

Entwicklung eines Mini-Gefriertrockners

Kontrollierte Herstellung und Charakterisierung
von Trägerlyophilisaten zur Anwendung am Auge

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stephan Alexander Maier

aus

Wertheim am Main

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Professor Dr. R. Süverkrüp
2. Referent: Professor Dr. M. Diestelhorst

Tag der Promotion: 15. Juni 2004

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	THEORETISCHER TEIL - GRUNDLAGEN UND STAND DER TECHNIK	4
2.1	Arzneiformen in der ophthalmologischen Therapie	4
2.1.1	Konventionelle Augentropfen – Bewertung einer Applikationsform	4
2.1.2	Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS)	7
2.2	Gefriertrocknung	11
2.2.1	Definition	11
2.2.2	Geschichtlicher Hintergrund	12
2.2.3	Vor- und Nachteile der Gefriertrocknung	14
2.2.4	Einsatzgebiete der Gefriertrocknung	15
2.2.5	Der Gefriertrocknungsprozess	15
2.2.5.1	Einfrieren	15
2.2.5.2	Aufbau der Gefriertrocknungsanlage (GT-Anlage)	21
2.2.5.3	Funktionsweise der Komponenten und deren Aufgabe bei Primär- und Sekundärtrocknung	22
2.2.5.4	Energieübertragung im Vakuum	29
2.2.5.5	Die Produkttemperatur im Gefriertrocknungsprozess	32
2.2.5.6	Erkennung des Endpunktes der Sublimationstrocknung	35
2.2.5.7	Der kontrollierte Gefriertrocknungszyklus - ein Beispiel	37
2.3	Die mittlere freie Weglänge (MFW)	41
2.4	Vakuuminduziertes Einfrieren	45
3	EXPERIMENTELLER TEIL	51
3.1	Materialien	51
3.1.1	Trägerfolie	51
3.1.2	Hydrophiles Polymer	52
3.1.3	Arzneistoff	53

3.2	Methoden	55
3.2.1	Der Herstellungsprozess:	55
3.2.1.1	Herstellung der wirkstoffhaltigen Polymerlösung	56
3.2.1.2	Herstellung der Applikatoren	57
3.2.1.3	Herstellung der Lyophilisate	58
3.2.2	Charakterisierung der verwendeten Polymerlösungen	62
3.2.2.1	Bestimmung der Dichte	62
3.2.2.2	Bestimmung der Viskosität	62
3.2.2.3	Bestimmung der Dosiergenauigkeit	63
3.2.3	Charakterisierung der Lyophilisate mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)	63
3.2.4	Ablöseverhalten von der Trägerfolie	66
3.2.5	Druckfestigkeit der Lyophilisate	68
3.2.6	Restmengenbestimmung des Fluorescein-Natriums auf den Trägerfolien	69
3.2.7	Bestimmung der Restfeuchte der Lyophilisate mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration	71
3.2.8	Statistische Methoden	75
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	79
4.1	Entwicklung eines Mini-Gefriertrockners	79
4.1.1	Zielsetzung	79
4.1.2	Auswahl der Komponenten	82
4.1.2.1	Temperaturmessung / Endpunktdetektion	82
4.1.2.2	Druckmesser	82
4.1.2.3	Ventile	83
4.1.2.4	Vakuumpumpe	83
4.1.2.5	Kühlmedium	83
4.1.3	Entwicklungsgang der Prototypen	84
4.1.4	Kontrolle und Aufzeichnung der Prozessparameter	96
4.2	Charakterisierung der verwendeten Polymerlösungen	98
4.2.1	Bestimmung der Dichte bei 20 °C	98
4.2.2	Bestimmung der Viskosität nach Ubbelohde	98
4.2.3	Bestimmung der Dosiergenauigkeit der verwendeten Pipette	101

4.3	Gefriertrocknung	102
4.3.1	Verlauf der Einfrier- und Trocknungskurven	102
4.3.2	Entwicklung verschiedener Einfriermethoden	105
4.3.3	Reproduzierbarkeit von Einfrier- und Trocknungsbedingungen	110
4.3.4	Einfluss der Wirkstoffkonzentration auf den Trocknungsverlauf	118
4.4	Einfluss von Lyophilisatzusammensetzung und Einfrierbedingungen auf die Eigenschaften von OLCS	120
4.4.1	Aufzeichnung von Kraft-Weg-Diagrammen zur Ermittlung der Haftfestigkeit von Lyophilisaten auf der PTFE-Folie	120
4.4.1.1	Einfluss der Einfriermethode auf die Haftfestigkeit	123
4.4.1.2	Einfluss des Wirkstoffgehaltes auf die Haftfestigkeit	135
4.4.1.3	Einfluss des Polymergehaltes auf die Haftfestigkeit	137
4.4.1.4	Sonstige Erkenntnisse zur Haftfestigkeit (Veränderung des Anlagendesigns)	145
4.4.2	Einfluss auf die Druckfestigkeit der Lyophilisate	149
4.4.2.1	Einfluss der Einfriermethode auf die Druckfestigkeit	150
4.4.2.2	Einfluss des Polymergehaltes auf die Druckfestigkeit	151
4.4.2.3	Quantifizierung der Druckfestigkeit	152
4.4.3	Erkenntnisse zu Haft- und Druckfestigkeiten durch klinische Studien	159
4.4.4	Restmengenbestimmung auf den Trägerfolien	163
4.4.4.1	Abhängigkeit der Restmengen von den Einfrierbedingungen	163
4.4.4.2	Abhängigkeit der Restmenge vom Wirkstoffgehalt	167
4.4.4.3	Abhängigkeit der Restmengen vom Polymergehalt	168
4.4.4.4	Vergleichbarkeit von In-vivo- und In-vitro-Ergebnissen	169
4.4.5	Effekte durch Variation der Einfrierbedingungen im Mini-Gefriertrockner – Zusammenfassung und Diskussion	170
4.4.6	Restfeuchtebestimmung der Lyophilisate nach Karl Fischer	174
5	ZUSAMMENFASSUNG	177
6	ANHANG	181
6.1	Zeichen und Symbole	181
6.2	Abkürzungen	183

1 Einleitung und Zielsetzung

Die wichtigste pharmazeutische Darreichungsform zur Anwendung am Auge des Menschen sind wässrige Augentropfen, mit weitem Abstand gefolgt von Augensalben, Augengelen und Inserten [12]. Allerdings handelt es sich bei Augentropfen im Grunde genommen um eine unzureichende Darreichungsform, deren vielfältiger Einsatz heutzutage nur durch einen Mangel an Alternativen gerechtfertigt werden kann [82].

So erreichen oft nur weniger als 5 % der applizierten Arzneistoffmenge den gewünschten Wirkort. Der Rest der verabreichten Dosis wird zum größten Teil (50 bis nahezu 100 %) systemisch verfügbar und kann erhebliche unerwünschte Wirkungen auslösen. Aus Studien ist bekannt, dass zum Beispiel unter Timolol-Therapie bei 20 % der Patienten unerwünschte systemische Wirkungen des Betablockers (Bronchokonstriktion und Bradykardie) auftreten [12].

Ziel moderner Ophthalmika ist es, die systemischen Wirkungen zu vermindern und die lokale Wirksamkeit zu optimieren. Des Weiteren wird eine Senkung der Applikationsfrequenz, Vermeidung einer Sehbeeinträchtigung, sowie eine Verbesserung der Applizierbarkeit angestrebt [12].

Mit dem Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS), einem Lyophilisat auf einem Träger, wurde eine Arzneiform entwickelt, die diesen Ansprüchen an eine moderne Applikationsform zur Anwendung am Auge weitgehend gerecht wird. Dies konnte bereits durch die Arbeiten von Grunthal [25] und Weichselbaum [82] belegt werden. Schwierigkeiten bereitete allerdings die reproduzierbare Herstellung der Applikationsform mit den gewünschten physikalisch-chemischen Eigenschaften. Besonderes Augenmerk muss dabei auf die Haftfestigkeit des porösen Lyophilisattropfens auf dem flexiblen Trägerstreifen gerichtet werden. Das Lyophilisat muss einerseits so fest mit dem Träger verbunden sein, dass es bei der Handhabung während des Transportes oder bei der Anwendung nicht abfällt. Andererseits darf es nicht so fest haften, dass eine vollständige Ablösung bei der Applikation nicht mehr gewährleistet werden kann.

Ziel dieser Dissertation ist die Weiterführung der von Grunthal (1996) und Weichselbaum (2002) durchgeführten Arbeiten, wobei der Schwerpunkt auf dem Herstellungsprozess liegt.

Die Chargengröße wurde von maximal 5 Lyophilisaten pro Herstellungsprozess bei Grunthal durch Weichselbaum auf bis zu 40 Trägerstreifen erhöht. Unregelmäßige und ungenügend kontrollierte Einfrierbedingungen, sowie unterschiedliche Gefrier-trocknungsbedingungen innerhalb einer Versuchsreihe resultierten jedoch in einer verhältnismäßig breiten Streuung der Haftfestigkeitswerte der Lyophilisate. In klinischen Studien konnten diese Lyophilisate nur unvollständig appliziert werden und zeigten dadurch gegenüber gleich dosierten konventionellen Augentropfen eine schlechtere bzw. keine deutlich verbesserte Bioverfügbarkeit.

Daher wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit, entgegen dem Trend zu immer größeren Geräten mit inhomogenen Bedingungen im Trockenraum, ein Mini-Gefriertrockner entwickelt, in dem nur ein einzelner Lyophilisatträger unter genauer definierten Bedingungen eingefroren und getrocknet werden konnte.

Um mit diesem Mini-Gefriertrockner eine ausreichende Menge Lyophilisate in akzeptabler Zeit fertigen zu können, wurden das Design und die Einfriermethodik angepasst und die Prozesszeit wesentlich verkürzt.

Die Temperatur im Produkt sowie die Bedingungen in der Trockenkammer wurden sowohl beim Einfrieren als auch bei der Trocknung kontinuierlich erfasst. Die Daten wurden aufgezeichnet und graphisch dargestellt. Im Mini-Gefriertrockner können die Prozessbedingungen exakt eingestellt und kontrolliert werden. Dadurch war es möglich, definierte Einfriermethoden zu entwickeln und deren Reproduzierbarkeit nachzuweisen.

Anhand der physikalisch-chemischen Charakterisierung der unter verschiedenen Bedingungen gefertigten Lyophilisate wurde überprüft, ob mit dem Mini-Gefriertrockner eine reproduzierbare Herstellung von OLCS möglich ist und ob die Eigenschaften der Lyophilisate gezielt verändert werden können. Die die Applizierbarkeit beeinflussenden Faktoren Druck- und Haftfestigkeit waren dabei von besonderem Interesse.

Das von Weichselbaum angewendete Prinzip zur Bestimmung der Haftfestigkeit wurde verbessert und eine präzise Testapparatur entwickelt. Mit dieser wurde der Einfluss der verschiedenen Einfriermethoden sowie der Lyophilisatzusammensetzung auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate untersucht.

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Diese Apparatur wurde in einer modifizierten Betriebsweise zur Bestimmung der Strukturfestigkeit verwendet und dadurch die von Weichselbaum angewendete sensorische Prüfung mit den Fingern quantifizierbar gemacht. Druckfestigkeitsprofile wurden in Abhängigkeit von verschiedenen Rezeptur- und Herstellparametern aufgezeichnet und ausgewertet.

Mittels rasterelektronischer Aufnahmen der Lyophilisatstruktur wurde der Zusammenhang zwischen den Einfrierbedingungen und der Lyophilisatzusammensetzung sowie der Haft- und Druckfestigkeit untersucht.

Fluoresceinhaltige Klinikmuster unterschiedlicher Zusammensetzung mit definierten Spezifikationen bezüglich Druck- und Haftfestigkeit wurden hergestellt und deren Applizierbarkeit in klinischen Studien getestet. Mit Hilfe der Fluorphotometrie erfolgte eine Quantifizierung der Rückstände auf der Trägerfolie. So wurde die Vollständigkeit der Applikation nach der klinischen Anwendung wie auch die Restmenge des Wirkstoffs auf der Folie nach In-vitro-Abreißtest ermittelt.

2 Theoretischer Teil - Grundlagen und Stand der Technik

2.1 Arzneiformen in der ophthalmologischen Therapie

2.1.1 Konventionelle Augentropfen – Bewertung einer Applikationsform

Die Handhabbarkeit der konventionellen Darreichungsformen zur Anwendung am Auge und eine ausreichende Patientencompliance manchmal über Jahre stellen große Probleme bei der Behandlung mit Ophthalmika dar.

Zur richtigen Anwendung von konventionellen Augentropfen muss der Kopf um mehr als 45° rekliniert werden. Diese unphysiologische Haltung löst bei einigen Patienten Schwindelattacken aus [14]. Auch kann eine Bewegungseinschränkung verhindern, dass eine solche Neigung erreicht wird. In dieser Position fehlt dem Anwender die visuelle Applikationskontrolle z. B. durch einen Spiegel. In der Folge misslingt häufig das Einbringen des Tropfens in den Bindehautsack. Der Tropfen läuft über die Wange und der Wirkstoff steht am Auge nicht zur Verfügung.

Um die Anwendung zu kontrollieren, berühren einige Patienten die Cornea mit dem Tropfer. Diese Methode ist abzulehnen, da sie mit Schmerzen, einem Verletzungsrisiko und mikrobieller Verunreinigung der Augentropfflasche samt Lösung einhergeht. Ölige Augentropfen oder solche mit erhöhter Viskosität werden häufig versehentlich beim Lidschlussreflex mit den Wimpern am Flaschenauslass abgestreift und gelangen ebenfalls nicht an den Wirkort. Zudem wird dabei die Öffnung des Tropfers mikrobiologisch kontaminiert und die Haltbarkeit der Lösung gegebenenfalls herabgesetzt.

Unerwünscht ist auch der Abfluss der Augentropfen über den Tränen-Nasen-Kanal zur Nasenschleimhaut. Dieses sehr gut durchblutete Organ stellt eine gute Resorptionsfläche dar. Somit müssen systemische Nebenwirkungen erwartet werden, die aufgrund einer Umgehung des First-Pass-Effektes verstärkt auftreten können. Dies kann durch ein kurzzeitiges Abdrücken des Kanals mit dem Zeigefinger direkt nach der Applikation zwar weitgehend vermindert werden, jedoch ist diese Methode nur wenigen Patienten bekannt.

Appliziert werden mit einem Augentropfen zwischen 20 und 50 μL Flüssigkeit, je nach Fertigarzneimittel. Das Volumen der sich kontinuierlich erneuernden Tränenflüssigkeit beträgt beim Erwachsenen allerdings nur 7 bis 10 μL pro Auge [32]. Daher fließen bis zu 80 % der applizierten Wirkstoffmenge mit dem nächsten Lidschluss über die Wange oder den nasolakrimalen Kanal ab [15]. Die Arzneistoffmenge, die das Kammerwasser erreicht, ist sehr gering und macht höchstens einige Prozente der applizierten Dosis aus [18]. Hier sind also sowohl Unterdosierung als auch systemische Wirkungen nicht auszuschließen, zumal das große Flüssigkeitsvolumen einen vermehrten Tränenfluss zur Folge hat. Viskositätserhöhende Hilfsstoffe sollen die Filmbildung und Haftfähigkeit verbessern und Reizwirkungen verhindern. Eine Intensivierung und Verlängerung der Wirkung ist aber vor allem auf die Verlangsamung des Abflusses der applizierten Tropfen über die Tränenkanäle zurückzuführen [18].

Die Sicherheit der Augentropfenanwendung wurde in einer Studie durch Brown et al. an 150 Glaukompatienten untersucht: 27 % aller Patienten, überwiegend Langzeitanwender, misslang der Versuch, den Tropfen in das Auge einzubringen. Vier von fünf Patienten berührten den Auslass der Augentropfflasche mit den Wimpern, den Fingern, den Augenlidern oder der Bindehaut und kontaminierten so den Tropfer. Hygienemaßnahmen durch Waschen der Hände vor der Anwendung betrieben nur 9 % der Probanden [3].

Die Compliance scheitert häufig an der schwierigen Handhabbarkeit von Augentropfen, aber auch an den Beschwerden, die das Tropfen selbst hervorruft wie z. B. Brennen, Jucken, Stechen und das Gefühl, einen Fremdkörper im Auge zu spüren. Auch die systemischen Nebenwirkungen, die der Patient oftmals nicht mit seiner Augenmedikation in Verbindung bringt, sollen bei einer Langzeitanwendung z. B. bei einer Glaukomtherapie ertragen werden. Gerade bei Glaukompatienten kommt erschwerend hinzu, dass der erhöhte Augeninnendruck keine Schmerzen oder andere erkennbare Beschwerden hervorruft und somit die Notwendigkeit der Therapie grundsätzlich in Frage gestellt wird [15].

Die Compliance ist somit ins Zentrum der therapeutischen Überlegung gerückt und es wird versucht, die oben beschriebenen Probleme zu lösen.

Ein Ansatz ist die Entwicklung von Einzeldosisophthiolen (EDO). Sie minimieren die Kontaminationsproblematik sowie Unverträglichkeitsreaktionen durch Fehlen von Konservierungsmitteln. Die Sollbruchstellen solcher Einzeldosisbehältnisse sind

jedoch oft scharfkantig und somit gefährlich für Patienten, die die Cornea mit dem Auslass berühren (Abb. 2-1). Zudem kann die Entstehung einer Luftblase beim Öffnen das freie Austropfen der Lösung behindern. Zum Einbringen eines Tropfens in den Bindehautsack ist häufig starker Druck auf das EDO erforderlich. Ältere und schwache Patienten können diesen nicht immer aufbringen.

Der Name Einzeldosisbehältnis ist irreführend. Die Füllmenge solcher Ophthiolen beträgt 0,5 mL, verwendet wird aber nur 1 Tropfen, also maximal etwa 50 μ L. Das bedeutet, dass nur 1/10 der Augentropfenlösung zur Anwendung kommt. Der Rest wird verworfen. Da sich in den Ophthiolen keine wahre Einzeldosis befindet, besteht immer noch die Möglichkeit einer Unter- oder Überdosierung.

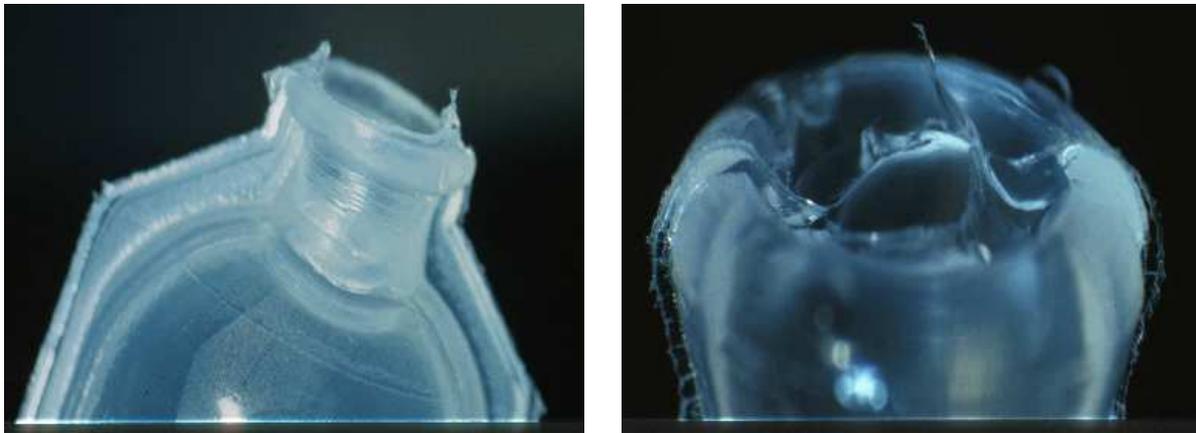


Abb. 2-1a und b: Sollbruchstelle von Einzeldosisophthiolen. Rechts stark vergrößert.
Fotos: M Diestelhorst.

Einige Firmen haben Applikationshilfen entwickelt, um die Compliance zu verbessern.

Die Firma Chibret bietet einen kleinen Spiegel an, der mit einer Haltevorrichtung an der Augentropfflasche fixiert werden kann. Beim Einträufeln der Augentropfen kann der Patient durch einen Blick in den Spiegel kontrollieren, ob sich der Tropfer unmittelbar über dem Auge befindet. Damit kann der Tropfen exakt platziert werden [25].

Eine Studie, die dem Vergleich der Anwendung mit und ohne Augenspiegel dienen sollte, zeigte eine Abnahme der Fehlapplikationen durch Zuhilfenahme des Spiegels. Zusätzlich konnten die Spiegel-Probanden ihre Therapiezeit mit einem Flascheninhalt verlängern, also die Tagestherapiekosten senken [74].

Ein weiteres, von der Firma Owen Mumford entwickeltes Hilfsmittel zur Applikation von Augentropfen ist ein Trichter mit Gewinde (Autodrop[®], Fa. Owen Mumford, Bielefeld). Nach Einschrauben der Augentropfflasche an der verjüngten Seite des Trichters wird dieser mit der weiten Seite über beide Lider des geöffneten Auges gestülpt und der Tropfen in den Bindehautsack geträufelt.

Die Firma Blokland Pack Rowa Techniek, IJsselstein, Niederlande, hat eine ähnliche Applikationshilfe mit dem Namen „Drip Aid[®]“ entwickelt.

Aus Schweden kommt der Sonyl Novum[®] Tropfbehälter, bei dem ein Schutzring sowohl die Verunreinigung der Flasche durch die Berührung des Lidrandes als auch die Verletzung der Hornhaut durch den Tropfer verhindert [18].

2.1.2 Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS)

Beim Ophthalmic Lyophilisate Carrier System handelt es sich um einen gefriergetrockneten Tropfen einer Augentropfenzubereitung (Lyophilisat) auf einer hydrophoben Trägerfolie (Abb. 2-2 und Abb. 2-3).

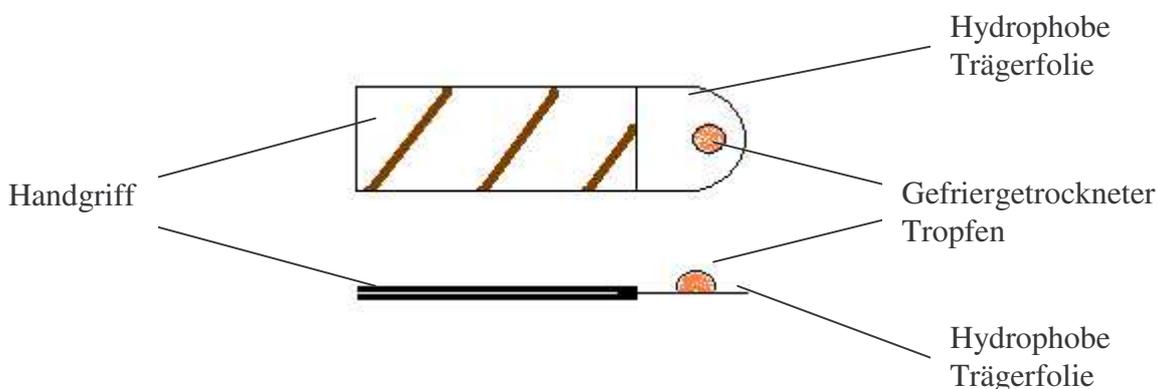


Abb. 2-2: Aufbau eines OLCS, Aufsicht und Seitenansicht.

Das Lyophilisat besteht aus einer Polymermatrix, in der nur der Wirkstoff, ohne weitere Hilfsstoffe, in dispergierter oder suspensierter Form vorliegt. Die Polymermatrix übernimmt zum einen die Aufgabe der Gerüstsubstanz, da der Wirkstoff allein mengenmäßig nicht zur Ausbildung einer mechanisch stabilen Lyophilisatstruktur ausreicht. Andererseits bildet das Polymer beim Kontakt mit der Tränenflüssigkeit ein Gelkissen, welches zu einer verlängerten Wirkstofffreisetzung führen kann. Zur besseren Handhabung ist die Trägerfolie mit einem Handgriff versehen.

Die neue Applikationsform hat diverse Vorteile gegenüber konventionellen Augentropfen:

Da es sich um eine wasserfreie Arzneiform handelt

- müssen weder pH-Wert noch Osmolalität eingestellt werden.
- kann auf Konservierungsmittel verzichtet werden.
- gibt es keine Stabilitätsprobleme der eingesetzten Wirkstoffe im Vergleich zu flüssigen Augentropfen.

- Es wird eine genau bemessene Einzeldosis appliziert (ein Lyophilisat mit definiertem Gehalt, volumendosiert) [14]. Somit werden Über- und Unterdosierung ausgeschlossen. Die Gleichförmigkeit der Dosierung ist gegenüber handelsüblichen Augentropfenpräparaten deutlich verbessert [82].
- Bessere Bioverfügbarkeit aufgrund verlängerter Wirkstofffreisetzung durch Gelbildung des Lyophilisates (Abb. 2-5 und Abb. 2-7). Es konnte gezeigt werden, dass die Bioverfügbarkeit von Fluorescein nach Applikation als Lyophilisat bis zu 34mal höher war als bei Applikation von Augentropfen gleicher Dosierung [16].
- Weniger systemische Nebenwirkungen. Durch die Bildung des Gelkissens, aus dem der Wirkstoff langsam kontinuierlich freigesetzt wird, kommt es kaum zum Abtransport überschüssiger Flüssigkeit und damit des Wirkstoffs über den Tränen-Nasen-Kanal.
- Einfache Anwendung, besonders für Brillenträger und ältere Menschen. Im Gegensatz zu konventionellen Augentropfen ist zur Applikation der OLCS das Reklिनieren des Kopfes nicht notwendig (Abb. 2-4) [14].



Abb. 2-3: Detailaufnahme Fluorescein-OLCS.
Foto: S Dinslage.



Abb. 2-4: Applikation eines Fluorescein-OLCS.
Foto: S Dinslage.

Zur Applikation wird das Unterlid des Auges, in das das Lyophilisat eingebracht werden soll, mit Zeige- und Mittelfinger der einen Hand leicht nach unten gezogen, um das Lid vom Augapfel zu lösen und den Bindehautsack zugänglich zu machen. Dann wird das OLCS zwischen Daumen und Zeigefinger der anderen Hand genommen, wobei der Zeigefinger zur Stabilisierung auf die Trägerfolie hinter das Lyophilisat gelegt wird (Abb. 2-4). Das Applikationssystem wird nun zum Auge geführt und der gefriergetrocknete Tropfen durch Abstreifen an der Unterlidkante in den Bindehautsack überführt. Dort löst er sich unter Gelbildung langsam auf und setzt so den Wirkstoff frei (Abb. 2-5 und Abb. 2-6).



Abb. 2-5: Gelkissen, 1 Minute nach Applikation.
Foto: S Dinslage.



Abb. 2-6: 5 Minuten nach Applikation.
Foto: S Dinslage.

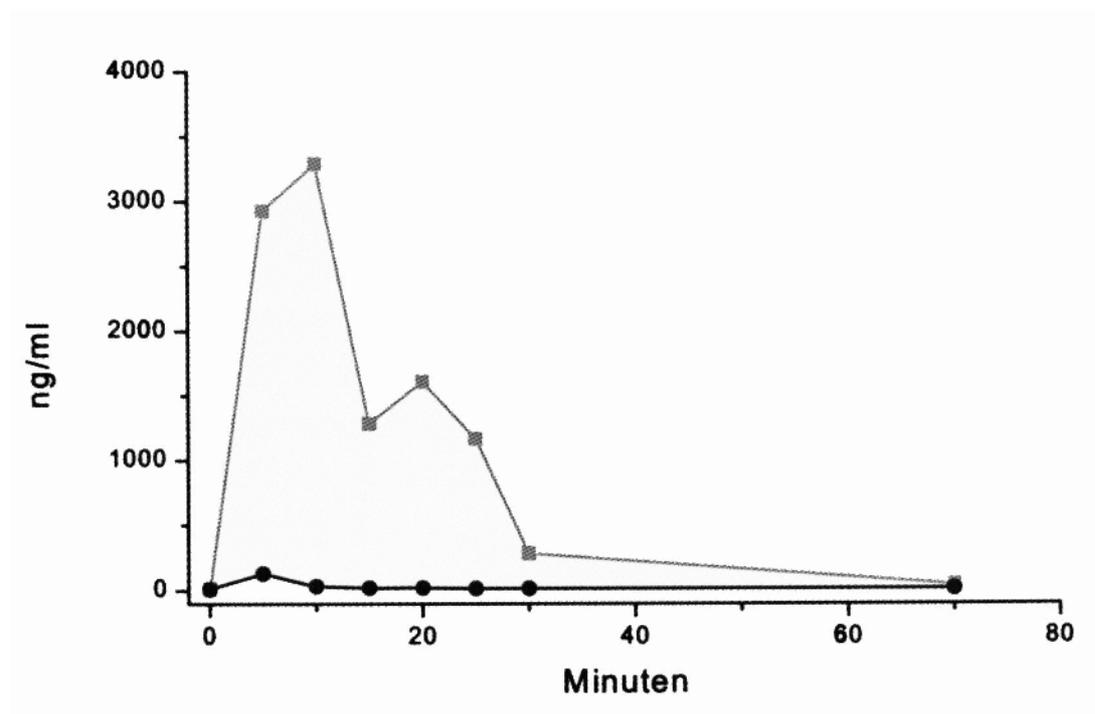


Abb. 2-7: Fluoresceinkonzentration in der Vorderkammer nach Applikation von 68 μg Fluorescein-Natrium mittels konventioneller Augentropfen (dunkle Linie, -●-), und als Lyophilisat (helle Linie, -■-). Die Vorderkammermessungen mittels Fluorphotometrie zeigen, dass eine etwa 30-40fache Konzentration von Fluorescein nach einmaliger Applikation als Lyophilisat in der Vorderkammer des Auges erreicht werden kann. Die Daten unterstreichen die deutlich verbesserte Pharmakokinetik nach Medikamentenapplikation als Lyophilisat am Auge [15].

Die Art der Applikation macht die Haftfestigkeit der Lyophilisate und ihre Druckfestigkeit zu spezifischen Qualitätsmerkmalen von OLCS. Haftet das Lyophilisat zu fest, wird es nur unvollständig abgelöst. Es kommt zu einer Unterdosierung des Arzneistoffs und die gewünschte Wirkung ist vermindert oder bleibt aus.

Ist die Haftfestigkeit dagegen nicht ausreichend, so kann sich das Lyophilisat bereits bei der Lagerung oder beim Transport von der Trägerfolie ablösen und das System verliert seine Integrität. Dann kann das Lyophilisat nicht mehr unter hygienisch einwandfreien Bedingungen appliziert werden.

Auch die Druckfestigkeit der Lyophilisate spielt eine entscheidende Rolle für die Applizierbarkeit. Um den gefriergetrockneten Tropfen an der Unterlidkante abzustreifen, muss ein gewisser Druck auf das Lyophilisatgerüst ausgeübt werden. Dies geschieht durch den Zeigefinger, der das Lyophilisat leicht an den Bindehautsack bzw. die Bindehaut andrückt (Abb. 2-8). Ist das Gerüst zu weich, so wird das halbkugelförmige Lyophilisat dabei stark zusammengedrückt. Dadurch wird es deutlich flacher und die Abstreiffläche des gefriergetrockneten Tropfens (Abb. 2-8, dicker weißer Pfeil) reicht unter Umständen nicht mehr aus, um die zur Applikation notwendigen

Scherkräfte aufzubringen. Ist das Gerüst dagegen zu hart, könnte es bei der Applikation zu Schmerzen oder sogar Verletzungen am Auge kommen.

Um also OLCS gut applizieren zu können, müssen diese Eigenschaften richtig eingestellt werden.

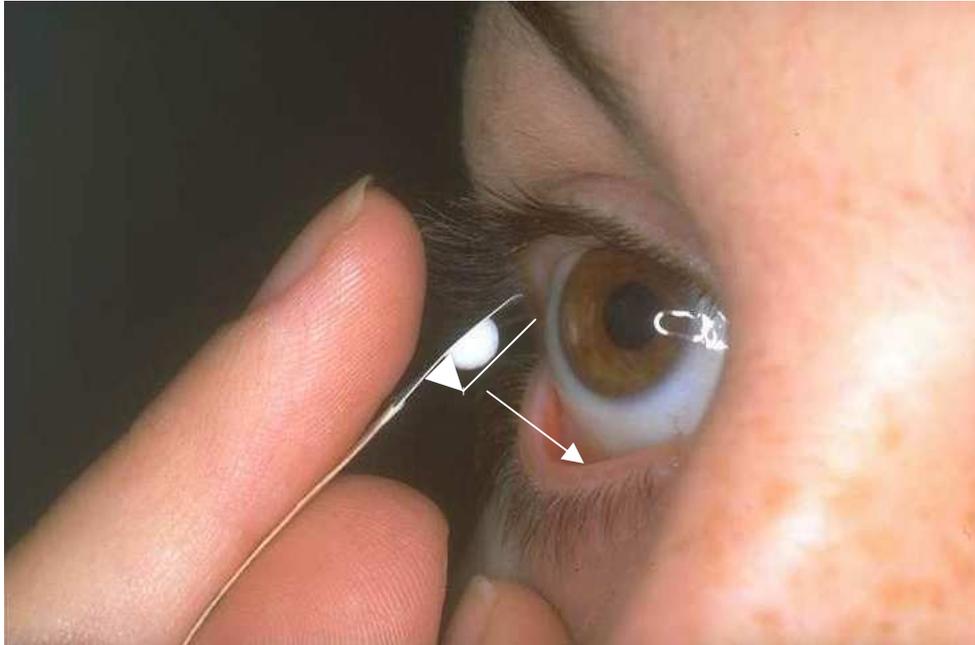


Abb. 2-8: Applikation eines Pilocarpin-OLCS.

2.2 Gefriertrocknung

2.2.1 Definition

Gefriertrocknung ist ein Prozess, bei dem das zu trocknende Material eingefroren und anschließend die Flüssigkeit, zum Beispiel ein Lösungsmittel, aus der festen Phase entfernt wird. Dies geschieht zuerst durch Sublimation (Primärtrocknung), darauf folgt die Desorption restlicher Wassermengen, die an der Oberfläche des Gerüsts haften (Sekundärtrocknung). Der dabei erreichte Restfeuchtegehalt sollte kein biologisches Wachstum und keine chemischen Reaktionen mehr unterstützen.

Die getrockneten Produkte werden als Lyophilisate (von lyophil [griechisch] = lösungsfreundlich) bezeichnet.

2.2.2 Geschichtlicher Hintergrund

Die Historie des Gefriertrocknens lässt sich bis zu der Hochkultur der Inkas zurückdatieren. Sie konservierten Kartoffeln, indem sie diese einfroren. Anschließend wurden sie der Wärme der Sonne und der kalten, zirkulierenden Andenluft ausgesetzt. Gleiches wird heute noch von den peruanischen Nachkommen der Inka praktiziert. Somit erhalten sie ein haltbares, trockenes Produkt mit nahezu allen Nährstoffen der ursprünglichen Kartoffel. Interessanterweise ist diese Technik in ihren Grundzügen identisch mit der von Meryman 1959 beschriebenen Sublimationsgefriertrocknung ohne Vakuum. Meryman ersetzte den kalten Wind durch einen gewöhnlichen Ventilator. Mit diesem leitete er Luft durch ein Trockenmittel und anschließend über die zu trocknende Probe [44].

Bereits 1890 beschrieb Richard Altmann in seinem Buch „Die Elementarorganismen und ihre Beziehung zu den Zellen“ das Einfrieren und Trocknen frischer Organstücke [29]. Dies gelang ihm bei Temperaturen von etwa -20 °C und Unterdruck. 1905 berichteten Benedict und Manning von der Trocknung organischen Materials bei reduziertem Druck, erzeugt durch eine „chemische Pumpe“ [29].

Diese Art der Trocknung war allerdings sehr uneffizient, denn es dauerte etwa zwei Wochen, um den Restfeuchtegehalt einer Gelatinezubereitung auf 20 % zu reduzieren. Um 1909 führte Shackell Trocknungsversuche mit einem Versuchsaufbau ähnlich dem von Benedict und Manning durch. Allerdings benutzte er bereits eine mechanische Vakuumpumpe [29]. Interessant ist, dass die von Shackell beschriebene Trocknungsanlage bereits aus den gleichen Hauptkomponenten aufgebaut war, wie sie heute noch in modernen Gefriertrocknungsanlagen verwendet werden. Dies sind eine Trocknungskammer, eine Kondensatorkammer und ein Vakuumsystem.

1929 zeigten Sawyer, Lloyd und Kitchen, dass sich Gelbfiebereviren erfolgreich gefriertrocknen lassen [54]. 1932 konstruierte Gersh mit Hilfe der von Gaede erfundenen Diffusionspumpe schließlich eine erste leistungsfähige Vakuumanlage zum Gefriertrocknen von histologischen Präparaten [54].

Der erste Hinweis auf die Gefriertrocknung in der Patentliteratur geht auf den französischen Erfinder Tival aus dem Jahre 1927 zurück [79]. Dieses Patent geht allerdings bezüglich der Methodik nicht ins Detail. Eine ausführliche Beschreibung der Vakuumtrocknung eines gefrorenen Gutes beinhaltet das Patent von Elser (1934). Er benutzte eine Kühlfalle mit festem Kohlendioxid als Kondensator [79]. Flosdorf und Mudd verwendeten 1935 Methanol und Trockeneis als leicht handhabbares Kühlmedium.

Diese Kühlflüssigkeit nutzten sie gleichzeitig zum schnellen Einfrieren der Proben [79]. Im gleichen Jahr führten Flosdorf et al. erste Untersuchungen zur Gefriertrocknung von Blutprodukten durch [77]. 1939 publizierte Greaves das erste gelungene Design eines Gefriertrockners mit einem nahe an der Probe gelegenen Kondensator, der mechanisch gekühlt wurde. Damit ersetzte er die bis dahin verwendeten, mit festem Kohlendioxid gekühlten Kondensatoren [79].

Großtechnische Bedeutung erlangte die Gefriertrocknung dann während des 2. Weltkrieges zur Herstellung von Blutplasma und Penicillin [66]. Mit der Gefriertrocknung war eine Stabilisierungsmethode gefunden, durch die eine breite Anwendung des hydrolyseempfindlichen Penicillins möglich wurde. Das stabile Antibiotikumpulver wurde kurz vor der Anwendung gelöst und anschließend injiziert.

1940 baute Greaves an der Cambridge University England, veranlasst durch den Medical Research Council auf der Grundlage einer Pilotanlage eine großtechnische Produktionsanlage, um Tetanusantitoxin zu lyophilisieren. Die Produktionsleistung dieser und ähnlicher Anlagen war jedoch nicht ausreichend. 1942 wurde beschlossen, eine neue und größere Gefriertrocknungsanlage zu errichten. Ihre Kapazität betrug 2500 Flaschen pro Woche. Zwischen Februar 1943 und September 1945 wurden dort eine halbe Million Flaschen mit Blutplasma zur Behandlung von Kriegsoptionen getrocknet [79].

Nach Kriegsende war die Gefriertrocknung eine allgemein anerkannte Methode zur Konservierung von Arzneimitteln und biologischen Produkten.

In den fünfziger Jahren dominierten in der Forschung auf dem Gebiet der Gefriertrocknung die pharmazeutischen Anwendungen. In den 60ern waren es Nahrungsmittel, die den Anstoß zur Forschung und Entwicklung gaben. Zum Beispiel nutzte die NASA gefriergetrocknete Nahrungsmittel in der Raumfahrt [50].

Die Verwendung von gefriergetrockneten Produkten durch Extrembergsteiger und Polarforscher führte schließlich dazu, dass diese inzwischen auch im Handel erhältlich sind.

Heutzutage hat die Gefriertrocknung ihre größte Bedeutung in der Pharmaindustrie. Darunter fallen die Gefriertrocknung von chemischen Verbindungen, Parenteralia, Impfstoffen, In-vivo- und In-vitro-Diagnostika sowie biotechnologischen Produkten et cetera. Gefriergetrocknete Produkte machen etwa 8-10 % der Gesamtkosten des Gesundheitswesens aus, das waren 1999 mehr als 8 Milliarden US-Dollar [29].

Mengenmäßig den größten Anteil hat jedoch die Lebensmittelindustrie zum Beispiel mit der Herstellung von löslichem Kaffee [54].

2.2.3 Vor- und Nachteile der Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung ist eine Technik, die viele verschiedene Vorteile mit sich bringt:

- Minimale Strukturveränderung des zu trocknenden Gutes
- Minimale Aktivitätsverluste bei biologischem Material
- Schonende Trocknung von empfindlichen, thermolabilen Stoffen
- Verlängerung der Haltbarkeit
- Die poröse Struktur ermöglicht schnelle und vollständige Rehydratation.
- Genaue, saubere Dosierung im Endbehältnis
- Sterile Herstellung ist möglich.

Dafür müssen aber auch einige Nachteile in Kauf genommen werden:

- Hohe Kapitalkosten, durch einen großen apparativen Aufwand [59]
- Lange Prozesszeit, bis zu mehreren Tagen [59]
- Hoher Energieeinsatz, zum Beispiel zur Aufrechterhaltung des Vakuums oder zur Kühlung der Kondensatorflächen während des gesamten Prozesses.
- Feuchtigkeitsempfindliche Produkte
- Die große, hochporöse Oberfläche der Lyophilisate begünstigt Oxidationsprozesse und Verklumpung durch Feuchtigkeit.

2.2.4 Einsatzgebiete der Gefriertrocknung

Lyophilisiert werden zum Beispiel:

- Materialien für Blut-, Samen- und Gewebebanken wie Blutplasma, Plasmafraktionen, Haut, Hornhaut, Ei- und Samenzellen, Bakterienstämme [50]
- Chemische Verbindungen, In-vitro- und In-vivo-Diagnostika [50]
- Biotechnologische Produkte, vor allem auf Proteinbasis [57]
- Arzneiformen wie parenterale Pulver in Trockenampullen oder Fläschchen. Dazu zählen Eiweiß- und Hormonpräparate, zum Beispiel Polyestradiolphosphat zur intramuskulären Injektion (Lyophilisat und Lösungsmittel), oder auch Lebendimpfstoffe von Viren oder Bakterien [54].
- Pflanzliche Zubereitungen (Blumen, Teepulver) und Enzyme (Pankreatin) [50]
- Nahrungsmittel wie Säuglingsmilch, Fertigsuppen, Gemüse, Kartoffeln, Obst, Gewürze, Säfte oder Kaffee [50]
- Technische Produkte wie zum Beispiel möglichst wenig agglomerierte Ausgangsmaterialien für die Herstellung komplexer, gesinterter keramischer Werkstoffe [54]
- Materialien wie Holz, Leder oder Papier, zum Beispiel zum Restaurieren oder Konservieren historischer Objekte [11, 50]

2.2.5 Der Gefriertrocknungsprozess

Der Gefriertrocknungsprozess lässt sich in drei aufeinander folgende Verfahrensschritte gliedern: Das Einfrieren, die Haupttrocknung und die Nachtrocknung. Da bei der Gefriertrocknung Wasser das am häufigsten verwendete Lösungsmittel ist, beziehen sich darauf die nachfolgenden Betrachtungen.

2.2.5.1 Einfrieren

Schon das Einfrieren hat einen entscheidenden Einfluss auf den Gefriertrocknungsprozess sowie die Eigenschaften des Endproduktes. Flink konnte am Beispiel des Kaffees zeigen, dass die Einfrierbedingungen einen Einfluss auf die Farbe des

gefriergetrockneten Kaffees hatten. Dieses Beispiel weist auf die Bedeutung des Einfriervorgangs hin [20].

Der Einfrierprozess muss daher so gesteuert werden, dass der für eine bestimmte Produktqualität ermittelte, optimale Temperatur-Zeit-Verlauf gleichmäßig und reproduzierbar ist [66]. Zum Einfrieren muss eine Formulierung so weit abgekühlt werden, dass entweder Wasser und Feststoff vollständig auskristallisiert sind, oder Zonen von kristallinem Eis sich mit festen, amorphen Zonen abwechseln [54]. Ob eine Formulierung vollständig auskristallisiert, hängt von deren Zusammensetzung, den Eigenschaften der einzelnen Komponenten sowie von der Abkühlgeschwindigkeit und der Endtemperatur ab.

In der Praxis kommt es beim Einfrieren von Flüssigkeiten zur Unterkühlung [29, 50, 52, 54, 57, 66]. Aufgrund fehlender Kristallisationskeime wird der Kristallisationsprozess verzögert und Flüssigkeiten können bis weit unter den Gefrierpunkt abkühlen. Der Grad der Unterkühlung ist abhängig von den gelösten Stoffen, der Einfriermethode (Temperatur-Zeit-Verlauf), dem Behältnis und der Anwesenheit von partikulären Verunreinigungen, die als Kristallisationskeime für die Eisbildung dienen können. Die Unterkühlung beeinflusst die Gesamttrocknungszeit, die Struktur des späteren Lyophilisates und die Zeit, die benötigt wird, um dieses zu rehydratisieren [22].

Normalerweise ist eine gemäßigte Unterkühlung von 10 bis 15 °C erwünscht. Für gewöhnlich zeigen die in der Pharmazie häufig vorkommenden sterilen und partikelfreien Lösungen eine stärkere Unterkühlung. Wichtig ist, dass die Unterkühlung sowohl innerhalb eines Behältnisses als auch innerhalb einer Charge einheitlich ist [57]. In der Praxis ist das allerdings vor allem bei großen Anlagen nur schwer zu gewährleisten.

Bei Formulierungen, die vollständig auskristallisieren, kann es, abhängig von der Konzentration der Ausgangslösung und der Kühlrate, beim Abkühlen entweder zu einer Gefrierkonzentration oder zu Ausfällungen kommen.

Bei verdünnten Lösungen scheiden sich unterhalb von 0 °C zunächst reine Eiskristalle ab. Dabei erhöht sich die Konzentration der verbleibenden Lösung entsprechend (Gefrierkonzentration) [19, 35, 57] und ihr Gefrierpunkt sinkt [36, 75]. Dieser Effekt wird zum Beispiel in der Lebensmittelindustrie zum schonenden Aufkonzentrieren von Säften verwendet [35]. Der Gefrierkonzentrationseffekt ist umgekehrt proportional zur ursprünglichen Konzentration der ungefrorenen Lösung, das heißt,

je verdünnter die Ausgangslösung, umso größer wird der Konzentrierungsfaktor [19, 75].

Als Folge dieser Gefrierkonzentration kann sich die unmittelbare Umgebung eines Wirkstoffes so stark verändern, dass Abbaureaktionen bereits während des Einfrierens ausgelöst werden können. Bei wässrigen Proteinlösungen zum Beispiel können dabei örtlich hohe Salzkonzentrationen auftreten, die direkt oder indirekt durch pH-Verschiebung die Proteinstabilität negativ beeinflussen. Dieser Vorgang wird als Kältedenaturierung bezeichnet und kann zu Aggregation bzw. Inaktivierung führen [19].

Ist die Ausgangslösung dagegen hochkonzentriert, scheiden sich bei niedrigen Temperaturen zunächst Substanzkristalle ab (Ausfällung). Dabei sinkt die Lösungskonzentration und die Gefriertemperatur steigt.

In beiden beschriebenen Fällen kann es, durch unterschiedliche Löslichkeiten von beispielsweise Puffersalzen, zu signifikanten pH-Wert-Änderungen kommen. Beim Abkühlen eines Puffersystems aus Zitronensäure und Dinatriumphosphat zum Beispiel kristallisiert zuerst das Natriumsalz aus, was einen starken Abfall des pH-Wertes von pH 6 auf etwa pH 3,5 nach sich zieht [19]. Dieses Puffersystem würde daher Probleme bereiten, wenn es zusammen mit einer Substanz verwendet wird, die sich bei niedrigen pH-Werten rasch zersetzt, wie zum Beispiel Benzylpenicillin [57].

Im Zuge einer weiteren Abkühlung erreicht eine vollständig auskristallisierende Formulierung die eutektische Temperatur. Hier hat die verbleibende Lösung in beiden Fällen, unabhängig von der Konzentration der Ausgangslösung, die gleiche, definierte Konzentration und gefriert als Ganzes. Dabei trennt sich das System in Eis und Feststoffkristalle und bildet ein Kristallgemisch [66, 68].

Dies muss aber bei komplexen Lösungen oder Suspensionen nicht der Fall sein. Beim Einfrieren und der damit verbundenen Gefrierkonzentration kann sich aufgrund einer Übersättigung eine viskose Lösung oder Suspension bilden. Dort können Diffusionsvorgänge, die für die Kristallisation von Nöten sind, nur sehr langsam ablaufen. Deshalb kristallisiert dieses System, obwohl es thermodynamisch instabil ist, nicht aus, sondern erstarrt kinetisch als unterkühlte Flüssigkeit ohne vollständige Phasentrennung der Komponenten [33]. Man spricht hier vom so genannten Glasübergang, weil die gelösten Bestandteile dabei in einen glasartigen, starren Zustand übergehen. Dieser Glaszustand ist gekennzeichnet durch eine extrem hohe Viskosität, so dass

die Teilchenbewegung vernachlässigbar klein wird, und infolge dessen Reaktionen zwischen den Einzelkomponenten verhindert werden [19]. Die Glasübergangstemperatur, auch als Kollapstemperatur bezeichnet [66] entspricht der eutektischen Temperatur für vollständig kristallisierende Formulierungen. Sie kennzeichnet die Temperatur, ab der normalerweise von einem vollständig gefrorenen Produkt ausgegangen werden kann.

Widerstandsmessungen an dem gefrorenen Gut lassen jedoch darauf schließen, dass auch unterhalb dieser Temperaturen feinste Flüssigkeitstropfen im Eis erhalten bleiben. Erst wenn die Temperatur um etwa 20 °C unter die des eutektischen Punktes oder der Kollapstemperatur gesenkt worden ist, erstarren diese Flüssigkeitsnester. Auch von der Abkühlgeschwindigkeit hängt das Vorhandensein solcher Flüssigkeitsspuren ab. Hieraus ergibt sich die Forderung nach möglichst schnellem Einfrieren [36, 53] und nach einer Endtemperatur, die wesentlich unterhalb der eutektischen bzw. Kollapstemperatur liegt [36]. Die Endtemperatur des Eises beim Einfrieren liegt in der Praxis typischerweise um -40 °C [37, 57].

Das zu trocknende Gut muss letztlich vollständig durchgefroren sein, da es sonst während der Trocknung von den Flüssigkeitsnestern ausgehend zu Schaumbildung kommen kann. Dieser Effekt wird als „Frothing“ (engl. für „Schäumen“) bezeichnet [29]. Zum „Frothing“ kommt es ebenfalls, wenn das Material nach vollständigem Durchfrieren örtlich wieder antaut [36].

Ein wichtiges Kriterium beim Einfrieren ist die Einfriergeschwindigkeit, die mit Mitteln der Kältetechnik gesteuert wird [53]. Für die spätere Beschaffenheit des Gefriertrockengutes, insbesondere seiner Porosität, sind Kristallgröße und Kristallform des Eises entscheidend. Diese werden wie folgt durch die Einfrierbedingungen bestimmt:

Beim sehr langsamen Abkühlen kommt es zu einer deutlichen Unterkühlung der Lösung [40]. Setzt dann spontan die Kristallbildung ein, friert das Produkt sehr rasch durch. Als Folge bilden sich nur kleine Kristalle [66].

