

Abschlussbericht zum DBU-Verbundprojekt

Minimierung des Umwelteintrages von Tierarzneimitteln und antibiotikaresistenten Mikroorganismen durch neue Technologien

Beteiligte:

Prof. Dr. Manfred Kietzmann, Dr. Jessica Meißner (geb. Stahl) (Koordination)

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover,
Bünteweg 17, Haus 218, D-30559 Hannover (*TiHo Pharma*)

Prof. Dr. Nicole Kemper, Dr. Jochen Schulz

Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule
Hannover, Bischofsholer Damm 15, Gebäude 116, D-30173 Hannover (*TiHo Hyg*)

Prof. Dr. Gerd Hamscher, Friederike Hahne

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen,
Heinrich-Buff-Ring 17-19, D-35392 Gießen (*JLU LCB*)

Prof. Dr.-Ing. Arno Kwade, Dr. Jan Henrik Finke

Institut für Partikeltechnik und Zentrum für Pharmaverfahrenstechnik, Technische Universität
Braunschweig, Volkmaroder Str. 5, 38104 Braunschweig (*TUBS iPAT*)

Gregor Heiermann, Florian Kolodziej

Bauer Solutions GmbH, Soestweg 2, D-59269 Beckum (*BAUER*)

Dipl. Ing. agr. Heiner Gerlings

aniMedica GmbH (Livisto), Im Südfeld 9, 48308 Senden-Bösensell (*aniMedica*)

Berichtszeitraum: 11/2015 – 10/2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung / Motivation	3
2	Vorgehensweise / Projektablauf	6
3	Projektergebnisse (einschl. Methodik)	7
3.1	Institut für Partikeltechnik, Technische Universität Braunschweig	8
3.2	Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover	39
3.3	Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen	63
3.4	Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover	92
4	Zusammenfassung	111
5	Öffentlichkeitsarbeit / Veröffentlichungen / Vorträge	116
6	Fazit / Ausblick	118

1 Einführung / Motivation

Die breite Verwendung von antibakteriell wirksamen Stoffen (nachfolgend als Antibiotika bezeichnet) in der Tiermedizin trägt nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass ein signifikanter Eintrag in die Umwelt erfolgt, zur bestehenden Resistenzproblematik bei. Es war daher das Ziel des Kooperationsprojekts, einen Beitrag zur Minimierung des Antibiotikaeinsatzes sowie möglicher Verschleppungen in die Umwelt zu leisten. Das Projekt gliederte sich in zwei Teilbereiche.

In einem Projektteil wurden durch das Institut für Partikeltechnik und Zentrum für Pharmaverfahrenstechnik (iPAT) der Universität Braunschweig neuartige Formulierungen (submikrone Partikel) für die orale Medikation über Futter und Tränkwasser entwickelt, die auf der Basis einer verbesserten Bioverfügbarkeit eine Reduzierung eingesetzter Wirkstoffmengen ermöglichen sollten, was bedingt durch geringere Wirkstoffmengen zu einer Umweltentlastung beitragen würde. Die Untersuchung der Bioverfügbarkeit dieser Formulierungen erfolgte im Vergleich zu im Handel befindlichen Arzneimitteln (*aniMedica GmbH*, Senden-Bösensell) im *Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*.

Im anderen Projektteil wurde ein von der *Bauer Solutions GmbH* (Beckum) vertriebenes System im *Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* untersucht, um zu prüfen, ob mit diesem System eine Verminderung der Keimbelastung und der Biofilmbildung in Tränkwassersystemen erreicht wird und ob ein Effekt auf dem Wasser zugesetzte Wirkstoffe (Stabilität) festgestellt werden kann. Im *Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie* der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden bei Mitarbeit in beiden Teilprojekten analytische Arbeiten durchgeführt, die u.a. die Entstehung von Abbauprodukten aus den verwendeten Wirkstoffen betrafen (s. Abb. 1.1).



Abb. 1.1: Zielsetzungen der Teilprojekte des Projekts

Die Vision des Verbundprojekts war es somit, submikrone Wirkstoffpartikel, die aufgrund ihrer größeren spezifischen Oberfläche eine deutlich verbesserte Löslichkeit und damit gesteigerte Bioverfügbarkeit aufweisen, zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit zu formulieren und deren Vorteile in experimentellen Studien an Schweinen zu belegen. Gleichzeitig soll der in Tränkesystemen bestehenden Problematik der Biofilmbildung, die sowohl die Wirkstoffverfügbarkeit negativ beeinflusst als auch zur Ansiedlung resistenter Bakterien beitragen kann, mit Hilfe einer physikalischen Methode (Bauer-System), welche die Wassermoleküle mittels gepulster elektromagnetischer Signale permanent in Bewegung hält, begegnet werden. Es ist damit das Ziel des Kooperationsprojekts, mit neuartigen Wirkstoffformulierungen und modifizierten Behandlungsbedingungen dazu beizutragen, dass eine verminderte Belastung der direkten Umgebung behandelter Tiere und damit letztlich der Umwelt resultiert. Gleichzeitig soll mit dem Projekt auch ein Beitrag zur Minderung der insgesamt eingesetzten Mengen antibakteriell wirksamer Stoffe gemäß dem Antibiotika-Minimierungskonzept und damit zu einer Verbesserung der Resistenzsituation geleistet

werden. Die nachfolgende Abbildung 1.2 zeigt die Interaktionen zwischen den Projektpartnern im Überblick.

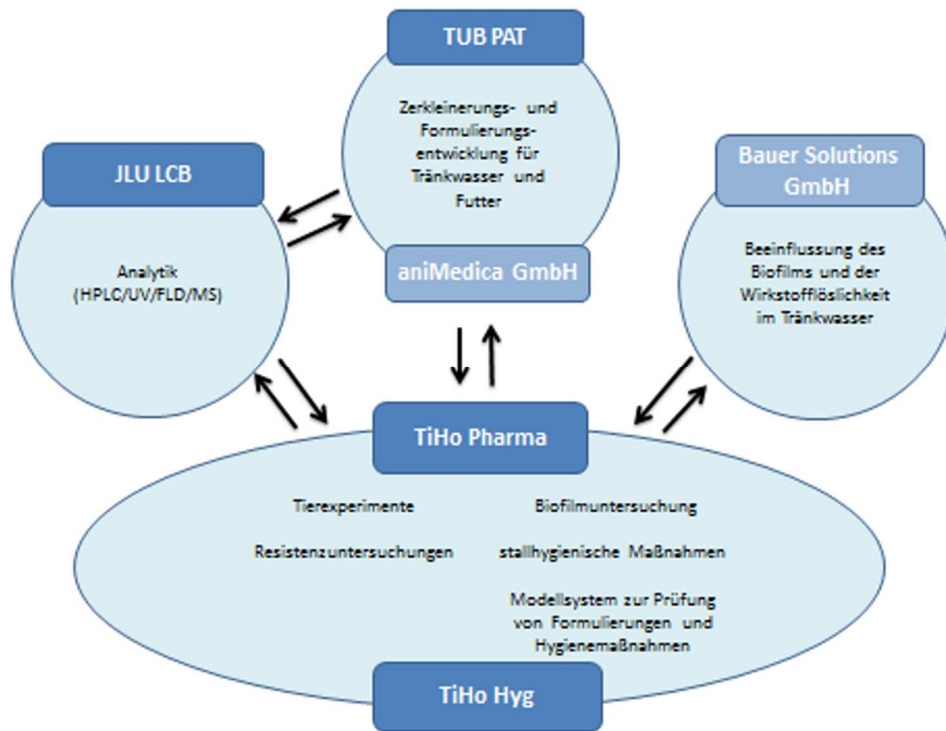


Abb. 1.2: Interaktion zwischen den Projektpartnern

2 Vorgehensweise / Projektablauf

Nachfolgend werden die Aktivitäten der einzelnen Projektpartner und die erzielten Ergebnisse beschrieben. Die Beschreibung der jeweils verwendeten Verfahren und Methoden findet sich im Ergebnisteil.

Im Projektverlauf fanden neben den direkten Interaktionen zwischen den Projektpartnern regelmäßig Projekttreffen (insgesamt neun Treffen in Hannover, Braunschweig, Gießen, Senden und Nottuln) statt, bei denen das weitere Vorgehen miteinander abgestimmt wurde:

22.9.2015	Hannover
17./18.2.2016	Nottuln
24./25.10.2016	Hannover
6./7.4.2017	Gießen
14./15.11.2017	Braunschweig
25./26.4.2018	Hannover
25./26.9.2018	Hannover
28.2./1.3.2019	Senden
7./8.10.2019	Hannover

3 Projektergebnisse

3.1 Institut für Partikeltechnik (iPAT), TU Braunschweig

Schwerpunktmäßig wurden am iPAT Arbeiten zur Formulierungsentwicklung für die orale Medikation für Nutztiere durchgeführt. Zusammen mit den Projektpartnern wurden zu Beginn des Projektes die antibiotischen Wirkstoffe Enrofloxacin sowie Sulfadiazin und Trimethoprim ausgewählt. Sowohl Enrofloxacin als auch die in Kombination verabreichten Wirkstoffe Sulfadiazin/Trimethoprim werden vielfach in der Nutztierhaltung eingesetzt, Studien belegen Umweltbelastungen durch diese Wirkstoffe und ebenso die Bildung von Resistenzen bei Mikroorganismen [1-3].

Hinsichtlich der Produktformulierung stellen die ausgewählten Wirkstoffe sehr unterschiedliche Anforderungen. Enrofloxacin weist eine relativ niedrige Wasserlöslichkeit auf (0,2 g/L), allerdings lässt sich diese durch den Zusatz von Komplexbildnern wie bspw. Essigsäure um das 500-fache steigern [4, 5]. Die Bioverfügbarkeit stellt in der Regel keinen limitierenden Faktor für die Anwendung von Enrofloxacin dar. Im Rahmen dieses Projektes wurde am iPAT eine Formulierungsstrategie der gezielten Wirkstofffreisetzung für Enrofloxacin entwickelt. Über eine pH-sensitive Verkapselung ist es gelungen, die Löslichkeit von Enrofloxacin im Tränkwasser zu minimieren und eine gezielte Freisetzung der Wirkstoffmoleküle im Magen-Darm-Trakt der zu behandelnden Tiere zu ermöglichen.

Im Gegensatz dazu stellt die Wirkstoffkombination Sulfadiazin/Trimethoprim aufgrund ihrer physikochemischen Stoffparameter andere Anforderungen an die Produktformulierung. In der Praxis wird diese Kombination als Mikrosuspension (Handelsname Trimetotat-Suspension, aniMedica GmbH) oder in trockener, fester Form verabreicht. Beim erstgenannten Präparat handelt es sich um eine Suspension des Wirkstoffes Trimethoprim, während die zweite Wirkstoffkomponente Sulfadiazin in Form eines Natriumsalzes hoher Löslichkeit beigemischt wird (Na-Sulfadiazin). Der Fokus bei der Formulierungsentwicklung wurde auf den Wirkstoff Trimethoprim gerichtet, Studien belegen, dass die Bioverfügbarkeit partikulären Trimethoprim gering ist [6]. Entsprechend der Idee, die Bioverfügbarkeit durch Verringerung der Partikelgröße und damit Vergrößerung der spezifischen Oberfläche zu verbessern, wurde Trimethoprim zerkleinert und als Nanosuspension formuliert. Entscheidend für die Möglichkeit der Verbesserung der Bioverfügbarkeit beim Einsatz in den Tieren ist es notwendig, die durch diese Prozesse eingestellte, nanopartikuläre Struktur auch in der verabreichten Arzneiform zu erhalten, sodass diese nanopartikuläre Wirkstoffpartikel freisetzt, die durch Ihre große Oberfläche eine schnelle Freisetzung erhalten haben. Um dies zu prüfen und im Sinne einer praxisorientierten Anwendungsmöglichkeit wurde diese Nanosuspension über einen weiteren Entwicklungsschritt zu einer festen Form weiterverarbeitet. Dabei wurden mit der Sprühtrocknung, Wirbelschichtgranulation und Hochenergiegranulation unterschiedliche Granulationsverfahren wissenschaftlich untersucht und bezüglich Ihres Erhalts der Nanopartikularität des Trimethoprim, der erreichten

Produktpartikelgrößenverteilung und der Änderung des Freisetzungsverhaltens untersucht. Da im Laufe des Projektes Hinweise auf eine unkontrollierte Rekrystallisation im Magen gesammelt wurde, wurde ebenfalls ein magensaftresistentes Coating (Filmüberzug) der Granulate untersucht.

Ausgewählte Zubereitungen wurden oral über das Futtermittel verabreicht und anschließend im Magen-Darm-Trakt des behandelten Tieres freigesetzt.

Formulierungsentwicklung mit dem Wirkstoff Enrofloxacin

Für die Formulierung des Wirkstoffes Enrofloxacin wurde die Strategie der Einbettung des Wirkstoffes in eine polymere Matrix durch ionische Komplexierung verfolgt, sodass dieser nach Möglichkeit ohne Beeinträchtigung der Bioverfügbarkeit über einen pH-sensitiven Mechanismus gezielt freigesetzt werden kann und ein unkontrollierter Umwelteintrag minimiert wird. Die ionische Komplexierung basiert auf der Ausnutzung pH-abhängiger Ladungszustände des Enrofloxacin-Moleküls mit entgegengesetzt geladenen Polymerspezies.

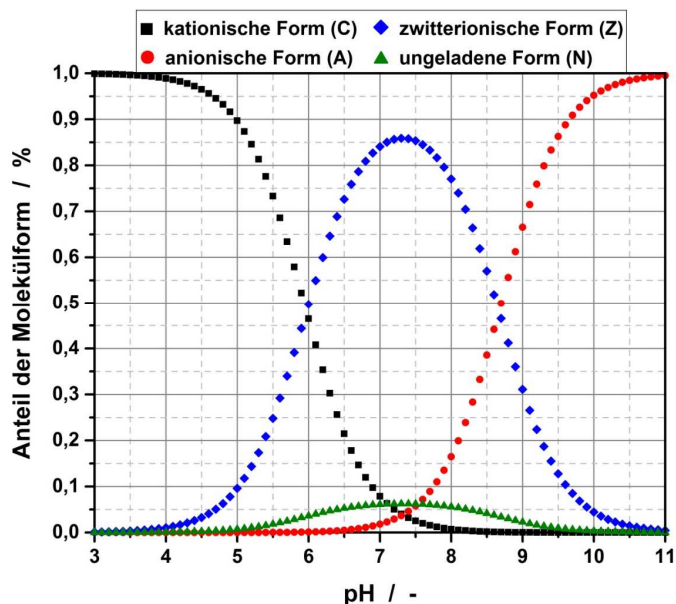


Abbildung 3.1.1: Ladungszustände des Enrofloxacin Moleküls in Abhängigkeit vom pH-Wert

Abbildung 3.1.1 stellt den Anteil der Ladungszustände der Enrofloxacin-Moleküle als Funktion des pH-Wertes dar. Das Enrofloxacin-Molekül liegt nur zu geringen Anteilen in ungeladener Form vor, im neutralen pH-Bereich dominiert die zwitterionische Form, im sauren die kationische und im alkalischen die anionische Form. Für die Komplexierung wird die Polyacrylsäure Carbopol 971 (C971) eingesetzt, die ebenfalls einen pH-abhängigen Ladungszustand aufweist. Im pH-Bereich zwischen 4 und 6 tritt die Komplexbildung mit Enrofloxacin aufgrund unterschiedlicher Ladungsvorzeichen ein.

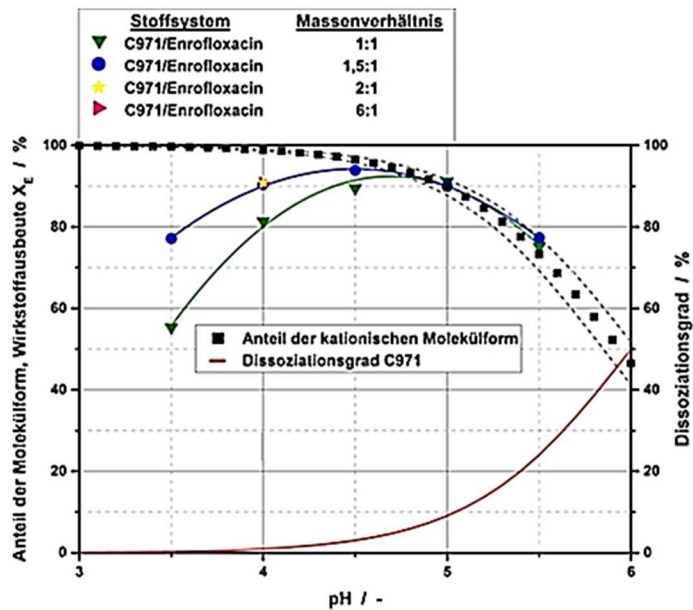


Abbildung 3.1.2: Dissoziationszustände von Enrofloxacin und Carbopol 971 sowie Wirkstoffausbeuten in Abhängigkeit des pH-Wertes bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen

Abbildung 3.1.2 stellt die pH-Abhängigkeit der Wirkstoffausbeute dar. Damit die Komplexbildung möglichst vollständig ablaufen kann, müssen Polymer und Wirkstoff unterschiedliche Ladungsvorzeichen aufweisen. Der Anteil der kationischen Molekülform der Wirkstoffes Enrofloxacin nimmt mit abnehmendem pH-Wert zu und liegt unterhalb von pH 4 bei 100 %. Im Gegensatz dazu nimmt der Dissoziationsgrad von C971 ab pH 4 zu, sodass sich ein enges Prozessfenster des pH-Wertes für die ionische Komplexbildung ergibt. Das Maximum der Wirkstoffausbeute liegt unabhängig vom Wirkstoff-Polymer-Verhältnis zwischen pH 4,5 und 5. Im Bereich kleinerer pH-Werte ist der Dissoziationsgrad von C971 zu gering, die Anzahl der verfügbaren Ladungspunkte ist stark verringert, sodass die Ausbeute sinkt. Bei höheren pH-Werten überwiegt die zwitterionische Molekülstruktur des Enrofloxacins, welche eine geringere Affinität zur Komplexbildung besitzt, die Ausbeute sinkt ebenfalls. Im optimalen pH-Bereich können durch die ionische Komplexbildung über 90 % der Wirkstoffmoleküle verkapselt werden.

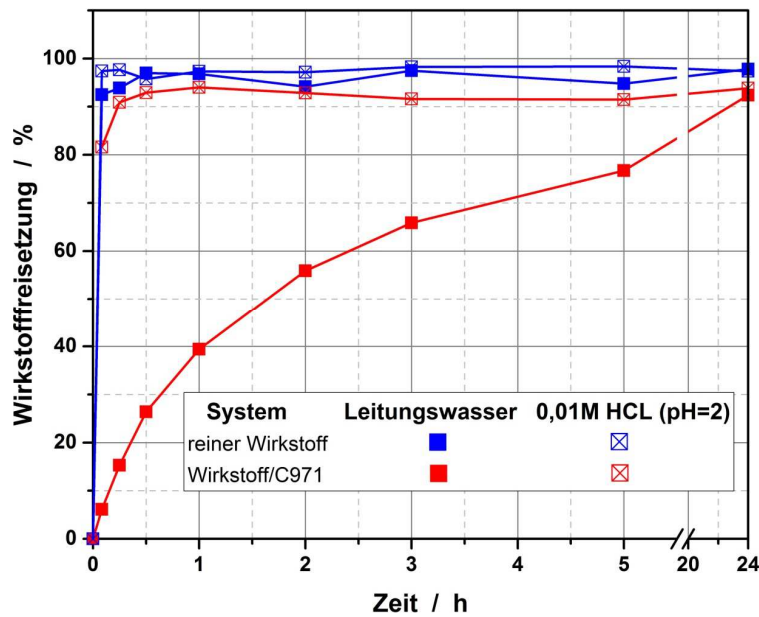


Abbildung 3.1.3: Wirkstofffreisetzung unterschiedlicher Enrofloxacin-Formulierungen in Leitungswasser und 0,01 M HCl (entspricht pH-Wert im Magen, nüchterner Zustand)

Abbildung 3.1.3 stellt die Wirkstofffreisetzung unterschiedlicher Formulierungen als Funktion der Zeit in Leitungswasser und 0,01 M HCl (Simulation des pH-Wertes des Magens) dar. Der reine Wirkstoff löst sich sowohl in Leitungswasser als auch in 0,01 M HCl innerhalb von wenigen Minuten auf. Ebenso zeigt der Komplex aus Enrofloxacin und C971 eine sofortige Auflösung in 0,01 M HCl. Im Gegensatz dazu ist die Freisetzung in Leitungswasser stark verzögert, nach 24 Stunden wurde die vollständige Freisetzung im Wasser gemessen. Demnach erweist sich die Verkapselung des Wirkstoffes mit C971 als geeignete Methode, um die Auflösungskinetik im Tränkwasser zu verlangsamen und so die unkontrollierte Freisetzung zu minimieren. In einem weiteren Freisetzungsversuch wurde die Verabreichung des Wirkstoffes über das Tränkwassersystem abgebildet. Für diesen wurde eine mittlere Verweilzeit von maximal einer Stunde im Rohrsystem angenommen und anschließend der pH-Wert in Anlehnung an das Milieu im Magen sprunghaft auf pH 2 verändert (Abbildung 3.1.4).

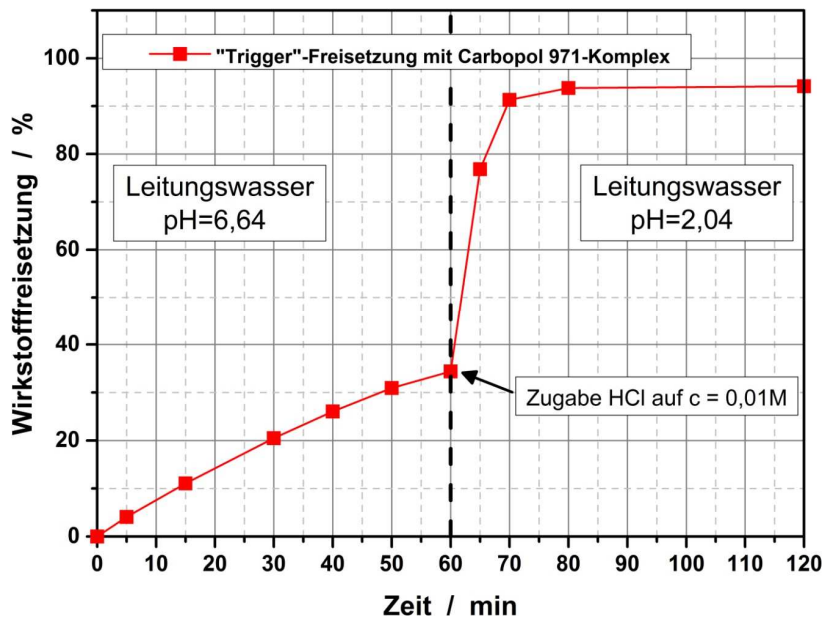


Abbildung 3.1.4: Wirkstofffreisetzung des Enrofloxacin-Carbopol Komplexes mit pH-Änderung

Nach Veränderung des pH-Wertes löst sich der Wirkstoffkomplex innerhalb von wenigen Minuten auf. Somit ist davon auszugehen, dass sich der Wirkstoff im Magen der Tiere schnell auflösen wird und die Bioverfügbarkeit nicht negativ beeinflusst wird. Abbildung 3.1.4 lässt erkennen, dass nach 60 Minuten im Leitungswasser ca. 35 % des Wirkstoffes freigesetzt wurden. Demnach kann die Wirkstoffkonzentration im Tränkwasser deutlich minimiert werden, sodass der Umwelteintrag und möglicherweise auch die Verlagerung in Biofilme verringert werden.

Formulierungsentwicklung einer Suspension mit der Wirkstoffkombination Sulfadiazin/Trimethoprim

Zur Vorbereitung der Formulierungsentwicklung wurde die Trimetostat-Mikrosuspension von aniMedica untersucht. Diese enthält die Wirkstoffe Na-Sulfadiazin zu 435 g/L und Trimethoprim 80 g/L, welches dem Verhältnis von 5:1 bei der therapeutischen Anwendung entspricht. Na-Sulfadiazin besitzt eine sehr hohe Löslichkeit (500 g/L), sodass die enthaltene Menge komplett in gelöster Form vorliegt [7]. Im Gegensatz dazu besitzt Trimethoprim eine relativ geringe Löslichkeit von 0,4 g/L [8], sodass dieser Anteil als Feststoff und damit das Gesamtsystem als Suspension vorliegt. Die Partikelgrößenanalyse der Trimetostat-Suspension bestätigt, dass der Wirkstoff in Form von Mikropartikeln mit einem Medianwert von $x_{50,3}$: 12 μm vorliegt. Übergreifend ist die Zerkleinerungsaufgabe auf den Wirkstoff Trimethoprim begrenzt. Im ersten Schritt der Formulierungsentwicklung wurde das Zeta-Potential der Trimethoprimpartikel in Wasser als Funktion des pH-Wertes gemessen.

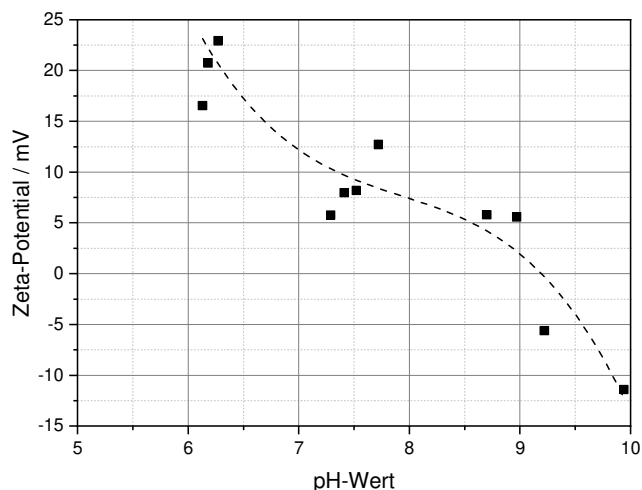


Abbildung 3.1.5: Zeta-Potential von Trimethoprim in Wasser als Funktion des pH-Wertes ($I=0,01$)

Der Verlauf des Zeta-Potentials ist in Abb. 3.1.5 dargestellt. Als charakteristisches Merkmal lässt sich der isoelektrische Punkt bei einem pH-Wert von ca. 9,2 identifizieren. Im neutralen pH-Bereich weist das Zeta-Potential einen Wert ca. 10 mV auf. Damit scheidet die rein autogene, elektrostatische Stabilisierung der Partikel gegen Agglomeration aus. Für eine ausreichende elektrostatische Abstoßung muss die Potentialbarriere mindestens 25 mV betragen. Darüber hinaus stellt die hohe Ionenkonzentration des gelösten Na-Sulfadiazins eine weitere Limitierung der elektrostatischen Stabilisierung dar, da die elektrische Doppelschicht dadurch komprimiert wird und geringere Abstoßungskräfte resultieren. Daraus folgt, dass die Wirkstoffpartikel über eine sterische Barriere gegen Agglomeration stabilisiert werden müssen. Für die Formulierungsentwicklung wurde ein systematisches Screening mit verschiedenen Stabilisatoren in Form kleinstskaliger Zerkleinerungsversuche mit Polymeren und Tensiden in einer Planetenkugelmühle durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass der alleinige Einsatz von Tensid oder Polymer keine ausreichende Stabilisierung gegen Agglomeration darstellt. Im Gegensatz dazu hat sich die Kombination des ionischen Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS) mit dem Polymer Hydroxypropylcellulose (HPC) bewährt, um die kolloidale Stabilität der zerkleinerten Wirkstoffpartikel zu gewährleisten. Bei dieser Kombination kann von einem elektrosterischen Stabilisierungsmechanismus ausgegangen werden. Messungen des Zeta-Potentials haben dies durch Werte im Bereich von -45 mV bestätigt. Die Kombination aus SDS und HPC wurde im weiteren Verlauf der Formulierungsentwicklung hinsichtlich der Additivkonzentration optimiert, sodass nur so viel Stabilisator wie notwendig für die Zerkleinerung eingesetzt werden musste (i.e. HPC zu 25 Gew.-% des Wirkstoffanteils, SDS zu 2,5 Gew.-% des Wirkstoffanteils).

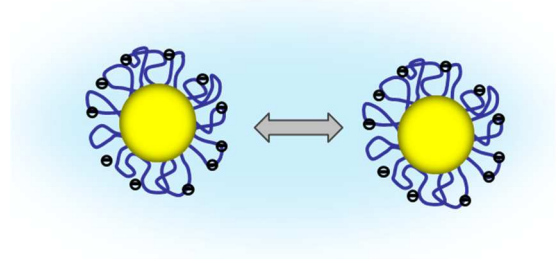
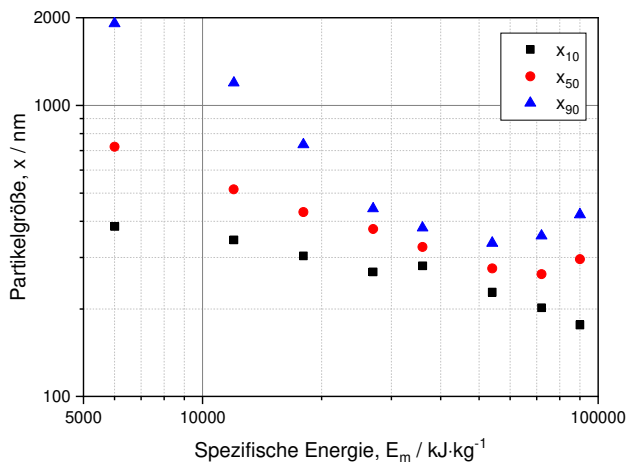


Abbildung 3.1.6: links: Zerkleinerungsverlauf von Trimethoprim, charakteristische Partikelgrößenkennwerte als Funktion des spezifischen Energieeintrags; rechts: Modellvorstellung der Anlagerung von Polymeren (HPC, dunkelblau) und anionischem Tensid (SDS, schwarz) an Trimethoprim-Partikel mit resultierender Abstoßung durch gleichnamige Oberflächenladungen

Trimethoprim wurde zusammen mit den Additiven SDS und HPC in einer Rührwerkskugelmühle zerkleinert. Abb. 3.1.7 stellt den Verlauf der Partikelgrößenkennwerte $x_{10,3}$, $x_{50,3}$ und $x_{90,3}$ als Funktion des spezifischen Energieeintrags dar. Bereits nach geringen spezifischen Energieeinträgen werden Partikelgrößen unter $1\ \mu\text{m}$ erreicht. Im weiteren Verlauf der Zerkleinerung wurde die Partikelgrößenverteilung immer enger, bis der Zerkleinerungsversuch bei einem Medianwert unter $300\ \text{nm}$ beendet wurde.

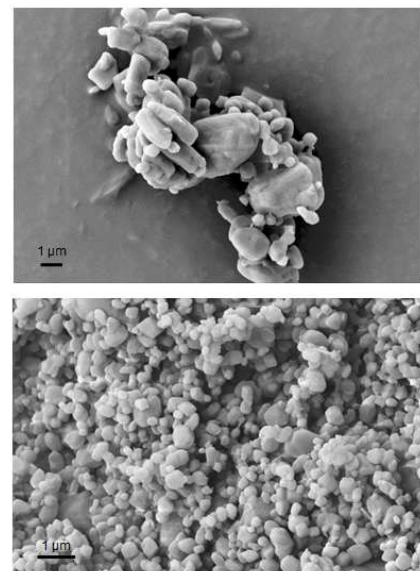
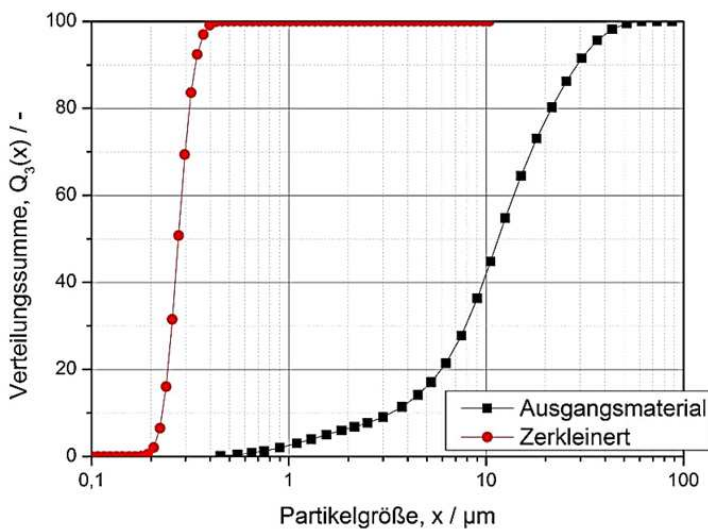


Abbildung 3.1.7: links: Partikelgrößenverteilungen vor und nach der Zerkleinerung, rechts: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von oben: mikronisiertem Trimethoprim (Ausgangsmaterial), unten: in Rührwerkskugelmühle zerkleinertem Trimethoprim

Die hergestellte Wirkstoffsuspension weist eine enge Partikelgrößenverteilung im submikronen Größenbereich auf (vgl. 3.1.7). Im Vergleich zum Ausgangsmaterial wurde die

mittlere Partikelgröße um den Zerkleinerungsgrad von 40 verringert und dadurch die theoretische spezifische Oberfläche der Wirkstoffpartikel von $0,82 \text{ m}^2/\text{g}$ auf $19,2 \text{ m}^2/\text{g}$ vergrößert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen, dass das Ausgangsmaterial in Form mikroskaliger Partikel vorliegt (vgl. 3.1.7, rechts oben). Durch die Beanspruchung in der Rührwerkskugelmühle werden die organischen Kristalle echtzerkleinert. Abb. 3.1.7, rechts unten, zeigt die zerkleinerten Partikel, die dem Eindruck der Partikelgrößenverteilung (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, links) entsprechen.

Einfluss des Bauersystems auf die Sättigungslöslichkeit von Trimethoprim in Wasser

Um den Einfluss des Bauersystems, das in Tränkeleitungssystemen für die Verhinderung und den Abbau von Ablagerungen u.a. von Biofilmen, eingesetzt wird, auf die Löslichkeit von schwerlöslichem Trimethoprim zu untersuchen, wurde in einem Langzeitversuch eine übersättigte Lösung auf Basis von vollentsalztem Wasser durch ein Bauersystem im Normalbetrieb mithilfe einer Peristaltikpumpe in und aus einem temperierten Vorlagegefäß gefördert (Abb. 3.1.8, rechts).

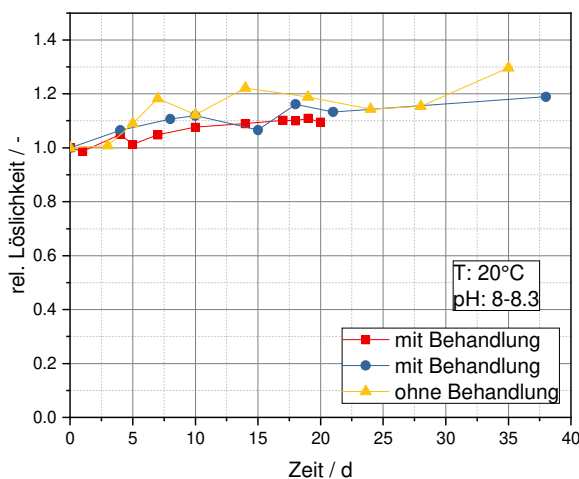


Abbildung 3.1.8: links: Verlauf der Trimethoprimkonzentration über die Zeit, Vorlage temperiert auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 8,0-8,3$; zwei identische Versuchsdurchläufe mit Behandlung, ein Referenzverlauf ohne Behandlung; rechts: Versuchsaufbau zur Analyse des Einflusses des Bauersystems auf die Löslichkeit von Trimethoprim in vollentsalztem Wasser

Die Löslichkeit des Trimethoprims steigt mit zunehmender Zirkulationszeit reproduzierbar leicht an (ca. 10-20% über 20 Tage). Es wurden jedoch gegenüber einem Versuch ohne Betrieb des Bauersystems keine abweichenden Konzentrationen gefunden. Demnach ist von einem Fehlen eines relevanten Einflusses des Bauersystems auszugehen.

Kolloidale Stabilität von Trimethoprim-Nanosuspensionen mit Na-Sulfadiazin

Da Trimethoprim in Kombination mit Sulfadiazin zum Einsatz kommt und dies in einer Arzneiform stattfinden soll, wurde im nächsten Schritt der Formulierungsentwicklung der zerkleinerten Trimethoprim-Suspension der Wirkstoff Na-Sulfadiazin hinzugegeben und deren physikochemisches Verhalten in der Suspension untersucht.

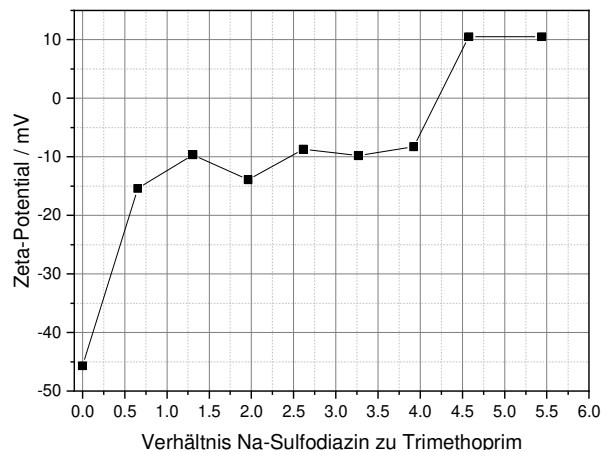


Abbildung 3.1.9: links: Zeta-Potential von Trimethoprim in Abhängigkeit der Konzentration von Na-Sulfadiazin; rechts: reversible Flokkulation einer gelagerten Trimethoprim-Nanosuspension mit Na-Sulfadiazin

Abb. 3.1.9 stellt das Zeta-Potential der Trimethoprim-Partikel als Funktion der zugegebenen Menge an Na-Sulfadiazin dar. Durch die Erhöhung der Ionenstärke wird die diffuse Doppelschicht der Partikel komprimiert, sodass der Betrag des Zeta-Potentials abnimmt und dieses sogar ab einer bestimmten Konzentration durch die Anlagerung von Kationen umgedreht wird. Die hohe Salzfracht führt zur Flockung der Partikel in der Suspension, da die elektrostatische Barriere gegen Agglomeration nicht mehr ausreichend ist. Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Agglomeration der Trimethoprimpartikel reversibel ist. Bei Verdünnung lassen sich die Partikel redispersieren, sodass der kolloidale Zustand erhalten bleibt. Die Partikelgrößenanalyse der verdünnten Suspension mit Na-Sulfadiazin liefert einen Medianwert von 400 nm (vgl. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dieses Verhalten ist durch die sterische Barriere des Polymers begründet. Das Polymer ist an der Partikeloberfläche adsorbiert und verhindert den direkten Kontakt, sodass nur „Flocken“ entstehen, welche bei verringerter Ionenstärke wieder zu einer kolloidalen Suspension zerfallen. In der Kombination mit der 5-fachen Menge Sulfadiazin entspricht die Wirkstoffzusammensetzung der Trimetostat-Suspension von aniMedica. Ein wichtiges Kriterium für die Anwendung in weiteren Versuchen ist die Lagerstabilität der Suspension bei verschiedenen Temperaturen.

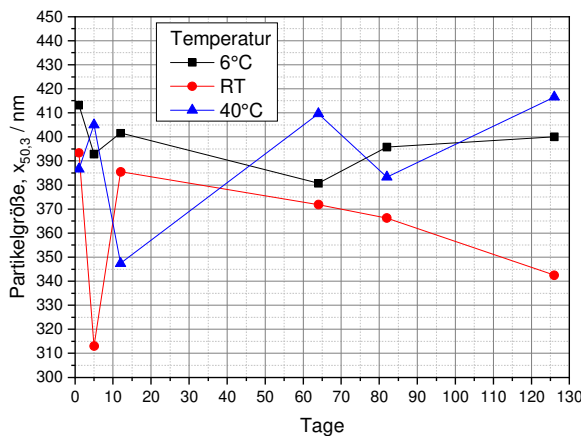


Abbildung 3.1.10: Partikelgröße von submikroner Trimethoprim-Suspension (mit Na-Sulfadiazin) über die Zeit bei verschiedenen Lagertemperaturen

Abb. 3.1.10 stellt die Partikelgröße $x_{50,3}$ der Na-Sulfadiazin/Trimethoprim-Formulierung als Funktion der Lagerzeit bei 6 °C, Raumtemperatur und 40 °C dar. Trotz Schwankungen zeigt die Beobachtung über mehr als 120 Tage keine deutliche Veränderung des Medianwertes der Partikelgrößenverteilung. Es kann die Aussage getroffen werden, dass die Partikelgröße im untersuchten Temperaturfenster stabil, insbesondere stabil gegen Reifungsprozesse und stabile Agglomeration/Aggregation ist. Damit konnte eine Veränderung der Partikelgröße über den untersuchten Zeitraum ausgeschlossen werden und die Formulierung für weiterführende Untersuchungen und Tierversuche an die Projektpartner weitergegeben werden. Die neue Formulierung wurde im direkten Vergleich zum kommerziellen Referenzprodukt von der AG Kietzmann in Tierversuchen erprobt. Es wurde mit der Fragestellung geprüft, ob die Verringerung der Partikelgröße in diesem Fall zu einer Verbesserung der Bioverfügbarkeit führt. Darüber hinaus wurden Proben von der AG Hamscher auf ihre chemische Stabilität untersucht. Es wurde geprüft, ob der Wirkstoff durch die mechanische Beanspruchung in der Mühle und in der Formulierung mit stabilisierenden Additiven degradiert, was nicht der Fall war.

Kristallisationsverhalten von Trimethoprim

Das Kristallisationsverhalten von Trimethoprim in Medien unterschiedlicher pH-Werte wurde untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund der ca. 50-fach höheren Löslichkeit von Trimethoprim in sauren Lösungen ($\text{pH} < 6$; $\text{pKs}1 = 6,76$; gemessene Löslichkeit ca. 7,5 g/L, Abb. 3.1.11) deutliche Umkristallisationseffekte zeigte (Abb. 3.1.12, links). Diese zeigten eine stäbchen- bzw. nadelartige Struktur, wohingegen die im Rohmaterial vorliegen kompakte Kristallform im basischen Bereich beibehalten wurde (Abb. 3.1.12, rechts). Diese Untersuchungen zeigen die Herausforderung, dass bei der Applikation von Trimethoprim-suspensionen bei der Passage des Magens Änderungen der Kristallform auftreten können. Entsprechend sollen im weiteren Verlauf bei der Erforschung der aus den Nanosuspensionen herzustellenden Granulate auch magensaftresistente Coatings untersucht werden.

