix-Membranverfahrens werden Mikroorganismen ähnlich wie beim Sterilfiltrieren abgetrennt. Die Güte dieser Trennung wird durch den Anteil der jeweils abgetrennten Keime festgelegt. Als Keime wurden *E. coli* K12 (DSM 498) und *Micrococcus luteus* (DSM 20030) eingesetzt.

E. coli K 12 wurde in LB(Luria-Bertoni)-Medium und *Micrococcus luteus* in Nutrient-Medium bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert. Die Mikroorganismen wurden zentrifugiert und in eine isotonische Salzlösung („Ringerlösung“, Merck, Darmstadt) resuspendiert. Die Mikroorganismen-Suspension wurde in die kontinuierliche Phase der Emulsion eingegeben.

Die Keimzahlkonzentration ließ sich nach einer Variante des Oberflächen-Spatelverfahrens [4] bestimmen. Hierzu wurden die Proben verdünnt, damit die entsprechende Keimzahl auf der Platte erreichen werden konnte, und mittels des Spiralplattensystems Eddy Jet (IUL Instruments GmbH, Königswinter) auf Agar ausplattiert. Von jeder Verdünnungsstufe wurden zwei Platten eingesetzt. Als spezifisches Medium für Enterobakterien diente Endo-Agar (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), als spezifisches Medium für *E. coli* K12 bzw. *Micrococcus Luteus* wurde Standard1-Agar verwendet.

Für die Messung der Größenverteilung der Mikroorganismen wurde ebenfalls das Weitwinkel-Laserlichtbeugungsspektrometer Coulter LS230 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) mit PIDS-Technologie (polarization intensity differential scattering) verwendet. Zur Verdünnung der Proben diente Ringerlösung. Für die Auswertung dieser Messungen ist der Brechungsindex des untersuchten Materials erforderlich, der von Bateman et al., 1965 [5] übernommen wurde.

Ergebnisse

Herstellung von parenteralen Emulsionen mittels des Membranemulgier-Verfahrens

Zur Beginn dieser Arbeit wurden die zwei genannten Membranen mit unterschiedlichen mittleren Porengrößen zur Herstellung von parenteralen Emulsionen eingesetzt. Beide Membranen haben sich für diese Anwendung als geeignet erwiesen. Die Emulgiererergebnisse waren gut reproduzierbar. Im Verlauf der Untersuchung mussten neuen Membranen mit der Porengröße 0,2 μm angeschafft werden. Aus bisher noch nicht geklärten Gründen hatten diese Membranen andere Eigenschaften als diejenigen der ersten Lieferung und erwiesen sich als ungeeignet, da die Emulsionen unmittelbar nach der Herstellung brachen. Die Ursache für dieses Verhalten wird derzeit geklärt. Denkbar wäre eine veränderte Oberflächenladung oder eine andere Benetzung der neuen Membranen gegenüber den früher benutzten.

Für die weiteren Untersuchungen wurden zunächst nur Membranen mit einer mittleren Porengröße von 0,45 μm eingesetzt.

Abb.1 zeigt die Volumendichteverteilungen der Emulsionstropfen, die mit dieser Membran mit mittlerer Porengröße von 0,45 μm gewonnen wurde. Die Emulsion wurde dreifach durch die Membran gepresst und nach jedem Lauf eine Probe zur Tropfengrößenbestimmung entnommen. Nach dem zweiten Membrandurchlauf sind die Tropfen der Emulsion kleiner als 3 μm (Sauterdurchmesser $x_{1,2} = 0,9 \mu\text{m}$, maximaler Tropfendurchmesser $x_{3,99} = 2,4 \mu\text{m}$); damit ist das hier geforderte Ziel erreicht. Es gibt kaum Unterschiede zwischen den Volumendichteverteilungen nach dem 2. und 3. Lauf.