Auch bei einer sehr hohen Abkühlrate kommt es aufgrund einer ungleichmäßigen Unterkühlung des Produktes zu einer raschen Kristallisation. Es entstehen wiederum viele Kristallkeime, die zu kleinen Kristallen heranwachsen [66]. Diese Eiskristalle zeigen keine hexagonale Struktur sondern sind unregelmäßig und heterogen [50]. Zusätzlich führt die ungleichmäßige Unterkühlung mit Temperaturgradienten dazu, dass sich die Kristalle nicht nur in eine Richtung ausbilden, sondern sie in Form von

Nadeln oder dendritischen Gebilden in das Produkt hineinwachsen [86]. Die Entstehung amorpher, glasartiger Bereiche wird gefördert und die Gefrierkonzentration unterdrückt.

In beiden Fällen ist zu Beginn der Trocknung die Sublimationsrate noch hoch. Später aber stellt der bereits getrocknete, feinporige Teil des Trockengutes mit wenigen durchlässige Poren und Kanälen für den sublimierenden Wasserdampf einen immer größeren Widerstand dar. Die Prozesszeit verlängert sich. Ein solches Lyophilisat hat aufgrund der großen inneren Oberfläche allerdings eine hohe Lösungsgeschwindigkeit [37].

Bei mittleren Abkühlraten entstehen weitgehend homogene Eisstrukturen mit großen hexagonalen Kristallen. Das dadurch während der Trocknung entstehende großporige Lyophilisat stellt für den sublimierenden Wasserdampf nur einen geringen Widerstand dar. Somit können kurze Prozesszeiten erzielt werden [66].

Es ist festzuhalten, dass die Geschwindigkeit des Einfrierens erheblichen Einfluss auf die Qualität des Endproduktes nehmen kann. In Abhängigkeit vom Produkt oder dessen Zusammensetzung führen verschiedene Einfriergeschwindigkeiten zu unterschiedlichen Gefügen, welche die Qualität des getrockneten Kuchens bestimmen. Deshalb muss für jedes Produkt nicht nur die optimale Einfriertemperatur sondern auch die günstigste Einfriergeschwindigkeit ermittelt werden [2].

2.2.5.1.1 Einfriermethoden

Je nach Art des Produktes und späterem Verwendungszweck gibt es verschiedene Möglichkeiten eine Ausgangslösung einzufrieren.

Das Einfrieren kleiner Volumina in der Endverpackung, wie zum Beispiel Injectabilia in Vials, erfolgt häufig auf den temperierbaren Stellflächen innerhalb des Gefriertrockners. Diese Flächen werden von einem kalten Fluid durchströmt und so langsam abgekühlt. Durch Prozesssteuerung lassen sich reproduzierbare Temperatur-Zeit-Verläufe einstellen.

Bei der Herstellung gefriergetrockneter, schnelllöslicher Oralien (Zofran[®], Zydis[®]) in kontinuierlicher Arbeitsweise wird die Arzneistoffsuspension direkt in die Blisterverpackung dosiert. Die Blister durchlaufen dann einen Gefriertunnel, in den von oben flüssiger Stickstoff eingesprüht wird. Dieser verdampft sofort und erzeugt eine Atmosphäre von kaltem Gas. Bei diesen Bedingungen friert die Suspension in etwa 4 Minuten durch [39].

Sollen größere Volumina eingefroren werden, wächst mit zunehmender Höhe des Flüssigkeitsstandes in einem Gefäß die Schichtdicke des zu produzierenden Lyophilisates. Dies führt neben einer verlängerten Einfrierzeit auch zu einer deutlichen Verlängerung der Trocknungszeit. Daher wurden, neben dem gängigen Verfahren des Einfrierens und Trocknens in großflächigen Schalen für Ausgangs- oder Zwischenprodukte, Einfriermethoden für großvolumige flüssige Zubereitungen im Endbehältnis entwickelt. Bereits 1944 benutzte Greaves eine solche Methode, um dünne Eisschichten mit kleinen Eiskristallen zu erzeugen [24].

Dazu wird heute meist ein Kühlbad aus Alkohol, CO₂ oder flüssigem Stickstoff (Abb. 2-9) verwendet. Um zu vermeiden, dass Eiskristalle senkrecht zur Gefäßwand wachsen und sich somit Porenwände senkrecht zur Sublimationsrichtung des Wasserdampfes bilden (vgl. Abb. 4-48), werden die Flaschen im Bad gedreht. Dabei unterscheidet man schnelles, senkrecht drehen, so genanntes „spin-freezing“ und langsames, fast waagerechtes Rotieren, das „shell-freezing“. In beiden Fällen ist das Ziel, große Füllhöhen im Trockengefäß auf 15-20 mm Schichtdicken zu reduzieren [36, 54].

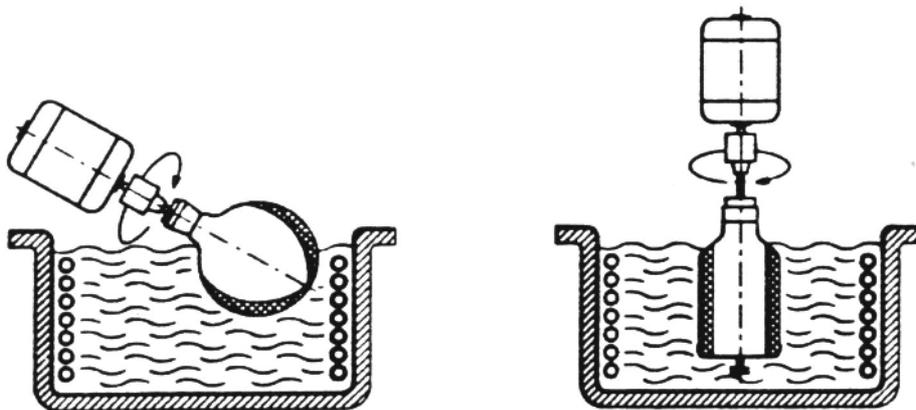


Abb. 2-9: Einfriermethoden für größere Volumina. Links: Shell-Freezing: Ein Kolben wird unter einem Winkel so in das Kühlbad getaucht, dass er bis zu seinem Hals mit der Kühlflüssigkeit bedeckt ist. Ein Motor dreht den Kolben, so dass das Produkt an der Kolbenwand anfriert. Rechts: Spin-Freezing: Eine oder mehrere Flaschen werden an einer Vorrichtung befestigt und in das Kühlbad eingetaucht. Die Vorrichtung dreht die Flasche(n) so schnell um ihre Achse(n), dass die Flüssigkeit sich gleichmäßig auf den zylindrischen Teil der Flasche(n) verteilt [54].

2 THEORETISCHER TEIL

Daneben gibt es das Verfahren des vakuuminduzierten Einfrierens (snap freezing) [27, 29, 33, 36, 54, 79]. Es eignet sich besonders für sehr geringe Flüssigkeitsmengen und dünne Schichten. Auf diese Methode wird in Kapitel 2.4 ausführlich eingegangen.

Die Verfahren der Haupt- und Nachtrocknung werden nachfolgend im Zusammenhang mit dem Aufbau und der Funktionsweise der Gefriertrocknungsanlage erläutert.

2.2.5.2 Aufbau der Gefriertrocknungsanlage (GT-Anlage)

Die Abb. 2-10 zeigt schematisch den Aufbau einer modernen Gefriertrocknungsanlage.

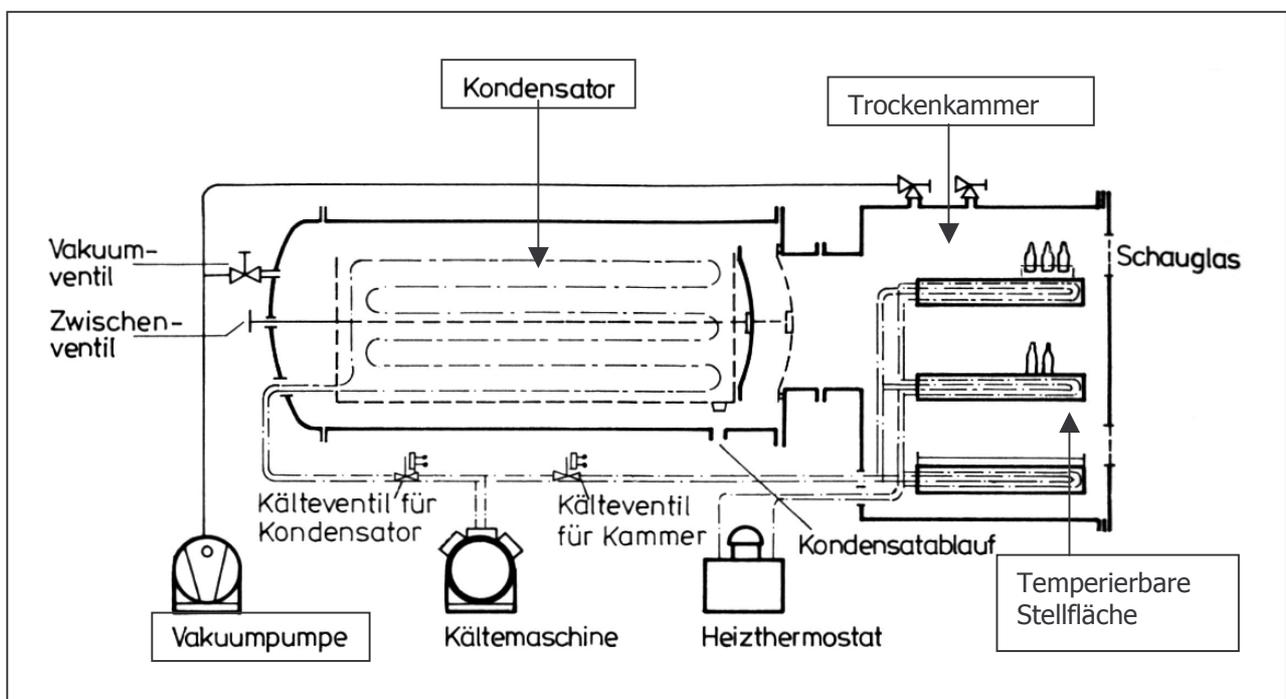


Abb. 2-10: Aufbau und Komponenten einer modernen Gefriertrocknungsanlage. Quelle: [37].

Näher betrachtet werden hier nur die Hauptkomponenten. Dies sind:

Die Trockenkammer

Ein geschlossener Raum, der evakuiert werden kann. Hier findet die Gefriertrocknung (gegebenenfalls auch das Einfrieren) statt.

Das Vakuumsystem

Hauptbestandteil ist eine Vakuumpumpe. Sie entfernt die nichtkondensierbaren Gase der Luft - hauptsächlich Stickstoff und Sauerstoff - um die Sublimation und Diffusion von Wasserdampf zu erleichtern.

Der Kondensator

Bei diesem handelt es sich um eine tiefgekühlte Fläche (-60 bis -80 °C). Der sublimierte Wasserdampf diffundiert zum Kondensator und schlägt sich dort als Eis nieder.

Die temperierbare Stellfläche

Sie hat primär die Aufgabe, die der Formulierung als Wärme entzogene Sublimationsenergie nachzuliefern. Außerdem kann hier das Produkt direkt eingefroren werden, wenn eine Kältemaschine im Anlagendesign integriert ist.

2.2.5.3 Funktionsweise der Komponenten und deren Aufgabe bei Primär- und Sekundärtrocknung

2.2.5.3.1 Das Vakuumsystem

Nach dem Phasendiagramm des Wassers (Abb. 2-11) findet Sublimation erst unterhalb des Tripelpunktes statt, d. h. unterhalb eines Druckes von 6,13 mbar (und unterhalb 0,0098 °C). Erst darunter ist der Phasenübergang von fest zu gasförmig möglich.

Zu beachten ist allerdings, dass der Wert 6,13 mbar den reinen Wasserdampfdruck (über Eis) und nicht den Gesamtdruck (Absolutdruck) darstellt [71]. Deshalb ist Gefriertrocknung auch bei Atmosphärendruck möglich [79]. Als Voraussetzung dafür muss die Luft jedoch sehr trocken sein, um einen Wasserdampfpartialdruck kleiner 6,13 mbar zu erreichen. Eine Verringerung des Gesamtdruckes hat somit keinen direkten Einfluss auf die Sublimation, trägt aber deutlich zur Beschleunigung des Prozesses bei, wie im Folgenden erläutert werden soll.

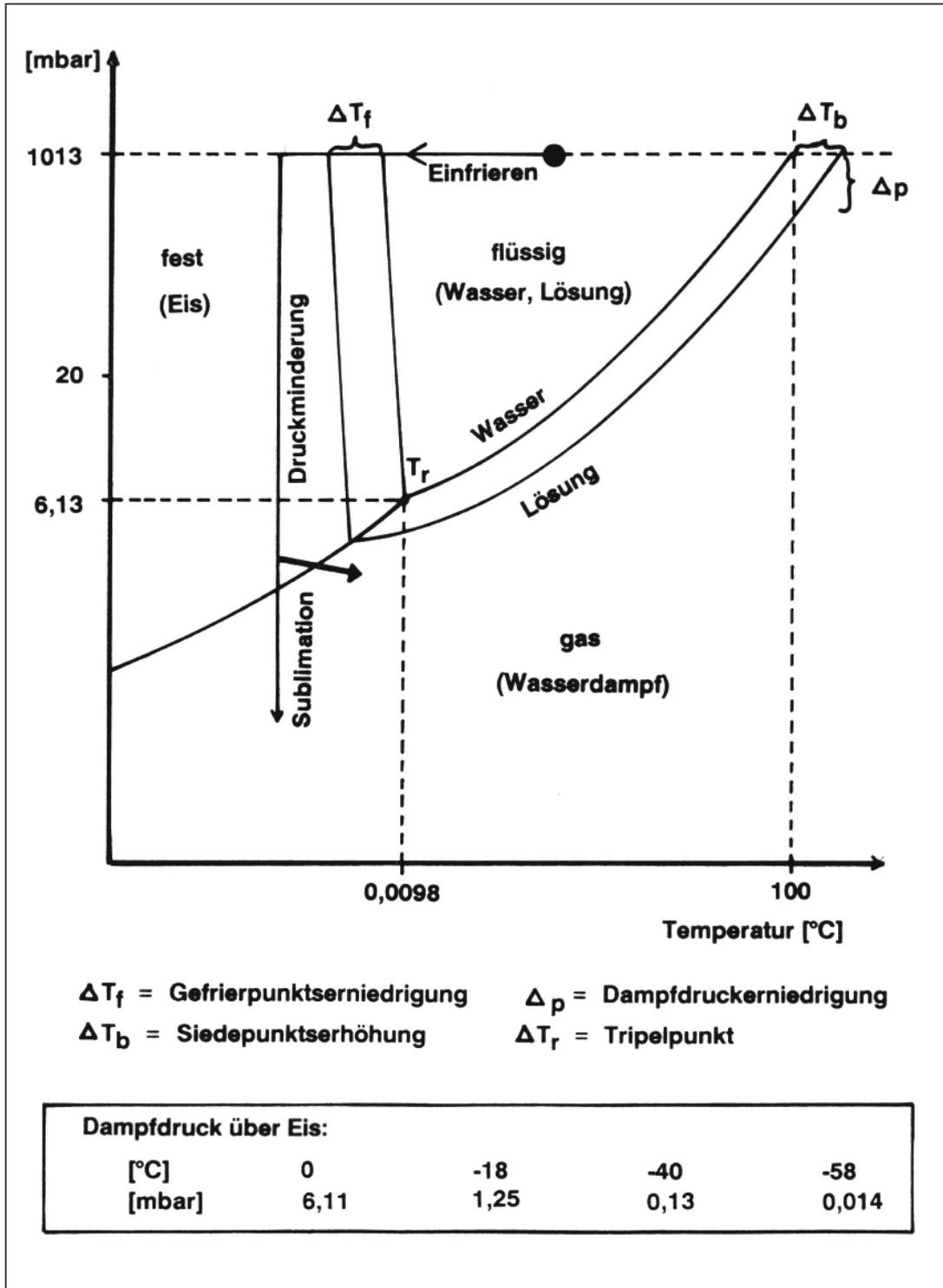


Abb. 2-11: Zustandsdiagramm des Wassers und einer wässrigen Lösung sowie Prozessschritte bei der Gefriertrocknung (nicht maßstäblich) [66].

Die Grenzfläche Eis / Gas bildet eine ungeordnete Oberflächenschicht, die auch als Übergangsregion bezeichnet wird (Abb. 2-12).

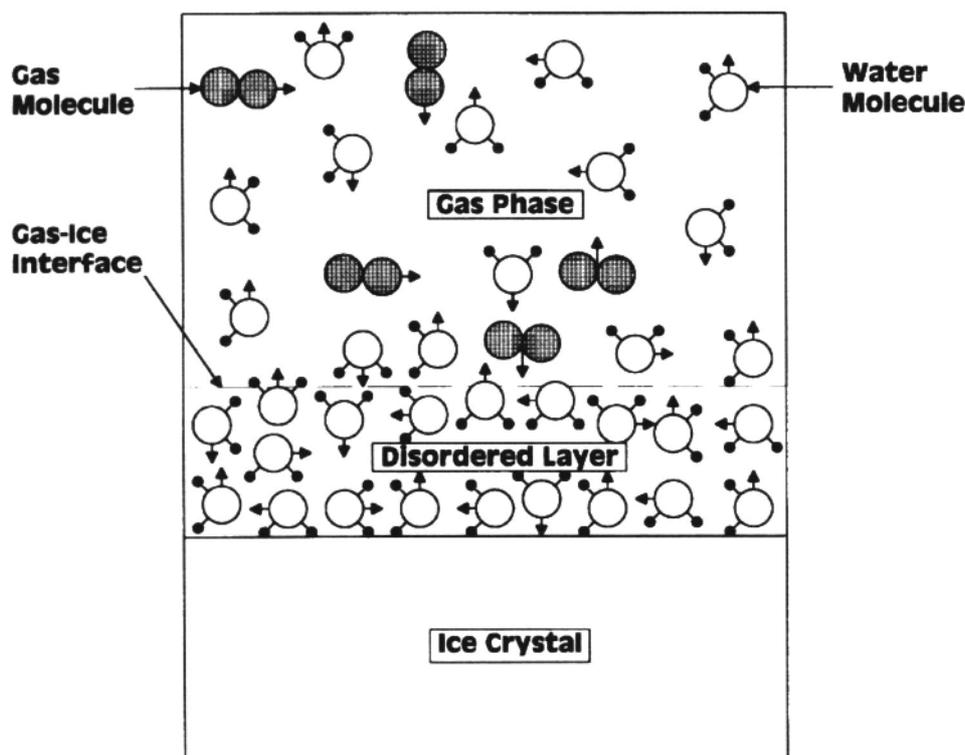


Abb. 2-12: Schematische Darstellung der ungeordneten Oberflächenschicht. Quelle: [29].

Dabei handelt es sich um ein System von Wassermolekülen ohne definierte Struktur, ähnlich dem flüssigen Zustand. Diese Schicht ist nur wenige Moleküle dick. Bei diesem Film handelt es sich um einen natürlichen Zustand von festem Eis, gebildet durch einen Prozess, der als Oberflächenschmelzen bezeichnet wird. Er birgt einige strukturelle Eigenschaften des Eises unterhalb der Schicht, hat aber die Mobilität einer Flüssigkeit [83].

Nähert man sich vom Kristallinneren der Oberfläche, wird das Molekülgerüst ungeordnet, da die äußersten Wassermoleküle in die unstrukturierte Umgebung der Gasphase hineinreichen. Diese Oberflächenmoleküle erfahren die geringsten chemischen Bindungskräfte im Kristallgerüst. Daher bewegen sie sich stärker als die eingebundenen Moleküle im Eisinneren, wenn sich die Temperatur erhöht. Bei einer ausreichend hohen Temperatur – jedoch immer noch unterhalb des normalen

Schmelzpunktes – beginnen die Moleküle in einem flüssigkeitsähnlichen Film zu fließen [83].

Wird der Druck über dieser Grenzschicht nun erniedrigt, verlassen Wassermoleküle, die ausreichend Energie und einen geeigneten Impulsvektor besitzen, diese Schicht und diffundieren in die Kammer. Einmal in der Gasphase, können diese Wassermoleküle mit den noch vorhandenen Gasmolekülen kollidieren und abgelenkt werden. Im ungünstigsten Fall kehren sie zur Grenzfläche zurück und kondensieren dort wieder. Die Häufigkeit dieser Kollisionen ist abhängig von der Anzahl Gasmoleküle in der Kammer, also vom Kammerdruck. Je weiter zudem der Kondensator von der Sublimationsfront entfernt ist, desto mehr Kollisionen finden statt und umso schwieriger ist es für ein Wassermolekül, zum Kondensator zu diffundieren. Die Sublimationsrate ist geringer. Da diese die Dauer des Trocknungsprozesses maßgeblich bestimmt, führt das zu längeren Prozesszeiten. Generell gilt, dass der Kammerdruck signifikant niedriger sein sollte als der Dampfdruck des Eises bei der Zieltemperatur des gefrorenen Produktes. Bei einer festgelegten Produkttemperatur führt jeder Kammerdruck größer als 0 mbar zu einer Verringerung der treibenden Kraft für die Sublimation und somit zu einer Verlängerung der Primärtrocknungsphase [57].

Um die Wasserdampfdiffusion zum Kondensator zu erleichtern, sollte die Vakuumpumpe den Kammerdruck während der Primär- und Sekundärtrocknung auf einen kleinstmöglichen Wert einstellen.

2.2.5.3.2 Der Kondensator

Eis hat, genau wie Wasser, einen Dampfdruck, der auch als Sättigungs- oder Gleichgewichtsdampfdruck bezeichnet wird. Er ist abhängig von der Temperatur und umso kleiner, je niedriger die Eistemperatur ist. Wenn der Dampfdruck der Wassermoleküle im Gasraum größer ist als der des Eises, dann kondensieren Wassermoleküle an der Eisoberfläche. Im umgekehrten Fall gibt das Eis Wassermoleküle an seine Umgebung ab, und zwar so lange, bis sich das System im Gleichgewicht befindet. Dieser Zustand ist erreicht, wenn pro Zeiteinheit genauso viele Wassermoleküle die Eisoberfläche verlassen wie wieder an ihr kondensieren. Solange dieser Gleichgewichtszustand nicht erreicht ist, sublimieren mehr Moleküle als zeitgleich an der Produktoberfläche kondensieren und die Primärtrocknung schreitet fort.

Die Aufgabe des Kondensators besteht nun darin, kontinuierlich die Wassermoleküle aus dem Gasraum zu kondensieren und als Eis abzuscheiden. Dadurch wird

2 THEORETISCHER TEIL

verhindert, dass sich der Gleichgewichtszustand einstellen kann und der Trocknungsprozess zum Erliegen kommt. Eine Vakuumpumpe ist zum Entfernen der anfallenden Menge Wassermoleküle ungeeignet, wie das folgende Beispiel zeigt:

Ein Mol Gas - also auch Wasserdampf - nimmt bei 0 °C und etwa 1000 mbar ein Volumen von 22,4 L ein.

Daraus ergibt sich für Wasser (Molekulargewicht: 18 g/mol), dass 1 g Wasserdampf bei 1000 mbar ein Volumen von 1,24 L einnimmt.

Nach dem allgemeinen Gasgesetz :

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

gilt für eine konstante Stoffmenge n und die Temperatur T:

$$P \cdot V = \text{konstant.}$$

Für 1 g Wasserdampf unter Atmosphärendruck errechnet sich $P \cdot V$ zu

$$\begin{aligned} & 1000 \text{ mbar} \cdot 1,24 \text{ L} \\ & = 100000 \text{ Pa} \cdot 0,00124 \text{ m}^3 \\ & = 124 \text{ J} \end{aligned}$$

Betrachtet man nun die Trockenkammer mit einem Prozessdruck von 1,0 mbar, so errechnet sich das Volumen von 1 g Wasserdampf zu:

$$\begin{aligned} V & = 124 \text{ J} / 100 \text{ Pa} \\ & = 1,24 \text{ m}^3 \\ & = 1240 \text{ L} \end{aligned}$$

Ein Gramm Wasserdampf nimmt bei 1,0 mbar also etwa ein Volumen von 1240 Litern ein [54, 66]. Somit ist es praktisch unmöglich, die bei gängigen Prozessdrücken anfallenden Wasserdampfvolumina mit den normalerweise verwendeten Vakuumpumpen zu entfernen. Das Prinzip der Wasserdampfkondensation an gekühlten Kondensatorflächen ist einfach und kostengünstig im Vergleich zu einer

mechanischen Pumpe, die derart große Dampfmengen entfernen könnte. Aber selbst wenn die Leistung der Pumpe ausreicht, gelangt zu viel Wasserdampf in die häufig verwendeten Drehschieberpumpen und kondensiert im Öl. Dadurch verschlechtern sich seine Schmiereigenschaften und die Pumpe wird auf Dauer zerstört.

2.2.5.3.2.1 Die Kondensatortemperatur

Eis erzeugt über seiner Oberfläche den der Eistemperatur zugehörigen Sättigungsdampfdruck. Zum Beispiel hat das gefrorene Produkt bei einer Temperatur von -20 °C einen Sättigungsdampfdruck von 1,04 mbar. Hat Eis am Kondensator eine Temperatur von -70 °C , entspricht diesem Wert ein Sättigungsdampfdruck von 0,0026 mbar. Aufgrund dieses herrschenden Druckgradienten erfolgt die Wasserdampfdiffusion in Richtung Kondensator sehr rasch und der Partialdruck über dem Produkt, und somit in der Kammer, ist immer kleiner als 1,04 mbar.

Die treibende Kraft sowohl für die Primär- als auch die Sekundärtrocknung ist diese Differenz zwischen dem Dampfdruck des gefrorenen Produktes und dem Dampfdruck des Eises am Kondensator [52]. Daher muss immer eine zumindest minimale Differenz zwischen diesen Dampfdrücken herrschen, sonst kommen Sublimation und Diffusion zum Erliegen [84].

Erhöht man die Kondensatortemperatur nun auf die Temperatur des gefrorenen Produktes (-20 °C), so kondensiert an den Kondensatorflächen im Vergleich zur sublimierten Menge immer weniger Wasserdampf. Der Wasserdampfpartialdruck in der Kammer steigt, bis er dem Sättigungsdampfdruck des Eises am Kondensator – also 1,04 mbar – entspricht. Die Sublimation kommt zum Erliegen, da die Druckdifferenz jetzt null ist.

Eine erhöhte Kondensatortemperatur bedingt einen geringen Druckgradienten und somit eine verlängerte Trockenzeit. Eine möglichst niedrige Kondensatortemperatur ist vorteilhaft. Kondensatoren in Industrieanlagen sind üblicherweise zwischen -50 und -90 °C kalt [50]. Auf jeden Fall muss die Kondensatortemperatur unter der Produkttemperatur liegen. Mit einer Temperaturdifferenz von mindestens 15 bis 20 °C ist ein ausreichender Wasserdampfentzug gesichert [9, 66].

Zusammenfassung

Um eine ausreichende Sublimationsrate zu erhalten, das heißt akzeptable Prozesszeiten, muss der Wasserdampfpartialdruck in der Kammer wesentlich niedriger als der Sättigungsdampfdruck des Produktes sein. Dazu muss aber auch die Kondensatortemperatur deutlich niedriger als die während der Trocknung angestrebte Eistemperatur des Produktes sein. Dann entfernt der Kondensator kontinuierlich den anfallenden Wasserdampf und hält somit dessen Partialdruck in der Trockenkammer niedrig.

Die Vakuumpumpe hat die Aufgabe, den Partialdruck der unkondensierbaren Gase in der Trockenkammer – hauptsächlich Stickstoff und Sauerstoff – soweit zu senken, dass ungehinderte Diffusion des Wasserdampfes von der Sublimationsfront zum Kondensator stattfinden kann. Erst dann erfolgen Sublimation und Diffusion ausreichend schnell.

2.2.5.3.3 Die temperierbare Stellfläche

Die Stellflächen eines Gefriertrockners können je nach vorliegendem Modell entweder nur geheizt oder sowohl geheizt als auch gekühlt [2] werden. Im Fall der kühlbaren Stellflächen ist es möglich, das Produkt direkt in der Trockenkammer einzufrieren. Die Abkühlrate (K/min), die Endtemperatur sowie der Temperatur-Zeitverlauf (z. B. in Intervallen) sind dabei meist steuerbar.

Da der Einfrierprozess bereits erläutert wurde (vgl. Kapitel 2.2.5.1), soll im Folgenden die Wichtigkeit der Wärmequelle beim Gefriertrocknen näher betrachtet werden:

Damit Eis sublimiert, ist eine Energiemenge von etwa 2800 Joule pro Gramm als Sublimationswärme aufzubringen [29, 50, 54, 57, 58]. Mit dieser Wärmemenge könnte die achtfache Masse flüssigen Wassers von 20 °C zum Sieden erhitzt werden [50]. Diese Energie wird dem gefrorenen Produkt beim Sublimationsprozess in Form von Wärme entzogen. Dadurch kühlt das Eis von der Sublimationsfront her ab und sein Sättigungsdampfdruck verringert sich entsprechend. Das geschieht so lange, bis der Wert des Kammerdrucks erreicht ist. Ohne zusätzliche Energiezufuhr, um den Prozess zu unterstützen, kommt die Sublimation hier zum Stillstand [37].

Um der Abkühlung des Eises entgegen zu wirken und dessen Temperatur von Beginn der Primärtrocknung an möglichst konstant zu halten, wird der Sublimationsfront durch Wärmeübertragung von der Stellfläche die benötigte Sublimationsenergie

zugeführt. Dadurch bildet sich im Produkt ein Temperaturgradient aus. Die höchste Temperatur herrscht am Boden des Produktcontainers, die tiefste an der Sublimationsfront.

Ziel ist es, einen ausreichenden Temperaturgradienten zu erreichen, um an der Sublimationsfront genau soviel Wärmeenergie zur Verfügung zu stellen, dass sich das Produkt während der Primärtrocknung nur geringfügig oder gar nicht erwärmt. Die zugeführte Wärmeenergie wird dann allein durch den Sublimationsprozess verbraucht.

Eine weitere Erhöhung der Stellflächentemperatur resultiert in einer Zunahme der Produkttemperatur und somit in einem höheren Sättigungsdampfdruck der Formulierung. Nail beschreibt, dass jede Steigerung der Eistemperatur um 50 °C ungefähr zu einem 75%igen Anstieg des Sättigungsdampfdrucks führt [52]. Bei gleich bleibendem Kammerdruck bedeutet dies eine größere Sublimationsrate [17, 57]. Damit verkürzt sich auch die Prozesszeit. Pikal zeigte, dass eine Erhöhung der Produkttemperatur um nur 1 °C die Primärtrocknungsphase um 13 % verkürzt [56], eine Erhöhung der Produkttemperatur um 5 °C kann die Trocknung sogar um den Faktor 2 verkürzen [34, 58]. Ein Ziel der Prozessentwicklung wird also sein, die Stellflächentemperatur so einzustellen, dass die Temperatur am Boden des Produktes immer möglichst knapp aber trotzdem sicher unterhalb der eutektischen oder Kollapstemperatur liegt [57, 68]. Normalerweise beträgt die Sicherheitsspanne zwischen 2 und 5 °C [57].

Kann der Kondensator die dann anfallende größere Wasserdampfmenge allerdings nicht mehr schnell genug entfernen, so führt die Erhöhung des Sättigungsdampfdrucks der Formulierung zu einer Erhöhung des Wasserdampfpartialdrucks in der Kammer. Damit wird die Druckdifferenz kleiner und die Sublimationsrate sinkt. Die Prozesszeit verlängert sich.

Es gibt somit eine optimale, möglichst hohe Stellflächentemperatur bei der das gefrorene Produkt nicht schmilzt und die Sublimationsrate unterhalb des Punktes liegt, an dem die Kapazität des Kondensators überschritten wird.

2.2.5.4 Energieübertragung im Vakuum

Für die Übertragung der Sublimationswärme von der Energiequelle zur Produktoberfläche gibt es verschiedene Möglichkeiten. Sie sind abhängig vom Kammerdruck, dem Material und der Form des Produktgefäßes sowie der Art der Energiequelle.

Bei der häufig angewendeten Gefriertrocknung in Glasvials auf beheizbaren Stellflächen kann die Wärmeübertragung durch Gaskonvektion zwischen dem Vial und seiner Umgebung, durch Wärmestrahlung und durch Wärmeleitung bei direktem Kontakt zwischen Stellfläche und Vial stattfinden (Abb. 2-13) [57, 66, 68].

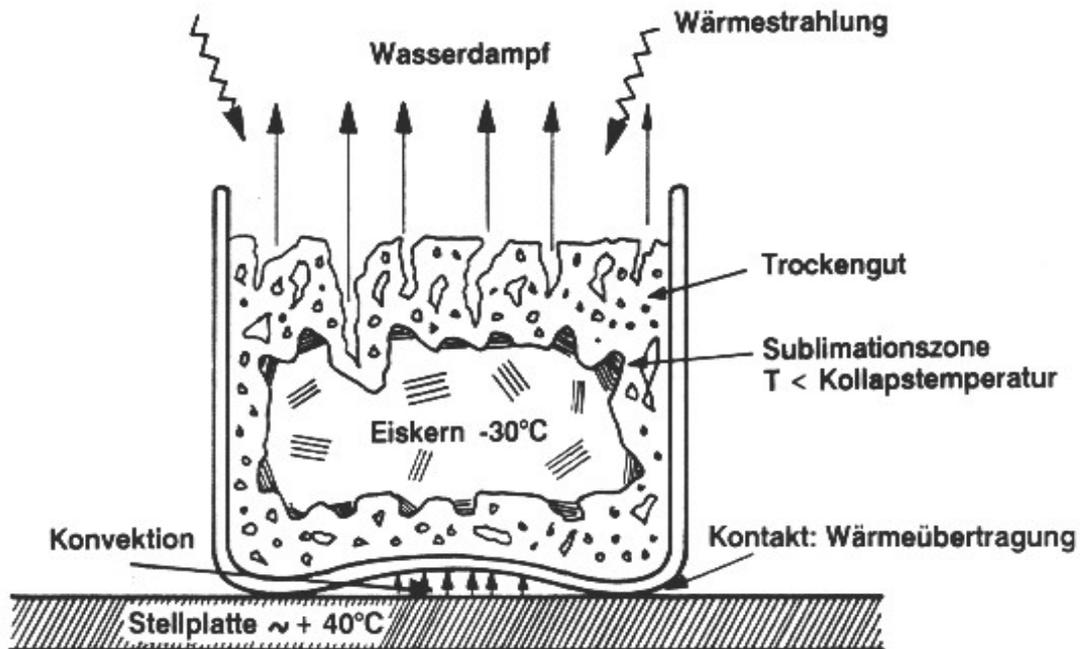


Abb. 2-13: Möglichkeiten der Wärmeübertragung in der Haupttrocknung [66].

Wärmeleitung und Konvektion stehen hier im Vordergrund, wobei der Wärmeleitung aufgrund der kleinen Kontaktfläche ein geringerer Effekt beigemessen wird. Durch den konkaven Vialboden befindet sich zwischen Stellfläche und Behältnis ein Gaspolster, über welches nur konvektiver Wärmetransport stattfinden kann (Abb. 2-13) [70].

Bei einem Kammerdruck unterhalb 0,1 mbar sinkt die Sublimationsrate stark ab. Dies überrascht zunächst, da ja bisher davon ausgegangen wurde, dass ein besseres Vakuum den Trocknungsprozess beschleunigt. Es überwiegt hier jedoch für den Gesamtprozess, dass die Wärmezufuhr zum Produkt durch Konvektion bei derart niedrigen Drücken vernachlässigbar klein wird [66]. Immer weniger Gasmoleküle stehen für den konvektiven Wärmetransport zu Verfügung. Im Bereich von 0,01 mbar kommt dieser sogar zum Erliegen [66]. Bei diesem Druck erfolgt Wärmeübertragung hauptsächlich durch Wärmestrahlung. Diese ist bei den gängigen Stellplattentemperaturen allerdings so minimal, dass sie einen geringen Effekt hat.

Brülls und Rasmuson beschreiben in einem theoretischen Modell für die Gefriertrocknung in Vials unter anderem den Einfluss der Wärmestrahlung bei verschiedenen Kammerdrücken und zeigen den Einfluss des Drucks auf den gesamten Wärmeübertragungskoeffizienten [4]. Sie zeigen, dass der relative Einfluss der Wärmestrahlung mit steigendem Kammerdruck logarithmisch abnimmt, während der Wärmeübertragungskoeffizient des Gesamtsystems proportional mit dem Kammerdruck ansteigt. In diesem Modell dominiert Wärmestrahlung bei sehr niedrigem Druck (0,05 mbar), Konvektion dagegen ab etwa 0,16 mbar aufwärts.

Nail untersuchte die Trocknungsrate in Abhängigkeit vom Kammerdruck bei Glasvials in einem Metallcontainer auf einer beheizbaren Stellfläche. Er gibt an, dass die Behinderung des Wärmetransportes durch die Gaspolster zwischen Vial und Metallcontainer bzw. Metallcontainer und Stellfläche bei niedrigem Kammerdruck signifikant wird. Die Ergebnisse zeigen, dass die Trocknungsrate mit besserem Vakuum immer geringer wurde [51].

Auch Pikal kommt zu dieser Erkenntnis. Die treibende Kraft für den Wasserdampftransport von der Sublimationsfront ist die Differenz zwischen dem Gleichgewichtswasserdampfdruck des Eises und dem Kammerdruck. Wird der Kammerdruck erhöht, so verringert sich zwar diese treibende Kraft, jedoch steigt der Wärmetransportkoeffizient des Glasvials. Dadurch wird bei gleich bleibender Stellflächentemperatur mehr Wärme zur Produktoberfläche transportiert. Es resultiert eine höhere Produkttemperatur mit einem höheren Sättigungsdampfdruck. Da der Effekt des steigenden Sättigungsdampfdrucks stärker ist als die Erhöhung des Kammerdrucks, wird die Druckdifferenz insgesamt größer und somit die treibende Kraft für die Sublimation ebenfalls. Mit höherem Kammerdruck wird demnach eine höhere Sublimationsrate erreicht [57].

Bei der Gefriertrocknung in Vials auf beheizbaren Stellflächen gilt daher, die Stellflächentemperatur und den Kammerdruck während der Primärtrocknung möglichst hoch einzustellen. In industriellen Gefriertrocknungsanlagen wird daher bei Bedarf gezielt Inertgas (z. B. Stickstoff) in die Trocknungskammer geleitet (sog. gas bleed system), um den konvektiven Wärmetransport zu verstärken [68, 71]. Dabei muss allerdings ein Kompromiss gefunden werden.

Einerseits sollen ausreichend viele Gasmoleküle in der Trockenkammer zu Verfügung stehen, damit der konvektive Wärmetransport ausreichend effizient ist. Andererseits soll die Diffusion von Wassermolekülen zum Kondensator nicht behindert

werden. Für die Trocknung von Produkten in Glasvials wird deshalb ein Kammerdruck von größer als 1 mbar angestrebt [66].

Soll dagegen die Wärmeübertragung durch einen reinen Wärmestrahler erfolgen, wird die größte Effizienz durch Anlegen eines möglichst hohen Vakuums erreicht [4]. Energieübertragung durch Wärmestrahlung findet erst unterhalb von 0,1 mbar Umgebungsdruck merklich statt. Die verbesserte Wasserdampfdiffusion bei diesen Prozessdrücken verringert zusätzlich die Trockenzeit.

Pikal et al. machten Gefriertrocknungsversuche mit sehr kleinen Proben in einem speziellen Probenhalter. Die Wärmezufuhr erfolgte hierbei nicht durch Wärmeleitung, sondern über Wärmestrahlung. Pikals Untersuchungen ergaben, dass niedrigere Kammerdrücke in diesem Fall die Sublimationsrate erhöhen [59].

Dolan untersuchte die Abhängigkeit der Sublimationsrate vom Kammerdruck unter Verwendung von Mikrowellenstrahlung. Diese hat den Vorteil in ihrer Wirkung unabhängig vom Druck bzw. Vakuum zu sein. Er trocknete Proben bei unterschiedlichem Kammerdruck, die er durch die Mikrowellenstrahlung jeweils annähernd auf der gleichen Temperatur hielt. Bei den Versuchen mit besserem Vakuum zeigte sich eine deutlich höhere Sublimationsrate und somit eine Verkürzung der Prozesszeit [17].

2.2.5.5 Die Produkttemperatur im Gefriertrocknungsprozess

Die Produkttemperatur spielt während des Gefriertrocknungsprozesses eine entscheidende Rolle. Im Folgenden soll gezeigt werden, warum auf eine kontinuierliche Erfassung nicht verzichtet werden sollte.

2.2.5.5.1 Das Einfrieren

Damit eine Formulierung einfrieren kann, muss die Temperatur der gesamten flüssigen Phase unter die eutektische oder Kollapstemperatur abgesenkt werden.

Der dafür notwendige Wärmeentzug wird zum Beispiel durch Abkühlen der Stellflächen erreicht. Da die Kontaktfläche zwischen der Stellplatte und dem Produkt in einem Gefäß häufig nur sehr klein ist, dauert es eine gewisse Zeit, bis die Formulierung diese Temperatur angenommen hat. Wird die Produkttemperatur nicht erfasst, muss ein experimentell ermitteltes Zeitintervall als Anhaltspunkt für die Annahme eines vollständig gefrorenen Produktes dienen. Dieses Zeitintervall ist abhängig von der Art des Gefäßes und dessen Füllvolumen und muss für jede Formulierung neu

ermittelt werden. Dagegen ist es durch Messung der Produkttemperatur auch ohne Vorversuche möglich, Abkühlrate, Unterkühlung und Einfrierzeitpunkt genau zu bestimmen. Diese zusätzlichen Informationen können bei der Aufklärung unterschiedlicher Eigenschaften und Strukturen des trockenen Produktes helfen.

2.2.5.5.2 Die Primärtrocknung

Bei der Primärtrocknung wird die Stellflächentemperatur so gewählt, dass die Sublimationsrate ausreichend hoch ist, aber die Produkttemperatur immer noch deutlich unterhalb der eutektischen oder Kollapstemperatur liegt. Da die Wärmezufuhr durch die Stellfläche von unten erfolgt und die Eisoberfläche durch Entzug der Sublimationsenergie permanent gekühlt wird, bildet sich ein Temperaturgradient aus. Die Temperaturmessung sollte also möglichst am Gefäßboden, dem Punkt der höchsten Eistemperatur, erfolgen. Liegt dort die Temperatur während der Primärtrocknung unterhalb der eutektischen oder Kollapstemperatur, kann von einem vollständig gefrorenen Produkt ausgegangen werden. Im Idealfall ist die Produkttemperatur direkt abhängig von der Stellflächentemperatur und dem Kammerdruck. Will man also eine vorgegebene Produkttemperatur beibehalten, so ist es nicht möglich, den Druck oder die Temperatur ohne eine kompensierende Veränderung des jeweils anderen Parameters zu variieren.

Die Erfassung der Produkttemperatur während der Primärtrocknung hat zwei wichtige Funktionen. Zum einen den Nachweis, dass die Produkttemperatur während der gesamten Primärtrocknung unterhalb der eutektischen oder Kollapstemperatur liegt. Zum anderen die kaum weniger wichtige Funktion nachzuweisen, dass für ein bestimmtes Intervall der Produkttemperatur auch die Temperatur jeder einzelnen Stellfläche und der Kammerdruck innerhalb ihrer vorgeschriebenen Grenzen liegen. Die direkte Abhängigkeit dieser drei Werte voneinander ermöglicht eine solche Kontrolle. Der Nachweis über die richtige Stellflächentemperatur und den Kammerdruck ist erbracht, wenn mindestens eine Produkttemperatur pro Stellfläche überprüft wird. Somit ist es möglich, sowohl die Richtigkeit der Druckmessung zu kontrollieren, als auch Abweichungen der Stellflächen- von der Solltemperatur zu erkennen, bevor solche Veränderungen die Qualität des Endproduktes nachteilig beeinflussen. Deshalb ist es im Sinne der Qualitätskontrolle essentiell darzulegen, dass die Produkttemperatur während der Primärtrocknung in den vorgeschriebenen Grenzen gehalten wurde. Eine indirekte Abschätzung der Produkttemperatur über den

Kammerdruck und die Stellflächentemperatur führt zu einem Unsicherheitsgrad bezüglich der Produktqualität [28].

2.2.5.5.3 Die Sekundärtrocknung

Die Haupttrocknung ist dann beendet, wenn das gesamte Eis sublimiert ist. Im Gut verbleiben danach zwischen 5 und 30 % des ursprünglich vorhandenen Wassers.

Die Sekundärtrocknung dient der Reduktion der Restfeuchte im getrockneten Produkt. Der Restwassergehalt ist hauptsächlich abhängig von den adsorptiven Eigenschaften des Lyophilisates. Daneben beeinflussen während der Sekundärtrocknung aber auch Lyophilisattemperatur, Partialdruck des Wasserdampfes über der Produktoberfläche und chemische Interaktionen zwischen der Formulierung und dem Wasserdampf das Restfeuchtegleichgewicht. Der Restfeuchtegehalt eines Lyophilisates kann reduziert werden durch

- eine Erhöhung der Produkttemperatur über die Stellflächentemperatur (bei konstantem Partialdruck des Wasserdampfes in der Kammer) oder
- eine Reduktion des Partialdruckes des Wasserdampfes über der Lyophilisatoberfläche (bei konstanter Produkttemperatur) durch eine entsprechend niedrigere Kondensatortemperatur.

Die Trocknungsrate bei der Sekundärtrocknung steigt deutlich mit einer Erhöhung der Produkttemperatur. Obwohl hohe Temperaturen während der Sekundärtrocknung normalerweise vermieden werden, um einen Abbau oder Aktivitätsverlust des Produktes während des Prozesses zu minimieren, führt die Einstellung einer hohen Stellflächentemperatur, um einen gewünschten Restfeuchtegehalt zu erreichen, nicht zwingend zu einer stärkeren Zersetzung als die Verwendung einer niedrigen Temperatur, welche in einer deutlich längeren thermischen Belastung resultiert [57]. Die Restfeuchte ist soweit zu erniedrigen, dass das Wachstum von Mikroorganismen und chemische Reaktionen vollständig unterbunden werden.

Der Endpunkt der Sekundärtrocknung, das heißt das Ende des Gefriertrocknungszyklus, wird beispielsweise dadurch bestimmt, dass die Produkttemperatur sich für ein bestimmtes Zeitintervall an die Stellflächentemperatur annähert.

Fazit

Bereits bei der Prozessentwicklung muss die Produkttemperatur kontinuierlich in jedem Verfahrensschritt erfasst werden, um die geeigneten Parametereinstellungen für einen schnellen und effizienten Gefriertrocknungszyklus experimentell zu ermitteln.

Auch bei der großtechnischen Produktion gibt es die verschiedensten Fehlerquellen, die zu einem qualitativ unzureichenden Produkt führen können. Ohne eine stichprobenartige Überwachung der Produkttemperatur während des gesamten Gefriertrocknungszyklus (Inprozesskontrolle) fehlen Daten, die wichtige Hinweise über die Fehlerursache geben können [85].

2.2.5.6 Erkennung des Endpunktes der Sublimationstrocknung

Die Primärtrocknung ist beendet, wenn das Eis vollständig aus den Produkten entfernt ist. Im nächsten Schritt wird die Temperatur der Heizquelle erhöht, um adsorbiertes Wasser schneller zu entfernen (Sekundärtrocknung). Geschieht dies, bevor das Eis vollständig entfernt wurde, riskiert man Kollaps oder eutektisches Schmelzen in den Produkten, die noch Restmengen an Eis enthalten. Zur Prozesskontrolle benötigt man daher eine Möglichkeit, den Endpunkt der Sublimationstrocknung zu erkennen.

- Temperaturmessung im Produkt

Die Messung der Produkttemperatur ist die am häufigsten angewendete Methode, um den Endpunkt der Primärtrocknung zu bestimmen [57].

Die Temperaturmessung erfolgt in den untersten Produktschichten bei der höchsten Eistemperatur. Da die Sublimationsfront von oben nach unten fortschreitet, zeigt der Temperaturfühler einen scharfen Anstieg der Produkttemperatur, sobald sich die Eisfront an ihm vorbeibewegt hat. Ist der Temperaturfühler am Boden des Produktes zentriert eingebracht, so ist der Temperaturanstieg annähernd mit dem Ende der Primärtrocknung gleichzusetzen. Pikal beschreibt, dass mit dem Anstieg der Produkttemperatur der gleichzeitig bestimmte Wasserverlust pro Zeiteinheit stark absinkt, aber nicht sofort auf Null fällt [57]. Dies weist auf das schnelle Entfernen nicht gefrorenen Wassers in der Anfangsphase der Sekundärtrocknung hin, kann aber zumindest teilweise auch die Sublimation von kleinen

Restmengen Eis anzeigen, welche nicht in direktem thermischen Kontakt zum Temperaturfühler stehen.

- Messung der Kondensatortemperatur

Die Erfassung des Temperaturverlaufes am Kondensator soll eine weitere Möglichkeit darstellen, den Endpunkt der Primärtrocknung zu ermitteln. Solange während der Primärtrocknung größere Mengen des sublimierten Wasserdampfes am Kondensator abgeschieden werden, kommt es aufgrund der freiwerdenden Kondensationswärme zu einem Temperaturanstieg am Kondensator [84]. Gegen Ende der Sublimationstrocknung wird die kondensierende Wasserdampfmenge immer geringer, was zu einem Abfall der Kondensatortemperatur führt.

- Komparative Druckmessung

Wird zur Druckmessung in der Trocknungskammer sowohl ein gasartabhängiges Wärmeleitfähigkeitsmanometer (Pirani-Röhre, auf Stickstoff kalibriert) als auch ein kapazitives, gasartunabhängiges Manometer verwendet, so wird die Anwesenheit von Wasserdampf durch eine Diskrepanz der Messwerte zwischen beiden Geräten detektiert. Zu Beginn der Sublimationstrocknung entstehen große Mengen Wasserdampf und die Pirani-Röhre zeigt gegenüber dem kapazitiven Druckmesser erhöhte Werte an, da Wasserdampf die doppelte spezifische Wärmeleitfähigkeit von Stickstoff hat. Am Ende der Primärtrocknung ist kaum noch Wasserdampf in der Trocknungskammer vorhanden, die Messwerte nähern sich einander an. So kann das Ende der Sublimationstrocknung ohne Wärmefühler im Trockengut festgestellt werden [33].

- Gefriertrocknungswaagen

Durch die Verwendung von Mikro-Waagen, die mit in die Trockenkammer eingebracht werden, kann zum Beispiel ein Vial während des Gefriertrocknungszyklus in definierten Intervallen angehoben, gewogen und der Gewichtsverlust als Funktion der Trocknungszeit aufgenommen werden. Dadurch ist eine eindeutige

Abgrenzung zwischen Sublimations- und Desorptionsphase im Trocknungsverlauf möglich [39].