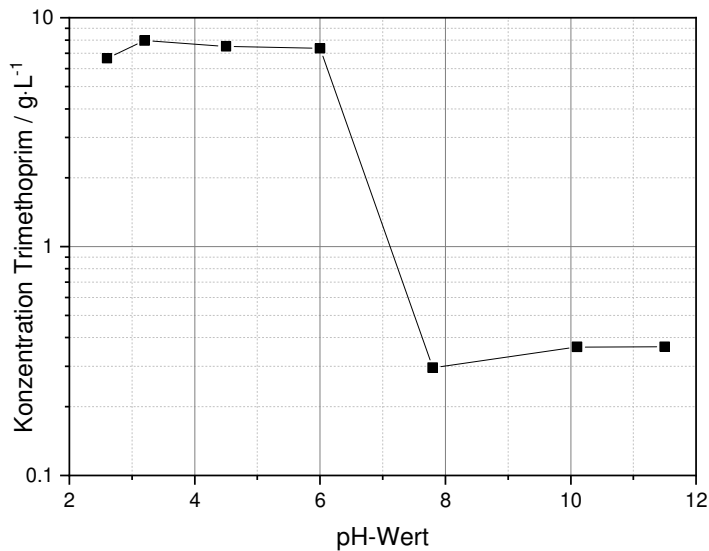


Abbildung 3.1.11: Löslichkeit von Trimethoprim in wässrigen Medien unterschiedlichen pH-Wertes

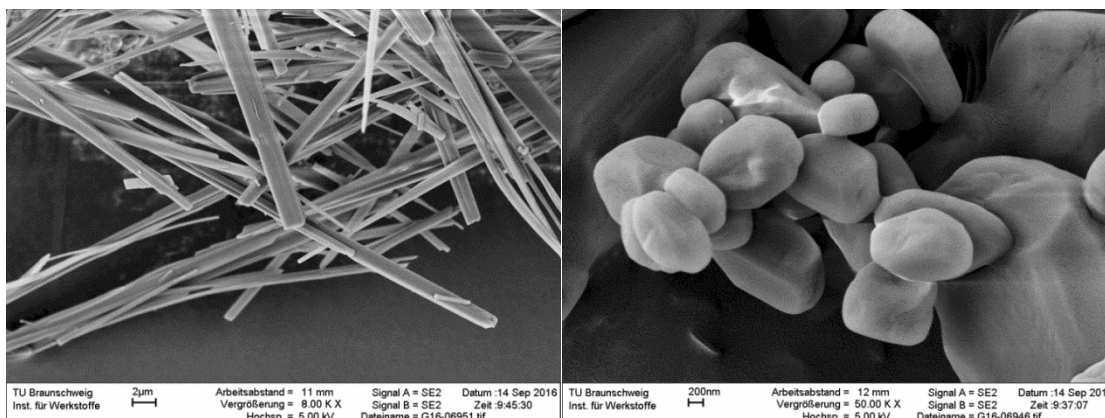


Abbildung 3.1.12: REM-Aufnahmen der Kristallformen separierter Trimethoprim-Kristalle aus wässrigen Medien unterschiedlichen pH-Wertes: links: saurerer $pH < 6$; rechts: alkalischer $pH > 7$

Untersuchung des Einflusses von Prozessparametern bei der Wirbelschichtgranulation auf die Integrität von Trimethoprim-Nanopartikeln

Eine vereinfachte Formulierung wurde zur grundlegenden Erforschung von Prozess- und Carriermaterialeinflüssen auf die Integrität der nanopartikulären Eigenschaften, die in der Herstellung der Trimethoprim-Nanosuspension eingestellt wurden, eingesetzt. Dabei wurden alle unlöslichen (z.B. MCC) oder spektrometrisch störenden Stoffe (Na-Sulfadiazin) aus der späteren Formulierung für Wirbelschichtgranulationsversuche entfernt. Diese Untersuchungen dienen somit der Erforschung der Prozess-Struktur-Eigenschafts-Beziehungen, die erzeugten Proben wurden aufgrund des Fehlens des Sulfadiazins jedoch nicht weitergehenden Tierstudien unterzogen.

Der Einfluss der Ausgangspartikelgröße des Carriermaterials Laktose wurde durch den Einsatz unterschiedlicher, kommerziell erhältlicher Qualitäten untersucht und dabei ein Partikelgrößenbereich von ca. 30 bis 130 μm abgedeckt (Abb. 3.1.13, oben links). Durch die Granulation wurden die Partikel vergrößert, wobei kleine Ausgangspartikel einen höheren relativen Partikelgrößenzuwachs erfahren haben (Abb. 3.1.13 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, oben links). Die resuspendierten Partikel wiesen allgemein keinen starken Größenzuwachs auf. Bei den mittelgroßen Carrierpartikeln (Granulac140 und Granulac70) war die Änderung der Trimethoprim-Partikelgröße am geringsten (Abb. 3.1.3, oben rechts). Da eine Annäherung der Granulatgröße an die Futtermittelpartikelgröße (x_{50} ca. 2 mm) angestrebt wird, ist mit der Auswahl von Granulac70 eine größere Granulatgröße zu bevorzugen. Die reale Wirkstoffkonzentration im Produkt (Abb. 3.1.13, unten) schwankt aufgrund dessen, dass sowohl feine Produktpartikel durch die Verwirbelung aus dem Prozessraum und an die Filter oder komplett aus dem System ausgetragen werden können und, dass Tropfen der Wirkstoffsuspension, die nicht die Oberflächen der Carrierpartikel erreichen, direkt sprühtrocknet werden und damit als sehr kleine Partikel ebenfalls fluiddynamisch aus dem System entfernt werden können.

Die Sprütrate, mit der die Trimethoprim-Nanosuspension auf den Carrier appliziert wird, wirkt sich drastisch auf die Partikelgröße der Granulate wie auch die reale Wirkstoffkonzentration im Produkt aus (Abb. 3.1.14, links). Mit erhöhter Sprütrate wird bei gleichbleibenden übrigen Prozessparametern eine höhere Gutfeuchte im Betrieb erreicht. Dadurch können sich mehr und stärkere, über Kapillarkräfte getriebene Brücken der Granulationsflüssigkeit zwischen den Carrierpartikeln ausbilden. Durch die erhöhte Sprütrate wird aber ebenfalls die reale Wirkstoffkonzentration im Granulat durch Prozessverluste reduziert, sodass eine geringere Sprütrate ($< 2,5$ g/min) vorteilhaft erscheint. Dieser Vorteil zeigt sich ebenso in der Resuspendierbarkeit der Trimethoprim-Nanopartikel, die nur bei der höchsten untersuchten Sprütrate negativ beeinflusst ist (Abb.3.1.14, rechts).

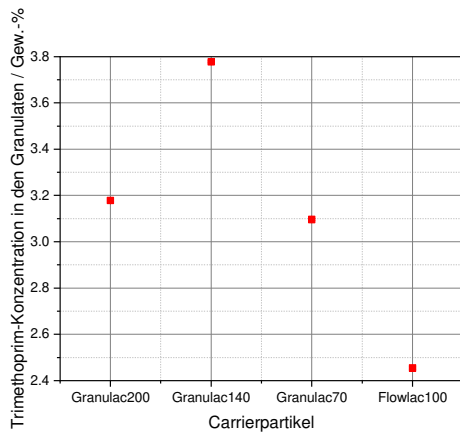
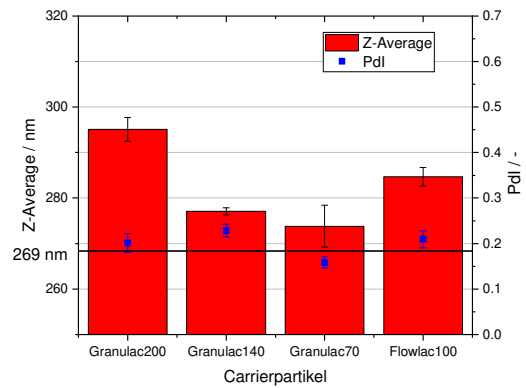
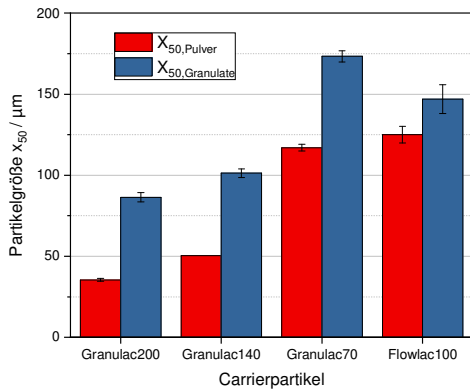


Abbildung 3.1.13: Untersuchung des Carrierpartikelgrößeneinflusses in der Wirbelschichtgranulation von Laktose mit Trimethoprim-Nanosuspension; oben links: Ausgangs- und Granulatpartikelgröße; oben rechts: resuspendierte Partikelgröße des Trimethoprim, waagerechte Linie zeigt Ausgangspartikelgröße der Trimethoprim-Nanosuspension; unten: gemessene Trimethoprim-Konzentration im Granulat

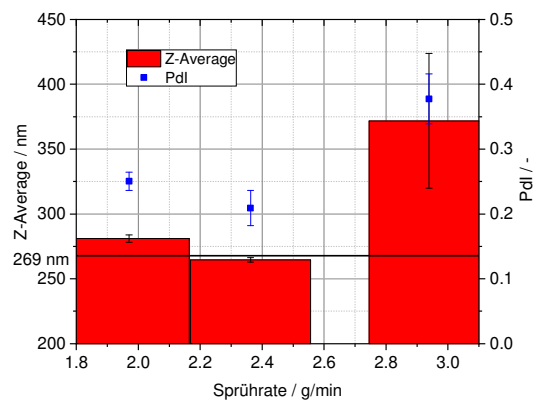
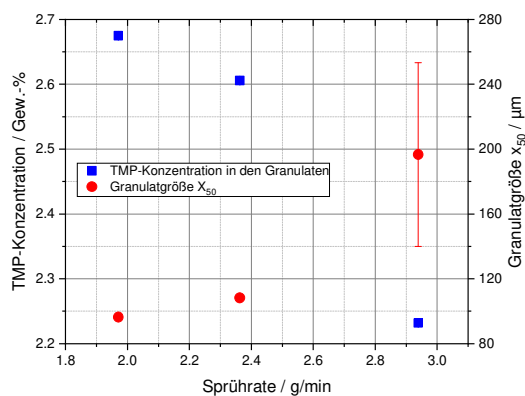


Abbildung 3.1.14: Untersuchung des Sprührateneinflusses in der Wirbelschichtgranulation von Laktose mit Trimethoprim-Nanosuspension; links: gemessene Trimethoprim-Konzentration im Granulat und Granulatpartikelgröße; rechts: resuspendierte Partikelgröße des Trimethoprim, waagerechte Linie zeigt Ausgangspartikelgröße der Trimethoprim-Nanosuspension

Die Tropfengröße der zerstäubten Granulationsflüssigkeit wird neben der Sprührate der Granulierflüssigkeit ebenfalls durch den Sprühdruck des Zerstäubergases beeinflusst. Mit steigendem Sprühdruck lässt sich ein Trend zu geringeren realen Wirkstoffkonzentrationen sowie zu geringeren Granulatgrößen erkennen (Abb.3.1.15, links). Durch die geringere Tropfengröße bei höherem Sprühdruck steigt die Wahrscheinlichkeit der Sprühtrocknung dieser Tropfen, damit der Entfernung aus dem System und der Reduktion der Wirkstoffkonzentration im Produkt. Ebenso wird die Flüssigkeit ggf. gleichmäßiger, aber mit geringerer, punktueller Schichtdicke auf die Carrier appliziert, sodass bei Kontakt zwischen Carrierpartikeln durch kleinere Tropfen auch kleinere, adhäsiv wirkende Kapillarkräfte bedingt werden, die Haftungswahrscheinlichkeit sinkt und so geringere Granulatgrößen resultieren. Die resuspendierte Trimethoprim-Partikelgröße zeigt nur beim höchsten Sprühdruck einen negativen Einfluss (Abb. 3.1.15 , rechts). Zusammenfassend ist ein geringer Sprühdruck für alle relevanten Produktparameter vorteilhaft.

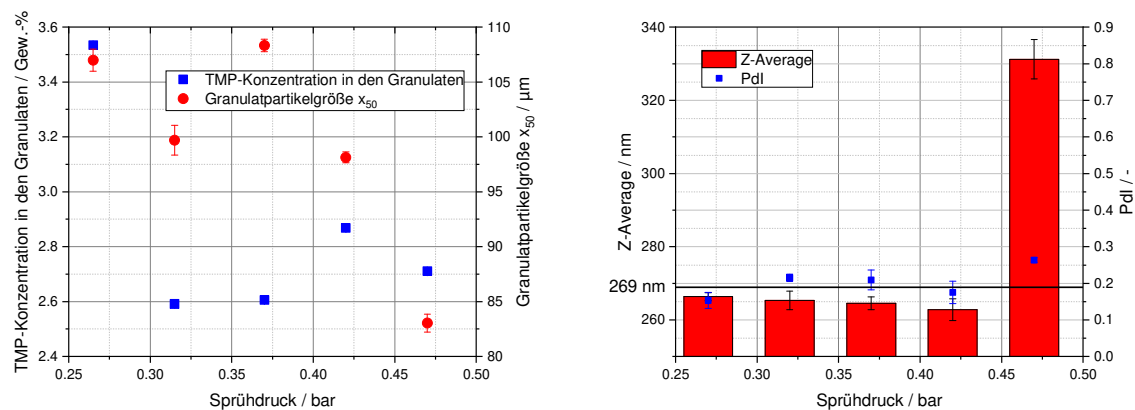


Abbildung 3.1.15: Untersuchung des Sprühdruckeinflusses in der Wirbelschichtgranulation von Laktose mit Trimethoprim-Nanosuspension; links: gemessene Trimethoprim-Konzentration im Granulat und Granulatpartikelgröße; rechts: resuspendierte Partikelgröße des Trimethoprim, waagerechte Linie zeigt Ausgangspartikelgröße der Trimethoprim-Nanosuspension

Das Massenverhältnis zwischen Wirkstoff und Carriervorlage bedingt direkt die Konzentration des Wirkstoffs im Granulat. Die Applikation größerer Mengen an Trimethoprim wurde durch die Applikation größerer Massen an Granulationsflüssigkeit unter Beibehaltung der Prozessparameter und damit durch eine Verlängerung der Applikationszeit erreicht. Es ist auffällig, dass mit steigendem Massenverhältnis die negative Abweichung der realen von der theoretischen Konzentrationen zunimmt (Abb. 3.1.16, links). Dies spricht dafür, dass mehr Trimethoprim mit steigender Konzentration aus dem System entfernt wird. Dies geschieht in Form feiner Partikel, die an die Filter gelangen oder diese aufgrund ihrer geringen Größe passieren können. In dieser Versuchsreihe wurden auch Proben von den Filtern, die den Prozessluftaustritt ermöglichen, aber Partikel zurückhalten sollen, bzgl. Ihrer Wirkstoffkonzentration vermessen. Hier ist zu erkennen, dass die am Filter abgeschiedenen Partikel stets eine höhere Konzentration an Trimethoprim besitzen als die theoretische Konzentration im Prozess und die reale Konzentration im Granulat (Abb. 3.1.16, links). Dies

stützt die These, dass es zu einer verstärkten Entfernung von wirkstoffhaltigen Feinpartikeln mit steigendem Massenverhältnis bzw. verlängerter Prozesszeit kommt. Dies kann durch die fortwährende, teilweise Sprühtrocknung der Granulierflüssigkeit oder durch Abrieb der mit hohen Wirkstoffkonzentration versehenen Oberflächen der Granulate bei Kontakt in der Wirbelschicht erklärt werden. Es konnten wiederum sehr gute Redispergierbarkeiten der Trimethoprim-Nanopartikel gemessen werden (Abb. 3.1.16, rechts). Allein bei einem Trimethoprim/Carrier-Verhältnis > 0.07 wurde eine Agglomeration und damit ein leichter, aber vertretbarer Anstieg der Partikelgröße registriert. Insgesamt wurde mit den geringsten Trimethoprim/Carrier-Verhältnissen die besten Widerfindungen (beste Entsprechung von Soll- und Istgehalt des Wirkstoffes) erreicht.

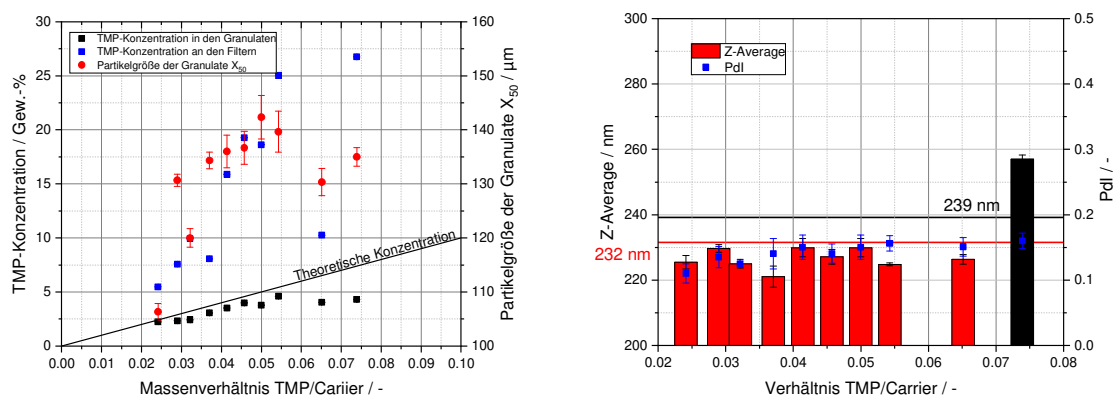


Abbildung 3.1.16: Untersuchung des Einflusses des Verhältnisses von Trimethoprim zur Carriervorlage in der Wirbelschichtgranulation von Laktose mit Trimethoprim-Nanosuspension; links: gemessene Trimethoprim-Konzentration im Granulat und Granulartypenpartikelgröße; rechts: resuspendierte Partikelgröße des Trimethoprim, waagerechte Linie zeigt Ausgangspartikelgröße der Trimethoprim-Nanosuspension

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigt, dass die Trimethoprim-Nanopartikel auf den Granulaten abgelagert sind (Abb. 3.1.17). Sie befinden sich bevorzugt in Vertiefungen der Partikel und somit in konkaven Regionen.

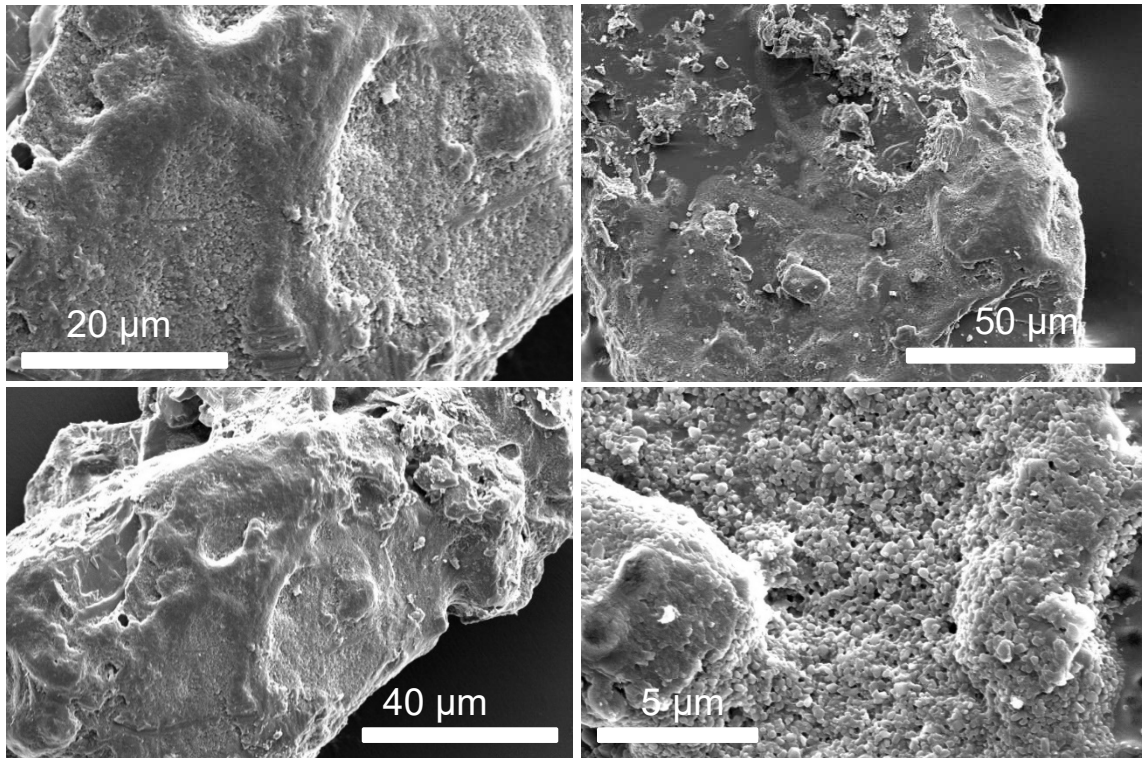


Abbildung 3.1.17: REM-Aufnahmen von Wirbelschichtgranulaten mit Trimethoprim-Nanosuspension als Binder

Das Überziehen der in der Wirbelschichtgranulation hergestellten Produkte mittels eines magensaftresistenten Polymethacrylatfilmes wurde durch den weiteren Schritt des Wirbelschichtcoatings erprobt. Aufgrund der noch kleinen Aggregatpartikelgröße und der fraktalen Struktur der Partikel konnte jedoch kein durchgängiges Coating erreicht werden, da die Oberflächen nicht deckend mit dem Polymer überzogen werden konnte (Abb. 3.1.18) und der Wirkstoff bereits bei einem niedrigen pH-Wert von 1 freigesetzt wurde. Dabei Ergaben die Erprobungen von Top-Spray und Bottom-Spray/Wurster-Prozessführung rasterelektronenmikroskopisch zwar einen vorteilhaften Eindruck vollständigeren Filmüberzugs für die Wurster-Variante, jedoch konnte auch hier kein funktionales, magensaftresistentes Coating erreicht werden.

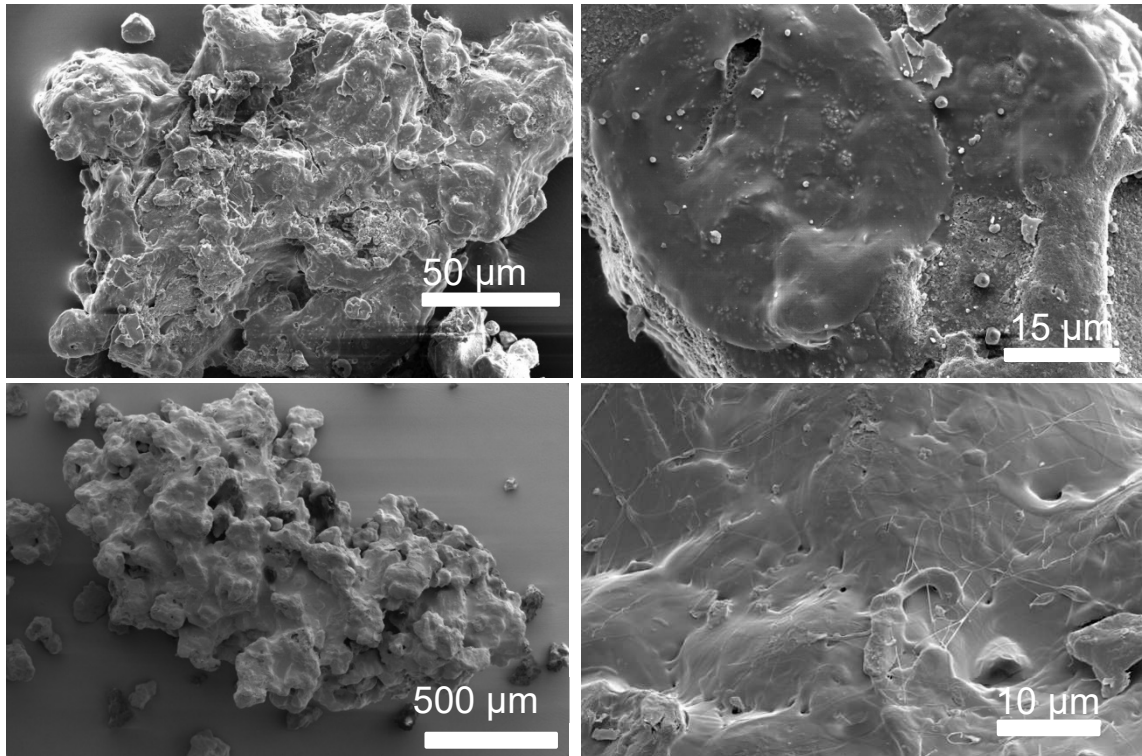


Abbildung 3.1.18: REM-Aufnahmen von Wirbelschichtgranulate mit Trimethoprim-Nanosuspension als Binder, gecoatet mit magensaftresistentem Polymerfilmüberzug in Top-Spray- (oben) und Bottom-Spray-Wurster-Prozessführung (unten)

Entwicklung einer festen Formulierung mit der Wirkstoffkombination Na-Sulfadiazin/Trimethoprim

Da für die Therapie eine fixe Wirkstoffkombination von Sulfadiazin und Trimethoprim im Verhältnis 5:1 eingesetzt wird, müssen die Trimethoprim-Nanosuspensionen neben Ihrer Trocknung unter Erhalt ihrer nanopartikulären Struktur mit Na-Sulfadiazin kombiniert werden. Hierzu wurden unterschiedliche Herstellungsverfahren der Sprühtrocknung, Wirbelschichtgranulation und Hochenergiegranulation sowie Applikationsstrategien des Na-Sulfadiazins als Feststoff oder in der Trimethoprim-Nanosuspension gelöst sowie die abschließende Applikation eines magensaftresistenten Coatings untersucht. Dabei wurden Partikelgrößen der Produkte, der Erhalt der Nanoparikularität des Trimethoprim, die Verteilung von Wirkstoffen in den Granulaten sowie das Freisetzungsverhalten der Granulate *in vitro* charakterisiert.

Sprühtrocknung

Bei der Sprühtrocknung wird (zumeist) ein Flüssigkeitsstrom durch Versprühen in Form von diskreten Tropfen in einen temperierten Trockengasstrom eingebracht. Durch die große Oberfläche und die Temperaturdifferenz zwischen Tropfen und Gasstrom wird der

Flüssigkeitsanteil verdampft und die Feststoffe im Tropfen (anfänglich gelöst oder in Form von Partikeln vorliegend) bleiben als Feststoffpartikel im Produktstrom zurück und werden mithilfe eines Zyklons vom Gasstrom getrennt, der die Flüssigkeit in Form von Dampf aus dem System transportiert.

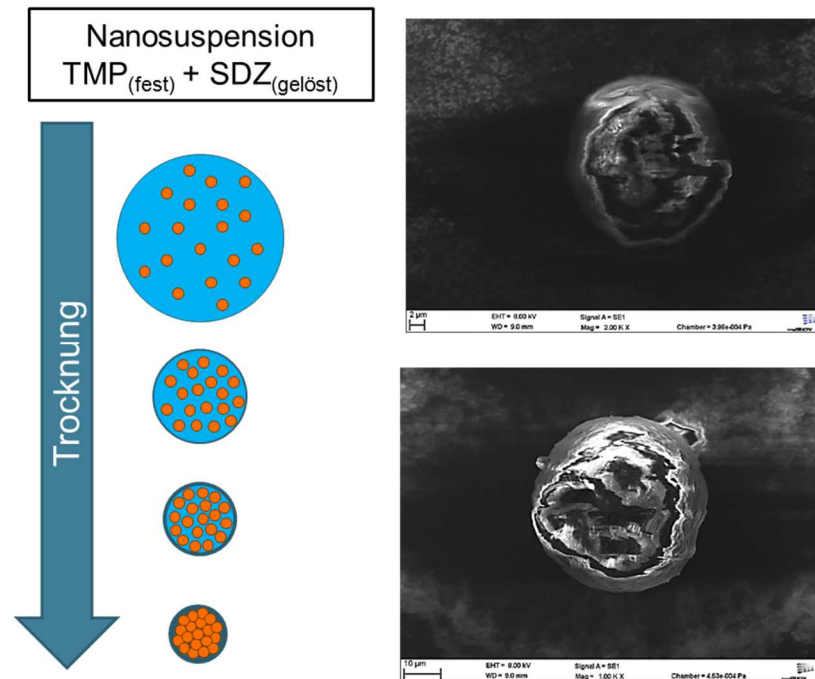


Abbildung 3.1.19: links: Modellvorstellung des Trocknungsverlaufs in der Sprühtrocknung einer Trimethoprim-Nanosuspension mit gelöstem Na-Sulfadiazin; rechts: REM-Aufnahmen angebrochener Produktpartikel der Sprühtrocknung

Für die Untersuchung der Sprühtrocknung bietet sich nur eine Zuführung des Na-Sulfadiazin gelöst in der Trimethoprim-Nanosuspension an, sodass beide Wirkstoffe in jedem Tropfen enthalten sind. Die sprühgetrockneten Partikel weisen eine typische, sphärische Form mit einer relativ glatten Oberfläche auf (Abb. 3.1.19, rechts, Abb. 3.1.20). Die Elementaranalyse auf Schwefel, den in dieser Formulierung nur Na-Sulfadiazin enthält, zeigt, dass dieser relativ gleichmäßig über die Oberfläche der Partikel verteilt erscheint. Dies spricht dafür, dass Na-Sulfadiazin die Trimethoprim-Nanopartikel einbettet und ggf. auch die Granulate mit einer äußeren Schicht überzieht. Die Partikelgröße der sprühgetrockneten Granulate ist in einem typischen Bereich zwischen 5 und 10 µm (Abb. 3.1.19, rechts; Abb. 3.1.20). Dies bedingt auf der einen Seite ein schlechtes Fließverhalten des Produktpulvers und begünstigt andererseits die Entmischung bei Zugabe zu Futtermitteln mit deutlich größeren Partikeln (Abb. 3.1.23). Allein diese Eigenschaften machen den wirtschaftlichen Einsatz dieses Trocknungsverfahrens zur Herstellung fester Arzneiformen für diese Anwendung sehr fraglich. Entsprechend wurden diese Proben nicht in Tierversuchen untersucht.

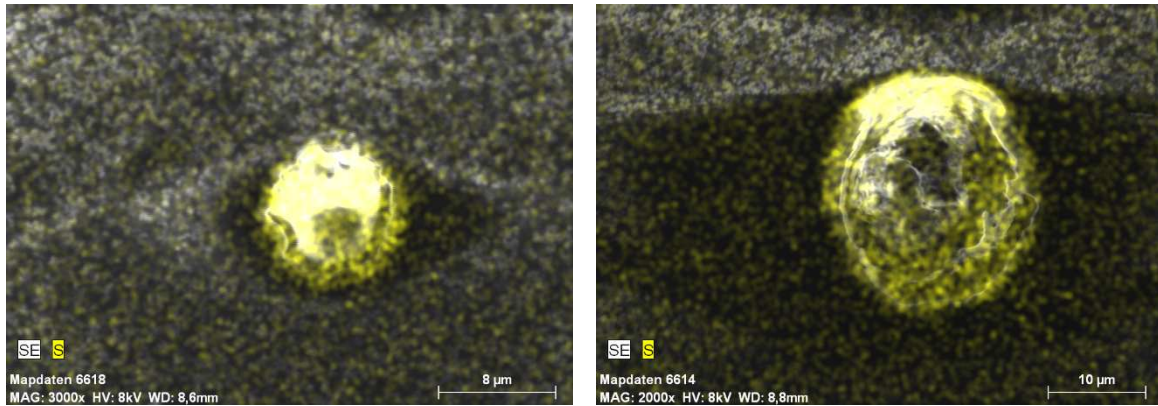


Abbildung 3.1.20: REM-Aufnahmen mit energiesdispersiver Röntgenanalyse (EDX, Elementaranalyse) mit Visualisierung des Schwefelanteil (nur in Na-Sulfadiazin enthalten) auf Sprühtrocknungsgranulaten von Trimethoprim-Nanosuspension mit gelöstem Na-Sulfadiazin

Wirbelschichtgranulation

Basierend auf der zerkleinerten Wirkstoffsuspension wurde eine feste Formulierung auch in Form eines Granulates mittels Wirbelschichtgranulation entwickelt. Die wichtigste Anforderung für diese Formulierung war die „Konservierung“ der submikronen Partikelgröße des Trimethoprimis in der festen Form, sodass nach dem Resuspendieren in Wasser die Partikelgröße der Suspensionsformulierung erhalten bleibt. Darüber hinaus stellen die mechanische Festigkeit und die Fließfähigkeit der Granulate wesentliche Merkmale zur staubfreien Lager-, Dosier- und Mischbarkeit dar, sodass unkontrollierte Umwelteinträge durch Abrieb und Stäube vermieden werden sollen. Zur besseren Mischbarkeit und zur Verhinderung von Entmischung bei der Applikation der festen Formulierung mit dem Futter sollte die Partikelgrößenverteilung der Granulate an die des Futters angepasst werden. Hier wird die prozesstechnische Umsetzung durch die Wirbelschichtgranulation genauer betrachtet.

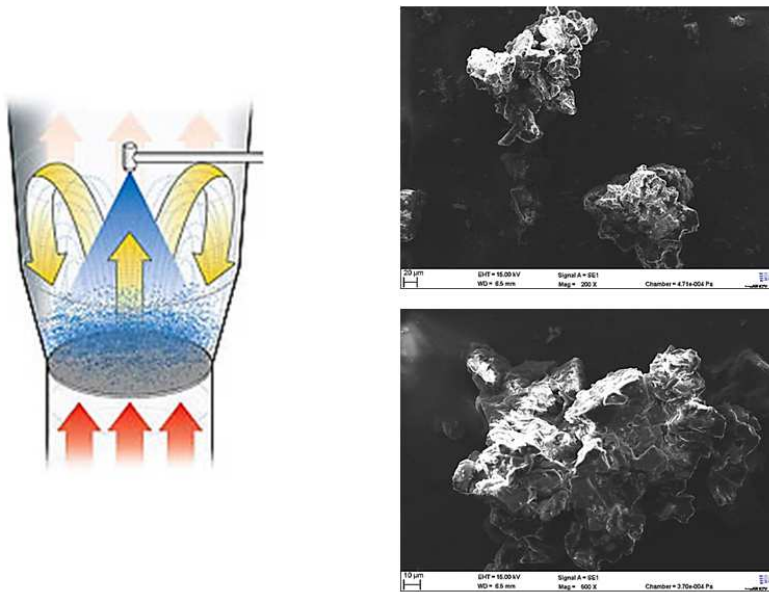


Abbildung 3.1.21: links: Prinzip der Wirbelschichtagglomeration [Glatt GmbH], rechts: REM-Aufnahmen der Struktur der resultierenden Granulate

Das Prinzip der absatzweise betriebenen Wirbelschichtagglomeration ist in Abb. 3.1.21 links dargestellt. Bei diesem Verfahren wird ein Pulverbett auf einem Siebboden vorgelegt, welches über anströmende Luft von unten in eine zirkulierende Wirbelschicht versetzt wird. In diesem Fall wurde die Wirkstoff suspension von oben in die Wirbelschicht gesprüht. Die aus diesem Prozess resultierenden Agglomerate weisen in der Regel eine charakteristische „Brombeerstruktur“ auf, die sich an den hergestellten Wirkstoffgranulaten erkennen lässt (vgl. Abb. 3.1.21, rechts). Die Granulate wurden mithilfe von Trägerpartikeln aus mikrokristalliner Cellulose und Laktose (Verhältnis 2:1) hergestellt. Die Hilfsstoffe wurden in der Wirbelschicht vorgelegt und die Trimethoprim-Nanosuspension mit gelöstem Na-Sulfadiazin unter Zusatz von HPC (als Binder und Matrixmaterial) in das Wirbelbett gesprüht. Bei der Trocknung kristallisiert, neben der Erstarrung von HPC, auch das gelöste Na-Sulfadiazin aus, sodass dem Granulat eine höhere Festigkeit verliehen wird. Die Verteilung des Na-Sulfadiazins auf den Oberflächen (Abb. 3.1.22) ist somit eher punktuell in den Zwickelbereichen zwischen den Carrierpartikeln (MCC und Laktose), da dort die Brückenbildung durch die Granulationsflüssigkeit auftritt und das gelöste Na-Sulfadiazin auskristallisiert. Die Trocknung des Granulats und resultierende Pulvereigenschaften werden über verschiedene Prozessparameter wie Lufttemperatur, Geschwindigkeit, Beladung oder Förderrate bestimmt. Mittels einer umfassenden Parameterstudie wurde die Herstellung des Granulats untersucht und eine Optimierung der mechanischen und dispersen Granulateigenschaften vorgenommen.

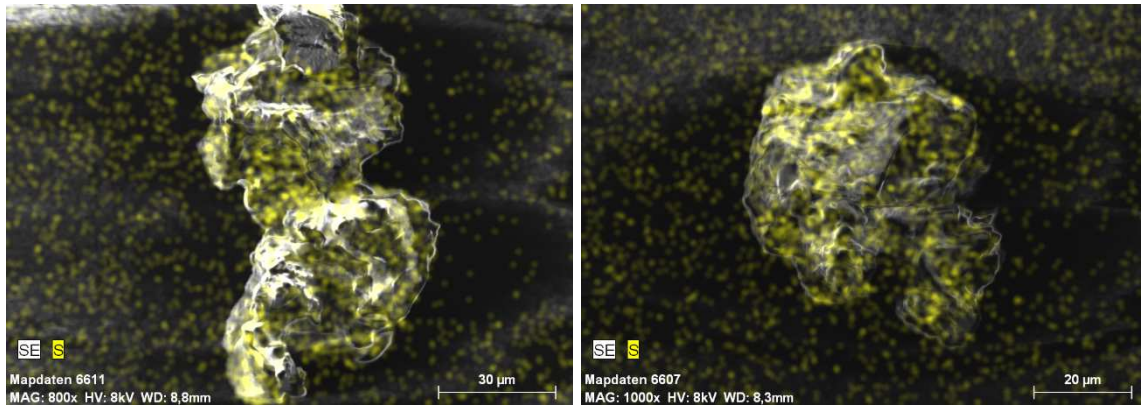


Abbildung 3.1.22: REM-Aufnahmen mit energiesdispersiver Röntgenanalyse (EDX, Elementaranalyse) mit Visualisierung des Schwefelanteil (nur in Na-Sulfadiazin enthalten) auf Wirbelschichtgranulaten mit Trimethiprim-Nanosuspension und gelöstem Na-Sulfadiazin als Granulationsflüssigkeit, appliziert auch MCC und Laktose als gemischte Carrier

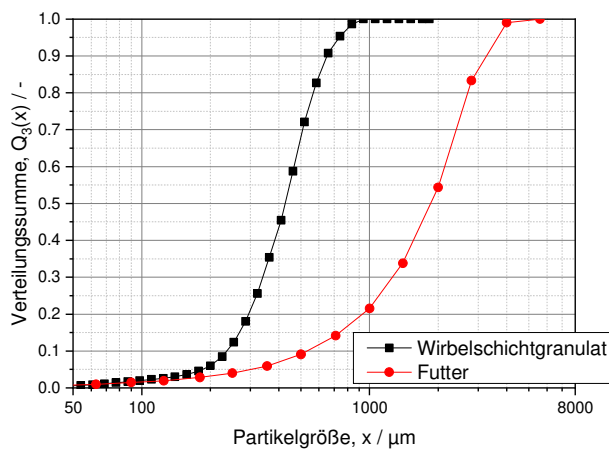


Abbildung 3.1.23: Partikelgrößenverteilungen von Futter und Wirbelschichtgranulat

Das Ziel, die Partikelgrößenverteilung des Wirbelschichtgranulats an die des Futters anzupassen, konnte mittels der Wirbelschichtgranulation nicht erreicht werden, jedoch blieben die Partikelgrößen 50- bis 100-fach höher verglichen mit der Sprühtrocknung und damit auch günstiger in Bezug auf die Staubbildung bei der Applikation. Abb. 3.1.23 stellt die Verteilungssummenkurven von Futter und Wirbelschichtgranulat dar. Die Granulate wurden mittels dynamischer Bildanalyse und das Futter über eine Siebanalyse charakterisiert. Der Medianwert des Futters liegt bei einer Partikelgröße von rund 2 mm, im Gegensatz dazu ist es mit der Wirbelschichtagglomeration gelungen, Granulate bis zu einer Größe von knapp 1 mm herzustellen. Für die Herstellung größerer Granulate wäre ein zweiter Agglomerationsschritt denkbar, der mittels einer zweiten Binderlösung die im ersten Prozessschritt entstandenen Granulate weiter zu größeren Granulaten aufbauen könnte. Dieser konnte in diesem Projekt nicht mehr untersucht werden. Ein solcher, mehrstufiger Prozess wäre jedoch wirtschaftlich kritisch zu betrachten, da bei der Wirbelschichtgranulation große Luftmengen aufgeheizt und damit große Energiemengen aufgewandt werden müssen. Als Alternative zum Aufbau größerer Granulatstrukturen wurde die Hochenergiegranulation im nachfolgenden Kapitel untersucht.

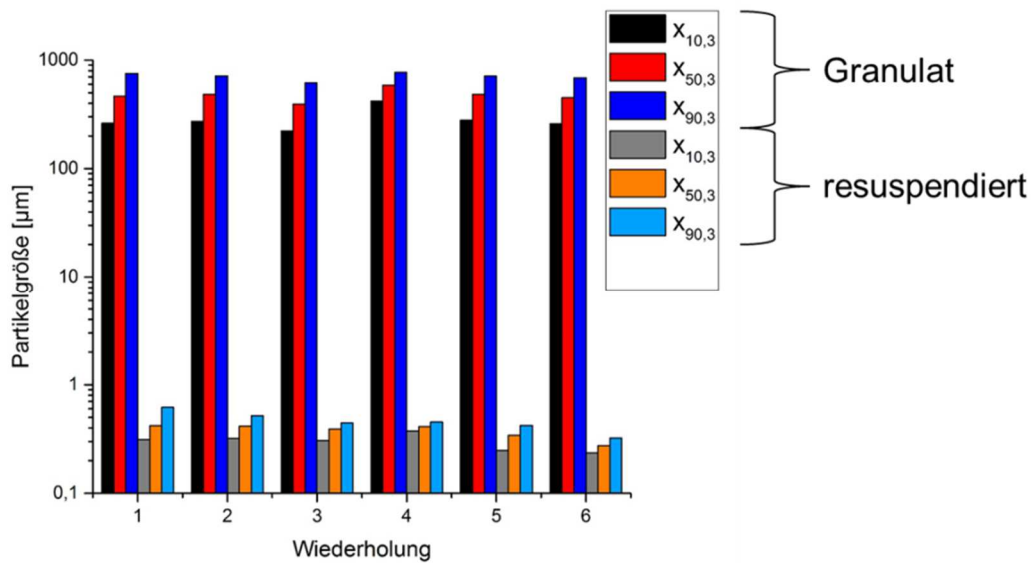


Abbildung 3.1.24: Reproduzierbarkeit der Wirbelschichtgranulation mit Trimethoprim-Nanosuspension mit gelöstem Na-Sulfadiazin: Partikelgrößenkennwerte von Granulat und resuspendierten Trimethoprim-Nanopartikeln

Die Anforderung der „Konservierung“ der Partikelgröße von zerkleinerten Trimethoprimpartikeln in der festen Form wurde in Versuchen zur Resuspendierbarkeit untersucht. Abb. 3.1.24 zeigt die Kennwerte der Partikelgrößenverteilungen $x_{10,3}$, $x_{50,3}$ und $x_{90,3}$ von Granulaten und redisuspendierten Trimethoprim-Partikeln. Die Versuche bestätigen, dass die Partikelgrößen der zerkleinerten Trimethoprim-Partikel nach der Resuspendierung nahezu unverändert im Vergleich zur Suspensionsformulierung bei einem Medianwert von rund 400 nm liegen (vgl. Abb. 3.1.10). Diese wesentliche Eigenschaft der Granulate bildet die Voraussetzung für die Anwendungsidee im Rahmen des Forschungsvorhabens.

Freisetzungsversuch:

- Ph.Eur. 8.8, M. 2.9.3, Apparatur 2
- Wasser/HCl, pH 2, 37 °C
- Definierte Einwaage von Granulat
- Regelmäßige Probenahme
- pH-Shift (2→10) nach 60 Min.
- Analyse der Wirkstoffkonzentrationen durch Frau Hahne/AG Hamscher

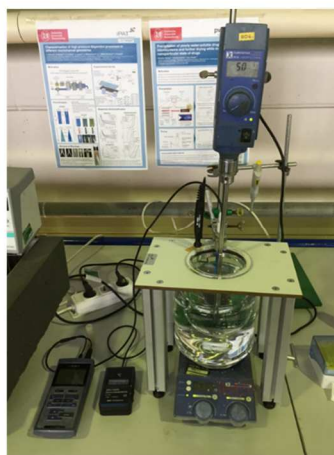


Abbildung 3.1.25: links: Zusammenfassung der Durchführungsparameter der Freisetzungsversuche mittels Apparatur 2; rechts: Laboraufbau für Freisetzungsversuche mittels Freisetzungsapparatur 2 nach Ph Eur.

Das Freisetzungsverhalten der Wirbelschichtgranulate wurde in einer Paddle-Apparatur (Apparatur2/USP2) bei pH 2 für eine Stunde charakterisiert und unter Pufferzugabe (Erreichen von pH 10) für eine Stunde fortgesetzt (Abbildung 3.1.25). Die Analyse der Freisetzungproben mittels HPLC erfolgte durch AG Hamscher. Beide getesteten Präparate setzen Trimethoprim schnell frei (mind. 90% nach 20 min). Im Vergleich zum Handelsprodukt Trimetostat (Mikrosuspension von Trimethoprim unter Zusatz von Na-Sulfadiazin, aniMedica GmbH) setzt das entwickelte Wirbelschichtgranulat das enthaltene Trimethoprim leicht verzögert frei (Abb. 3.1.25). Dies ist wahrscheinlich auf den Auflösungsprozess des Na-Sulfadiazins zurückzuführen. Dieses löst sich im sauren Milieu nur zu einem sehr geringen Anteil, so dass es beim Wirbelschichtgranulat dazu kommt, dass Trimethoprim-Nanopartikel in der Matrix des nicht gelösten Na-Sulfadiazins isoliert vom Freisetzungsmedium verbleiben und sich erst auflösen, wenn sich Na-Sulfadiazin beim pH-Wechsel (pH 2 zu pH 10) ebenfalls auflöst.