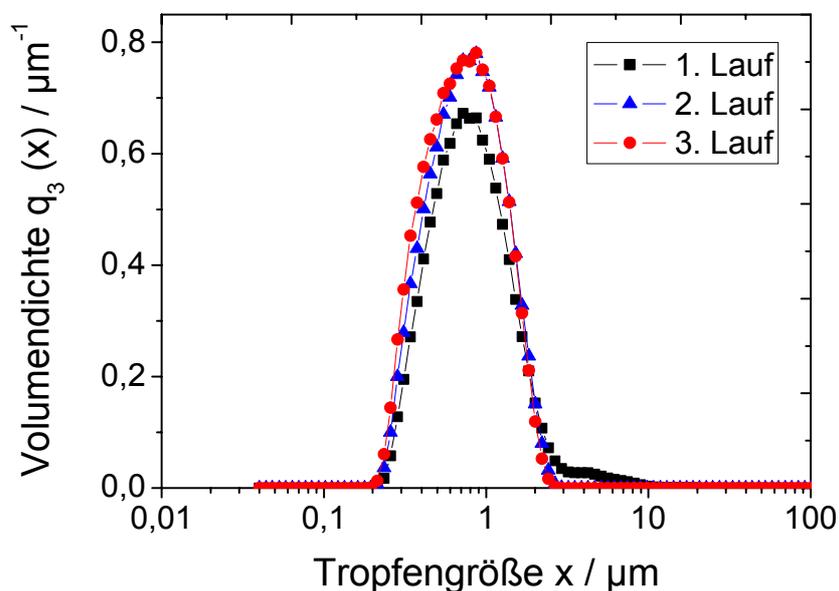


Abb.1: Volumendichteverteilung einer O/W-Emulsion, hergestellt nach dem Premix-Verfahren mit einer Membran der mittleren Porengröße von 0,45 μm , nach ein, zwei und drei nacheinander ausgeführten Durchläufen.

Die hier gezeigten Emulgiererergebnisse stimmen grundsätzlich mit den Ergebnissen des ersten Projektjahrs überein, auch wenn bei den früheren Untersuchungen gröbere

Membranen mit einer mittleren Porengröße von 0,8 μm verwendet wurden. In beiden Fällen ist ein zweiter Durchlauf erforderlich. Dagegen liefert ein dritter Durchlauf keine signifikante Verbesserung des Ergebnisses.

Physikalische Stabilität der Emulsionen

In Abb.2 sind der Sauterdurchmesser $x_{1,2}$ und der maximale Tropfendurchmesser $x_{3,99}$ einer Emulsion während der Lagerungszeit bei drei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur, 37°C und 45°C) dargestellt.