- Druckanstiegstest / barometrische Temperaturmessung (BTM)

Trennt man die Trockenkammer während der Sublimationsphase für eine kurze Zeit mit einem Ventil vom Kondensator ab, steigt der Druck in der Kammer an, und zwar so lange, bis der Wasserdampfpartialdruck in der Kammer dem Gleichgewichtsdampfdruck des Eises entspricht. Ein nachlassender oder fehlender Druckanstieg zeigt das Ende der Primärtrocknung an. Zudem lässt sich aus einem Wasserdampf-Temperaturdiagramm für Eis der Gleichgewichtsdampfdruck in die entsprechende Eistemperatur umrechnen. Dies stellt eine weitere Möglichkeit dar, auf indirektem Weg und nicht invasiv die Produkttemperatur zu schätzen [54].

- Restfeuchtemessung durch Nahinfrarotspektroskopie (NIR) oder Gasanalyse

Während der Primärtrocknung lässt sich der noch vorhandene Restdruck in der evakuierten Trockenkammer nahezu vollständig auf den Dampfdruck der Wassermoleküle zurückführen. Wenn alles Eis aus dem Produkt sublimiert ist, sinkt der Partialdruck des Wassers stark ab. Dieser Punkt im Trocknungsprozess kann durch einen elektronischen Feuchtesensor, durch NIR oder mit Hilfe der Restgasanalyse detektiert werden [64].

2.2.5.7 Der kontrollierte Gefriertrocknungszyklus - ein Beispiel

Für eine Beispielformulierung mit einer Kollapstemperatur von -23 °C werden zunächst effiziente Prozessparameter ermittelt. Danach wird der Trocknungsverlauf anhand dieser Parameter erläutert.

Ermittlung der Prozessparameter

Produkttemperatur

Die Produkttemperatur soll unterhalb der eutektischen oder Kollapstemperatur liegen. Daher wird man hier für die Primärtrocknung unter Berücksichtigung der Sicherheitsspanne von 2-5 °C (vgl. Kapitel 2.2.5.3.3) eine Produkttemperatur von $-28\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ festlegen. In diesem Temperaturintervall kann bei ausreichend hoher Sublimationsrate von einem vollständig gefrorenen Produkt ausgegangen werden.

Kammerdruck und Stellflächentemperatur

Um bei Festlegung eines Kammerdrucks die Produkttemperatur im gewählten Intervall zu halten, muss die Stellflächentemperatur auf einen festgelegten, experimentell zu ermittelnden Wert eingestellt werden. Die Wahl des Kammerdrucks ist in gewissen Grenzen willkürlich. Die Obergrenze ist durch den Sättigungsdampfdruck des Eises bei Produkttemperatur (-28 °C) mit ca. 0,5 mbar vorgegeben. Prinzipiell jeder Kammerdruck unterhalb 0,5 mbar führt zu einer Sublimation des Eises. Die Untergrenze wird unter anderem durch die Wasserdampfkapazität des Kondensators festgelegt. Wird der Kammerdruck sehr tief gewählt, so ist eine sehr hohe Stellflächentemperatur notwendig, um die Produkttemperatur im festgelegten Intervall zu halten. Beides erhöht die Sublimationsrate stark. Kann der Kondensator die entstehenden Wasserdampfmengen nicht schnell genug aus der Trockenkammer entfernen, so kommt es zu einem unkontrollierten Anstieg des Kammerdrucks, der - bei gleich bleibender Stellflächentemperatur - zu einem unkontrollierten Anstieg der Produkttemperatur führt. Überschreitet diese die Kollapstemperatur von -23 °C , so resultiert daraus unweigerlich eine Qualitätsminderung des Produktes.

Daneben stellt die Porenstruktur des bereits getrockneten Lyophilisates für den sublimierenden Wasserdampf einen beträchtlichen Widerstand dar und kann bei zu hohen Sublimationsraten zu einer Zerstörung der Produktstruktur führen.

Für dieses Beispiel wird ein Vakuum von 0,1 mbar festgelegt. Daraus resultiert für die Stellflächentemperatur ein experimentell ermitteltes Intervall von $10\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Beschreibung des Gefriertrocknungszyklus über die Prozessparameter

Primärtrocknung

Der Zusammenhang zwischen Kammerdruck, Stellplatten- und Produkttemperatur, sowie der Sublimationsrate wird im Folgenden an einem hypothetischen Beispiel erläutert [29].

Eine Formulierung wurde in der Gefriertrocknungsanlage bei Atmosphärendruck eingefroren. Das gefrorene Produkt auf der Stellfläche und die Stellfläche selbst sowie das Gas in der Trockenkammer haben eine Temperatur von $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abb. 2-14). Ohne Wärmeübertragung geht die Sublimationsrate gegen null. Einige Wassermoleküle verlassen zwar die Eisoberfläche und diffundieren zum Kondensator, aber dieser Anteil ist verschwindend klein und Gefriertrocknung unter diesen Bedingungen praktisch unmöglich.

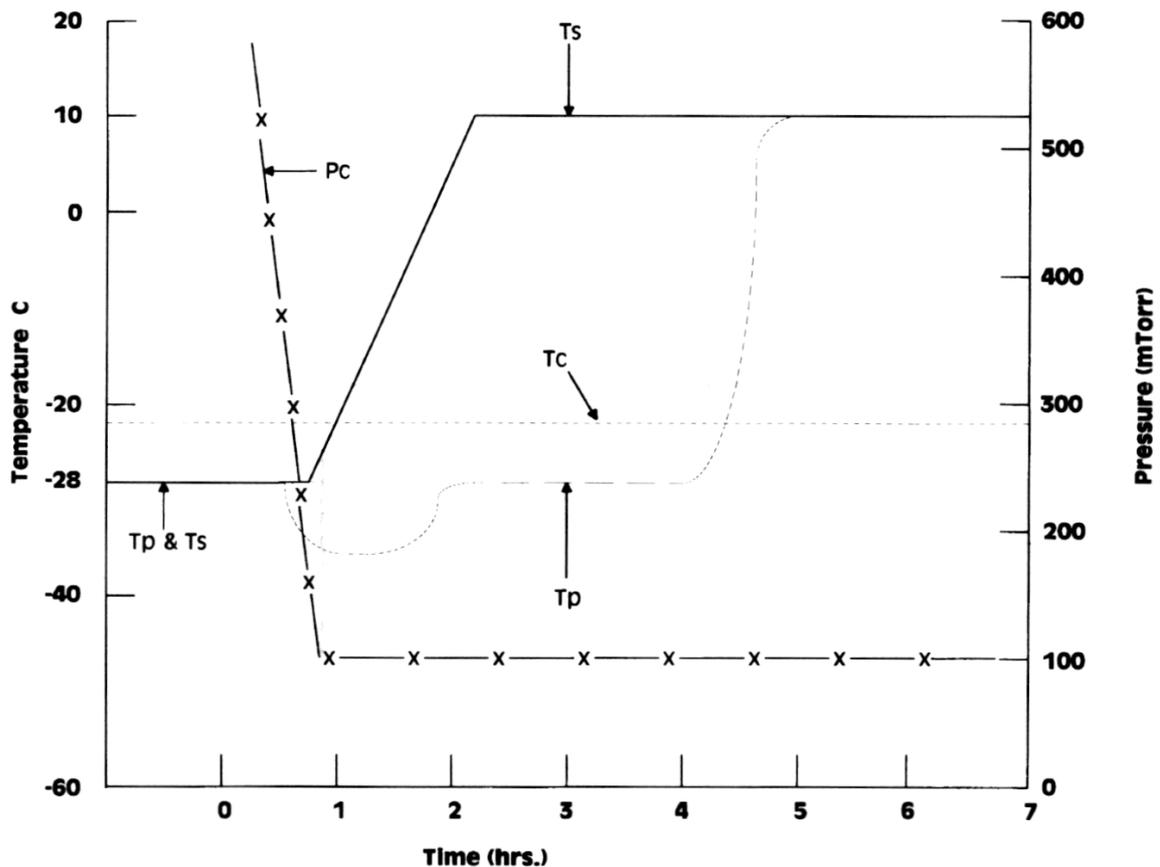


Abb. 2-14: Kontrollierter Gefriertrocknungsprozess (Primärtrocknung) einer Beispielformulierung [29]. Pc = Kammerdruck; Tc = Kollapstemperatur; Tp = Produkttemperatur; Ts = Stellflächentemperatur.

Nun wird die Kammer langsam bis zu einem Enddruck von etwa 0,1 mbar evakuiert. Sobald das Vakuum 0,5 mbar unterschreitet, setzt merklich die Sublimation ein [68]. Durch die benötigte Sublimationsenergie kommt es zu einem deutlich erkennbaren Absinken der Produkttemperatur.

Da eine Abkühlung des Produktes unter das gewünschte Temperaturintervall von $-28\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ weitestgehend vermieden werden soll, wird ab dem Unterschreiten von 0,5 mbar mit der Zufuhr der Sublimationswärme über die Stellfläche begonnen.

Dazu wird diese langsam auf die experimentell ermittelte Temperatur von $10\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ erwärmt. Nachdem sowohl das Endvakuum als auch die endgültige Stellflächentemperatur erreicht sind, stellt sich die Produkttemperatur im vorgeschriebenen Intervall ein. Jetzt werden Kammerdruck und Stellflächentemperatur konstant gehalten. Unter diesen Bedingungen bleibt die Produkttemperatur im vorgeschriebenen Intervall, bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Eisfront den Punkt der Temperaturmessung passiert hat. Nach einer Prozesszeit von etwa 4,5 Stunden beginnt sich die Temperatur des Lyophilisates zu erhöhen. Die Primärtrocknung gilt als beendet, wenn sich die Produkttemperatur für etwa zwei Stunden an die Stellflächentemperatur angenähert hat.

Sekundärtrocknung

Der Restfeuchtegehalt des Lyophilisates kann entweder durch eine Erhöhung der Stellflächentemperatur oder durch Reduktion des Wasserdampfpartialdruckes in der Trockenkammer, das heißt eine niedrigere Kondensatortemperatur, verringert werden. Die Produkttemperatur für die Sekundärtrocknung wurde für dieses Beispiel auf 20 °C festgelegt, um eine Stabilitätsbeeinflussung durch zu hohe Temperaturen zu vermeiden. Der Kammerdruck wurde bei etwa 0,1 mbar belassen. Da die Produkttemperatur am Ende der Primärtrocknung annähernd 10 °C beträgt (siehe Abb. 2-14), muss die Stellflächentemperatur nur um weitere 10 °C erhöht werden, um dem Produkt die notwendige Energie zuzuführen, die zur Entfernung des adsorbierten Wassers bis zu einer gewünschten Restfeuchte benötigt wird.

Aufgrund der schlechteren Wärmeleitung der trockenen, porösen Struktur erreicht das Produkt erst zu einem etwas späteren Zeitpunkt die angestrebte Temperatur von 20 °C . Auf dieser Temperatur wird es 5 Stunden belassen, bis sich der gewünschte Restfeuchtegehalt eingestellt hat. Nach insgesamt etwa 12 Stunden ist der Gefriertrocknungszyklus beendet.

2.3 Die mittlere freie Weglänge (MFW)

Unter der mittleren freien Weglänge versteht man den Weg, den ein Gasmolekül im Mittel zurücklegt, ohne mit einem weiteren Molekül im Gasraum zu kollidieren [29]. Die Anzahl solcher Kollisionen eines Wassermoleküls auf dem Weg von der Sublimationsfront zum Kondensator bestimmt maßgeblich die Trockenzeit (vgl. Kapitel 2.2.5.3.1). Daher sollte die mittlere freie Weglänge idealerweise von gleicher Größenordnung sein wie der Abstand von Trockengut und Kondensatoroberfläche.

Zur Vereinfachung der Berechnung des MFW wird angenommen, dass nur eines der Gasmoleküle in einem geschlossenen System in Bewegung ist. Der Rest der Gasmoleküle bleibt in einer fixen Position, so dass die Dichte des Gases konstant bleibt. Außerdem wird vereinfacht davon ausgegangen, dass alle Gasmoleküle denselben Durchmesser d haben.

Das eine freibewegliche Gasmolekül hat eine Geschwindigkeit \vec{v} und durchsetzt ein Volumen V_t pro Zeiteinheit. Dabei kollidiert es mit jedem weiteren Molekül, dessen Mittelpunkt sich im Abstand d von seinem eigenen Zentrum auf seiner Flugbahn befindet (Abb. 2-15).

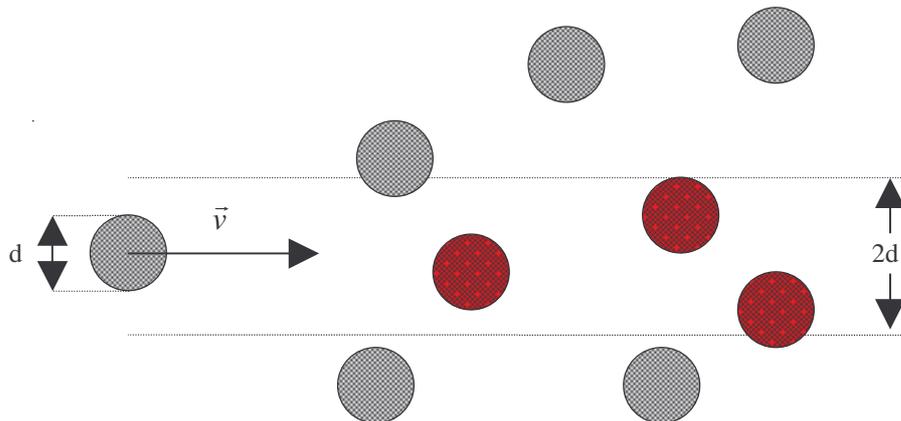


Abb. 2-15: Kollisionen von Gaspartikeln in einem System, in dem nur ein Gaspartikel frei beweglich ist. Die übrigen Partikel haben feste Positionen.

2 THEORETISCHER TEIL

Das durchsetzte Volumen V_t pro Zeiteinheit errechnet sich nach der Formel für ein Zylindervolumen (1) [29]:

$$V_t = \pi \cdot d^2 \cdot \bar{v} \left[\frac{m^3}{sec} \right] \quad (1) \quad \left(\bar{v} = \frac{s_m}{t} \right)$$

d = Durchmesser der Gasmoleküle [m]

\bar{v} = Geschwindigkeit des beweglichen Gasmoleküls [m/sec]

s_m = zurückgelegte Strecke [m]

t = für die Strecke s_m benötigte Zeit [sec]

Mit V_t lässt sich nun die Anzahl der Gas-Gas-Kollisionen pro Zeiteinheit berechnen, in die das eine freibewegliche Gasmolekül verwickelt ist. Bei bekannter Gastemperatur T_g , in diesem Fall die zum Kammerdruck nach der Dampfdruckkurve des Eises zugehörige Temperatur, und bekanntem Kammerdruck, lässt sich über das allgemeine Gasgesetz (2) die Anzahl der Gasmoleküle berechnen, die sich im Volumen V_t aufhalten. Deren Anzahl ist gleich der Anzahl der Kollisionen.

Allgemeines Gasgesetz:

$$P_c \cdot V_t = n \cdot R \cdot T_g \quad (2)$$

P_c = Kammerdruck [N/m²]

V_t = durchsetztes Volumen [m³]

n = Stoffmenge des Gases [mol]

R = allgemeine Gaskonstante [J/mol K]

T_g = Gastemperatur [°C]

Um die Anzahl an Gasmolekülen zu erhalten, muss die Avogadrokonstante N_A [mol⁻¹] in die Gleichung (2) eingeführt werden. Dazu werden beide Seiten mit dieser multipliziert (3).

$$N_A \cdot P_c \cdot V_t = n \cdot N_A \cdot R \cdot T_g \quad (3)$$

2 THEORETISCHER TEIL

Jetzt setzt man $n \cdot N_A = z$, welches der Anzahl der Partner entspricht, mit denen das Molekül kollidiert.

Aus (3) ergibt sich:

$$z = \frac{N_A \cdot P_c \cdot V_t}{R \cdot T_g} \quad (4)$$

Zur Vereinfachung wird nun die Boltzmann-Konstante k in Gleichung (4) eingeführt:

mit $\frac{R}{N_A} = k$ [J/K] ergibt sich:

$$z = \frac{P_c \cdot V_t}{k \cdot T_g} \quad (5)$$

Jetzt wird (1) in (5) eingesetzt:

$$z = \frac{P_c \cdot \pi \cdot d^2 \cdot \vec{v}}{k \cdot T_g} \quad \left[\frac{m^2 \cdot m \cdot N \cdot K}{K \cdot s \cdot m^2 \cdot J} \right] \quad (6) \quad \text{mit } N \cdot m = J : \quad \left[\frac{1}{s} \right] \equiv \left[\frac{\text{Kollisionen}}{\text{Zeit}} \right]$$

Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang, indem aus der Zeit t über die Geschwindigkeit \vec{v} die in dieser Zeit zurückgelegte Strecke s_m berechnet wird.

$$z = \frac{1}{t} \Rightarrow t = \frac{1}{z} \quad \text{mit } \vec{v} = \frac{s_m}{t} \quad \text{ergibt sich} \quad s_m = \frac{\vec{v}}{z}$$

2 THEORETISCHER TEIL

Die MFW oder die durchschnittliche Distanz zwischen zwei Gas-Gas-Kollisionen errechnet sich nun nach:

$$MFW = \frac{\bar{v}}{z} = \frac{k \cdot T_g}{\pi \cdot d^2 \cdot P_c} \quad \left[\frac{J \cdot K \cdot m^2}{K \cdot m^2 \cdot N} \right] \quad (7) \quad \text{mit } J = N \cdot m : \quad \left[\frac{m}{1} \right] \equiv \left[\frac{\text{Distanz}}{\text{Kollision}} \right]$$

In den Gefriertrocknungsversuchen soll mit Prozessdrücken unterhalb 0,03 mbar gearbeitet werden. Deshalb wird als Beispiel die MFW für diesen Druck berechnet. Nach der Dampfdruckkurve des Eises entspricht 0,03 mbar einer Eistemperatur von -52 °C [54]. Für die Gasphase wird deshalb hier diese Temperatur angenommen.

Einsetzen:

$$k = 1,3807 \cdot 10^{-23} \text{ [J/K] [8]}$$

$$T_g = -52 \text{ [°C]} = 221,15 \text{ [K]}$$

$$d = \text{Wirkungsquerschnitt von } H_2O \text{ - Gasmolekülen: } 3,7 \cdot 10^{-10} \text{ [m] [43]}$$

$$P_c = 0,03 \text{ [mbar]} = 3 \text{ [Pa]} = 3 \text{ [N/m}^2\text{]}$$

$$MFW = \frac{1,3807 \cdot 10^{-23} \cdot 221,15}{\pi \cdot (3,7 \cdot 10^{-10})^2 \cdot 3} \text{ [m]}$$

$$MFW = 2,37 \cdot 10^{-3} \text{ m} = \underline{\underline{2,37 \text{ mm}}}$$

Idealerweise liegt die Distanz zwischen Produktoberfläche und Kondensator also im Bereich von wenigen Millimetern.

2.4 Vakuuminduziertes Einfrieren

Beim vakuuminduzierten Einfrieren erreicht man die zum Einfrieren notwendige Wärmeabgabe der wässrigen Formulierung durch das Verdampfen eines Anteils des Lösungsmittels. Dies wird durch schnelles Evakuieren der Trockenkammer erreicht. Eine Energiebilanz soll darlegen, wie viel Prozent des Lösungsmittels verdampfen müssen, um die Formulierung bei gegebenen Prozessbedingungen durchfrieren zu lassen.

I. Zum Einfrieren abzuführende Wärmemenge / Energiemenge bei vorgegebener Anfangs- und gewünschter Endtemperatur:

Aufgrund des geringen Feststoffgehaltes der Formulierungen (< 2 %) kann dieser in erster Näherung vernachlässigt werden.

Zur Berechnung kann folgende Gleichung (1) herangezogen werden [54]:

$$(1) \quad Q_{ges} / W_{ges} = c_w \cdot (T_1 - T_0) + Q_e + c_e \cdot (T_0 - T_2) \quad \left[\frac{J}{g} \right]$$

Q_{ges} / W_{ges} = Wärmemenge / Energiemenge [J/g]

c_w = spezifische Wärme von Wasser zwischen +20 °C und -10 °C: $\approx 4,19$ [J/(g • K)]

Q_e = Schmelzwärme von Eis: 60131 [J / mol] $\cong 334$ [J / g]

c_e = spezifische Wärme von Eis, temperaturabhängig [J/(g • K)]

T_0 = Gefriertemperatur des Wassers: 0 °C *

T_1 = Anfangstemperatur des Wassers: +20 °C (Raumtemperatur)

T_2 = Endtemperatur des Eises: 0 °C

Da hier nur die Wärmeabgabe bis zum Einfrieren berücksichtigt werden soll, ist die Endtemperatur des Eises identisch mit der Gefriertemperatur des Wassers. Dadurch vereinfacht sich Gleichung (1) wie folgt:

$$(2) \quad Q_{ges} / W_{ges} = c_w \cdot (T_1 - T_0) + Q_e \quad \left[\frac{J}{g} \right]$$

* Da in der Pharmazie häufig sterilfiltrierte Lösungen verwendet werden, kommt es beim Einfrierprozess zu einer deutlichen Unterkühlung der Lösung. Diese Unterkühlung muss energetisch mit berücksichtigt werden. Im Folgenden wird eine Unterkühlung von 10 K angenommen. Nach dem Einsetzen des Kristallisationsprozesses steigt die Eistemperatur dann wieder auf 0 °C an. Deshalb kann trotzdem mit der vereinfachten Gleichung (2) gerechnet werden.

Durch Einsetzen der Werte ergibt sich:

$$Q_{ges} / W_{ges} = 4,19 \cdot (20 + 10) + 334 \quad \left[\frac{J \cdot K}{g \cdot K} + \frac{J}{g} \right]$$

$$Q_{ges} / W_{ges} = \underline{459,7} \quad \left[\frac{J}{g} \right]$$

Diese Energiemenge pro Gramm muss der wässrigen Lösung von +20 °C entzogen werden, um diese, bei einer angenommenen Unterkühlung von 10 K, vollständig durchzufrieren. Beim schnellen Evakuieren der Trockenkammer verdampft ein Teil des Lösungsmittels. Die dazu benötigte Verdampfungsenergie wird der flüssigen Formulierung entzogen, bis diese vollständig durchgefroren ist.

II. Zum Verdampfen benötigte Wärmemenge / Energiemenge:

Dampf ist der infolge Temperatur- (und Druck-) Einfluss in den Gaszustand übergegangene Anteil einer bei Raumtemperatur flüssigen oder festen Substanz. Die Beziehung zwischen Dampfdruck und absoluter Temperatur einer Flüssigkeit ist durch die Clausius-Clapeyronsche Gleichung (3) gegeben:

$$(3) \quad \log \frac{P_1}{P_2} = \frac{\Delta H_v \cdot (T_2 - T_1)}{2,303 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2}$$

$P_1; P_2$: Dampfdrücke [mbar] bei den Temperaturen $T_1; T_2$ [K]

ΔH_v : molare Verdampfungswärme [J/mol], das heißt die Wärmemenge, die nötig ist, um 1 mol Flüssigkeit zu verdampfen.

R : allgemeine Gaskonstante [J/mol K]

Durch Auflösen der Clausius-Clapeyronschen Gleichung (3) nach ΔH_v ergibt sich (4):

$$(4) \quad \Delta H_v = \frac{\log \frac{P_1}{P_2} \cdot (2,303 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2)}{(T_2 - T_1)} \quad \left[\frac{J}{mol} \right]$$

Mit dieser Gleichung (4) lässt sich aus den Dampfdrücken bei zwei verschiedenen Temperaturen ein Durchschnittswert für ΔH_v berechnen. Im Fall des vakuuminduzierten Einfrierens wird angenommen, dass die Ausgangstemperatur der wässrigen Lösung +20 °C (Raumtemperatur) beträgt. Durch Unterkühlung kann sich die Flüssigkeit bis deutlich unter den Gefrierpunkt abkühlen, ohne zu gefrieren. Im Folgenden wird eine Endtemperatur von -10 °C angenommen.

2 THEORETISCHER TEIL

Die Ausgangs- und Endtemperatur [°C] werden in ihre absoluten Werte [K] überführt und der zugehörige Dampfdruck ermittelt [81]:

$$T_2 = +20 \text{ °C} \equiv 293 \text{ K} \quad \rightarrow \quad P_2 = 23,38 \text{ mbar}$$

$$T_1 = -10 \text{ °C} \equiv 263 \text{ K} \quad \rightarrow \quad P_1 = 2,597 \text{ mbar}$$

Allgemeine Gaskonstante: $R = 8,314 \text{ [J/mol}\cdot\text{K]}$

Einsetzen der Werte in Gleichung (4) ergibt:

$$\Delta H_v = \frac{\log \frac{23,38}{2,597} \cdot (2,303 \cdot 8,314 \cdot 263 \cdot 293)}{(293 - 263)} \left[\frac{\text{mbar} \cdot \text{J} \cdot \text{K}^2}{\text{mbar} \cdot \text{mol} \cdot \text{K}} \right] \frac{1}{\text{K}}$$

$$\Delta H_v = \frac{\log 9 \cdot 1,475 \cdot 10^6}{30} = \underline{\underline{46931}} \left[\frac{\text{J}}{\text{mol}} \right]$$

Zur Berechnung der Verdampfungswärme pro Gramm Lösungsmittel benötigt man dessen Molmasse:

Molmasse von Wasser: 18 [g/mol]

$$\Delta H_v = \frac{46931}{18} \left[\frac{\text{J} \cdot \text{mol}}{\text{mol} \cdot \text{g}} \right] = \underline{\underline{2607}} \left[\frac{\text{J}}{\text{g}} \right]$$

Dies ist die gemittelte Verdampfungswärme, die bei Wasser zwischen +20 °C und -10 °C aufzubringen ist, um 1 g in die Gasphase zu überführen.

Um bei den gegebenen Bedingungen ein Gramm der Lösung einzufrieren, müssen 459,7 J Wärmeenergie abgeführt werden. Beim vakuuminduzierten Verdampfen werden allerdings 2607 J pro Gramm verbraucht. Im Folgenden wird berechnet, wie viel Prozent x des Lösungsmittels verdampfen, bis die Lösung eingefroren ist:

$$(5) \quad x = \frac{W_{ges}}{\Delta H_v} \cdot 100 \text{ [\%]}$$

$$x = \frac{459,7}{2607} \cdot 100 \left[\frac{J \cdot g}{J \cdot g} \right] = \underline{17,7 \text{ [\%]}}$$

Die Methode des vakuuminduzierten Einfrierens wird normalerweise technisch nicht verwendet, da zum einen nur die Produktoberfläche (3-4 mm) eingefroren wird, zum anderen kommt es dabei zu einer Volumenreduktion des Ausgangsmaterials [29, 54]. Im Falle der OLCS ließ sich diese Methode allerdings zum vollständigen Durchfrieren der Einzeltropfen verwenden, da diese im Schnitt nur einen Durchmesser von 3-4 mm hatten.

Abb. 2-16 zeigt einen gefrieretrockneten Tropfen nach Einfrieren unter Atmosphärendruck. In Abb. 2-17 ist ein Lyophilisat nach vakuuminduziertem Einfrieren abgebildet. Eine vergleichende Bestimmung des Tropfendurchmessers wurde durchgeführt und daraus das Volumen einer entsprechenden Kugel berechnet. Aus der Volumendifferenz lässt sich auf den Wasserverlust beim vakuuminduzierten Einfrieren schließen.

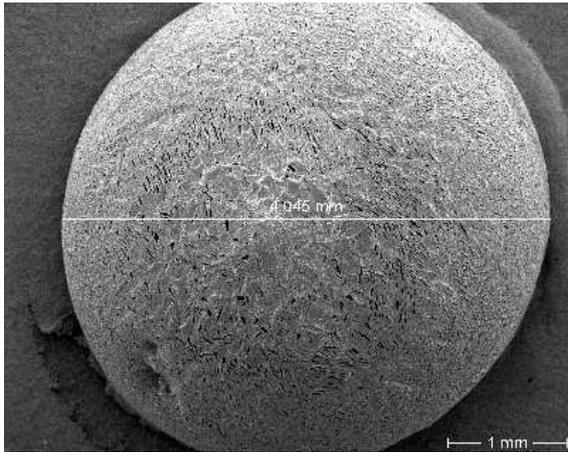


Abb. 2-16: Oberfläche eines bei Atmosphärendruck eingefrorenen Lyophilisates. Durchmesser d1: ~4,0 mm.

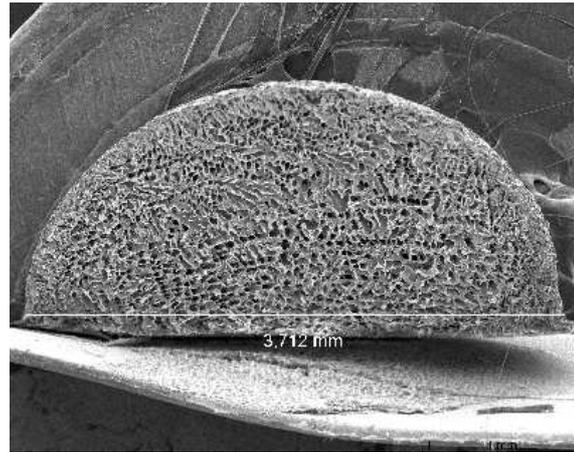


Abb. 2-17: Vertikalschnitt eines vakuuminduziert eingefrorenen Lyophilisates. Durchmesser d2: ~3,7 mm.

Durchmesser bei normalem Einfrieren d1:	~ 4,0 mm
Durchmesser bei vakuuminduziertem Einfrieren d2:	~ 3,7 mm
Volumen einer Kugel mit Durchmesser d1:	33,5 mm ³
Volumen einer Kugel mit Durchmesser d2:	26,5 mm ³
Volumendifferenz:	7 mm ³ = ~21 %

Nach Oetjen muss man in der Praxis beim vakuuminduzierten Einfrieren mit etwa 15 - 20 % Wasserverlust rechnen. Für das vakuuminduzierte Einfrieren der OLCS wurde diese Aussage experimentell bestätigt [54].

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien

Das Applikationssystem OLCS besteht aus vier Teilen:

- a. Hydrophobe Trägerfolie,
auf welcher das wirkstoffhaltige Polymerlyophilisat haftet.
- b. Handgriff,
aus Autoklavierklebeband zur besseren Handhabbarkeit der Trägerfolie.
- c. Hydrophiles Polymergerüst,
welches durch Lyophilisation hergestellt wird und in das der Arzneistoff molekulardispers oder suspendiert eingebettet ist.
- d. Ein oder mehrere Wirkstoffe

3.1.1 Trägerfolie

Die hydrophobe PTFE-Folie dient einerseits als Träger für das wirkstoffhaltige Polymerlyophilisat, andererseits ermöglicht sie es, das Lyophilisat sicher zum Auge zu führen und durch Abstreifen am Unterlid in den Bindehautsack zu applizieren. Die Folie darf bei diesem Vorgang keine Verletzungen hervorrufen und muss ausreichend stabil sein, um nicht mit dem Lyophilisat umzuklappen, wodurch eine Applikation unmöglich wird.

Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon[®]) ist in einem Temperaturbereich von -200 °C bis +250 °C einsetzbar und dadurch gut zu autoklavieren. Es ist chemisch inert, physiologisch unbedenklich, alterungsbeständig, untoxisch, nimmt keine Feuchtigkeit auf (< 0,01 %) und quillt weder in wässrigen noch in organischen Lösungsmitteln [60]. Aufgrund der hydrophoben, antiadhäsiven Eigenschaften resultieren große Kontaktwinkel mit hydrophilen Flüssigkeiten [25].

In der Pharmazie wird es zur Beschichtung von Elastomerstopfen für Infusionsflaschen verwendet. Wegen seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften und

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Biokompatibilität findet es in hochreiner Form auch in der medizinischen Implantat-technik Verwendung.

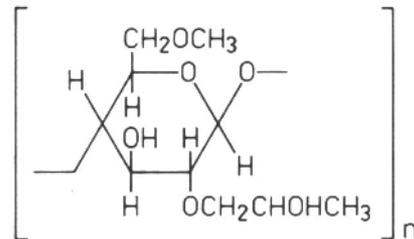
PTFE hat eine weiße Eigenfarbe und fühlt sich wachsartig an. Folien können aus Dispersionen bzw. durch Schälén von gesinterten oder ungesinterten Vollstäben hergestellt werden.

Bei den von Weichselbaum durchgeführten Untersuchungen an 18 verschiedenen PTFE-Folien auf ihre Verwendbarkeit als Trägerfolie erwies sich die ungesinterte PTFE-Folie der Firma 3P GmbH als am besten geeignet [82].

Deshalb wird für alle nachfolgenden Versuche diese PTFE-Folie verwendet: ungesinterte PTFE-Folie, ursprünglicher Verwendungszweck / Qualität: zur Isolation in der Elektrotechnik, Dicke 100 µm, Dichte 1,6 g/cm³, Firma 3P GmbH Performance Plastic Products, Karben [60].

3.1.2 Hydrophiles Polymer

Hydroxypropylmethylcellulose Ph. Eur.
(HPMC, Hypromellose, Methocel®)



Die eingesetzte Hydroxypropylmethylcellulose dient als Gerüstbildner für das Lyophilisat, in das der Arzneistoff molekulardispers oder suspendiert eingebettet ist. Es handelt sich um einen gemischten, nichtionogenen Ether der Cellulose. Die Herstellung erfolgt durch Einwirken von Methylchlorid und Propylenoxid auf Alkalicellulose [8]. HPMC ist als Hilfsstoff für Arzneiformen zur Anwendung am Auge zugelassen und neben Methylcellulose der meistverwendete viskositätserhöhende Zusatz zur Kontaktzeitverlängerung am Auge [18, 12]. Vor allem nach Sterilfiltration, welche problemlos bis zu einer Konzentration von 1,5 % möglich ist, erfüllt die Lösung die Anforderungen an Klarheit, Durchsichtigkeit und Schwebstofffreiheit.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Für alle nachfolgenden Versuche wurde das folgende Produkt verwendet:

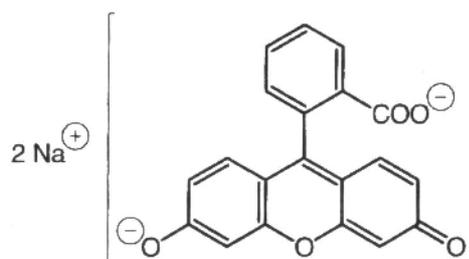
Methocel[®] E50LV Premium EP, Colorcon Ltd., England [45]

Ch.-B.:	OK 16012415
pH (1%ige Lösung):	5,5 bis 8
Substitutionsgrad Methoxygruppen:	28,0 - 30,0 %
Substitutionsgrad Hydroxypropylgruppen:	7,0 - 12,0 %
Viskosität nach Ph. Eur.:	49 mPa·s
Relative Molekülmasse:	10000 bis 150000 g/mol [8]

3.1.3 Arzneistoff

Fluorescein-Natrium Ph. Eur.

Farbstoff zur diagnostischen Anwendung



Aussehen: orangerotes, feines, hygroskopisches Pulver

Eigenschaften: leicht löslich in Wasser, löslich in Ethanol, praktisch unlöslich in Hexan, 2%ige wässrige Lösung mit gelbgrüner Fluoreszenz

pH-Wert (2%ige Lösung): 7,0 bis 9,0

Relative Molekülmasse: 376,3 g/mol [21]

Pharmakokinetik

Der Farbstoff wird bei normaler Applikation am Auge nicht resorbiert, jedoch lässt sich durch Zusätze wie 0,5 % Hydroxypropylmethylcellulose oder Benzalkoniumchlorid die Permeabilität erhöhen [80]. Fluorescein wird über den Tränen-Nasen-Kanal resorbiert. Es wird rasch zum Glucoronid metabolisiert, das über den Urin ausgeschieden wird.

Indikationen und Anwendungsmöglichkeiten

- Nachweis und Überwachung von Hornhautulzerationen
 - traumatischen Ursprungs;
 - verursacht durch Mikroben, Viren oder Pilze;
 - trophischen oder degenerativen Ursprungs.
- Augendruckmessung durch Applanationstonometrie.
- Nachweis einer externen Fistel (Seidel-Phänomen) nach operativem Eingriff am vorderen Augapfelsegment.
- Untersuchung des Tränensacks.
- Augenhintergrundbetrachtung (Angiographie).
- Erfassung des Kammerwasserflusses (Seidel-Test).
- Erkennung von Fremdkörpern.
- Anpassung und Kontrolle von Kontaktlinsen (ausgenommen sind weiche, hydrophile Linsen).

Fluorescein färbt die Hornhautpartien, deren Epithel geschädigt ist, aber noch lebende Zellen enthält. Die abgestorbenen Zellen verfärben sich nicht. Die geschädigten Hornhautpartien erscheinen als grüne Flecken, während in die Hornhaut eingedrungene Fremdkörper von einem grünen Ring umgeben sind.

Beim Anpassen von Kontaktlinsen erscheinen die Stellen, an denen die Linse die Hornhaut nicht berührt, unter blauem Licht in dunklem Raum, nach Instillation von Fluorescein, in verschwommenem Gelbgrün, während die Stellen, an denen die Linse auf der Hornhaut aufliegt, dunkelrot erscheinen [1, 82].

Für alle nachfolgenden Versuche wurde Fluorescein-Natrium der Firma Synopharm, Barsbüttel, Ch.-B.: 9904B092 verwendet [21].

3.2 Methoden

3.2.1 Der Herstellungsprozess:

Der Herstellungsprozess von OLCS umfasst 5 Schritte.

1. Herstellung und Sterilisation der Applikatoren
2. Herstellung und Sterilfiltration der wirkstoffhaltigen Polymerlösung
3. Auftropfen der Lösung auf den sterilisierten Applikator
4. Einfrieren und Gefriertrocknen
5. Verpackung

Geräte:

- Autoklav: Typ VST 40/60, Nr. 91/410, max. Temp.: 132 °C, max. Druck: 2,2 bar, Apparatebau Zirbus, Osterode/Harz
- Hand-Folienschweißgerät: Polystar 244
- Trockenschrank: Typ FT 420, Nr. 7104640, WC Heraeus, Hanau, Temperatur 60 °C
- Laminar-Airflow-Werkbank: Clean Air Typ MSC / FSS 6 - 2, KL II B
- Dosierpipette: Eppendorf Multipette[®] plus, Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg, versehen mit: Combitip Biopur[®], 2,5 mL, SollwertEinstellung: 25 µL, Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg
- Waage: Sartorius, Typ BP 210S (d = 0,1 mg), Sartorius GmbH, Göttingen

Materialien:

- Autoklavierband: Autoclave Tape, 3M Medical Products Division, St. Paul (USA)
- Autoklavierfolie: Melafol[®] 1502, Melag, Breite: 150 mm
- Zellstofftupfer: Pur-Zellin[®], 4 x 5 cm, Hartmann
- Wasser für Injektionszwecke: 5 mL Ampullen, Bayer AG, Leverkusen oder Ciba Geigy GmbH, Wehr

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.2.1.1 Herstellung der wirkstoffhaltigen Polymerlösung

Berechnung der Wirkstoffmenge:

Die Lyophilisate sollen in Anlehnung an das Fertigarzneimittel Fluorescein SE - Augentropfen® der Firma Alcon Thilo dosiert werden. Diese Augentropfen enthalten 1,7 mg Fluorescein-Natrium in 1 mL Lösung; 1 Tropfen wird mit 40 µL angegeben [63]. Somit liegt die Einzeldosis bei 68 µg. Das Tropfenvolumen sollte möglichst klein sein. Für die Lyophilisate wurde es auf 25 µL eingestellt. Daraus ergibt sich eine Wirkstoffkonzentration von 68 µg / 25 µL oder 0,272 %.

Daneben werden auch Lyophilisate mit der dreifachen Einzeldosis für Studienzwecke hergestellt und untersucht (Wirkstoffkonzentration: 204 µg / 25 µL oder 0,816 %).

Um den Einfluss der Polymerkonzentration auf die Eigenschaften der OLCS untersuchen zu können, werden wirkstoffhaltige Lösungen mit 0,5 %, 1,0 % und 1,5 % HPMC hergestellt.

<u>Rezeptur 1: 0,272 % Fluorescein / 0,5 % HPMC</u>		<u>Gehalt pro Lyophilisat</u>
Fluorescein-Natrium	0,136 g	68 µg
Methocel E50	0,250 g	125 µg
Aqua ad injectabilia	49,614 g	
<u>Rezeptur 2: 0,272 % Fluorescein / 1,0 % HPMC</u>		<u>Gehalt pro Lyophilisat</u>
Fluorescein-Natrium	0,136 g	68 µg
Methocel E50	0,500 g	250 µg
Aqua ad injectabilia	49,364 g	
<u>Rezeptur 3: 0,272 % Fluorescein / 1,5 % HPMC</u>		<u>Gehalt pro Lyophilisat</u>
Fluorescein-Natrium	0,136 g	68 µg
Methocel E50	0,750 g	375 µg
Aqua ad injectabilia	49,114 g	
<u>Rezeptur 4: 0,816 % Fluorescein / 1,0 % HPMC</u>		<u>Gehalt pro Lyophilisat</u>
Fluorescein-Natrium	0,408 g	204 µg
Methocel E50	0,500 g	250 µg
Aqua ad injectabilia	49,092 g	

Herstellung der Lösung:

1. Aqua ad injectabilia wird in ein Becherglas mit Magnetrührstäbchen eingewogen. Das Becherglas wird mit Alufolie abgedeckt und auf dem Magnetrührer mit Heizung bis zum Sieden erhitzt.
2. Das Becherglas mit dem siedenden Wasser wird auf einen zweiten Magnetrührer ohne Heizung überführt und die abgewogene Menge HPMC auf die Wasseroberfläche aufgestreut.
3. Die agglomeratfreie Suspension wird nun 2 Stunden kalt gerührt, bis eine klare Lösung entstanden ist. Verdunstetes Wasser wird ergänzt.
4. Die abgewogene Menge Fluorescein-Natrium wird zugesetzt und umgerührt.
5. Die hergestellte Lösung wird unter der Laminar-Airflow-Werkbank in ein steriles Weithalsglas sterilfiltriert. Dazu wird ein Membranfilter der Porenweite 0,22 µm verwendet.
6. Das Gefäß wird mit einem Schraubdeckel dicht verschlossen und etikettiert.
7. Der Bubble-Point-Test zur Überprüfung der Integrität des Filters wird durchgeführt.

3.2.1.2 Herstellung der Applikatoren

Bei der Herstellung der Applikatoren wurden desinfizierte Vinyl-Einmalhandschuhe getragen. Vorversuche zeigten, dass nach Berührung der PTFE-Folie mit der Fingerkuppe ein aufgebrachtter Wassertropfen deutlich stärker spreitete als bei unberührter Folie. Auch Weichselbaum beobachtete, dass Ablagerungen auf der Oberfläche den Kontaktwinkel der Lösung auf dem Träger verändern können, was später zu Haftproblemen auf der Folie führen kann [82].

Zuerst wurden aus den DIN A4 großen Bögen PTFE-Folie Streifen von 15 mm Länge und 10 mm Breite geschnitten. Diese Streifen wurden dann auf 2-3 mm Länge mit der schmalen Seite auf die selbstklebende Seite eines 40 mm langen Streifens Autoklavierband (Breite 12 mm) geklebt. Dann wurde ein zweiter Streifen gleicher Größe wiederum mit der selbstklebenden Seite darüber geklebt. Für den Labormaßstab eignete sich das Autoklavierband als Handgriff besonders gut, da es zusätzlich die Möglichkeit bot, durch den Farbumschlag des integrierten Thermoindicators von

3 EXPERIMENTELLER TEIL

hellbeige nach dunkelbraun, das Erreichen der erforderlichen Sterilisationstemperatur im Autoklaven anzuzeigen.

Schließlich wurde die nicht verklebte Seite des PTFE-Streifens noch vorsichtig mit einer Nagelschere abgerundet, damit der Applikator auf der Seite, mit der das Lyophilisat zum Auge geführt wird, keine Ecken und Kanten aufweist (Abb. 3-1).

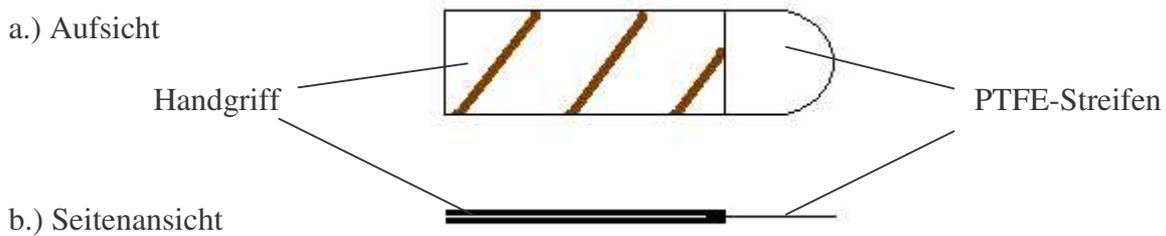


Abb. 3-1: Aufsicht und Seitenansicht eines Lyophilisatträgers.

Nun wurde der PTFE-Teil mit Isopropanol gereinigt, um Reste der geschnittenen Folie, Flusen oder Staubkörner, die sich durch elektrostatische Aufladung an die Folie angelagert hatten, zu entfernen. Dazu wurde jeder Träger auf eine glatte Glasplatte gelegt und der PTFE-Teil mit einem isopropanolgetränkten Steriltupfer abgerieben. Zum Schluss wurden die Applikatoren noch kurz in einem Isopropanolbad abgespült, um eventuelle Fasern des Steriltupfers zu entfernen, und in ein Metallkästchen mit perforiertem Boden gelegt. Diese wurden schließlich in Autoklavierfolie eingeschweißt und mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf für 15 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Danach wurden die autoklavierten Behälter über Nacht bei 50-60 °C im Trockenschrank getrocknet. Erst kurz vor der Verwendung wurde die Autoklavierfolie aufgeschnitten und die Streifen einzeln mit der Pinzette entnommen.

3.2.1.3 Herstellung der Lyophilisate

a) für die Prozessentwicklung

Für die Ermittlung geeigneter Prozessparameter wird zur Temperaturerfassung in den Tropfen ein Thermoelement eingebracht.

In den einzelnen Applikator wird im Bereich der PTFE-Folie zentral ein kleines Loch für das Thermoelement gestochen (Abb. 3-2).



Abb. 3-2: Applikator mit Loch zum Durchführen des Thermoelements.

Dazu wird er auf eine weiche Styroporplatte gelegt, am Handgriff festgehalten und die PTFE-Folie vorsichtig mit einer Nadel perforiert. Dann wird der Applikator auf den Probenträger überführt. Dieser besitzt eine kleine Bohrung am vorderen Ende der Auflagefläche, durch die der Thermofühler senkrecht von unten durchgeführt wird. Der Applikator wird nun mit dem Loch auf die Bohrung des Probenträgers gelegt, mit einer Pinzette angedrückt und das Thermoelement vorsichtig von unten durch die Folie gedrückt. Anschließend wird die Position der Fühlerspitze, auf der sich der Messpunkt von 0,5 mm Durchmesser befindet, so eingestellt, dass sie sich etwa 1 mm über der PTFE-Folie befindet. Zum Schluss wird noch die PTFE-Folie vorsichtig mit einer feinen Pinzette fest um die Spitze des Fühlers gedrückt, um zu vermeiden, dass nach dem Aufbringen des Tropfens ein Teil der Lösung durch Kapillarwirkung durch einen Spalt zwischen Loch im PTFE und Fühler gezogen wird.

b) für die Anwendung

Bei der Herstellung von Klinikmustern wird auf die Verwendung des Thermofühlers verzichtet. Der Applikator wird unverändert auf einen Probenträger ohne Thermoelement überführt. Bei der OLCS-Herstellung sowohl für die Methodenentwicklung als auch zur Verwendung als Klinikmuster wird anschließend wie folgt verfahren:

Vor dem Aufbringen des Tropfens wird noch ein Strahlungsschild aus 0,1 mm dickem, poliertem Edelstahl mit einer Aussparung für den Tropfen auf den Probenträger aufgesetzt (Abb. 3-3), um diesen und die PTFE-Folie vor der direkten Infrarot-Strahlung von oben zu schützen. Dieser Strahlungsschild ist im Weiteren zur besseren Übersicht weggelassen.

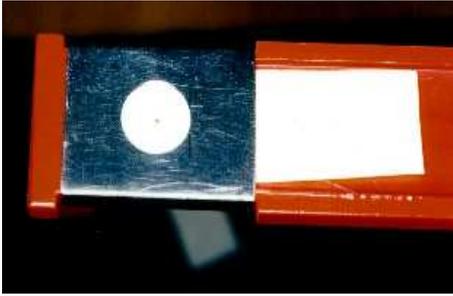


Abb. 3-3: Probenhalter mit PTFE-Folie und Strahlungsschild aus Edelstahl. In der Mitte der Schildaussparung befindet sich der Thermofühler. Foto: M Diestelhorst.



Abb. 3-4: Aufbringen der Lösung mit der Dosierpipette. Foto: M Diestelhorst.

Mit der Dosierpipette werden dann genau 25 μL der sterilen Lösung auf die Spitze des Thermoelementes bzw. in die Mitte der Folie aufgetropft (Abb. 3-4). Dabei ist zum einen darauf zu achten, dass sich der Fühler möglichst zentral im Tropfen befindet, zum anderen sollte der Tropfen möglichst halbkugelförmig sein und nicht verlaufen.

Anschließend wird der Probenträger vorsichtig in die Trockenkammer eingebracht, diese dabei verschlossen, und der Einfriervorgang beginnt (Abb. 3-5). Hier wurde die Trockenkammer aus Acrylglas verwendet, um die Vorgänge während des Einfrierens und Trocknens besser beobachten zu können (Abb. 3-6).

Bei dem weißen Zylinder in Abb. 3-6 handelt es sich um die Strahlungsheizung. Am glasigen und durchsichtigen Tropfen erkennt man, dass er noch nicht gefroren ist.

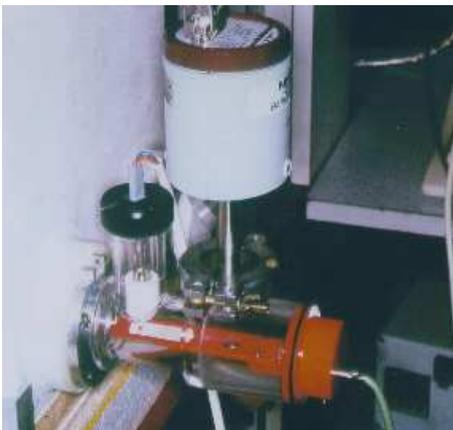


Abb. 3-5: Apparatur mit eingebrachtem Tropfen. Foto: M Diestelhorst.



Abb. 3-6: Detailaufnahmen des noch flüssigen Tropfens in der Trockenkammer. (Tropfen ist noch durchsichtig). Foto: M Diestelhorst.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Nachdem der Tropfen durchgefroren ist, kann die Strahlungsheizung eingeschaltet werden (Abb. 3-7). Der Tropfen beginnt zu trocknen, das äußere Erscheinungsbild wird matt.

Nach Beendigung der Trocknung wird die Trocknungskammer mit Stickstoffgas belüftet und der Probenträger entnommen. Der Applikator wird daraufhin in einem sterilen Polyethylen-Röhrchen verpackt und mit der Chargennummer versehen (Abb. 3-8).