Reines Trimethoprim zeigt zunächst eine hohe Konzentration, die dann durch Rekristallisation wieder auf ca. 50% abgebaut wird (Abb. 3.1.26, links). Anschließend steigt die Freisetzungskurve vergleichbar mit den Wirbelschichtgranulaten wieder an. Das Sprühtrocknungsgranulat von Trimethoprim-Nanosuspension mit Na-Sulfadiazin (siehe vorangegangenes Kapitel) zeigt eine schnelle Freisetzung des Trimethoprim, vergleichbar mit dem Handelsprodukt Trimetostat, das jedoch im Gegensatz als Suspension vorliegt, sodass die Partikel nicht erst im Freisetzungsversuch benetzt werden müssen. Hier beschleunigt die Nanopartikularität des Trimethoprim die Freisetzung. Die schnellere Freisetzung des Sprühtrocknungsgranulates im Vergleich zum Wirbelschichtgranulat ist aufgrund der höheren spezifischen Oberfläche, verursacht durch die deutlich kleinere Granulartypartikelgröße des Sprühtrocknungsgranulates zu erwarten.

Zur Überprüfung, ob die Bioverfügbarkeit von Trimethoprim und Sulfadiazin durch Zerkleinerung und anschließende Wirbelschichtgranulation verändert wird, wurden diese (ungeoateten) Wirbelschichtgranulate im Rahmen eines Tierversuches von der AG Kietzmann untersucht.

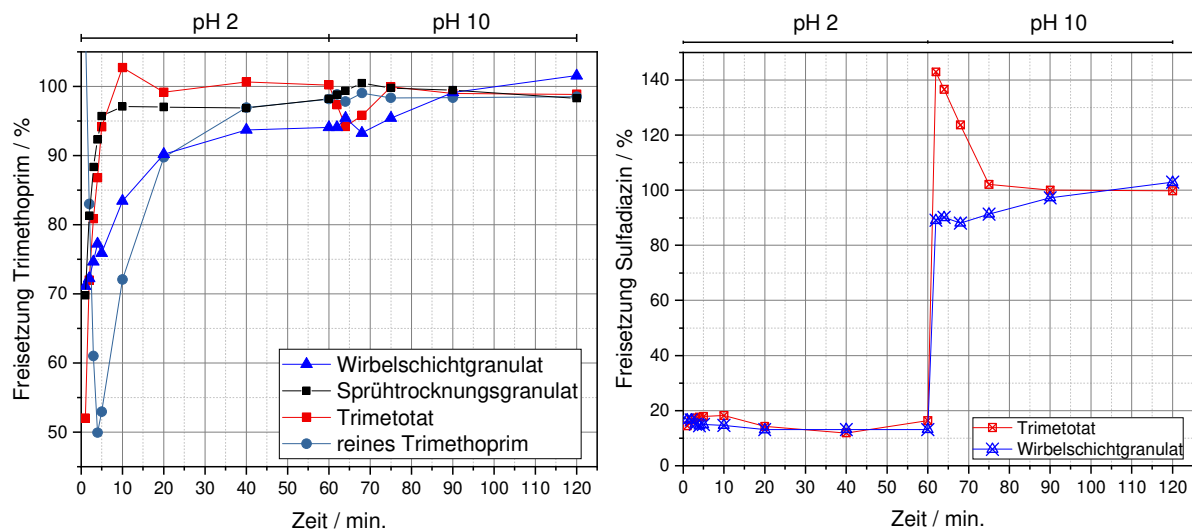


Abbildung 3.1.26: In Vitro Freisetzungsprofile (mithilfe eines Apparatur 2-Rührkesselaufbaus) von Wirbelschichtgranulaten mit Trimethoprim-Nanosuspension mit gelöstem Na-Sulfadiazin als Granulierflüssigkeit in Vergleich zum Handelsprodukt Trimetotat (Suspension, aniMedica GmbH); links: Freisetzung des Trimethoprim bezogen auf applizierte Dosis, zusätzlich Freisetzung von Sprühtrocknungsgranulat und reinem Trimethoprim; rechts: Freisetzung von Sulfadiazin bezogen auf die applizierte Dosis; beide: 60 min Freisetzung in salzsaurer Lösung mit pH 2, anschließend Pufferzugabe, Einstellung auf pH 10, Freisetzung weitere 60 min, Quantifizierung der Wirkstoffe durch Uni Gießen mittels HPLC

Hochenergiegranulation

Die Sprühtrocknung und Wirbelschichtgranulation erbrachten eine Konservierung des nanopartikulären Zustandes des Trimethoprim in einem resuspendierbaren Zustand, jedoch wurden die Zielpartikelgrößen der Granulate für eine Ähnlichkeit zum Futter mit einem Medianwert von ca. 2 mm mit diesen Herstellungsmethoden nicht erreicht. Die Hochenergiegranulation stellt hierbei eine wirtschaftliche und industriell sehr weit verbreitete Alternative zu den anderen erstuntersuchten Trocknungs- und Granulationsmethoden dar. Bei der Hochenergiegranulation werden ebenfalls Feststoffträgerpartikel vorgelegt und die Trimethoprim-Nanosuspension als Binderflüssigkeit eingebracht. Bei der Hochenergiegranulation werden die Partikel jedoch nicht durch einen Luftstrom in einen Wirbelschichtzustand überführt, sondern durch einen Rotor in intensiven Kontakt miteinander gebracht und so größere Energiemengen eingebracht. Die granulierten, feuchte Masse wurde anschließend im Trockenschrank über 24 h bei 50°C getrocknet. Mit diesem Prozess können ebenfalls kompaktere und größere Granulate hergestellt werden. Entsprechend wurde die Prozesskette der Hochenergiegranulation mit anschließendem magensaftresistentem Coating in der Wirbelschicht untersucht (Abb. 3.1.27).

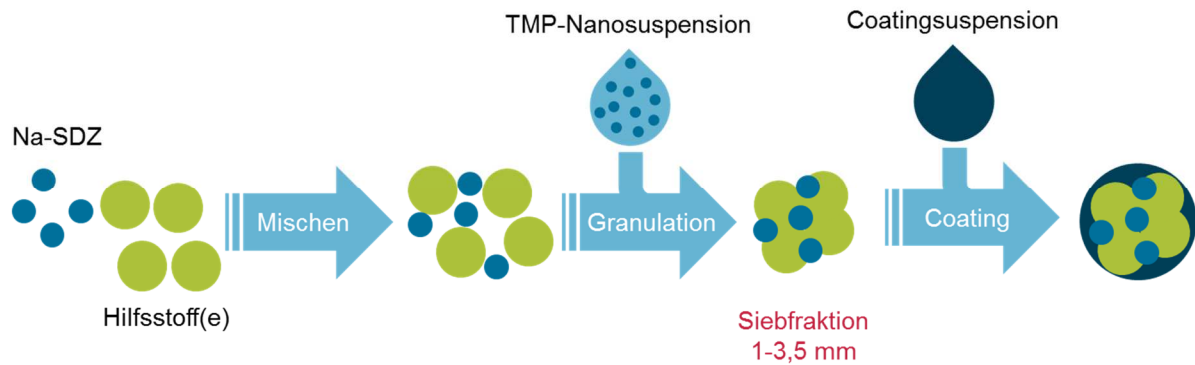


Abbildung 3.1.27: Schema der Hochenergiegranulation mit anschließender Klassierung (Siebung) und abschließendem Coating der Siebfraktion 1-3,5 mm

Zunächst wurde anhand einer reduzierten Formulierung ohne Na-Sulfadiazin die grundsätzliche Machbarkeit der Herstellung von Trimethoprim-nanopartikelhaltigen Granulaten unter Konservierung derer Partikelgröße untersucht. Dabei wurde eine Trimethoprim-Nanopartikelsuspension mit 5% Wirkstoffgehalt auf reine Laktose (Tablettose 70) als Carrier appliziert. Die Granulation führt zu einer deutlichen Partikelgrößenerhöhung gegenüber dem Carrier und die Resuspendierung der Trimethoprim-Nanopartikel erfolgt vollständig (Abb. 3.1.28). Jedoch ist der Anteil von sinnvollen Partikelgrößen > 1 mm recht gering ausgeprägt.

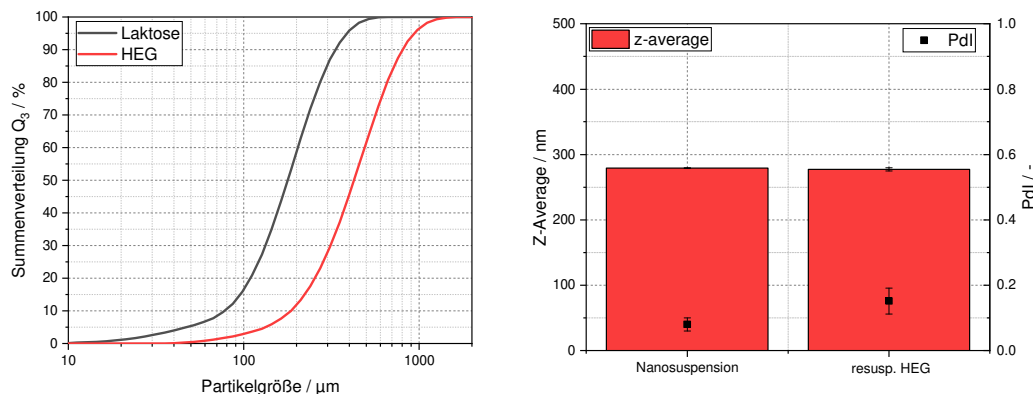


Abbildung 3.1.28: Untersuchung der Herstellbarkeit von Trimethoprim-nanopartikelhaltigen Hochenergiegranulaten ohne Na-Sulfadiazin sowie deren magensaftresistenten Coatings; links: Partikelgrößenverteilungen Granulaten; rechts: Redispergierbarkeit enthaltener Trimethoprim-Nanopartikel

Für die Herstellung relevanter Produkte wurde gegenüber der Machbarkeitsstudie der Hochenergiegranulation eine Nanosuspension mit 20 Gew.-% Trimethoprim als Granulationsflüssigkeit eingesetzt und ein korrespondierender Teil der Laktosevorlage durch partikuläres Na-Sulfadiazin ersetzt, sodass ein adäquates Verhältnis von Sulfadiazin:Trimethoprim von ca. 5:1 erhalten wurde. Diese Formulierungsänderungen bedingten eine deutliche Verbesserung der Ausbeute adäquater Partikelgrößen < 1 mm (Abb. 3.1.29, links). Die Untersuchung der Verteilung der beiden Wirkstoffe über die Fraktionsgrößen (Abb. 3.1.29, rechts) zeigt das zu erwartende Bild: Das mit der

Granulationsflüssigkeit eingebrachte Trimethoprim steigt mit dem Granulationserfolg, also der Granulatgröße an, während der Na-Sulfadiazingehalt mit größeren Granulatgrößen abnimmt.

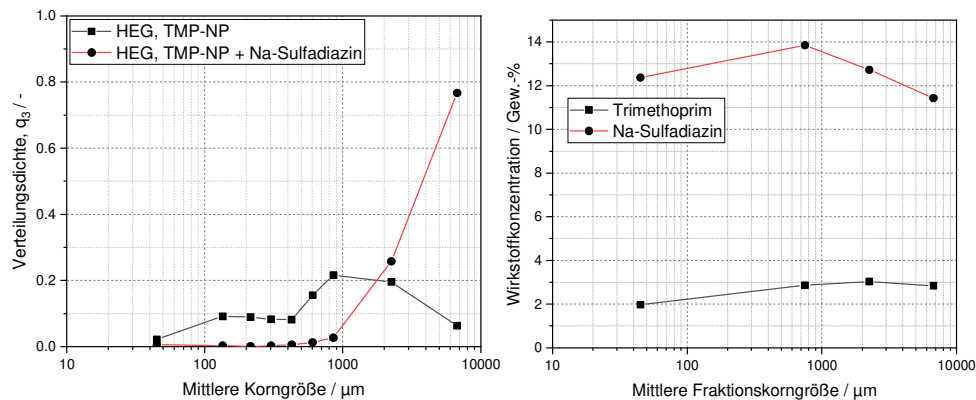


Abbildung 3.1.29: Vergleich der Hochenergiegranulation von Laktose bzw. Laktose/Na-Sulfadiazin-Mischung mit Trimethoprim-Nanosuspensionen: links: Massenverteilung auf die Fraktionen einer Siebanalyse; rechts: Analyse des Wirkstoffgehaltes über die Siebfractionen, Quantifizierung der Wirkstoffe durch AG Hamscher

Die erzeugten Hochenergiegranulate (HEG, Trimethoprim und Na-Sulfadiazin enthaltend) der Fraktion 1-3,5 mm wurden direkt der AG Kietzmann zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit zur Verfügung. Zusätzlich wurde auf dieselbe Fraktion (HEG, 1-3,5 mm) im Wirbelschichtverfahren ein magensaftresistentes Coating appliziert und diese Proben (gecoatetes HEG) ebenfalls der AG Kietzmann für Bioverfügbarkeitsstudien zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.1.1: Wirkstoffgehalte der im Tierversuche (AG Kietzmann) eingesetzten Hochenergiegranulate der Größenfraktion 1-3,5 mm, Gehaltsbestimmung durch AG Hamscher mittels HPLC

	Ungecoatetes Hochenergiegranulat	Gecoatetes Hochenergiegranulat
Trimethoprimgehalt [mg/g]	30,3	24,0
Sulfadiazingehalt [mg/g]	127,2	104,0

Vergleich der Freisetzungverhalten Trimethoprim- und Na-Sulfadiazin-haltiger, fester Arzneiformen

Zur abschließenden Bewertung und zur Interpretation der Bioverfügbarkeitsdaten der AG Kietzmann wurden Freisetzungversuche mithilfe einer Durchflusszellenapparatur (Ph. Eur. Apparatur 4) unter pH-getreuer Simulation der Magenpassage (pH 1 durch 0,1 M Salzsäure für 120 min) und der Darmassage (Phosphatpuffer pH 7,4 für weitere 60 min) durchgeführt. Hierbei wurden die in den Versuchen der AG Kietzmann untersuchten festen Zubereitungen der Pulvermischung der AniMedica, des Wirbelschichtgranulats sowie des ungecoateten und des gecoateten Hochenergiegranulats verglichen.

Die Freisetzungsprofile zeigen, dass die vermarktete Zubereitung der aniMedica die schnellste Freisetzung des Trimethoprim zeigt (Abb. 3.1.30, links). Das Wirbelschichtgranulat zeigt die zweitschnellste Freisetzung, gefolgt vom ungecoateten Wirbelschichtgranulat. Dieses Freisetzungsverhalten ist aufgrund der erhaltenen Partikelgrößen, und damit der erhaltenen spezifischen Oberflächen der Arzneiformen für die Auflösung, sowie der erwarteten Kompaktheit der Hochenergiegranulate zu erwarten. Das magensaftresistente Coating des Hochenergiegranulates verzögert die Freisetzung der Wirkstoffe, sodass während der simulierten Magenpassage nur max. 40% der innerhalb von 180 min freigesetzten Wirkstoffmasse gelöst wurden. Beim pH-Wechsel von Magen- zu Darmbedingungen (pH 1 → pH 7,4) erfolgt eine sehr schnelle Freisetzung der Wirkstoffe (Abb. 3.1.30).

Die Freisetzung des Na-Sulfadiazins (Abb. 3.1.30, rechts) folgt grundsätzlich dem des Trimethoprim, wobei der größte Unterschied zwischen den Verläufen beider Wirkstoffe für das Produkt der aniMedica GmbH gefunden wird. Dies zeigt den Unterschied im Aufbau der Formulierungen. Bei den hergestellten Trocknungsprodukten von Trimethoprim-Nanosuspensionen handelt es sich um komplexe Partikelstrukturen, bei denen sich die beiden Wirkstoffe teilweise umschließen, insbesondere Na-Sulfadiazin das Trimethoprim. Dabei kann es zu einer gegenseitigen Freisetzungsbeeinflussung kommen. Dem entgegen liegen die beiden Wirkstoffe im aniMedica-Produkt als einfache Pulvermischung vor und können sich somit unabhängig voneinander auflösen.

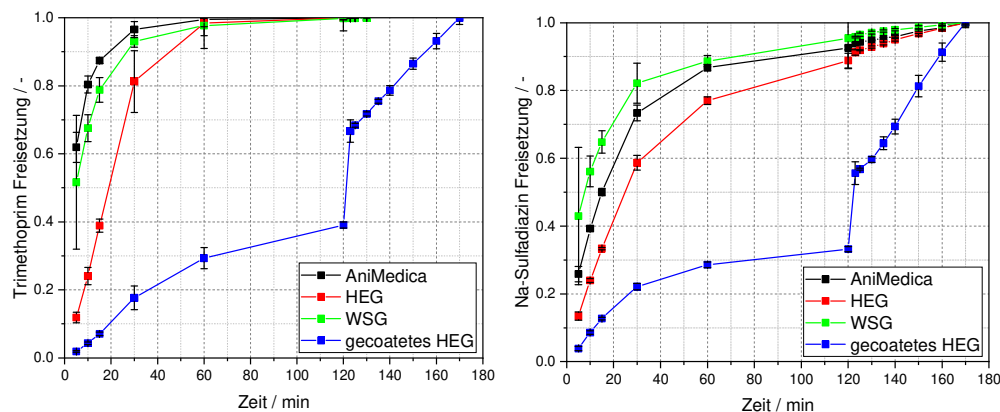


Abbildung 3.1.30: Vergleichende in Vitro Freisetzungsprofile von Wirbelschichtgranulaten (Trimethoprim-Nanosuspension mit gelöstem Na-Sulfadiazin als Granulierflüssigkeit), Hochenergiegranulaten ohne (HEG) und mit magensaftresistentem Coating (gecoatetes HEG), sowie dem Handelsprodukt der aniMedica GmbH mithilfe einer Apparatur 4/USP4-Durchflusszellenapparatur; 120 min simulierte Magenpassage mit 0,1 M Salzsäure, 60 min simulierte Darmpassage mit Phosphatpuffer pH 7,4; relative Freisetzung bezogen auf die freigesetzte, kumulative Masse innerhalb von 180 min; Quantifizierung der Wirkstoffe durch AG Hamscher; links: Freisetzung in Trimethoprim; rechts: Freisetzung von Na-Sulfadiazin

Evaluierung der Raman-Mikroskopie zur Wirkstofflokalisierung und Coatingintaktheit

Wirkstofflokalisierung

Für die genaue Evaluierung der Ergebnisse von Granulationsprozessen wurde im Rahmen des Projektes das Raman-spektroskopische, chemische Mapping mithilfe der konfokalen Lasermikroskopie untersucht. Diese Methode erlaubt es, mittels Mikroskopie die Oberflächen von Produkten abzurastern und dabei spektrale Informationen lokal aufgelöst zu sammeln und auszuwerten. Im hier untersuchten Fall wurden die Produkte der Hochenergiegranulation mittels mikroskopischem Raman-Mapping charakterisiert, um die Oberflächenverteilung der Bestandteile und damit die Struktur der Produkte weiter aufzuklären.

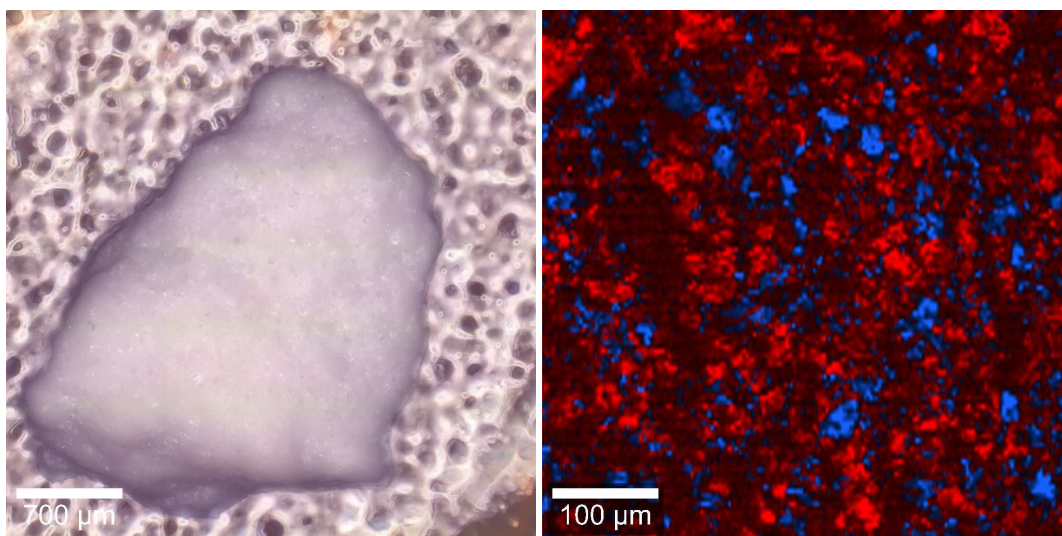


Abbildung 3.1.31: Trimethoprim-nanopartikelhaltiges Hochenergiegranulat (Siebfraktion 1-3,5 mm); links: Lichtmikroskopische Aufnahme; rechts: Raman-spektroskopisches Mapping eines Ausschnitts der Granulatoberfläche mit Falschfarbendarstellung der spektralen Identifikation von Trimethoprim (rot) und Laktose (blau)

Zu diesem Zweck wurde ein konfokales Raman-Mikroskop (alpha300R, WiTec) mit einem Laser von 532 nm Wellenlänge und einer Oberflächennachführung (True Surface Mk 3, WiTec) vermessen. Die spektralen Informationen wurden gegen separat von den Ausgangsmaterialien aufgenommene Referenzspektren verglichen und die Wiederfindung der chemisch-spektralen Information über die untersuchte Fläche als Falschfarbenbild dargestellt (siehe z.B. Abbildung 3.1.31).

Trimethoprim-nanopartikelhaltige Hochenergiegranulate (ohne Na-Sulfadiazin) zeigen eine homogene Verteilung des Trimethoprim zu einer hohen Konzentration auf der Oberfläche des Granulates (Abbildung 3.1.31). Dies entspricht den Erwartungen, da beim Granulationsprozess die vorgelegte Laktose nicht von der zugegebenen Trimethoprim-Nanosuspension aufgelöst, sondern als Granulierflüssigkeit überzogen und über Kapillarkräfte agglomeriert und damit granuliert wird.

Die Untersuchung der Oberflächen der Hochenergiegranulate mit Trimethoprim und Na-Sulfadiazin zeigt sich u.a. eine Kolo-kalisation von Na-Sulfadiazin und Trimethoprim (Mischfarbe türkis, Abbildung 3.1.32), so dass davon auszugehen ist, dass ein Teil des Na-Sulfadiazins während der Granulation gelöst wurde und Trimethoprim-Nanopartikel eingebettet hat. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen der Sprühtrocknung und Wirbelschichtgranulation, bei denen Na-Sulfadiazin jeweils mit der Granulierflüssigkeit gelöst appliziert wurde.

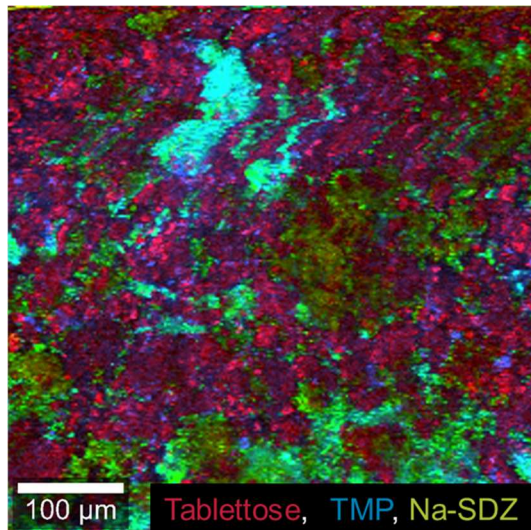


Abbildung 3.1.32: Na-Sulfadiazin- und Trimethoprim-nanopartikelhaltiges Hochenergiegranulat (Siebfraktion 1-3,5 mm); Raman-spektroskopisches Mapping der Granulatoberfläche mit Falschfarbendarstellung der spektralen Identifikation von Trimethoprim (blau), Na-Sulfadiazin (grün) und Laktose (rot)

Coatinganalytik

Zur Analyse des Coatings auf gecoateten Hochenergiegranulaten (ohne Na-Sulfadiazin) wurden diese ebenfalls Raman-mikroskopisch untersucht (Abbildung 3.1.33). Die Lichtmikroskopische Aufnahme (Abbildung 3.1.33, links) zeigt eine abgerundete Granulatstruktur im Vergleich zur kantigeren Granulatstruktur ohne Coating (Abbildung 3.1.31, links). Das Raman-Mapping zeigt keine eindeutige Verteilung der Komponenten Trimethoprim, Laktose (Trägermaterial) und Coating (Referenzspektrum der Gesamtheit aller Coatingbestandteile). Hier ist eine Weiterentwicklung der Analyse-methode notwendig, die im Projekt nicht mehr bearbeitet werden konnte.

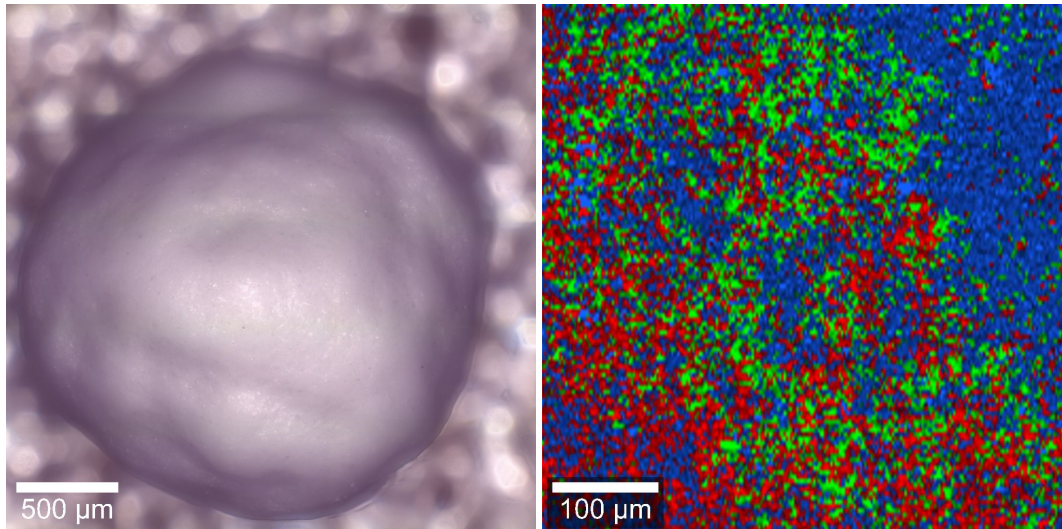


Abbildung 3.1.33: Gecoatetes, Trimethoprim-Nanopartikel-haltiges Hochenergiegranulat (Siebfraktion 1-3,5 mm); links: Lichtmikroskopische Aufnahme; rechts: Raman-spektroskopisches Mapping eines Ausschnitts der Granulatoberfläche mit Falschfarbendarstellung der spektralen Identifikation von Trimethoprim (rot), Coating (grün) und Laktose (blau)

Zur vereinfachten Analyse des Coatings wurden die gecoateten Hochenergiegranulate (ohne Na-Sulfadiazin) mit einer Spannung von 250 MPa in einem Kompaktierungssimulator (Styl'One evolution, Medel'Pharm) zu Tabletten kompaktiert. Das Raman-Mapping dieser ebenen und damit leichter zugänglichen Oberfläche zeigt, dass ein durchgängiges Coating (grün) erreicht wurde, das unter der Belastung der Kompaktierung aufgerissen ist und in den kleinen Rissen Trimethoprim (rot) und in großen Rissflächen auch Tablettose (blau) zeigt (Abbildung 3.1.34). Dies spricht dafür, dass die ursprüngliche, ungecoatete Granulatstruktur (Abbildung 3.1.31, rechts) mit einer hohen Oberflächenkonzentration des Trimethoprim auch nach der Beschichtung unter dem Coating erhalten bleibt.

Im Projekt konnte gezeigt werden, dass sowohl mit dem Einsatz von geladenen Polymeren zur Komplexierung von Wirkstoffen sowie durch ein Coating die Freisetzung der Wirkstoffe gezielt beeinflusst werden kann. So wurde durch die Komplexierung von Enrofloxazin eine eingeschränkte und langsame Freisetzung in Leitungswasser erreicht, wohingegen eine sehr schnelle Freisetzung nach der Einnahme und der Aussetzung der Arzneiform gegen saure Bedingungen im Magen freisetzt. So kann möglicherweise auch eine ungezielte Freisetzung in der Umwelt reduziert werden. Durch das magensaftresistente Coating von Arzneiformen (hier Granulate von Trimethoprim-Nanopartikeln und Na-Sulfadiazin) konnte eine Verzögerung der Freisetzung in der (simulierten) Magenpassage erreicht werden. Dies soll die unkontrollierte Rekristallisation des Wirkstoffs Trimethoprim im sauren Magenmilieu verhindern und so eine schnelle Freisetzung der Trimethoprim-Nanopartikel im Darm ermöglichen.

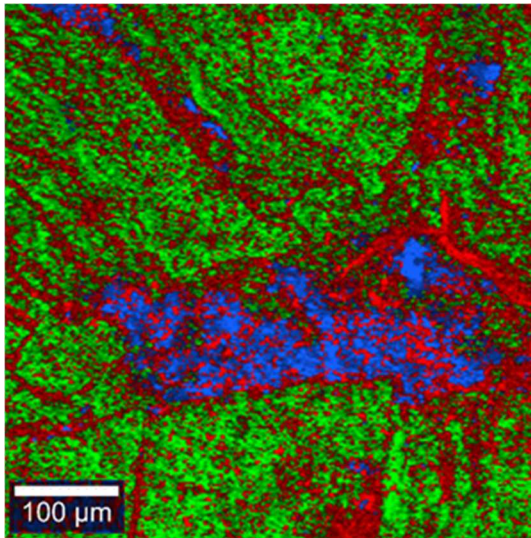


Abbildung 3.1.34: Raman-spektroskopisches Mapping der Oberfläche eines Tablette, hergestellt aus gecoatetem Trimethoprim-Nanopartikel-haltigem Hochenergiegranulates mit Falschfarbendarstellung der spektralen Identifikation von Trimethoprim (rot), Laktose (blau) und Coating (grün)

Die häufigste Methode zur Herstellung submikroner Wirkstoffpartikel, um deren Auflösungs geschwindigkeit und damit ggf. auch die Bioverfügbarkeit zu steigern, ist die Nanozerkleinerung in Rührwerkskugelmöhlen. Dieses Verfahren wurde zur Herstellung einer Trimethoprim-Nanosuspension angewendet, die Nanosuspensionen wurden zur Steigerung der Lagerstabilität und zur Verbesserung der Handhab- und Anwendbarkeit mittels unterschiedlicher Trocknungsverfahren in feste Arzneiformen überführt. Dabei konnten von der Sprühtrocknung über die Wirbelschichtgranulation bis hin zur Hochenergiegranulation immer größere Granulatpartikelgrößen erreicht werden, die mit dem letztgenannten Verfahren in den Bereich der Futtermittelpartikelgröße ($x_{50} = 2 \text{ mm}$) lagen. Die Ähnlichkeit der Partikelgrößenverteilungen von Arzneiform und Futter führt dazu, dass die Wahrscheinlichkeit der Entmischung dieser beiden Komponenten reduziert wird. Dadurch kann eine sicherere Handhabbarkeit bei der Eindosierung in Futter und eine gleichmäßigere Verteilung bei der Aufnahme durch die behandelten Tiere erwartet werden. Die nanopartikeläre Form der Trimethoprim-Nanopartikel wurde, auch basierend auf einer adäquaten Stabilisierung während der Zerkleinerung, in allen Trocknungsverfahren erhalten, sodass die Produkte zu Trimethoprimpartikeln gleicher Partikelgröße resuspendiert werden konnten.

Die *In-vitro*-Untersuchung der Freisetzungseigenschaften zeigte, dass die im Rahmen des Projektes hergestellten Granulate mit redispersierbaren Trimethoprim-Nanopartikeln zwar die durch das Coating beabsichtigte bevorzugte Freisetzung bei Darm-pH-Wert zeigten, aber insgesamt die Freisetzung von Trimethoprim und Na-Sulfadiazin nicht beschleunigt wurde. Die Freisetzungsgeschwindigkeit der Wirkstoffe konnte vielmehr auf die Granulatgröße der eingesetzten Trocknungsprodukte und die Freisetzungverzögerung von Na-Sulfadiazin im

sauren Milieu zurückgeführt werden, die bei einer Einbettung der Trimethoprim-Nanopartikel in eine Na-Sulfadiazin-Matrix auch deren Freisetzung verzögert.

Die Struktur und Wirkstoffverteilung konnte mittels EDX (im Rahmen von REM-Aufnahmen) und durch konfokale Raman-Mikroskopie genauer charakterisiert werden. Hierbei zeigte sich eine Konzentrierung der mittels Granulierflüssigkeit aufgebrauchten Komponenten auf den Oberflächen der Granulate sowie in der Zwickelräumen zwischen agglomerierten, primären Trägerpartikeln bei der Wirbelschicht- und Hochenergiegranulation und eine homogene Verteilung der Wirkstoffe bei Sprühgranulation.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Martínez-Carballo, C. González-Barreiro, S. Scharf, and O. Gans, "Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria," *Environmental Pollution*, vol. 148, pp. 570-579, 2007.
- [2] V. M. F. Frade, M. Dias, A. C. S. C. Teixeira, and M. S. A. Palma, "Environmental contamination by fluoroquinolones," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 50, pp. 41-54, 2014.
- [3] G. M. Eliopoulos and P. Huovinen, "Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole," *Clin Infect Dis*, vol. 32, pp. 1608-1614, 2001.
- [4] M. Lizondo, M. Pons, M. Gallardo, and J. Estelrich, "Physicochemical Properties of Enrofloxacin," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 15, pp. 1845-1849, 1997.
- [5] N. Seedher and P. Agarwal, "Various Solvent Systems for Solubility Enhancement of Enrofloxacin," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 71, pp. 82-87, Jan-Feb 2009.
- [6] K. Baert, S. De Baere, S. Croubles, and P. De Backer, "Pharmacokinetics and oral bioavailability of Sulfadiazine and Trimethoprim in broiler chickens," *Veterinary Research Communications*, vol. 27, pp. 301-309, 2003.
- [7] D. R. Delgado and R. F. Martínez, "Thermodynamic study of the solubility of sodium Sulfadiazine in some emthanol+water cosolvent mixtures," *Vitae*, vol. 17, pp. 191-198, 2010.
- [8] A. O. Ferreira, H. C. Polonini, S. L. Silva, F. B. Patrício, M. A. F. Brandão, and N. R. B. Raposo, "Feasibility of amlodipine besylate, chloroquine phosphate, dapsone, phenytoin, pyridoxine hydrochloride, Sulfadiazine, sulfasalazine, tetracycline hydrochloride, Trimethoprim and zonisamide in SyrSpend® SF PH4 oral suspensions," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 118, pp. 105-112, 2016.

3.2 Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover:

Bioverfügbarkeit von Sulfadiazin/Trimetoprim-Formulierungen beim Schwein

Für alle mit den vom iPAT hergestellten Testformulierungen durchgeführten Untersuchungen wurden Schweine aus dem Lehr- und Forschungsgut Ruthe der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover verwendet. Es wurden insgesamt fünf einzelne Versuche durchgeführt:

- 1) Behandlung mit zwei iPAT-Testformulierungen, einer Nanosuspension von Trimethoprim mit gelöstem Na-Sulfadiazin und einem Wibelschichtgranulat mit nanopartikulärem Trimethoprim, jeweils im Vergleich zu im Handel verfügbaren Arzneimitteln (Suspension und Pulver) der aniMedica GmbH über fünf Tage
- 2) Einmalige Gabe von zwei iPAT-Testformulierungen, einer Nanosuspension von Trimethoprim mit gelöstem Na-Sulfadiazin und einem Wibelschichtgranulat mit nanopartikulärem Trimethoprim, jeweils im Vergleich zu im Handel verfügbaren Arzneimitteln der aniMedica GmbH
- 3) Einmalige Gabe eines iPAT-Wirbelschichtgranulates
- 4) Einmalige Gabe von zwei iPAT-Testformulierungen, einem ungecoateten und einem gecoateten Hochenergiegranulat mit submikronen Trimethoprimpartikeln, im Vergleich zu einem im Handel verfügbaren Arzneimittel der aniMedica GmbH
- 5) Einmalige Gabe eines reproduzierten iPAT-Wirbelschichtgranulates mit submikronen Trimethoprimpartikeln im Vergleich zu einem im Handel verfügbaren Arzneimittel der aniMedica GmbH

Versuch 1: Behandlung mit zwei iPAT-Testformulierungen, einer Nanosuspension von Trimethoprim mit gelöstem Na-Sulfadiazin und einem Wibelschichtgranulat mit nanopartikulärem Trimethoprim, jeweils im Vergleich zu im Handel verfügbaren Arzneimitteln der aniMedica GmbH über fünf Tage

Die nachfolgende Tabelle 3.2.1 zeigt die in diesem Versuch verwendeten vom iPAT hergestellten Formulierungen im Vergleich zu zwei Vergleichsprodukten (zugelassene Arzneimitteln der aniMedica GmbH).

Tabelle 3.2.2: Wirkstoffzusammensetzung der eingesetzten Formulierungen

	Formulierung	Trimethoprim	Sulfadiazin
Suspension	<i>Trimetotat oral Suspension 48 %</i> (aniMedica-Suspension)	80 mg/ml	400 mg/ml ¹⁾
	Suspension mit submikronen Trimethoprim-Partikeln (iPAT-Suspension)	38,29 mg/g	215,29 mg/g ¹⁾
Pulver	<i>Trimetho-Diazin</i> (aniMedica-Pulver)	125 mg/g	625 mg/g ²⁾
	Wirbelschichtgranulat mit submikronen Trimethoprim-Partikeln (iPAT- Wirbelschichtgranulat)	15,7 mg/g	78,6 mg/g ¹⁾

1) als Sulfadiazin-Natrium 2) als Sulfadiazin

In diesem Versuchsdurchgang erfolgte eine Behandlung der Schweine über fünf Tage, wobei zweimal täglich die halbe Tagesdosis mit einer Futterration verabreicht wurde. Es wurden zweimal täglich 2,5 mg/kg Trimethoprim verabreicht; dies entspricht einer bestimmungsgemäßen Tagesdosis von 5 mg/kg. Entsprechend erhielten die Tiere Sulfadiazin in Tagesdosierungen von etwa 25 mg/kg. Neben Blutproben wurden Urin- und Staubproben (Sedimentationsstaub, luftgetragener Staub) genommen. Daneben dienten Kotproben der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Sulfadiazin/Trimethoprim-Kombination in kommensalen *E. coli*. Detaillierte Angaben zur Methodik finden sich in der Dissertationsschrift von D. Pilgram „Orale Bioverfügbarkeit von submikronen Trimethoprimpartikeln beim Schwein und ihre Auswirkung auf die Wirkstoffverschleppung im Stall“ (2018).

Neben den behandelten Schweinen befand sich im Stall in diesem Versuch eine Gruppe unbehandelter Schweine, die in einem Abstand von 3,6 Metern aufgestellt waren. Somit bestand kein direkter Tierkontakt zwischen den Gruppen. Die Kontrolltiere dienten dabei als Indikatortiere, um zu prüfen, ob eine Übertragung von Sulfadiazin und Trimethoprim mit dem Staub bestand. Die nachfolgende Abbildung 3.2.1 zeigt modellhaft die Anordnung der Tierhaltungsbuchten und die Lokalisation für die Gewinnung der Staubproben.

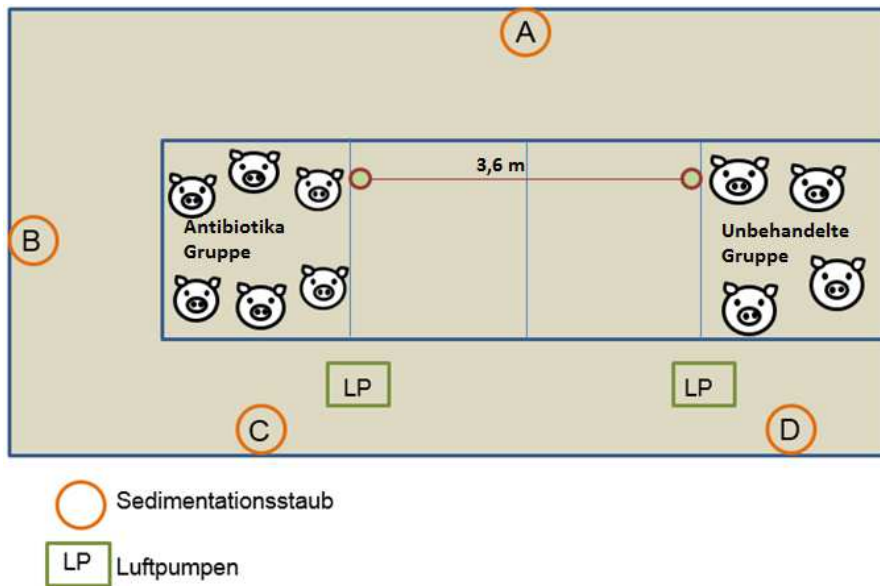


Abb. 3.2.1: Stallplan

Der quantitative Nachweis von Trimethoprim und Sulfadiazin erfolgte in den Proben mittels HPLC (RP-18-Trennsäule mit vorgeschalteter RP-18-Vorsäule, Detektion mittels UV/VIS-Detektor, 80 % McIlvaine-Puffer und 20 % Methanol als mobile Phase, Flussrate 1 ml/min, Retentionszeit für Trimethoprim 5,2 und für und Sulfadiazin 2,4 Minuten). Eine Quantifizierung der Analyten erfolgte auf Basis von Kalibrierungsreihen (0,1 µg/ml – 100 µg/ml). Als interner Standard dienten bei der Bestimmung von Trimethoprim und Sulfadiazin Antipyrin bzw. Sulfamerazin. Die Extraktionsschritte der Plasma-, Urin-, Sedimentationsstaub- sowie Filterstaubproben sind in Tabelle 3.2.2 zusammengefasst.

Zur Validierung wurden Selektivität, Linearität, Richtigkeit und Präzision der Analysenmethode geprüft. Dabei erfüllten alle untersuchten Kriterien die zu stellenden Anforderungen. Die ermittelten Detektions- und Quantifizierungsgrenzen sind in Tabelle 3.2.3 dargestellt.