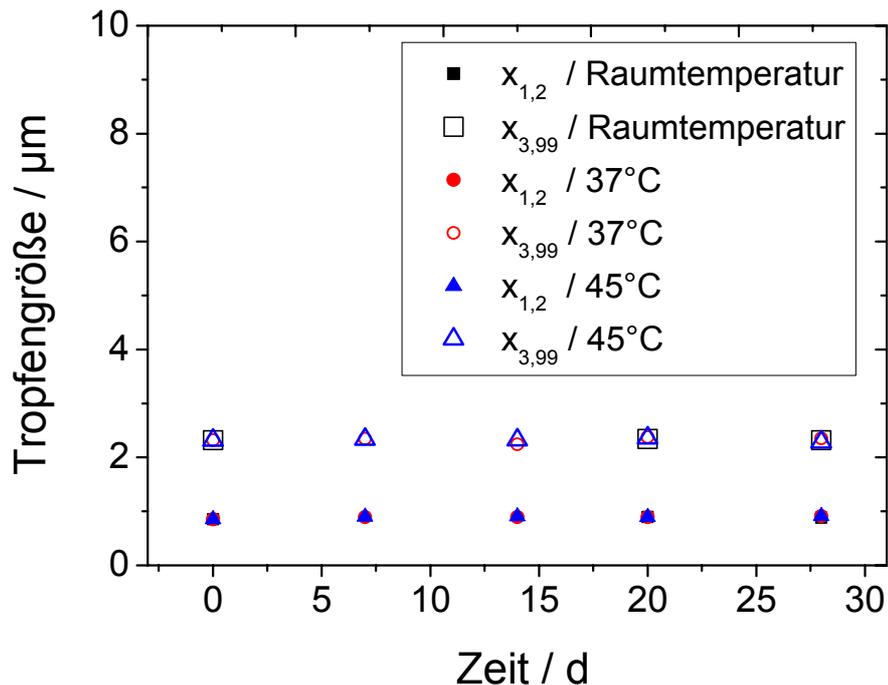


Abb.2: Tropfengrößen $x_{1,2}$ und $x_{3,99}$ einer Emulsion, die mit dem Premix-Membran-Verfahren (Membran-Porengröße 0,45 μm) und zwei Durchläufen hergestellt wurde, im Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

Die Volumendichteverteilung, der Sauterdurchmesser $x_{1,2}$ und der maximale Tropfendurchmesser $x_{3,99}$ der Emulsion bleiben während der Lagerungszeit unverändert sowohl bei Raumtemperatur als auch bei höheren Temperaturen. Damit kann die Emulsion als physikalisch stabil angesehen werden.

Sterilität der Emulsionen

Da die Versuchsergebnisse gezeigt haben, dass zwei Durchläufe durch die Membran genügen, um hinreichend feine Emulsionen herzustellen, wurde das Verfahren so verändert, dass ein kontinuierlicher Betrieb grundsätzlich möglich ist. Anstelle von zwei Durchläufen wurden zwei Module entsprechend Abb.3 in Serie geschaltet. Bei der jetzigen

Konfiguration war wegen einer noch fehlenden Druckregleinheit kein kontinuierlicher Betrieb möglich. Daher wurde der Schlauch für Druck-Stickstoff zunächst mit dem ersten Gefäß verbunden und die Emulsion bei 12 bar durch die Membran in das zweite Gefäß gepresst. Danach wurde das zweite Gefäß mit Druck beaufschlagt und die Emulsion wieder bei 12 bar durch die zweite Membran gepresst.

Nach dem zweiten Membranmodul wurde die Emulsion durch einen Schlauch in einen Erlenmeyerkolben geleitet. Das zweite Membranmodul ist durch einen Schlauch mit einem Erlenmeyerkolben verbunden. Der in Abb. 3 gekennzeichnete Teil der Anlage, also das zweite Membranmodul, Verbindungsschlauch und Erlenmeyerkolben, wurde vor jedem Versuch autoklaviert. Dadurch soll eine unerwünschte Kontamination durch den nicht sterilen Teil der Versuchsanlage möglichst verhindert werden.