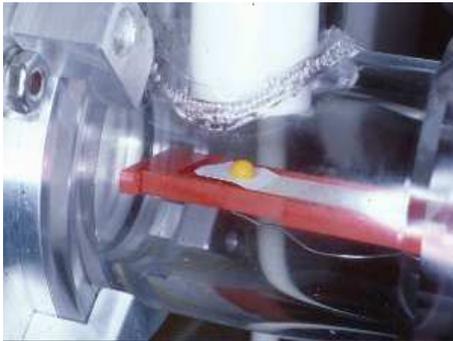


Abb. 3-7: Durchgefrorener Tropfen in der Trockenkammer (Tropfen erscheint matt).
Foto: M Diestelhorst.



Abb. 3-8: In PE-Röhren verpackte Lyophilisatträger.

3.2.2 Charakterisierung der verwendeten Polymerlösungen

3.2.2.1 Bestimmung der Dichte

Die Dichtebestimmung der Polymerlösungen erfolgte mit der Pyknometermethode nach DAB9 [13] bei 20 °C.

Geräte:

Pyknometer: Schott Geräte GmbH, Hofheim/Taunus, Füllvolumen 50,0 mL

Analysenwaage: Mettler Toledo AG 204

Wasserbad: Thermostat Lauda, K2D, Nr. 10461, Temperatur 20 °C ± 0,1 °C

Durchführung:

Das Pyknometer wurde gereinigt, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann das Leergewicht auf der Analysenwaage ermittelt. Darauf wurde es luftblasenfrei randvoll mit der entsprechenden, temperierten Polymerlösung befüllt und sofort mit der Analysenwaage das Gesamtgewicht bestimmt.

3.2.2.2 Bestimmung der Viskosität

Die Viskosität der HPMC-Lösungen wurde mit dem Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde bestimmt.

Geräte:

Kapillarviskosimeter nach DIN 51 562: Ubbelohde-Viskosimeter mit hängendem Kugelniveau zur Bestimmung der kinematischen Viskosität, Schott Geräte GmbH, Hofheim/Taunus, Typ 501 20 / II, App. Nr. 91577, $K=0,1010$ [cSt/s]

Wasserbad: Thermostat Lauda, K2D, Nr. 10461, Temperatur 20 °C ± 0,1 °C

Durchführung:

- a.) Das Viskosimeter wurde mehrmals mit wenigen Millilitern der Messlösung gespült.
- b.) In das weite Rohr der Kapillare wurde ca. 20 mL der Polymerlösung gefüllt, bis der Flüssigkeitspegel zwischen den beiden unteren Hilfslinien lag.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

- c.) Das befüllte Kapillarviskosimeter wurde nun zum Temperatenausgleich mindestens 20 Minuten in das auf $20\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ temperierte Wasserbad gehängt.
- d.) Die Viskositätsmessung erfolgte an sechs Proben jeder Lösung.

3.2.2.3 Bestimmung der Dosiergenauigkeit

Die Dosiergenauigkeit der verwendeten Pipette wurde überprüft und untersucht, ob die Dichteunterschiede der verschiedenen konzentrierten HPMC-Lösungen Einfluss auf die Dosierung haben.

Geräte:

- Dosierpipette: Eppendorf Multipette[®] plus, Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg, versehen mit: Combitip Biopur[®], 2,5 mL, SollwertEinstellung: 25 μL , Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg
- Analysenwaage: Mettler Toledo AG 204

Durchführung:

Die Dosierpipette wurde auf ein Einzeldosisvolumen von 25 μL eingestellt und mit der entsprechenden Polymerlösung durchgespült. Dann wurde erneut die Polymerlösung aufgezogen und jeweils 30mal die Masse eines Einzeltropfens auf der Analysenwaage bestimmt. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

3.2.3 Charakterisierung der Lyophilisate mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Vorbereitung der Lyophilisate:

Zur Anfertigung der Vertikalschnitte wurden die entsprechenden Lyophilisate in eine mit flüssigem Stickstoff gefüllte Petrischale überführt. Nach kurzer Durchfrierzeit von 1 bis 2 Minuten wurden die Proben mit einer neuen Rasierklinge im flüssigen Stickstoff möglichst halbiert. Danach wurden die Hälften umgehend mit einer Pinzette aus dem Kältebad entnommen, in eine Kunststoffröhre überführt und luftdicht verschlossen, um sie vor kondensierender Luftfeuchtigkeit zu schützen.

Zur Untersuchung der Bodenstruktur der Lyophilisate wurden diese vorsichtig durch Dehnung der PTFE-Folie von dieser abgelöst.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Die Lyophilisate wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht, um sowohl die inneren als auch oberflächlichen Strukturen sichtbar zu machen, welche im Wesentlichen die Eigenschaften Haftfestigkeit und Druckfestigkeit mitbestimmen.

Geräte:

Sputter: Sputter Coater S 150 B, Edwards High Vacuum
Internation, West Sussex, Großbritannien
Eingestellte Stromstärke: 15 mA

Sputterzeit: 3 x 2 Minuten

Probenträger: Gereinigte Aluminiumniete, Durchmesser 0,8 cm

Rasterelektronenmikroskop: Hitachi S 2460 N Scanning Electron Microscope,
Tokio, Japan

Arbeitsabstand: 25 mm

Anodenspannung: 15 kV

Bildauswertung: digital

Programm: Digital Image Processing System V2.5.2.1

Point electronic GmbH

Messgerät:

Das REM ermöglicht eine vergrößerte Aufnahme und Abbildung von Objekten mit Hilfe von Elektronenstrahlen. Dies wird möglich durch die in umgekehrter Proportionalität zu ihrer Beschleunigungsspannung (hier: 15 kV) stehende, verglichen mit sichtbarem Licht bis zu 10^5 mal kleinere Wellenlänge der Elektronenstrahlen. Demnach entspricht eine höhere Beschleunigungsspannung einer kürzeren Wellenlänge und einer besseren Bildauflösung.

Der Aufbau eines REM besteht aus folgenden Einheiten: Durch eine beheizte Wolframkathode wird ein fokussierter Elektronenstrahl erzeugt, welcher die zu untersuchende Probe Zeile für Zeile abtastet (Raster). Dies geschieht bei einem Arbeitsvakuum von 10^{-5} bis 10^{-6} mbar, damit der Strahl auf dem Weg zum Objekt nicht abgelenkt, gestreut oder anderweitig gestört wird. Die zurückgestreuten Primär- und die erzeugten Sekundär-Elektronen werden durch einen Detektor erfasst. Ein Videoverstärker generiert aus der ankommenden Spannung ein Schwarz-Weiß-Bild auf einer Bildröhre. Helle Punkte im Bild resultieren aus einer höheren Spannung als dunkle Punkte.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Da nicht leitende Proben im REM nicht sichtbar gemacht werden können, müssen derartige Objekte zuerst mit einem Kleber fixiert und anschließend mit einem leitenden Überzug beschichtet (besputtert) werden.

Durchführung:

Ein Teil der Proben wurde mit einer Silbersuspension fixiert. Jedoch löste diese Suspension die Lyophilisate teilweise an, so dass im weiteren Verlauf der Rasteraufnahmen „UHU hart“ als Kleber eingesetzt wurde. Um die Leitfähigkeit zwischen Probe und Probenteller zu gewährleisten, wurde in diesen Fällen vor der Goldbeschichtung die Oberfläche des getrockneten Klebers und des Probenhalters mit der Silbersuspension bepinselt. Das Lyophilisat wurde 6 Minuten lang samt Halterung im Sputtercoater mit Gold beschichtet. Mit Hilfe des REM wurden die so gefertigten Proben im Bereich von 25-facher bis 1000-facher Vergrößerung detailliert betrachtet.

3.2.4 Ablöseverhalten von der Trägerfolie

Als Versuchsaufbau zur Bestimmung der Haftfestigkeit der Lyophilisate auf dem Applikator diente die in Abb. 3-9 dargestellte Konstruktion.

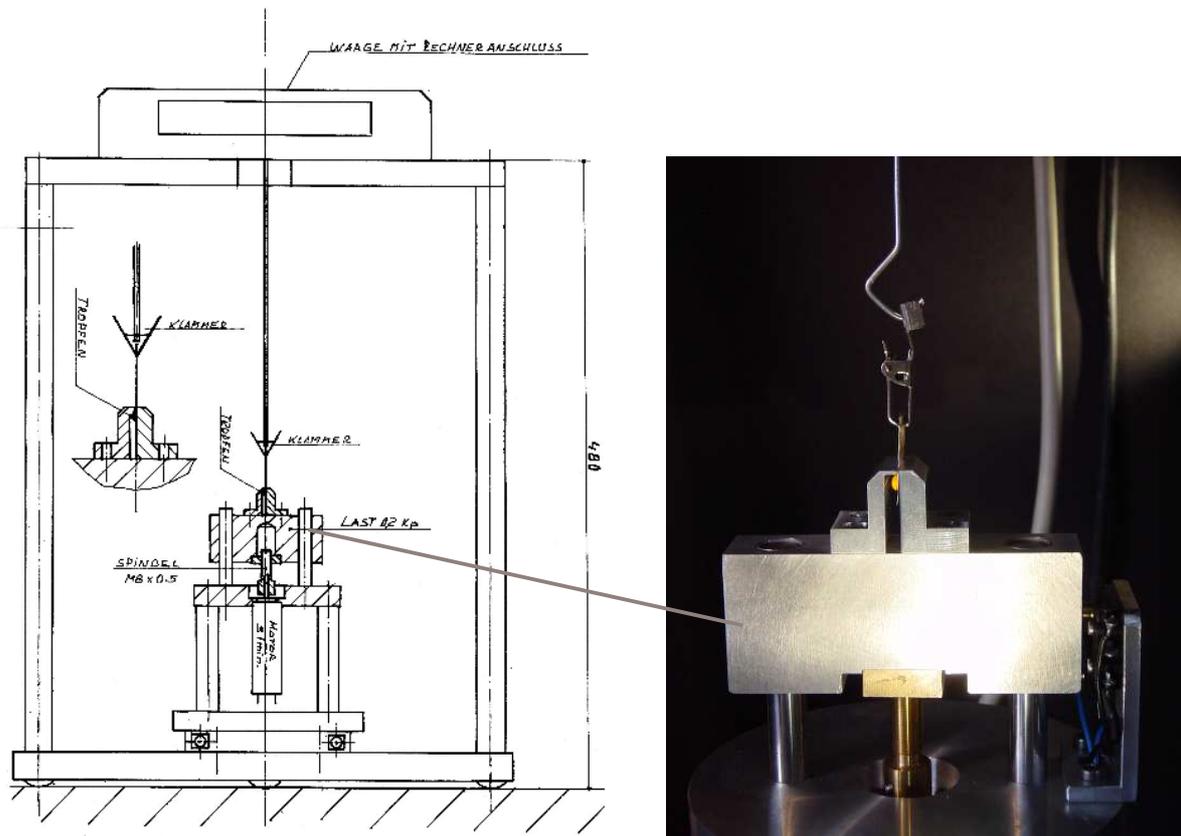


Abb. 3-9: Technische Zeichnung der Apparatur zur Bestimmung der Haftfestigkeit. Das Foto zeigt detailliert die eigentliche Abreißvorrichtung.
Technische Zeichnung, Entwurf und Herstellung: B Neff.

Geräte:

Feinwaage: Sartorius L 2200S ($d = 0,01$ g), Sartorius GmbH, Göttingen

Serielle Schnittstelle: Baud rate: 1200

Parity bit: Odd

Einstellung: Datenausgabe auf Printbefehl ohne Stillstand
(dynamische Messung möglich, PC fordert den momentanen Messwert an)

3 EXPERIMENTELLER TEIL

PC-Notebook:	MBC-17NB, Sanyo Electric Co. Ltd., Japan
Serielle Schnittstelle:	RS 232
Datenerfassung:	Programm zur Erfassung von Wägedaten im Sekundentakt
Ausgabeformat:	ASCII-Datei (*.dat)

Bei der verwendeten Konstruktion handelt es sich um ein Holzgestell, auf dem die elektronische Feinwaage steht, deren Werte sich über den PC kontinuierlich aufzeichnen lassen. In die Untertisch-Öse der Waage wird das zum Haken gebogene Ende einer Metallstange (Durchmesser: 1 mm) eingehängt, an deren anderem Ende eine kleine Klammer angebracht ist. In diese Klammer wird der Handgriff des Applikators eingespannt, so dass der PTFE-Streifen mit dem Lyophilisat senkrecht nach unten hängt. Der PTFE-Streifen (Dicke: 100 µm) wird nun oberhalb des Lyophilisattropfens vorsichtig zwischen einem 200 µm großen Spalt der Abreißvorrichtung auf einem Aluminiumblock gefädelt. Dieser Block liegt auf einer schwimmend gelagerten Mutter, die auf einer Spindel mit der Steigung 0,5 mm läuft. Die Abreißvorrichtung senkt sich also mit 0,5 mm pro Umdrehung der Mutter auf der Spindel. Sie wird über einen Elektromotor angetrieben, dessen Drehzahl abhängig von der angelegten Spannung ist. Bei der gewählten Spannung von 12 Volt legt die Abreißvorrichtung 0,58 mm/min zurück.

3.2.5 Druckfestigkeit der Lyophilisate

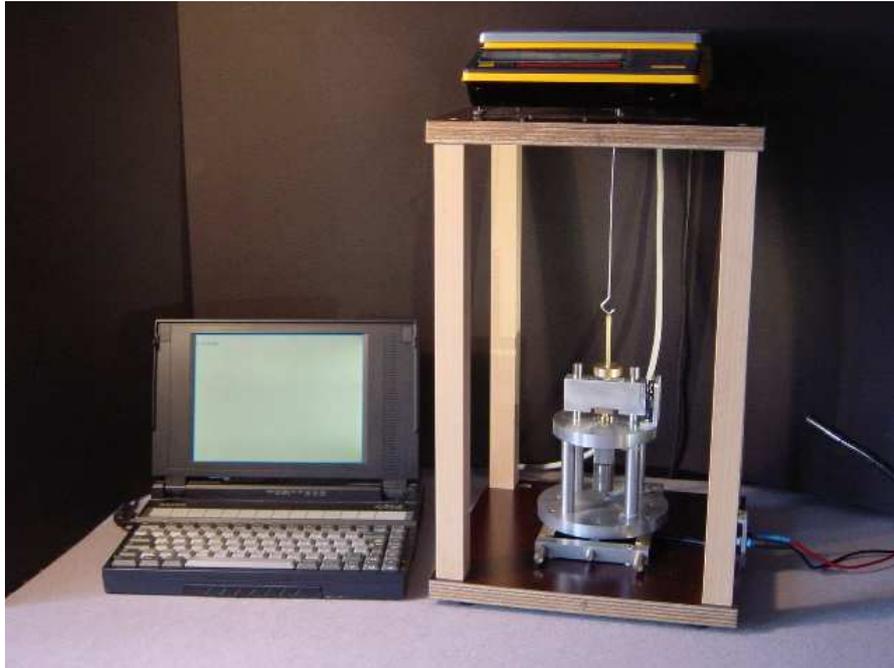


Abb. 3-10: Apparatur zur Bestimmung der Druckfestigkeit.

Dabei handelt es sich um dasselbe Gerät wie zur Bestimmung der Haftfestigkeit mit geringfügig verändertem Versuchsaufbau (Abb. 3-10). Der Unterschied besteht darin, dass die Abreißvorrichtung entfernt wird, damit der Lyophilisatträger plan auf dem Aluminiumblock zum Liegen kommt. Statt der Klammer hängt an der dünnen Metallstange jetzt ein Metallstempel mit einer Masse von 200 Gramm (Abb. 3-11).

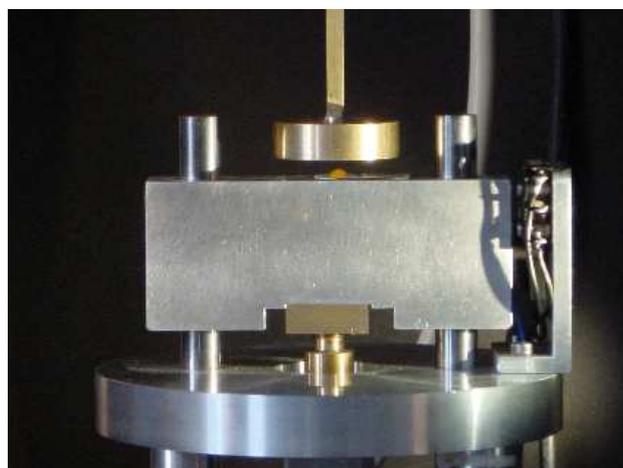


Abb. 3-11: Detailaufnahme des Aluminiumblocks, auf dem ein Lyophilisatträger liegt; darüber der Stempel.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Zu Beginn der Messung wird der Spalt zwischen dem Aluminiumblock und dem Stempel auf etwa 5 bis 10 mm eingestellt, so dass der Applikator bequem dazwischen passt. Dies geschieht durch Heben oder Senken des Blockes durch den Elektromotor.

Beim Dazwischenlegen ist darauf zu achten, dass der Mittelpunkt des Lyophilisates unter der Mitte der Stempels liegt. Ist das nicht der Fall, so kann es dazu kommen, dass der Stempel während der Messung in Schräglage kommt und mit einer Kante den Aluminiumblock berührt, bevor die Messung beendet ist. Dies würde das Messergebnis verfälschen.

Dann kann mit der Druckfestigkeitsmessung begonnen werden. Dazu wird der Aluminiumblock langsam nach oben bewegt. Dabei legt er wiederum 0,58 mm/min zurück. Die Waage ist auf Null tariert. Mit der ersten Berührung des Stempels durch das Lyophilisat registriert die Waage eine Entlastung, die umso größer wird, je weiter das Lyophilisat zusammengedrückt wird. In diesem Moment beginnt die Zeiterfassung manuell mit einer Stoppuhr.

Beim Erreichen einer Entlastung von 20 Gramm werden die Messungen beendet. Zur graphischen Darstellung wird das Vorzeichen der negativen Messwerte geändert. Diese Werte werden gegen den aus der Messzeit ermittelten, zurückgelegten Weg aufgetragen.

3.2.6 Restmengenbestimmung des Fluorescein-Natriums auf den Trägerfolien

Die Restmengenbestimmung des Fluorescein-Natriums auf den Trägerfolien erfolgte in Anlehnung an die Methode des USP 24 [78].

Material:

Boratpuffer pH 9 USP 24

Fluorescein-Natrium Stammlösung USP 24

Gerät:

Fluoreszenzspektrophotometer: Perkin-Elmer 650-40

Extinktionswellenlänge: 485 nm

Emissionswellenlänge: 515 nm

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Methode:

Bei der Fluorimetrie handelt es sich um eine Methode der Emissionsspektroskopie, bei der Moleküle durch Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird als Fluoreszenzspektrum registriert und analytisch ausgewertet.

Um Fluoreszenz herbeizuführen, muss das Elektronensystem zunächst durch Lichtabsorption angeregt werden. Das Absorptionsspektrum bezeichnet man in der Fluorimetrie als Anregungsspektrum. Misst man dagegen die Intensität des ausgestrahlten Fluoreszenzlichtes in Abhängigkeit von der Wellenlänge, so erhält man das Fluoreszenzspektrum, ein Emissionsspektrum.

Bei konstanter Anregungsintensität ist unter konstanten Messbedingungen die Intensität des Fluoreszenzlichtes der Konzentration der Substanz proportional.

Der Aufbau eines Fluorimeters ist in Abb. 3-12 gezeigt [65].

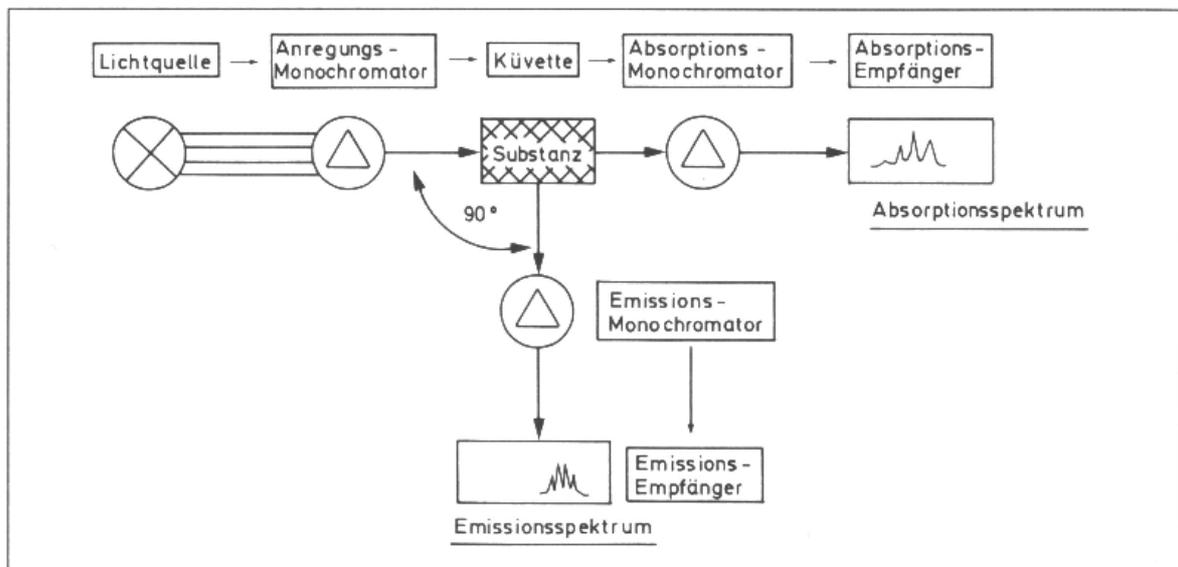


Abb. 3-12: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers [65].

Durchführung:

a.) Kalibrationskurven:

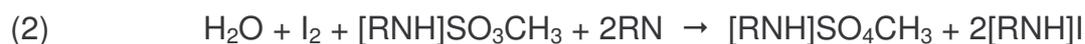
Aus der Fluorescein-Natrium Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Damit wurden im Bereich von 1 ng/mL bis 5 ng/mL und 5 ng/mL bis 100 ng/mL zwei Kalibrationsreihen vermessen und über lineare Regression die Geradengleichungen ermittelt. Durch Einsetzen der Emissionsintensitäten der Proben in die Gleichungen wurden unter Berücksichtigung der Verdünnung die Restgehalte Fluorescein-Natrium auf den PTFE-Folien in Mikrogramm berechnet.

b.) Probenvorbereitung:

1. Der PTFE-Teil des Applikators, auf dem die Restmenge des Lyophilisates haftet, wird vom Handgriff abgeschnitten und in einen 100,0 mL Messkolben überführt, der etwa zur Hälfte mit destilliertem Wasser gefüllt ist.
2. Der Messkolben wird manuell geschüttelt, 10 min stehen gelassen, dann erneut geschüttelt.
3. Die Lösung wird mit 20,0 mL Boratpuffer pH 9 versetzt und mit destilliertem Wasser zu 100,0 mL aufgefüllt.
4. Konzentrationsbestimmung am Fluorimeter.

3.2.7 Bestimmung der Restfeuchte der Lyophilisate mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration

1935 publizierte Karl Fischer eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Wasser durch Redox Titration. Die coulometrische Karl-Fischer-Titration ist eine Variante der klassischen Wasserbestimmungsmethode nach Karl Fischer. Die herkömmliche Methode arbeitet mit einer methanolischen Lösung von Iod, Schwefeldioxid und einer Base als Puffersubstanz (hier Imidazol). Bei der Titration einer wasserhaltigen Probe laufen mehrere Reaktionen ab, die sich in den folgenden Summengleichungen zusammenfassen lassen:



RN = Base (Imidazol)

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Reaktion (1) ist eine Gleichgewichtsreaktion bei der Methylsulfit entsteht. Reaktion (2) ist die Redoxreaktion. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der verwendeten Base ab. Sie verläuft im Falle des Imidazols sehr schnell. Iod reagiert nach Gleichung (2) quantitativ mit Wasser. Trotz großer Fortschritte bei der Weiterentwicklung leidet die klassische, volumetrische Karl-Fischer-Methode darunter, dass die Reagenzien nicht völlig stabil sind, weshalb der Titer periodisch neu bestimmt werden muss.

Bei der coulometrischen Karl-Fischer-Titration wird das benötigte Iod direkt im vorgelegten Elektrolyten auf elektrochemischen Weg erzeugt. Zwischen der elektrischen Ladungsmenge und der Menge des erzeugten Iods besteht eine streng quantitative Beziehung, die für die hochpräzise Dosierung des Iods verwendet wird. Da es sich bei der coulometrischen Karl-Fischer-Methode um eine Absolutbestimmung handelt, muss kein Titer bestimmt werden. Es muss nur sichergestellt sein, dass die Reaktion, welche das Iod erzeugt, mit 100 % Stromausbeute abläuft.

Die Endpunktsindikation erfolgt voltametrisch, in dem einer Doppel-Platin-Elektrode ein Wechselstrom konstanter Stärke aufgeprägt wird. Dadurch entsteht zwischen den Platindrähten eine Spannungsdifferenz, die beim Vorhandensein geringster Mengen freien Iods drastisch abnimmt. Dieser Umstand wird zur Ermittlung des Endpunktes der Titration verwendet [46].

Vorteile der Coulometrie:

- für sehr kleine Wassergehalte geeignet
- einfach zu bedienen
- hohe Genauigkeit

Materialien:

- Probengläser 6 mL (head space vials) 38,25 x 21,75 mm
- Septumverschlüsse mit Aludeckel und Teflon[®]-Einlage
- Septumverschlusszange

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte:

- Analysenwaage Sartorius Research R 160 P
- Metrohm Oven Sample Processor 774 mit Metrohm 756 KF Coulometer (Abb. 3-13)

Einstellungen: Ofentemperatur: 120 °C

Heizzeit: 600 s

Trärgas: Stickstoff, getrocknet und gefiltert

Gasflussrate: 85 mL/min

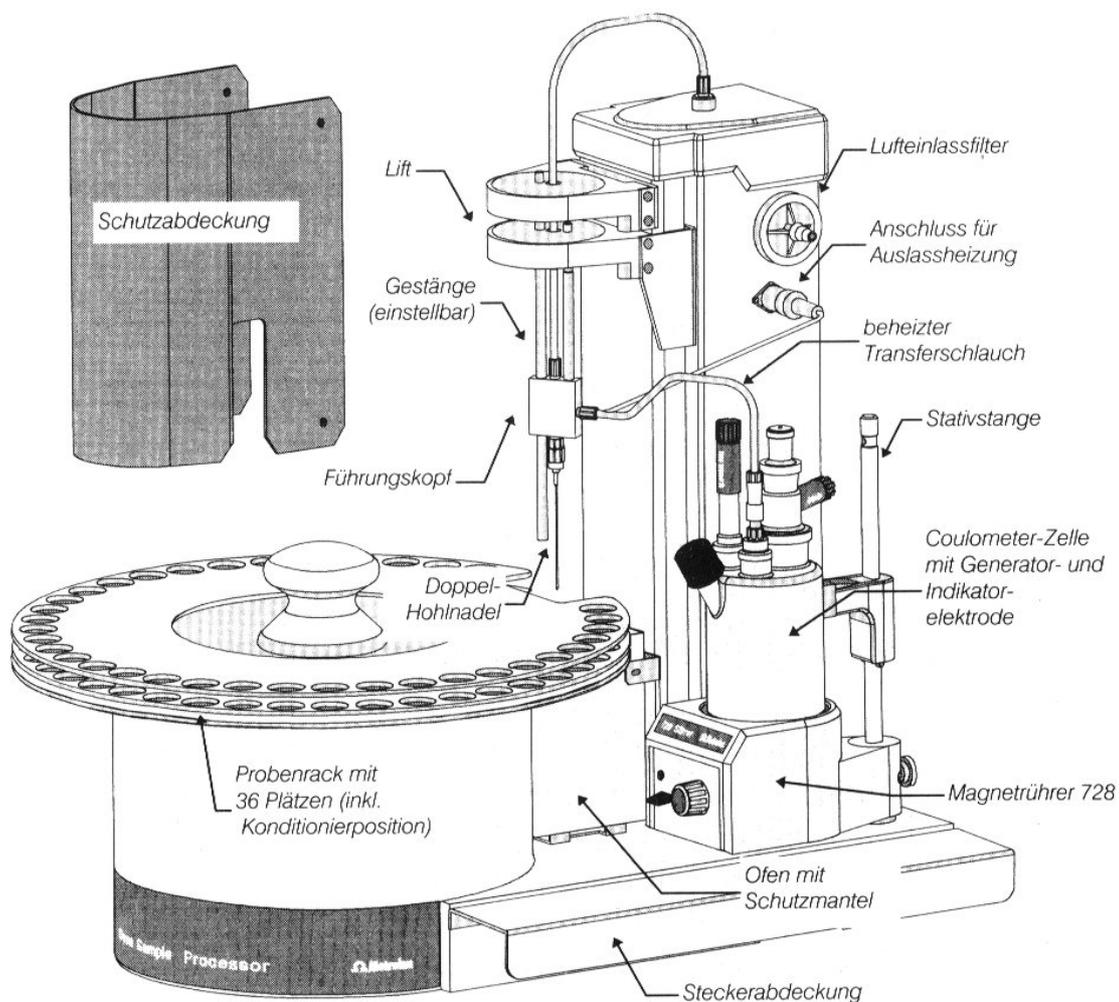


Abb. 3-13: Schematische Darstellung des Metrohm Oven Sample Processor 774 mit Metrohm 756 KF Coulometer [47].

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Bestimmungsablauf [47, 76]:

Das Prinzip der Feuchtebestimmung nach der Ofenmethode mit dem Oven Sample Processor 774 (Abb. 3-13) sieht folgendermaßen aus:

Vorbereitung:

- Die Lyophilisate werden auf der Analysenwaage in die Probengläser eingewogen und mit einem PTFE-beschichteten Septum dicht verschlossen. Die Probeneinwaagen werden am Coulometer eingegeben.
- Die Probengefäße werden auf dem Probenwechsler platziert und der Ofen wird vorgeheizt.
- Ein leeres, verschlossenes Probengefäß dient als Konditioniergefäß und wird auf der dafür vorgesehenen Position im Probenwechsler positioniert.

Konditionieren und Blindwertbestimmung:

- Das Konditioniergefäß wird auf den Ofen gefahren und der Lift auf die Spülposition gesenkt. Dabei wird das Septum des Konditioniergefäßes von der Einstichnadel durchstoßen.
- Nun wird der Gasfluss eingeschaltet, um das ganze Schlauchsystem zu spülen und reproduzierbare, konstante Verhältnisse zu schaffen.
- Die Messzelle wird nun mit dem Coulometer solange konditioniert, bis das Reaktionsmedium genügend trocken ist.
- Nach Ausschalten des Gasflusses wird jeweils eine Blindprobe (von $n = 3$) in den Ofen gefahren, der Gasfluss wiederum eingeschaltet und eine Blindwertbestimmung gestartet, um die Umgebungseinflüsse während der Heizperiode zu ermitteln. Der Blindwert beinhaltet Feuchtigkeit, die dem Probengefäß anhaftet, sowie eine latent vorhandene Systemdrift, deren Ursache in einer minimalen Restfeuchtigkeit des Trägergases und eventuellen Undichtigkeiten im Schlauchsystem zu suchen ist.
- Nach erfolgter Blindwertbestimmung wird das Reaktionsmedium wieder konditioniert.

Probenbestimmung:

- Wenn das Reaktionsmedium fertig konditioniert ist, wird der Gasfluss unterbrochen, eine Probe auf den Ofen gefahren und mit Hilfe der Einstichnadel in den Ofenblock eingeführt.
- Der Gasfluss wird wieder eingeschaltet und die Probenbestimmung am Coulometer gestartet. Die Extraktionszeit von 600 s gewährleistet eine minimale Bestimmungs- und damit auch Heizdauer.
- Die im Ofenblock erhitzte Probe gibt dabei ihre Feuchtigkeit in Form von Wasserdampf ab. Die thermisch ausgetriebene Feuchtigkeit wird nun durch den Gasstrom in das Reaktionsgefäß transportiert und die Wassermenge bestimmt. Die Heizung des Transferschlauches sorgt dafür, dass keine Feuchtigkeit im Schlauch kondensieren kann.
- Nach Abschluss der Bestimmung wird der Feuchtigkeitsgehalt des Lyophilisates unter Berücksichtigung des zuvor bestimmten mittleren Blindwertes ($n = 3$) berechnet.
- Der Gasfluss wird ausgeschaltet und das Konditioniergefäß wiederum auf den Ofen gefahren.
- Nach Einfahren der Einstichnadel in das Konditioniergefäß wird der Gasfluss eingeschaltet und das Reaktionsmedium konditioniert.
- Nach erfolgter Konditionierung kann mit der nächsten Probenbestimmung weitergefahren werden (s. o.)

3.2.8 Statistische Methoden

Statistische Tests sind immer dann wichtig, wenn bei merklicher Streuung und begrenzter Zahl der Daten die Existenz bzw. Richtung eines Unterschiedes geklärt werden soll [67]. In dieser Arbeit werden Mittelwertvergleiche eingesetzt, um zu überprüfen, ob Faktoren auf unterschiedlichen Niveaus einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse von Versuchen haben. Untersucht werden unter anderem die Variablen Haftfestigkeit und Druckfestigkeit auf eine bestehende Abhängigkeit von den Faktoren Polymergehalt und Einfriermethode. Zur Auswertung der erhobenen Daten wird die Software SPSS, Version 11.5 für Windows verwendet.

Die Unterschiede zwischen verschiedenen Datengruppen können mittels parametrischer und nicht parametrischer (synonym: verteilungsfreier) Testverfahren überprüft

3 EXPERIMENTELLER TEIL

werden, wobei die parametrischen Tests sowohl eine geringe Abweichung von der Normalverteilung als auch eine hohe Varianzhomogenität voraussetzen [7]. Dagegen machen die nicht parametrischen Tests weder Annahmen bezüglich der Parameter (wie z. B. Mittelwert und Varianz) einer Verteilung noch der Art der vorliegenden Verteilung.

Die Wahl der anzuwendenden Testverfahren innerhalb der einzelnen Versuchsserien erfolgt in Anlehnung an das Fließschema in Abb. 3-14, wobei hier die zu vergleichenden Datengruppen zuerst auf Varianzhomogenität geprüft werden sollen. Dazu wird der Test nach Levene angewendet. Bei einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ kann von Varianzhomogenität ausgegangen werden, d. h., die Gruppen unterscheiden sich bezüglich der Varianz nicht signifikant voneinander.

Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test werden die Daten, bei denen Varianzhomogenität nachgewiesen wurde, auf Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Bei einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ kann hier von dem Vorliegen einer Normalverteilung ausgegangen werden.

Erfüllen alle Daten diese beiden Anforderungen, werden die Gruppen mit parametrischen Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Sobald nur ein Datum der betreffenden Versuchsreihe entweder den Normalverteilungskriterien oder der homogenen Varianz nicht hinreichend genügt, werden die gesamten Daten mit verteilungsfreien Tests analysiert.

Bei allen Tests wird auf die Nullhypothese „Mittelwertunterschiede zwischen den untersuchten Stichproben sind rein zufällig, es ist kein statistisch signifikanter Effekt des Faktors (der Faktoren) auf die abhängige Variable nachzuweisen“ geprüft. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wird die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese „Mittelwertunterschiede, d. h. ein Effekt des Faktors (der Faktoren) auf die abhängige Variable, sind statistisch signifikant nachweisbar“ angenommen.

Da in der vorliegenden Arbeit nur Versuche mit 3 und mehr unabhängigen Datengruppen statistisch untersucht werden, soll im Folgenden lediglich auf die entsprechenden Testmethoden näher eingegangen werden.

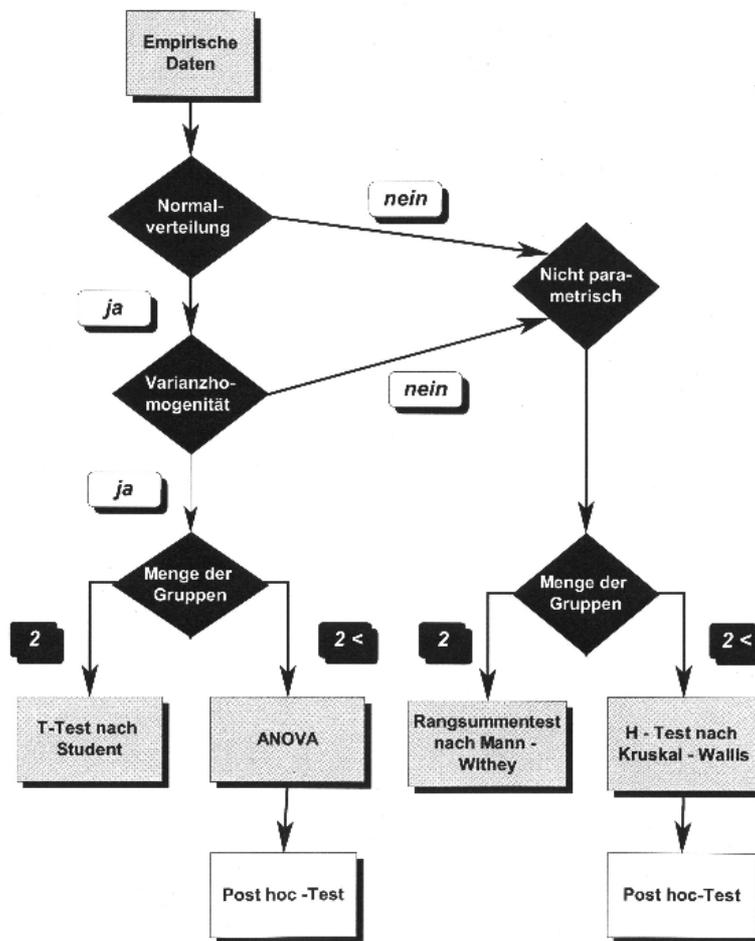


Abb. 3-14: Entscheidungsschema für die Auswahl des geeigneten Mittelwertvergleichs bei der Analyse der erhobenen Daten. Quelle: H Hollert, Skriptum zu „Statistik im Hauptpraktikum Alternativmethoden in der Ökotoxikologie, WS 2002/03“, Universität Heidelberg.

Parametrischer Test:

Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), mit nachfolgendem post-hoc Test bei 3 und mehr unabhängigen Datengruppen.

Mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse wird bei 3 oder mehr unabhängigen Datengruppen überprüft, ob sich die einzelnen Datengruppen signifikant unterscheiden. Bei einem Unterschied wird in einem nachfolgenden post-hoc Test überprüft, welche Gruppen sich signifikant unterscheiden. Dabei werden die Messgruppen durch den Fischer’s Least Significance Difference (LSD)-Test paarweise miteinander verglichen.

Nichtparametrischer Test:

H-Test nach Kruskal und Wallis mit nachfolgendem post-hoc Test bei 3 und mehr unabhängigen Datengruppen.

Mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis können mehr als drei unabhängige Datengruppen unter vollständiger Ausschöpfung der ordinalen Information der Daten (Ränge) analysiert werden. Dabei handelt es sich um das verteilungsfreie Analogon zur parametrischen ANOVA. Bei einem signifikanten Unterschied der Gruppen wird durch das post-hoc Verfahren überprüft, welche Gruppen sich signifikant unterscheiden. Hier werden die einzelnen Datengruppen paarweise durch den Games-Howell (pairwise comparison)-Test miteinander verglichen. Dieser Test wird angewendet, wenn keine Varianzhomogenität vorherrscht. Für den Fall, dass Varianzhomogenität gegeben ist, aber keine Normalverteilung vorliegt, wird als post-hoc Test wiederum Fischer's Least Significance Difference (LSD)-Test angewendet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung eines Mini-Gefriertrockners

4.1.1 Zielsetzung

OLCS nehmen aufgrund ihrer Streifenform in der Trockenkammer nur ein kleines Volumen im Verhältnis zu ihrer relativ großen Auflagefläche ein. Da die Größe von handelsüblichen Gefriertrocknungsanlagen (GT-Anlagen) über die Stellfläche definiert wird, ist eine große Anlage notwendig, um mehrere OLCS gleichzeitig zu trocknen. Daraus resultieren folgende Nachteile:

- Es dauert sehr lange, bis die Trockenkammer evakuiert worden ist, da das Produkt in dem großen Gefriertrockner nur ein kleines Volumen einnimmt.
- In großen GT-Anlagen befinden sich große Kondensatoren, die gekühlt werden müssen. Trotz der beachtlichen Auflagefläche, die die OLCS einnehmen, werden nur minimale Eismengen sublimiert. Ein kleiner Kondensator mit geringem Energieverbrauch wäre ökonomischer.
- Durch die räumliche Größe der Trocknungskammer ergeben sich für den Wasserdampf lange Diffusionswege zum Kondensator.
- Es ist nicht möglich, große Stellflächen so gleichmäßig zu temperieren, dass die zur reproduzierbaren Herstellung von OLCS benötigten Einfrier- und Trocknungsbedingungen für jedes einzelne Produkt genau eingehalten werden können. So ist zum Beispiel die Einfriergeschwindigkeit von der Position des Trockengutes in der Kammer abhängig.
- Die großen Edelstahlstellflächen sind träge Massen und können nur langsam aufgewärmt werden. Zudem wird die Wärmezufuhr nur unterhalb des gefrorenen Tropfens benötigt, nicht unter dem ganzen Applikator. Die Energieverwertung ist uneffizient.

- Die PTFE-Folie isoliert und erschwert somit die Wärmeübertragung. Unterstützt wird dieser Effekt dadurch, dass die Folie nicht plan auf den Edelstahlflächen aufliegt. Die Gaspolster erschweren zusätzlich die Wärmeübertragung. Nur durch Konvektion ist hier eine effiziente und schnelle Wärmeübertragung zu gewährleisten. Folglich ist Restgas als Wärmeübertragungsmedium erforderlich und der Kammerdruck wird auf über 1 mbar eingestellt. Dies behindert jedoch die Wasserdampfdiffusion zum Kondensator.

Diese Punkte resultieren in einem unverhältnismäßig hohen Energieverbrauch und langen Prozesszeiten. Wärmeübertragung durch Konvektion bei geringem Vakuum führt zu Temperatur- und Druckschwankungen innerhalb der Trocknungskammer. Der Gefriertrocknungszyklus ist schlecht reproduzierbar, die Produktqualität schwankt (Haftfestigkeit).

Ziel der Entwicklung ist eine Gefriertrocknungsanlage speziell zur Herstellung von OLCS. Bei der bisher üblichen, chargenorientierten Gefriertrocknung wird typischerweise der Inhalt von bis zu mehreren tausend Behältnissen in einer Großanlage gleichzeitig getrocknet. Die Trocknung kleiner Mengen ist damit zwar möglich, aber unter Berücksichtigung der Investitions- und Betriebskosten unwirtschaftlich. Deshalb soll hier zunächst jeweils nur ein einzelnes OLCS getrocknet werden.

Dieser Mini-Gefriertrockner soll einfach zu handhaben sein sowie eine energieeffiziente und vor allem schnelle Herstellung von OLCS erlauben. Die in der Literatur für halbkugelförmige Partikel mit etwa 3 mm Durchmesser beschriebene Trockenzeit von 1 bis 3 Stunden soll deutlich unterschritten werden [23]. Daneben muss der Mini-Gefriertrockner gut reproduzierbare Gefriertrocknungszyklen ermöglichen, um eine definierte, konstante Qualität der OLCS zu gewährleisten.

List nennt folgende Punkte bei einer Gefriertrocknungsanlage als konstruktiv vorteilhaft [36]:

1. Große Temperaturdifferenz und damit große Dampfdruckdifferenz zwischen Gut und Eis am Kondensator
2. Kurze Entfernung zwischen Produkt und Kondensator
3. Große Kondensatoroberfläche
4. Gutes Vakuum

Die energieeffiziente, schnelle und reproduzierbare Herstellung von OLCS soll daher durch die Kombination folgender Maßnahmen erreicht werden:

- Extrem kleines Volumen der Trocknungskammer ermöglicht ein schnelles Erreichen des angestrebten Prozessvakuum. Die Wände der Trockenkammer stellen zugleich den Kondensator dar. Daher ist die Kondensatorfläche groß gegenüber der Trocknungsfläche des Gutes.
- Kühlung der Kondensatorflächen durch direkten Kontakt mit dem Kühlmedium. Aufgrund niedriger Kosten, Umweltfreundlichkeit und guter Verfügbarkeit bietet sich hier Flüssigstickstoff an [73].
- Keine temperierte Stellfläche mehr, stattdessen direkte Heizung des Trockengutes durch Infrarotstrahlung von oben. (Diese Maßnahme wurde erst ab dem 2. Prototyp technisch umgesetzt.)
- Minimierung des Diffusionswiderstandes durch Trocknung bei hohem Vakuum (unterhalb 0,03 mbar).
- Minimierung der Diffusionsstrecke durch möglichst kurze Distanz zwischen Trockengut und Kondensator.

Um einen Anhaltspunkt für die optimale Größenordnung der Distanz zwischen Trockengut und Kondensator zu bekommen, wird für den angestrebten Vakuumbereich die mittlere freie Weglänge berechnet (vgl. Kapitel 2.3).

4.1.2 Auswahl der Komponenten

4.1.2.1 Temperaturmessung / Endpunktdetektion

Um während der Prozessentwicklung die Produkttemperatur im Einzeltropfen (Durchmesser etwa 3-4 mm) bestimmen zu können, sollte der Temperaturmesser so klein wie möglich sein und eine exakte Temperaturmessung in einem Bereich von -200 °C bis +100 °C ermöglichen. Verwendet wurden schließlich Mantelthermoelemente mit dem Thermopaar Ni/Cr-Ni der Firma Jumo mit einem Durchmesser der Messspitze von nur 0,5 mm und folgenden Eigenschaften [30]:

- geeignet für Temperaturen von -200 °C bis +1150 °C
- biegsame, dünnwandige Metalleitung; kleiner Biegeradius möglich
- kurze Ansprechzeiten (ab 0,15 sec)
- hohe Messgenauigkeit

Das verwendete Temperaturmessgerät INFINITY INFT 1001 der Firma Newport Electronics, Deckenfronn, verfügt über eine RS 232-Schnittstelle (Baud rate: 9600 bd; Parity: Odd), die eine kontinuierliche Messwertaufzeichnung per PC erlaubt [26].

- Messbereich: -200 °C bis +900 °C
- Auflösung: 0,01 °C
- Messrate: 3 Messungen pro Sekunde
- Genauigkeit: 0,6 °C

4.1.2.2 Druckmesser

Der Druckmesser zur Bestimmung des Vakuums in der Trockenkammer soll die folgenden Eigenschaften aufweisen:

- gasartunabhängige Messung
- hohe Genauigkeit
- kurze Ansprechzeit

Es wird ein kapazitiver Druckaufnehmer der Firma MKS verwendet.

Absolutdruckaufnehmer MKS Baratron Typ 626 [48]

Messbereich:	10 bis $1 \cdot 10^{-3}$ mbar
Genauigkeit:	0,25 % vom Messwert \pm Nullpunktstabilität
Nullpunktstabilität:	0,005 % vom Endwert/ $^{\circ}$ C
Betriebstemperatur:	0 $^{\circ}$ C bis 50 $^{\circ}$ C (Umgebungstemperatur)

Das zugehörige Betriebsgerät Typ PR 4000 S verfügt ebenfalls über eine RS 232-Schnittstelle (Baud rate: 9600 bd; Parity: Odd), die eine kontinuierliche Messwerterfassung per PC erlaubt [49].

4.1.2.3 Ventile

Gasdosier-Absperrventil EVN 116, Firma Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar [55]

- sehr großer Regelbereich ($5 \cdot 10^{-6}$ mbarL/s bis 1000 mbarL/s)
- optimale Kennlinie
- analoge, dreistellige Positionsanzeige zur exakten Einstellung
- gute Reproduzierbarkeit
- extrem kleines Totvolumen
- integriertes Absperrventil (Schließen ohne Veränderung der Regelstellung)
- Dichtheit: $1 \cdot 10^{-9}$ mbarL/s

4.1.2.4 Vakuumpumpe

Drehschieberpumpe -trivac-, Typ-Nr.: D8A, Firma Leybold-Heraeus, Köln.
Nennsaugvermögen: 12,8 m³/h. Erreichbarer Druck: 0,00025 mbar.

4.1.2.5 Kühlmedium

In konventionellen Gefriertrocknungsanlagen treten etwa 80 % der Serviceprobleme im mechanischen Kühlsystem auf [73]. Deshalb und aufgrund der im Folgenden genannten Vorteile, wurde Flüssigstickstoff als Kühlmedium gewählt.

- Inerte Flüssigkeit / Gas und somit umweltfreundlich.
- Erlaubt das Arbeiten bei sehr niedrigen Temperaturen, denn Stickstoff hat einen Siedepunkt von -196 °C.
- Kann direkt oder indirekt zur Kühlung verwendet werden.
- Es ist kostengünstig (weniger als 10 Cent/Liter).

4.1.3 Entwicklungsgang der Prototypen

Im Folgenden wird die technische Entwicklung des Mini-Gefriertrockners von der ersten Versuchsanordnung (Prototyp 1a) bis zum endgültigen Aufbau (Prototyp 4) beschrieben.

Prototyp 1a (Abb. 4-1):

In einen Edelstahlkasten als Flüssigstickstoff-Reservoir wurde ein Edelstahlrohr von 25 mm Durchmesser eingeschweißt. Das Innenvolumen dieses Rohres stellt die Trockenkammer dar. Die innere Mantelfläche des Rohres, umgeben von flüssigem Stickstoff, fungiert als Kondensator. An einem Ende des Trockenrohres wurde ein Rohrleitungssystem mit dem barometrischen Drucksensor und zwei Nadelfeinventilen angeschlossen. Mit einem Feinventil ließ sich die Geschwindigkeit regulieren, mit der die Kammer auf das maximal mögliche Endvakuum evakuiert wurde.

Das zweite Ventil ermöglichte sowohl das Einstellen des Arbeitsvakuum durch kontrolliertes Belüften mit dem Inertgas Stickstoff, als auch das vollständige Belüften der Trockenkammer zu Prozessende. Als temperierbare Stellfläche wurde ein Aluminiumzylinder verwendet, bei dem ein Teil der Rundung abgeflacht war (Abb. 4-2). In diesen flachen Teil war eine Vertiefung zur Aufnahme des Lyophilisatträgers eingefräst. Der Abstand des gefrorenen Produktes zum Kondensator betrug dadurch nur wenige Millimeter, war also im Bereich der mittleren freien Wegstrecke der Gasmoleküle. Mit eingebrachter Stellfläche wurde das freie Volumen in der Kammer so klein, dass sie sich innerhalb weniger Sekunden evakuieren ließ.

In den Aluminiumzylinder wurden eine Heizpatrone und ein Temperaturfühler eingeklebt. Eine Thermostatsteuerung ermöglichte das Einstellen und Konstanthalten der gewünschten Stellflächentemperatur. Ein zweiter Thermofühler wurde in der Vertiefung entlang geführt und konnte horizontal in den Tropfen eingebracht werden.

Er erlaubte die Erfassung der Produkttemperatur während des Gefriertrocknungsprozesses (Abb. 4-2).

Der Aluminiumzylinder war auf einer Seite mit einem Kunststoffstopfen verschraubt. Dieser sollte die Trockenkammer durch einen integrierten O-Ring radial vakuumdicht verschließen.