Tabelle 3.2.3: Extraktion der Plasma-, Urin-, Sedimentstaub- und Filterstaubproben (MeOH = Methanol) modifiziert nach STAHL et al. (2016)

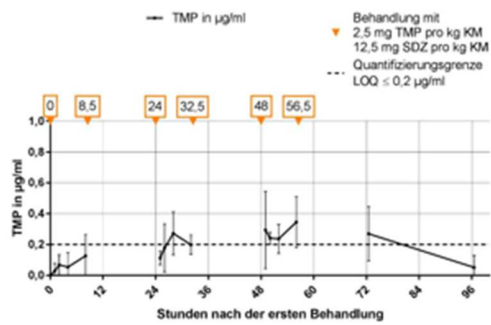
		Urin	Plasma	Sedimentstaub	Filterstaub
1.	Probenmenge	2 ml	1 ml	Zugabe von 1 ml PBS	Zugabe von 2 ml MeOH
2.	Schütteln	-		X	X
3.	Versetzen mit internen Standards	10 µg (1 µg/µl)		50 µg (1 µg/µl)	10 µg (1 µg/µl)
4.	Rüttler	5 min			1,5 h auf Orbitalshaker (lichtgeschützt)
5.	Zugabe von Phosphatpuffer	jeweils 0,2 ml			-
6.	Rüttler	5 min			-
7.	Ethylacetat	jeweils 6 ml			-
8.	Rüttler	10 min			-
9.	Zentrifugieren	10 min, 3000 g, 4°C			-
10.	Überstand	Komplette Abnahme des Überstands, Überführen in neues PP-Röhrchen, bei 50 °C im Heizblock mit Druckluft eindampfen			
11.	Wiederholung von Schritt 8-9	jeweils 6 ml Ethylacetat auf den verbleibenden Bodensatz geben			-
12.		Überstand auf das PP-Röhrchen geben, in dem zuvor eingedampft wurde			-
13.	Eindampfen	bei 50 °C im Heizblock mit Druckluft eindampfen			-
14.	Aufnahme in MeOH	100 µl		200 µl	
15.	Rüttler	5 min			10 min
16.	Zugabe von McIlvaine-Puffer	400 µl		300 µl	
17.	Rüttler	5 min			10 min
19.	Überführen in HPLC Vial	500 µl			

Tabelle 3.2.4: Detektions- und Quantifizierungsgrenze von Trimethoprim und Sulfadiazin

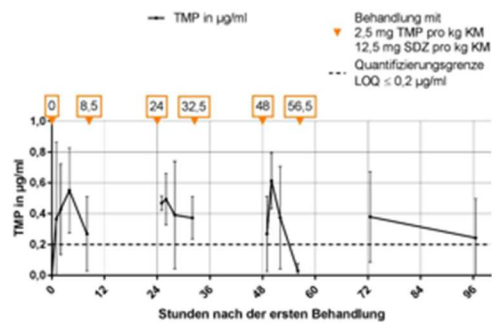
Testsubstanz	Matrix	Detektionsgrenze (LOD) [µg/ml]	Quantifizierungsgrenze (LOQ) [µg/ml]
Trimethoprim	Eluent	0,13	0,40
	Plasma	0,07	0,20
	Urin	0,03	0,10
	Sedimentstaub	0,13	0,40
	Filterstaub	0,13	0,40
Sulfadiazin	Eluent	0,09	0,10
	Plasma	0,05	0,05
	Urin	0,02	0,03
	Sedimentstaub	0,09	0,10
	Filterstaub	0,09	0,10

Die nachfolgenden Abbildungen 3.2.2 und 3.2.3 zeigen die im Blutplasma der behandelten Schweine gemessene Sulfadiazin- und Trimethoprimkonzentration.

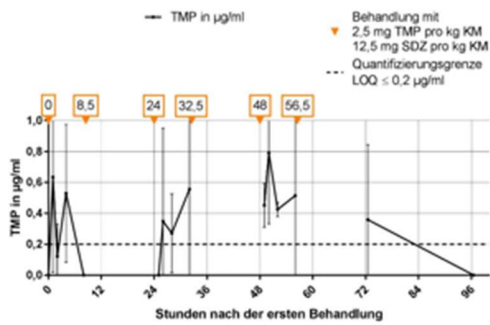
aniMedica-Pulver



iPAT-Wirbelschichtgranulat



aniMedica-Suspension



iPAT-Suspension

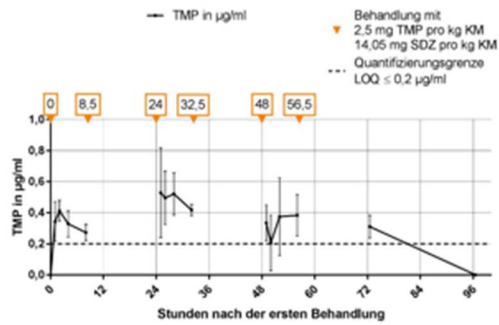
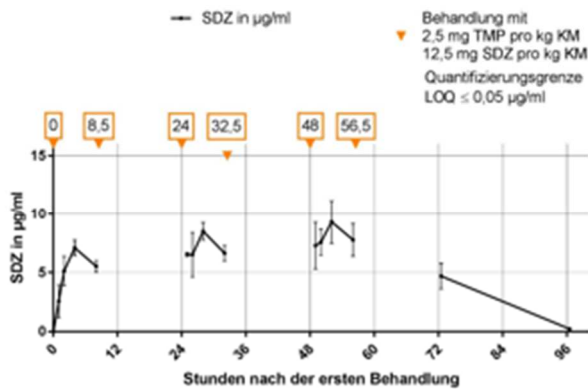
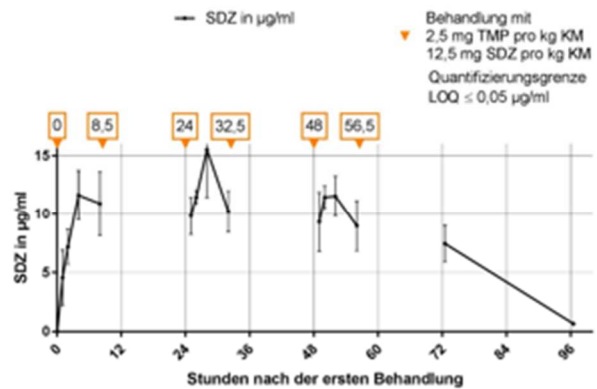


Abbildung 3.2.2: Trimethoprimkonzentration im Plasma von Schweinen nach oraler Behandlung mit iPAT-Formulierungen bzw. aniMedica-Handelsprodukten über das Futter, Dosierung von 5 mg Trimethoprim und 25 mg Sulfadiazin pro kg KM

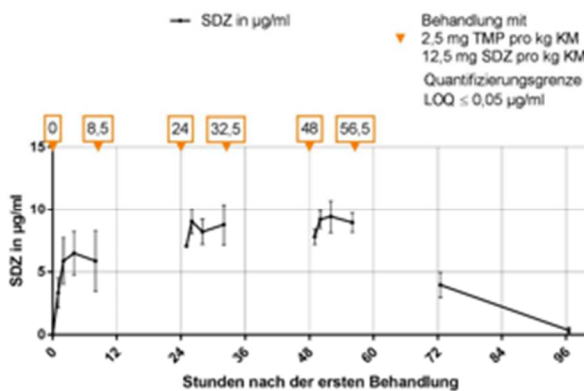
aniMedica-Pulver



iPAT-Wirbelschichtgranulat



aniMedica-Suspension



iPAT-Suspension

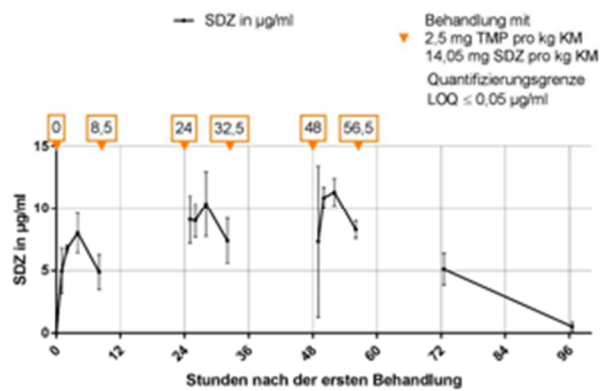


Abbildung 3.2.3: Sulfadiazinkonzentration im Plasma von Schweinen nach oraler Behandlung mit iPAT-Formulierungen bzw. aniMedica-Handelsprodukten über das Futter, Dosierung von 5 mg Trimethoprim und 25 mg Sulfadiazin pro kg KM

Im Fütterungsversuch wurden nach der Behandlung mit submikronen Trimethoprimpartikeln (Granulat) im Vergleich zu der pulverförmigen handelsüblichen Formulierung geringgradig höhere und tendenziell länger anhaltende Trimethoprim-Plasmakonzentrationen erreicht. Nach der Behandlung mit den Suspensionen konnte dagegen kein entsprechender Unterschied der Plasmakonzentration festgestellt werden.

In keinem Versuchsdurchgang konnte Trimethoprim im Plasma der Sentinel-Schweine detektiert werden. Sulfadiazin konnte lediglich nach der Behandlung mit dem aniMedica-Pulver, 24,5 Stunden nach der ersten Behandlung im Plasma der Sentinel-Schweine detektiert werden. Zu diesem Probenahmezeitpunkt wurde 0,61 µg/ml Sulfadiazin im Plasma der Sentinel-Schweine gemessen.

Trimethoprim- und Sulfadiazinkonzentration im Urin

Die nachfolgenden Abbildungen 3.2.4 bis 3.2.7 zeigen die mittlere Trimethoprim- und Sulfadiazinkonzentrationen im spontan abgesetzten Urin der behandelten und der unbehandelten Schweine. Da das spontane Absetzen von Urin nicht beeinflusst wurde, variiert die Anzahl der beprobten Schweine zu jedem Probenahmetag.

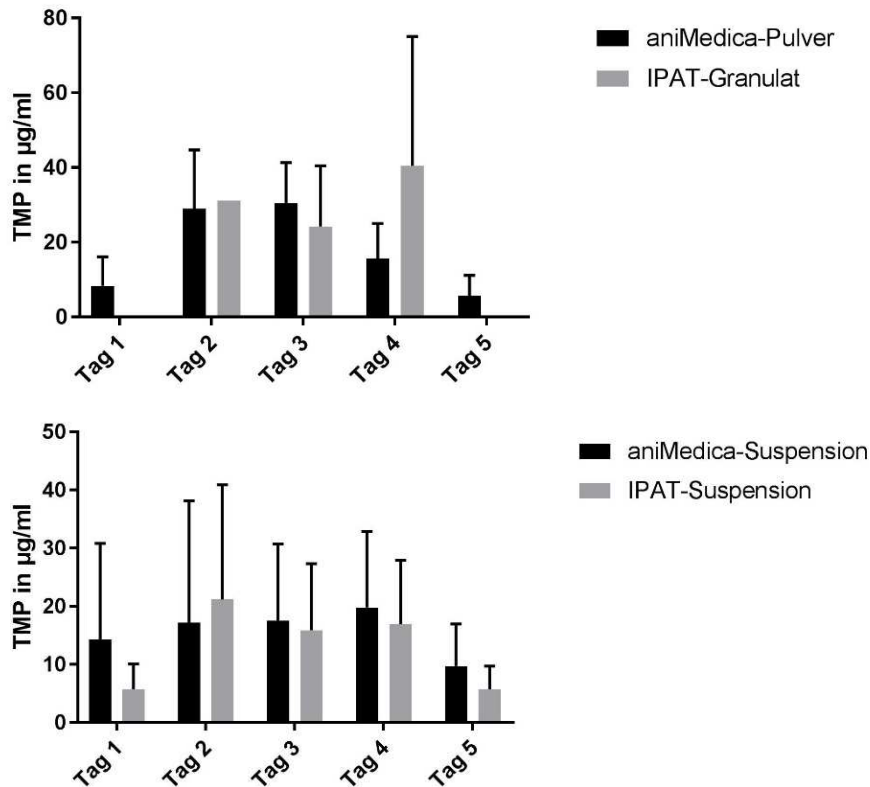


Abbildung 3.2.4: Trimethoprimkonzentration im Urin von Schweinen nach oraler Behandlung mit IPAT-Formulierungen bzw. aniMedica-Handelsprodukten über das Futter, Dosierung von 5 mg Trimethoprim und 25 mg Sulfadiazin pro kg KM

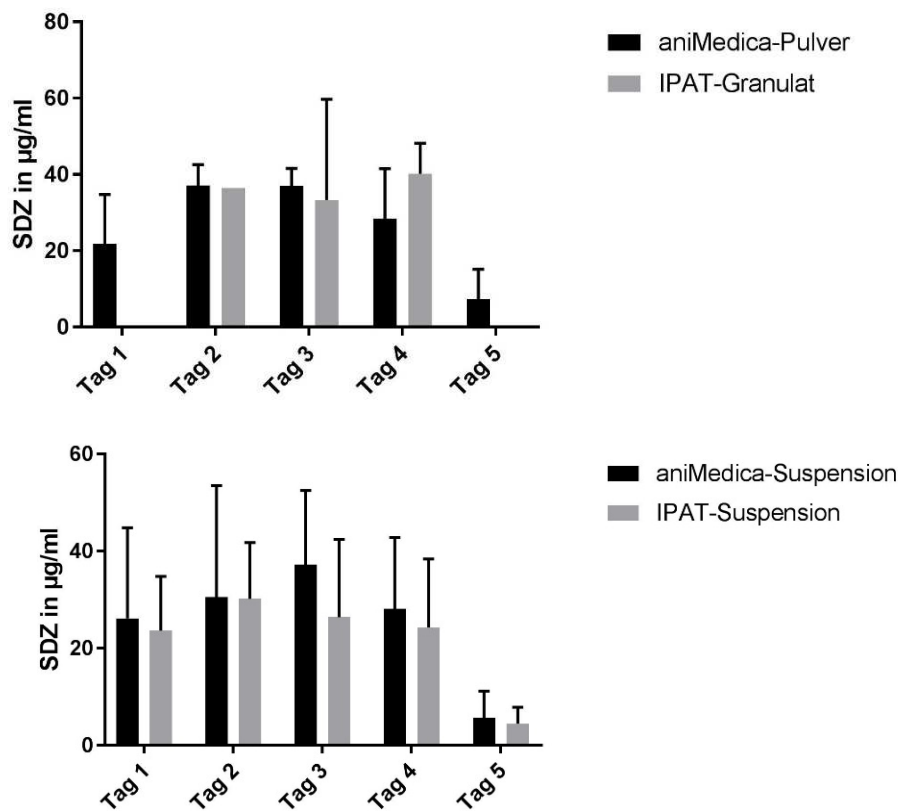


Abbildung 3.2.5: Sulfadiazinkonzentration im Urin von Schweinen nach oraler Behandlung mit IPAT-Formulierungen bzw. aniMedica-Handelsprodukten über das Futter, Dosierung von 5 mg Trimethoprim und 25 mg Sulfadiazin pro kg KM

Unbehandelte Schweine

Die nachfolgenden Abbildungen 3.2.6 und 3.2.7 zeigen die Wirkstoffkonzentrationen im Urin der unbehandelten Schweine.

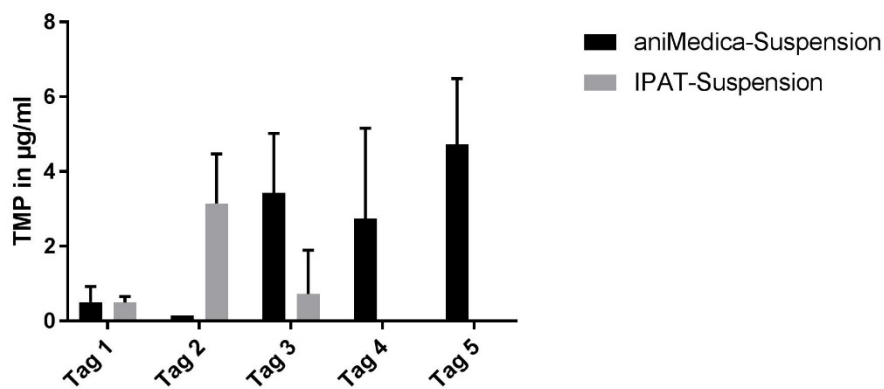
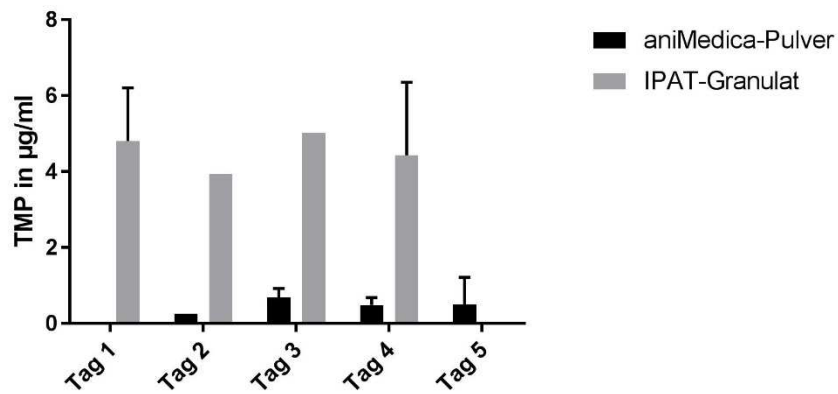


Abbildung 3.2.6: Trimethoprimkonzentration im Urin von unbehandelten Schweinen, die in demselben Stallraum wie behandelte Schweine (orale Behandlung mit IPAT-Formulierungen bzw. aniMedica-Handelsprodukten über das Futter, Dosierung von 5 mg Trimethoprim und 25 mg Sulfadiazin pro kg KM) gehalten wurden

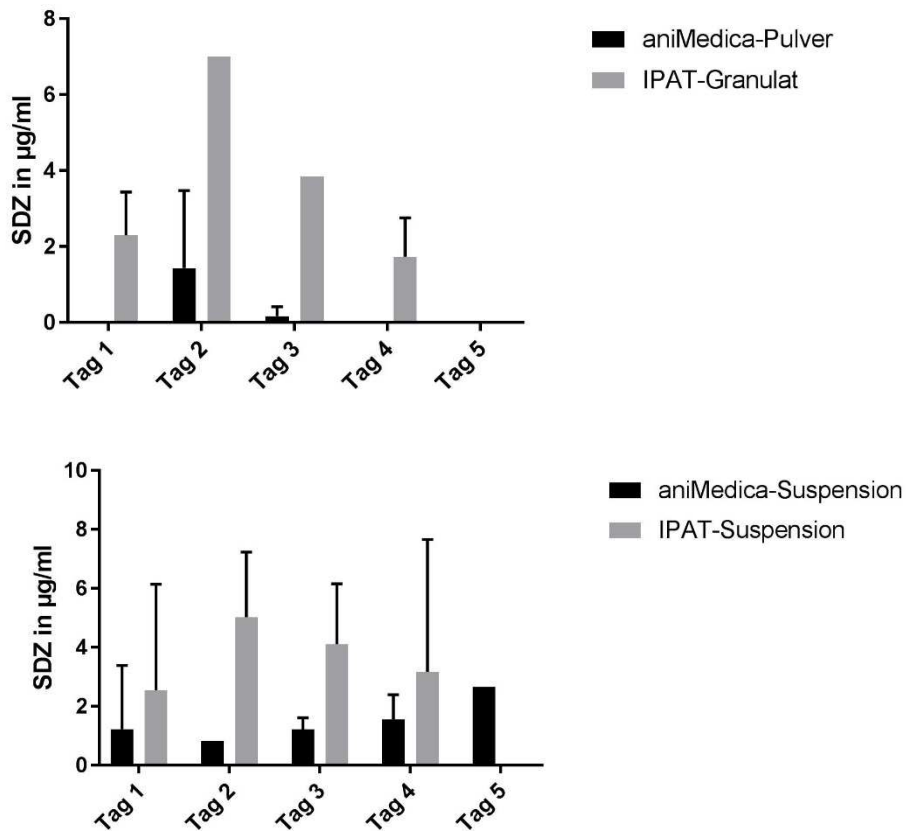


Abbildung 3.2.7: Sulfadiazinkonzentration im Urin von unbehandelten Schweinen, die in demselben Stallraum wie behandelte Schweine (orale Behandlung mit IPAT-Formulierungen bzw. aniMedica-Handelsprodukten über das Futter, Dosierung von 5 mg Trimethoprim und 25 mg Sulfadiazin pro kg KM) gehalten wurden

Aerosolstaubproben (Filterstaubproben)

In keinem Versuchsdurchgang konnte Trimethoprim in luftgetragendem Staub (Polycarbonatfilter) nachgewiesen werden.

Sulfadiazin wurde lediglich in dem Versuchsdurchgang, in welchem mit iPAT-Wirbelschichtgranulat behandelt wurde, in der Stallluft nachgewiesen. Es wurden Konzentrationen von bis zu 0,84 µg/m³ Luft gemessen. An Tag 15 konnte an beiden Pumpenpositionen kein Sulfadiazin mehr nachgewiesen werden.

Trimethoprim- und Sulfadiazingehalt im Sedimentstaub

In den Abbildungen 3.2.8 bis 3.2.11 wird der Sulfadiazingehalt im Sedimentstaub dargestellt, der zu den Probenahmetagen von jeweils 18 cm² Fläche, an vier definierten Lokalisationen im Stall abgesammelt wurde. Jeder Versuchsdurchgang wird einzeln in einer Abbildung dargestellt, wobei der Trimethoprim- bzw. Sulfadiazingehalt im Sedimentstaub der vier Sammelstellen gezeigt wird.

Vor Versuchsbeginn konnte weder Trimethoprim noch Sulfadiazin im Sedimentstaub nachgewiesen werden. Die für Trimethoprim nach der Behandlung mit der aniMedica-Suspension ermittelten Werte im Sedimentstaub lagen stets unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Sulfadiazin konnte hingegen im Sedimentationstaub nachgewiesen werden, wie die nachfolgenden Abbildungen zeigen.

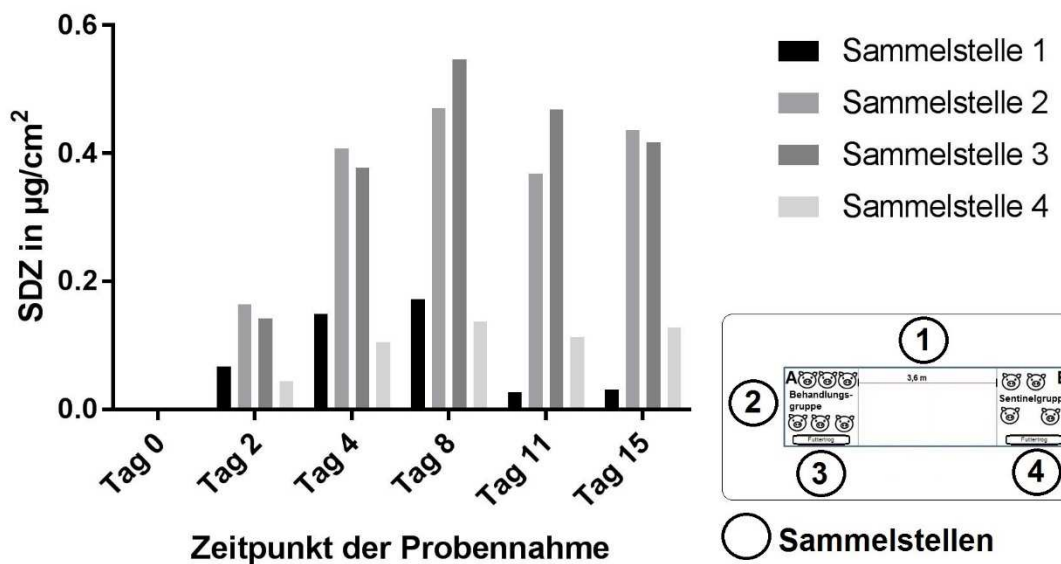


Abbildung 3.2.8: Sulfadiazingehalt im Sedimentstaub in µg/cm² nach der Behandlung mit dem aniMedica-Pulver

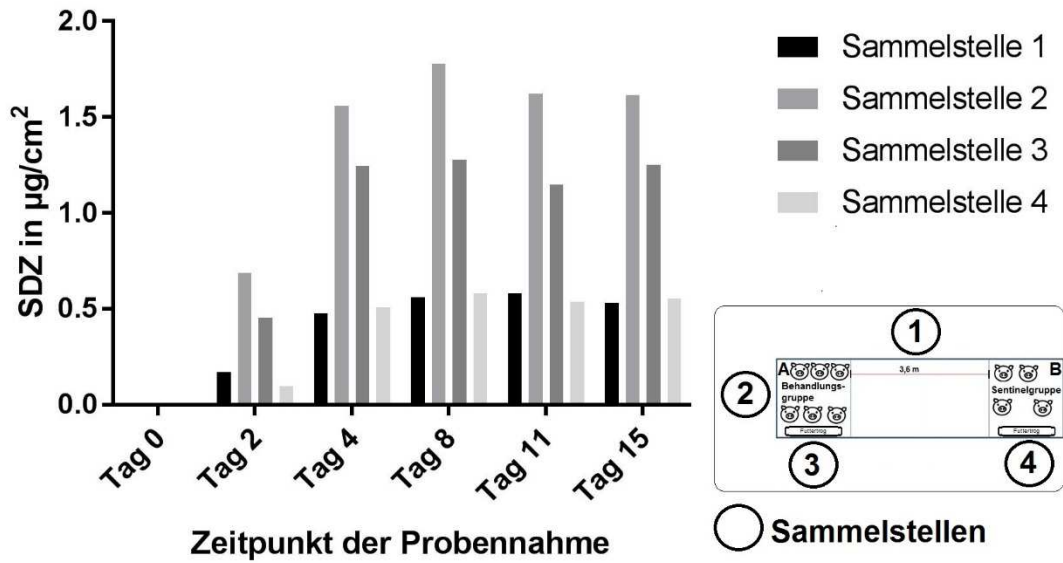


Abbildung 3.2.9: Sulfadiazingehalt im Sedimentstaub in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach der Behandlung mit dem iPAT-Wirbelschichtgranulat

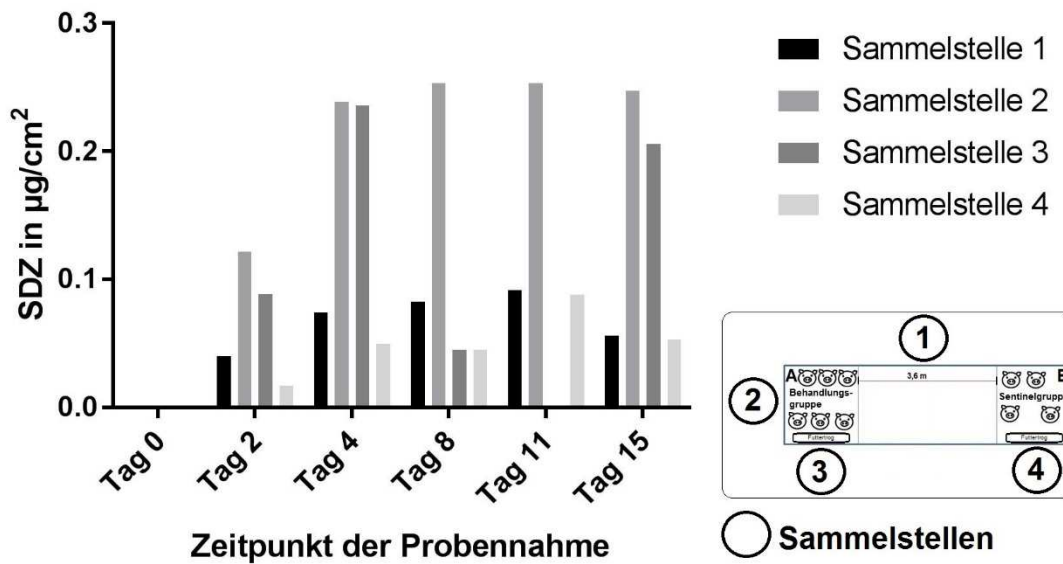


Abbildung 3.2.10: Sulfadiazingehalt im Sedimentstaub in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach der Behandlung mit der aniMedica-Suspension

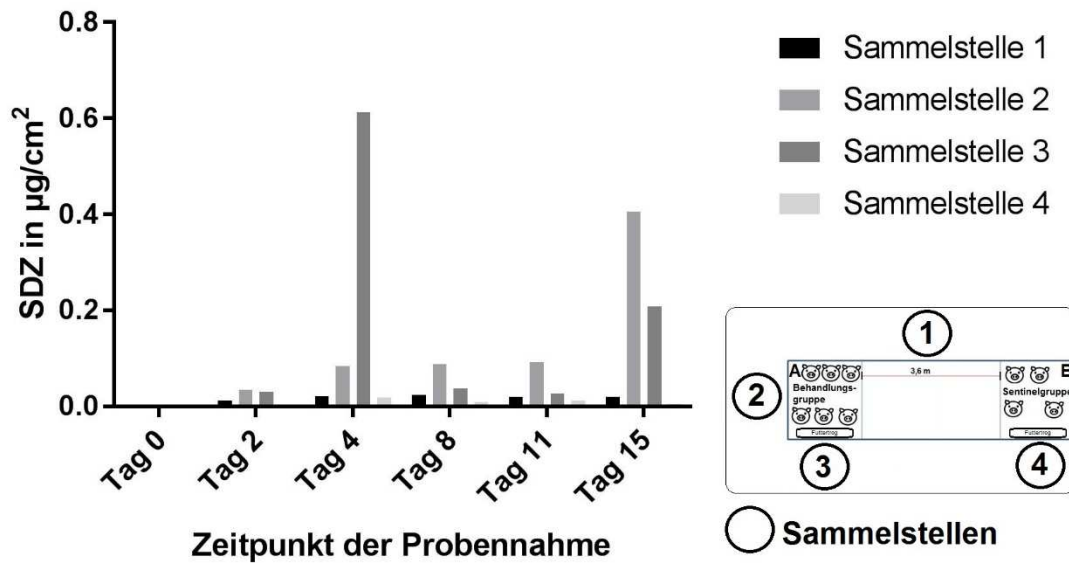


Abbildung 3.2.11: Sulfadiazingehalt im Sedimentstaub in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach der Behandlung mit der IPAT-Suspension

Versuch 2: Einmalige Gabe von zwei iPAT-Testformulierungen, einer Nanosuspension von Trimethoprim mit gelöstem Na-Sulfadiazin und einem Wibelschichtgranulat mit nanopartikulärem Trimethoprim, jeweils im Vergleich zu im Handel verfügbaren Arzneimitteln der aniMedica GmbH

Tabelle 3.2.1 gibt einen Überblick über die auch in diesem Versuch eingesetzten Prüfmuster. In diesem Versuchsdurchgang wurden Untersuchungen am Schwein mit einer handelsüblichen Pulverformulierung der aniMedica GmbH sowie vom iPAT hergestellten submikronen Formulierungen durchgeführt. Es erfolgte eine einmalige orale Eingabe der bestimmungsgemäßen Tagesdosis.

Die in den Abbildungen 3.2.12 und 3.2.13 dargestellten Plasmakonzentrationen von Trimethoprim stellen den Mittelwert der vier behandelten Tiere dar. In den von jedem Schwein vor Versuchsbeginn gesammelten Plasmaproben konnte kein Trimethoprim detektiert werden.

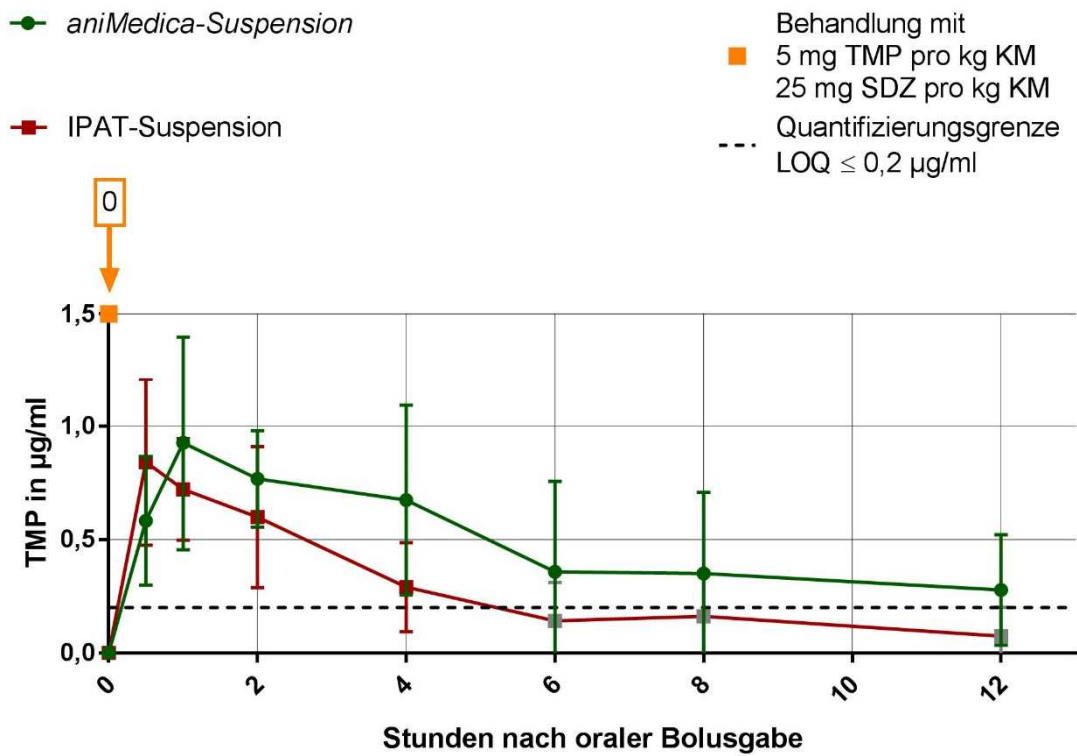


Abbildung 3.2.12: Trimethoprimkonzentration im Plasma von Schweinen (iPAT-Granulat = Wirbelschichtgranulat)

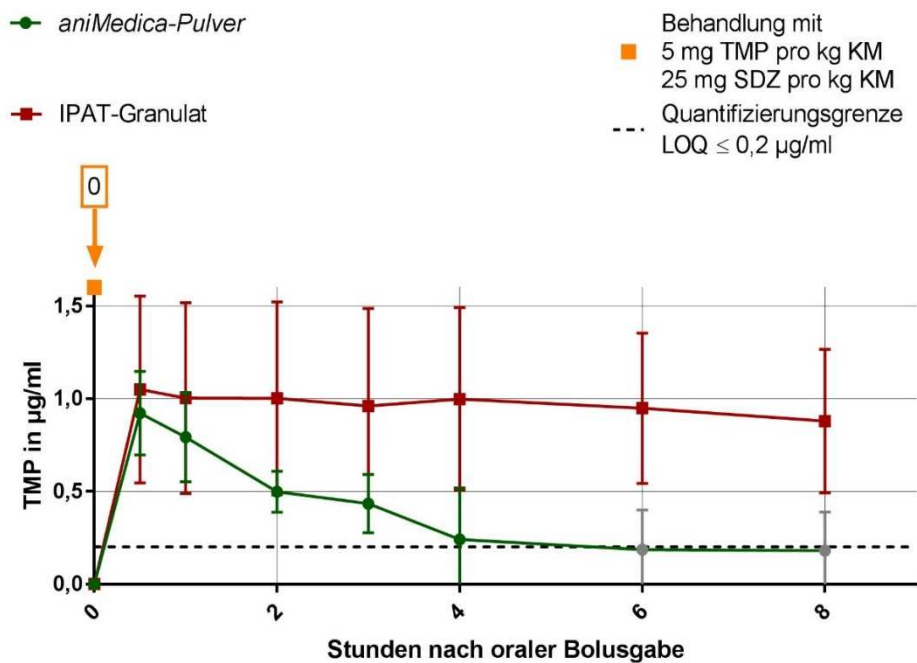


Abbildung 3.2.13: Trimethoprimkonzentration im Plasma von Schweinen (iPAT-Granulat = Wirbelschichtgranulat)

Bei den behandelten Schweinen fällt für das iPAT-Granulat in den ersten acht Stunden nach der Eingabe im Vergleich zu den anderen Versuchsmustern eine länger anhaltende Trimethoprimkonzentration im Blutplasma auf.

Versuch 3: Einmalige Gabe eines iPAT-Wirbelschichtgranulates

In diesem Versuchsdurchgang wurden Untersuchungen am Schwein mit einem vom iPAT hergestellten Wirbelschichtgranulat mit submikronen Trimethoprimpartikeln (15,7 mg Trimethoprim pro Gramm) wiederholt analog zu Versuch 2 durchgeführt. Es erfolgte eine einmalige orale Eingabe der bestimmungsgemäßen Tagesdosis.

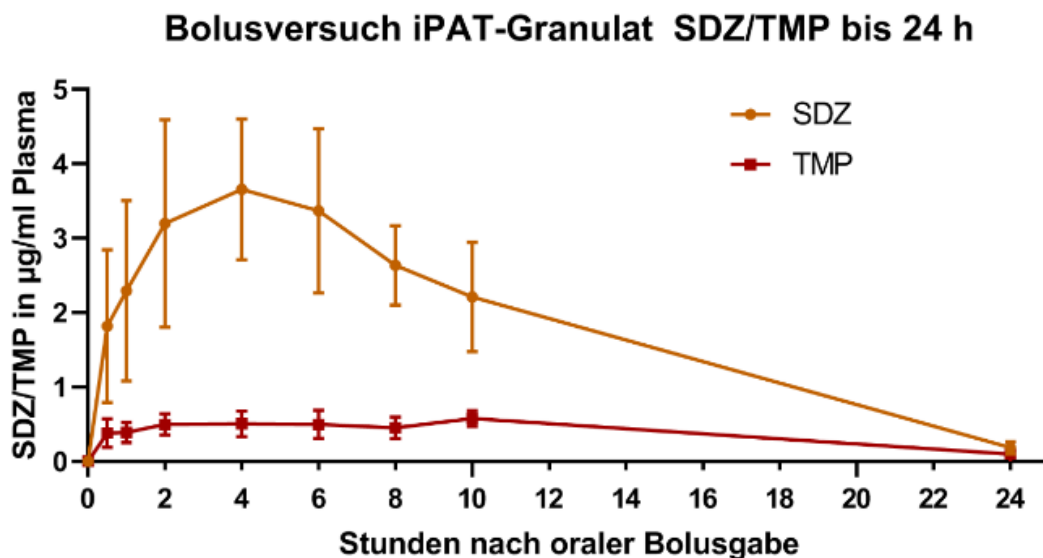


Abbildung 3.2.14: Sulfadiazin- und Trimethoprimkonzentration im Plasma von Schweinen

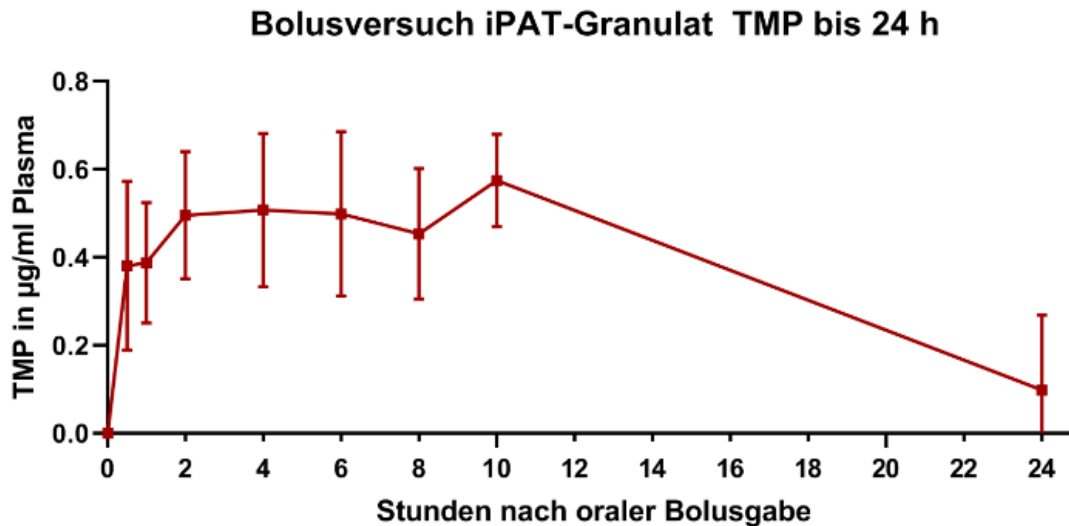


Abbildung 3.2.15: Vergrößerte Darstellung der Trimethoprimkonzentration im Plasma von Schweinen

Der Versuch bestätigt für die verwendete Formulierung die tendenziell verlängerte Eliminationshalbwertszeit von Trimethoprim. Allerdings liegt die gemessenen Konzentration von Trimethoprim nur bei ca. 50 % der in der vorangegangenen Studie gemessenen Konzentrationen.

Versuch 4: Einmalige Gabe von zwei iPAT-Testformulierungen, einem ungecoateten und einem gecoateten Hochenergiegranulat mit submikronen Trimethoprimpartikeln, im Vergleich zu einem im Handel verfügbaren Arzneimittel der aniMedica GmbH

In diesem Versuchsdurchgang wurden Untersuchungen am Schwein mit IPAT-Granulat, welches gecoatet oder nicht gecoatet war, im Vergleich zu aniMedica-Pulver durchgeführt. Es erfolgte eine einmalige orale Eingabe der bestimmungsgemäßen Tagesdosis.

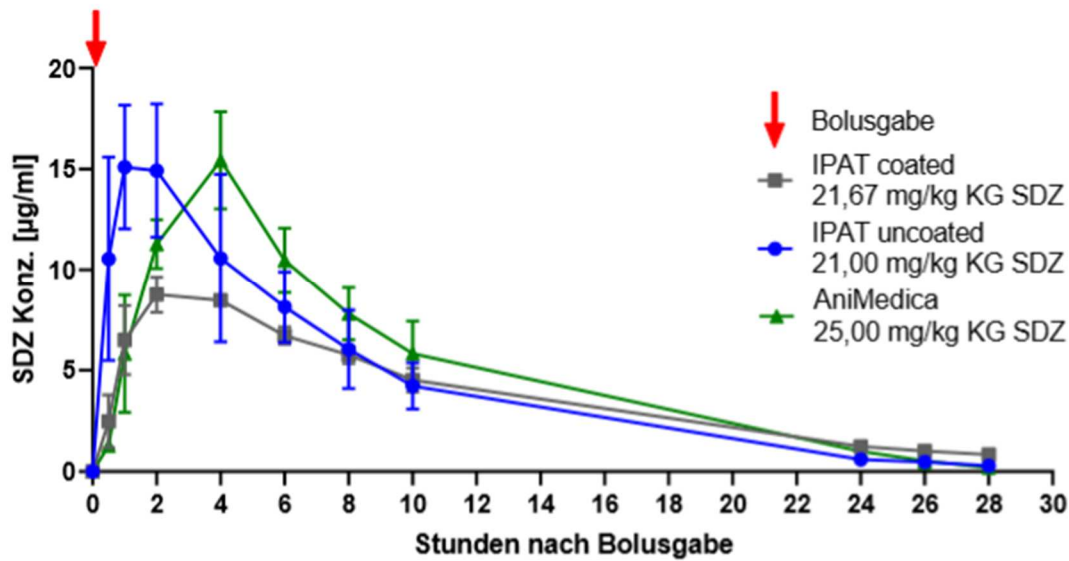


Abbildung 3.2.16: Sulfadiazinkonzentration im Plasma von Schweinen

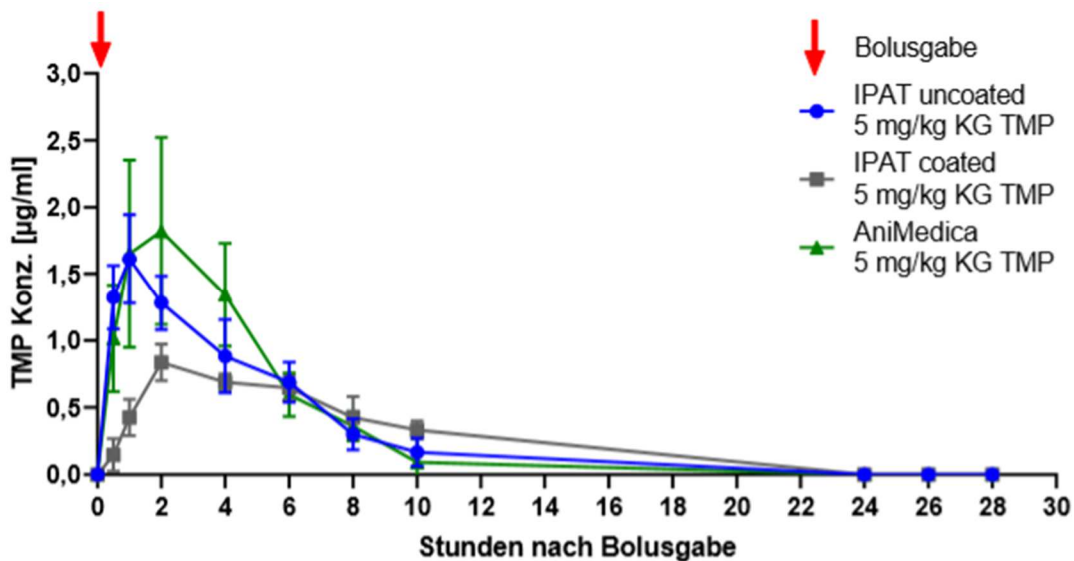


Abbildung 3.23.17: Trimethoprimkonzentration im Plasma von Schweinen

Der Versuch bestätigt die verlängerte Eliminationshalbwertszeit von Trimethoprim nach Behandlung mit den submikronen Partikeln nicht. Die gemessenen Konzentrationen liegen größenordnungsmäßig im Bereich des ersten durchgeführten Versuchs, wobei die nach Gabe des gecoateten Granulats gemessenen Konzentration deutlich niedriger war. Das Handelsprodukt aniMedica-Pulver und das nicht gecoatete Granulat zeigten hinsichtlich der erreichten Wirkstoffkonzentrationen keine Unterschiede. Allein die Sulfadiazinfreisetzung ist

beim ungecoateten iPAT-Hochenergiegranulat gegenüber des Handelspräparates beschleunigt.