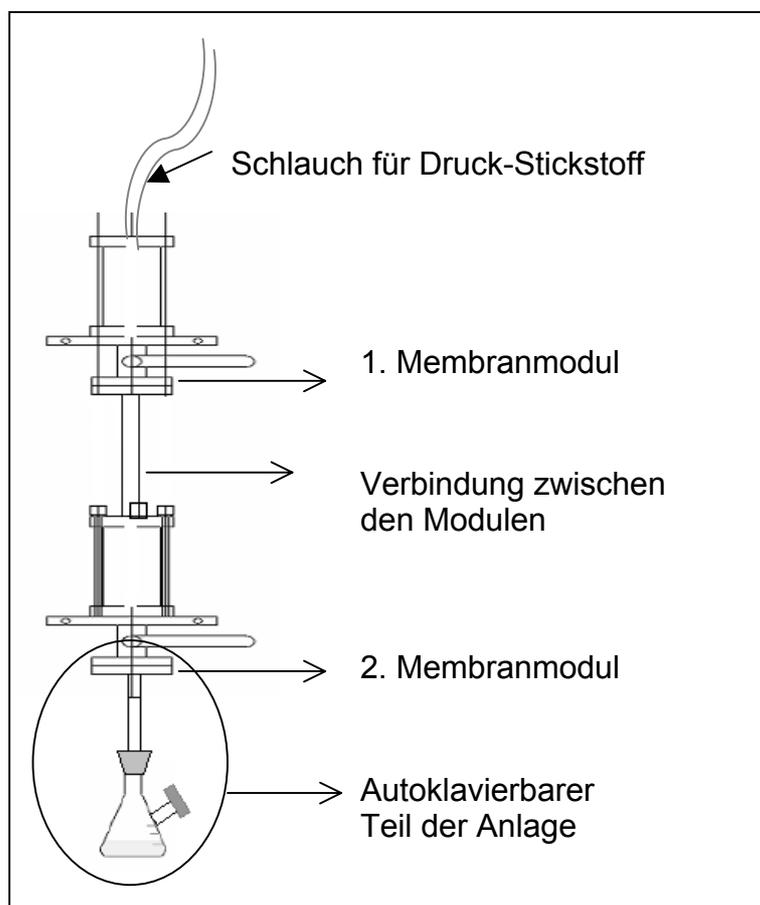


Abb. 3: Zweistufige Premix-Membrananlage. Bei der neuen Konfiguration wird die Emulsion durch zwei Membranmodule geleitet. Der gekennzeichnete Teil der Anlage wird vor jedem Versuch autoklaviert

Größenverteilung der Mikroorganismen

Abb.4 zeigt die Volumendichteverteilungen der hier untersuchten Mikroorganismen. *E. coli* K12 haben den über das Volumen der Keime gemittelten Durchmesser $x_{1,3} = 0,7 \mu\text{m}$,

wobei es sich um Bakterien mit Stäbchenform handelt. *M. Luteus* zeigen eine etwas breitere Größenverteilung als *E. coli* K12. Ursache für dieses Verhalten sind kettenförmigen Anlagerungen der kugelförmigen Mikroorganismen *M. luteus*, die im untersuchten System schwieriger zu dispergieren sind als *E. coli* K12.

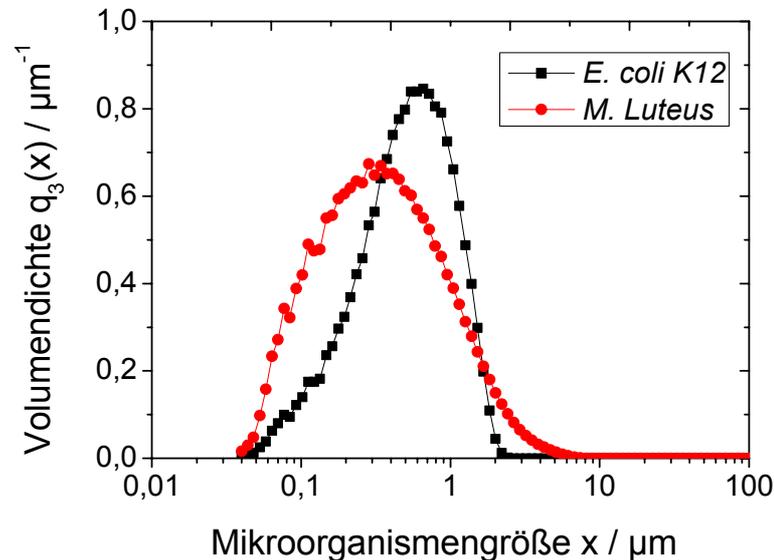


Abb. 4: Volumendichteverteilungen der untersuchten Mikroorganismen im Durchmesser-Bereich zwischen ca. 0,04 μm und 6 μm

Die Abtrennung der Keime durch die zwei Membranmodule wurde für jeden Mikroorganismus getrennt untersucht. Die Anfangskonzentration der Mikroorganismen wurde zwischen 10^6 und 10^7 KBE/mL gewählt.