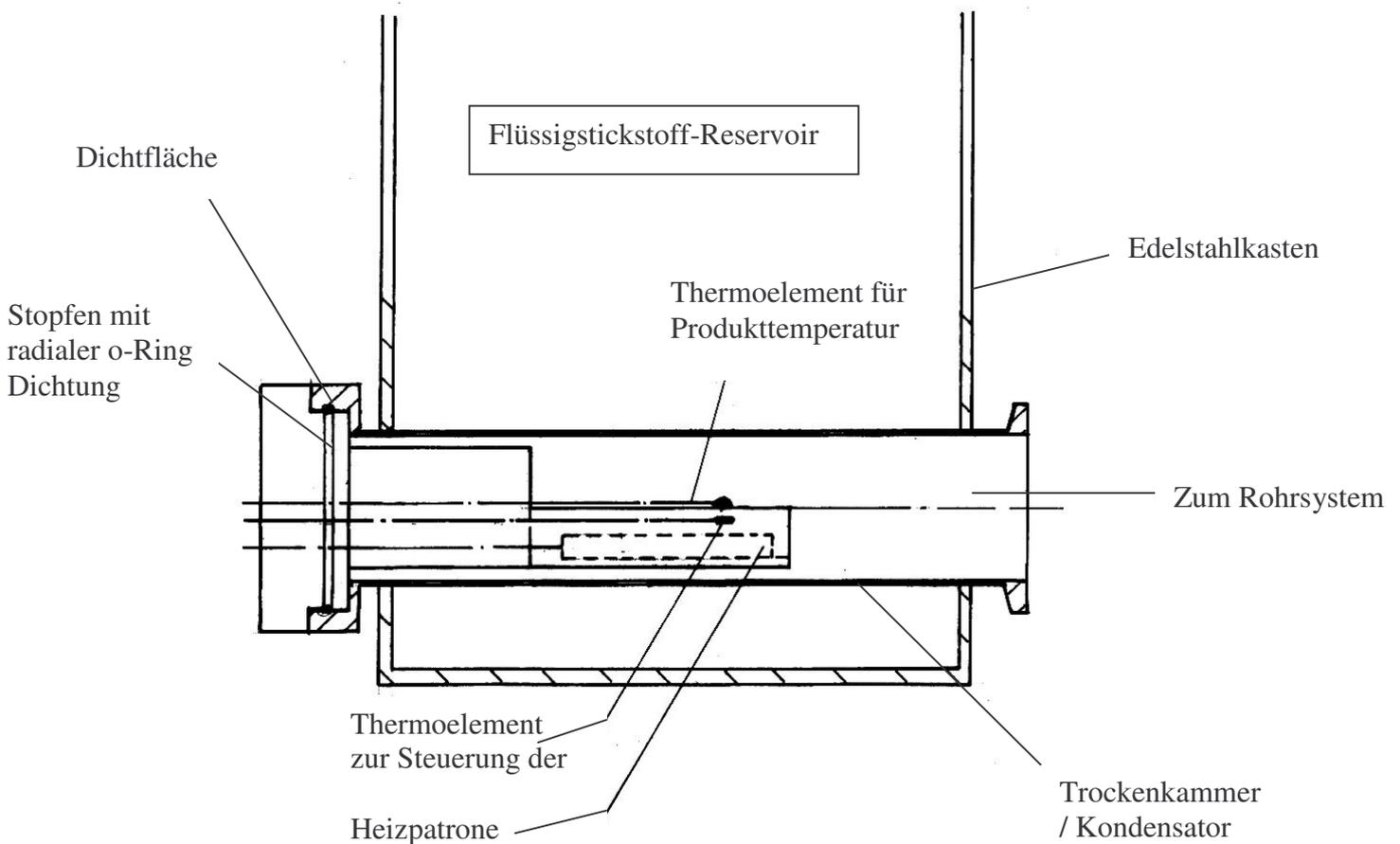


Abb. 4-1: Schemazeichnung des Prototyp 1a. Technische Zeichnung: B Neff, Fertigung: S Horst.

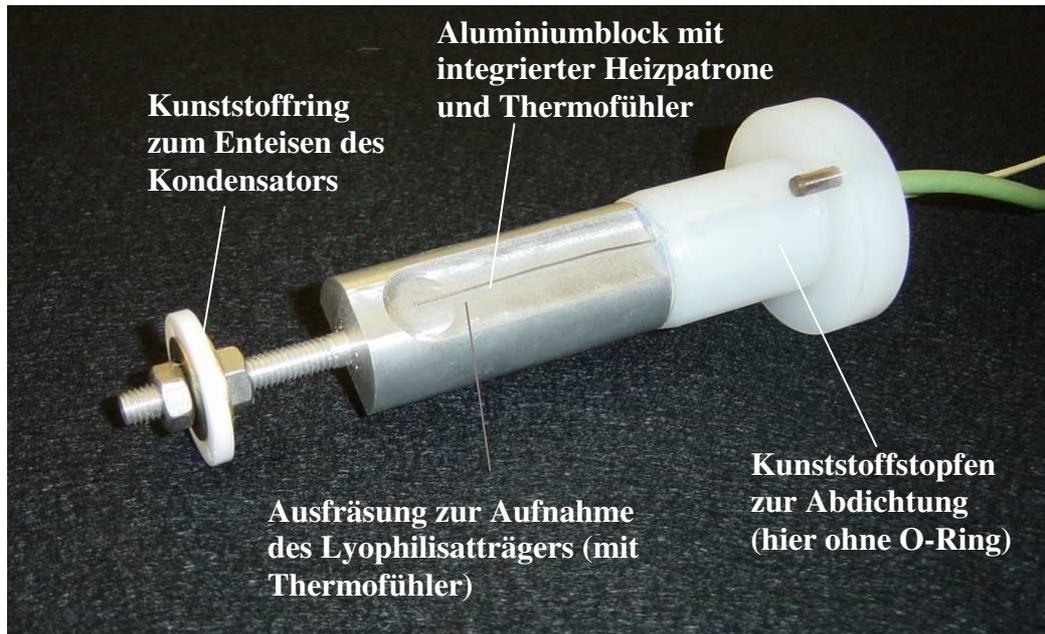


Abb. 4-2: Produkthalter des Mini-Gefriertrockners Prototyp 1a.

Problematik bei der Verwendung von Prototyp 1a:

Der direkte Kontakt der metallischen Dichtfläche (Abb. 4-1, Dichtfläche) zum -196 °C kalten Kondensator führte innerhalb kürzester Zeit zu einem starken Wärmeentzug an der Dichtfläche. Trotz der Verwendung von bis -80 °C temperaturbeständigem Viton als Material für den O-Ring, versprödete dieser dadurch reversibel, dichtete nicht mehr ausreichend ab und das Vakuum in der Trockenkammer brach zusammen.

Prototyp 1b (Abb. 4-3):

Um die starke Abkühlung der Ringdichtung zu vermeiden, wurde ein 3 cm langes, sehr dünnes Edelstahlrohr mit neuer Dichtfläche um das ursprüngliche Trockenrohr auf den Metallkasten aufgeschweißt. Aufgrund der durch das sehr dünne und somit schlecht wärmeleitende Metallrohr entstandenen Distanz zwischen Dichtfläche und kaltem Kondensatorrohr, wirkte die Raumtemperatur effizient einer Abkühlung der Dichtfläche entgegen. Durch das Mitevakuiieren dieses Bereiches wurde zusätzlich der Wärmeentzug durch Konvektion minimiert.

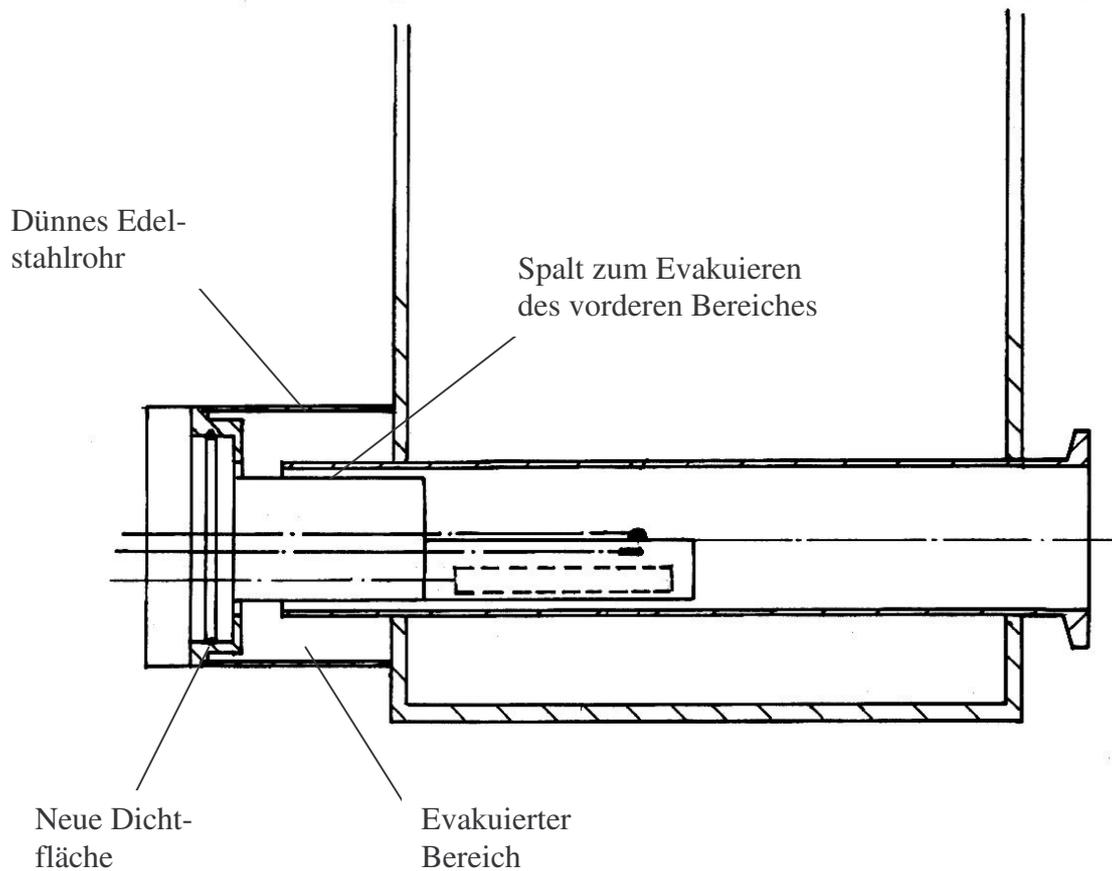


Abb. 4-3: Schemazeichnung des Prototyp 1b. Technische Zeichnung und Umbau: B Neff.

Mit diesem Prototyp war es nun wegen des länger anhaltenden Vakuums möglich, einige OLCS nacheinander zu trocknen. Allerdings zeigten sich nach kurzer Probezeit erneut Probleme.

Problematik bei der Verwendung von Prototyp 1b:

Das Aufheizen des Aluminiumblockes in direkter Nähe zum Kondensator (Spaltbreite von nur wenigen Millimetern) führte dazu, dass der Flüssigstickstoff rasch verdampfte und das Reservoir in kurzen Abständen aufgefüllt werden musste. Der gesamte Aluminiumblock musste aufgeheizt werden, obwohl nur ein kleiner Bereich unterhalb des gefrorenen Tropfens die Wärmezufuhr benötigte. Durch dieses träge System dauerten Temperaturwechsel sehr lange.

Dazu kam, dass bei laufendem Betrieb der Aluminiumzylinder immer weiter abkühlte. Die träge Temperatursteuerung regelte zwar permanent einer Abkühlung entgegen, durch diese schubweise Energiezufuhr ergab sich allerdings ein unkontrollierbarer, treppenförmiger Anstieg der Produkttemperatur. Die Schwankungen der

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Stellflächentemperatur wurden umso größer, je länger die Anlage in Betrieb war. Zudem kondensierte Luftfeuchtigkeit an dem Edelstahlgehäuse, so dass man beim Entnehmen des trockenen Lyophilisates darauf achten musste, dass dieses nicht durch herabfallenden Reif angelöst wurde.

Um möglichst effizient Sublimationswärme auf das gefrorene Produkt zu übertragen, wurde ein Vakuum eingestellt, bei dem bevorzugt Wärmeübertragung durch Konvektion stattfindet (0,5 bis 1 mbar). Konvektion bei diesen extremen Temperaturunterschieden in der unmittelbaren Umgebung des Produktes führte zu sehr unregelmäßigen und somit nicht reproduzierbaren Trocknungsverläufen (Tabelle 1). Wärmeleitung spielte wegen der isolierenden Eigenschaft der PTFE-Folie nur eine untergeordnete Rolle.

Temp. Tropfen zu Beginn [°C]	Zeit bis 0°C [s]	Kühlrate [K/min]	Endtemp. Produkt [°C]	Trocknungszeit [min]	Aussehen Lyophilisat
17,0	36	28	-39	12,5	angetaut
16,5	45	22	-40	16	feinporig, glänzend
15,5	38	24	-37	16	feinporig, glänzend
16,0	34	28	-37	11,5	feinporig, glänzend
16,0	48	20	-36	12,5	innen leicht angetaut, feinporig, glänzend

Tabelle 1: Kenndaten einiger Trocknungsverläufe mit Prototyp 1b. Endvakuum: 0,5 mbar, Ventilstellung 500, Stellflächentemperatur 70 °C.

Durch direkten Kontakt zwischen dem Aluminiumblock und dem darauf liegenden Thermofühler wurde der Messdraht aufgeheizt und transportierte so zusätzliche Energie über Wärmeleitung direkt in den gefrorenen Tropfen. Dies führte mehrfach zu einem Antauen des Produktes.

Prototyp 2 (Abb. 4-4):

Beim zweiten Prototyp wurden grundlegende Veränderungen vorgenommen. Das Stickstoffreservoir war nun nicht mehr aus Edelstahl, sondern es wurde ein Kasten aus dem hochisolierenden Werkstoff Rohacell[®] gefertigt. Rohacell[®] hat bei 20 °C eine Wärmeleitfähigkeit von nur 0,030 W/mK [62].

Demgegenüber stehen Wärmeleit Zahlen von 15 W/mK für Edelstahl (VA 1.4301) und zum Beispiel etwa 395 W/mK für Kupfer [10]. In diesen Rohacell[®]-Kasten wurde das als Trocknungskammer und Kondensator dienende Metallrohr eingeklebt. Dadurch sollte die Kondenswasser- bzw. Reifbildung vermieden und zusätzlich der Stickstoffverbrauch reduziert werden. Außerdem bestand somit kein direkter metallischer Kontakt mehr zwischen der Dichtfläche und dem kalten Kondensatorrohr. Die gute Isolationswirkung des Rohacell[®] verhinderte eine Abkühlung der Dichtfläche und die damit verbundenen Probleme.

Das Trockenrohr war jetzt als T-Stück geformt, wobei der senkrechte Teil als Aufnahme für eine Strahlungsheizung vorgesehen war (Abb. 4-4). Dieser senkrechte Teil reichte bis über das Stickstoff-Reservoir hinaus und ermöglichte das Einbringen und Justieren einer Glühwendel knapp oberhalb des gefrorenen Tropfens. Somit war eine gezielte Zufuhr von Sublimationswärme punktuell nur auf das gefrorene Gut möglich. Eine solche Glühdrahtheizung reagiert äußerst schnell und präzise auf Änderungen in der Spannungszufuhr und lässt sich daher genau steuern.

Da die Wärmeübertragung jetzt durch die Strahlungsheizung erfolgte, konnte der voluminöse Aluminiumzylinder durch eine dünne Kunststoffplatte ersetzt werden. Der Thermofühler zur Erfassung der Produkttemperatur wurde nun, geschützt vor direkter Wärmeeinstrahlung, unterhalb dieser Platte entlang geführt. Er wurde dann unmittelbar unterhalb des Tropfens durch ein kleines Loch im Kunststoffträger senkrecht nach oben in den Tropfen geführt. Dadurch wurde während der Trocknung ein Energietransport durch den Thermofühler in das Produkt weitestgehend vermieden. Die Temperaturmessung ergab genauere Werte. Ein verfrühtes Beenden der Trocknung aufgrund falsch hoher Temperaturwerte kam nicht mehr vor.

Da unterhalb 10^{-2} mbar die Konvektion der Gasphase zum Erliegen kommt, konnte durch ein besseres Vakuum schließlich auch die Konvektion in der Trockenkammer weitestgehend vermieden und die Wärmestrahlung effizient genutzt werden [66]. Damit wurden auch die Trocknungsbedingungen reproduzierbar.

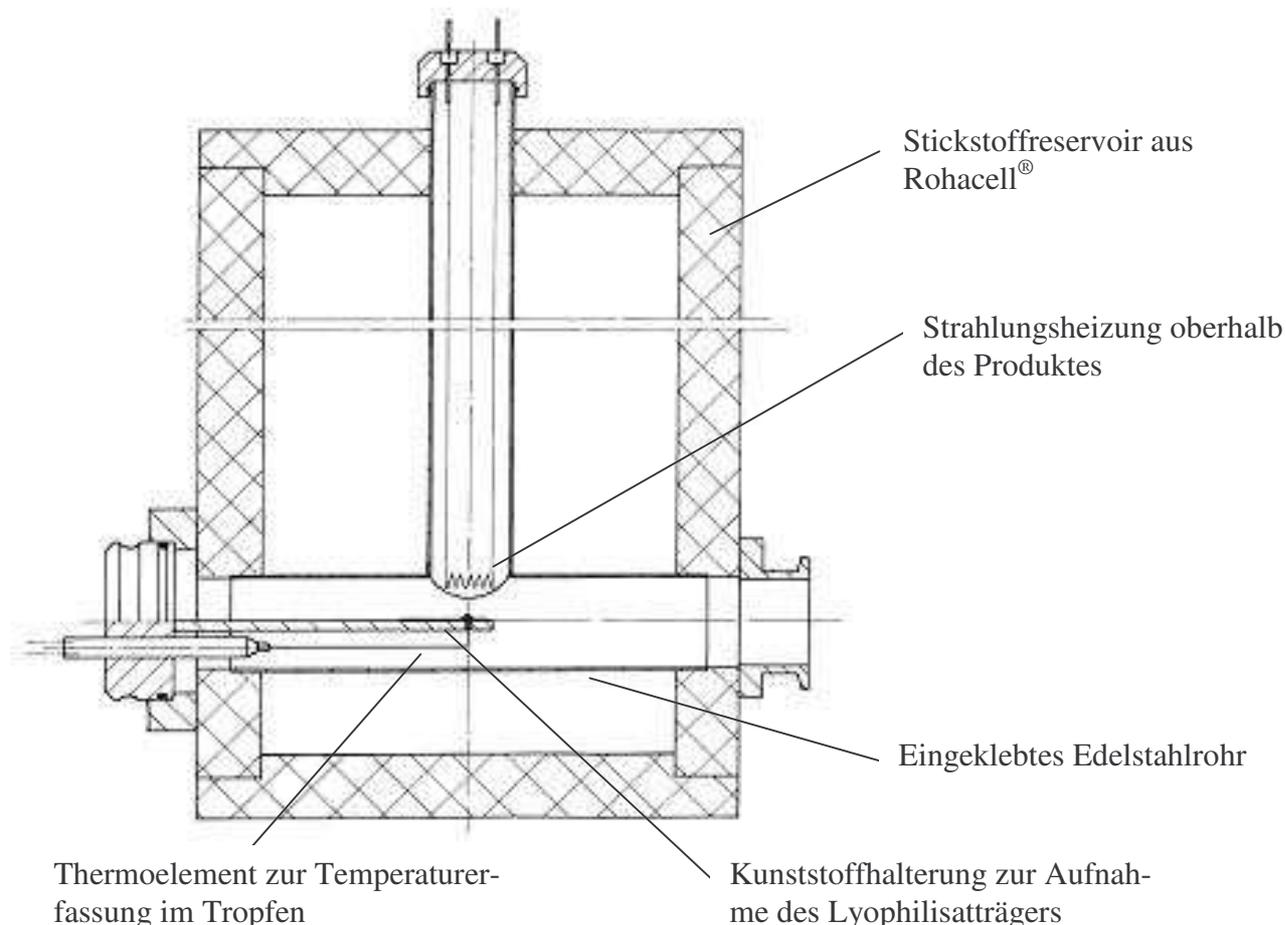


Abb. 4-4: Schemazeichnung des Prototyp 2. Technische Zeichnung und Fertigung: B Neff.

Problematik bei der Verwendung von Prototyp 2:

Der nicht mehr temperierbare Kunststoffträger kühlte nach Abschalten der Strahlungsheizung bei Trocknungsende rasch ab, so dass es auf ihm beim Herausnehmen aus der Trocknungskammer zur Kondenswasserbildung kam. Dies führte gelegentlich zum teilweisen Anlösen des Lyophilisates.

Außerdem sollte die nächste Entwicklungsstufe die Beobachtung des Gefriertrocknungsprozesses ermöglichen.

Prototyp 3 (Abb. 4-5):

Um die Vorgänge beim Einfrieren und Trocknen verfolgen zu können, wurde eine durchsichtige Trocknungskammer aus Acrylglas gefertigt. Diese wurde an dem vorderen Ende des ursprünglichen Trockenrohres vakuumdicht angebracht. Um den Kunststoffträger nicht unnötig verlängern zu müssen, wurde die Strahlungsheizung aus dem Stickstoffreservoir nach außen verlegt. Dadurch verringerte sich der Verbrauch an flüssigem Stickstoff erneut deutlich. Da der Träger jetzt nicht mehr

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

vollständig vom Kondensator umgeben war und kaum noch abkühlte, wurde Kondensation von Luftfeuchtigkeit beim Entnehmen verhindert. Um den Abstand zwischen gefrorenem Produkt und Kondensatorfläche dennoch möglichst klein zu halten, wurde das Kondensatorrohr im unteren Bereich verlängert, so dass es bis unter das Gut in die neue Trockenkammer hineinragte.

Gleichzeitig wurde auch der Druckmesser vom hinteren Rohrsystem nach vorne verlegt, um untersuchen zu können, ob es aufgrund der Sublimation in der Trockenkammer vor dem Kondensator zu einem merklichen Druckanstieg kommt. Dies war allerdings nicht der Fall.

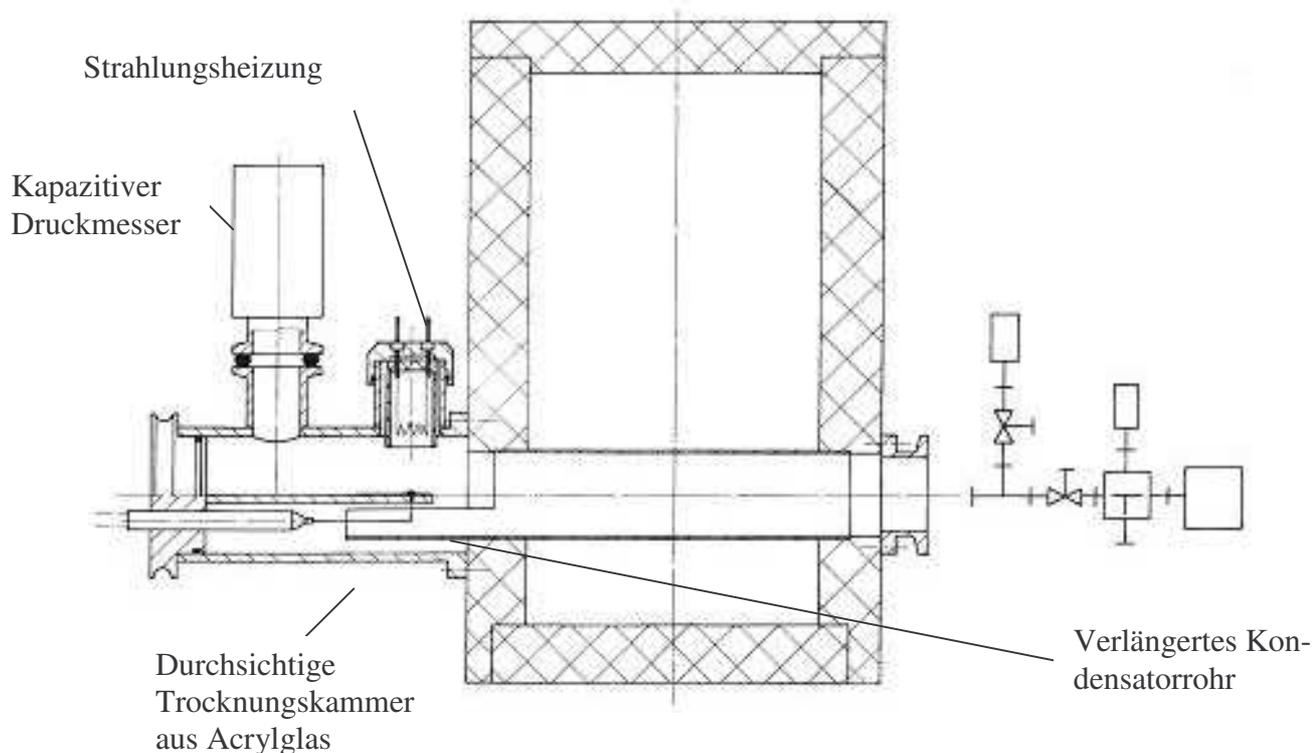


Abb. 4-5: Schemazeichnung des Prototyp 3. Technische Zeichnung und Fertigung: B Neff.

Problematik bei der Verwendung von Prototyp 3:

Mit diesem Anlagendesign ließ sich schnell und reproduzierbar sowohl Einfrieren als auch Gefriertrocknen. Auch in Sachen Handhabbarkeit stellte es bisher das Optimum dar, obwohl sich aufgrund der Verlängerung des Kondensatorrohres an der Unterseite der Acrylglaskammer Kondenswasser bildete (Abb. 4-6, Pfeil).

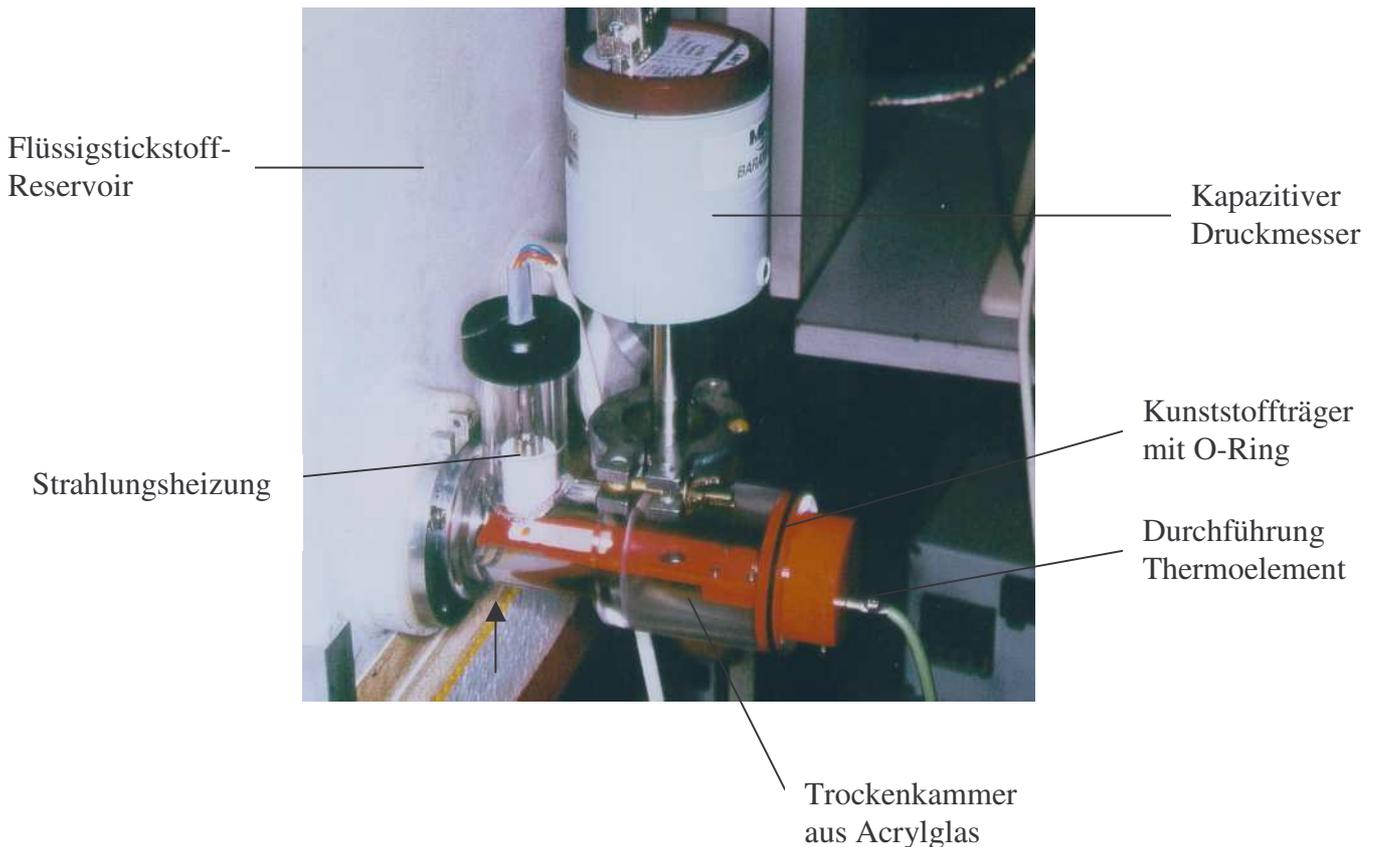


Abb. 4-6: Prototyp 3 während eines Gefriertrocknungsprozesses. Foto: M Diestelhorst.

Allerdings waren die Standzeiten der Anlage inakzeptabel. Sowohl die thermische Belastung durch Strahlungsheizung und Kondensator, als auch die mechanische Belastung durch ständigen Wechsel von Vakuum und Atmosphärendruck, unterstützt durch den schweren kapazitiven Druckmesser, verursachte in regelmäßigen Abständen Rissbildung im Acrylglas. Dies führte zum Zusammenbruch des Vakuums.

Weitere Schwachpunkte waren die Stellen, an denen das Metallrohr in die Rohacell[®]-Kiste eingeklebt war. Wegen der häufigen Wechsel zwischen Raumtemperatur und Flüssigstickstoff-Temperatur kam es durch die unterschiedliche thermische Verformung der beiden Materialien zu Materialermüdung. Oft riss die Rohacell[®]-Kiste beim Befüllen mit Flüssigstickstoff an den Klebestellen.

Prototyp 4 (Abb. 4-7):

Statt eines eingeklebten Metallrohres, welches vollständig von Flüssigstickstoff umgeben war, wurde hier ein Messinghalbrohr als Kondensator verwendet (Abb. 4-9), das über einen Kupferzylinder in Kontakt mit dem Kühlmedium stand. Da nun der Kondensator keine Röhrenform mehr hatte, wurde zusätzlich eine evakuierbare Kondensatorkammer benötigt. Aus Aluminium wurde eine nach oben offene Kammer gefertigt, auf die der Vorratsbehälter aus Rohacell[®] aufgeklebt werden konnte. Um diesen Behälter aus einem Stück ohne Klebestellen fertigen zu können, wurde eine runde Form gewählt. In den Boden des Reservoirs eingeklebt, stellte der Kupferzylinder die einzige wärmeleitende Verbindung zwischen Flüssigstickstoff und dem Kondensator in der Kammer dar. Durch diese Maßnahmen reduzierten sich die thermisch belasteten Klebestellen auf ein Minimum. An diese Aluminiumkammer wurde wiederum eine Trockenkammer vakuumdicht angeschlossen. Allerdings wurde diese jetzt aus Messing statt aus Acrylglas gefertigt. Um den Gefriertrocknungsprozess weiterhin beobachten zu können, wurde ein kleines Sichtfenster eingebaut (Abb. 4-10). Die Kondensatorfläche wurde nach vorne bis in die Trockenkammer aus Messing unterhalb der Strahlungsheizung verlängert, um die Distanz zwischen Sublimationsfront und Kondensator so klein wie möglich zu halten. Ein integriertes Thermoelement diente der Überprüfung, ob das vordere Ende des Kondensators schnell genug ausreichend kalt wurde. Der kapazitive Drucksensor wurde wieder hinter die Kammer zum Rohrsystem verlegt. Der Vorratsbehälter aus Rohacell[®] wurde an der Kontaktfläche zur Aluminiumkammer mit einer dünnen Edelstahlfolie beklebt (Abb. 4-7, vergrößerter Ausschnitt). Dies diente der Abdeckung der porösen Rohacell[®]-Struktur und sollte eine mikrobiologische Kontamination einschränken. Dadurch wäre zusätzlich ein Sterilisieren mit gesättigtem, gespannten Wasserdampf möglich.

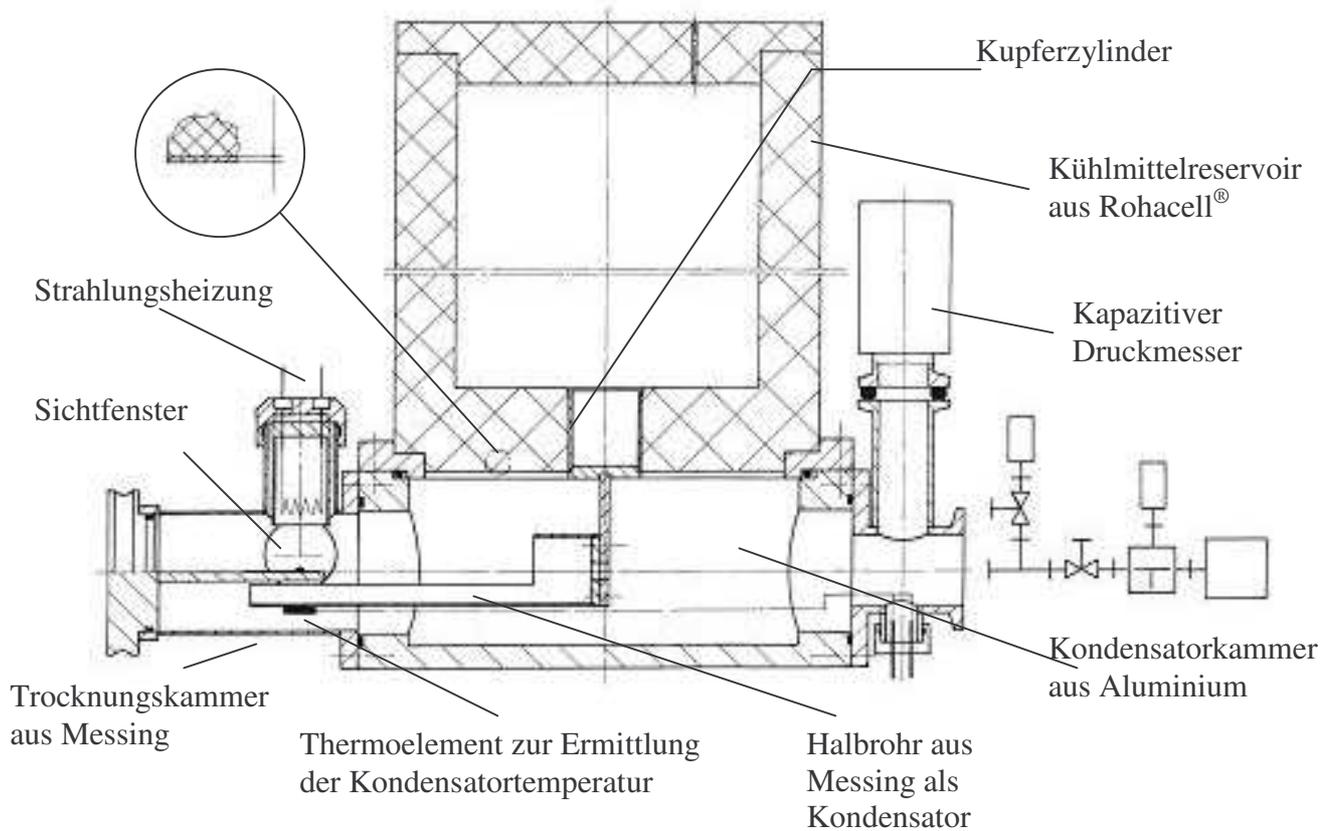


Abb. 4-7: Schemazeichnung des Prototyp 4. Technische Zeichnung und Fertigung: B Neff.

Mit dem endgültigen Aufbau des Mini-Gefriertrockners Prototyp 4 (Abb. 4-8) ließ sich ein noch tieferes Vakuum erreichen (0,01 mbar). Dadurch und weil die Kondensatorfläche auf etwa ein Drittel reduziert wurde, kam es nicht mehr zu Kondenswasserbildung am Trockenrohr. Die Standzeit der Anlage verlängerte sich deutlich, es traten keine Materialermüdungen mehr auf. Die Veränderung des Endvakuums und der Kondensatorfläche hatte in der Folge Auswirkungen auf die bisher entwickelten Einfrier- und Trocknungsmethoden. Allerdings ließen sich die Unterschiede einfach kompensieren (vgl. Kapitel 4.4.1.4).

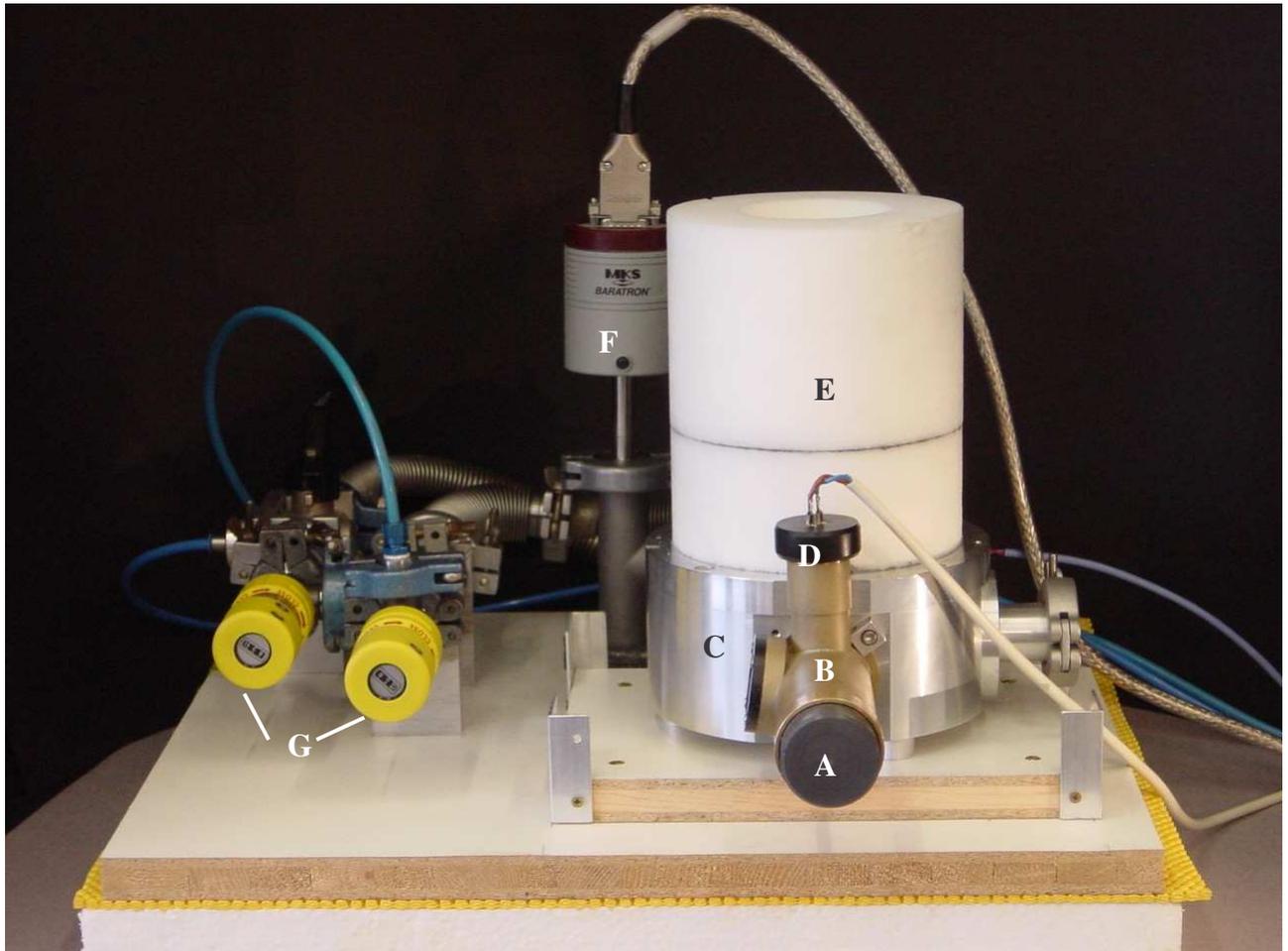


Abb. 4-8: Endgültiger Aufbau des Mini-Gefriertrockners Prototyp 4.

- | | |
|--|----------------------------|
| A: Kunststoffträger mit radialer O-Ringdichtung | B: Trocknungskammer |
| C: Kondensatorkammer aus Aluminium | D: Strahlungsheizung |
| E: Reservoir für Flüssigstickstoff | F: kapazitiver Drucksensor |
| G: Feinventile zur Einstellung des Endvakuums / der Evakuiergeschwindigkeit. | |

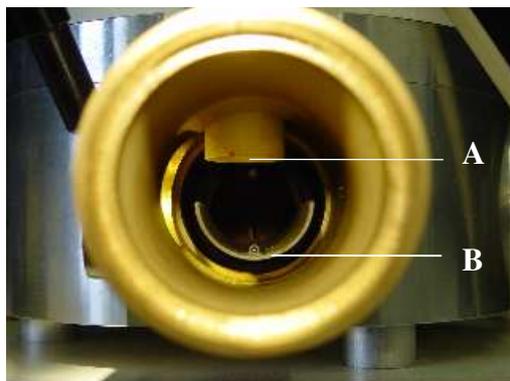


Abb. 4-9: Blick von vorne in die Trocknungskammer

- A: Strahlungsheizung
B: Kondensatorfläche mit Thermofühler

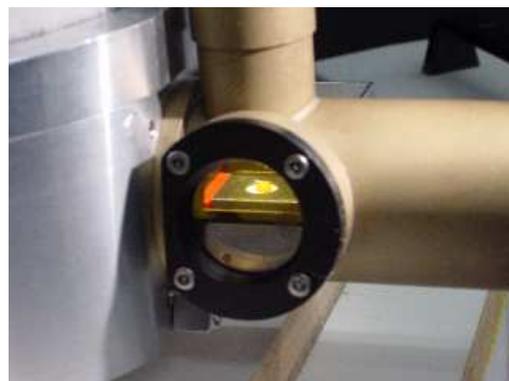


Abb. 4-10: Blick durch das seitliche Sichtfenster in die Trocknungskammer während der Trocknung.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1.4 Kontrolle und Aufzeichnung der Prozessparameter

Datenerfassungsprogramm zur Messdatenerfassung per PC

Mit Hilfe des eigens für den Mini-Gefriertrockner programmierten Datenerfassungsprogramms ComGraph V1.0 (Programmierung: R Schroeder) ist es möglich, kontinuierlich die Werte für den Druck in der Trocknungskammer und die Temperatur im Produkt aus den entsprechenden Messgeräten auszulesen (Abb. 4-11) und sowohl numerisch als auch graphisch aufzuzeichnen. Zudem wird die genaue Prozesszeit erfasst.



Abb. 4-11: Erfassung und Aufzeichnung von Druck und Temperatur.

Über die Benutzeroberfläche des Programms werden Datum und Uhrzeit aufgezeichnet und maximale Messdauer, Messintervall und Schnittstellenparameter definiert (Abb. 4-12).

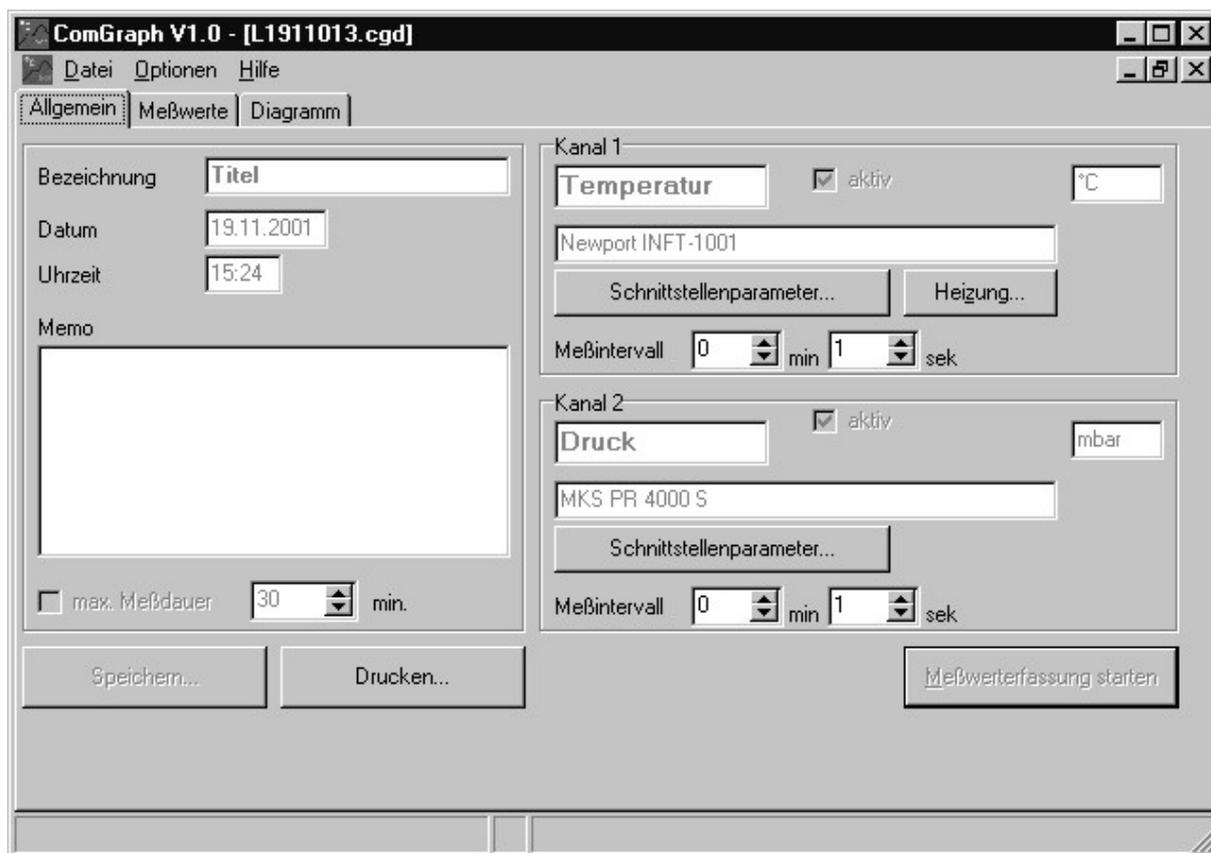


Abb. 4-12: Screenshot der Benutzeroberfläche des Datenerfassungsprogramms ComGraph V1.0. Programmierung: R Schroeder.

Schnittstellenparameter:

Betriebsgerät zur Temperaturerfassung: Newport INFINITY INFT – 1001 [26]

- Baud rate: 9600 bd
- Data bits: 7
- Stop bits: 1
- Parity: Odd
- Flow control: none
- Messintervall: 1 sec

Betriebsgerät zur Druckerfassung: MKS PR 4000 S [49]

- Baud rate: 9600 bd
- Data bits: 7
- Stop bits: 1
- Parity: Odd
- Flow control: none
- Messintervall: 1 sec

4.2 Charakterisierung der verwendeten Polymerlösungen

Die in den Gefriertrocknungsversuchen verwendeten HPMC E50 Lösungen verschiedener Konzentrationen wurden ohne Wirkstoffzusatz auf die Dichte, Viskosität und Dosiergenauigkeit hin untersucht.

4.2.1 Bestimmung der Dichte bei 20 °C

Im Folgenden soll untersucht werden, welchen Einfluss die Polymerkonzentration im Bereich zwischen 0,5 % und 1,5 % auf die Dichte der wässrigen Lösung hat.

Masse des leeren Pyknometers: 30,8633 g

HPMC-Konzentration [%]	0,5	1,0	1,5
Gesamtmasse [g] (Lösung + Pyknometer)	80,7931	80,8624	80,9245
Masse der Lösung [g]	49,9298	49,9991	50,0612
Resultierende Dichte [g/cm ³]	0,9986	1,0000	1,0012

Tabelle 2: Ergebnisse der Dichtebestimmung mit dem Pyknometer.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Dichtebestimmung der verwendeten HPMC-Lösungen. Mit steigender HPMC-Konzentration ist auch ein geringfügiger Anstieg der Dichte zu erkennen. Da allerdings die Unterschiede nur minimal sind und alle drei Werte fast 1,0 betragen, wird hier vereinfacht für alle Lösungen von einer Dichte von 1,0 g/cm³ ausgegangen. Dies entspricht dem Dichtewert des Lösungsmittels. Bei der volumetrischen Dosierung kann demnach eine Beeinflussung des Wirkstoffgehaltes der Einzeldosen durch den Polymergehalt ausgeschlossen werden. In Kapitel 4.2.3 wird dies nochmals genauer überprüft.

4.2.2 Bestimmung der Viskosität nach Ubbelohde

Die Viskosität der verwendeten Polymerlösungen kann sich ganz entscheidend sowohl auf die Lyophilisatherstellung als auch auf die Anwendung auswirken. Was Dosierbarkeit und Filtrationsfähigkeit angeht, ist eine niedrige Viskosität vorteilhaft.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Eine höhere Viskosität verlängert zwar während der Rehydratation des Lyophilisates die Kontaktzeit des Wirkstoffes am Auge und damit die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs, jedoch verstärkt sich auch das Fremdkörpergefühl im Auge und es kommt zu einer schlechteren Akzeptanz durch den Anwender.

Die kinematische Viskosität ν [cSt] errechnet sich aus der Konstanten K des verwendeten Kapillarviskosimeters und der Durchflusszeit t [s] unter Einbeziehung des Hagenbach-Korrekturfaktors.

$$\nu = K \cdot (t - \upsilon)$$

- ν kinematische Viskosität [cSt]
- K Konstante der Kapillare [cSt/s]
- t Durchflusszeit [s]
- υ Hagenbach-Korrekturfaktor [s]

Mit Hilfe der Dichte kann aus der kinematischen Viskosität die dynamische Viskosität η [cP] berechnet werden.

$$\eta = \nu \cdot \rho$$

- η dynamische Viskosität [cP]; 1 cP = 1 mPa·s
- ν kinematische Viskosität [cSt]; 1 cSt = 10^{-6} m² / s
- ρ Dichte der jeweiligen Lösung [1000 kg/m³]

Es wurde jeweils eine Kapillare II verwendet mit $K = 0,1010$ [cSt/s].