Versuch 5: Einmalige Gabe eines reproduzierten iPAT-Wirbelschichtgranulates mit submikronen Trimethoprimpartikeln im Vergleich zu einem im Handel verfügbaren Arzneimittel der aniMedica GmbH

In diesem Versuchsdurchgang wurden Untersuchungen am Schwein mit einem IPAT-Wirbelschichtgranulat im Vergleich zu aniMedica-Pulver durchgeführt. Es erfolgte eine einmalige orale Eingabe der bestimmungsgemäßen Tagesdosis.

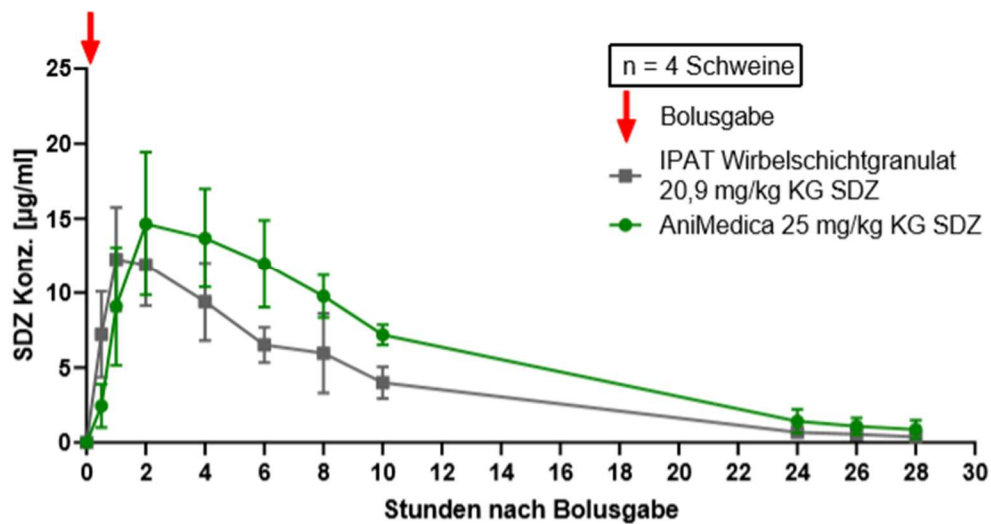


Abbildung 3.2.18: Sulfadiazinkonzentration im Plasma von Schweinen

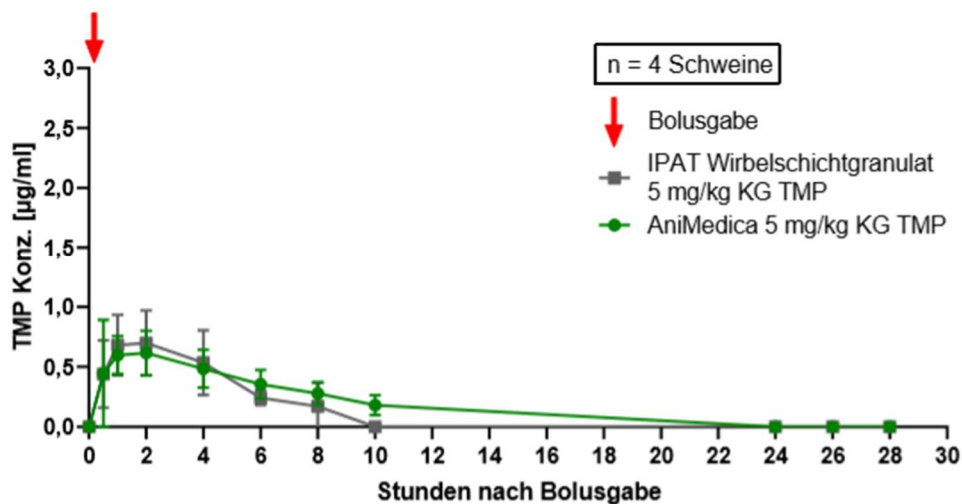


Abbildung 3.2.19: Trimethoprimkonzentration im Plasma von Schweinen

Im Blutplasma der behandelten Schweine lag die gemessene Konzentration von Sulfadiazin nach Eingabe des iPAT-Wirbelschichtgranulats geringfügig niedriger als nach Gabe des aniMedica-Vergleichsprodukts; allerdings muss die Dosierung berücksichtigt werden. Diese betrug für das iPAT-Wirbelschichtgranulat nur ca. 84 % der mit dem aniMedica-Produkt verabreichten Dosis, um gleiche Trimethoprimdosierungen von 5 mg/kg verabreichen zu können. Die gemessenen Trimethoprimkonzentrationen waren vergleichbar.

Untersuchung der bakteriellen Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber Sulfadiazin und Trimethoprim und deren Kombination *in vitro*

Die in den durchgeführten Versuchen vor Behandlungsbeginn aus Kotproben isolierten kommensalen Bakterien (*E. coli*) erwiesen sich alle als resistent gegenüber der Sulfadiazin/Tripethoprim-Kombination (Verhältnis 19:1). Daher konnten in den Tierversuchen keine Untersuchungen zur Resistenzentwicklung durchgeführt werden.

Um das momentan in handelsüblichen Präparaten verwendete Verhältnis von Sulfonamid zu Trimethoprim hinsichtlich des Potentials für Resistenzentwicklungen zu bewerten, wurde daher ein *In-vitro*-Resistenztest verwendet, bei dem zwei verschiedene *E.coli*-Isolate Verwendung fanden. Die Bakterien wurden über 21 Tage täglich mit subtherapeutischen Dosierungen der Antibiotika alleine oder in Kombination versetzt und die minimale Hemmkonzentration an Tag 0 und Tag 21 bestimmt. Die entsprechenden minimalen Hemmkonzentrationen gegenüber Sulfonamiden (Sulfamethoxazol) und Trimethoprim sind Tab. 3.2.4 zu entnehmen.

Tabelle 3.2.4: Minimale Hemmkonzentrationen gegenüber Sulfonamiden (SMX) und Trimethoprim (Trimethoprim) allein und in Kombination (1:19) für E.coli ATCC 25922 und E. coli 73.2 vor Beginn der In-vitro-Behandlung mit den Wirkstoffen

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> 73.2
Trimethoprim/SMX (1/19)	0,125 µg/ml	0,125 µg/ml
SMX	16 µg/ml	12 µg/ml
Trimethoprim	0,5 µg/ml	0,75 µg/ml

Die in Tabelle 3.2.4 gezeigten Daten belegen den bekannten synergistischen Effekt von Sulfonamiden und Trimethoprim (sog. Sequentialeffekt).

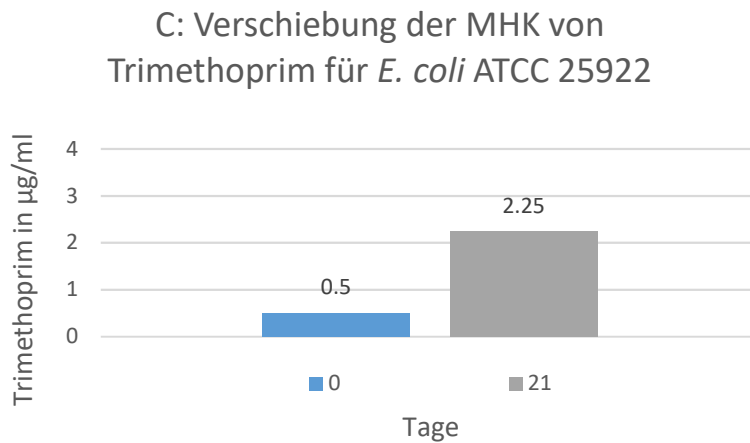
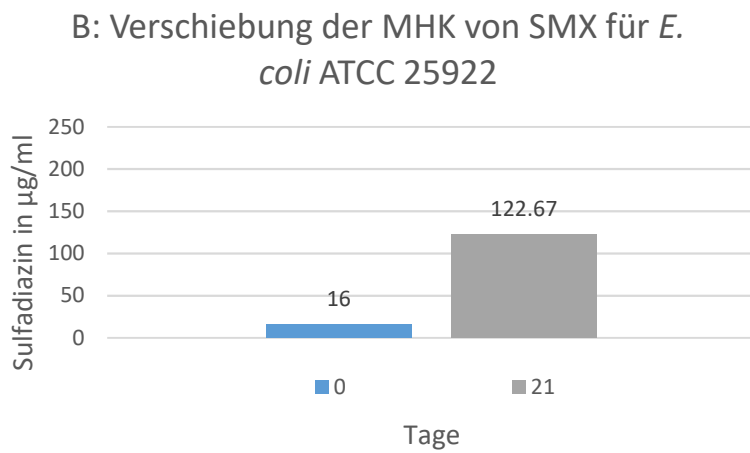
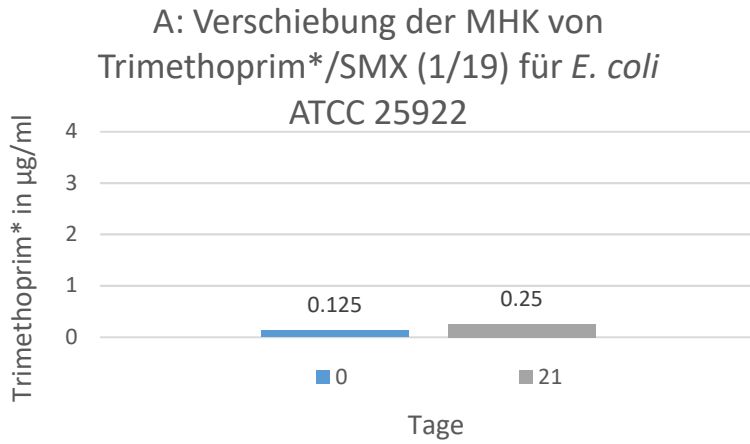
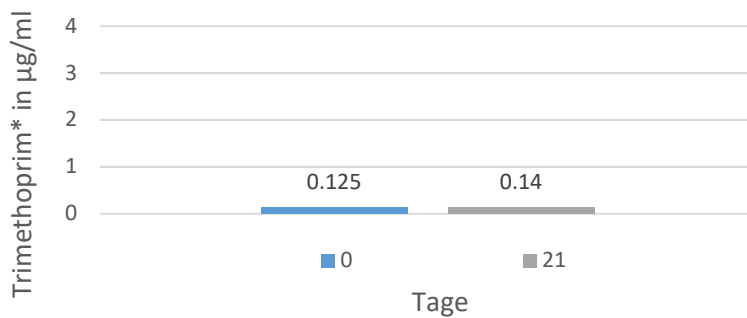
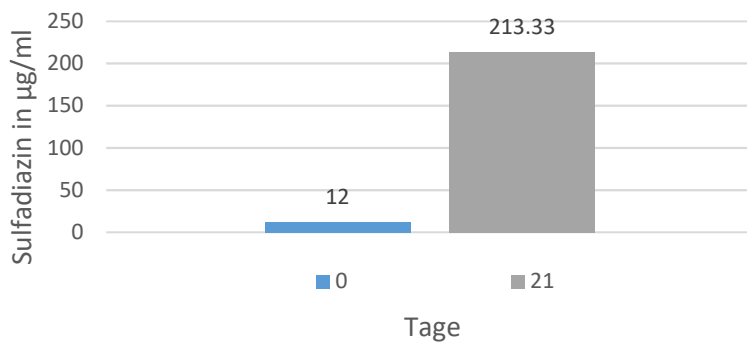


Abbildung 3.2.20: MHK-Entwicklung unter der täglichen Behandlung von *E. coli* ATCC25922 A: in Kombination 1 zu 19 (Trimethoprim:Sulfamethoxazol(SMX), B: mit Sulfamethoxazol (SMX) und C: mit Trimethoprim allein

A: Verschiebung der MHK von Trimethoprim*/SMX (1/19) für *E. coli* 73.2



B: Verschiebung der MHK von SMX für *E. coli* 73.2



C: Verschiebung der MHK von Trimethoprim für *E. coli* 73.2

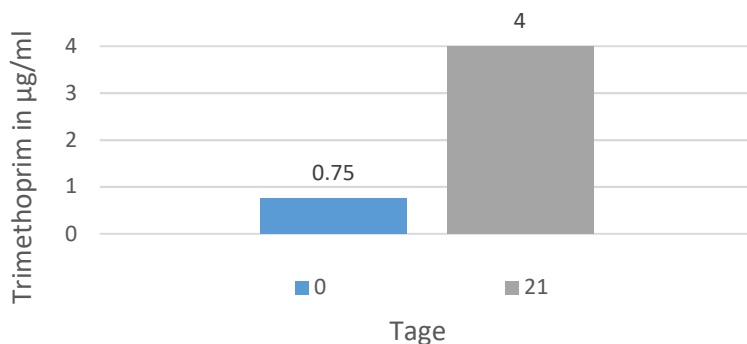


Abbildung 3.2.21: MHK-Entwicklung unter der täglichen Behandlung von *E. coli* 73.2 A: in Kombination 1 zu 19 (Trimethoprim:Sulfamethoxazol (SSMX), B: mit Sulfamethoxazol (SMX) und C: mit Trimethoprim allein

Wie in den Abbildungen 3.2.20 und 3.2.21 zu sehen ist, wurden bei beiden verwendeten *E.coli*-Isolaten *in vitro* unter der Behandlung mit Sulfamethoxazol und Trimethoprim (alleine appliziert) eine Erhöhung des MHK-Wertes erzeugt, während die Kombination von Sulfamethoxazol mit Trimethoprim im Verhältnis 1 zu 19 zu keiner entsprechenden Erhöhung der MHK führte. Demnach ist das verwendete Verhältnis von Sulfonamid zu Trimethoprim geeignet, eine Resistenzentwicklung zu minimieren.

3.3 Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Aufgabenstellungen

Am Institut für Lebensmittelchemie und –biotechnologie wurde eine Methode zur parallelen Bestimmung von Sulfadiazin (Sulfadiazin) und Trimethoprim (Trimethoprim) entwickelt und validiert, die auch für die Projektpartner verwendet wurde. Weitere Aufgaben waren Untersuchungen zur Stabilität von Sulfadiazin und Trimethoprim in verschiedenen wässrigen Lösungen und zu Biofilmversuchen mit verschiedenen Antibiotikakonfrontationen nach dem Protokoll des Institutes für Tierhygiene. Darüber hinaus erfolgten die Charakterisierung eines Photoabbauproduktes von Sulfadiazin und die Untersuchung von Interaktionen zwischen Wirkstoffen und Formulierungshilfsstoffen.

Die in der Technischen Universität Braunschweig hergestellten Suspensionen und Granulate mit unterschiedlichen Gehalten an NatriumSulfadiazin (Na-Sulfadiazin) und Trimethoprim (Trimethoprim) sowie Formulierungshilfsstoffen sollten mittels HPLC-UV auf ihre angegebenen Wirkstoffkonzentrationen überprüft werden. Zusätzlich wurden in Braunschweig Freisetzungskinetiken verschiedener Formulierungen durchgeführt, die auch vom Institut für Lebensmittelchemie mittels gleicher Technik gemessen und ausgewertet wurden. Diese wurden alle nach der nachfolgend beschriebenen Methode untersucht.

Das Institut für Tierhygiene der Tierärztlichen Hochschule führte Versuche mit Antibiotikakonfrontationen von Biofilmen sowie Versuche von Tränkwasserleitungen mit Bauersystemen und einen Einfluss dessen auf Antibiotika durch. Hierfür wurde auch ebendiese HPLC-UV-Methode angewandt.

Entwicklung und Validierung einer HPLC-UV-Methode für Sulfadiazin und Trimethoprim

Die Bestimmung von Sulfadiazin und Trimethoprim wurde mit einem HPLC-UV-System durchgeführt (siehe Tabelle 3.3.1).

Tabelle 3.3.1: HPLC-Komponenten der verwendeten HPLC-UV-Anlage.

Gerät	Modell	Hersteller
Autosampler	SIL-10ADVP	SHIMADZU
Degasser	DGU-14A	SHIMADZU
Pumpe	LC-10ATVP	SHIMADZU
Säulenofen	CTO-10ACVP	SHIMADZU
UV-Detektor	SPD-10AVP	SHIMADZU
Controller	SCL-10AVP	SHIMADZU
Software	Class VP 6.13 SP1	

In Tabelle 3.3.23.3.2 sind die Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse aufgelistet, der Gradient ist für alle Analysen in Tabelle 3.3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3.2: Messbedingungen für die HPLC-Messungen.

Säule	Hypersil Gold (Thermo Scientific): 150 mm x 4,60 mm; Porengröße: 5 µm
Eluent	Wässrige Lösung (A): 0,5 % Ameisensäurelösung, 1 mM Ammoniumacetat Organische Lösung (B): Methanol
Injektionsvolumen	10 µL
Temperatur	30 °C
Zeit	14,0 min
Flussrate	1,0 mL/min
Wellenlänge λ	270 nm

Tabelle 3.3.3: Gradient der HPLC-UV-Analyse für Sulfadiazin und Trimethoprim.

Zeit t [min]	Fließmittel B [%]
0	15
6,0	45
7,5	80
8,5	80
9,5	15
14,0	15

Um das Kalibrierverfahren zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu ermöglichen, musste für die entsprechende Kalibriergerade Varianzhomogenität vorliegen. Zur Bestimmung der Varianzhomogenität wurde eine Kalibriergerade aus zehn äquidistanten Sulfadiazin- und Trimethoprim-Konzentrationen von 0,05 bis 0,5 µg/mL erstellt. Die Kalibriergerade erfüllte in dem untersuchten Bereich die Voraussetzung der Varianzhomogenität und daher konnte nach DIN 32645 die Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet werden. Diese Parameter sind in Tabelle 3.3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.3.4: Auflistung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode für Sulfadiazin und Trimethoprim.

Parameter	Sulfadiazin [µg/mL]	Trimethoprim [µg/mL]
Nachweisgrenze	0,010	0,025
Bestimmungsgrenze	0,034	0,081

Außerdem wurde zu jeder Messung ein *Interday*-Standard zugefügt, der die Wiederholpräzision der verschiedenen Messtage angab. An jedem dieser Messtage wurde zudem ein *intraday*-Standard am Anfang und am Ende der Messung mitgeführt. Bei sehr vielen Messungen wurden weitere *Intraday*-Standards innerhalb der Probensequenz gemessen. Die Bestimmung der Abweichung ermöglichte zu verfolgen, ob die gleichmäßige Qualität der HPLC-Analyse über den gesamten Zeitraum gewährleistet war.

Stabilitätsuntersuchungen von Sulfadiazin und Trimethoprim in verschiedenen wässrigen Lösungen

Ziel dieser Untersuchung war es, Einflüsse verschiedener wässriger Lösungen auf die beiden Wirkstoffe nachzuweisen. Dabei wurde die beschriebene HPLC-UV-Methode verwendet.

Durchführung

Sulfadiazin (120 µg/mL) und Trimethoprim (80 µg/mL) wurden in einem Verhältnis von (3+2) in folgenden Lösungen angesetzt (siehe

Tabelle 3.3.5):

Tabelle 3.3.5: Parameter für die Stabilitätsuntersuchungen von Sulfadiazin und Trimethoprim.

Parameter	
Wässrige Lösungen	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1%ige Ameisensäurelösung • 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung pH 5 • 0,1 M Phosphatpuffer-Lösung pH 3 • 0,1 M Phosphatpuffer-Lösung pH 8 • Reinstwasser • Eisenlösung mit 2 mg/L Eisen
Temperatur	<ul style="list-style-type: none"> • Raumtemperatur
Lichteinfluss	<ul style="list-style-type: none"> • Ohne • Unter

Ergebnisse

In einem Zeitraum von 70 Versuchstagen konnte für beide Wirkstoffe eine hohe Stabilität nachgewiesen werden. In der folgenden Abbildung 3.3.1 sind verschiedene UV-Chromatogramme der beiden Wirkstoffe in unterschiedlichen wässrigen Lösungen dargestellt.

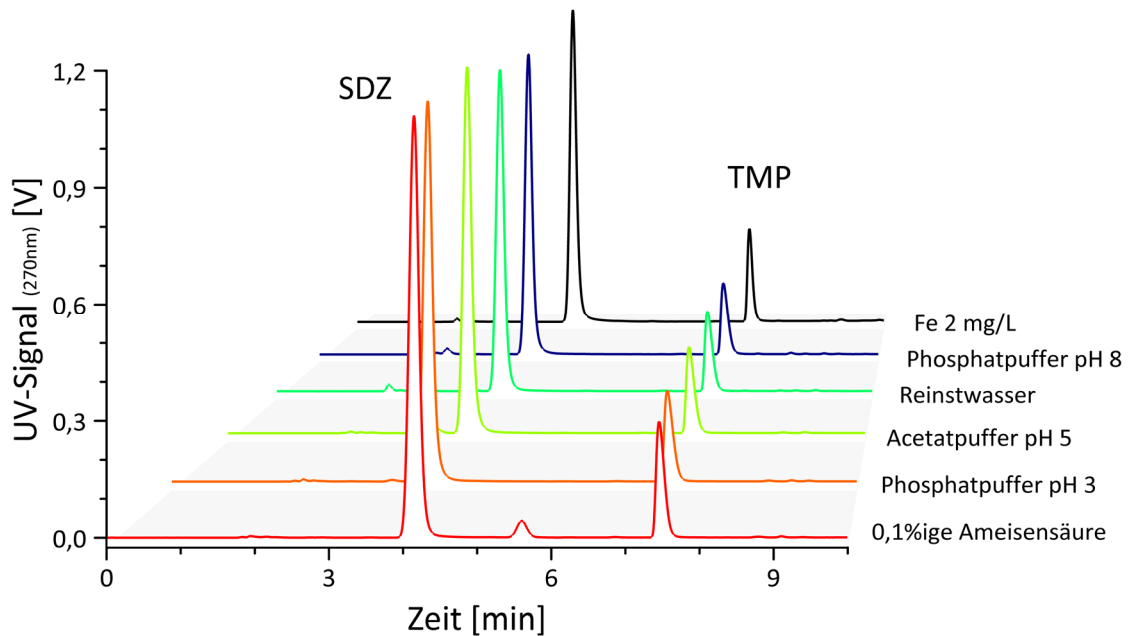


Abbildung 3.3.1: UV-Chromatogramme ausgewählter Lösungen von Sulfadiazin und Trimethoprim unter Lichteinfluss und Raumtemperatur nach 70 Versuchstagen, detektiert bei 270 nm.

Dabei fällt auf, dass in den Chromatogrammen der wässrigen Lösungen neue Peaks auftraten. In 0,1%iger Ameisensäure wurde ein Peak detektiert, der einen prozentualen Flächenanteil zum Sulfadiazin-Standard von über 1 % aufwies. Dieser eluiert zwischen Sulfadiazin und Trimethoprim bei 5,5 min. In Tabelle 3.6 ist der prozentuale Flächenanteil des Peaks bezogen auf den jeweiligen Sulfadiazin-Tagesstandard für mit und ohne Lichteinfluss aufgezeigt.

Tabelle 3.3.6: Prozentuale Flächenzunahme des Peaks bei 5,5 min in der 0,1%igen Ameisensäure-Lösung mit und ohne Lichteinfluss bezogen auf den Sulfadiazin-Tagesstandard mit 120 µg/mL.

Versuchstag	Flächen-% mit Lichteinfluss	Flächen-% ohne Lichteinfluss
0	-	-
5	2,53	2,66
11	3,58	3,47
18	3,75	3,73
20	3,96	3,90
70	3,87	4,02

Beim Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Lichteinfluss fällt auf, dass sie sich kaum unterscheiden. Am letzten Versuchstag ist der prozentuale Flächenanteil unter Lichteinfluss tendenziell leicht gesunken. In den anderen untersuchten Lösungen betrug der prozentuale Flächenanteil unter 1 % und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass beide Wirkstoffe in wässrigen Lösungen unter unterschiedlichsten Bedingungen sehr stabil sind. Saure Bedingungen können eine Verringerung des Sulfadiazin-Gehaltes hervorrufen (Ghanem und Abu-Lafi, 2013). Unter den ameisensauren Bedingungen konnte nach 5 Tagen ein Peak mit einem prozentualen Flächenanteil von 2,5 % detektiert werden, der bis zum 70. Versuchstag auf 4 % – mit und ohne Lichteinfluss – anstieg.

Konfrontation eines Modellbiofilms mit dem Kombinationspräparat

Der Projektpartner TiHo Hyg entwickelte einen Modellbiofilm, den er nach 7-tägiger Entwicklung mit den Wirkstoffen Sulfadiazin in Kombination mit Trimethoprim konfrontierte. Das Institut in Hannover führte die mikrobiologischen Untersuchungen durch und das Institut für Lebensmittelchemie bestimmte die Wirkstoffgehalte und ggf. neue Transformationsprodukte durch HPLC-UV-Analyse.

Nach den täglichen Probenahmen musste zwingend eine Sterilfiltration der Lösungen stattfinden, damit die HPLC-Säule nicht kontaminiert wurde und die Proben nicht weiter mikrobiologisch verändert werden konnten.

Ergebnisse in den Modell-Rohren

In den folgenden Grafiken sind die Gehalte der beiden Wirkstoffe im Versuchszeitraum aufgetragen. Dies wurde für zwei Biofilmversuche durchgeführt und jeweils in Doppelbestimmung gemessen. Die Auftragung der Konzentrationen erfolgt dabei prozentual,

sodass die Werte zwischen den Versuchen besser vergleichbar sind. Die Startkonzentrationen betragen für Sulfadiazin 150 mg/L und für Trimethoprim 30 mg/L. Bei der Analyse des Kombinationspräparates wurden schon in den ersten Probenahmen eine Stunde nach der Applikation Konzentrationsunterschiede zwischen dem Rohr mit und dem Kontrollrohr ohne Biofilm festgestellt (siehe Abbildung 3.3.2).

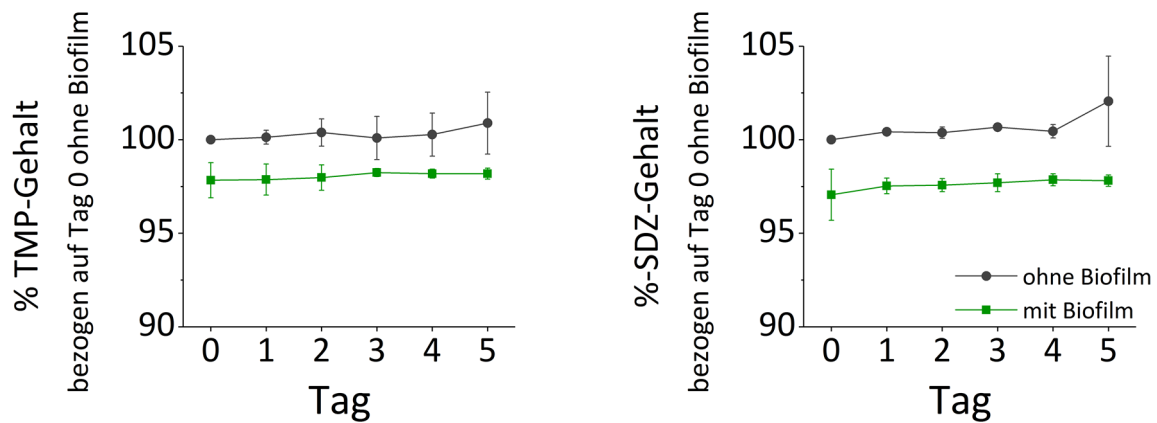


Abbildung 3.3.2: Prozentuale Trimethoprim- (links) und Sulfadiazin-Gehalte (rechts) in den Rohren mit (grün) und ohne (schwarz) Biofilm im Versuchszeitraum von 5 Tagen.

Über den Anwendungszeitraum sind in den jeweiligen Rohren nur marginale Veränderungen bezüglich der Wirkstoffgehalte zu erkennen. Zudem wurde kein Einfluss des Biofilms auf eine Transformation oder einen Abbau der Substanzen detektiert. Die geringeren Konzentrationen von Sulfadiazin im Biofilmrohr im Vergleich zum Kontrollrohr ohne Biofilm können ein Hinweis auf eine Diffusion des Wirkstoffes in oder eine Adsorption an den Biofilm sein. Dies gilt es noch zu klären. Die Trimethoprim-Konzentrationsunterschiede im Rohr mit Biofilm und dem Kontrollrohr ohne Biofilm liegen im Bereich der Messunsicherheit.

Ergebnisse im Modellbiofilm

Wie in der Etablierung eines Modellbiofilms des Institutes für Tierhygiene beschrieben (siehe TiHo-Hyg) wird nach 7-tägiger Entwicklung und nach Ende der Antibiotikakonfrontation der Biofilm aus den Rohren abgelöst. Dabei wird ein tensidhaltiger PBS-Puffer in das Rohr gegeben und danach die koloniebildenden Einheiten (KbE) aus der gepufferten Lösung auf ausgewählten Agarplatten gezählt. Nachdem eine Diffusion oder Adsorption der Wirkstoffe möglich erscheint, wurden die Wirkstoffe in dieser PBS-Tensid-Lösung mittels HPLC-UV-Analyse untersucht (siehe Tabelle 3.3.7).

Tabelle 3.3.7: Ergebnisse der HPLC-UV-Analyse in der tensidhaltigen PBS-Lösung mit der Umrechnung auf pro cm² Biofilm und die dazugehörige zur Totalzellzahl – 1. Untersuchung.

Proben- beschreibung	Sulfadiazin- Gehalt [µg/mL]	Sulfadiazin- Gehalt [µg/cm ²]	Totalzellzahl ¹ [log ₁₀ (KbE/cm ²)]
Rohr 1	3,36	11,21	7,20
Rohr 2	2,84	9,45	6,93
Rohr 3	3,49	11,64	7,22
Kontrollrohr (ohne Biofilm)	0,46	1,54	0

¹ Totalzellzahl: Summe koloniebildende Einheiten von *E. coli* und *P. fluorescens* aus der PBS-Lösung.

Dabei ist zu erkennen, dass Sulfadiazin in der PBS-Biofilm-Lösung quantifiziert werden kann. Der Wirkstoffgehalt in der Lösung mit Biofilm ist sechs- bis achtfach höher als in dem Kontrollrohr. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Biofilm einen Einfluss auf den Sulfadiazin-Gehalt in der PBS-Lösung hat. Ein eindeutiger Nachweis für eine Diffusion in den Biofilm oder eine Adsorption an den Biofilm ist das allerdings nicht. Es konnte hiermit zunächst bestätigt werden, dass der geringere Sulfadiazin-Gehalt in den Biofilm-Rohrlösungen ursächlich mit diesem zusammenhängt. Der Sulfadiazin-Gehalt in der PBS-Lösung korreliert dabei nicht mit der Totalzellzahl (siehe Tabelle 3.3.7).

In einem weiteren Versuch wurden zusätzlich zur Untersuchung der PBS-Lösung auch die vorherigen Waschschrte untersucht. Auffällig sind die niedrigeren Sulfadiazin-Gehalte in der PBS-Lösung im Vergleich zur ersten Untersuchung (siehe Tabelle 3.3.7 und Tabelle 3.3.8). Eine Erklärung dafür könnte die geringere Totalzellzahl in diesem Versuch sein.

Tabelle 3.3.8: Ergebnisse der HPLC-UV-Analyse in der tensidhaltigen PBS-Lösung mit der Umrechnung auf pro cm² Biofilm und die dazugehörige zur Totalzellzahl – 2. Untersuchung.

Proben- beschreibung	Sulfadiazin- Gehalt [µg/mL]	Sulfadiazin- Gehalt [µg/cm ²]	Totalzellzahl ¹ [log ₁₀ (KbE/cm ²)]
Rohr 1	0,636	2,12	6,75
Rohr 2	0,197	0,66	6,46
Rohr 3	0,306	1,02	6,54
Kontrollrohr (ohne Biofilm)	< NWG	< NWG	0

¹ Totalzellzahl: Summe koloniebildende Einheiten von *E. coli* und *P. fluorescens* aus der PBS-Lösung.

Durch den Versuch kann ebenfalls bestätigt werden, dass Sulfadiazin in den Rohren mit Biofilm eindeutig bestimmt werden kann. In der Kontrolle liegt die Sulfadiazin-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Kapitel 3.4).

In den folgenden Tabellen sind die Sulfadiazin-Gehalte der Waschlösungen (0,9%ige NaCl-Lösung) dargestellt. Das jeweilige Rohr wurde dreimal gespült. Dabei sollen leicht anhaftende Zellen abgespült werden, damit diese in den KbE-Untersuchungen nicht erfasst werden. Dabei könnten auch Sulfadiazin und Trimethoprim mit abgespült werden, die äußerlich am Biofilm oder an der Rohrwand (PVC) adsorbiert sind.

Tabelle 3.3.9: Sulfadiazin-Ergebnisse der HPLC-UV-Analyse in den Waschlösungen.

Sulfadiazin-Gehalt [µg/mL]	Rohr 1	Rohr 2	Rohr 3	Kontrollrohr (ohne Biofilm)
1. Waschschrift	6.13	5.48	4.92	3.28
2. Waschschrift	1.50	1.21	1.23	0.74
3. Waschschrift	0.89	0.76	0.65	0.17

Tabelle 3.3.10: Trimethoprim-Ergebnisse der HPLC-UV-Analyse in den Waschlösungen.

Trimethoprim-Gehalt [µg/mL]	Rohr 1	Rohr 2	Rohr 3	Kontrollrohr (ohne Biofilm)
1. Waschschrift	0.479	0.498	0.476	0.339
2. Waschschrift	0.095	< BG	< BG	< BG
3. Waschschrift	< BG	< BG	< BG	< NWG

In Tabelle 3.3.9 und Tabelle 3.3.10 ist ersichtlich, dass durch das Spülen mit 0,9%iger NaCl-Lösung Sulfadiazin und Trimethoprim in die Spüllösungen gelangen. Bei Trimethoprim kann es wegen seiner geringeren Einsatzkonzentration zum Teil nicht mehr bestimmt bzw. nachgewiesen werden. Dagegen kann man bei Sulfadiazin gut erkennen, dass mit jedem

Spülschritt der nachgewiesene Sulfadiazin-Gehalt abnimmt. Dies ist in den Rohren mit Biofilmen und auch im Kontrollrohr erkennbar. Dies könnte daraufhin deuten, dass durch das erste Leeren der Rohre nicht die vollständige Lösung entfernt wurde, sondern noch einzelne Tropfen zurückblieben. Darüber hinaus kann es möglich sein, dass Sulfadiazin und Trimethoprim am Biofilm und in der Kontrolle schwach adsorbieren und leicht abgespült werden könnten. Ein Unterschied zwischen dem Biofilmrohr und der Kontrolle ist, dass die nachgewiesenen Gehalte in den Rohren mit Biofilm höher sind als in den Kontrollen und somit ein Einfluss des Biofilms nachvollziehbar ist.

Die Wirkstoffdiffusion in oder -adsorption an den Biofilm kann insofern bestätigt werden. Das Spülen der Rohre wurde auch in den vorherigen Versuchen durchgeführt, aber nicht im Detail untersucht, weshalb man keine unmittelbare Aussage zum Spüleffekt in diesen Untersuchungen treffen kann.

Zusammenfassung Untersuchungen der Wirkstoffe mit einem Modellbiofilm (HPLC-UV)

Es konnte festgestellt werden, dass der etablierte Modellbiofilm einen Einfluss auf die Wirkstoffe hat. Schon nach einer Stunde Exposition konnten Konzentrationsunterschiede zwischen dem Biofilm- und dem Kontrollrohr bestimmt werden. Dies deutete auf eine Diffusion in oder eine Adsorption an den Biofilm hin. Durch mehrfaches Spülen mit 0,9%iger NaCl-Lösung konnten restliches Sulfadiazin und Trimethoprim entfernt werden einschließlich schwach sorbiertem Sulfadiazin an der Rohrwand oder am Biofilm. Dennoch konnte in den Biofilmrohren Sulfadiazin nach Ablösen des Biofilms in der PBS-Lösung bestimmt werden, welches eine mögliche Diffusion in oder eine stärkere Adsorption an den Biofilm bestätigt. Entsprechende Aussagen zu Trimethoprim können wegen der deutlich geringeren Einsatzkonzentration nicht gemacht werden.

Aus den Untersuchungen der PBS-Lösung könnte man folgern, dass die Dichte des Biofilms einen Einfluss auf das Festhalten von Sulfadiazin haben könnte. Bei einem geringeren KbE-Gehalt pro cm^2 könnte auch weniger Sulfadiazin in den Biofilm eindringen. Was man bisher nicht abschätzen kann, ist ein möglicher Einfluss der extrazellulären Substanzen (EPS), die einen Großteil eines Biofilms ausmachen. Könnte bei einer geringeren KbE-Dichte auch weniger EPS produziert werden? Daher ist eine unmittelbare Korrelation mit den bisherigen Untersuchungen nicht möglich.

Charakterisierung eines Phototransformationsproduktes von Sulfadiazin: SO₂-extrudiertes Sulfadiazin (Sulfadiazin_{ex})

Hintergrund

In verschiedenen Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass sich der Gehalt von Sulfadiazin durch Autoklavieren verringerte. Gleichzeitig konnte in den autoklavierten

Lösungen ein neuer Peak im UV-Chromatogramm bei einer Retentionszeit von 3,4 min detektiert werden (siehe Abbildung 3.3.3).

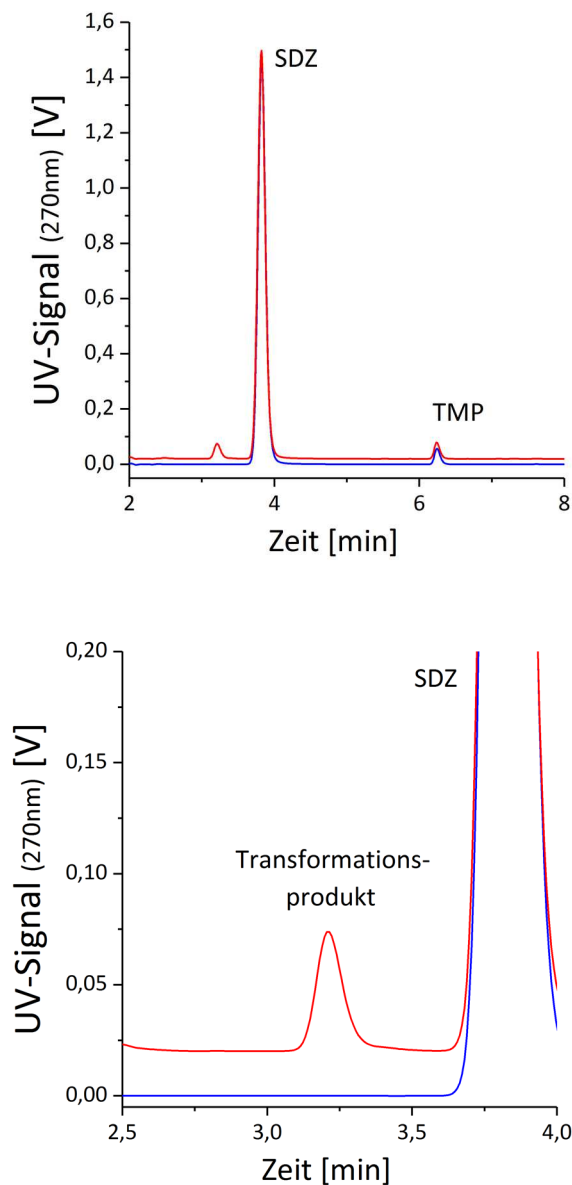


Abbildung 3.3.3: UV-Chromatogrammausschnitte von Sulfadiazin und Trimethoprim vor (blau) und nach (rot) dem Autoklavieren (links), auf der rechten Seite UV-Chromatogrammausschnitte desgleichen im Bereich von 2,5 bis 4,0 min.

Dieses Produkt konnte mittels HR-TOF-MS identifiziert werden. Beim Autoklavieren findet eine SO_2 -Extrusion statt und es entsteht 1-N-(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin, SO_2 -extrudiertes Sulfadiazin (Sulfadiazin_{ex}, siehe Abbildung 3.3.43.3.4).

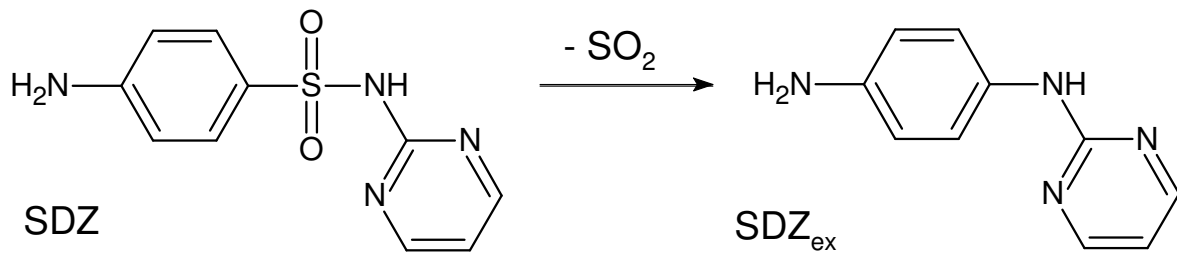


Abbildung 3.3.4: Reaktionsgleichung zur Bildung von Sulfadiazin_{ex} aus Sulfadiazin durch SO₂-Extrusion beim Autoklavieren.

Diese Reaktion ist auch als eine charakteristische Photoreaktion von Sulfonamiden bekannt (Periša *et al.*, 2013). Zur biologischen Aktivität und Stabilität von Sulfadiazin_{ex} selbst ist bisher nicht viel bekannt, weshalb eine Charakterisierung bezüglich der Stabilität in verschiedenen Lösungen und ein Test zur Bestimmung der mikrobiologischen Aktivität durchgeführt wurden sowie auch eine Konfrontation mit dem etablierten Modellbiofilm. Für die Analyse von Sulfadiazin_{ex} wurde die vorhandene HPLC-UV-Methode adaptiert.

Methodenadaptierung und -validierung für Sulfadiazin_{ex}

Die HPLC-Parameter und Eluenten entsprechen den in Kapitel 0 beschriebenen. Der HPLC-Gradient wurde an Sulfadiazin_{ex}, das vor Sulfadiazin eluiert, angepasst (siehe Abbildung 3.3.3).

Tabelle 3.3.11: Gradient der HPLC-UV-Analyse von Sulfadiazin_{ex}.

Zeit t [min]	Fließmittel B [%]
0	10
4,5	90
6,0	90
6,5	10
11,0	10

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie die Qualitätskontrolle wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Eine Kalibriergerade aus zehn äquidistanten Sulfadiazin_{ex}-Konzentrationen im Bereich von 0,05 bis 0,5 µg/mL zeigte Varianzhomogenität und somit konnten die Nachweis- und Bestimmungsgrenze gemäß DIN 32645 berechnet werden (siehe Tabelle 53.3.12).

Tabelle 5: Auflistung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode für Sulfadiazin_{ex}.

Parameter	Sulfadiazin _{ex} [µg/mL]
Nachweisgrenze	0,007
Bestimmungsgrenze	0,026

Stabilitätsuntersuchungen des SO₂-extrudierten Sulfadiazin

Die Parameter für die Stabilitätsuntersuchungen sind in Tabelle 3.3.133.3.13 aufgeführt. Die Startkonzentration betrug 100 µg/mL und der Versuch wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt.

Tabelle 3.3.13: Bedingungen für die Stabilitätsuntersuchungen von Sulfadiazin_{ex}.

Parameter	
Lösungen	<ul style="list-style-type: none"> • Methanol • Wässrig bei pH 4, 7 oder 10
Temperatur	<ul style="list-style-type: none"> • Raumtemperatur • 37°C • 4°C • -18°C
Lichteinfluss	<ul style="list-style-type: none"> • Ohne • Mit

Sulfadiazin_{ex} zeigte sich unter allen Bedingungen als stabil. Die Abweichungen der Sulfadiazin_{ex}-Konzentrationen blieben unter 1 %.