Die Untersuchungen mit *M. luteus* zeigen, dass die Sterilfiltration grundsätzlich erfolgreich ist, auch wenn die Anlage derzeit noch nicht vollständig steril betrieben werden konnte. Da Standard1-Agar benutzt wurde, konnten daher auch andere Arten von Keimen auf der Agarplatte wachsen.

Derzeit wird die Anlage hinsichtlich einer steriler Arbeitsweise und eines kontinuierlichen Betriebs modifiziert.

Da die Verunreinigungen mit Mikroorganismen experimentell erfasst werden konnten, sind die Versuchsergebnisse dennoch brauchbar. Dies bestätigen auch Experimente mit *E. coli* K12, bei denen spezifische Agarplatten für den Nachweis von Enterobakterien verwendet wurden. In diesen Fällen war die Sterilfiltration von *E. coli* K12 perfekt. Verunreinigungen durch Keime infolge einer nicht vollständig sterilen Arbeitsweise waren auf den Agarplatten nicht erkennbar.

Schlussfolgerung

Das Herstellen von parenteralen Emulsionen mittels Premix-Membranemulgieren wurde mittels Membranen mit mittleren Porengrößen von 0,45 μm erfolgreich realisiert. Die Emulsion muss mindestens zweifach durch die Membran bei 12 bar gepresst werden, um

das gewünschte Ergebnis (max. Tropfendurchmesser $x_{3,99} < 3 \mu\text{m}$) zu erhalten. Allerdings ist der Sauterdurchmesser der Emulsion mit $x_{1,2} = 0,9 \mu\text{m}$ etwas größer als bei üblichen parenteralen Emulsionen. Durch den Einsatz von Membranen mit feineren Poren lässt sich dieser Mangel einfach beheben.

Die Emulsionen sind unabhängig von der Lagerungstemperatur (Raumtemperatur, 37°C und 45°C) während der untersuchten Lagerungszeit von 30 Tagen physikalisch stabil.

Beim zweistufigen Premix-Membranemulgieren findet gleichzeitig eine Sterilfiltration statt. Die in die Voremulsion eingebrachten Mikroorganismen waren in der Feinenemulsion nicht nachweisbar, wurden also vollständig zurückgehalten. Kontaminationen, die auf eine nicht sterile Arbeitsweise zurückzuführen sind, sollen zukünftig durch eine modifizierte Anlage vermieden werden. Grundsätzlich ist damit das Premix-Membranemulgieren zur Herstellung parenteralen Emulsionen geeignet. Da bisher aber nur Laborversuche vorliegen, sind weitere Experimente nötig, um auch Fragen des Membranfouling und der Prozessstabilität während längerer Laufzeiten klären zu können.

Literatur

[1] Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 4. Aufl., Stuttgart, 1991. Zitiert nach Kohlrausch, A.: *Öl-in-Wasser-Emulsionen als intravenöse Applikationsformen für schwer lösliche Wirkstoffe*. Dissertation der Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, 1998, Bonn.

[2] Suzuki, K.; Fujiki, I.; Hagura Y.: *Preparation of Corn Oil/ Water and Water/ Corn Oil Emulsions Using PTFE Membranes*. Food Science Technology, 4, Nr.4, 1998, S.164-167.

[3] Sigg, J.: *Pharmazeutische Emulsionen-Entwicklung, Herstellung und Prüfung*. Hochschulkurs Emulgiertechnik, 2002, Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik, Universität Karlsruhe.

[4] Pichhardt, K.: *Lebensmittelmikrobiologie : Grundlagen für die Praxis*. - 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989.

[5] Bateman, J.B.; Wagman, J.; Carstensen, E.L.: *Refraction and Absorption of light in Bacterial Suspension*. Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere, Band 208, Heft 1, 1965, S. 44-58.