HPMC-Konzentration [%]	Durchflusszeit [s] (gemittelt n = 6)	Hagenbach-Korrekturfaktor [s]	Kinemat. Viskosität [cSt]	Dynam. Viskosität [mPa·s]
0,5	32,8	0	3,313	3,3
1,0	78,5	0,04	7,924	7,9
1,5	191,3	0,01	19,32	19,3

Tabelle 3: Ergebnisse der Viskositätsbestimmung nach Ubbelohde.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde der Logarithmus der dynamischen Viskosität [mPa·s] gegen die HPMC-Konzentration [%] graphisch aufgetragen. Die in der Spezifikation für diese HPMC angegebene Viskosität von 49 mPa·s [45] für eine 2%ige Lösung [18, 78] wurde auch in der Abb. 4-13 berücksichtigt (quadratisches Symbol).

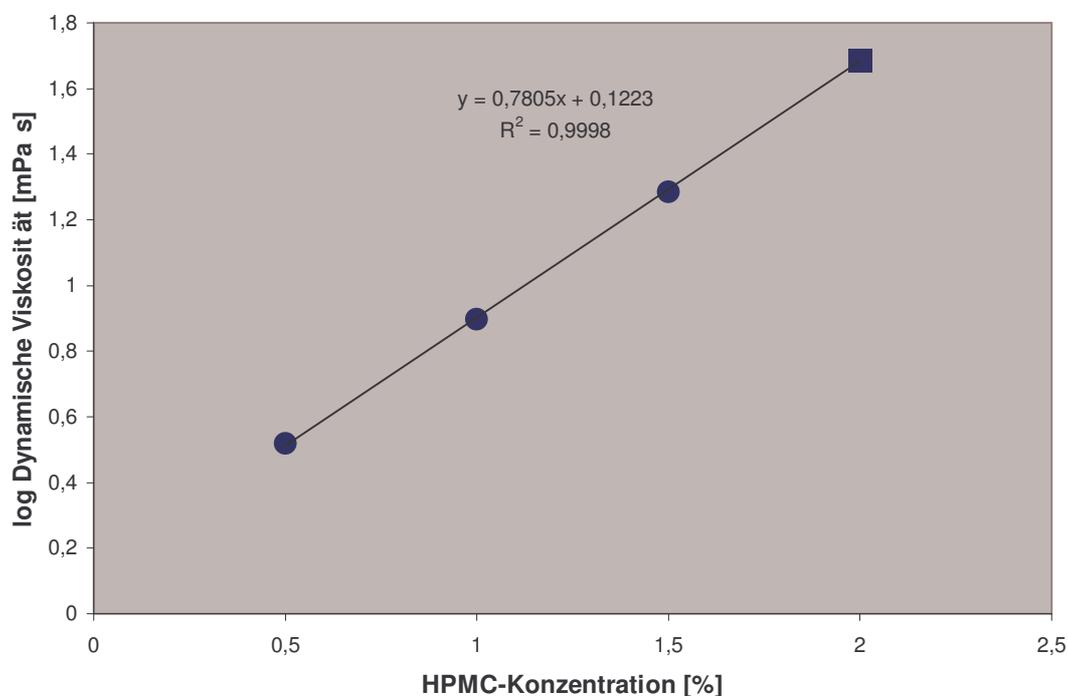


Abb. 4-13: Viskosität in Abhängigkeit von der Konzentration der HPMC-Lösung.

Die Viskosität der HPMC-Lösung steigt mit dem Polymergehalt exponentiell an. Zur besseren Interpretation der Werte dienen vergleichsweise die Viskositäten bei 20 °C von Wasser (1,008 mPa·s) und wasserfreiem Glycerol (1490 mPa·s) [8].

Die ermittelten niedrigen Viskositäten begünstigen die Handhabbarkeit beim Pipettieren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die Lösungen leicht durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm sterilzufiltrieren.

Allerdings reagiert ein Tropfen einer niedrig viskosen Lösung auf dem PTFE-Träger recht sensibel auf äußere Einflüsse wie z. B. Erschütterungen, und es besteht die Gefahr, dass der halbkugelförmige Tropfen verläuft. In diesem Fall vergrößert sich die Kontaktfläche zwischen Polymerlösung und Trägerfolie, wodurch das Lyophilisat nach dem Gefriertrocknungsprozess nur schwer oder gar nicht vom Träger abgestreift werden kann. Bei identischer Herstellung führt dies zu starken Streuungen bezüglich der Haftfestigkeit.

4.2.3 Bestimmung der Dosiergenauigkeit der verwendeten Pipette

Um die Gleichförmigkeit der Dosierung bei den Einzeltropfen zu überprüfen, wurden von jeder Lösung zweimal die Massen von je 30 Einzeltropfen (Volumen 25 µL) bestimmt.

HPMC-Konzentration [%] Messung:	0,5	0,5	1,0	1,0	1,5	1,5
	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Maximum [mg]	25,0	25,3	25,2	27,8	25,0	25,6
Minimum [mg]	23,1	22,5	22,3	22,4	23,4	23,0
Mittelwert [mg]	24,1	24,1	24,1	24,2	24,3	24,2
Standardabweichung [mg]	0,53	0,62	0,66	1,02	0,43	0,79
Rel. Standardabweichung [%]	2,2	2,6	2,8	4,2	1,8	3,3

Tabelle 4: Ergebnisse der Bestimmung der Pipettendosiergenauigkeit.

In Tabelle 4 lässt sich eine geringfügige Tendenz dazu erkennen, dass die Tropfenmasse mit steigendem Polymergehalt minimal zunimmt. Dies bestätigt nochmals die Ergebnisse der Dichtebestimmung. Allerdings beträgt der mittlere Massenunterschied zwischen einem Tropfen der 0,5%igen HPMC-Lösung und der 1,5%igen weniger als 1 % und kann deshalb hier vernachlässigt werden.

Deutlicher fällt dagegen der Unterschied zum erwarteten Durchschnittsgewicht aus. Statt des erwarteten Sollwertes von 25 mg hatten die Tropfen im Mittel nur eine Masse von 24,2 mg. Das bedeutet, die verwendete Dosierpipette führt zu einer Unterdosierung von etwa 3,2 %.

Die relativen Standardabweichungen zwischen 1,8 und 4,2 % sprechen für eine gute Gleichförmigkeit der Dosierung. Man kann daher davon ausgehen, dass innerhalb einer Versuchsreihe Unterschiede des Gehaltes nicht auf eine Ungenauigkeit bei der Dosierung zurückzuführen sind.

4.3 Gefriertrocknung

In der Literatur wird vielfach erwähnt, dass die Einfrierbedingungen die Struktur eines Lyophilisates maßgeblich beeinflussen können [29, 34, 50, 54, 57, 66]. Da die Lyophilisate im Falle der OLCS in direktem Kontakt mit der Trägerfolie stehen, sollte eine Veränderung der Porenstruktur direkten Einfluss auf die Haftfestigkeit haben.

Um den Einfluss verschiedener Einfrierbedingungen auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate untersuchen zu können, ist es jedoch notwendig, die Temperaturverläufe im Produkt genau zu erfassen und wenn möglich zu quantifizieren, um sie mit den Haftfestigkeiten zu korrelieren.

Im Mini-Gefriertrockner war es möglich, die Temperatur im Einzeltropfen zu messen. Es sollten definierte Einfriermethoden entwickelt und deren Reproduzierbarkeit überprüft werden.

4.3.1 Verlauf der Einfrier- und Trocknungskurven

Im folgenden Versuch wurde der Temperaturverlauf in einem Tropfen Polymerlösung (1 % HPMC E50) mit dem Datenerfassungsprogramm ComGraph V1.0 ermittelt (vgl. Kapitel 4.1.4) und interpretiert.

Anhand von Abb. 4-14 soll der generelle Verlauf von Einfrier- und Trocknungskurven genauer erläutert werden.

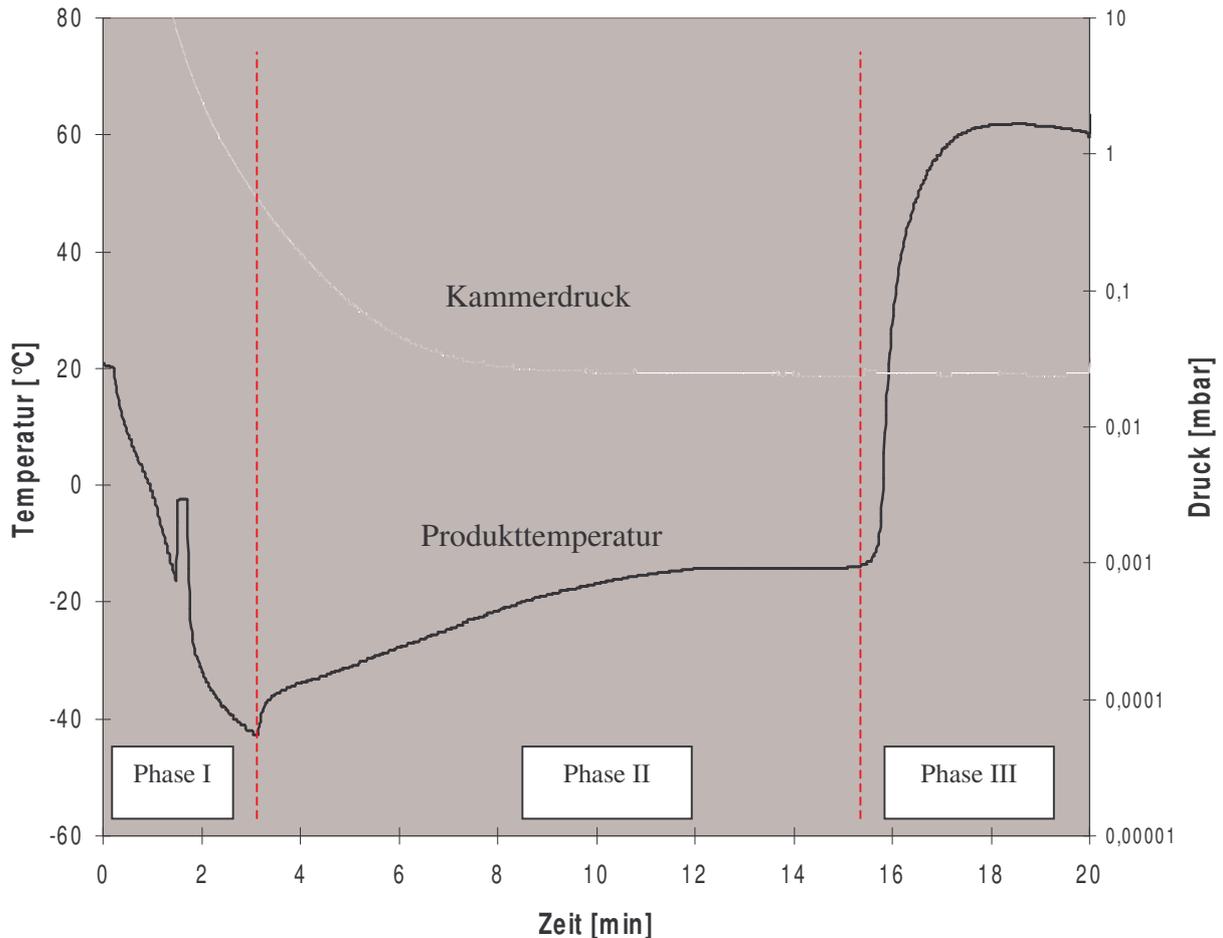


Abb. 4-14: Produkttemperatur und Kammerdruck während des Gefriertrocknungszyklus (Das Vakuum wurde direkt nach Einbringen der Probe angelegt. Ventilstellung V = 600).

Phase I : Einfrieren

Zu Beginn hat die Probe Raumtemperatur. Das eingebettete Thermoelement misst in diesem Fall etwas über 20 °C. Nach dem Einbringen des Produkthalters in die Trockenkammer beginnt durch die tiefkalte Kondensatorfläche, hier zusätzlich unter Zuhilfenahme von Vakuum, die Abkühlung der Probe. Da es sich bei der Probe um eine sterilfiltrierte Lösung handelt, unterkühlt die Lösung bis etwa -16 °C. Mit der Bildung der ersten Kristallisationskeime wird Gitterenergie frei und es kommt zu einem sprunghaften Temperaturanstieg. Es folgt eine Plateauphase, die auf die Freisetzung von Kristallisationsenergie hindeutet, da trotz konstantem Wärmeentzug durch die Umgebung keine Temperaturveränderung erfolgt [66]. Die Plateautemperatur ist abhängig von der Konzentration gelöster Stoffe in der einzufrierenden Lösung. Da die im Folgenden verwendeten Lösungen nur geringe Feststoffkonzentrationen enthalten (< 2 %), ist ihre Gefrierpunktserniedrigung gering. Die Lösungen frieren 1 bis 4 °C unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser ein.

Nachdem die Lösung vollständig durchgefroren ist, also keine Kristallisationsenergie mehr freigesetzt wird, kühlt das Eis sehr schnell ab und nähert sich der Temperatur an, die nach der Dampfdruckkurve des Eises durch das Endvakuum in der Trockenkammer vorgegeben ist. Dies ist an einem leichten Abflachen der Temperaturkurve erkennbar. Das Endvakuum beträgt in diesem Fall 0,024 mbar, die asymptotische Endtemperatur entspräche demnach -54 °C.

Phase II : Primärtrocknung / Sublimationstrocknung

Nachdem die Probe eine ausreichend tiefe Temperatur erreicht hat, in diesem Fall unter -40 °C, wird die Infrarotheizung (IR-Heizung) mit einer Heizleistung von ca. 8 W (Heizspannung 7 V bei ca. 1,1 A) zugeschaltet. Es kommt sofort zu einer deutlichen Erwärmung des Eises. Die Eistemperatur steigt nun während der Trocknung kontinuierlich an, bis sich die Wärmezufuhr durch die IR-Heizung und der Wärmeentzug, zum einen durch die zur Sublimation benötigte Wärmeenergie, zum anderen durch die kalte Kondensatorfläche, kompensieren. Die Produkttemperatur bleibt nun konstant und es ergibt sich ein weiteres Plateau.

Jetzt sind Heizungs- und Produkttemperatur sowie der Kammerdruck konstant, es herrscht der angestrebte, kontrollierte Gefriertrocknungsprozess [29]. Wenn das gefrorene Bulkwasser gegen Ende der Gefriertrocknung weitestgehend entfernt ist und die Sublimationsgeschwindigkeit zurückgeht, steigt die Produkttemperatur an.

Phase III: Sekundärtrocknung

Ist auch das letzte Eis sublimiert, kommt es zu einem starken Temperaturanstieg. Der Endpunkt der Sublimationsphase lässt sich durch den nahezu senkrecht ansteigenden Temperaturverlauf eindeutig und sehr genau detektieren. Das Lösungsmittel ist nun vollständig entfernt. Es herrscht jedoch eine gewisse Restfeuchte durch Haft- und Hydratwasser. Um diese möglichst gering zu halten, wird das Produkt bei Endvakuum noch kurze Zeit einer erhöhten Temperatur ausgesetzt. So werden noch adsorbierte Wassermoleküle entfernt.

Dann wird die Heizung ausgeschaltet, die Trockenkammer kann belüftet und das fertige Produkt entnommen werden.

Mit Hilfe der sehr kleinen Messspitze des Thermoelementes und der extrem kurzen Ansprechzeit war es möglich, selbst in einem Tropfen von nur 25 µL Volumen, den Temperaturverlauf sehr genau zu erfassen. Ein Vergleich mit dem von Rahm

gegebenen Beispiel für den gesamten Temperaturverlauf einer Gefriertrocknung zeigt deutlich, dass der Gefriertrocknungszyklus im Mini-Gefriertrockner mit dem konventioneller Gefriertrockner durchaus vergleichbar ist (Abb. 4-15) [61]. Allein durch die deutlich kürzere Dauer der einzelnen Phasen ergeben sich kleine Unterschiede. So sind im eben beschriebenen Beispiel für das Auskristallisieren der reinen Eiskristalle und das Durchfrieren des Eutektikums keine getrennten Plateauphasen detektierbar. Das liegt an der kurzen Einfrierphase von nur etwa 3 Minuten im Mini-Gefriertrockner im Vergleich zu den 6 Stunden bei Rahm [61].

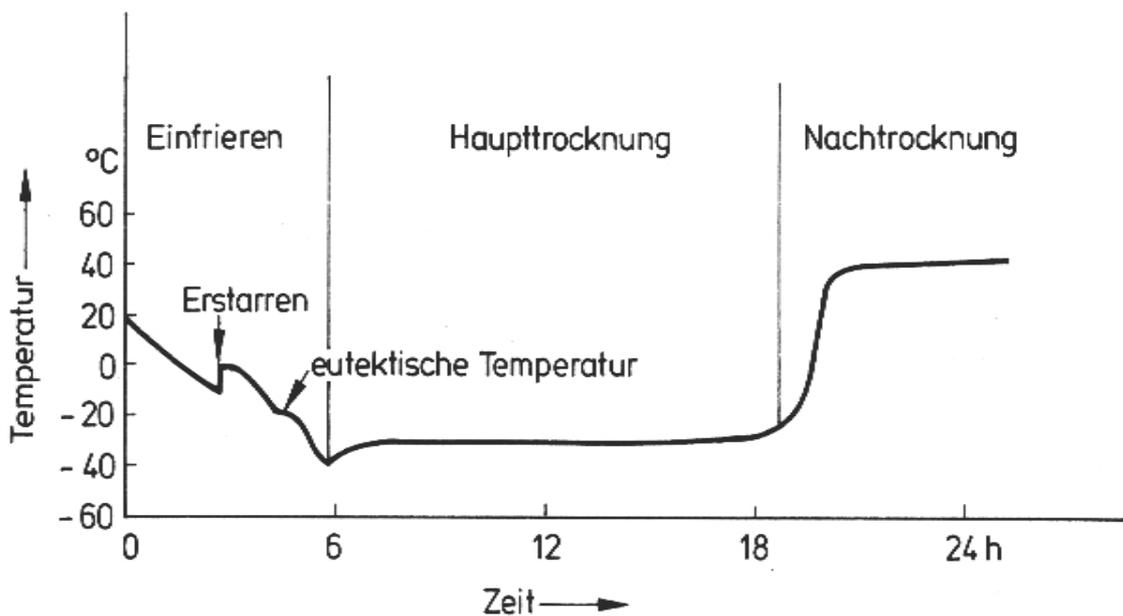


Abb. 4-15: Verlauf der Produkttemperatur bei der Gefriertrocknung, nach Rahm [61].

4.3.2 Entwicklung verschiedener Einfriermethoden

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich unterschiedliche Einfrierbedingungen durch gezielte Veränderung der Prozessparameter einstellen lassen.

Durch die Kombination von normalem Einfrieren, aufgrund von Wärmeentzug durch das von der Kondensatorfläche gekühlte Gas in der Trockenkammer, und vakuuminduziertem Einfrieren (vgl. Kapitel 2.4) mit verschiedenen, diskreten Evakuiergeschwindigkeiten, wurden unterschiedliche Einfriermethoden entwickelt.

Dabei ist die langsamste Einfriergeschwindigkeit durch die Geometrie und Anordnung des Kondensators vorbestimmt. Die durch Kontakt mit dem Flüssigstickstoff-Reservoir gekühlte Kondensatorfläche entzieht dem Gas in der Trockenkammer

kontinuierlich Wärmeenergie und kühlt dadurch indirekt die Probe, bis es schließlich unter Atmosphärendruck zur Kristallisation kommt.

Durch zusätzliches Evakuieren der Trockenkammer von Beginn an, mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, ließen sich verschiedene schnellere Durchfriergeschwindigkeiten erreichen [41]. Die Evakuiergeschwindigkeit wurde über ein Nadelfeinventil mit Analoganzeige reguliert. In Abb. 4-16 ist der vom Hersteller angegebene Zusammenhang zwischen der Ventilstellung und dem Gasfluss für Luft bei 1 bar Differenzdruck für den bei unterschiedlichen Einfrierbedingungen genutzten Bereich dargestellt [55]. Diese Werte wurden als Evakuiergeschwindigkeiten übernommen.

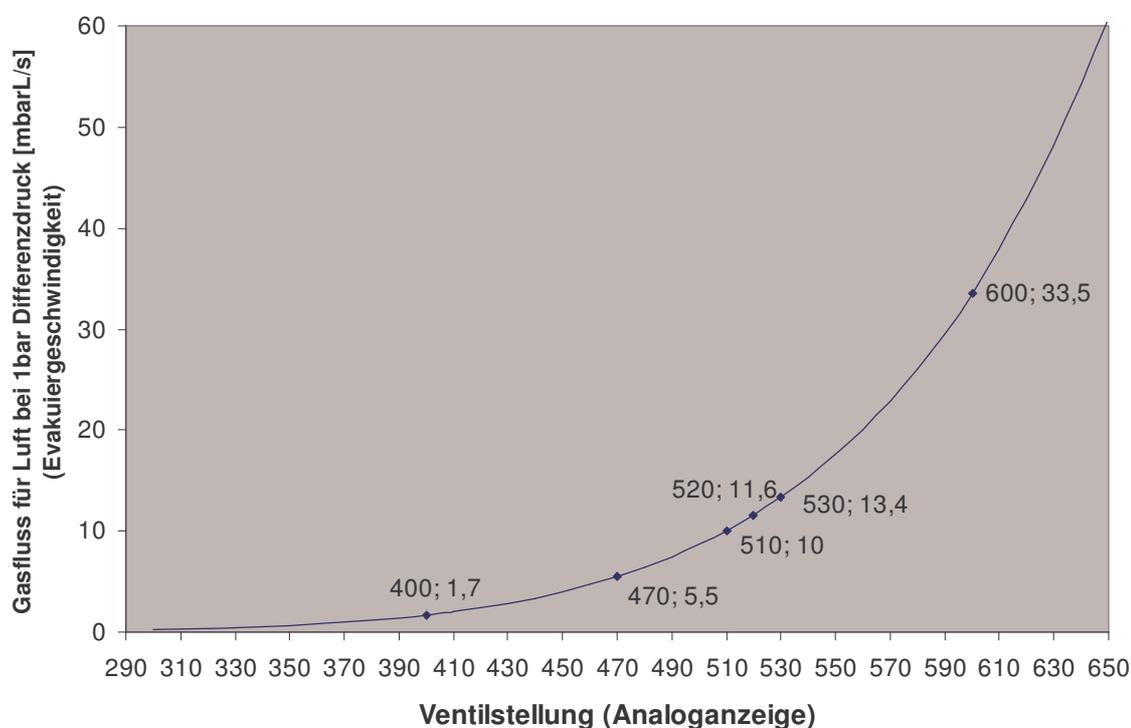


Abb. 4-16: Zusammenhang zwischen Ventilstellung und Evakuiergeschwindigkeit.

Verschiedene Druckprofile (je $n = 2$) mit zugehöriger Ventilstellung und der sich daraus ergebenden Gasflussrate sind in Abb. 4-17 wiedergegeben.

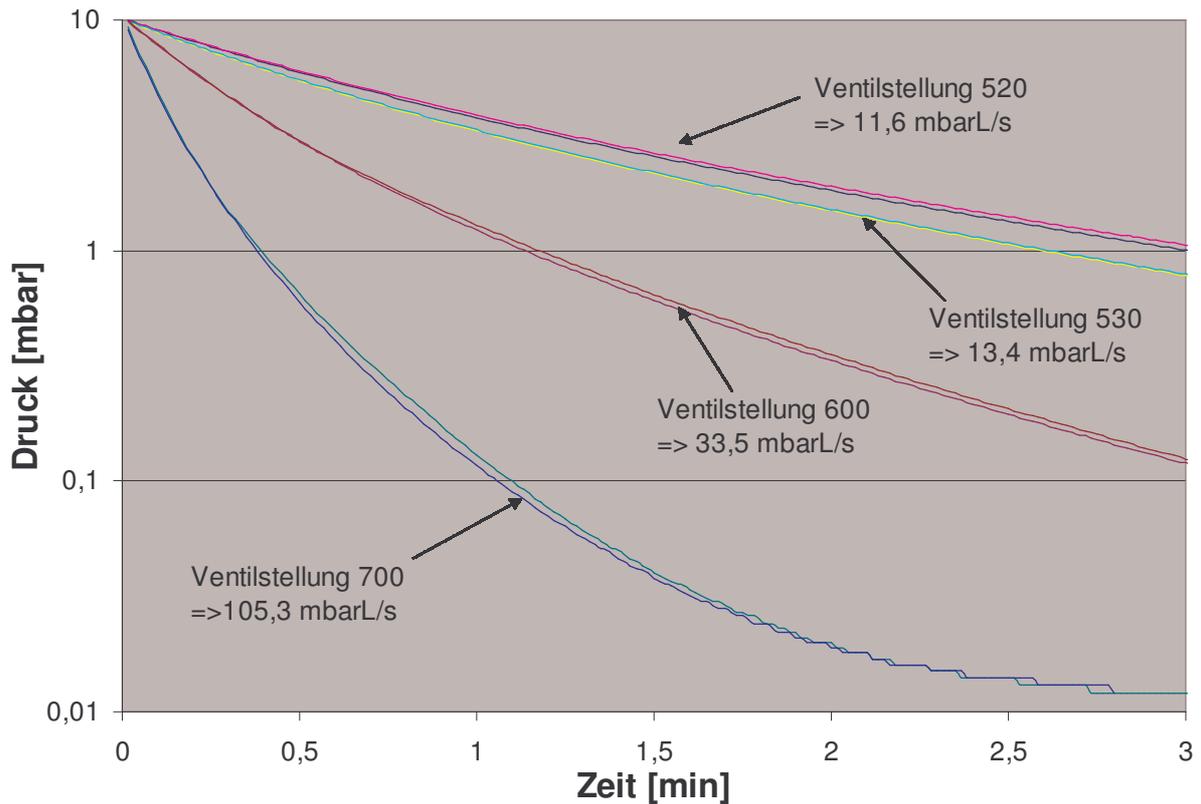


Abb. 4-17: Druckverlauf in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Evakuiergeschwindigkeiten.

Abb. 4-18 zeigt vier unterschiedliche Einfrierkurven mit dazugehörigem Verlauf des Kammerdrucks, die in diesem Versuch ermittelt wurden. Die durchgezogene, dicke Kurve beschreibt das Einfrierverhalten unter Atmosphärendruck. Das Vakuum wurde hier erst nach dem vollständigen Durchfrieren der Probe angelegt. Die zugehörige Druckkurve beginnt daher erst nach dem Plateau der Produkttemperatur. Bei dieser Einfriermethode beträgt die Dauer der Plateauphase 1,08 Minuten. Das ist die Zeit, in der die Eiskristalle wachsen können. Für einen langsamen Einfrierprozess spricht der schwache aber kontinuierliche Abfall der Temperatur während der Plateauphase [68]. Nachdem die Kristallisation im unteren Bereich des Tropfens eingesetzt hat, erkennbar durch den steilen Temperaturanstieg, der durch die freiwerdende Kristallisationswärme bedingt ist, wird die Eismatrix langsam dicker und die Eistemperatur sinkt langsam ab, bis schließlich die ganze Probe durchgefroren ist. Danach fällt die Temperaturkurve steil ab [50].

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Beim Einfrieren unter gleichzeitigem Evakuieren verkürzt sich die Dauer dieses Plateaus umso stärker, je höher die Evakuiergeschwindigkeit gewählt wurde (Tabelle 5). Bei einer Ventilstellung von 600 (durchgezogene, dünne, schwarze Kurve in Abb. 4-18) beträgt sie nur noch 0,22 Minuten. Der zusätzliche schnelle Wärmeentzug an der Grenzfläche Lösung / Gas in Form von Verdampfungs- und Sublimationswärme bewirkt einen schnellen Entzug der Kristallisationswärme.

Der Evakuiergeschwindigkeit sind allerdings Grenzen gesetzt. Durch in der Lösung eingeschlossenes Gas, welches beim Vermindern des Kammerdruckes expandiert, kommt es bei schnellem Evakuieren zur Ausbildung von Gasblasen in der Probe, die dann während des Durchfrierens platzen und die Matrix zerstören (sog. Frothing) [29].

Nach dem vollständigen Durchfrieren der Proben, erkennbar an dem steilen Abfall der aufgezeichneten Temperaturkurven nach dem Plateau, wurde dann in den Fällen geringer Evakuiergeschwindigkeit (Ventilstellung < 600), diese auf 105,3 mbarL/s (Ventilstellung 700) erhöht, um möglichst schnell das endgültige Prozessvakuum zu erreichen. Dies ist an einem deutlichen Knick in der aufgezeichneten Druckkurve zu erkennen (Abb. 4-18, Ventilstellung 530).

Ventilstellung	Unterkühlung [°C]	Gefrierpunkt [°C]	Beginn des Einfrierens [min]	Dauer der Plateauphase [min]
Geschlossen (0)	-18,6	-3,1 (bis -9)	2,30	1,08
470	-16,3	-2,4	2,83	0,57
530	-15,8	-1,6	2,11	0,37
600	-16,3	-2,4	1,50	0,22

Tabelle 5: Einfrierbedingungen in Abhängigkeit von der Ventilstellung. Ausgangslösung mit 0,816 % Fluorescein-Natrium und 1,0 % HPMC E50.

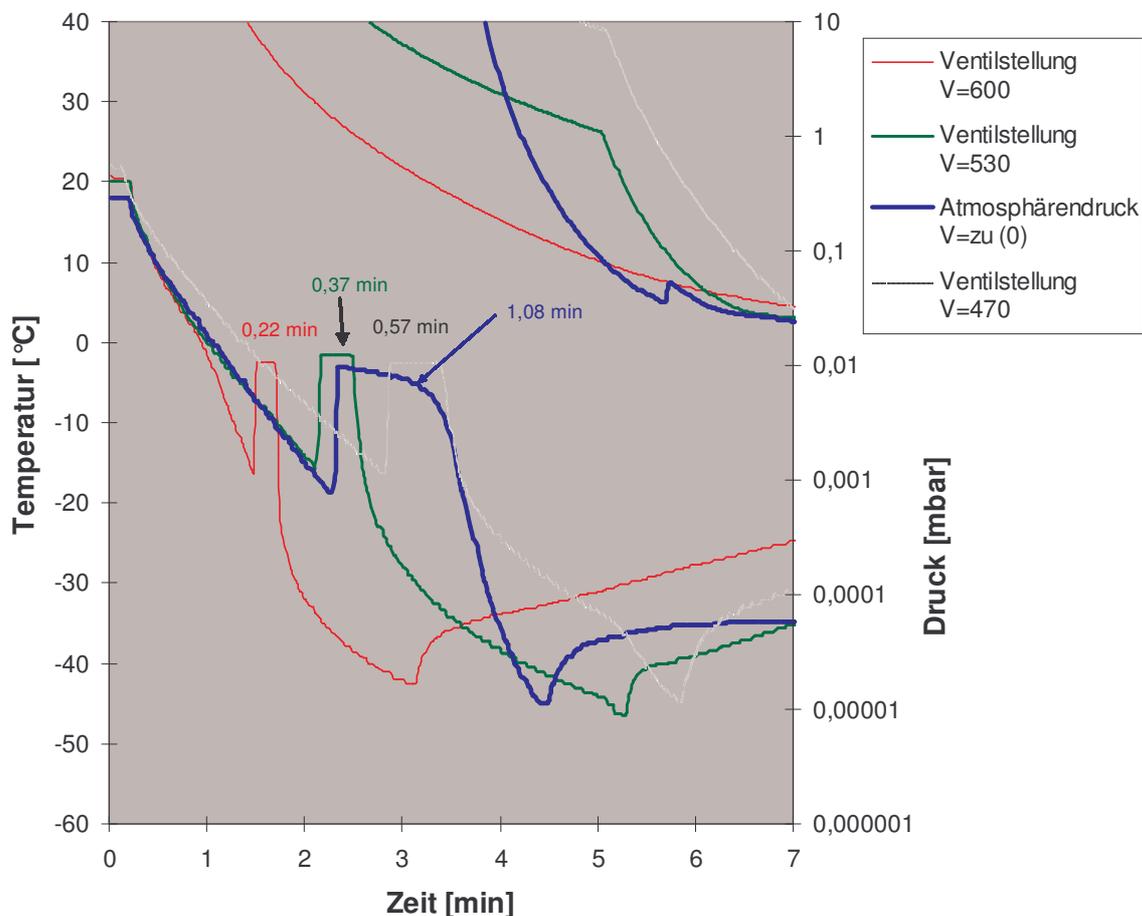


Abb. 4-18: Temperatur- und Druckverläufe verschiedener Einfrieremethoden. Ausgangslösung mit 0,816 % Fluorescein-Natrium und 1,0 % HPMC E50.

Eine kurze Plateauphase bedeutet, dass die Kristallisation entsprechend schnell erfolgt. Es sollte eine heterogene Eisstruktur mit im Durchschnitt kleineren Kristallen entstehen, als dies bei einer langen Plateauphase, z. B. beim Einfrieren unter Atmosphärendruck, der Fall ist [66]. Wie bereits erwähnt, sind Kristallgröße und Kristallform des Eises entscheidend für die Porenstruktur des Lyophilisates. Dadurch sollte sich auch die Haftfestigkeit der Lyophilisate auf der Trägerfolie verändern. Ob und in welchem Ausmaß dies der Fall ist, wird in Kapitel 4.4.1.1 näher untersucht.

4.3.3 Reproduzierbarkeit von Einfrier- und Trocknungsbedingungen

Untersucht werden sollte, ob sowohl die verschiedenen Einfriermethoden als auch die zugehörigen Trocknungsverläufe reproduziert werden können.

Für drei unterschiedliche Einfrier- und Trocknungszyklen wurden jeweils 8 Kurven aufgezeichnet und ausgewertet. Die Konzentrationen der Ausgangslösung betragen 0,816 % Fluorescein-Natrium und 1,0 % HPMC E50.

Methode 1 (Tabelle 6, Abb. 4-19):

Langsames Einfrieren bei Atmosphärendruck

Der Probenhalter wird in die Trocknungskammer eingebracht, ohne dass diese evakuiert wird. Die Abkühlung erfolgt hier also ausschließlich durch Wärmeentzug über Konvektion durch die kalte Kondensatorfläche. Da in der Kammer Atmosphärendruck herrscht, ist dieser Effekt stark genug ausgeprägt, um in kurzer Zeit die Kristallisation auszulösen. Der Tropfen friert langsam durch.

	Unterkühlung [°C]	Gefrierpunkt [°C]	Beginn des Ein- frierens [min]	Dauer der Plateau- phase [min]
	-20,7	-3,7 (bis -9)	2,08	0,95
	-18,6	-3,1 (bis -9)	2,30	1,12
	-16,9	-3,0 (bis -9)	1,97	1,10
	-18,8	-4,0 (bis -9)	2,02	1,12
	-21,5	-5,4 (bis -10)	2,02	1,00
	-21,1	-4,6 (bis -9)	2,10	1,02
	-20,3	-4,4 (bis -10)	2,05	1,00
	-20,5	-4,9 (bis -9)	2,18	1,02
Minimum	-21,5	-5,4	1,97	0,95
Maximum	-16,9	-3,0	2,30	1,12
Mittelwert	-19,80	-4,14	2,09	1,04
St.Abw.	1,56	0,85	0,11	0,06
Rel.St.Abw. [%]	7,87	20,51	5,06	6,13

Tabelle 6: Methode 1: Einfrierparameter (n = 8).

Nach etwas mehr als 3 Minuten ist hier der Tropfen vollständig gefroren. Um schnell das angestrebte Endvakuum von 0,02 mbar zu erhalten, wird mit 105,3 mbarL/s (Ventilstellung 700) evakuiert. Nach 4,5 Minuten wird die Strahlungsheizung (Heizleistung etwa 8 W) eingeschaltet. Die Sublimationstrocknung ist im Durchschnitt

nach 16,5 Minuten beendet. Die Dauer der Primärtrocknung beträgt etwa 12 Minuten.

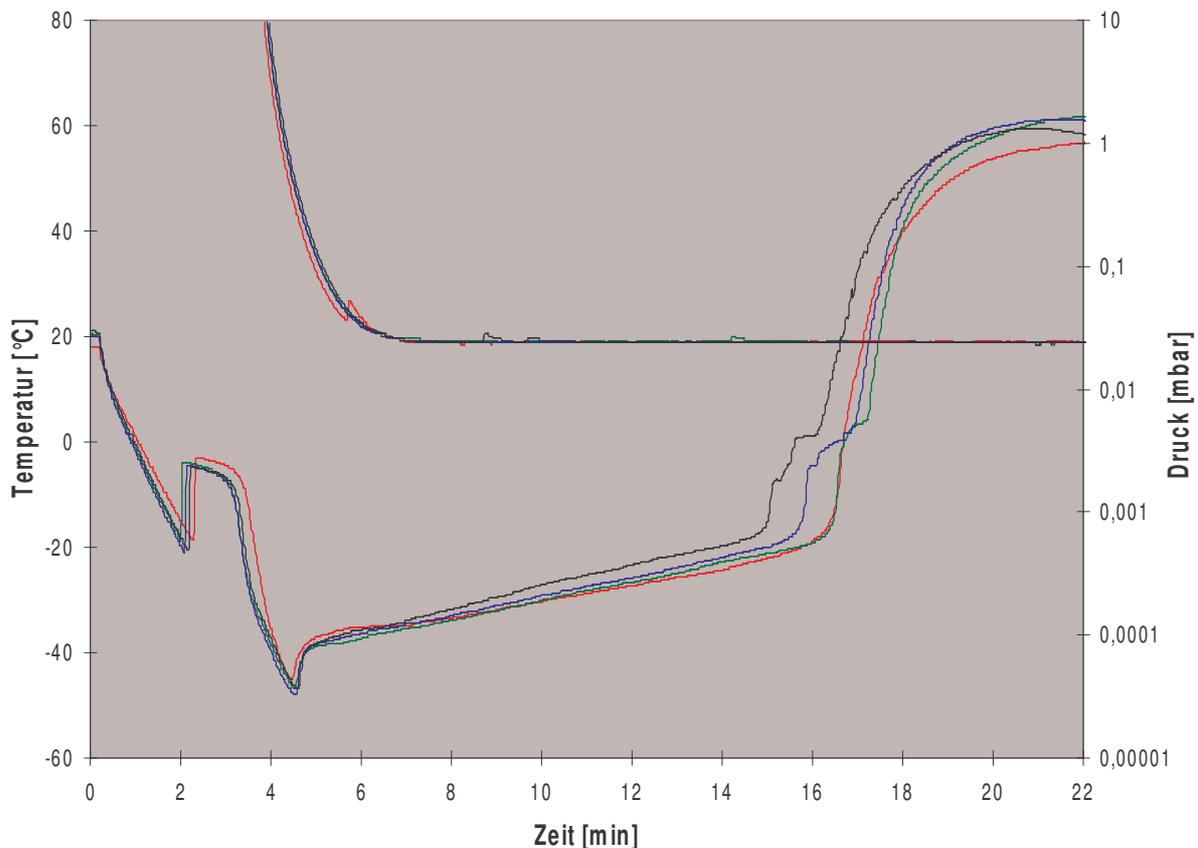


Abb. 4-19: Methode 1: Produkttemperatur und Druckverlauf (Einfrieren unter Atmosphärendruck).

Methode 2 (Tabelle 7, Abb. 4-20):

Mittleres Einfrieren bei Ventilstellung 530 / Evakuiergeschwindigkeit 13,4 mbarL/s

Nach Einbringen des Probenhalters in die Trocknungskammer wird diese langsam evakuiert. Die Abkühlung durch entzogene Verdampfungswärme an der Oberfläche der Probe und der Wärmeentzug über Konvektion durch die kalte Kondensatorfläche führen zu einem deutlich schnelleren Durchfrieren des Tropfens.

Nach etwa 2,5 Minuten ist der Tropfen vollständig gefroren. Da der Kammerdruck zu diesem Zeitpunkt erst 10 mbar beträgt, wird die Evakuiergeschwindigkeit nach 5 Minuten auf 105,3 mbarL/s (Ventilstellung 700) erhöht, um schnell das angestrebte Endvakuum einzustellen. Dies ist an einem deutlichen Knick in der Druckkurve zu erkennen. Kurz darauf wird die Strahlungsheizung eingeschaltet. Ab jetzt beginnt wiederum die Sublimationstrocknung. Im Durchschnitt nach 17 Minuten ist diese beendet, erkennbar an dem steilen Anstieg der Produkttemperatur. Da die Heizung erst

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

nach 5 Minuten zugeschaltet wurde, beträgt auch hier die Dauer der Primärtrocknung etwa 12 Minuten.

	Unterkühlung [°C]	Gefrierpunkt [°C]	Beginn des Einfrierens [min]	Dauer der Plateauphase [min]
	-17,6	-1,6	2,35	0,284
	-16,2	-2,8	2,15	0,367
	-16,8	-2,1	2,37	0,317
	-18,0	-2,8	2,18	0,317
	-19,9	-2,6	2,50	0,250
	-18,4	-2,9	2,25	0,317
	-18,1	-2,6	2,40	0,317
	-15,8	-1,6	2,13	0,350
Minimum	-19,9	-2,9	2,13	0,25
Maximum	-15,8	-1,6	2,50	0,367
Mittelwert	-17,60	-2,38	2,29	0,31
St.Abw.	1,32	0,54	0,13	0,04
Rel.St.Abw. [%]	7,49	22,59	5,83	11,47

Tabelle 7: Methode 2: Einfrierparameter (n = 8)

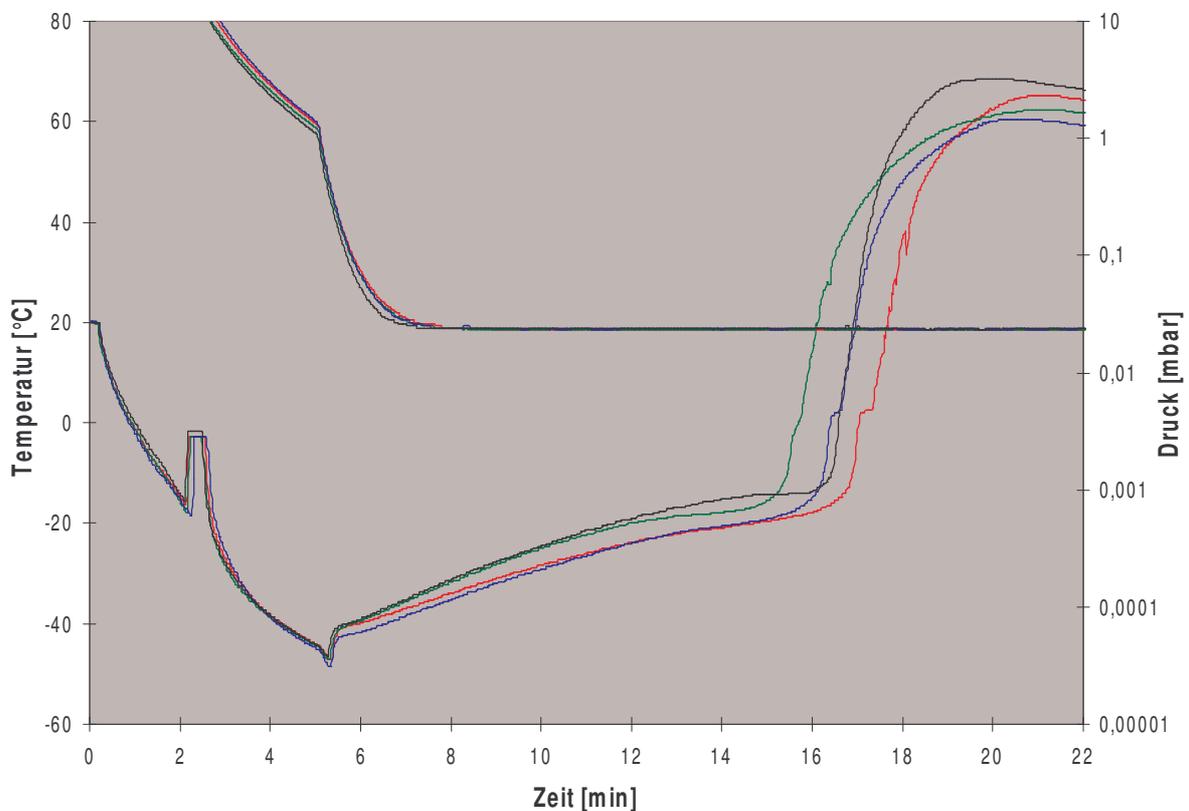


Abb. 4-20: Methode 2: Produkttemperatur und Druckverläufe (Langsames vakuuminduziertes Einfrieren).

Es ist zu vermuten, dass für eine gleichförmige Haftfestigkeit der Lyophilisate auf dem Applikator möglichst identische Einfrierkurven entscheidend sind. Zur Verdeutlichung der guten Reproduzierbarkeit zeigt Abb. 4-21 noch einmal vergrößert eine Zusammenstellung von Einfrierkurven aus Methode 2 (Ventilstellung 530).

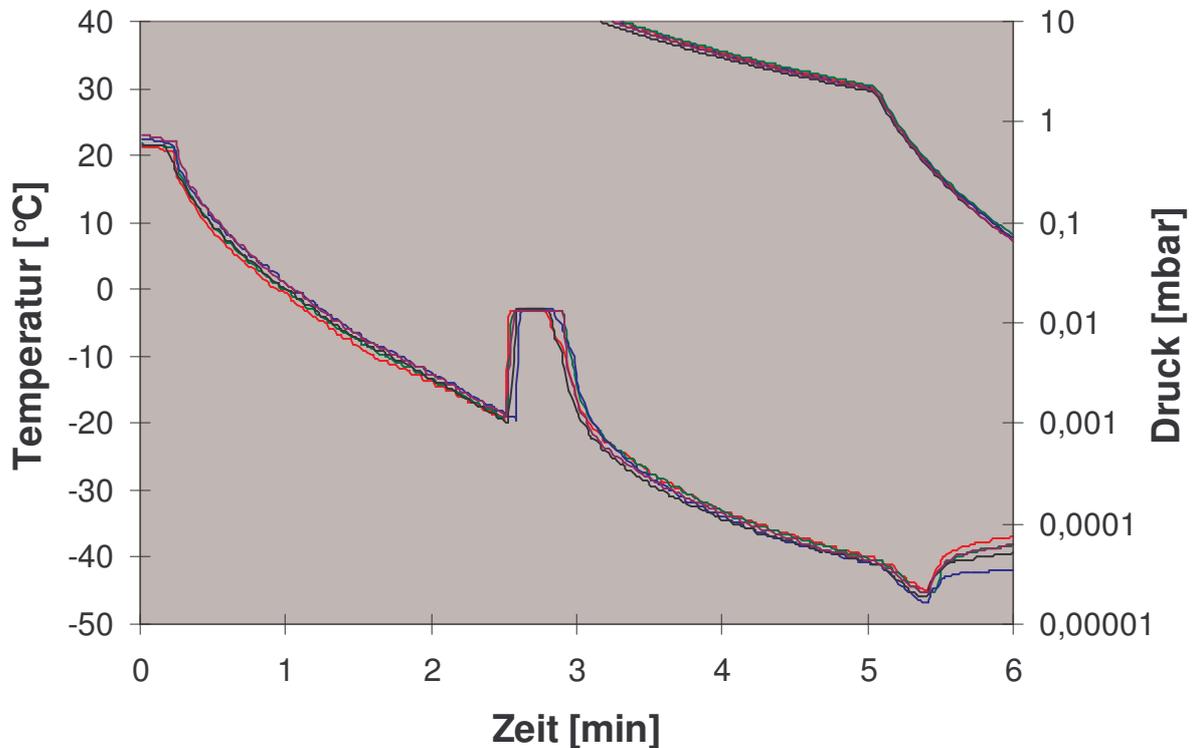


Abb. 4-21: Mehrere Einfrierkurven mit zugehörigen Druckverläufen nach Methode 2. Die Abbildung verdeutlicht die gute Reproduzierbarkeit des Mini-Gefriertrockners.

Methode 3 (Tabelle 8, Abb. 4-22):

Schnelles Einfrieren bei Ventilstellung 600 / Evakuiergeschwindigkeit 33,5 mbarL/s

Direkt nach Einbringen des Probenhalters mit dem flüssigen Tropfen auf dem PTFE-Applikator wird die Trocknungskammer schnell evakuiert. Dadurch ergibt sich ein starker Wärmeentzug durch verdampfendes Lösungsmittel an der Oberfläche des Tropfens. Dies führt zu einem noch schnelleren Durchfrieren der Probe, als es bei Methode 2 der Fall ist.

Der zusätzliche Wärmeentzug durch die kalte Kondensatorfläche bleibt hier vergleichsweise gering, da die Konvektion durch das zunehmende Vakuum behindert wird. Nach nicht einmal 2 Minuten ist der Tropfen vollständig gefroren, die Temperatur fällt steil ab.

	Unterkühlung [°C]	Gefrierpunkt [°C]	Beginn des Ein- frierens [min]	Dauer der Plateau- phase [min]
	-14,4	-2,1	1,58	0,217
	-16,9	-2,6	1,55	0,183
	-18,1	-2,5	1,63	0,183
	-17,4	-2,9	1,53	0,167
	-15,8	-2,2	1,50	0,200
	-17,9	-2,9	1,45	0,200
	-17,4	-2,4	1,57	0,183
	-16,3	-2,4	1,50	0,183
Minimum	-18,1	-2,9	1,45	0,167
Maximum	-14,4	-2,1	1,63	0,217
Mittelwert	-16,78	-2,50	1,54	0,19
St.Abw.	1,23	0,29	0,06	0,02
Rel.St.Abw. [%]	7,35	11,71	3,65	8,11

Tabelle 8: Methode 3: Einfrierparameter (n = 8)

Da der Kammerdruck schon unter 1 mbar abgesunken ist, wird die Evakuiergeschwindigkeit nicht zusätzlich erhöht. Das angestrebte Endvakuum von 0,02 mbar stellt sich auch so ausreichend schnell ein. Kurz darauf, nachdem die Temperaturkurve beginnt abzuflachen, wird die Strahlungsheizung eingeschaltet. Das ist hier nach etwa 3 Minuten der Fall. Ab jetzt beginnt die Sublimationstrocknung. Sie ist bei dieser Methode ebenfalls im Durchschnitt 12 Minuten nach dem Einschalten der Heizung abgeschlossen.