Antimikrobielle Aktivitätsbestimmung mittels Brillantschwarz-Reduktionstest

Mit Hilfe des Brillantschwarz-Reduktionstests (BRT, Hersteller: Analytik in Milch) ist es möglich, die antimikrobielle Aktivität von Wirkstoffen und ihren Transformationsprodukten bezüglich eines empfindlichen Testbakteriums zu ermitteln. Die Aktivität von Sulfadiazin_{ex} wurde im Vergleich zu Sulfadiazin als Referenz gemessen. Der Test wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

In die Kavitäten eines Streifens wurden je 100 µL einer Negativkontrolle, einer Positivkontrolle (Penicillin G) und fünf verschiedener Konzentrationen des Antibiotikums und von Sulfadiazin_{ex} (in Milch angesetzt) pipettiert.

Tabelle 3.3.14: Konzentrationen für die antimikrobielle Aktivitätsbestimmung mittels BRT von Sulfadiazin und Sulfadiazin_{ex} in Milch.

Konzentration [µg/mL]	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Sulfadiazin	0,01	0,05	0,10	0,25	0,75
Sulfadiazin _{ex}	10	50	100	150	200

Die Aktivität wird photometrisch im Vergleich zu einer Referenzkonzentration bestimmt. Nach der Inkubation sind die Kavitäten – je nach Probe – gelb oder bläulich gefärbt. Gelbfärbung bedeutet, dass keine antimikrobielle Aktivität vorliegt. Blaufärbung deutet auf eine Hemmung hin.

Zunächst wurde ein BRT durchgeführt, bei dem die Konzentrationen für Sulfadiazin und Sulfadiazin_{ex} gleich waren. Dabei zeigte sich keine Färbung bei Sulfadiazin_{ex}, weshalb der Test mit den in Tabelle 3.3.14 aufgelisteten Konzentrationen wiederholt wurde. Bei beiden Tests zeigte sich für das Antibiotikum Sulfadiazin bei den drei höchsten Konzentrationen die erwartete Blaufärbung. Für die Behandlung mit dem Transformationsprodukt von Sulfadiazin zeigte sich hingegen Gelbfärbung. Die zugehörigen Kavitäten sind in Abbildung 3.3.5 dargestellt.

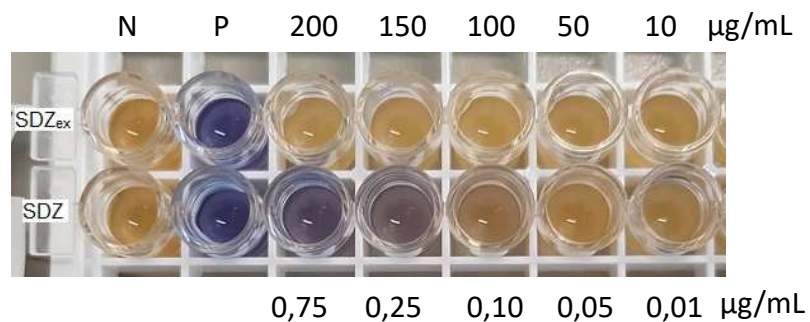


Abbildung 3.3.5: Direkter Vergleich der BRT-Teststreifen von Sulfadiazin (unten) und seinem Transformationsprodukt Sulfadiazin_{ex} (oben). N=Negativkontrolle (hemmstofffreie Milch, P=Positivkontrolle (Penicillin G), Sulfadiazin- oder Sulfadiazin_{ex}-Konzentrationen von links nach rechts absteigend in µg/mL.

Die Gelbfärbung aller Kavitäten, die mit Sulfadiazin_{ex} versetzt wurden, deutete darauf hin, dass diese Substanz nicht in gleichem Maße wie Sulfadiazin antimikrobiell wirkt. Demnach hat Sulfadiazin_{ex} selbst bei sehr hohen Konzentrationen keine Hemmwirkung bei dem eingesetzten Testbakterium. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, dass strukturell vergleichbare Photoabbauprodukte von Sulfonamiden nur noch sehr schwache bzw. keine antimikrobielle Aktivität mehr besitzen (Zessel *et al.*, 2014). In dieser genannten

Studie wurden jedoch nicht die einzelnen Photoabbauprodukte auf antimikrobielle Aktivität untersucht, sondern die bestrahlten Lösungen, die möglicherweise mehrere Photoabbauprodukte enthielten.

Konfrontation des Modellbiofilms mit Sulfadiazin_{ex}

Nach den Konfrontationsversuchen mit Sulfadiazin und Trimethoprim mit dem Biofilmprotokoll der TiHoHyg wurde auch das Transformationsprodukt Sulfadiazin_{ex} zur Konfrontation, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, eingesetzt.

Untersuchung mittels HPLC-UV-Analyse

Bei den mit Sulfadiazin_{ex} konfrontierten PVC-Rohren konnte eine Abnahme der Sulfadiazin_{ex}-Konzentration und die Entwicklung eines neuen Peaks beobachtet werden. In Abbildung 3.3.6 sind die erhaltenen UV-Chromatogramme für eine Probe aus einem mit Sulfadiazin_{ex} konfrontierten Biofilmrohr am ersten und letzten Versuchstag (Tag 0 und Tag 7) dargestellt. Es zeigt die deutliche Entwicklung der neuen Substanz bei einer Retentionszeit von 6,8 min. Da die Substanzen mit einer unpolaren RP-C18-Säule getrennt wurden, scheint das entstandene Transformationsprodukt unpolarer als Sulfadiazin_{ex} zu sein. In den Kontrollrohren ohne Biofilm konnte dieser Peak nicht detektiert werden.

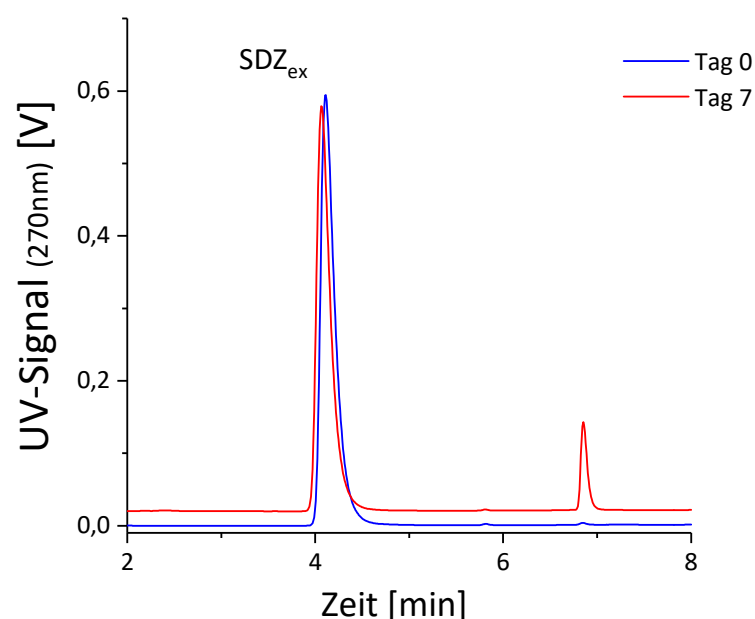


Abbildung 3.3.6: UV-Chromatogrammausschnitte eines mit Sulfadiazin_{ex}-konfrontierten Biofilmrohres am ersten (Tag 0, blau) und letzten Versuchstag (Tag 7, rot).

Dabei konnte für alle Sulfadiazin_{ex}-konfrontierten Biofilmrohre eine Konzentrationsabnahme detektiert werden. Für das Biofilmrohr mit einer Sulfadiazin_{ex}-Ausgangskonzentration von 100 µg/mL ist der prozentuale Verlauf in Abbildung 3.3.7 dargestellt. Die

Anfangskonzentrationen wurden auf 100 % festgelegt und alle weiteren Werte darauf bezogen.

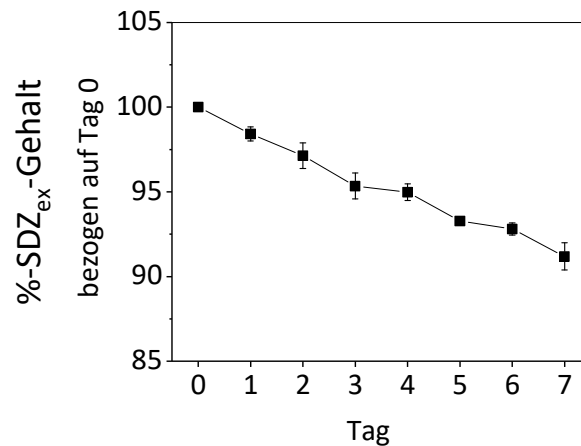


Abbildung 35: Konzentrationsverlauf von Sulfadiazin_{ex} im Biofilmrohr mit einer Sulfadiazin_{ex}-Ausgangskonzentration von 100 µg/mL.

Dabei zeigt sich eine Konzentrationsabnahme für Sulfadiazin_{ex} von über 8 %. Die Peakentwicklung des Transformationsproduktes von Sulfadiazin_{ex} im Laufe der sieben Beprobungstage ist in Abbildung 3.3.8 beispielhaft dargestellt.

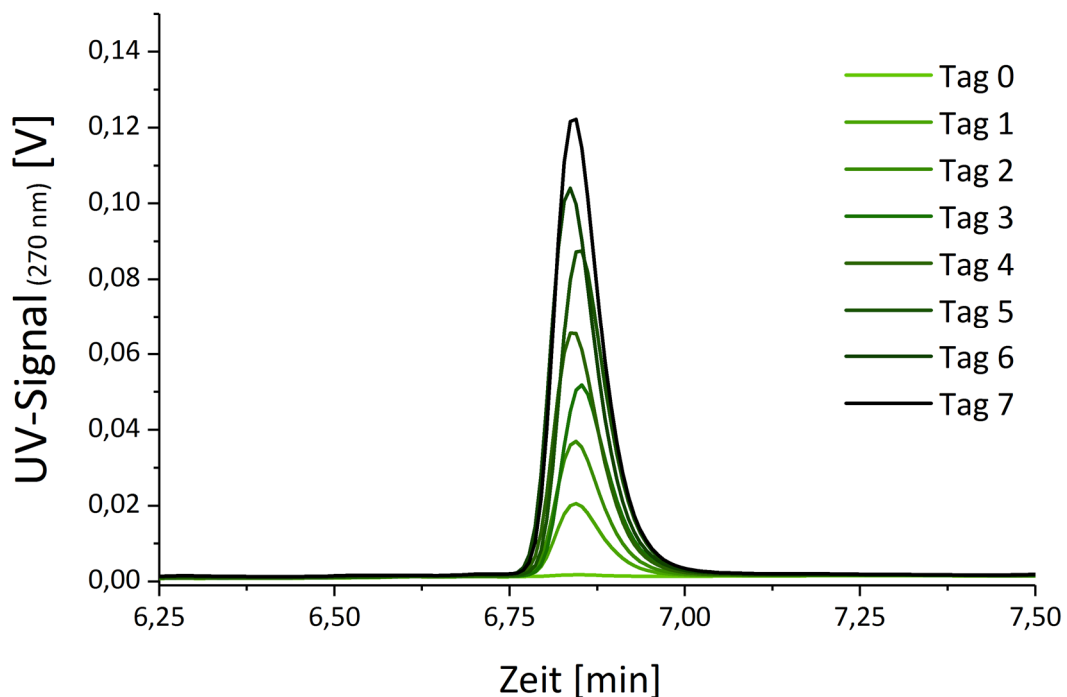


Abbildung 3.3.8: UV-Chromatogrammausschnitte des Transformationsproduktes an den sieben Beprobungstagen von einem Biofilmrohr mit der Startkonzentration von 100 µg/mL.

Es konnte durch einen zusätzlichen Versuch gezeigt werden, dass die Bildung des Transformationsproduktes ausschließlich durch *P. fluorescens* erfolgte.

Identifizierung des Transformationsproduktes von Sulfadiazin_{ex}

Zur Bestimmung der exakten Masse des Transformationsproduktes von Sulfadiazin_{ex} wurde ein Time of Flight-Massenspektrometer (TOF-MS) der Firma „AB Sciex“ verwendet.

Es wurde zunächst eine Full-Scan-Messung durchgeführt und daraufhin MS/MS-Experimente. Die TOF-MS-Messung zur Identifizierung des Transformationsproduktes von Sulfadiazin_{ex} ergab den in Abbildung dargestellten Full Scan.

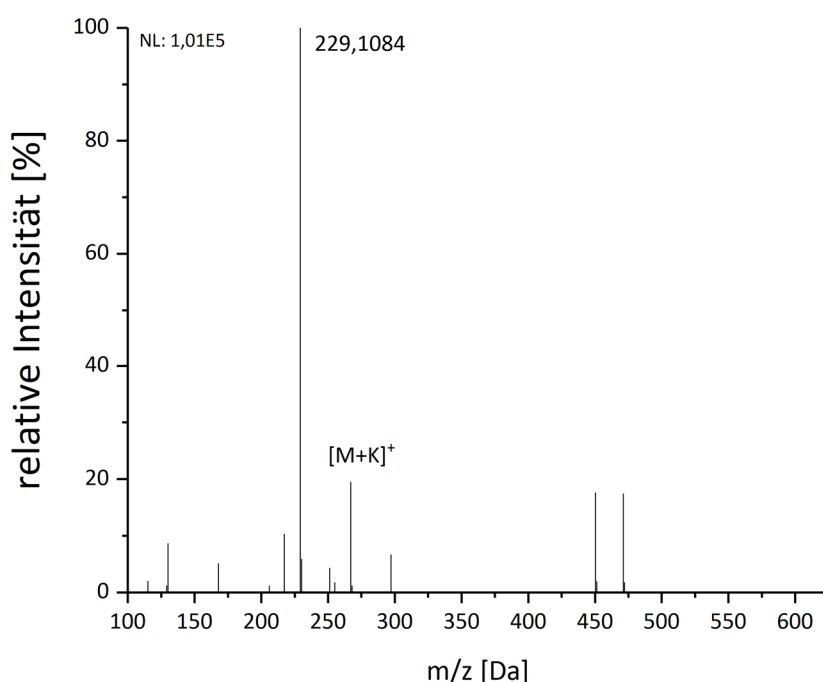


Abbildung 3.3.9: ESI⁺-TOF-MS-Spektrum (Full Scan, CE 10) des Transformationsprodukts von Sulfadiazin_{ex}.

Für den Molekülionenpeak mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) von 229,1 Da wurden die in Tabelle 3.3.15 aufgeführten Summenformeln ermittelt. Alle anderen Vorschläge hatten höhere Abweichungen.

Tabelle 3.3.15: Per ESI⁺-TOF-MS ermittelte Summenformeln für das Transformationsprodukt sowie exakte Massen und Abweichungen in [ppm].

Summenformel	M_{exakt} [Da]	$(M+H)^+$ _{exakt} [Da]	m/z	Abweichung [ppm]
C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O	228,10Trimethoprim	229,10838	229,10839	-0,4
C ₁₁ H ₁₆ O ₅	228,09977	229,10705	229,10705	5,4

Da die Acetylierung eine in der Literatur oft beschriebene Form der Metabolisierung bzw. Transformierung von Sulfonamiden ist (Sukul *et al.*, 2008; Kümmerer, 2009; Periša *et al.*, 2013) und die erste vorgeschlagene Strukturformel zu dieser Art der Transformation passt, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem Transformationsprodukt um das acetylierte Sulfadiazin_{ex} handeln könnte. Dies bestätigt auch die Annahme, dass das Transformationsprodukt unpolarer als Sulfadiazin_{ex} ist und somit – wie gezeigt – später in der HPLC-UV-Analyse eluiert. Die demnach vermutete Struktur des Transformationsprodukts mit seinen erwarteten Fragmenten ist in Abbildung 3.3.10 dargestellt.

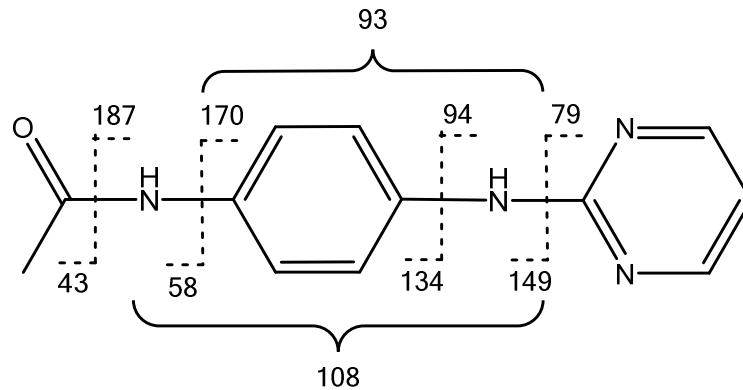


Abbildung 3.3.10: Struktur des Transformationsprodukts von Sulfadiazin_{ex} und seine möglichen Fragmente.

Die MS²-Messung mit einer Kollisionsenergie von 20 eV (CE 20) ergab das in Abbildung 3.3.11 dargestellte Spektrum. Das Spektrum verdeutlicht, dass das Fragment, welches als erstes entstand, ein m/z von 187,1 Da hat. Dies entspricht dem Molekülionenpeak des Full Scans des Sulfadiazin_{ex}-Standards. Somit wurde die Annahme, dass es sich bei dem untersuchten Transformationsprodukt um eine Substanz mit einer Molekülformel von C₁₂H₁₂N₄O handelte, bestätigt. Die andere in Tabelle 3.3.15 angegebene Summenformel konnte hierdurch ausgeschlossen werden.

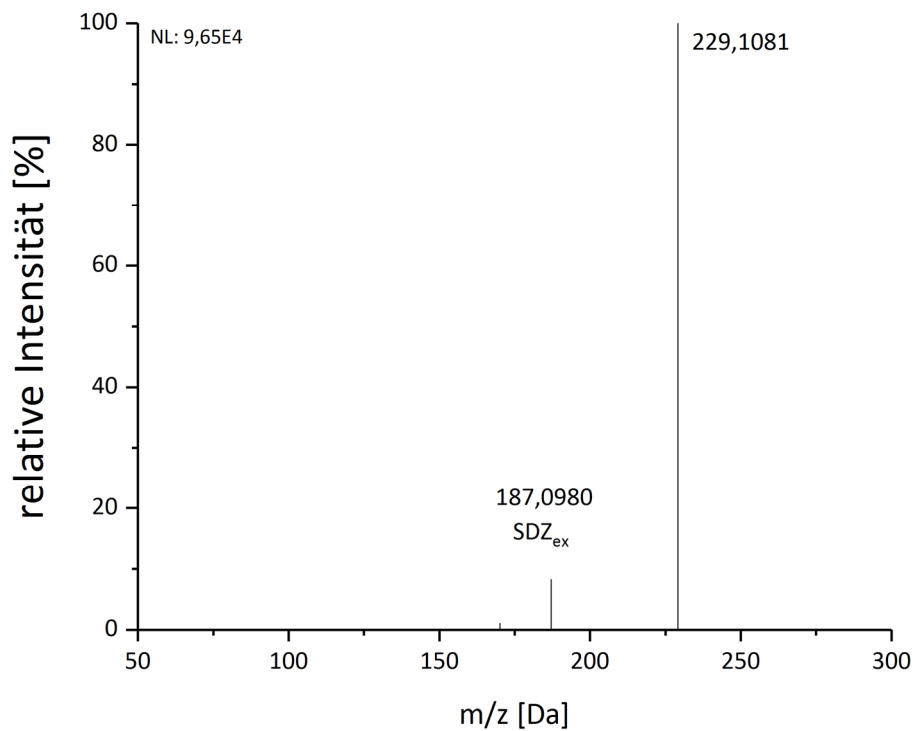


Abbildung 36.3.11: ESI⁺-MS²-Spektrum (CE20) der Masse mit m/z 229,1 Da für das Transformationsprodukt von Sulfadiazin_{ex}.

In Abbildung 3.3.12 ist das vollständige Massenspektrum bei einer CE von 30 des Transformationsproduktes dargestellt mit der bildlichen Darstellung der dazugehörigen Fragmente. Diese ähneln erwartungsgemäß auch dem typischen Massenspektrum eines Sulfonamids bei den kleineren m/z .

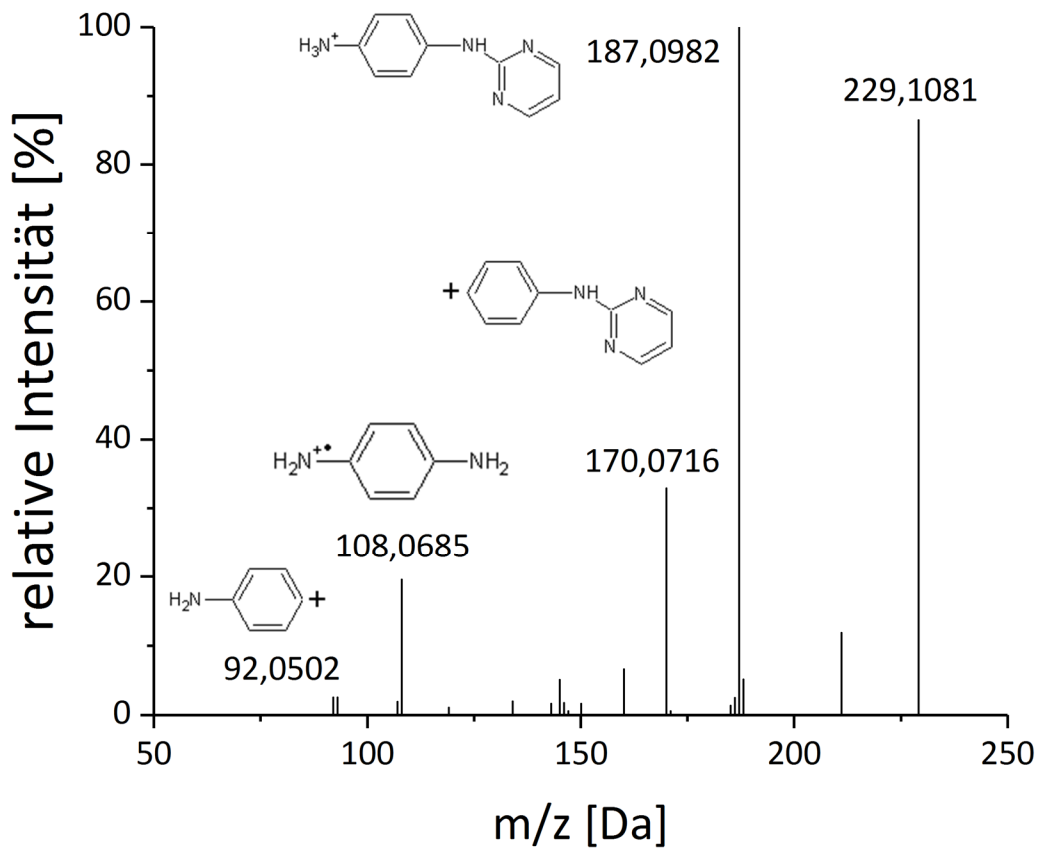


Abbildung 3.3.12: ESI⁺-MS²-Spektrum (CE30) mit isoliertem m/z 229,1 Da für das Transformationsprodukt.

Zusammenfassung und Bewertung

Sulfadiazin kann beim Autoklavieren unter SO₂-Verlust zu Sulfadiazin_{ex} umgewandelt werden. Diese SO₂-Extrusion ist bei Sulfonamiden auch als Photolysereaktion beschrieben. Bisher ist wenig bekannt über Stabilität und biologische Wirkung dieser Transformationsprodukte, die möglicherweise in der Umwelt gebildet werden können. Sulfadiazin_{ex} zeigte sich als sehr stabil in Methanol sowie in wässrigen Lösungen bei pH 4, 7 und 10.

Im Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) konnte Sulfadiazin_{ex} – auch in sehr hohen Konzentrationen bis 200 µg/mL – keine mikrobielle Wirksamkeit gegenüber dem Testkeim entfalten. Insofern könnte die Photolyse auch als eine wichtige Reaktion für die Inaktivierung von Sulfonamiden – möglicherweise auch in der Umwelt – angesehen werden.

Mit Hilfe von *Pseudomonas fluorescens* konnte Sulfadiazin_{ex} durch den Modellbiofilm in ein Transformationsprodukt umgewandelt werden. Dabei entstand das acetylierte Produkt an der endständigen Amino-Gruppe, welches durch die Bestimmung der exakten Masse und des Fragmentmusters identifiziert werden konnte. Da Sulfadiazin vor allem in der

Veterinärmedizin eingesetzt und somit oft über Gülle in die Umwelt gelangt (Baran *et al.*, 2011), kann das Vorkommen von Sulfadiazin_{ex} neben Gewässern vor allem auch im Boden erwartet werden. Da die verwendete Pseudomonadenart oft in Böden vorkommt (Kay *et al.*, 2001), ist es auch möglich, dass sich dort das Transformationsprodukt bildet.

Die Transformation von Sulfadiazin_{ex} durch den Modellbiofilm zeigt, dass dieser auch metabolisch aktiv ist. Interessant ist zusätzlich, dass der Biofilm das Transformationsprodukt Sulfadiazin_{ex} acetylieren kann. Die Acetylierung nutzen Bakterien, um Substanzen zu inaktivieren und sich somit vor ihnen zu schützen. Sulfadiazin_{ex} hat keine antimikrobiologische Aktivität, Sulfadiazin hingegen schon. Somit bleibt die spannende Frage offen, warum Sulfadiazin nicht acetyliert wird.

Interaktionen zwischen Wirkstoffen und Formulierungshilfsstoffen

Hintergrund

Eine Probenserie der Freisetzungskinetikversuche vom Institut für Partikeltechnik von der TU Braunschweig zeigte eine deutliche Gelbfärbung nach Ankunft im Labor (Lagerung dabei zwei Tage bei Raumtemperatur), siehe Abbildung 3.3.13:



Abbildung 3.3.13: Probenserie einer Freisetzungskinetik nach zweitägiger Lagerung bei Raumtemperatur (Beschriftung von links nach rechts: Bild 1: V1 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 40 [min], Bild 2: V1 60, 62, 64, 68, 75, 90 und 120 [min] und Referenzlösung). Zwischen der Probe 60 und 62 erfolgte ein Sprung von pH 2 auf pH 10.

Die Gelbfärbung war beim Abschicken der Proben noch nicht ersichtlich. Auffällig ist, dass die Gelbfärbung erst nach dem Sprung von pH 2 auf pH 10 nach der Probe 60 erscheint. Die übrigen Probenserien waren und blieben farblos. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass der pH-Wert und die Zusammensetzung der Formulierung eine entscheidende Rolle spielen. Nur in dieser Formulierung (V1) wurde der Zusatz von Lactose als Formulierungshilfsstoff eingesetzt. Lactose ist ein reduzierender Zucker und könnte somit mit Aminogruppen der beiden Wirkstoffe Sulfadiazin und Trimethoprim interagieren. Um eine Interaktion nachzuweisen, wurde ein systematischer Versuchsaufbau entwickelt.

Durchführung

Versuchsaufbau

Bei der Durchführung sollte nicht nur Lactose als reduzierender Zucker untersucht werden, sondern auch der in Veterinärapplikationen oft verwendete Hilfsstoff Glucose. Als Kontrolle fungierten dabei der nichtreduzierende Zuckeralkohol Sorbitol und eine Lösung ohne Zusätze. So ergaben sich vier Versuchsreihen. Darüber hinaus sollten die Wirkstoffe einzeln und in Kombination untersucht werden. Dies erfolgte bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C über einen Zeitraum von 16 Wochen.

Tabelle 3.3.16: Versuchsparemeter für den Nachweis von möglichen Interaktionen von Sulfadiazin und Trimethoprim mit Formulierungshilfsstoffen.

Parameter	
Wässrige Lösungen	<ul style="list-style-type: none">• pH 2• pH 7• pH 10
Temperatur	<ul style="list-style-type: none">• 37°C (Trockenschrank)
Lichteinfluss	<ul style="list-style-type: none">• Ohne
Wirkstoffe	<ul style="list-style-type: none">• Sulfadiazin (750 mg/L)• Trimethoprim (150 mg/L)• Sulfadiazin und Trimethoprim (750 mg/L und 150 mg/L)
Reduzierende Zucker	<ul style="list-style-type: none">• Lactose (5918 mg/L)• Glucose (3114 mg/L)
Kontrollen	<ul style="list-style-type: none">• Sorbitol (nichtreduzierender Zuckeralkohol, 3149 mg/L)• Ohne Zusatz

HPLC-UV-Analytik

Die HPLC-Parameter und Eluenten entsprechen den in Kapitel 0 beschriebenen. Die HPLC-UV-Methode wurde an die Analyten angepasst. Dies ergab folgenden Gradienten (siehe Tabelle 3.3.17).

Tabelle 3.3.17: Gradient der HPLC-UV-Analyse zum Nachweis einer Interaktion von Sulfadiazin und/oder Trimethoprim mit reduzierenden Zuckern.

Zeit t [min]	Fließmittel B [%]
0	10
3,5	45
5,0	80
6,0	80
7,0	10
11,5	10

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie die Qualitätskontrolle wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung der Varianzhomogenität wurde eine Kalibriergerade aus zehn äquidistanten Sulfadiazin- und Trimethoprim-Konzentrationen von 0,05 bis 0,5 µg/mL erstellt.

Tabelle 3.3.18: Auflistung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode für Sulfadiazin und Trimethoprim für die Analytik des Interaktionsnachweises.

Parameter	Sulfadiazin [µg/mL]	Trimethoprim [µg/mL]
Nachweisgrenze	0,015	0,012
Bestimmungsgrenze	0,050	0,045

Ergebnisse

Innerhalb des Versuchszeitraumes konnten in den UV-Chromatogrammen der Proben mit reduzierenden Zuckern und dem Wirkstoff Sulfadiazin sowie der Kombination Sulfadiazin und Trimethoprim neue Peaks detektiert werden, die vor Sulfadiazin eluieren. Bei der Probenreihe mit Lactose eluiert dieser bei 3,0 min, in der Probenreihe mit Glucose bei 3,4 min (siehe Abbildung 3.3.14). Diese konnten weder in den Versuchsreihen mit Trimethoprim noch bei den Kontrollen mit Sorbitol bzw. ohne Zusatz beobachtet werden.

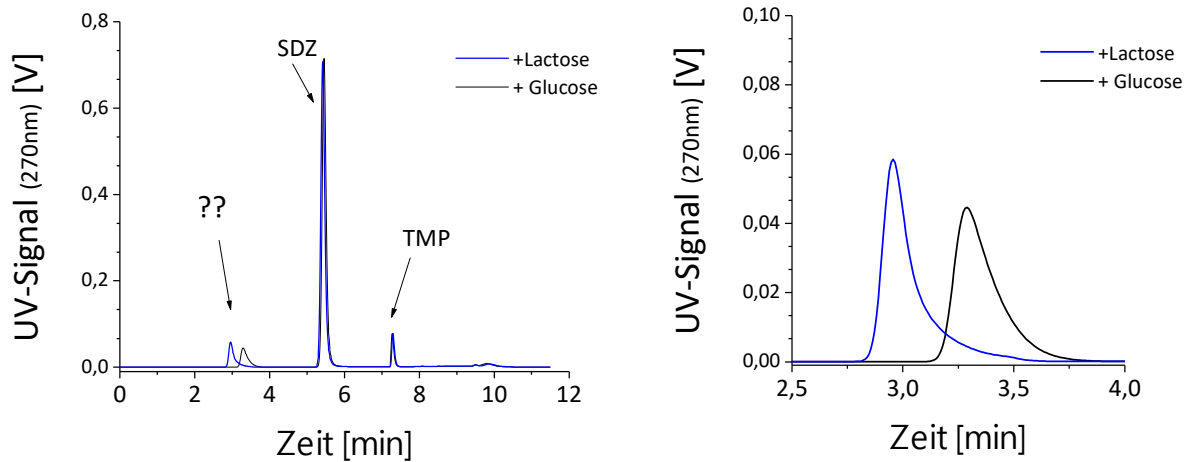


Abbildung 3.3.14: UV-Chromatogramme der Proben mit Sulfadiazin und Trimethoprim mit den Zusätzen Glucose (schwarz) oder Lactose (blau) bei pH 10 nach 12 Wochen Inkubation bei 37 °C. Rechte Seite: UV-Chromatogrammausschnitt von 2,5 bis 4,0 min.

Zur ersten Einschätzung der Gehalte wurde die Fläche der neuen Peaks prozentual auf den Tagesstandard bezogen. In der Abbildung 3.3.153.3.15 sind die Peakflächen-Ergebnisse für den Zusatz mit Lactose für alle drei pH-Werte, für Sulfadiazin allein und für die Kombination mit Trimethoprim für den Zeitraum von 16 Wochen dargestellt.

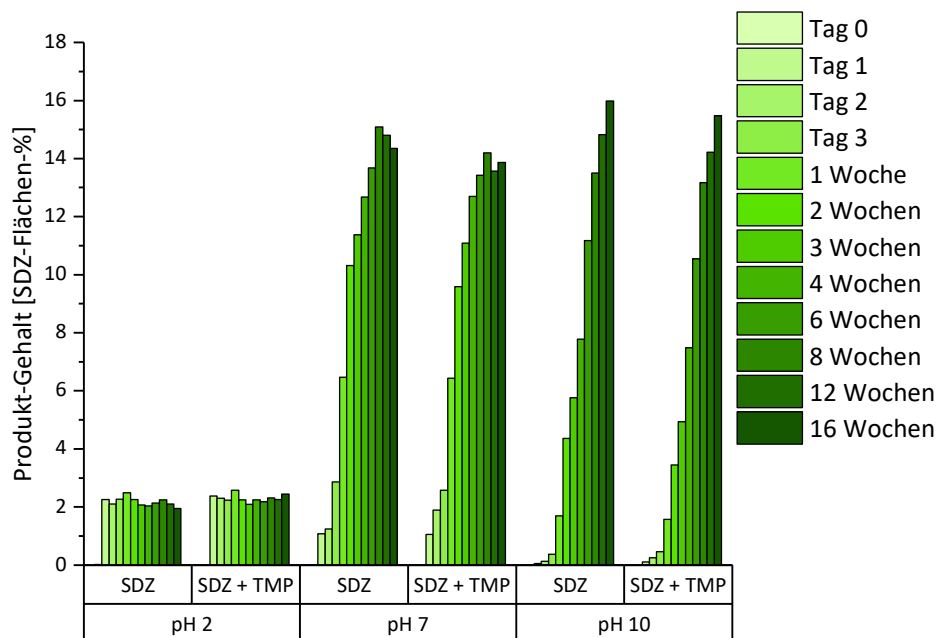


Abbildung 3.3.15: Darstellung der prozentualen Peakflächenverhältnisse zum Sulfadiazin-Tagesstandard vom neu entstandenen Peak in den Proben mit Lactose. Verglichen wurden Sulfadiazin und das Kombinationspräparat Sulfadiazin + Trimethoprim in Verbindung mit drei pH-Werten über einen Zeitraum von insgesamt 16 Wochen.

In dieser Abbildung 3.3.15 ist zu erkennen, dass sich der Peak bei allen pH-Werten und bei beiden Wirkstoffvarianten bildet. Auffällig ist, dass sich der Peak bei pH 2 unmittelbar bildet und dann über den ganzen Zeitraum konstant bei ca. 2 % bleibt. Im Gegensatz dazu steigt der Gehalt bei pH 7 und 10 vergleichsweise stark an. In der folgenden Abbildung ist dies als Zeitstrahl für die Lactoseproben mit Sulfadiazin als einzelнем Wirkstoff dargestellt.

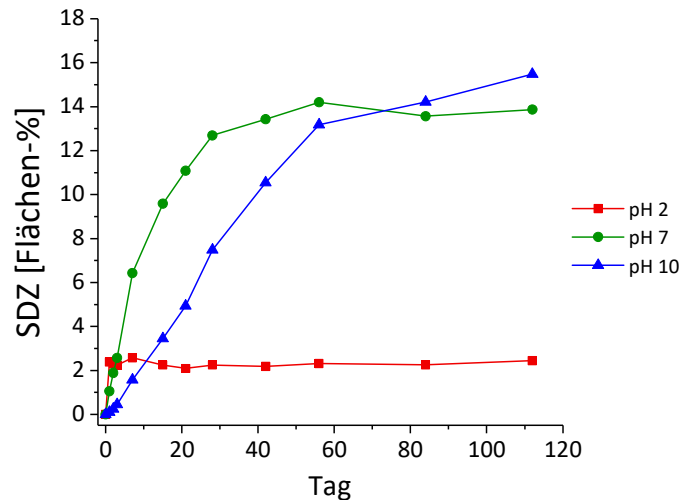


Abbildung 3.3.16: Adduktbildung von Lactose mit Sulfadiazin bei pH 2, 7 und 10.

Auch hier erkennt man gut, dass sich das Addukt unmittelbar in der sauren Lösung bildet und dann über den gesamten Zeitraum bei 2 % verharrt. Bei pH 7 bildet sich das Addukt zunächst etwas langsamer und steigt dann stark innerhalb von 3 Wochen auf einen Gehalt von 13 % an. Das Addukt bildet sich in der basischen Lösung zunächst noch langsamer, nach ca. 2 Wochen ist der Gehalt über 2 %, und steigt dann nach Monaten auf 13 %. Nach 16 Wochen beträgt das höchste Peakflächenverhältnis im basischen Milieu ca. 15 %, bei pH 7 sind es 14%.

In der folgenden Abbildung 3.3.17 sind die entsprechenden Ergebnisse für Glucose dargestellt. Die Flächenverhältnisse verhalten sich sehr ähnlich zu denen der Untersuchungen mit Lactose.

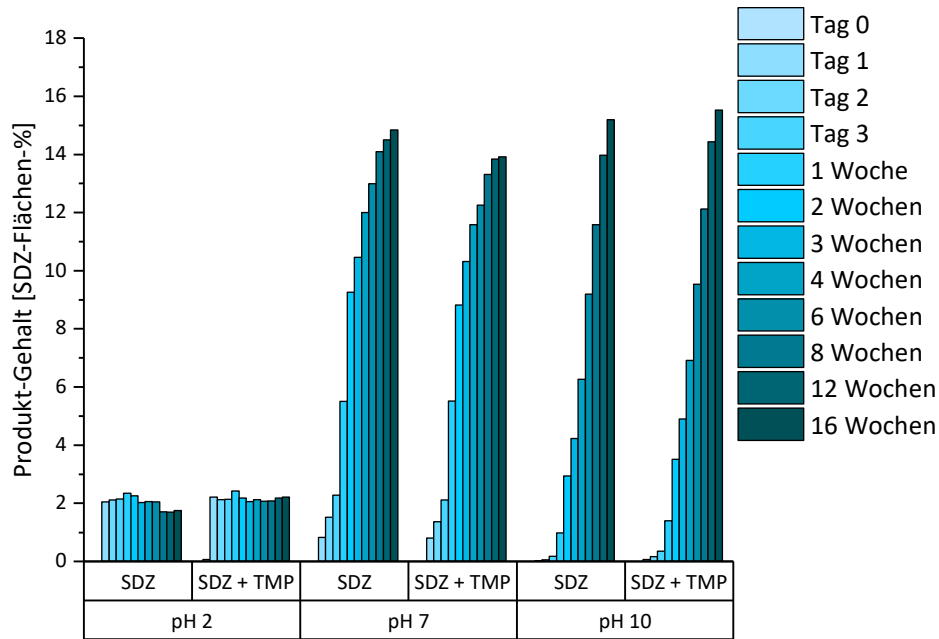


Abbildung 3.3.17: Darstellung der prozentualen Peakflächenverhältnisse zum Sulfadiazin-Tagesstandard vom neu entstandenen Peak in den Proben mit Glucose. Verglichen wurden Sulfadiazin und das Kombinationspräparat Sulfadiazin + Trimethoprim in Verbindung mit drei pH-Werten über einen Zeitraum von insgesamt 16 Wochen

Es wurde zusätzlich das aniMedica-Produkt „Trimetho-Diazin“ untersucht, da dort die Wirkstoffkombination sowie Glucose enthalten sind. Hier konnte kein Peak bei 3,4 min detektiert werden.

Isolierung und Identifizierung der unbekannt, neu gebildeten Substanz mittels präparativer HPLC und TOF-MS

Die neu detektierten Peaks aus Kapitel 0 sollten zur Identifizierung isoliert werden. Es wurde dies zuerst an den Proben mit Lactose durchgeführt. Bei der Isolierung zeigte sich die gebildete Substanz als säurelabil und es entstand bei Lagerung in der Eluentenlösung wieder Sulfadiazin. Die folgende Abbildung 3.3.18 zeigt eine Full-Scan-Messung der isolierten Lösung aus den präparativen Versuchen.

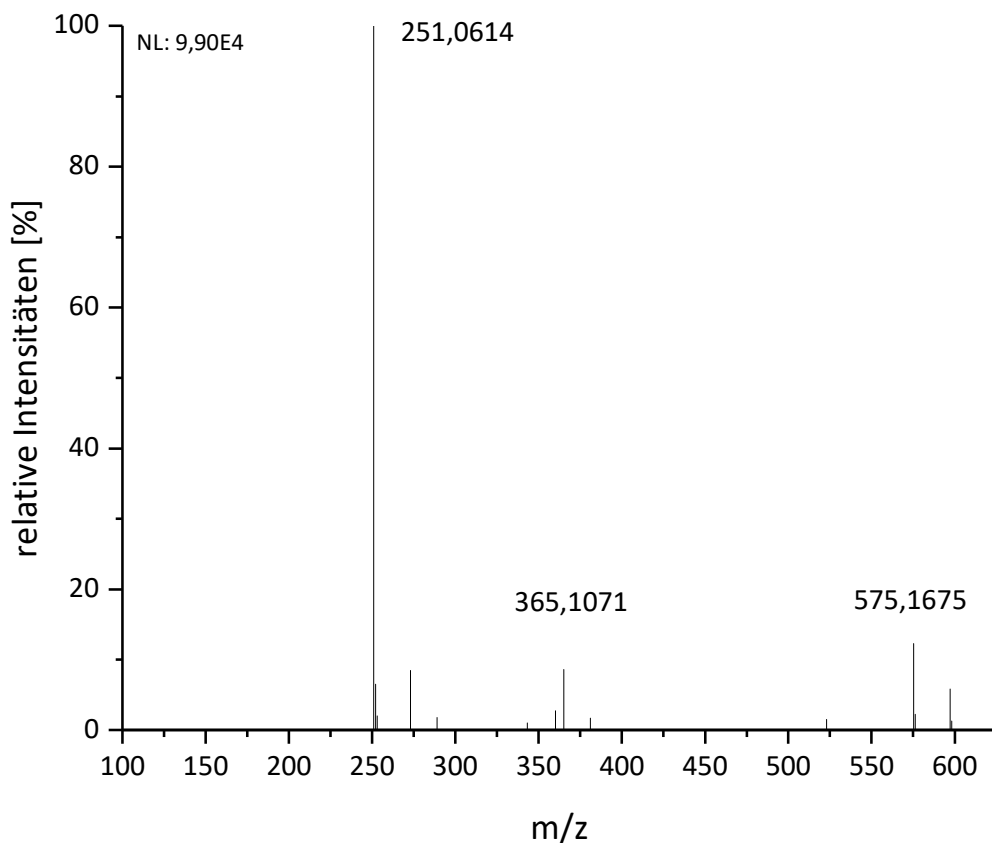


Abbildung 3.3.18: Full Scan des Peaks mittels EIS⁺-TOF-MS aus den Interaktionsversuchen mit Lactose.

Es konnte hierbei das m/z für Sulfadiazin von 251,0614 Da, das für Natrium-Lactose (365,1071 Da) sowie 575,1675 Da für eine bislang nicht bekannte Substanz detektiert werden. In

Tabelle 3.3.19 sind die Vorschläge der Software PeakView2.2 für dieses m/z aufgeführt. Dabei werden nur diejenigen aufgeführt, die als Summenformel zumindest Sulfadiazin enthalten.

Tabelle 3.3.19: Per TOF-MS ermittelte Summenformeln für den neuen Peak mit Lactose sowie exakte Massen und Abweichungen im Interaktionsnachweisversuch.

Summenformel	m/z	RDB/DBÄ	Abweichung [ppm] zu 575.16753
C ₂₄ H ₂₂ N ₁₂ O ₄ S	575.16805	20	-0.9
C ₂₃ H ₂₆ N ₈ O ₈ S	575.16671	15	1.4
C ₂₂ H ₃₀ N ₄ O ₁₂ S	575.16537	10	3.8
C ₂₀ H ₁₈ N ₁₈ O ₂ S	575.16536	21	3.8
C ₁₂ H ₂₆ N ₁₄ O ₁₁ S	575.16990	7	-4.1

Durch das Wissen der Substanzrückbildung zu Sulfadiazin und der Abwesenheit einer Stickstoffquelle kommt bei den Vorschlägen nur der 3. Hit „C₂₂ H₃₀ N₄ O₁₂ S“ in Frage mit einer Abweichung von 3,8 ppm. Dieser Vorschlag deutet auf folgende Adduktbildung hin, welches in Abbildung 3.3.19 dargestellt ist.

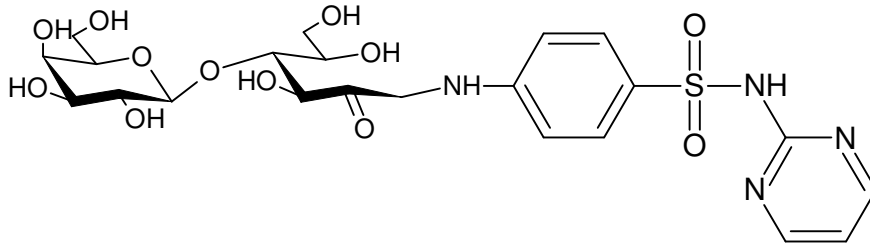


Abbildung 3.3.19: Strukturformel des Adduktproduktes von Sulfadiazin und Lactose.

Die vorgeschlagene Strukturformel lässt sich durch MS/MS-Fragmentierung vorläufig bestätigen (siehe Abbildung 3.3.20).

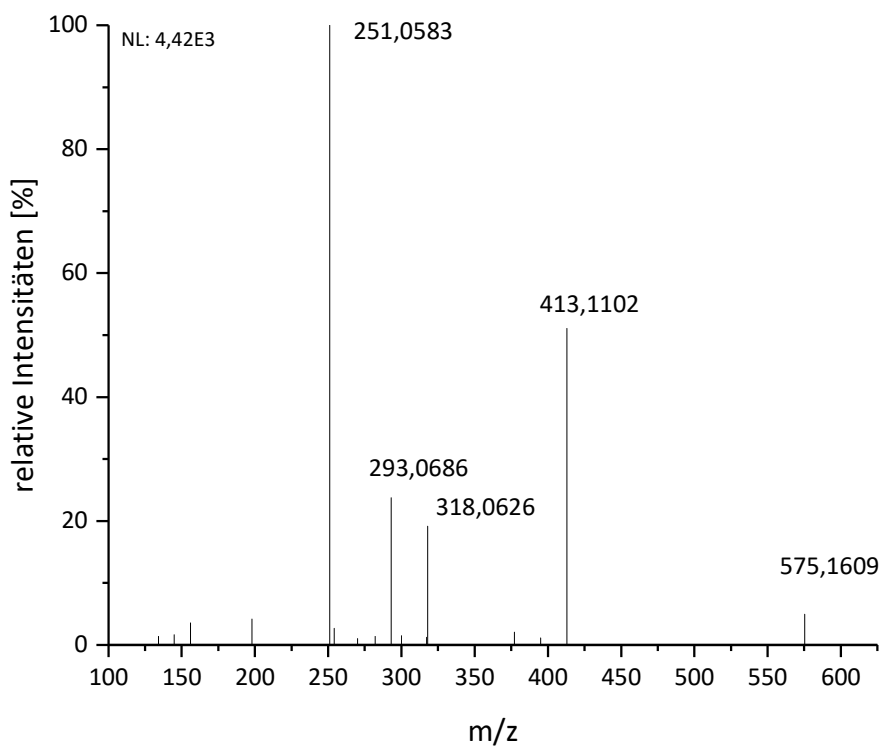


Abbildung 3.3.20: ESI⁺-MS²-Spektrum (CE 30) des m/z 575,2 des Adduktes mit Lactose.

Dabei lässt sich das m/z von 413,1102 Da dem Glucosyl-Addukt (Abspaltung der Galactose) und 318,0626 Da dem Glucosyl-Addukt mit der weiteren Abspaltung von Aminopyrimidin von Sulfadiazin zuordnen.

Für die Proben mit dem Zusatz von Glucose konnten entsprechende Untersuchungen im Rahmen des Projektes nicht mehr durchgeführt werden.

Auswertung der Interaktionsversuche

Es konnte gezeigt werden, dass Sulfadiazin und reduzierende Zucker ein im Sauren weitgehend reversibles Addukt bilden können. Dementsprechend werden die höchsten Gehalte im neutralen/basischen Bereich gebildet. Eine mögliche Entstehung bei der Herstellung von Formulierungen vor allem bei erhöhten Temperaturen mit Sulfadiazin und Lactose ist nicht auszuschließen und müsste dann als eine mengenmäßig relevante Verunreinigung gekennzeichnet werden. Bei der Applikation einer solchen Formulierung würde das säurelabile Addukt möglicherweise wieder im Magen zum Großteil zur aktiven Muttersubstanz zurückgebildet werden.

Die am Anfang des Kapitels beschriebene Gelbfärbung konnte durch diese Versuche jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Literatur

Baran, W.; Adamek, E.; Ziemiańska, J.; Sobczak, A., Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, *196*, 15.

DIN 32645, Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Deutsches Institut für Normung e.V., **2008**.

Ghanem, M. M., Abu-Lafi, S. A., Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Sulfadiazine sodium and Trimethoprim in injectable solution formulation. *Scientia Pharmaceutica* **2013**, *81*, 167–182.

Kromidas, S., *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH: Weinheim, **2000**; 503.

Kay, E.; Demanèche, S.; Simonet, P.; Francois, G., Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **2001**, *67*, 2617–2621.

Sukul, P.; Lamshöft, M.; Zühlke, S.; Spiteller, M., Sorption and desorption of Sulfadiazine in soil and soil-manure systems. *Chemosphere* **2008**, *73*, 1344–1350.

Kümmerer, K., Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere* **2009**, *75*, 435–441.

Periša, M.; Babić, S.; Škorić, I.; Frömel, T.; Knepper, T. P., Photodegradation of sulfonamides and their N4-acetylated metabolites in water by simulated sunlight irradiation: Kinetics and identification of photoproducts. *Environmental Science and Pollution Research* **2013**, *20*, 8934–8946.

Zessel, K.; Mohring, S.; Hamscher, G.; Kietzmann, M.; Stahl, J., Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. *Chemosphere* **2014**, *100*, 167–174.

Beeinflussung von Bioverfügbarkeit und Biofilmen in Formulierungen auf Basis von submikronen Partikeln durch physikalische Maßnahmen (in der Tränkwasserführung) unter dem Einfluss physikalischer Wasserbehandlung

Biofilme spielen in der Tierhaltung eine bedeutende Rolle, da sie sich üblicherweise auf der inneren Oberfläche von Tränkwasserleitungen bilden. Im Gegensatz zu den abiotischen Ablagerungen, können Biofilme in Tränkleitungen nicht nur die Sicherstellung der adäquaten Wasserversorgung der Tiere gefährden, sondern unter Umständen auch den gesundheitlichen Zustand der Tierbestände negativ beeinflussen, da sich Krankheitserreger darin einnisten können (SCHULZ et al. 2014). Es wird zudem vermutet, dass Biofilme in Tränkleitungen Schwierigkeiten bereiten können, wenn Nutztieren Arzneistoffe über das Tränkwasser verabreicht werden. Letztes aufgrund unterschiedlicher Berichte über die Fähigkeit der Biofilme Arzneimittel beispielsweise durch Transformation von Wirkstoffen zu inaktivieren (STEWART 2015). Die Verabreichung von Antibiotika über das Tränkwasser ist jedoch eine etablierte Form der Behandlung von Nutztieren, v.a. wenn die Therapie von großen Gruppen erforderlich ist (KAMPHUES 1996). Um die richtige Dosierung bei jedem zu behandelnden Tier zu erreichen, ist es entscheidend, dass in der vom Tier aufgenommenen Wassermenge die notwendige Konzentration des Wirkstoffs verfügbar ist (KIETZMANN und BÄUMER 2009). Stabile Formulierungen und eine Vermeidung von Biofilmen im Leitungssystem tragen daher zur ausreichenden Dosierung bei.

Ein weiteres Problem von Biofilmen in Tränkleitungen kann die Entwicklung bzw. Vermehrung von resistenten Bakterien unter dem Einfluss einer antibiotischen Behandlung sein (SCHULTE und FLEMMING 2006). Hierbei spielt der enge räumliche Kontakt zwischen Bakterienzellen sowie die Änderung der Physiologie der Keime zum Austausch von genetischem Material im Biofilm, wie z.B. von erworbenen Resistenzfaktoren, offenbar eine Rolle (STEWART 2015).

Ziele dieses Arbeitspaketes war es:

1. die Interaktionen zwischen Biofilmen und Antibiotika in Tränkwassersystemen zu analysieren.
2. den Effekt des vom Bauer-System (Bauer Solutions GmbH, Beckum, Deutschland) erzeugten elektromagnetischen Feldes auf die Keim- und Zellzahlen des Wassers in Modellen kommerzieller Tränkleitungssysteme zu untersuchen.
3. den Effekt des elektromagnetischen Feldes auf die Bioverfügbarkeit von Antibiotika in Modellen kommerzieller Tränkleitungssysteme zu evaluieren.
4. Einfluss des Systems auf den Biofilm in Stichleitungen unter Praxisbedingungen




Interaktionen zwischen Biofilmen und verschiedenen Tierarzneimitteln in Tränkwassersystemen

In diesem Projektabschnitt wurde ein statisches Biofilm-Modell etabliert, das an die Bedingungen in einer Tränkwasserleitung in der Tierhaltung angelehnt ist. Somit können mögliche Interaktionen zwischen Biofilm und Antibiotika in einem Tränkwassersystem exemplarisch analysiert werden. Zur Durchführung der Experimente, wurden Biofilme aus Pseudomonaden und gegen die geprüften Antibiotika sensitiven *Escherichia (E.) coli* für 7 Tage in einem nährstoffarmen Medium [Minimalmedium 1L: 15 ml Glycerol, 5 g L-Glutamine, 1,5 g K₂HPO₄, 0,1 g MgSO₄ (0,2g), pH 7,0] bei 22,0 °C in der Innenoberfläche von PVC-Rohrstücken artifizuell gezüchtet. Daraufhin erfolgte eine Anwendung von Sulfadiazin/Trimethoprim (Sulfadiazin/Trimethoprim; 30 mg bzw. 150 mg/L) für 5 Tage. Die angewendeten Antibiotikakonzentrationen entsprachen den Konzentrationen, welche zu therapeutischen Zwecken in der Praxis durch das Tränkwasser verabreicht werden. Als Referenz wurden sowohl Rohre mit Minimalmedium ohne Antibiotika oder ohne Biofilm unter den gleichen Bedingungen für die gesamte Versuchsperiode gelagert. Der Ablauf der Experimente wird in Abbildung 3.4.13.4.1 graphisch dargestellt. Die Untersuchungen beinhalteten sowohl mikrobiologische als auch chemische Analyse:

- Die Effekte der antibiotischen Auseinandersetzung auf dem Biofilmwachstum bzw. auf der mikrobiellen Zusammensetzung des Biofilms wurden durch die Bestimmung der Kolonie bildende Einheiten (KbE) vor- und nach der Versuchsperiode kontrolliert. Nach der KbE-Quantifizierung wurden *E. coli*-Kolonien zur Antibiotikaempfindlichkeitsbestimmung isoliert. In Anlehnung an die CLSI-Methode (CLSI 2009) wurde die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) gegen 12 verschiedene antibiotische Substanzen im Mikrodilutionsverfahren nach Anweisung des Herstellers durchgeführt (MHK-Gramneg, Bio-Rad Medical Diagnostics Ltd., München, Germany). Die Bewertung der MHK-Werte wurde bezugnehmend auf die epidemiologischen Cut-off-Werte für *E. coli* der Wildtyp-Population durchgeführt, die vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST) festgelegt wurden (EUCAST 2019).
- Die Bestimmung der Bioverfügbarkeit der Antibiotika wurde jede 24 h im flüssigen Medium überprüft. Die Präsenz von Antibiotikaresten im Biofilm wurde zudem am Ende der Behandlung im Biofilmmaterial analysiert. Ergebnisse der chemischen Analyse werden vom der Arbeitsgruppe JLU näher erläutert.

Polyvinylchlorid (PVC)



-  Pseudomonaden
ATCC 27853 oder
ATCC 13525
-  *Escherichia coli*
ATCC 23631
-  SDZ/TMP

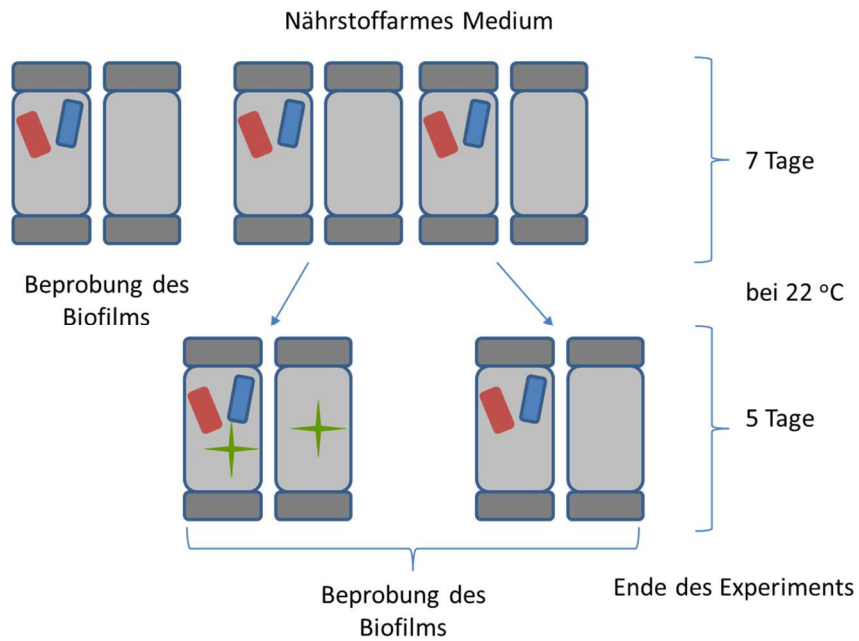


Abbildung 3.4.1: Graphische Darstellung des Versuchsablaufs

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen zeigten, dass die Biofilmentwicklung durch die antibiotische Auseinandersetzung nicht beeinflusst wurde. Wie in Abbildung 3.4.2 dargestellt, war die Zugabe von Sulfadiazine/Trimethoprim unzureichend, um den Keimgehalt der Biofilme zu beeinflussen (Abbildung 3.4.23.4.2). Zudem ist es deutlich, dass sensible *E. coli* im Biofilm, einen Antibiotikaeinfluss unter Bedingungen des Tränkwassers überleben können.

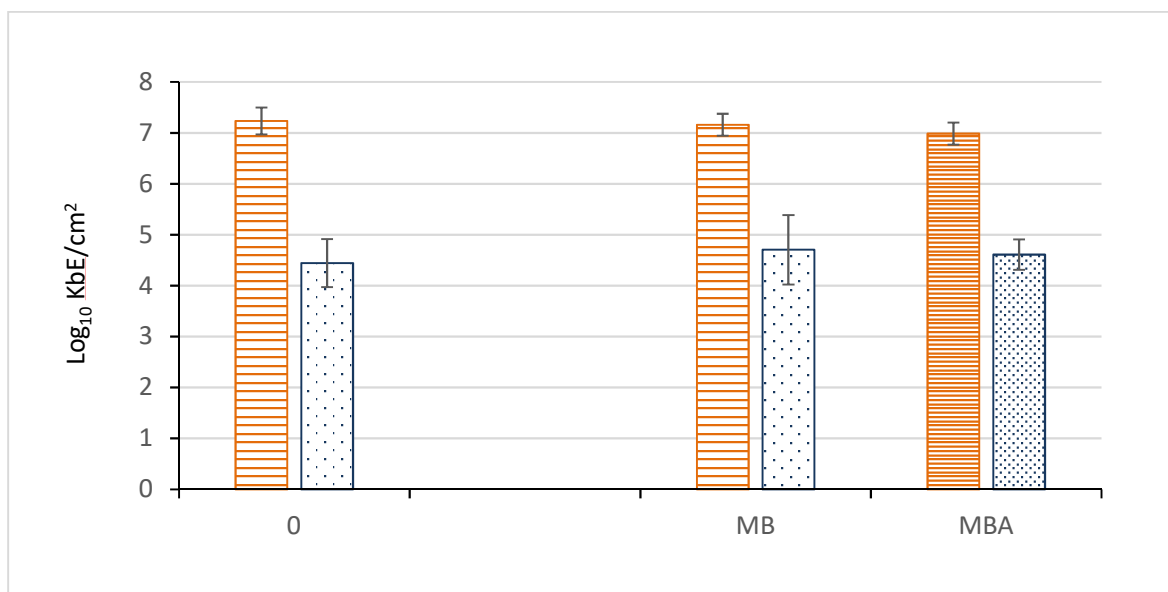


Abbildung 3.4.2: Vergleich der Keimzahlentwicklung im Biofilm bei einer antibiotischen Konfrontation mit Sulfadiazin/Trimethoprim. Keimzahlen von *Pseudomonaden* werden in Linienmustern dargestellt und Keimzahlen von *E. coli* sind durch Punktmuster gekennzeichnet.

0 entspricht der Keimgehalte vor Antibiotikaapplikation. MB und MBA zeigen die Keimgehalte nach der Versuchsperiode für die Kontrollbiofilme bzw. die behandelten Biofilme.

Zur antibiotischen Sensibilitätsprüfung wurden insgesamt 12 *E. coli*-Isolate aus behandelten Biofilmen einbezogen. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung von den ausgewählten Isolaten zeigten keine Veränderungen der MHK-Werte gegenüber den überprüften Substanzen nach der jeweiligen Antibiotikakonfrontation (Tabelle). Die MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte der getesteten *E. coli*-Population wird für jedes Antibiotikum in Tabelle 3.4.1 zusammengestellt.

Tabelle 3.4.1. Darstellung der erhobenen MHK₅₀ und MHK₉₀-Werte von *E. coli*-Isolaten aus behandelten Biofilmen

Antimicrobial	Concentration range	ECOFF	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ampicillin	0.25 - 32	≤8	4	4
Cefotaxim	0.06 - 8	≤0.25	≤0.06	≤0.06
Ceftazidim	0.06 - 8	≤0.5	0.25	0.5
Chloramphenicol	2 - 128	≤16	8	8
Ciprofloxacin	0.015 - 2	≤0.06	≤0.03	≤0.03
Colistin	0.12 - 16	≤2	2	2
Gentamicin	0.25 - 16	≤2	1	2
Nalidixinsäure	1 - 128	≤16	4	4
Sulfisoxazole	2 - 256	-*	4	4
Tetracyclin	0.25 - 32	≤8	2	2
Trimethoprim	0.25 - 32	≤2	≤0.25	≤0.25
Sulfadiazin/Trimethoprim	0.59/0.03 – 76/4	≤19/1	≤0.59/0.03	≤0.59/0.03

*kein epidemiologischer Cut-Off –Wert publiziert bei EUCAST (EUCAST, 2019)

Fazit des Projektabschnittes:

Durch die Untersuchungen konnte folgendes festgestellt werden:

- a. Die antibiotische Applikation von Sulfadiazin/Trimethoprim zeigte keine Auswirkungen auf die Keimgehalte der Polykultur-Biofilme, welche PVC-Rohre unter nährstoffarmen Bedingungen bei 20 °C besiedeln.
- b. Die Dosierungen waren unzureichend, um sensible *E. coli* in den Biofilmen abzutöten. Da keine Veränderungen der MHK-Werte bei den Isolaten nachgewiesen wurden, ist dieses Geschehen auf die Schutzigenschaften des Biofilms und/oder auf den metabolischen Status der bakteriellen Zellen im Biofilm zurückzuführen (FLEMMING et al. 2016).

- c. Das Modellsystem scheint geeignet, um Wechselwirkungen zwischen Antibiotika und Biofilmen untersuchen zu können, wie sie auch in Tränkleitung auftreten könnten. Da die eingesetzten *E. coli* und Pseudomonaden von Sulfadiazine/Trimethoprim nicht abgetötet werden, eignen sich diese Bakterien beispielsweise als Indikatoren, wenn das mikrobielle Wachstum in Gegenwart der Wirkstoffe unter Einfluss des Bauersystems getestet werden sollen. Ferner kann das System für verschiedenen Fragestellungen weiterentwickelt werden und als Grundlage weiterer Forschung dienen.

Untersuchung des Effekts der elektromagnetischen Behandlung des Wassers in Tränkleitungssystemen

Aufgrund der bereits genannten Biofilmproblematik in den Tränkleitungen der Tierhaltungsbetriebe hat die Bauer Solutions GmbH die physikalische Wasserbehandlung als Möglichkeit zur Verhinderung von Ablagerungen sowie zum Abbau von bereits vorhandenen Ablagerungen vorgeschlagen. Inwieweit die Bildung und Ablagerung von Biofilmen durch das System verhindert wird, bzw. die mikrobiologische Qualität von Tränkwasser verbessert werden kann, war bislang unbekannt. Das Bauer-System beruht darauf, dass ein permanent wiederholtes Frequenzband mittels gepulster elektromagnetischer Signale in das Tränkwasser gesendet wird. Das Frequenzband bildet 350 bis 10.000 Hertz (Hz) in Form von Peaks ab. Die Leistungsaufnahme liegt bei 30-50 Watt und kann bei bestimmten Peaks bis 800 Watt (W) ansteigen. Die magnetische Flussdichte beträgt in den Behandlungseinheiten 22 Microtesla (mT). Das Ziel dieses Versuchsabschnitts war der Einfluss dieser Behandlung auf die bakterielle Wassermicrobiota mittels verschiedener Ansätze zu bestimmen. Die Untersuchungen beinhalteten die quantitative Bestimmung der kultivierbaren Mikroorganismen im Wasser und Biofilm sowie die Bestimmung der Bakterienzellen bzw. bakterieller Aggregate mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Behandlung des Wassers in Modellen üblich eingesetzter Tränkleitungssysteme

Für den Versuch wurden praxisübliche Tränkleitungssysteme aus PVC in zweifacher Ausführung mit einer Gesamtlänge von ca. 20 m am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Hochschule Hannover entwickelt und aufgebaut (siehe Anhang des Zwischenberichtes). Die Modellsysteme bestanden entweder aus Leitungen der Art TwinClean Line (LUBING, Barnstorf, Deutschland), in denen das Wasser durch eine Pumpe kontinuierlich im Tränkstrang zirkulierte oder aus Bodenstrangtränken (LUBING, Barnstorf, Deutschland), in denen das Tränkwasser nur durch die Druckminderung im System floss (z.B. bei Wasseraufnahme). In 2 Modellen jeder Tränklinienart wurden Bauer-Systeme (Bauer Solutions GmbH, Beckum, Deutschland) zur physikalischen Behandlung der Versuchsleitungen angebracht. Die zwei anderen Tränkleitungen wurden als Kontrolle geführt. Alle Modelle wurden mit austauschbaren Rohrstücken versehen, um das Wachstum von Biofilmen im System zu untersuchen. Experimentablauf sowie Ergebnisse und entsprechende Diskussion

sind in der elektronischen Open Access Zeitschrift PLoS One des Jahrs 2019 ausführlich beschrieben. Zusammengefasst konnte anhand der Analysen während der Behandlungsperiode beobachtet werden, dass die o.g. elektromagnetischen Signale vermutlich einen Einfluss auf den mikrobiologischen Zustand des Wassers haben können. Dieser Einfluss scheint besonders in frühen Phasen der Behandlung gegeben. Jedoch, in späteren Phasen (nach 21 Tagen), konnte kein deutlicher Effekt auf die Bildung von Biofilmen und die Quantität kultivierbarer planktonischer Bakterien im behandelten Wasser nachgewiesen werden. Ergebnisse sind publiziert in nachfolgend aufgeführter Arbeit in PLoS ONE:

Low-frequency electromagnetic fields as an alternative to sanitize water of drinking systems in poultry production?

Published in PLoS ONE 14 (2019) e0220302

Rafael .H. Mateus-Vargas^{1*}, Nicole Kemper¹, Nina Volkmann¹, Manfred Kietzmann², Jessica Meissner², Jochen Schulz¹

¹Institute for Animal Hygiene, Animal Welfare and Farm Animal Behavior, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany

²Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Buenteweg 17, D-30559 Hannover, Germany

Correspondence

Rafael H. Mateus- Vargas, Institute for Animal Hygiene, Animal Welfare and Farm Animal Behavior, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany

Tel: (+49) 511 8568960

E-Mail: rafael.mateus@tiho-hannover.de

This study was financially supported by the German Federal Environmental Foundation (Deutsche Bundesstiftung Umwelt, DBU, AZ 32732/01). Additionally, the publication of the manuscript was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft and University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation within the funding program Open Access Publishing.

Abstract

Low-frequency electromagnetic fields (LF-EMF) may present an alternative to conventional sanitation methods of water supply lines in animal production. The objective of this study was to evaluate the effect of the application of LF-EMF on bacterial concentrations and biofilms at scale-models of different drinking systems (circulating and non-circulating) conventionally used in poultry holdings. Treated systems were equipped with commercial devices producing pulsed electromagnetic signals of low frequency up to 10,000 Hz; max. 21 mT. Exposure of water to LF-EMF resulted in changes of the culturable bacterial counts, although with high standard deviations. Differing between systems types, LF-EMF treatment seemed to be responsible either for a limitation or for an increase of colony forming unit counts, with partly statistically significant differences, especially in early stages of treatment. In contrast, neither biofilm formation nor counts of cells suspended in water differed between treated and control lines over 28 days of experiment, as determined by fluorescence microscopy. Although this study indicates that LF-EMF may influence culturability of water microorganisms, no clear inhibitory effects on bacterial biofilm formation or on planktonic microbes by LF-EMF treatment were confirmed in the experiments.

Elektromagnetische Behandlung ausgewählter Keime unter nährstoffarmen Bedingungen

Den Erkenntnissen der o.g. Versuche zu Grunde gelegt, wurden weitere Untersuchungen mittels unterschiedlicher Versuchsansätze durchgeführt, um mögliche Wirkungsmechanismen der elektromagnetischen Signale bei Referenzbakterien unter Laborbedingungen festzustellen. Die Versuche beinhalteten sowohl den Einsatz des

Bauersystems in einem kleineren Modell einer zirkulierenden Tränkleitung unter Laborbedingungen (Abbildung 3.4.1), als auch die direkte Behandlung von flüssigen Bakterienpräparaten in statischen sowie zirkulierenden Labormodellen (Abbildung , Abbildung 3.4.12). Mögliche Effekte der elektromagnetischen Behandlung des Mediums auf die darin enthaltenen Referenzbakterien wurden sowohl durch selektive Wachstumsbestimmung der Zielkeime als auch durch Fluoreszenzbildanalyse bewertet. Die Fluoreszenzanalyse erlaubte die Bestimmung der Zahl toter Bakterien und die Quantifizierung von Aggregaten im Wasser sowie eine genaue Messung der Biofilmdeckung auf den PVC-Flächen. Für die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden Aggregate als ein gut erkennbarer Verbund von drei oder mehr Zellen definiert.

a. Behandlung des Wassers am Tränkleitungsmodell mit Indikatorkeimen

Für die Analysen am Tränkleitungsmodell wurden eine Polykultur des Referenzstamms *P. aeruginosa* (DSM Trimethoprim7) und des Feldstamms *Stenotrophomonas maltophilia* mit einer Konzentration im steril filtriertem Wasser von ca. 10^6 KbE/ml in die Tränkleitung gegeben und zunächst für 28 Tage im Modell ohne Behandlung zirkulieren lassen. Zweck dieser ersten Phase war, der Bakterien die Anpassung an die Bedingungen des Modells sowie die Biofilmbildung zu ermöglichen. In Anlehnung an der bereits beschriebenen Methode (MATEUS-VARGAS et al., 2019), wurden Wasser und Biofilmproben zum Beginn des Versuchs abgenommen (Versuchstag 0) und das Bauer-System wurde angeschaltet. Die Auswirkungen der Behandlung auf die Bakterien wurde 42 Tage kontrolliert. Während der Gesamtdauer des Versuchs betrug die Raumtemperatur $22\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

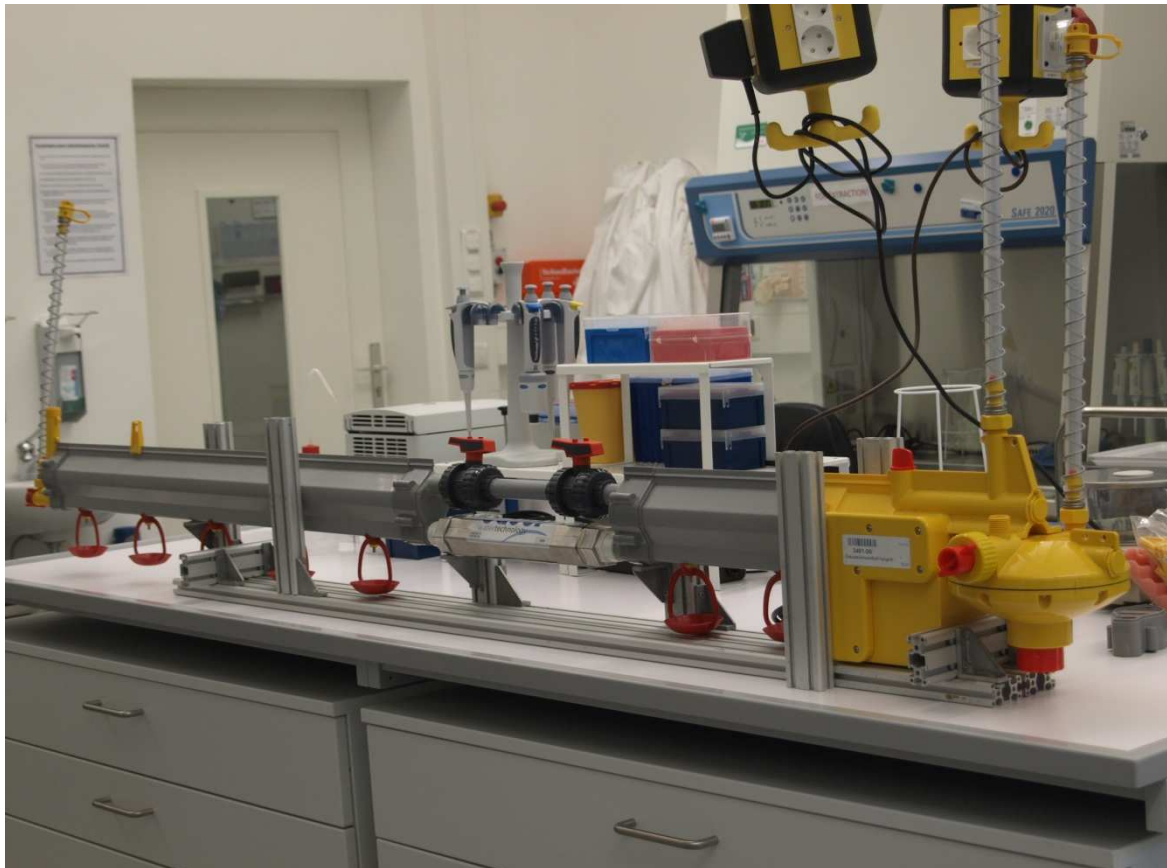


Abbildung 3.4.3. Tränkleitungsmodell im Labor Sicherheitsstufe 2 der TiHo-Hyg.

Wie aus Abbildung 3.4.4 ersichtlich, konnte unter den hier überprüften Bedingungen über 42 Tage kein deutlicher Effekt auf die Keimzahl im Wasser des Tränkleitungsmodells festgestellt werden. Sowohl die Keimzahlen von *P. aeruginosa* als auch die von *S. maltophilia* variierten unter der Behandlung weniger als 1 Log₁₀ über den gesamten Versuchszeitraum. Ein ähnliches Bild konnte hinsichtlich des Effekts der elektromagnetischen Felder auf die Biofilmentwicklung festgestellt werden (Abbildung).

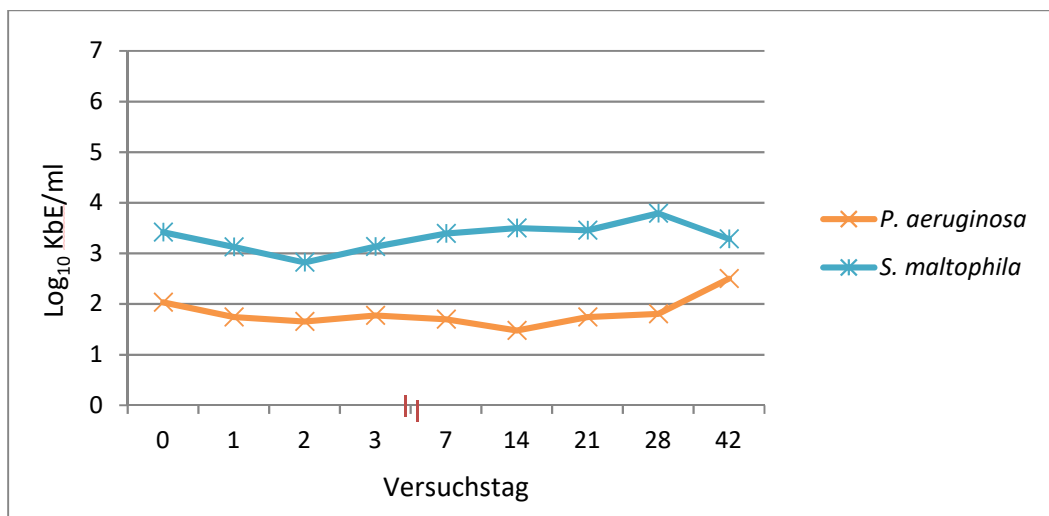


Abbildung 3.4.4. Keimzahlentwicklung planktonischer Zellen während der Behandlung mit den von Bauer-System erzeugten elektromagnetischen Signalen im Tränkleitungsmodell.

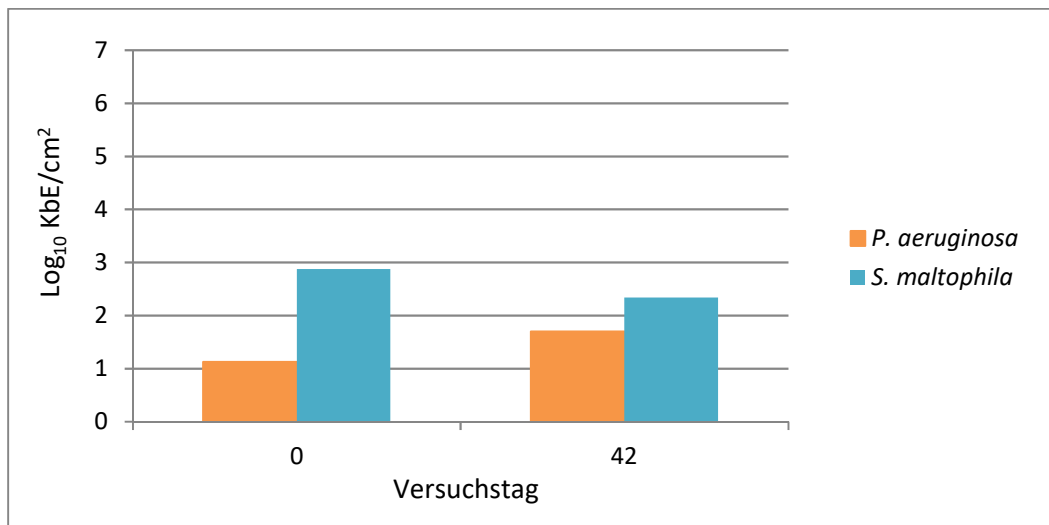


Abbildung 3.4.5: Keimzahlentwicklung im Biofilm während der Behandlung mit den von Bauer-System erzeugten elektromagnetischen Signalen.

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Bildanalyse konnte zudem beobachtet werden, dass die Behandlung am ersten Versuchstag zu einer deutlichen Zunahme der Konzentration an bakteriellen Aggregaten im Wasser geführt hat (Abbildung 3.4.6). Diese Zahl sank allerdings wieder am zweiten Tag und blieb stabil bis zum Ende des Versuchs (Abbildung 3.4.7). Laut Literaturangaben, haben elektromagnetische Felder ähnlicher Frequenz und Flussdichte Effekte auf die Aggregationsfähigkeit von Partikeln im Wasser (GOSSELIN et al. 2019; MERCIER et al. 2016). Wenn überhaupt, konnte dieser Effekt nur kurzfristig beobachtet werden.

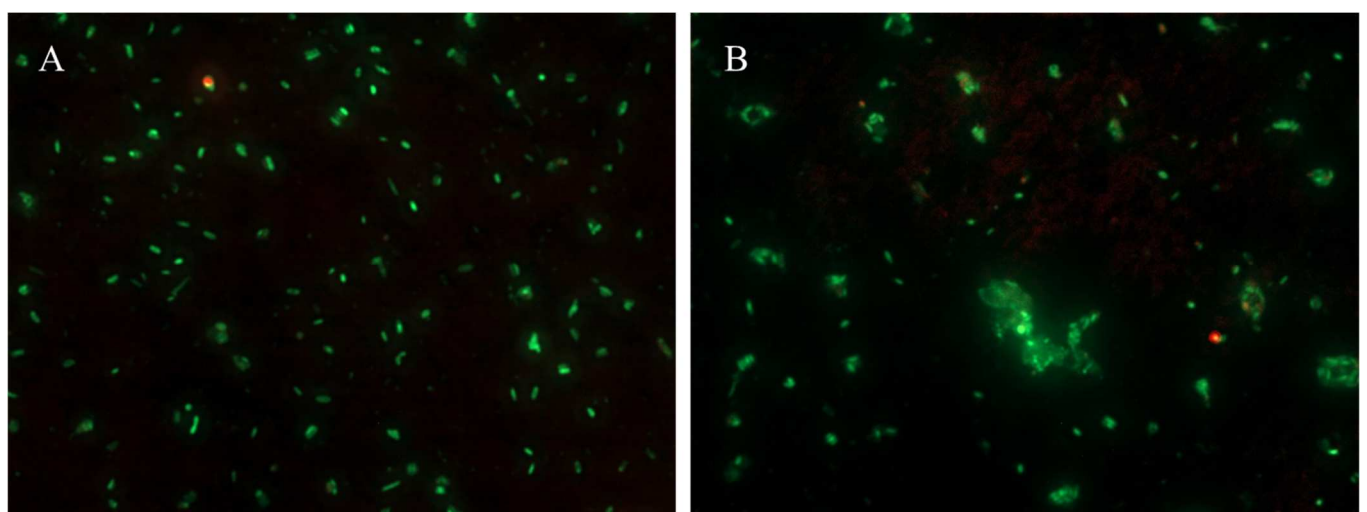


Abbildung 3.4.6. Beispielaufnahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung am Versuchstag 0 (A) und Versuchstag 1 (B).

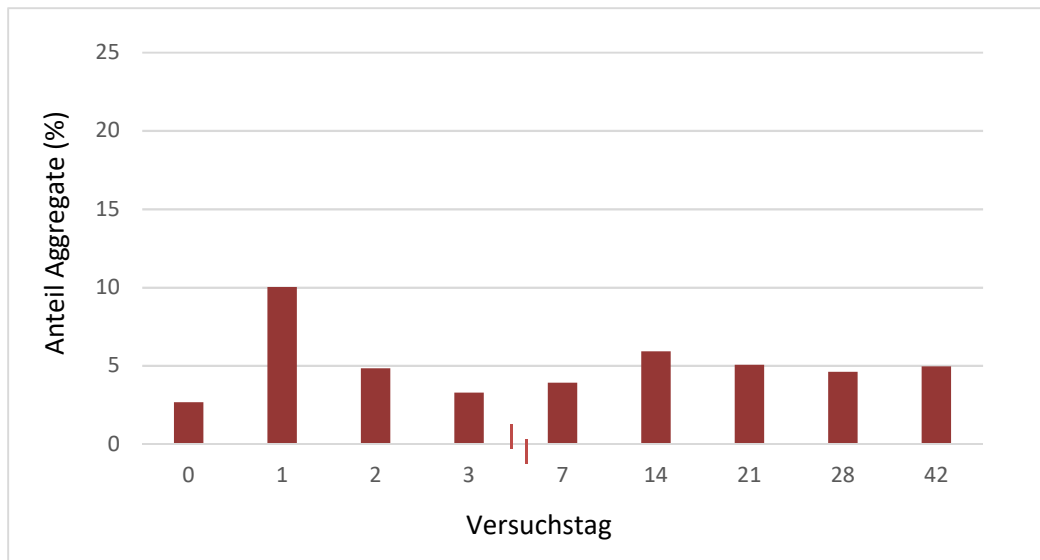


Abbildung 3.4.7. Anteil bakterieller Aggregate im Wasser des Tränkleitungsmodells während der Behandlung mit dem Bauersystem.

b. *Elektromagnetische Behandlung von Indikatorkeimen unter nährstoffarmen Bedingungen*
 Aufgrund der Ergebnisse am Tränkleitungsmodell und mit Beschluss des Projekttreffens vom 25.04.-26.04.2018 in Hannover wurden weitere Versuche mit einfacheren Modellen gestaltet, um auszuschließen, dass z.B. Materialeigenschaften oder die Architektur der Tränkleitung der Grund für die Beobachtungen war. Als erster Schritt wurde den Effekt einer direkten Exposition der Bakterien zu den elektromagnetischen Signalen direkt im Bauer-Gerät gemessen. Zur Analyse wurden reine Kulturen der Referenzstämme *Escherichia coli* (DSM 1103) und *P. aeruginosa* (DSM Trimethoprim7) verwendet. Kolonien aus 24 h alten Kulturen dieser Stämme wurden mit Minimalmedium vermischt, bis eine Endkonzentration von ca. $1,5 \times 10^8$ KbE/ml (McFarland 0,5) erreicht wurde.

Anschließend wurde die Bakteriensuspension in die aufrecht aufgestellten und unten auslaufsicher verschlossenen Bauer-Gerät gegeben (Abbildung 3.4.8). Um den Effekt der Behandlung zu bestimmen, wurden Proben der Suspension bei aktivem Gerät neunmal jede 15 Minuten (insg. 135 Minuten) und einmal nach 24 Stunden genommen. Die Temperaturen im Medium wurden während des gesamten Versuchsablaufs kontrolliert und bei jeder Probenahme erhoben.



Abbildung 3.4.8. Statisches Versuchsmodell zur Bestimmung des direkten Effekts des Bauer-Systems auf Referenzkeime.

Anhand der mikrobiologischen Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Kultivierbarkeit der Bakterienzahl beider Indikatorkeime bis 60 Minuten unter dem Einfluss des Geräts unverändert blieb. Ab 75 Minuten war zwar eine Senkung der Zahl der kultivierbaren Einheiten nachweisbar, diese war aber von einem weiteren Anstieg der Temperatur begleitet. Aufgrund der steigenden Temperaturen im Medium konnten keine längeren Zeiträume betrachtet werden. Festzuhalten bleibt, dass innerhalb von zwei Stunden bei direktem Einfluss innerhalb des Gerätes keine signifikante Keimreduzierung beobachtet werden konnte. In Tränkleitungen im Stall würden Keime das Gerät nur einmal passieren oder in innerhalb von Ringleitungen mit größeren Zeitabständen evtl. mehrfach durch das System geführt. Die Einwirkung des magnetischen Feldes wäre in der Praxis deutlich geringer, daher würden Enterobakterien und Pseudomonaden vermutlich nicht in ihrer Tenazität beeinflusst (Abbildung 3.4.93.4.9).