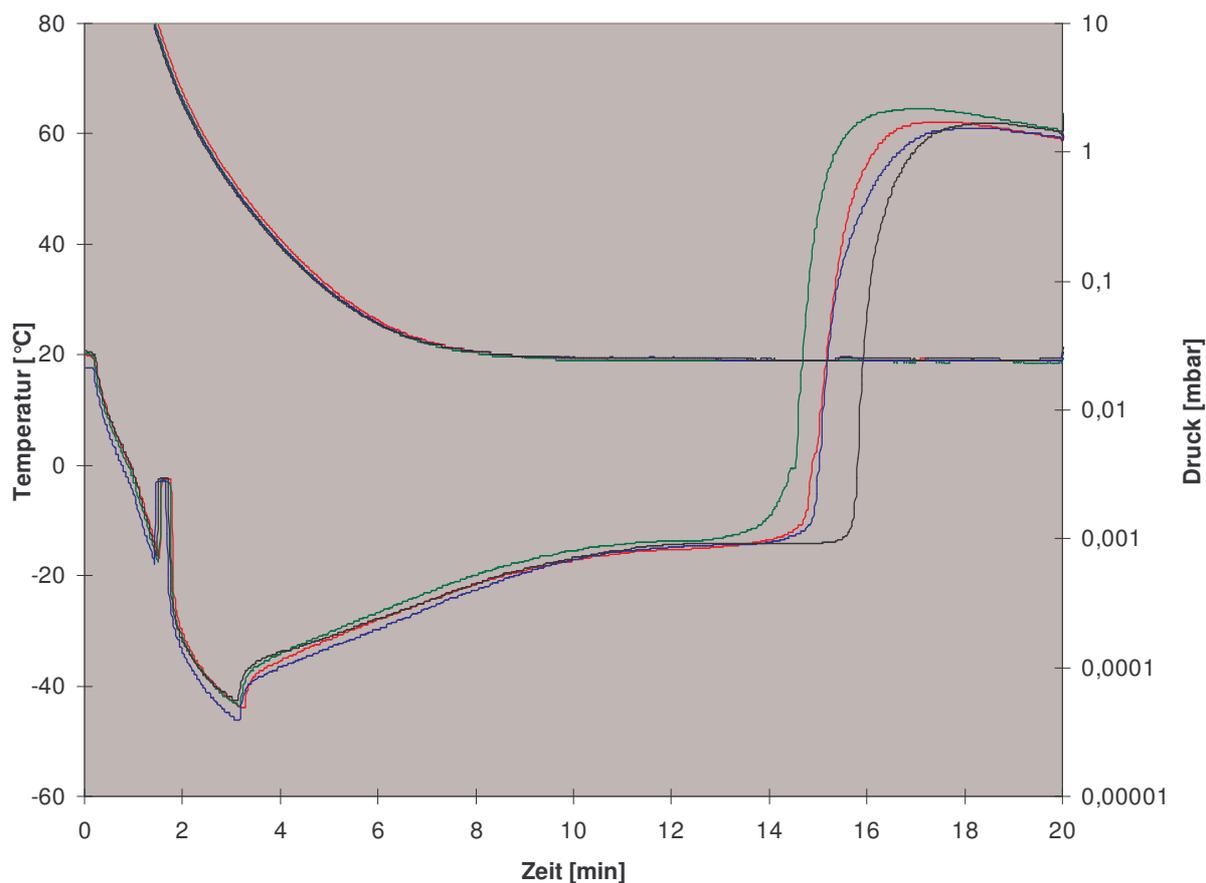


Abb. 4-22: Methode 3: Produkttemperatur und Druckverlauf (Schnelles vakuuminduziertes Einfrieren).

Auffällig ist, dass die Trocknungskurven sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärtrocknungsphase zum Teil deutlich voneinander abweichen. Dieses Phänomen ist bei der Messung der Produkttemperatur während der Gefriertrocknung durchaus bekannt. Thermoelemente wie auch temperaturabhängige Widerstände messen immer nur ihre eigene Temperatur. Die ihrer Umgebung messen sie nur, wenn sie in engem Kontakt mit ihr stehen. Die Bedingung des engen Kontaktes ist allerdings nur ganz zu Beginn der Primärtrocknungsphase erfüllt. Danach hängt der gemessene Temperaturwert ganz entscheidend von der Lage des Sensors im Produkt ab. So wurden zum Beispiel zwischen zwei Flaschen der gleichen Charge während der Primärtrocknung Temperaturunterschiede von 10 °C bis 15 °C gemessen [54]. Schelenz et al. zeichneten unter anderem die Temperaturprofile an unterschiedlichen Stellen im Glasvial in einer 30 mL Mannitollösung auf (Abb. 4-23 a und b) [69].

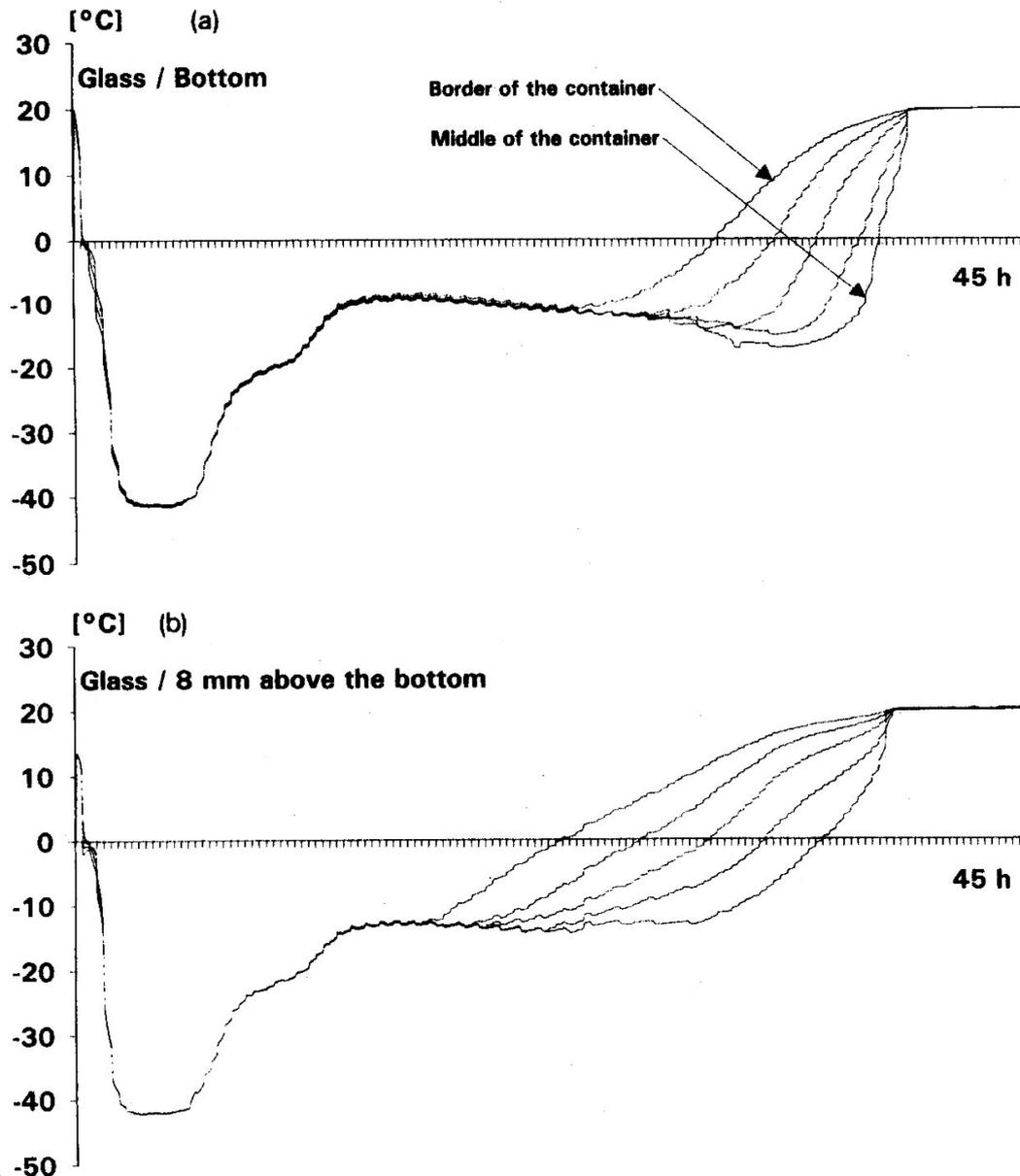


Abb. 4-23 (a) und (b): Temperaturverlauf in Abhängigkeit von der Position des Temperatursensors im Gefriertrockengut [69].

(a): verschiedene Messpositionen am Boden des Glasvials

(b): verschiedene Messpositionen 8 mm über dem Boden des Glasvials

Erwähnenswert ist zudem die Tatsache, dass sich trotz einer um den Faktor 5 längeren Durchfrierzeit (Plateauphase) bei Methode 1 im Vergleich zu Methode 3 (vgl. Abb. 4-18) keine Verkürzung der Primärtrocknungsphase ergibt. Wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, hat die Einfriereschwindigkeit Auswirkungen auf die Porengröße des Lyophilisates. Schnelles Einfrieren erzeugt kleine Eiskristalle und somit kleine Poren, die für den noch zu sublimierenden Wasserdampf einen Widerstand darstellen. Dies führt zu einer Verlängerung der Trocknungszeit gegenüber Proben, die langsamer eingefroren wurden. Scheinbar sind hier bei allen drei

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Methoden die Durchfriereschwindigkeiten absolut gesehen noch so hoch, dass sich nach dem Gefriertrocknen kein wesentlicher Unterschied in der Porengröße ergibt. Zumindest ist kein Einfluss auf die Sublimationsrate erkennbar.

Unter Berücksichtigung des Einflusses, den die Lage des Thermoelementes auf die gemessene Produkttemperatur haben kann, sind sowohl die Einfrier- als auch die Trocknungskurven für jede der drei Methoden gut reproduzierbar. Unterschiede in den Haft- bzw. Druckfestigkeiten der Lyophilisate, hergestellt nach der gleichen Methode, können demnach nicht auf unterschiedliche Einfrier- bzw. Gefriertrocknungsbedingungen zurückgehen. Tabelle 9 fasst noch einmal die wichtigsten Werte der Plateauphasendauer zusammen.

	Methode 1 Ventilstellung = 0	Methode 2 Ventilstellung = 530	Methode 3 Ventilstellung = 600
Min [min]	0,95	0,25	0,167
Max [min]	1,12	0,367	0,217
Mittelwert [min]	1,04	0,31	0,19
St.Abw. [min]	0,06	0,04	0,02
Rel.St.Abw. [%]	6,13	11,47	8,11

Tabelle 9: Statistischer Vergleich der Länge der Plateauphasen der Methoden 1 bis 3.

Da die Länge der Plateauphase als der entscheidende Faktor der verschiedenen Einfriermethoden bezüglich der Haftfestigkeit angesehen wird, soll anhand einer statistischen Auswertung überprüft werden, ob sich die 3 Methoden jeweils signifikant unterscheiden.

Der Test nach Levene auf Varianzhomogenität ergibt, dass sich die Varianzen der drei untersuchten Datengruppen signifikant unterscheiden ($p = 0,003$). Daher wird zur Prüfung auf einen statistisch signifikanten Unterschied der Einfrierbedingungen der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dieser zeigt, dass sich die Mittelwerte der drei Methoden auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ höchst signifikant unterscheiden, mit $H = 20,696 > \chi^2_{(2; 0,05)} = 5,99$ ($p < 0,001$).

Der post-hoc durchgeführte Games-Howell-Test, bei nicht gegebener Varianzhomogenität indiziert, ergibt zwischen jeder der drei Einfrierbedingungen einen höchst signifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Somit sind Voraussetzungen gegeben, die einen Einfluss der Einfriermethoden auf die Haftfestigkeit der entsprechenden Lyophilisate erwarten lassen.

4.3.4 Einfluss der Wirkstoffkonzentration auf den Trocknungsverlauf

Im Zuge dieser Arbeit sollten Fluorescein-Natrium-Lyophilisate unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen hergestellt und am Menschen getestet werden. In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob eine Veränderung der Arzneistoffdosis bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen eine Auswirkung auf den Temperaturverlauf im Tropfen und somit auf den Gefriertrocknungsprozess hat. Bruttini et al. beschreiben, dass eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration in wässrigen Lösungen zu einer Reduktion der Sublimationsrate führt. Da die Sublimationsrate den geschwindigkeitsbestimmenden Faktor der Primärtrocknung darstellt, würde dies in einer Verlängerung der Trocknungszeit resultieren [5, 6].

Die Trocknungskurven von Tropfen mit 1 % HPMC E50 und 68 μg bzw. 204 μg (dreifache Einzeldosis) Fluorescein-Natrium wurden aufgezeichnet und superponiert (Abb. 4-24).

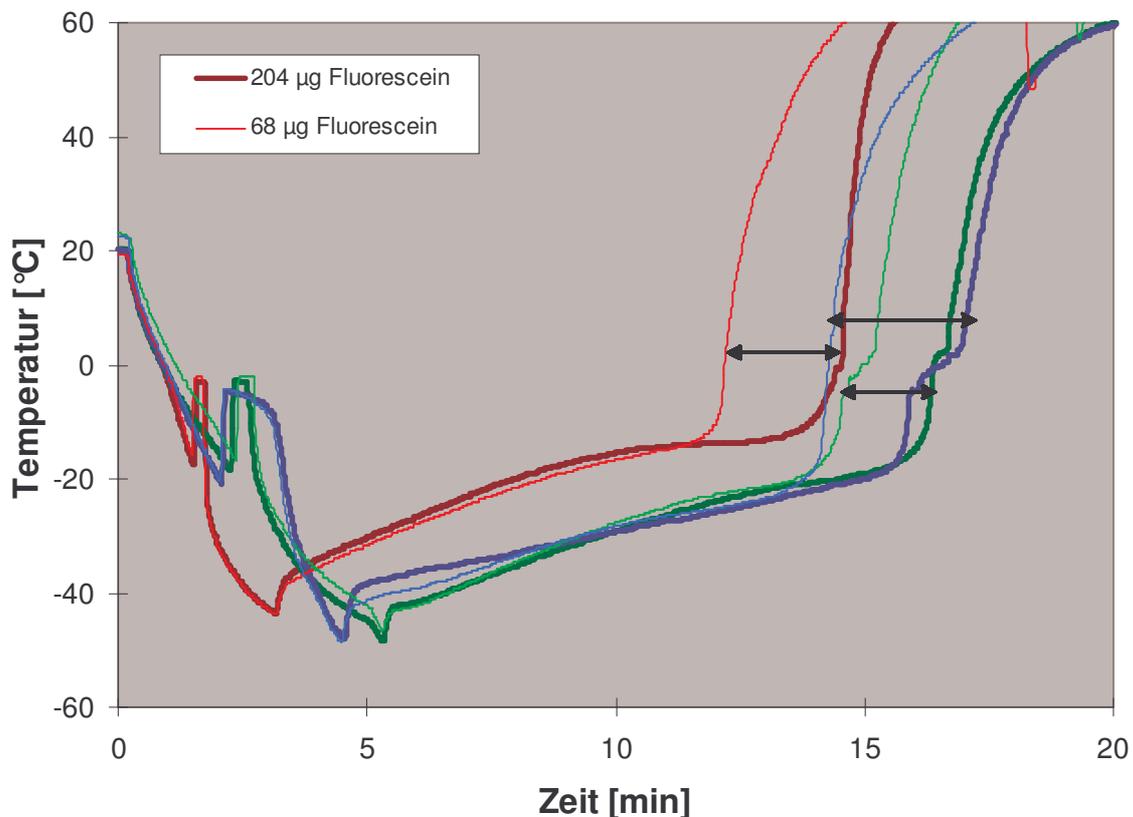


Abb. 4-24: Einfluss der Wirkstoffkonzentration auf den Verlauf des Gefriertrocknungszyklus. Die Doppelpfeile kennzeichnen die Temperaturverläufe bei identischen Einfrier- und Trocknungsbedingungen und zwei unterschiedlichen Fluoresceinkonzentrationen.

Dabei zeigte sich, dass sich eine Verdreifachung der Wirkstoffkonzentration weder auffällig auf die Durchfrieretemperatur (Gefrierpunktserniedrigung) noch auf die Dauer des Plateaus auswirkte. Insgesamt verlaufen die Trocknungskurven jeweils fast identisch zueinander. Allerdings zeigte sich bei allen drei Methoden eine Verlängerung der Trocknungszeit von im Durchschnitt etwa 2 Minuten. Im Vergleich zur Gesamtprozesszeit von 12 bis 15 Minuten stellt dies eine deutliche Verlängerung des Trocknungszyklus dar.

Bei der Haupttrocknung wandert die Sublimationsfront von außen nach innen. Die bereits trockenen Produktzonen sind eine Barriere für den Wasserdampf-Abtransport von der Sublimationsfront. Abb. 4-25 zeigt die Abhängigkeit des mittleren Lyophilisatwiderstandes und damit der Sublimationsrate von der Konzentration einer wässrigen KCl-Lösung [34]. Auch Pikal beobachtet eine Erhöhung des Lyophilisatwiderstandes bei einer höheren Konzentration an gelösten Substanzen [57].

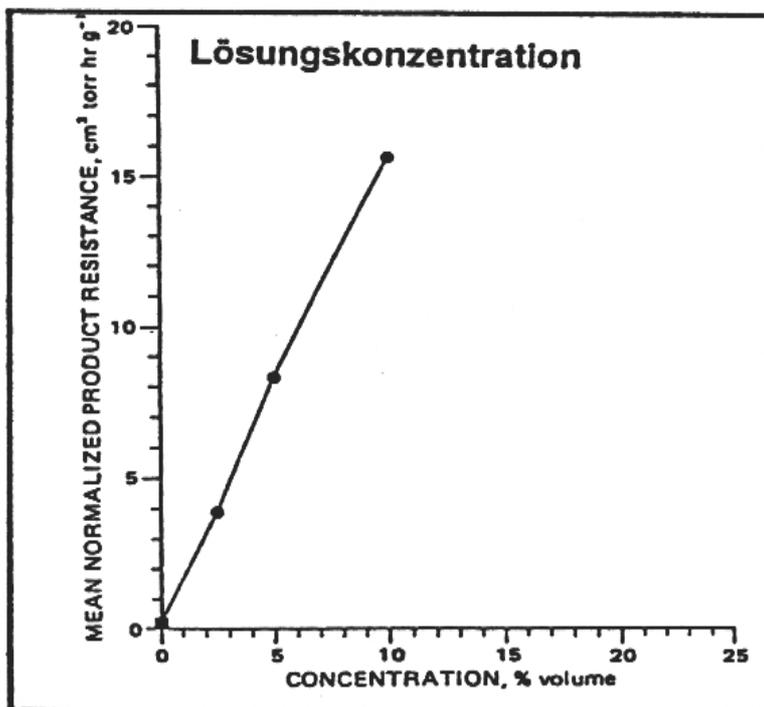


Abb. 4-25: Abhängigkeit des Lyophilisatwiderstandes von der Lösungskonzentration [34].

Selbst bei den niedrigen Feststoffkonzentrationen, die zur Fertigung von OLCS eingesetzt werden, haben Mengenänderungen der gelösten Substanzen deutlichen Einfluss auf die Dauer des Gefriertrocknungsprozesses.

4.4 Einfluss von Lyophilisatzusammensetzung und Einfrierbedingungen auf die Eigenschaften von OLCS

Charakterisierung der Lyophilisate

Weichselbaum stellte fest, dass eine einfache und vollständige Applizierbarkeit von Trägerlyophilisaten ganz entscheidend von deren Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit abhängt [82].

In den nachfolgenden Versuchen soll untersucht werden, wie sich unterschiedliche Wirkstoff- und Polymerkonzentrationen, sowie verschiedene Einfrierbedingungen auf die Haft- und Druckfestigkeit der Lyophilisate auswirken. Zudem soll versucht werden, mögliche Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften der Lyophilisate über eine Analyse der Struktur mittels Rasterelektronenmikroskopie zu erklären.

4.4.1 Aufzeichnung von Kraft-Weg-Diagrammen zur Ermittlung der Haftfestigkeit von Lyophilisaten auf der PTFE-Folie

Zur graphischen Darstellung des Kräfteverlaufs bei der Haftfestigkeitsprüfung wurden aus den Rohdaten Kraft-Weg-Diagramme erstellt. Ausgewertet wurden hier die Kraft-Weg-Diagramme, die sich bei Lyophilisaten aus 68 µg Fluorescein-Natrium und 250 µg HPMC E50 (einprozentige Ausgangslösung) hergestellt nach Methode 2 (Ventilstellung 530) ergaben.

Abb. 4-26 zeigt beispielhaft eine Zusammenstellung von 4 Kurven, wie sie sich direkt aus den Rohdaten nach erfolgten Abreißtests ergeben.

Als Haftfestigkeit wurde jeweils das Maximum der aufgezeichneten Kurve angesehen. Zusätzlich zu den aufgezeichneten Werten ließ sich das Abreißen auch durch ein deutlich vernehmbares Knacken erkennen. Bei der Restkraft nach den Maxima handelt es sich um Reibungskräfte, da sich die Lyophilisate nach dem Abreißen von der PTFE-Folie häufig, meistens unterstützt durch eine starke elektrostatische Aufladung, in der Aussparung der Abreißvorrichtung verhakten (vgl. Abb. 3-9). Nur in den seltensten Fällen fielen sie direkt vom Träger ab.

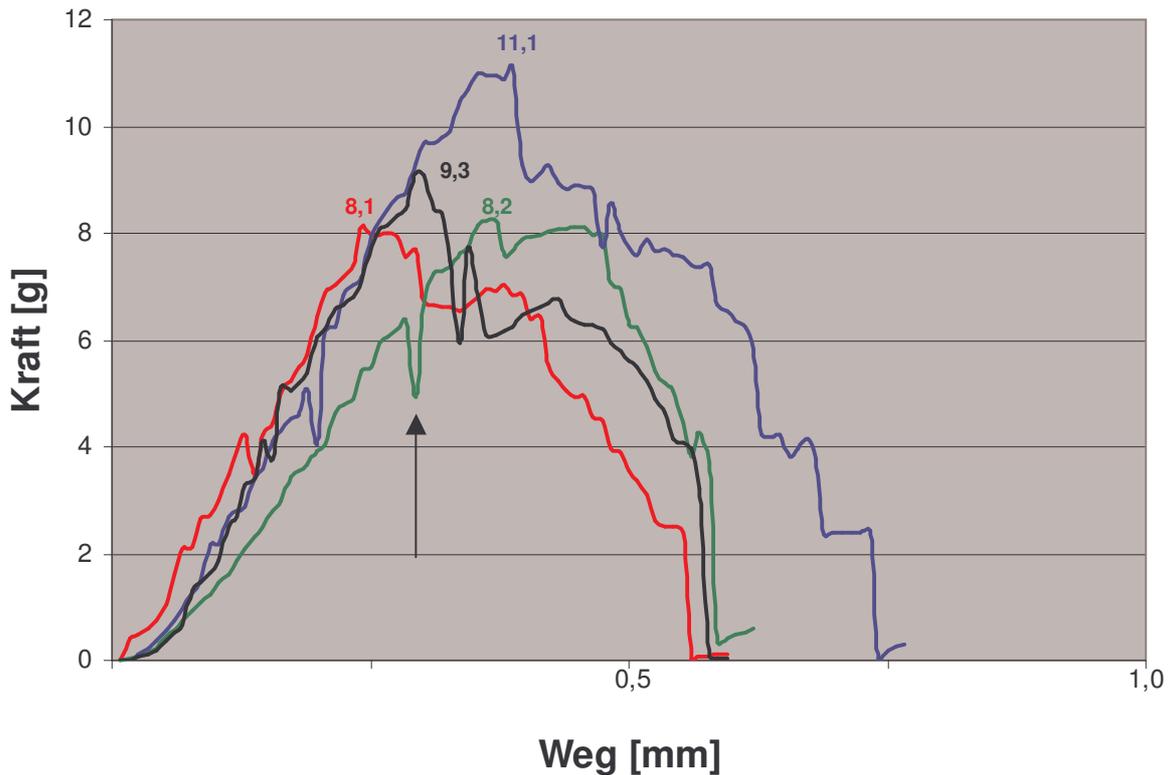


Abb. 4-26: Kraft-Weg-Diagramme der Haftfestigkeitsuntersuchungen.

Interessant war das Auftreten von Minima vor dem eigentlichen Maximum bei den meisten Abreißkurven, in Abb. 4-26 mit einem Pfeil angedeutet. Hier ließ sich nicht eindeutig ermitteln, ob sich das Lyophilisat bereits vollständig vom Träger abgelöst hatte und es nur durch Reibungseffekte zu einer weiteren Erhöhung der Haftkraft kam.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden Haftfestigkeitsmessungen direkt nach dem Auftreten eines solchen Minimums unterbrochen (Abb. 4-27). Dazu wurde der Motor der Abreißvorrichtung angehalten und die Messwerterfassung gestoppt. Die dünne Linie beschreibt den Verlauf der auftretenden mechanischen Kräfte bis kurz nach dem Minimum (Pfeil). Um die leicht unter mechanischer Spannung stehenden Applikatoren aus dem Abreißspalt zu entfernen, wurde der Motor kurz in entgegengesetzter Laufrichtung geschaltet. Nach Entnahme der Applikatoren wurde die Haftung der Lyophilisate auf dem Träger überprüft. Nun wurden die Applikatoren wiederum in die Abreißvorrichtung eingespannt und die Messung erneut gestartet (Abb. 4-27).

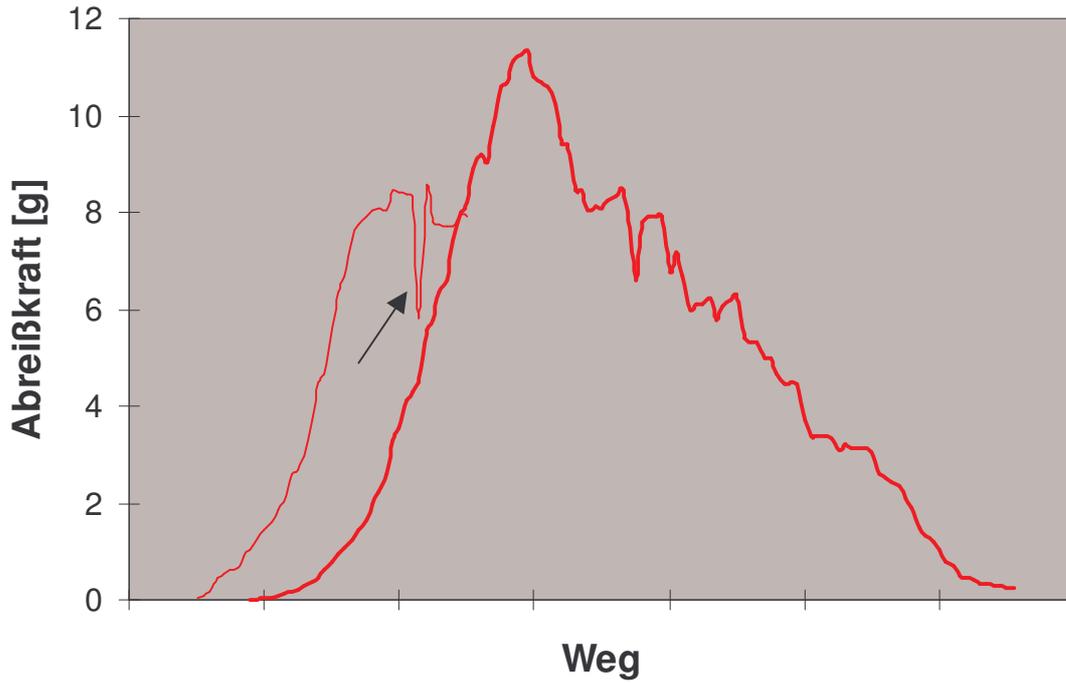


Abb. 4-27: Kraft-Weg-Diagramm mit Unterbrechung nach einem Minimum (Pfeil) und Wiederaufnahme der Messung.

Die sich nun ergebende Kurve (dicke Linie in Abb. 4-27) zeigt einen steilen, geraden Kraftanstieg ohne nennenswerte Unregelmäßigkeiten bis zum Maximalwert. Hier trennt sich das Lyophilisat vollständig von der PTFE-Folie ab. Danach fällt die Kurve in bekannter Weise ab.

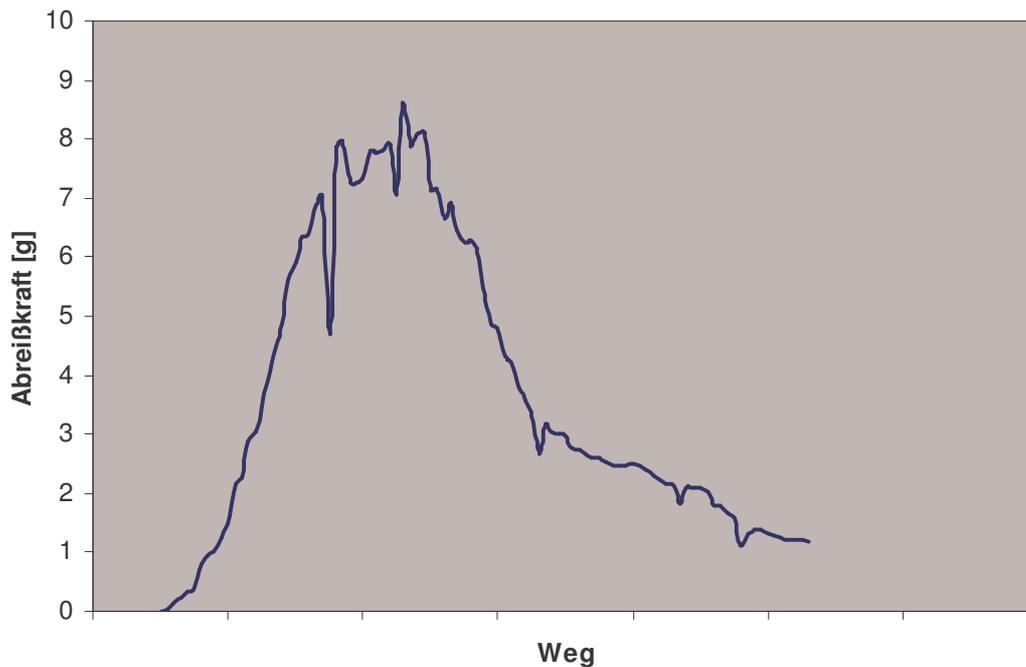


Abb. 4-28: Kraft-Weg-Diagramm, normaler Verlauf ohne Unterbrechung.

Abb. 4-28 zeigt im Vergleich noch einmal den Kurvenverlauf an einem Lyophilisatträger der gleichen Herstellungsweise ohne Versuchsunterbrechung.

Als Ergebnis ist festzuhalten, dass die Lyophilisate nach Unterbrechung des Versuchs noch immer fest auf der PTFE-Folie hafteten. Sie zeigten eine nahezu vollständige elastische Rückformung, da sich direkt nach der Entnahme aus der Abreißvorrichtung die ursprüngliche äußere Form annähernd wieder herstellte. Die plastische Verformung war nur gering. Durch Brechen innerer, schwacher Strukturen kommt es zum Auftreten der oben beschriebenen Minima, ohne dass die Haftfestigkeit nennenswert beeinträchtigt wird. Die Adhäsion des Lyophilisates zur PTFE-Folie scheint in diesen Fällen stärker zu sein als die innere Kohäsion des Lyophilisatgerüsts.

4.4.1.1 Einfluss der Einfriermethode auf die Haftfestigkeit

In der Literatur wird häufig beschrieben, dass der mittlere Porendurchmesser eines Lyophilisates maßgeblich von der Einfriergeschwindigkeit abhängig ist (Abb. 4-29) [66]. Wie in Kapitel 4.3.2 gezeigt wurde, friert eine Probe beim zusätzlichen Anlegen eines Vakuums schneller durch als unter Atmosphärendruck, die Kristallisation erfolgt entsprechend schneller. Die Eiskristalle haben somit weniger Zeit zu wachsen und sollten im Durchschnitt kleiner bleiben. Dies führt nach dem Gefriertrocknen zu kleineren Poren. Daher wurde ein Einfluss der Evakuiergeschwindigkeit auf die Haftfestigkeiten der Lyophilisate auf der PTFE-Folie erwartet.

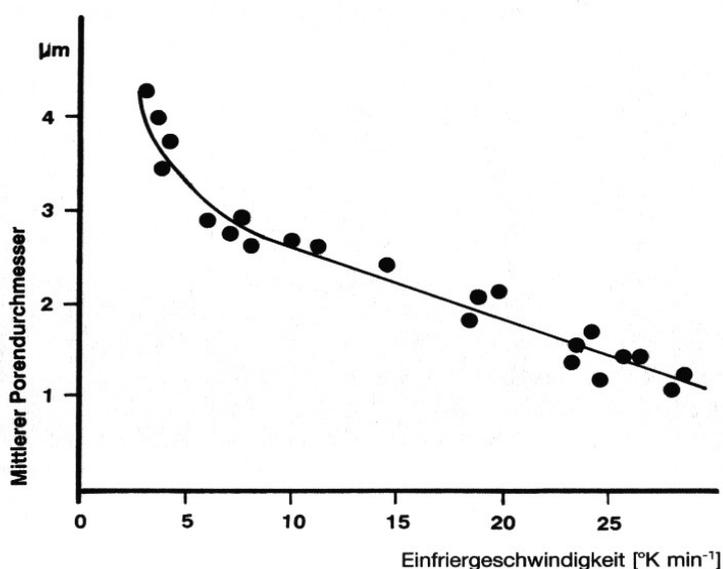


Abb. 4-29: Abhängigkeit der mittleren Porendurchmesser gefriergetrockneter Dextrinlösungen von der Einfriergeschwindigkeit [66].

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In diesem Versuch wurde der Einfluss der Evakuiergeschwindigkeit, also unterschiedlicher Einfrierbedingungen, auf die Haftfestigkeit untersucht. Es wurden Lyophilisate aus einer Lösung von 1 % HPMC E50 und 0,816 % Fluorescein-Natrium (dreifache Dosierung, 204 µg pro OLCS) nach drei verschiedenen Einfriermethoden (jeweils n = 10) hergestellt. Wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben, wurden dabei statistisch signifikante Unterschiede in der Länge der Plateauphasen beobachtet.

Bei der ersten Versuchsreihe handelte es sich um das Einfrieren unter Atmosphärendruck (Methode 1: Ventil geschlossen, Evakuiergeschwindigkeit = 0). Die Proben der zwei anderen Versuchsreihen wurden durch Evakuieren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit eingefroren (Methode 2: Ventilstellung = 530, Evakuiergeschwindigkeit 13,4 mbarL/s; Methode 3: Ventilstellung = 600, Evakuiergeschwindigkeit 33,5 mbarL/s). Mit der Evakuierung wurde unmittelbar nach Einbringen der Probe in die Trockenkammer begonnen. In Tabelle 10 sind die Einzelwerte der Haftfestigkeiten jeder Methode sowie der Stichprobenstatistik aufgeführt.

Einfriermethode mit	Ventilstellung = 0	Ventilstellung = 530	Ventilstellung = 600
Haftfestigkeit [g]	2,56	7,6	28,8
	3,0	8,5	29,7
	4,36	14,2	29,7
	5,0	14,6	30,0
	5,6	14,85	31,7
	9,0	15,0	31,9
	9,14	15,7	33,0
	9,64	19,4	35,9
	12,87	19,8	36,7
	13,96	14,4	37,3
n	10	10	10
Min	2,56	7,6	28,8
Max	13,96	19,8	37,3
Mittelwert	7,51	14,41	32,47
St.Abw.	4,01	3,91	3,15
Rel.St.Abw. [%]	53,33	27,14	9,69

Tabelle 10: Abhängigkeit der Haftfestigkeit von der Evakuiergeschwindigkeit: statistische Auswertung (250 µg HPMC E50 und 204 µg Fluorescein-Natrium pro OLCS).

Abb. 4-30 zeigt graphisch die Abhängigkeit der Haftfestigkeit von der Evakuiergeschwindigkeit. Es zeigt sich, dass mit einer Verkürzung der Durchfrierzeit durch zusätzliches Evakuieren mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, die Haftfestigkeit deutlich zunimmt [41].

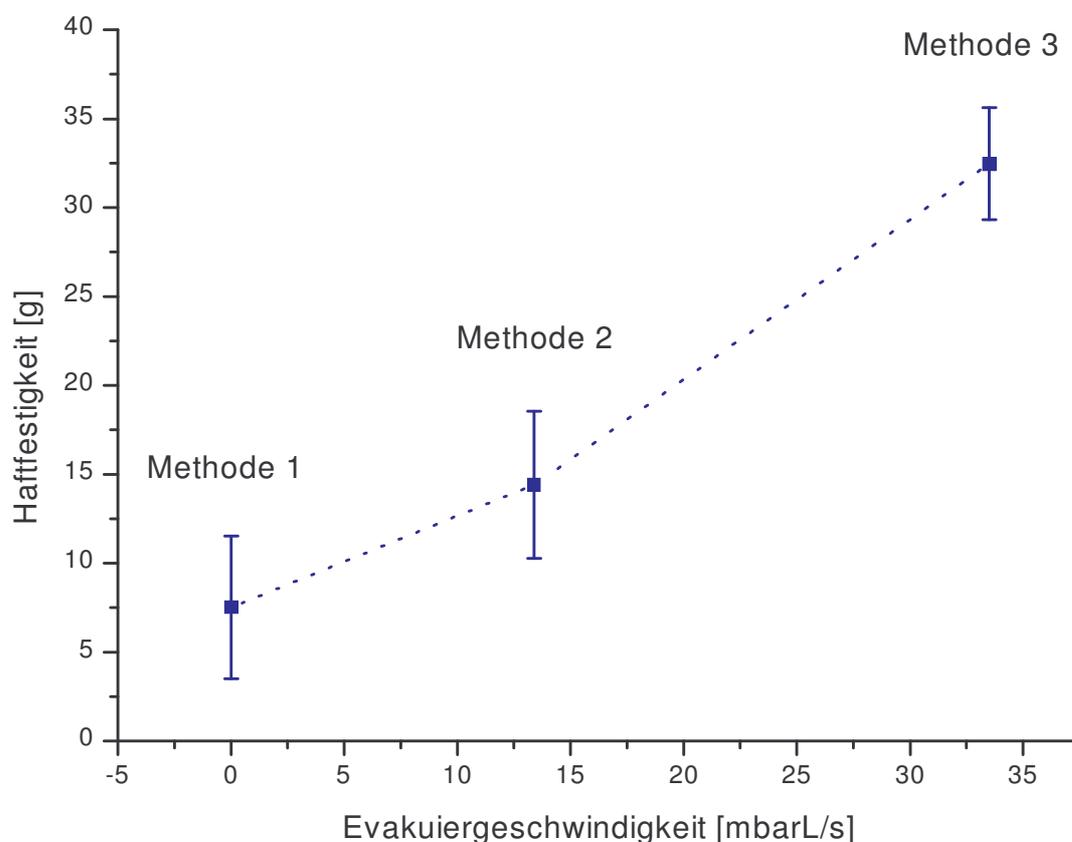


Abb. 4-30: Abhängigkeit der Haftfestigkeit von der Evakuiergeschwindigkeit; Lyophilisate aus 250 µg HPMC E50 und 204 µg Fluorescein-Natrium (jeweils $n = 10$, ein Fehlerbalken entspricht einer Standardabweichung).

Anhand einer statistischen Auswertung soll nun überprüft werden, ob die Haftfestigkeitsdifferenzen signifikant sind.

Die Annahme homogener Varianzen wird mit $p = 0,614$ nicht verletzt (Levene Test). Der Kolmogorov-Smirnov-Test ergibt mit $p = 0,255$ das Vorliegen einer Normalverteilung. Damit sind beide Voraussetzungen erfüllt, um eine einfaktorielle Varianzanalyse durchzuführen. Es zeigt sich ein statistisch höchst signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied zwischen den drei Evakuiergeschwindigkeiten in Bezug auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate auf der PTFE-Folie. Post-hoc wird mit dem Fischer's Least Significance Difference (LSD)-Test gezeigt, dass sich alle drei Methoden höchst signifikant voneinander unterscheiden (jeweils $p < 0,001$). Eine Veränderung der Evakuiergeschwindigkeit auf den untersuchten Niveaus hat also einen höchst signifikanten Einfluss auf die resultierende Haftfestigkeit der

entsprechenden Lyophilisate. Dieser signifikante Unterschied hat praktische Relevanz, da die geringsten Haftfestigkeiten bei Methode 1 in einem Bereich liegen, in dem sich die Lyophilisate bei der Handhabung bereits vom Träger lösen können. Nach Methode 2 hergestellte Lyophilisate weisen für die Anwendung optimale Haftfestigkeitswerte auf. Methode 3 führt bei diesem Versuch zu Haftfestigkeiten, bei denen eine vollständige Applikation nicht mehr gewährleistet ist.

Einfriermethode mit Ventilstellung	0	530	600
Resultierende Evakuiergeschw. [mbarL/s]	0	13,4	33,5
Mittlere Länge der Plateauphase [min]	1,04	0,31	0,19
Mittlere Haftfestigkeit [g]	7,51	14,41	32,47

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen Evakuiergeschwindigkeit, Länge der Plateauphase und Haftfestigkeit der resultierenden Lyophilisate.

Tabelle 11 zeigt noch einmal den Zusammenhang zwischen Evakuiergeschwindigkeit, Länge der Plateauphase und Haftfestigkeit der dazugehörigen Lyophilisate. Eine Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit resultiert jeweils in einer Verkürzung der Durchfrierphase. Je kürzer die Plateauphase, umso größer ist die mittlere Haftfestigkeit der produzierten Lyophilisate.

Zur Interpretation und Erklärung der Ergebnisse wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen.

Methode 1:

Das Einfrieren unter Atmosphärendruck führt zu geringen Haftfestigkeiten von durchschnittlich 7,5 g. Bei dieser Einfriermethode erfolgt der Wärmeentzug ausschließlich konvektiv durch die Kondensatorfläche, die sich direkt unterhalb des Probenträgers befindet. Daher erreicht zuerst eine dünne Schicht an der Unterseite des Tropfens, die in direktem Kontakt zur PTFE-Folie steht, die Kristallisationstemperatur. Während die Lösung darüber langsam und gleichmäßig abkühlt, ist der untere Bereich schon stark unterkühlt. Dies führt zur schnellen Bildung eines schmalen Bandes kleiner, unregelmäßig geformter Eiskristalle [68]. Daraus resultiert nach der Trocknung eine engmaschige, filigrane Lyophilisatstruktur (Abb. 4-31). Diese hat nur wenige, schwache Verbindungen zur PTFE-Folie und kann daher leicht abgelöst werden. Anhand

der Aufnahme der zugehörigen PTFE-Folie ist erkennbar, dass nur wenige, kleine Kontaktpunkte bestehen (Abb. 4-32). Der Kristallisation des schmalen Bandes kleiner, unregelmäßig geformter Kristalle folgt in der darüber stehenden, gleichmäßig abgekühlten Lösung ein langsames, senkrecht zur Oberfläche hin gerichtetes Wachstum großer Eiskristalle (vgl. Temperaturkurvenverlauf bei langsamem Einfrieren Kapitel 4.3.2). Dadurch werden im Lyophilisat weite Kanäle erzeugt (vgl. Abb. 4-31) [27, 68]. Aus diesem säulenartigen Eiskristallwachstum resultiert eine Aufkonzentrierung gelöster Substanzen an der Oberfläche der gebildeten Matrix [68]. Die Gefrierkonzentration ist erkennbar an der spitzen Form des Tropfens an seiner Oberseite und der dichten geschlossenen Oberflächenstruktur durch auskristallisierten Wirkstoff (Abb. 4-33 und Abb. 4-34).

Anhand des Vertikalschnittes lassen sich das schmale Band der dichten, filigranen Bodenstruktur, die vergleichsweise großen, offenen Kanäle im Inneren des Lyophilisates und die Oberflächenstruktur mit Gefrierkonzentration als Gesamtbild betrachten (Abb. 4-35). Schematisch ist dieser Aufbau noch einmal als Zeichnung in Abb. 4-36 dargestellt.

Abb. 4-31 bis 4-35: REM-Aufnahmen von OLCS, die unter Atmosphärendruck eingefroren wurden (Methode 1, 250 µg HPMC E50, 204 µg Fluorescein-Natrium).

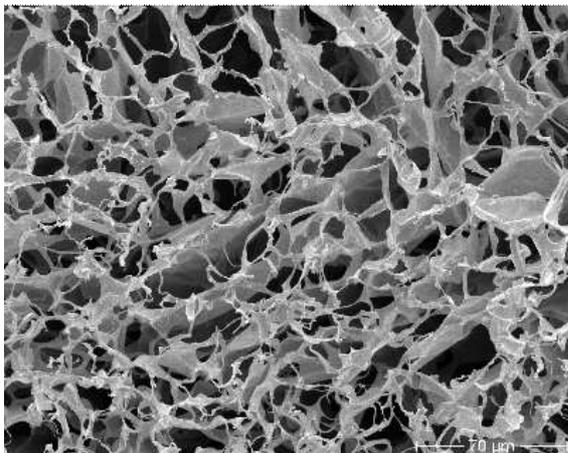


Abb. 4-31: Detailaufnahme der Lyophilisatunterseite. Durch die filigrane Bodenstruktur lassen sich in der Tiefe die großen, weiten Kanäle erkennen.

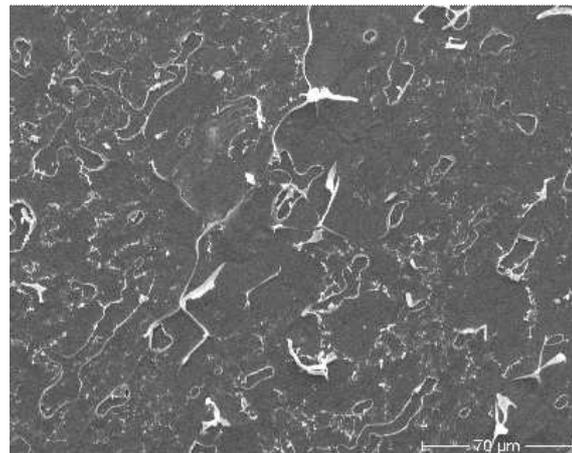


Abb. 4-32: Lyophilisatrückstände auf der PTFE-Folie.

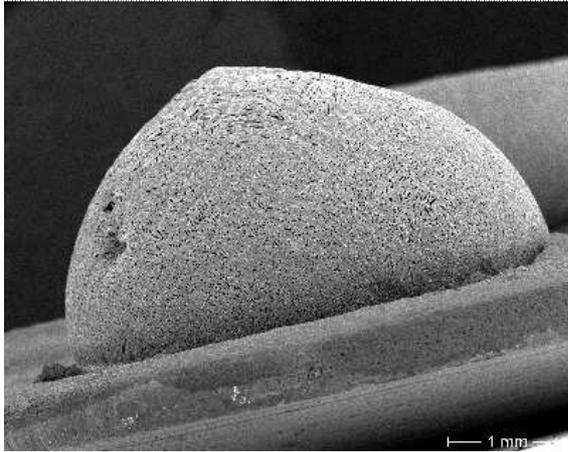


Abb. 4-33: Äußere Form des Lyophilisattropfens.

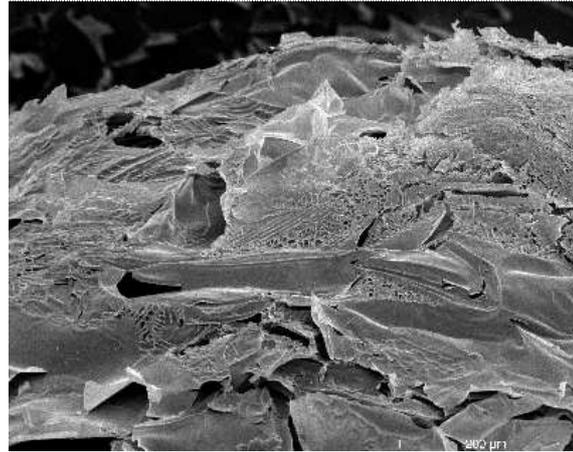


Abb. 4-34: Gefrierkonzentration. Detailaufnahme der Produktoberfläche mit auskristallisiertem Wirkstoff.

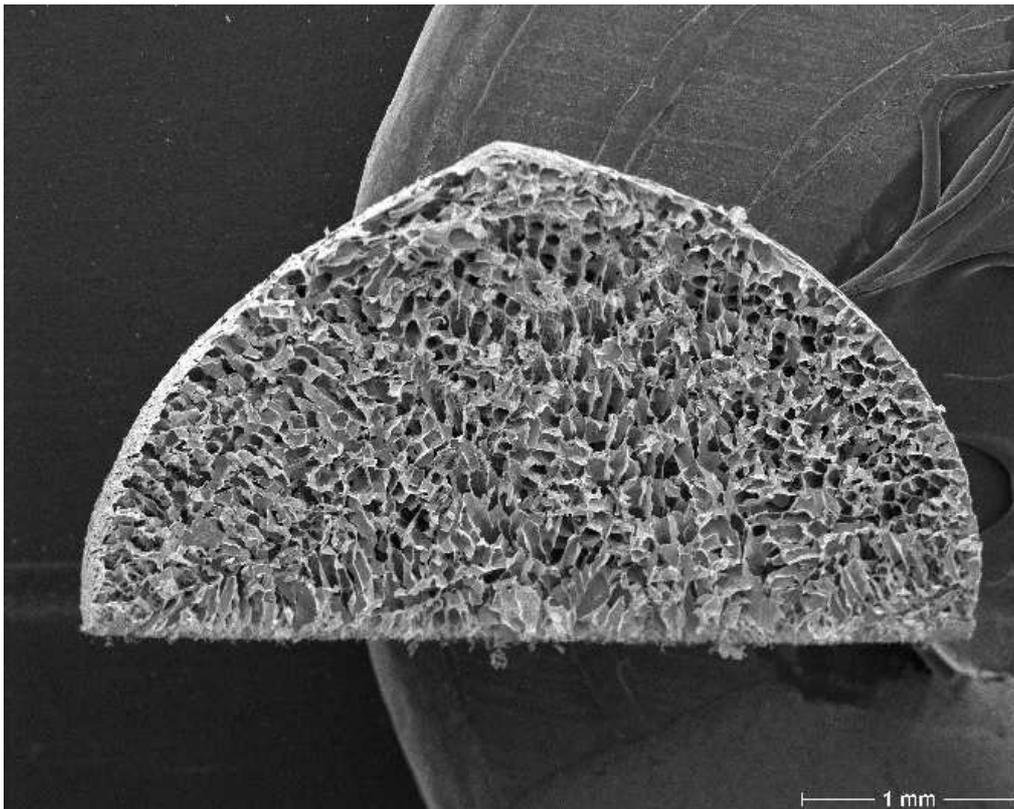


Abb. 4-35: Vertikalschnitt durch die Lyophilisatmitte.

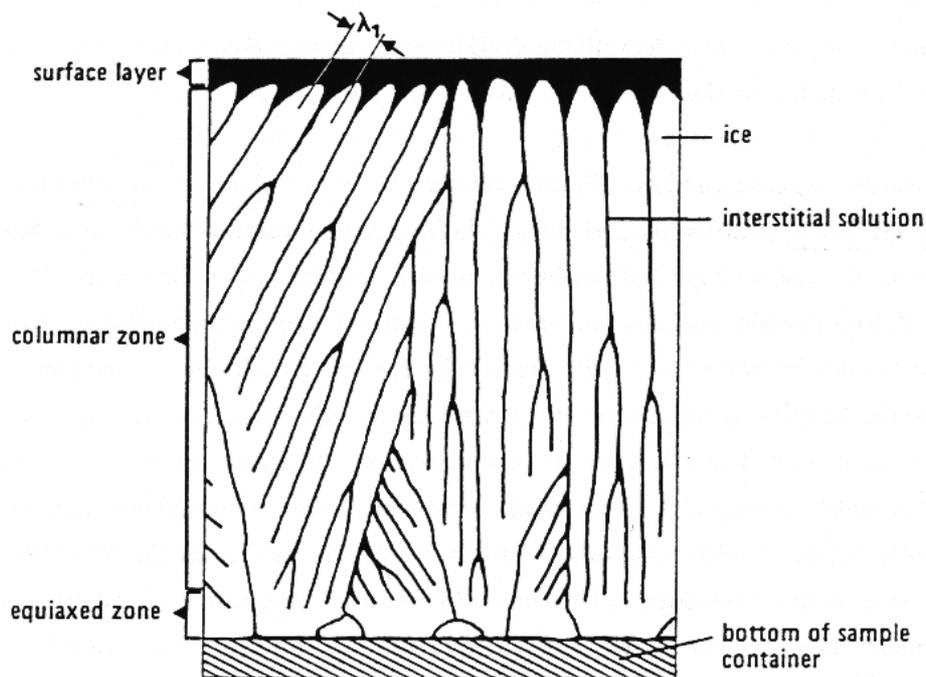


Abb. 4-36: Schematische Darstellung der Lyophilisatstruktur, erhalten durch langsames Einfrieren [33].