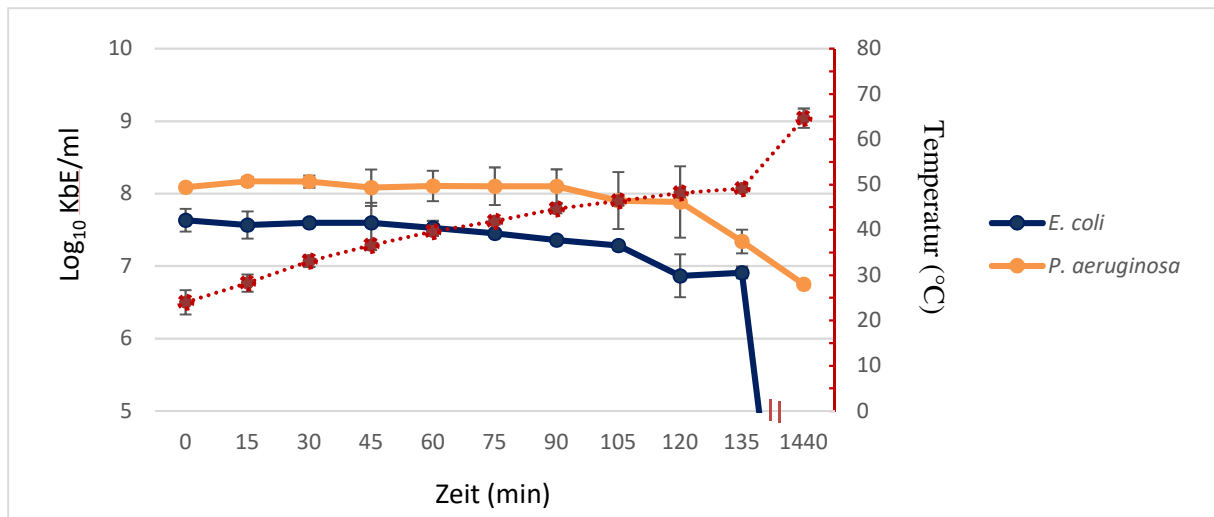


Abbildung 3.4.9. Keimzahlentwicklung planktonischer Zellen während der Behandlung mit dem vom Bauer-System erzeugten elektromagnetischen Signalen im statischen Modell.

Die Bestimmung der Anteile toter Zellen ergab augenscheinlich, dass die Lebensfähigkeit der Keime beeinflusst wurde (Abbildung 3.4.103.4.10). Mit Ausnahme der Ergebnisse, welche nach 60 Minuten erhoben wurden, können diese Beobachtungen wahrscheinlich auf eine beeinträchtigte Membranfunktion und demzufolge eine variable Aufnahmefähigkeit der Farbstoffe in die Zellen zurückgeführt werden. Letztens insbesondere, weil die Kultivierbarkeit während der Versuche unbeeinflusst blieb (Abbildung 3.4.4). Diesen Ergebnissen zu Grunde gelegt, konnten keinen bakteriziden Effekt noch eine eindeutige Tendenz bezüglich der intrazellulären Farbstoffaufnahme während der 2-stündigen Behandlung mit dem Bauer-Gerät festgestellt werden, welche nicht auf einem Temperatureinfluss zurückzuführen wäre (Abbildung 3.4.43.4.4; Abbildung 3.4.103.4.10).

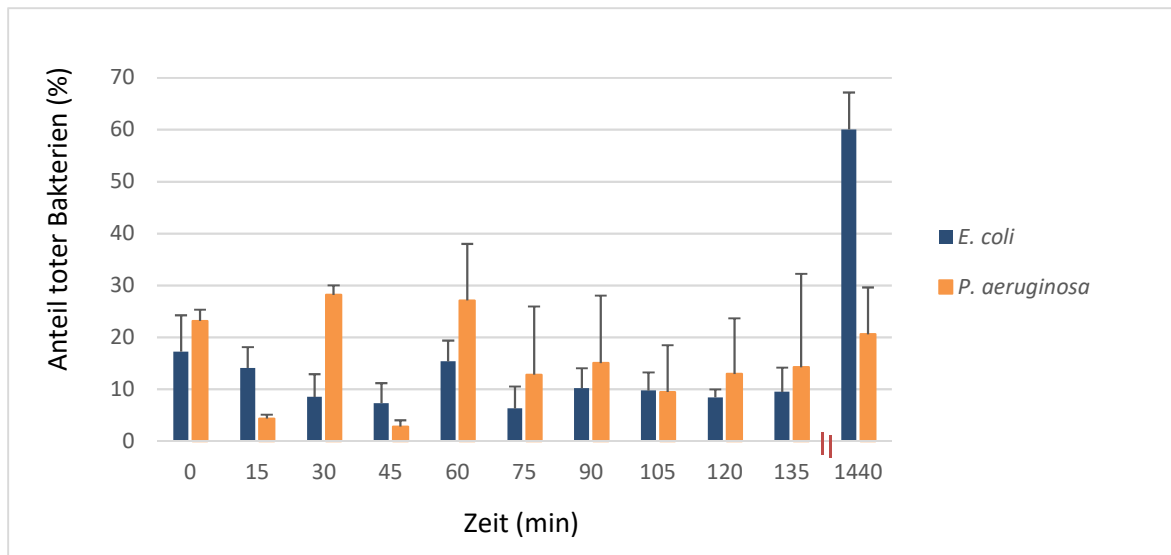


Abbildung 3.4.10. Prozentualer Anteil der toten Bakterien im Medium während der direkten Konfrontation im Bauer-Gerät.

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Bildanalyse zeigten zudem, dass der Anteil der bakteriellen Aggregate beider Referenzstämmen von der elektromagnetischen Behandlung (bis 60 Minuten) nicht erheblich beeinflusst wurden (Abbildung3.4.11).

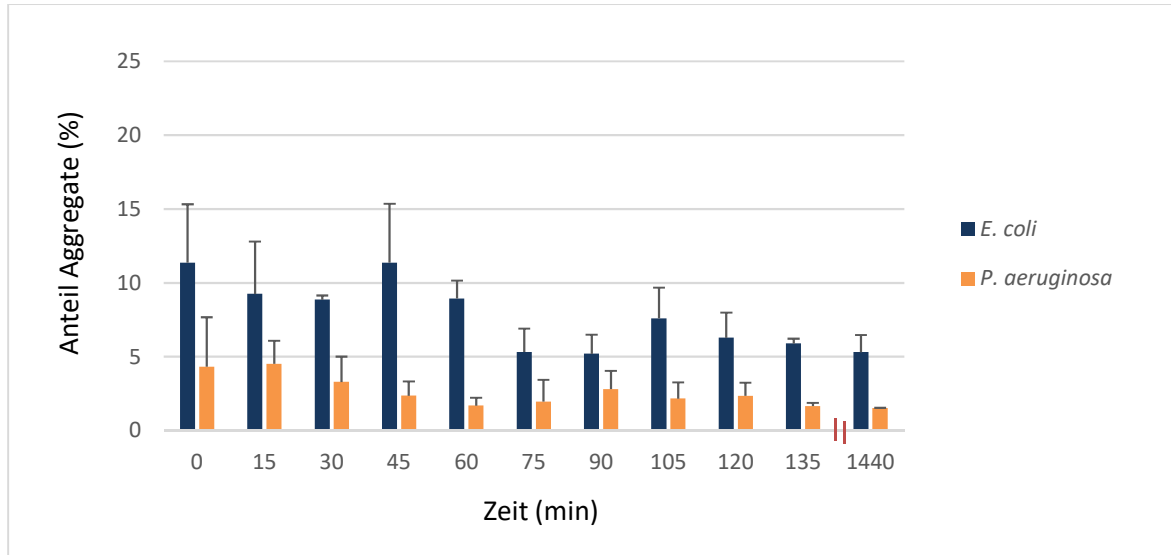


Abbildung3.4.11. Prozentualer Anteil der bakteriellen Aggregate im Medium während des gesamten Versuchs im Bauer-Gerät.

Aufgrund der Beobachtungen des zuvor geschilderten Versuchs wurde ein weiteres Labormodell konzipiert, in welchem einen kontinuierlichen Durchfluss des Mediums mit Bakterien mittels einer Pumpe gewährleistet war. Zweck des neuen Modellaufbaus war es den möglichen Temperatureinfluss des Gerätes auf die Bakterien vernachlässigen zu können und gleichzeitig eine kontinuierliche Behandlung des Mediums zu gewährleisten. Für den neuen Versuch wurden 2 identische Modelle aufgebaut (Abbildung3.4.12). Während des Versuches

wurde eins der Modelle als Kontrolle geführt (Bauer-Gerät war nicht an Strom angeschlossen). Mit dem neuen Modellaufbau konnten zudem Effekte auf Biofilme gemessen werden. Für den Versuch wurden 3 Liter einer Bakteriensuspension (*P. aeruginosa* 10^6 KbE/ml im Minimalmedium) in den sterilisierten Tank gegeben. Nachfolgend wurden die desinfizierten Pumpen und PVC-Abschnitte in die Suspension eingetaucht. Anschließend wurden die Pumpen eingeschaltet. Vor Versuchsbeginn wurde für 15 Tage die Biofilmbildung auf den PVC-Abschnitten ermöglicht (Abbildung 3.4.12). Akute Effekte wurden für 2 Stunden in Proben flüssigen Mediums kontrolliert. Die Entwicklung des Biofilms auf der Oberfläche der PVC-Abschnitte wurde vor der Versuchsperiode (Tag 0) und am Ende der Behandlungsphase (Tag 35) untersucht.



Abbildung 3.4.12. Zirkulierende Versuchsmodelle im Labor Stufe 2. Links wird der komplette Aufbau des Versuchsmodells gezeigt (A). Rechts werden die PVC-Abschnitte vor Versuchsbeginn dargestellt.

Die Untersuchungsergebnisse der ersten 2 Stunden ergaben keine erheblichen Unterschiede zwischen dem behandelten und dem unbehandelten Modell bezüglich der Zahl der kultivierbaren planktonischen Pseudomonaden, sowie des Anteils an toten Zellen oder des Anteils an Aggregaten im Medium (Abbildung 3.4.13; Abbildung 3.4.14). Trotz des Versuchsaufbaus mit bewegtem Wasser stieg die Temperatur des Mediums in den ersten 2 Stunden im behandelten Modell leicht an. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle schien dieser Anstieg im gemessenen Zeitraum allerdings weder das Bakterienwachstum noch die Membranintegrität der Zellen, noch die Aggregationsfähigkeit der Bakterien zu beeinflussen (Abbildung 3.4.13; Abbildung 3.4.14).

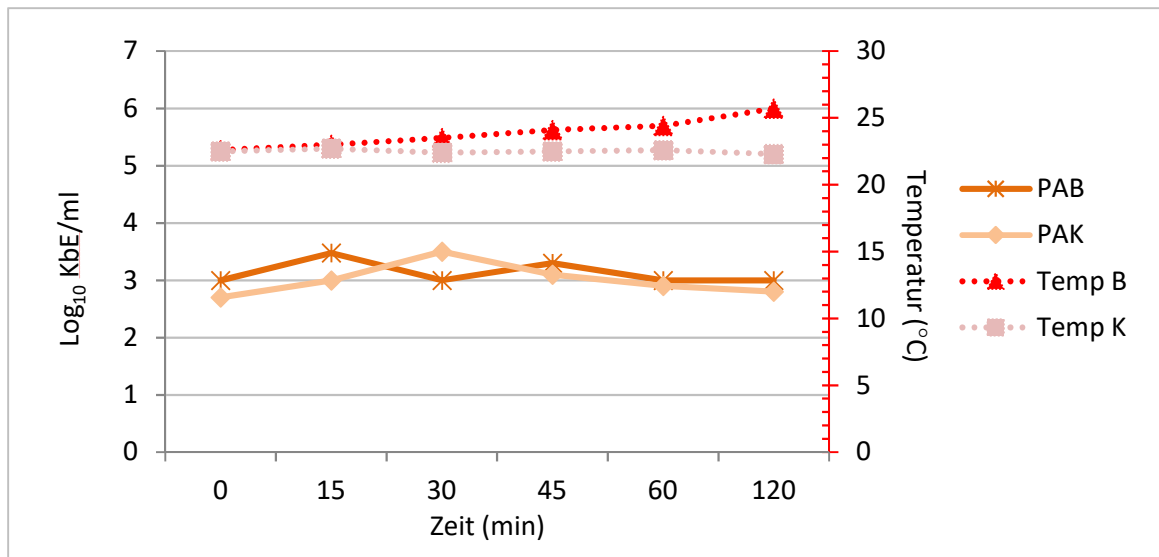


Abbildung 3.4.13 Vergleich der Keimzahl- und Temperaturentwicklung in Versuchsmodellen. Zahl der Pseudomonaden in behandeltem und in unbehandeltem Modell werden mit PAB bzw. PAK bezeichnet. Diskontinuierliche Striche zeigen die Temperatur in behandeltem System (Temp B) sowie im Kontrollaufbau (Temp K).

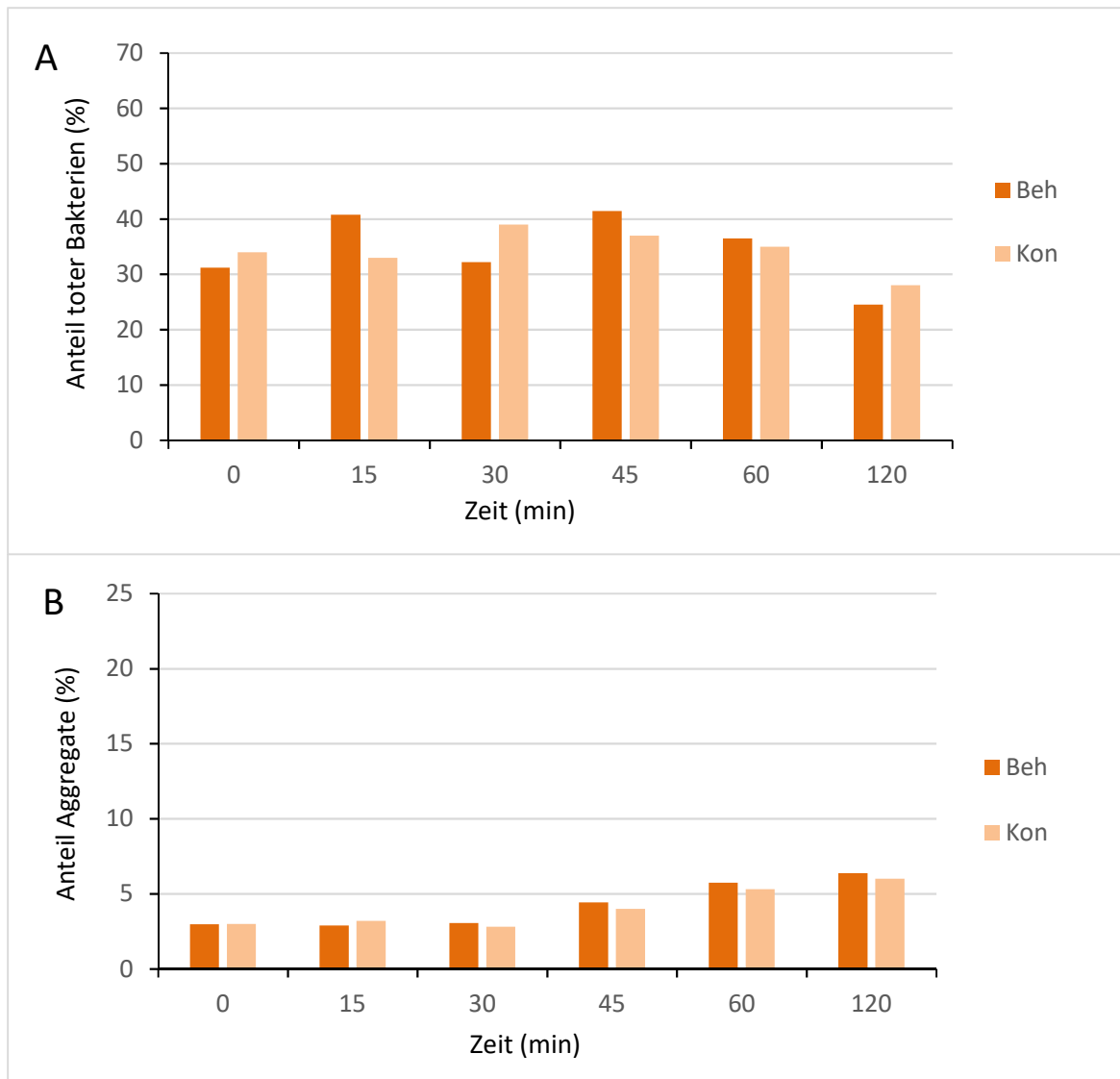


Abbildung 3.4.14. Prozentualer Anteil der toten Bakterien (A) bzw. der bakteriellen Aggregate (B) im Medium des behandelten Modells (Beh) oder des Kontrollaufbaus (Kon).

Ferner zeigten die mikrobiologischen Untersuchungen der PVC-Abschnitte nach 35 Tage unter den hier verwendeten Bedingungen keinen Abbaueffekt auf dem bakteriellen Biofilm durch Behandlung des Mediums mit dem Bauer-Gerät. Während beispielsweise die Zahl der Pseudomonaden pro Einheitsfläche am Ende der Behandlungsperiode 5,5 % niedriger war, betrug die Bakterienzahl der Kontrolle im Vergleich zum Anfangsgehalt 11,9 % weniger.

Fazit des Projektabschnittes:

Aus den Ergebnissen wird schlussgefolgert:

- a. Die Behandlung des Wassers in üblich eingesetzten Tränkleitungssystemen, unter den hier verwendeten Bedingungen, wies langfristig keinen reduzierenden Effekt auf den kultivierbaren Keimgehalt im Wasser oder auf die Biofilmbildung auf.

- b. Die Expositionsversuche der hier verwendeten Indikatoren zeigten keinen deutlichen Effekt der elektromagnetischen Behandlung weder auf die Membranaktivität noch die Aggregationsfähigkeit der Keime.
- c. Auch wenn keine direkte Wirkung auf Keime und Biofilme gezeigt werden konnte, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass Ablagerungen in Leitungen auf Praxisbetrieben durch das System beeinflusst werden und somit ein indirekter Effekt auf Keimzahlen in Tränkleitungen gegeben sein kann.

Effekt der elektromagnetischen Behandlung auf die Tränkwassermedikation in Tränkleitungssystemen

Zur Untersuchung des Einflusses eines elektromagnetischen Feldes auf die Tränkwassermedikation mit einer handelsüblichen Formulierung (Sulfadiazin/Trimethoprim; Trimetotat; AniMedica) wurden die Tränkleitungssysteme des Instituts für Pharmakologie verwendet, welche im Projektabschnitt 2 beschrieben wurden. Für die Applikation des Antibiotikums wurde ein mechanischer Dosierer eingesetzt (Dosatron; Lubing). Dieser funktioniert stromlos und ist in die Wasserhauptversorgung integriert. Der Medikamentendosierer dosiert den gewünschten Präparatgehalt prozentual mit dem Antriebswasser zu und befördert die hergestellte Lösung in die Tränkleitungen. Bei der Einstellung der Wirkstoffkonzentration wurde sich an den für die Medikation von Geflügel üblichen Konzentrationen orientiert. Zur Durchführung der Versuche wurden die Leitungen gereinigt und mit frischem Trinkwasser mehrmals gespült. Nachfolgend wurden sowohl die Pumpen als auch die Bauer-Systeme der behandelten Tränklinien in Betrieb genommen. Um die Wirkung der Behandlung des Wassers durch das Bauer-Gerät zu untersuchen, wurden die Antibiotikakonzentrationen der behandelten, den Konzentrationen der unbehandelten Tränkleitungen gegenübergestellt. Wasserproben wurden jeweils aus 3 Tränknippeln entlang der Leitungen gezogen, um die Wirkstoffmengen zu bestimmen.

Wie in der Abbildung 3.4.153.4.15 zu sehen, wurde kein Abbau von Sulfadiazin nach der Applikation von Trimetotat über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet, weder in den Leitungen, die mit dem Bauersystem behandelt wurden noch in den unbehandelten Leitungen.

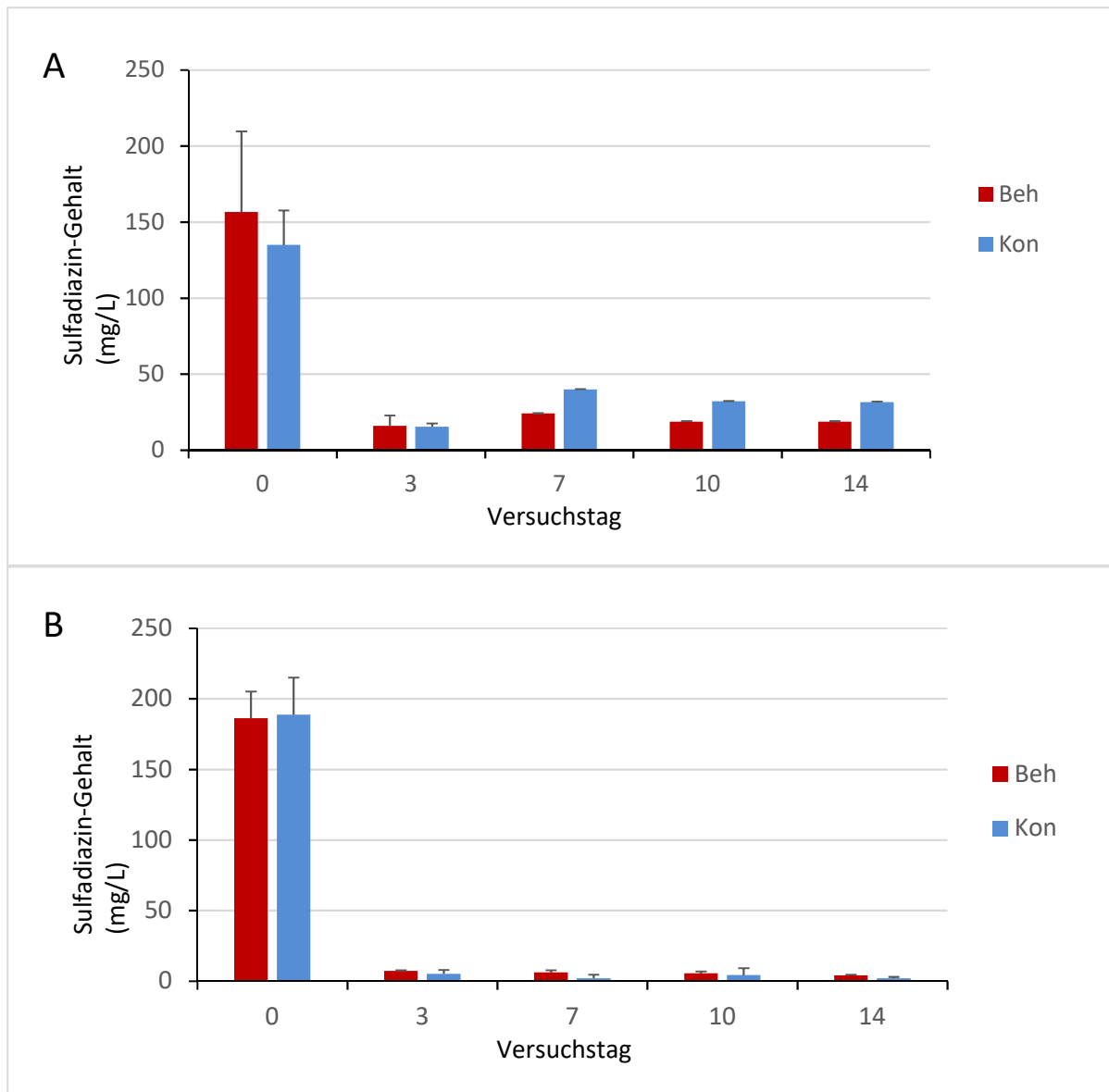


Abbildung 3.4.15. Konzentration Sulfadiazin nach Applikation im Tränkwasser mit (Beh) oder ohne (Kon) Verwendung des Bauer-Geräts. Ergebnisse an den zirkulierenden Tränkleitungen (A) und die Strangtränkleitungen (B) werden in mg/L dargestellt.

Fazit des Projektabschnittes:

Anhand der Ergebnisse kann festgehalten werden, dass das Bauer-Gerät mittels elektromagnetischer Felder keinen Antibiotika-Abbau-Effekt bei beiden verwendeten Modellen kommerziell vermarkteteter Tränkleitungen unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen zeigte. Demnach ist der Einsatz des Bauer-Geräts für die Tränkmedikation mit Sulfadiazin/Trimethoprim unbedenklich.

Aufgrund der Ergebnisse in Projektabschnitt 2 und des dort erwähnten Beschlusses wurden die Untersuchungen bezüglich der direkten Wirkung des Bauersystems auf die Tenazität von Bakterien intensiviert und von Untersuchungen unter Praxisbedingungen in einem Geflügelbestand Abstand genommen.

LITERATUR

CLSI (2009): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th informational supplement. CLSI document M100–S19. Wayne, PA.

EUCAST (2019): Antimicrobial Wild type distributions of microorganisms. (Zuletzt besucht am: 10. Oktober 2019). <http://mic.eucast.org/Eucast2/>.

FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., SZEWSKY, P., STEINBERG, P., RICE, S.A., KJELLEBERG, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 563-575.

GOSELIN, F., MATHIEU, L., BLOCK, J.-C., CARTERET, H., MUHR, H., JORAND, F.P.A. (2019): Assessment of an anti-scale low-frequency electromagnetic field device on drinking water biofilms. *Biofouling*. 7: 1-12. doi:10.1080/08927014.2018.1532998

KAMPHUES, J. (1996): Risiken bei der Medikierung von Futter und Wasser in Tierbeständen. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 103: 250-256.

KIETZMANN, M. und BAÜMER, W. (2009): Orale Medikation über Futter und Wasser aus pharmakologischer Sicht. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 116: 204-208.

MATEUS-VARGAS, R.H., KEMPER, N., VOLKMANN, N., KIETZMANN, M., MEISSNER, J., SCHULZ, J. (2019): Low-frequency electromagnetic fields as an alternative to sanitize water of drinking systems in poultry production? *PLoS ONE* 14: e0220302; doi:10.1371/journal.pone.0220302

MERCIER, A., BERTAUX, J., LESOBRE, J., GRAVOUIL, K., VERDON, J., IMBERT, C., VALETTE, E., HÉCHARD, Y. (2016): Characterization of biofilm formation in natural water subjected to low-frequency electromagnetic fields. *Biofouling*. 32: 287-299. doi:10.1080/08927014.2015.1137896

SCHULTE, S. und FLEMMING, H.-C. (2006): Ursachen der erhöhten Resistenz von Mikroorganismen in Biofilmen. *Chem. Ing. Tech.* 78: 1683-1689.

SCHULZ, J., SPINDLER, B., VERSPOHL, J., SUDENDEY, C., KEMPER, N. (2014): Tränkwasserqualität in Nutztierhaltungen: Welche Probleme gibt es und wie entstehen sie?. *Der Praktische Tierarzt*. 95: 649-651.

STEWART, P.S. (2015): Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiol. Spectrum*. 3: MB-0010-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014.

4 Zusammenfassung

Das Projekt „Minimierung des Umwelteintrages von Tierarzneimitteln und antibiotikaresistenten Mikroorganismen durch neue Technologien“ war in zwei Teilprojekte aufgliedert. In einem ersten Teil wurden mit verschiedenen Verfahren submikrone Wirkstoffpartikel (Trimethoprim) hergestellt, charakterisiert und mit Sulfadiazin zu Pulvern und Granulaten verarbeitet. Bei der Herstellung der submikronen Partikel kamen Sprühtrocknung, Wirbelschichtgranulation und Hochenergiegranulation zur Anwendung. Eine Kombination von Natriumdodecylsulfat und Hydroxypropylcellulose erwies sich als geeignet, um die kolloidale Stabilität der zerkleinerten Wirkstoffpartikel zu gewährleisten. Die hergestellten Wirkstoffsuspensionen wiesen eine enge Partikelgrößenverteilung im submikronen Größenbereich auf. Die Partikelgröße war im untersuchten Temperaturfenster stabil. Zudem erwies sich ein geringer Sprühdruk für alle relevanten Produktparameter in der Wirbelschichtgranulation als vorteilhaft.

Es fiel auf, dass Trimethoprim in saurem pH (Magen) umkristallisiert; es entsteht eine stäbchen- bzw. nadelartige Struktur, wohingegen im basischen Bereich eine kompakte Kristallform vorliegt. Um einer solchen Umkristallisation vorzubeugen, wurde zusätzlich ein magensaftresistentes Coating geprüft. Dabei wurden Partikelgrößen der Produkte, der Erhalt der Nanopartikularität des Trimethoprim, die Verteilung von Wirkstoffen in den Granulaten sowie das Freisetzungverhalten *in vitro* charakterisiert.

In vitro konnte gezeigt werden, dass aus allen Granulaten durch Auswahl passender Formulierungs- und Prozessparameter die zuvor eingesetzten submikronen Wirkstoffpartikelgrößen wieder redispergierbar waren. Die Freisetzung des Trimethoprim und des Sulfadiazins wird insbesondere durch die Granulatgröße beeinflusst wird, wobei eine schnellere Freisetzung aus Sprühtrocknungsgranulat im Vergleich zu Wirbelschichtgranulat und Hochenergiegranulat aufgrund der in dieser Reihenfolge sinkenden spezifischen Oberfläche festzustellen war. Es zeigte sich jedoch auch, dass die im Handel befindlichen Vergleichsprodukte der aniMedica die schnellste Freisetzung des Trimethoprim zeigten. Bei den hergestellten Trocknungsprodukten von Trimethoprim-Nanosuspensionen handelt es sich um komplexe Partikelstrukturen, bei denen sich die beiden Wirkstoffe teilweise umschließen, insbesondere Sulfadiazin das Trimethoprim. Dabei kann es zu einer gegenseitigen Freisetzungsbbeeinflussung kommen. Dem entgegen liegen die beiden

Wirkstoffe im aniMedica-Produkt als einfache Pulvermischung vor und können sich somit unabhängig voneinander auflösen. Für die Bestimmung von Sulfadiazin und Trimethoprim wurden chromatographische Nachweisverfahren etabliert und validiert (HPLC-UV, HPLC-MS). Die Wirkstoffe wiesen eine hohe Stabilität (untersucht über 70 Versuchstage) auf. Unter ameisensauren Bedingungen konnte nach 5 Tagen ein neuer Peak detektiert werden, der bis zum 70. Versuchstag auf 4 % – mit und ohne Lichteinfluss – anstieg.

In den mit den Testformulierungen aus den jeweiligen Herstellungsprozessen durchgeführten Experimenten an Schweinen konnten unter den gegebenen Versuchsbedingungen hinsichtlich der Bioverfügbarkeit und der Umweltbelastung über Stäube keine Vorteile der auf submikronen Partikeln basierenden Formulierungen festgestellt werden. Im Fütterungsversuch wurden nur nach der Behandlung mit submikronen Trimethoprimpartikeln (Granulat) im Vergleich zu der pulverförmigen handelsüblichen Formulierung geringgradig höhere und tendenziell länger anhaltende Trimethoprim-Plasmakonzentrationen erreicht. In keinem der Versuchsdurchgänge konnte Trimethoprim in luftgetragenen Staub (Polycarbonatfilter) oder im Plasma unbehandelter Sentinel-Schweine detektiert werden. Sulfadiazin wurde lediglich in dem Versuchsdurchgang, in welchem mit Wirbelschichtgranulat behandelt wurde, in der Stallluft (Aerosolstaub) nachgewiesen. Im Sedimentstaub lagen die für Trimethoprim nach der Behandlung mit den Testformulierungen ermittelten Werte stets unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Sulfadiazin konnte hingegen im Sedimentationsstaub nachgewiesen werden.

Nach einmaliger oraler Eingabe zeigte sich für ein submikrone Trimethoprimpartikel enthaltendes Granulat (Wirbelschichtgranulat) in den ersten Stunden nach der Eingabe im Vergleich zu den anderen Versuchsmustern eine höhere Trimethoprimkonzentration im Blutplasma. Dieser Effekt konnte in weiteren Versuchen mit Formulierungen, bei denen der Herstellungsprozess variiert worden war, und auch mit einer Formulierung, die der ersten untersuchten Formulierung entsprach, jedoch nicht bestätigt werden. Ein Coating erwies sich hinsichtlich des Ziels des Projekts, durch eine verbesserte Wirkstoffverfügbarkeit eine Reduzierung der zu verabreichenden Dosis zu erreichen, als nicht zielführend, da die erreichten Sulfadiazinkonzentrationen niedriger waren. Da bei den kommensalen intestinalen *E. coli* der Schweine, die in den einzelnen Versuchsabschnitten eingesetzt wurden, bereits eine Sulfonamidresistenz vorlag, konnten keine Aussagen zur Beeinflussung des

Resistenzgeschehens *in vivo* gemacht werden. In einem *In-vitro*-Ansatz zeigte sich, dass das 19:1-Verhältnis von Sulfonamid zu Trimethoprim geeignet ist, eine Resistenzentwicklung zu minimieren. Im Gegensatz dazu war es möglich, im Untersuchungszeitraum eine Abnahme der bakteriellen Empfindlichkeit (Resistenzentwicklung) mit den Einzelsubstanzen Sulfadiazin und Trimethoprim zu induzieren.

Im zweiten Projektteil wurde zunächst die Biofilmentstehung sowie das Verhalten des Biofilms während einer antibiotischen Exposition untersucht, um als nächsten Schritt ein von der Bauer Solutions GmbH (Beckum) vertriebenes Gerät hinsichtlich einer Verminderung der Keimbelastung und der Biofilmbildung in Tränkwassersystemen und eines Effekts auf dem Wasser zugesetzte Wirkstoffe (Stabilität) zu überprüfen. Der beobachteten Reproduzierbarkeit des Anzucht- sowie des Untersuchungsverfahrens zu Grunde gelegt, war das verwendete Modellsystem geeignet, um Wechselwirkungen zwischen Antibiotika und Biofilmen untersuchen zu können, wie sie auch in Tränkleitung auftreten könnten. Durch die Untersuchungen zur Biofilmentstehung konnte festgestellt werden, dass die mit Tränkwasser üblicherweise verabreichten Konzentrationen von Sulfadiazin und Trimethoprim keine Auswirkungen auf die Keimgehalte von Polykultur-Biofilmen in PVC-Rohren unter nährstoffarmen Bedingungen bei 20 °C hatten. Die Dosierungen waren zudem unzureichend, um sensible *E. coli* in den Biofilmen abzutöten. Da keine Veränderungen der MHK-Werte bei den Isolaten nachgewiesen wurden, ist dieses Geschehen sehr wahrscheinlich auf die Schutzeigenschaften des Biofilms und/oder auf den metabolischen Status der bakteriellen Zellen im Biofilm zurückzuführen.

Bezüglich des Sulfadiazingehalts im flüssigen Medium konnten nach einer Stunde Exposition Konzentrationsunterschiede zwischen dem Biofilm- und dem Kontrollrohr bestimmt werden. Zudem konnte Sulfadiazin in der Flüssigkeit der vorherigen Waschschriffe und in der PBS-Biofilm-Lösung quantifiziert werden. Der Wirkstoffgehalt in der PBS-Lösung mit Biofilm lag sechs- bis achtfach höher als im Kontrollrohr. Die Wirkstoffdiffusion in oder -adsorption an den Biofilm kann insofern bestätigt werden. Ferner lässt sich vermuten, dass die Dichte des Biofilms einen Einfluss auf die Aufnahmemenge von Sulfadiazin haben könnte. Bei einem geringeren KbE-Gehalt pro cm² könnte auch weniger Sulfadiazin in den Biofilm eindringen. Was man bisher nicht abschätzen kann, ist ein möglicher Einfluss der extrazellulären

Substanzen (EPS), die einen Großteil eines Biofilms ausmachen; so könnte bei einer geringeren KbE-Dichte weniger EPS produziert werden.

Sulfadiazin kann beim Autoklavieren unter SO_2 -Verlust zu Sulfadiazin_{ex} umgewandelt werden. Diese SO_2 -Extrusion ist bei Sulfonamiden auch als Photolysereaktion beschrieben. Die Summenformel „C₁₂H₁₂N₄O“ von SDZ_{ex} wurde mittels hochauflösender Massenspektrometrie bestätigt. Bisher ist wenig bekannt über Stabilität und biologische Wirkung dieser Transformationsprodukte, die möglicherweise in der Umwelt gebildet werden können. Sulfadiazin_{ex} zeigte sich als sehr stabil in Methanol sowie in wässrigen Lösungen bei pH 4, 7 und 10. Insofern könnte die Photolyse eine wichtige Reaktion für die Inaktivierung von Sulfonamiden – möglicherweise auch in der Umwelt – darstellen.

Mit Hilfe von *Pseudomonas fluorescens* konnte Sulfadiazin_{ex} durch den Modellbiofilm in ein Transformationsprodukt umgewandelt werden. Dabei entstand ein acetyliertes Produkt an der endständigen Amino-Gruppe, welches durch die Bestimmung der exakten Masse und des Fragmentmusters identifiziert werden konnte. Die Transformation von Sulfadiazin_{ex} durch den Modellbiofilm zeigt, dass dieser auch metabolisch aktiv ist. Interessant ist zusätzlich, dass der Biofilm das Transformationsprodukt Sulfadiazin_{ex} acetylieren kann. Sulfadiazin_{ex} hat keine antimikrobielle Aktivität, Sulfadiazin hingegen schon. Somit bleibt die spannende Frage offen, warum Sulfadiazin nicht acetyliert wird.

Es ergab sich bei den Untersuchungen mit dem Bauer-System, dass eine Behandlung des Wassers in handelsüblichen Tränkleitungssystemen unter den verwendeten Bedingungen langfristig keinen reduzierenden Effekt auf den kultivierbaren Keimgehalt im Wasser oder auf die Biofilmbildung hatte. Die Expositionsversuche der verwendeten Indikatoren zeigten weder auf die Membranaktivität noch auf die Aggregationsfähigkeit der Bakterien Effekte durch die elektromagnetische Behandlung. Auch wenn keine direkte Wirkung auf die verwendeten Keime und gezüchteten Biofilme in den Modellsystemen gezeigt werden konnte, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass Ablagerungen auf Tränkeleitungen in Praxisbetrieben durch das System beeinflusst werden und somit ein indirekter Effekt auf Keimzahlen gegeben sein könnte.

Ferner konnte anhand der Ergebnisse festgestellt werden, dass das Bauer-Gerät mittels elektromagnetischer Felder keine Antibiotika-Reduktion in betriebsüblichen Tränkeleitungen unter den eingestellten Versuchsbedingungen zeigte. Demnach ist der Einsatz des Bauer-

Geräts für die Tränkmedikation mit Sulfonamiden und Trimethoprim unbedenklich. Weil die Ergebnisse der Laborversuche keinen eindeutigen positiven Effekt des Bauer-Systems zeigten, wurden im Laufe des Projektes die Untersuchungen an Modellen intensiviert und von Untersuchungen unter Praxisbedingungen in einem Geflügelbestand Abstand genommen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass für die auf submikronen Partikeln basierenden Testformulierungen kein positiver Effekt im Sinne einer verbesserten Bioverfügbarkeit und verringerten Belastung der direkten Tierumgebung erreicht wurde. Auch das geprüfte Bauer-System zeigte keinen positiven Effekt im Sinne einer Verminderung der Biofilmentstehung; es hatte aber auch keinen negativen Einfluss auf die Wirkstoffstabilität in medikiertem Tränkwasser.

Im Verlauf der Arbeiten ergaben sich jedoch verschiedene grundlegende Aspekte, die im Sinne einer Reduzierung der Umweltbelastung weiterverfolgt werden können. Dies betrifft beispielsweise die Minimierung der Belastung der direkten Tierumgebung und damit letztlich der Umwelt durch verabreichte Wirkstoffe oder die Interaktion des verwendeten Sulfonamids im Biofilm.

Öffentlichkeitsarbeit / Veröffentlichungen / Vorträge

Das Projekt wurde bei der DBU-Tagung am 27./28.10.2015 vorgestellt. Ergebnisse aus dem Projekt wurden bisher bei den nachfolgend aufgelisteten Veranstaltungen präsentiert:

HAGEDORN, P., FLACH, F., MEISSNER, J., FINKE, J.H., PILGRAM, D., KWADE, A., KIETZMANN, M. (2018): Effect of submicron Trimethoprim particles on the oral bioavailability in pigs. 14th International Congress of the EAVPT, Wroclaw, Poland, June 24.-27., Abstract in: J. vet. Pharmacol. Therap. 41 (Suppl 1), 115

HAHNE, F., MÜLLER, C., YALMAN, S., HAMSCHER, G. (2018): Stabilität von wichtigen Veterinärantibiotika in verschiedenen Lösungen. Regionalverbandstagung Südwest der LChG, Gießen, Deutschland, März 06.-07.

HAHNE, F., MÜLLER, C., YALMAN, S., HAMSCHER, G. (2018): Stability of important veterinary antibiotics in various solutions. 8th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Gent, Belgium, Mai 22.-25.

HAHNE, F., JENSCH, S., MATEUS-VARGAS, R.H., SCHULZ, J., HAMSCHER, G. (2019): Effects of a bacterial biofilm on various antibiotics. 17th International Conference on Production Diseases in Farm Animals. Bern, Switzerland, June 27.-29.

MATEUS-VARGAS, R.H., HAHNE, F., JENSCH, S., KEMPER, N., HAMSCHER, G., SCHULZ, J. (2019): Interaktionen zwischen bakteriellen Biofilmen und Antibiotika in Tränkwasserleitungen in der Tierhaltung –Ein Modellversuch-. 4. Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland, Sept. 16.- 17.

HAHNE, F., MATEUS-VARGAS, R.H., JENSCH, S., KEMPER, N., HAMSCHER, G., SCHULZ, J. (2019): Einfluss eines bakteriellen Biofilms auf verschiedene Antibiotika in einem Modell-Tränkwasserrohr. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, Deutschland, Sept. 16.- 18.

MATEUS-VARGAS, R.H., HAHNE, F., JENSCH, S., KEMPER, N., HAMSCHER, G., SCHULZ, J. (2019): Effects of antibiotics on sessile bacteria in drinking water systems in poultry farms: A model approach. 17th Intl. Conference on Production Diseases in Farm Animals. Bern, Switzerland, June 27.-29.

MATEUS-VARGAS, R.H., KEMPER, N., VOLKMANN, N., KIETZMANN, M., MEIßNER, J., SCHULZ, J. (2019): Effects of low-frequency electromagnetic fields on water microorganism and biofilm formation in waterlines used in poultry production. XIX International Congress of ISAH. Wroclaw, Poland, Sept. 8. – 12.

MATEUS-VARGAS, R.H., HAHNE, F., JENSCH, S., KEMPER, N., HAMSCHER, G., SCHULZ, J. (2019): Interaktionen zwischen bakteriellen Biofilmen und Antibiotika in Tränkwasserleitungen in der Tierhaltung –Ein Modellversuch-. 4. Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland, Sept. 16.- 17.

Folgende Publikation, die auf Ergebnissen aus dem Projekt basiert, ist bisher erschienen:

PILGRAM, D. (2018): Orale Bioverfügbarkeit von submikronen Trimethoprimpartikeln beim Schwein und ihre Auswirkung auf die Wirkstoffverschleppung im Stall. Diss., Tierärztl. Hochschule Hannover

MATEUS-VARGAS, R.H., KEMPER, N., VOLKMANN, N. KIETZMANN, M., MEISSNER, J., SCHULZ, J. (2019): Low-frequency electromagnetic fields as an alternative to sanitize water of drinking systems in poultry production? PLoS ONE 14 (2019) e0220302

Weitere Publikationen sind geplant.

Fazit / Ausblick

In beiden Teilprojekten konnten nicht die Ergebnisse erzielt werden, die den durchgeführten Experimenten als Arbeitshypothesen zugrunde lagen. Es war das Ziel aufzuzeigen, dass die Verwendung submikroner Partikel auf Grund verbesserter Bioverfügbarkeit einen Vorteil hinsichtlich der Umweltbelastung durch verwendete Arzneimittel bedeuten kann und dass die physikalische Wirkung des Bauer-Systems einen hemmenden Einfluss auf die Biofilmentwicklung in für die Arzneimittelapplikation in Schweine- und Geflügelbeständen verwendeten Rohrsystemen haben kann. Dies sollte auch dazu beitragen, die Wirkstoffverschleppung im Betrieb zu minimieren. Das Projekt brachte jedoch Hinweise darauf, dass eine Optimierung der Behandlungsbedingungen und eine Minimierung der Biofilmbildung sehr wohl einen positiven Beitrag im Sinne der Umweltbelastung bedeuten können. Die hier untersuchten Formulierungen submikroner Wirkstoffpartikel und das Bauer-System erwiesen sich in der untersuchten Anwendung der Formulierung von Antibiotika und der Biofilmreduktion jedoch als nicht ausreichend geeignet, zum Erreichen dieses Ziels beizutragen.