Methode 2:

Beim Einfrieren unter langsamem Evakuieren mit 13,4 mbarL/s (Ventilstellung 530) ergaben sich Lyophilisate mit einer durchschnittlichen Haftfestigkeit von 14,4 g (vgl. Tabelle 11).

Durch den gleichzeitigen Wärmeentzug von unten durch die kalte Kondensatorfläche und von oben durch Verdampfung des Lösungsmittels kommt es zu einer gleichmäßigen Abkühlung des Tropfens. Die REM-Aufnahmen zeigen keine Gefrierkonzentration (Abb. 4-37). Die nahezu geschlossene Oberflächenstruktur (Abb. 4-40) im Vergleich zu der offenen Struktur der Tropfenunterseite (Abb. 4-39) lässt jedoch vermuten, dass auch hier die Probe von unten nach oben durchfriert. Aufgrund der gleichmäßigen Abkühlung entstehen sehr homogene, hexagonale bis runde Poren mit dicken Wänden (Abb. 4-39). Abb. 4-41 zeigt schematisch die Porenstruktur auf der Lyophilisatunterseite, wie sie sich beim Simulieren eines Eiswachstums bei gleichmäßiger Abkühlung ohne Temperaturgradienten ergibt. Rupprecht beschreibt die Bildung weitgehend homogener Eisstrukturen bei mittlerer Abkühlgeschwindigkeit [66]. Diese geordnete, regelmäßige Matrix haftet so stark an der PTFE-Folie, dass es

beim Ablösen zu einem Bruch in der inneren Struktur kommt, erkennbar an den Resten des Lyophilisates auf der Folie (Abb. 4-38).

Abb. 4-37 bis Abb. 4-40: REM-Aufnahmen von OLCS, die unter langsamem Evakuieren mit 13,4 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit eingefroren wurden (Methode 2, 250 µg HPMC E50, 204 µg Fluorescein-Natrium).

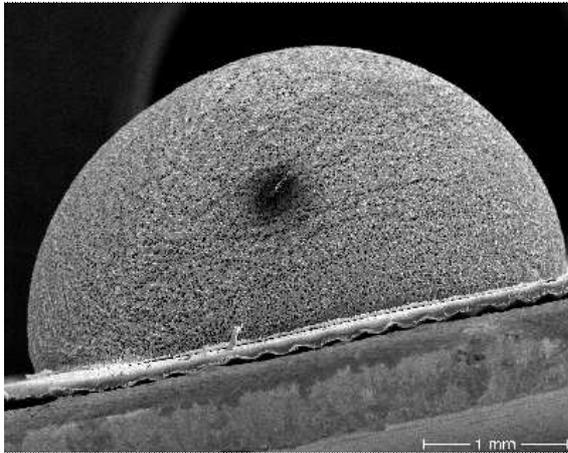


Abb. 4-37: Äußere Form des Lyophilisates.

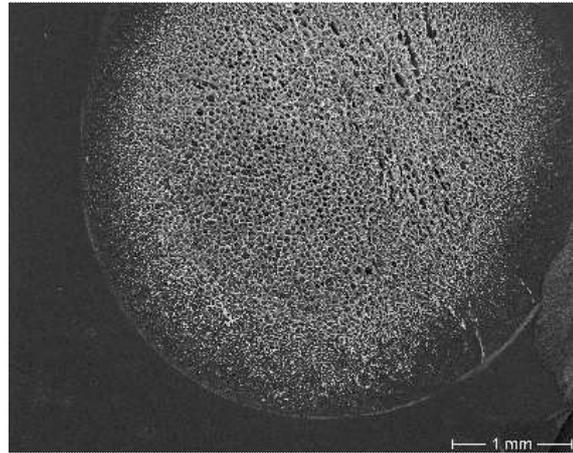


Abb. 4-38: Lyophilisatrückstand auf der PTFE-Folie.

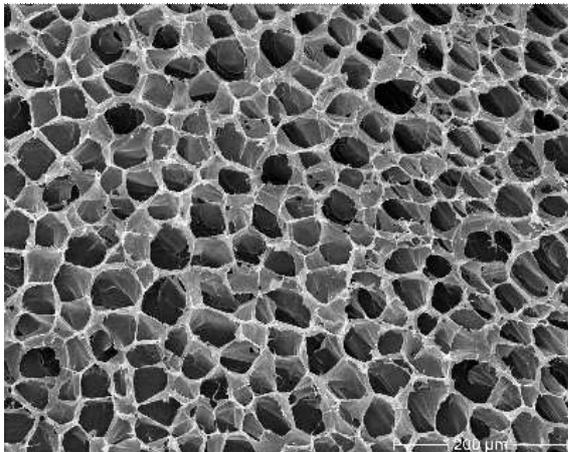


Abb. 4-39: Detailaufnahme der Bodenstruktur.

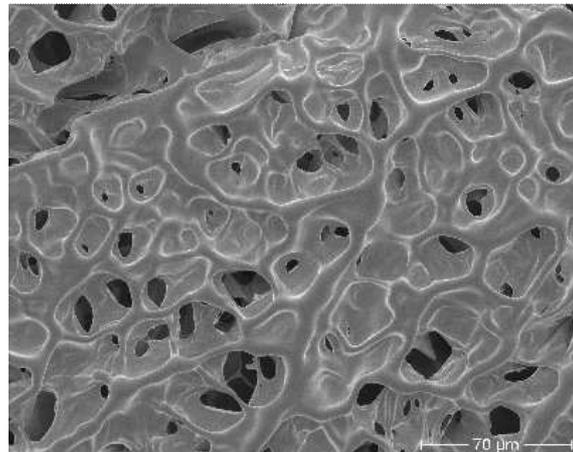


Abb. 4-40: Detailaufnahme der Produktoberfläche.

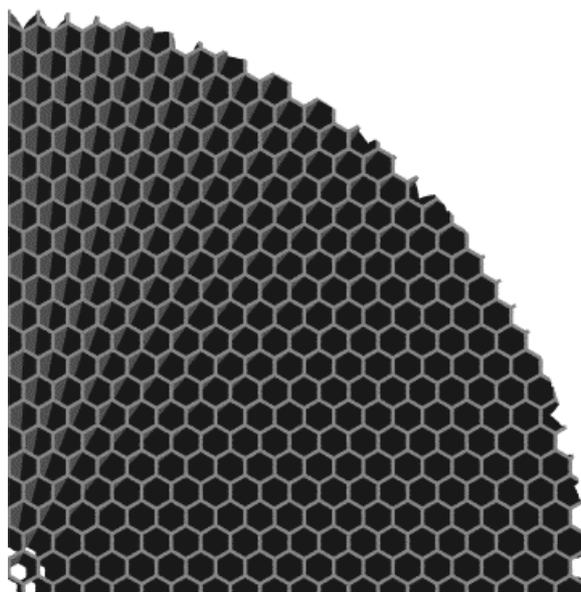


Abb. 4-41: Schematische Darstellung einer Lyophilisatunterseite, Simulation einer gleichmäßigen Abkühlung bei mittlerer Einfriergeschwindigkeit.

Methode 3:

Beim Einfrieren durch schnelles Evakuieren mit 33,5 mbarL/s (Ventilstellung 600) ergaben sich Lyophilisate mit einer durchschnittlichen Haftfestigkeit von 32,5 g.

Durch das rasche Evakuieren spielt der konvektive Wärmeentzug von der Unterseite des Tropfens durch die Kondensatorfläche nahezu keine Rolle mehr. Der schnelle und starke Wärmeentzug an der Tropfenoberfläche durch verdampfendes Lösungsmittel führt dort schnell zur Eisbildung (vakuuminduziertes Einfrieren = snap freezing). Da der innere Teil des Tropfens noch nicht so stark abgekühlt ist, kommt es zur Ausbildung eines deutlich ausgeprägten Temperaturgradienten [42].

Fehlen äußere Einflüsse bei der Kristallisation, neigen die Eiskristalle dazu, zufällig zu wachsen, das heißt ohne bevorzugte Richtung, wie es annähernd bei Methode 2 erreicht wurde (Abb. 4-42, rechts). Wird die Kristallisation allerdings beeinflusst, wie beim „Snap Freezing“ durch raschen Wärmeentzug an der Oberfläche, orientieren sich die schnell wachsenden Eiskristalle senkrecht entlang des gebildeten Temperaturgradienten [31, 50]. Hier wird sich die Porengröße senkrecht zum Temperaturgradienten verkleinern, in Richtung des Gradienten allerdings vergrößern, so dass man von zylindrisch geformten Eiskristallen sprechen kann (Abb. 4-42, Mitte) [31]. Unter extremen Bedingungen können diese Kristalle nadelförmig werden, also sehr schmal und länger als die eben angesprochenen Zylinder (Abb. 4-42, links).

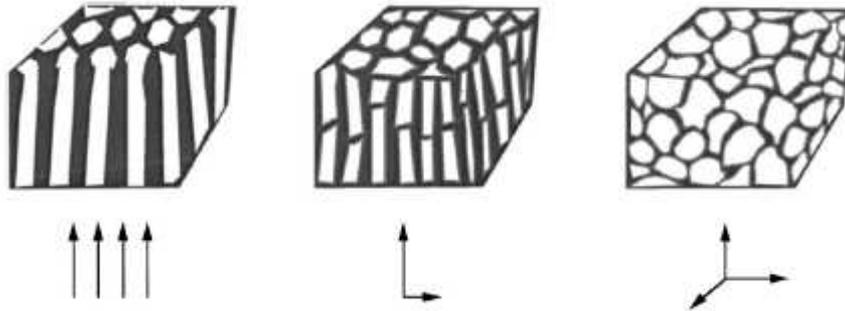


Abb. 4-42: Schematische Darstellung verschiedener Strukturen gefriergetrockneter Hydrogele, die bei verschiedenen Temperaturen eingefroren wurden. Die Einfriereschwindigkeit nimmt von links nach rechts stark ab [31].

Bei einem halbkugelförmigen Tropfen entsteht, unter den Bedingungen des vakuuminduzierten Einfrierens, ein von der Tropfenoberfläche zur Tropfenmitte hin ausgerichteter Temperaturgradient. Im Kontaktbereich des Tropfens mit der PTFE-Folie bilden sich lange, dünne Eiskristalle parallel zur Folie (Abb. 4-43, Abb. 4-44 und Abb. 4-45). Da sich die gelösten Bestandteile beim Gefrieren um die Lösungsmittelkristalle anordnen, kommt es teilweise zu einer sehr dichten, geschlossenen Kontaktflächenstruktur (Abb. 4-46 und Abb. 4-47), ähnlich wie man sie an der Oberfläche von gefriergetrockneten Lösungen, die in einem Kältebad eingefroren wurden, beobachten kann (Abb. 4-48). Diese geschlossenen Bereiche der Kontaktfläche erklären den starken Anstieg der Haftfestigkeit unter schnellen Einfrierbedingungen [42].

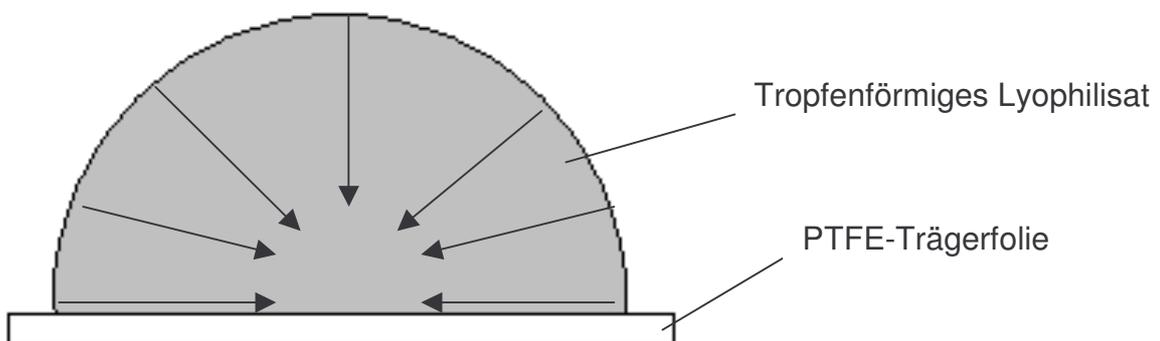


Abb. 4-43: Schematische Darstellung der Richtung des bevorzugten Eiskristallwachstums beim vakuuminduzierten Einfrieren.

Abb. 4-44 bis 4-47: REM-Aufnahmen von OLCS, die unter schnellem Evakuieren mit 33,5 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit eingefroren wurden (Methode 3, 250 µg HPMC E50, 204 µg Fluorescein-Natrium).

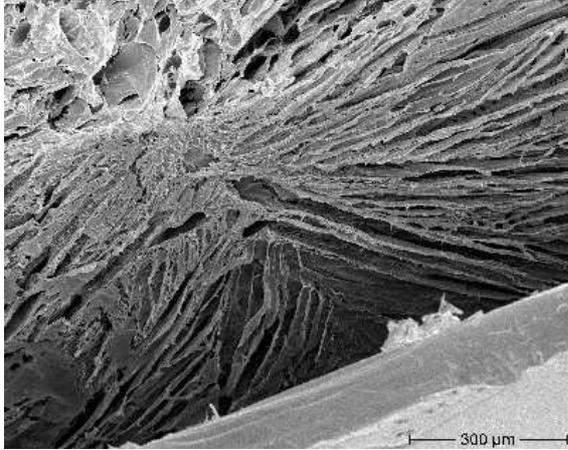


Abb. 4-44: Detailaufnahme der Bodenstruktur.

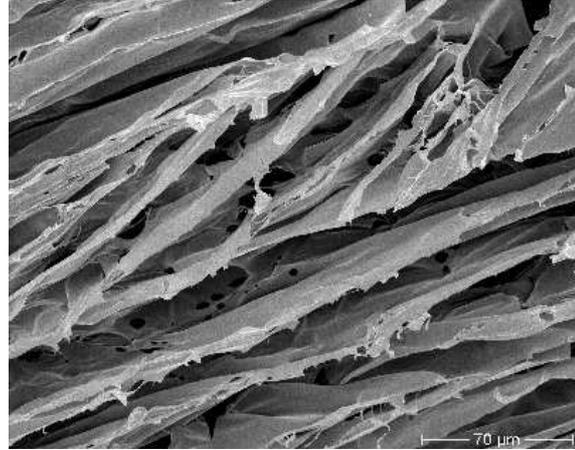


Abb. 4-45: Detailaufnahme der langen, dünnen Eiskanäle auf der Unterseite.

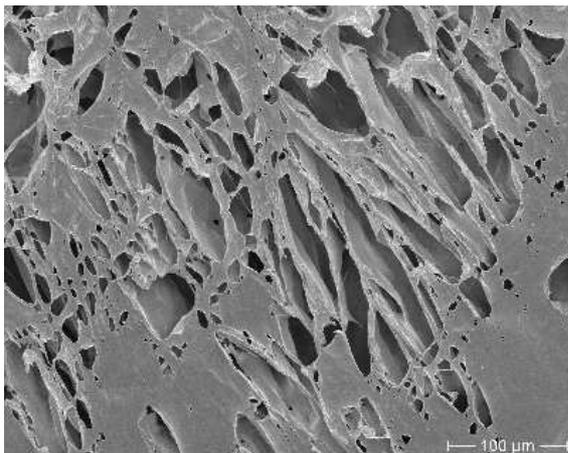


Abb. 4-46: Detailaufnahme der zum Teil offenen, zum Teil geschlossenen Bodenstruktur.

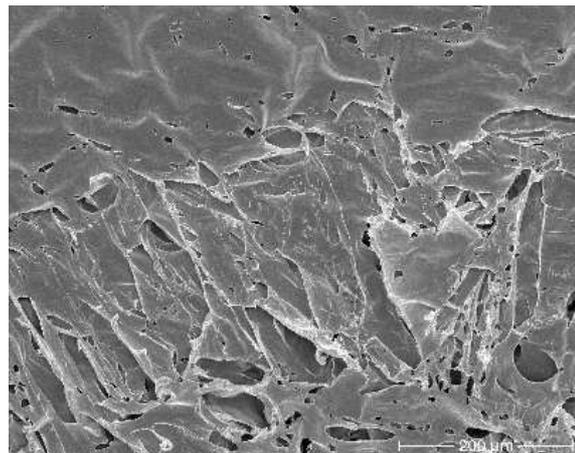


Abb. 4-47: Detailaufnahme der geschlossenen Bodenstruktur.

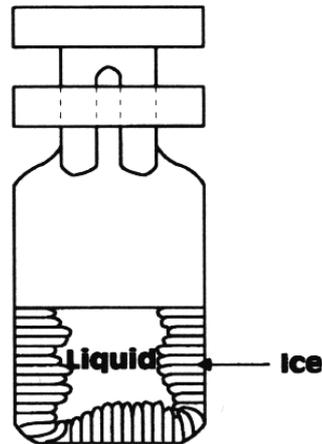


Abb. 4-48: Eisstrukturen, wie man sie beim Einfrieren von Lösungen in einem Kältebad erhält. Hier wachsen die Eiskristalle parallel zur Oberfläche. Die entstehende, geschlossene Oberflächenstruktur behindert den Wasserdampftransport [29].

Die Oberflächenstruktur der Lyophilisate, die nach Methode 3 hergestellt wurden, ist im Gegensatz zu den Oberflächenstrukturen nach Methoden 1 und 2 sehr locker und weitmaschig mit großen Poren (Abb. 4-49, Abb. 4-50). Die beiden letzt genannten Einfrierbedingungen ergeben dagegen Lyophilisate, bei denen eher die Kontaktflächen zum PTFE die offenen und weitmaschigen Strukturen aufweisen.

Abb. 4-49 bis 4-52: REM-Aufnahmen von OLCS, die unter schnellem Evakuieren mit 33,5 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit eingefroren wurden (Methode 3, 250 µg HPMC E50, 204 µg Fluorescein-Natrium).



Abb. 4-49: Äußere Form des Lyophilisattropfens.

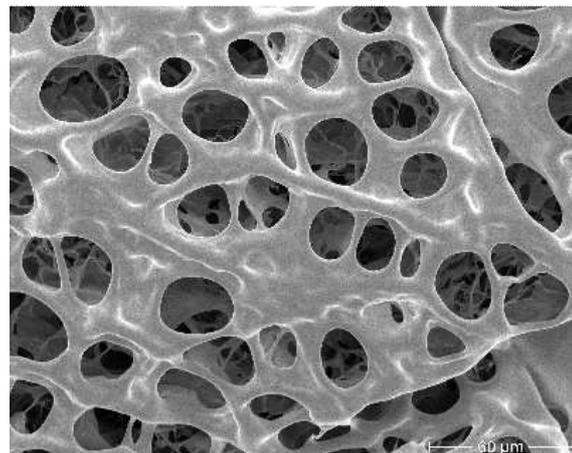


Abb. 4-50: Detailaufnahme der Produktoberfläche.

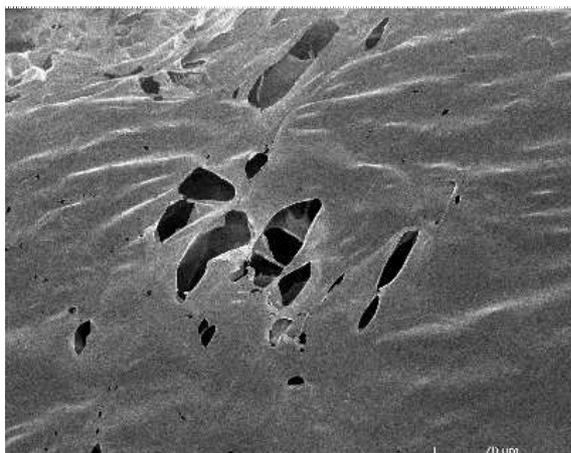


Abb. 4-51: Bodenstruktur am Rand ohne Gefrierkonzentration.

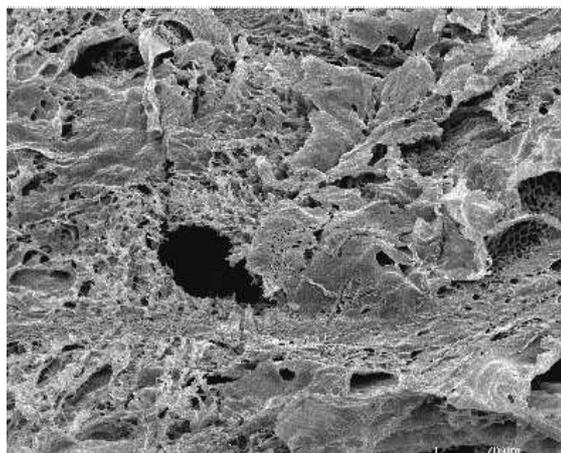


Abb. 4-52: Bodenstruktur in der Mitte mit Gefrierkonzentration des gelösten Wirkstoffs.

Wie beim Einfrieren unter Atmosphärendruck, kommt es auch beim schnellen, vakuuminduzierten Einfrieren aufgrund des gerichteten Eiskristallwachstums zu einer Gefrierkonzentration. Hier allerdings konzentrieren sich die gelösten Stoffe in der Mitte der Kontaktfläche zur Folie, also im Zentrum der Lyophilisatunterseite (Abb. 4-51, Abb. 4-52).

4.4.1.2 Einfluss des Wirkstoffgehaltes auf die Haftfestigkeit

Bereits zu Beginn des Kapitels 4.4 wurde erwähnt, dass Lyophilisate unterschiedlicher Wirkstoffkonzentration mit dem Mini-Gefriertrockner hergestellt und in klinischen Prüfungen getestet werden sollten. Der vorige Abschnitt hat gezeigt, dass der gelöste Wirkstoff je nach Einfrierbedingungen bevorzugt an verschiedenen Stellen des Lyophilisates auskristallisieren kann. Daher könnte sich die Wirkstoffkonzentration teilweise auch auf die Haftfestigkeit auswirken. Um zu prüfen wie die Arzneistoffdosis die Haftfestigkeit der Lyophilisate beeinflusst, wurde der folgende Versuch durchgeführt.

Es wurden Lyophilisate aus Tropfen mit 1 % HPMC E50 und 68 µg Fluorescein-Natrium bei unterschiedlichen Einfrierbedingungen hergestellt und deren Haftfestigkeit bestimmt. Um den Einfluss der Wirkstoffkonzentration zu ermitteln, wurden diese Ergebnisse mit denen aus Kapitel 4.4.1.1 (1 % HPMC E50 und 204 µg Fluorescein-Natrium) verglichen. Tabelle 12 und Abb. 4-53 zeigen die Ergebnisse dieses Versuches (vgl. Tabelle 10).

	Methode 1 (V=0)	Methode 2 (V=530)	Methode 3 (V=600)	Methode 4 (V=650)
n	8	14	14	8
Min [g]	0,07	7,3	6,5	7,4
Max [g]	3,47	15,4	14,0	13,1
Mittelwert [g]	0,99	10,47	10,69	10,85
St.Abw. [g]	1,26	2,55	2,58	2,12
Rel.St.Abw. [%]	127,3	24,4	24,13	19,5

Tabelle 12: Abhängigkeit der Haftfestigkeit von der Evakuiergeschwindigkeit bei einem Wirkstoffgehalt von 68 µg Fluorescein-Natrium: statistische Auswertung.

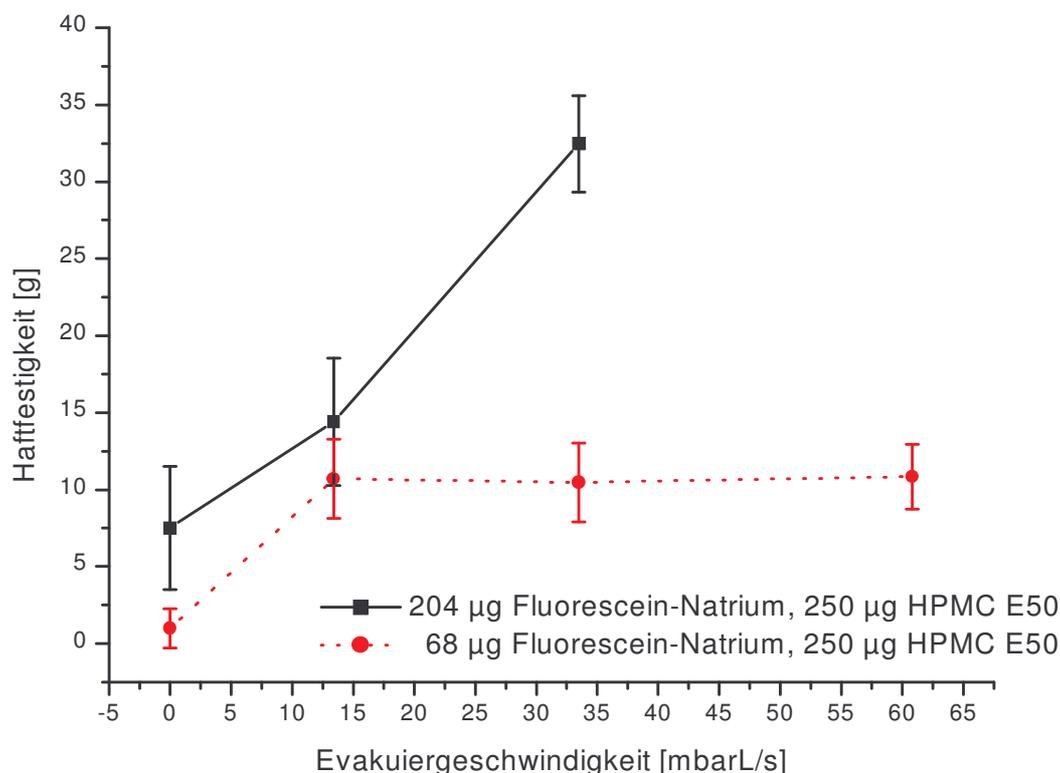


Abb. 4-53: Abhängigkeit der Haftfestigkeit von der Wirkstoffkonzentration. (Ein Fehlerbalken entspricht einer Standardabweichung.)

Die Lyophilisate mit verringertem Wirkstoffgehalt (gepunktete Linie im Diagramm) eingefroren nach Methode 1 (Atmosphärendruck) oder Methode 2 (langsames Evakuieren mit 13,4 mbarL/s) zeigen eine, im Vergleich zu den höher dosierten Lyophilisaten (durchgezogene Linie), verringerte Haftfestigkeit. Die Kurven verlaufen in diesem Bereich nahezu parallel (Abb. 4-53). Da bei reduziertem Wirkstoffgehalt weniger Material als Strukturbildner zu Verfügung steht, wird das Gerüst filigraner, die Haftfestigkeit geringer.

Beim schnellen Einfrieren durch Anlegen eines Vakuums mit 33,5 mbarL/s (Methode 3) ändern sich die Kurvenverläufe allerdings deutlich zueinander. Im Gegensatz zu dem starken Anstieg der Haftfestigkeit bei Lyophilisaten mit 204 µg Fluorescein-Natrium kommt es im Fall der niedrigen Konzentration zu keinem weiteren Anstieg der Haftkraft. Selbst bei einer weiteren Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit auf 60,8 mbarL/s (Methode 4, Ventilstellung = 650), ändert sich die Haftfestigkeit nicht mehr. Diese Methode führte jedoch während des Einfriervorgangs bei etwa 50 % der Proben zu einem Schäumen (Frothing) durch gelöste Gase, die sich beim Evakuieren ausdehnen, wodurch die Proben beim Durchfriervorgang zerstört wurden.

Beim Einfrieren mit 33,5 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit wird durch die Aufkonzentrierung der höheren Wirkstoffmenge am Lyophilisatboden bei 204-µg-Fluorescein-Natrium-OLCS die Haftkraft stark erhöht. Eine Wirkstoffkonzentrierung bei einfach dosierten OLCS (67 % weniger Fluorescein-Natrium) durch schnelles, gerichtetes Einfrieren an der Kontaktfläche mit dem PTFE reicht nicht aus, die Haftfestigkeit messbar zu erhöhen.

4.4.1.3 Einfluss des Polymergehaltes auf die Haftfestigkeit

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass ein Einfluss des Wirkstoffgehaltes auf die Haftfestigkeit besteht. Da nicht der Wirkstoffgehalt zur Einstellung der Haftfestigkeit und somit des Ablöseverhaltens der OLCS herangezogen werden kann, wird nun untersucht, ob die Haftfestigkeit über die Veränderung des Polymergehaltes in Kombination mit der Evakuiergeschwindigkeit gezielt variiert werden kann. Dazu wird der in den bisherigen Haftfestigkeitstests untersuchte Polymergehalt von 250 µg pro OLCS (einprozentige Ausgangslösung) halbiert (0,5 % HPMC E50 in der Lösung, 125 µg pro OLCS) und um die Hälfte erhöht (1,5 % Polymer in der Lösung, 375 µg pro OLCS). Aus diesen Polymerlösungen werden OLCS mit einem Fluorescein-Natrium-Gehalt von 68 µg, entsprechend der Normaldosis von handelsüblichen Fluoresceinaugentropfen, bei vier unterschiedlichen Einfrierbedingungen hergestellt (jeweils n = 5). In Abb. 4-53 zeigt sich eine Änderung in der Haftfestigkeit bei einfach dosierten OLCS nur im Bereich einer Evakuiergeschwindigkeit zwischen 0 und 13,4 mbarL/s. Daher soll im folgenden Versuch dieser Bereich näher untersucht werden. Deshalb wurden Evakuiergeschwindigkeiten von 1,65 mbarL/s, 10 mbarL/s und 13,4 mbarL/s ausgewählt.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Um zu untersuchen, ob sich auch bei unterschiedlichen Polymergehalten eine weitere Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit nicht mehr deutlich auf die Haftfestigkeit auswirkt, ist auch die Methode mit 33,5 mbarL/s in die Versuche mit einbezogen worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 und Abb. 4-54 dargestellt.

Evakuiergeschw. [mbarL/s]	Polymergehalt im OLCS [µg]	Mittelwert [g]	St.Abw. [g]
1,65	125	0,19	0,298
	250	1,91	1,929
	375	4,38	2,481
10,0	125	0,95	0,987
	250	10,98	2,969
	375	20,68	5,124
13,4	125	4,56	2,113
	250	13,66	3,359
	375	30,06	2,078
33,5	125	4,06	0,924
	250	16,00	3,322
	375	36,00	2,643

Tabelle 12: Haftfestigkeit in Abhängigkeit von Polymergehalt und Evakuiergeschwindigkeit: statistische Auswertung (n = 5).

Die Abb. 4-54 zeigt einen prinzipiell für alle drei Polymerkonzentrationen ähnlichen Kurvenverlauf. Es ergibt sich ein nahezu linearer Anstieg der Haftfestigkeit bei 250 µg und 375 µg Polymergehalt bis zu einer Evakuiergeschwindigkeit von 13,4 mbarL/s. Danach flacht die Kurve in jeder Datenreihe deutlich ab.

Die Haftfestigkeit nimmt mit steigender Polymerkonzentration deutlich zu, wobei sich dieser Effekt mit zunehmender Evakuiergeschwindigkeit verstärkt.

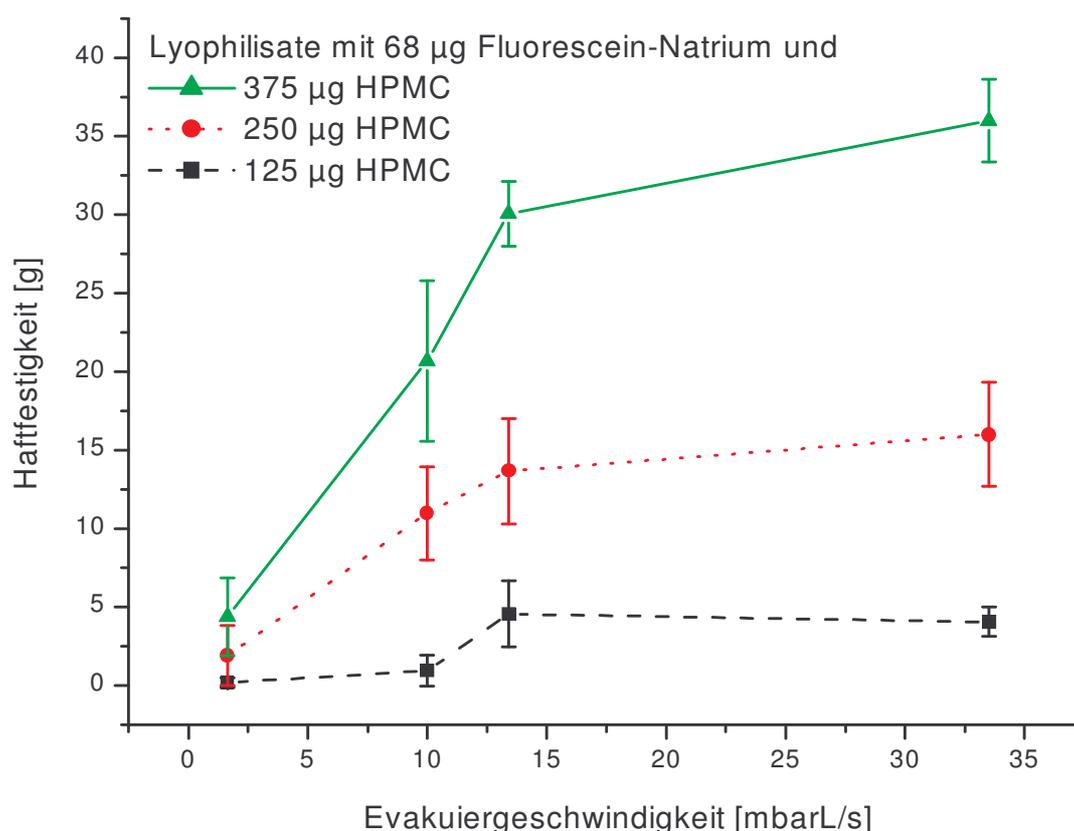


Abb. 4-54: Abhängigkeit der Haftfestigkeit vom Polymergehalt bei unterschiedlichen Evakuiergeschwindigkeiten bei einfach dosierten Proben (jeweils $n = 5$, ein Fehlerbalken entspricht einer Standardabweichung).

Statistisch soll überprüft werden, inwieweit die beiden Faktoren Polymergehalt und Evakuiergeschwindigkeit einen signifikanten Einfluss auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate haben.

Levene's Test ergibt keine Homogenität der Varianzen der Stichproben ($p = 0,001$). Daher wird für jeden Faktor getrennt ein nicht-parametrischer Test durchgeführt.

Evakuiergeschwindigkeit:

Nur für die Datenserie Evakuiergeschwindigkeit wird erneut der Test nach Levene durchgeführt. Er ergibt auch für diese Datengruppen keine Varianzhomogenität ($p < 0,001$).

Der Kruskal-Wallis-Test zeigt, dass sich die Haftfestigkeits-Mittelwerte der vier Niveaus für die Evakuiergeschwindigkeit auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ deutlich unterscheiden, mit $H = 23,134 > \chi^2_{(3; 0,05)} = 7,81$ ($p < 0,001$).

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das heißt mindestens eine der vier Datengruppen unterscheidet sich statistisch signifikant von den anderen. Der post-hoc durchgeführte, bei nicht gegebener Varianzhomogenität indizierte Games-Howell-Test ergibt für die vier Niveaus folgendes:

Evakuiergeschw. [mbarL/s]	1,65	10,0	13,4	33,5
1,65		p = 0,011*	p = 0,001*	p = 0,002*
10,0			p = 0,502	p = 0,281
13,4				p = 0,942

Tabelle 13: p–Werte für die Evakuiergeschwindigkeiten auf allen drei Niveaus des Polymergehaltes. * statistisch signifikante Unterschiede.

Betrachtet man den Einfluss der Evakuiergeschwindigkeit gleichzeitig auf allen drei Niveaus des Polymergehaltes, so unterscheidet sich nur die Evakuiergeschwindigkeit auf dem Niveau 1,65 mbarL/s bezüglich des Einflusses auf die Haftfestigkeit signifikant von allen drei übrigen Niveaus. Ansonsten lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen.

Auf Grund von Abb. 4-54 lässt sich allerdings vermuten, dass zumindest für einen Polymergehalt von 375 µg ein signifikanter Unterschied in der Haftfestigkeit zwischen allen vier Niveaus der Evakuiergeschwindigkeit bestehen könnte. Daher wird für diese Versuchsserie eine getrennte statistische Auswertung durchgeführt.

Levene's Test zeigt keine Varianzhomogenität der Stichproben (p = 0,030). Der Unterschied zwischen den vier Niveaus ist höchst signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $H = 17,583 > \chi^2_{(3; 0,05)} = 7,81$; p = 0,001). Der Games-Howell-Test ergibt für die Versuchsserie mit 375 µg Polymergehalt folgendes:

Evakuiergeschw. [mbarL/s]	1,65	10,0	13,4	33,5
1,65		p = 0,003*	p < 0,001*	p < 0,001*
10,0			p = 0,042*	p = 0,004*
13,4				p = 0,019*

Tabelle 14: p–Werte für die Evakuiergeschwindigkeiten unter ausschließlicher Berücksichtigung eines Polymergehaltes von 375 µg. * statistisch signifikante Unterschiede.

Im Fall der Versuchsserie mit 375 µg Polymergehalt hat jede der 4 Evakuiergeschwindigkeiten einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate. Das Ausmaß des Effektes der Evakuiergeschwindigkeit wird geringer, wenn die Polymerkonzentration sinkt (vgl. Abb. 4-54).

Polymergehalt:

Für die Datenreihen „Haftfestigkeit in Abhängigkeit vom Polymergehalt“ ergibt sich keine Varianzhomogenität ($p < 0,001$).

Die Mittelwerte der Haftfestigkeit auf den drei Niveaus des Polymergehaltes unterscheiden sich höchst signifikant ($H = 29,730 > \chi^2_{(2; 0,05)} = 5,99$; $p < 0,001$). Schließlich zeigt der Games-Howell-Test einen höchst signifikanten Unterschied für jede der drei Polymerkonzentrationen auf allen vier Niveaus für die Evakuiergeschwindigkeit (jeweils $p \leq 0,002$). Der Polymergehalt hat demnach einen sehr starken Einfluss auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate.

Sowohl die Evakuiergeschwindigkeit als auch der Polymergehalt zeigen einen deutlichen Einfluss auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate. Da der Effekt der Evakuiergeschwindigkeit mit steigender Polymerkonzentration zunimmt, sollte es durch Kombination beider Faktoren möglich sein, einen definierten Wert für die Haftfestigkeit gezielt einzustellen. In Kapitel 4.4.3 werden dahingehende Versuche beschrieben. Bereits die Ergebnisse in Kapitel 4.4.1.2 zeigten für OLCS mit 68 µg Fluorescein-Natrium oberhalb einer Evakuiergeschwindigkeit von 13,4 mbarL/s keine weitere deutliche Erhöhung der Haftfestigkeit. Dieses Ergebnis ließ sich jetzt an drei weiteren Versuchsreihen bestätigen (vgl. Abb. 4-54).

Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der schnell eingefrorenen Proben (33,5 mbarL/s) mit 375 µg Polymergehalt, soll untersucht werden, ob ein Hinweis für das Stagnieren der Haftfestigkeit zu finden ist. Dazu wurden Querschnittsaufnahmen gemacht.

Abb. 4-55 und Abb. 4-56: REM-Aufnahmen von OLCS, die unter schnellem Evakuieren mit 33,5 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit eingefroren wurden (Methode 3, 375 µg HPMC E50, 68 µg Fluorescein-Natrium).

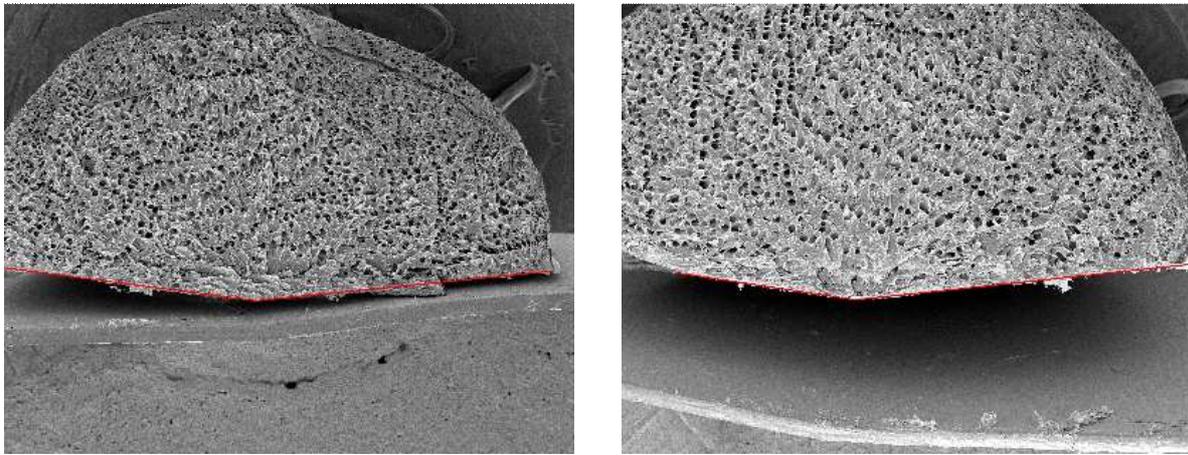


Abb. 4-55 a und b: Die Aufnahmen zeigen den beim Durchfrieren von der äußeren Oberfläche zum Zentrum der Bodenfläche hin gebildeten Keil mit einem Winkel von etwa 166°.

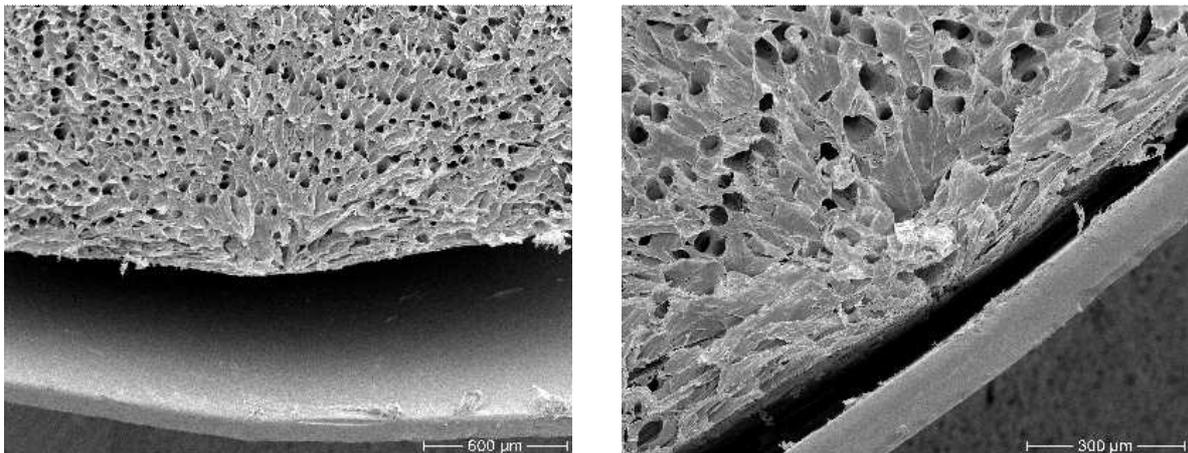


Abb. 4-56 a und b: Detailaufnahmen vom mittleren Bodenbereich der durch den Eiskeil gebildeten Lyophilisatstruktur.

Die Abb. 4-55 a und b sowie Abb. 4-56 a und b zeigen statt der vermuteten planen Unterseite eine keilförmig zur Mitte hin zulaufende Auflagefläche.

Diese Beobachtung lässt sich wie folgt erklären: Eis nimmt bekanntlich ein größeres Raumvolumen ein als Wasser. Bei 0 °C entspricht 1 Raumteil flüssiges Wasser 1,0906 Raumteilen Eis [8]. Friert nun der Flüssigkeitstropfen schnell von außen nach innen durch, so wird das noch flüssige Wasser immer weiter durch das sich bildende Eis in Richtung Mittelpunkt gedrängt [50].

Die schnell wachsenden, langen und dünnen Eiskristalle hinterlassen nach dem Gefriertrocknen ein strahlenförmig zum Zentrum der Bodenfläche hin verlaufendes Netz von Kanälen (Abb. 4-57, Abb. 4-58 und Abb. 4-59). Schließlich reicht dem Wasser zwischen PTFE-Folie und der halbkugelförmigen Eishülle das noch zur Verfügung stehende Volumen nicht aus um auszukristallisieren, ohne die Tropfenform zu verändern. Es bildet sich ein flacher Eiskeil aus, der dafür sorgt, dass sich das in seiner näheren Umgebung mit der PTFE-Folie in Kontakt befindliche Eis leicht von der Folie abhebt (vgl. Abb. 4-60 und Abb. 4-56 a). An den Rändern des gefrorenen Tropfens bleibt das Eis jedoch fest mit der PTFE-Unterlage verbunden, da hier die Adhäsionskräfte am stärksten sind und die PTFE-Folie flexibel ist.

Damit erklärt sich zum einen die von 180° abweichenden Winkel (etwa 166°) für die Bodenfläche (Abb. 4-55 a und b), andererseits das Erscheinungsbild der Restmengen des Lyophilisates auf den PTFE-Folien nach dem Abreißen der Tropfen (Abb. 4-61 und Abb. 4-62).

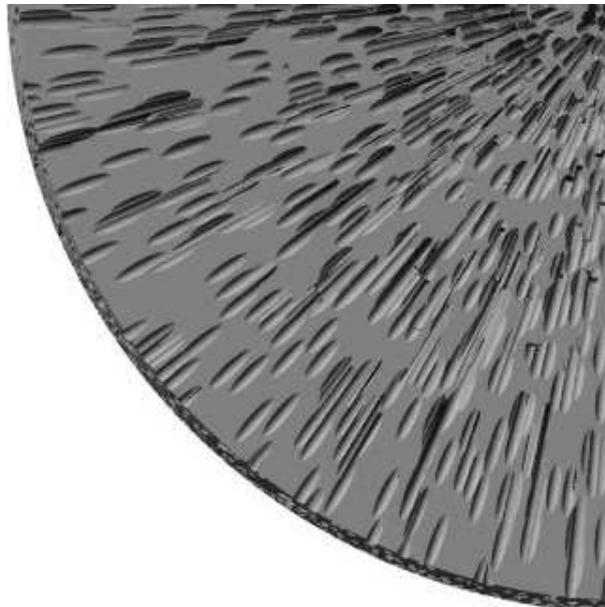


Abb. 4-57: Schematische Darstellung eines Vertikalschnittes. Die langen, dünnen Eiskanäle verlaufen strahlenförmig zum Zentrum. Die Mitte der Bodenfläche befindet sich am oberen rechten Bildrand.

Abb. 4-58 und Abb. 4-59: REM-Aufnahmen von OLCS, die unter schnellem Evakuieren mit 33,5 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit eingefroren wurden (Methode 3, 375 µg HPMC E50, 68 µg Fluorescein-Natrium).

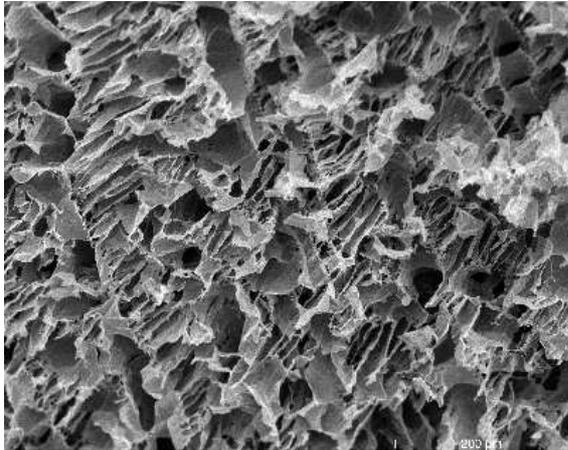


Abb. 4-58: Detailaufnahmen eines Vertikal-schnittes. Das Zentrum der Bodenfläche befindet sich am oberen Bildrand rechts. Die Eiskanäle sind zu diesem Punkt hin ausgerichtet.

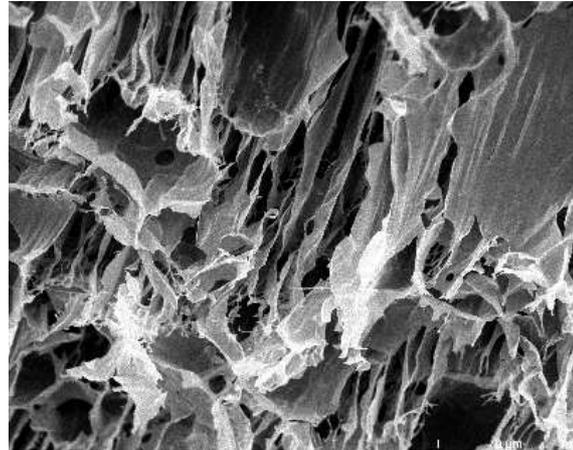


Abb. 4-59: Der Mittelpunkt der Bodenfläche befindet sich am oberen Bildrand in der Mitte.

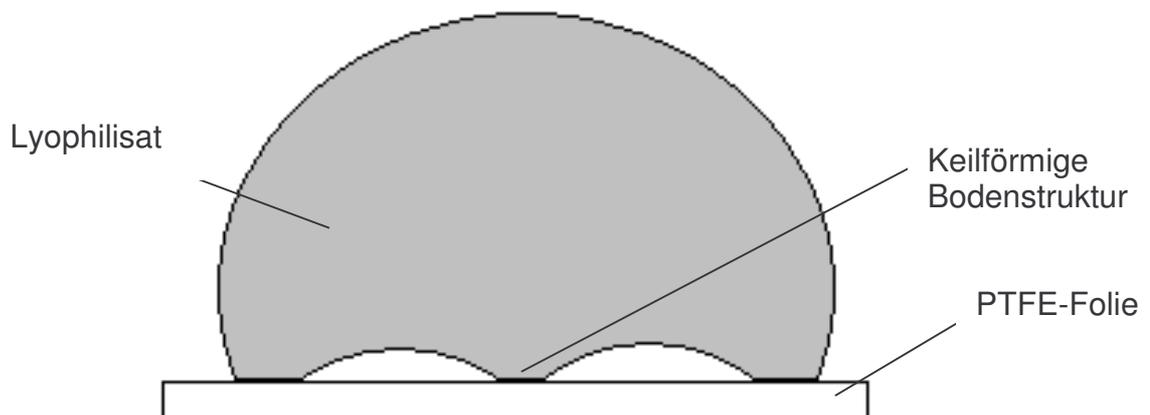


Abb. 4-60: Nicht maßstäbliche Schemazeichnung des Querschnitts eines Lyophilisates, eingefroren durch vakuuminduziertes Einfrieren mit einer Evakuiergeschwindigkeit von 33,5 mbarL/s. Ausgebildete, keilförmige Bodenstruktur und resultierende Form der Auflagefläche.

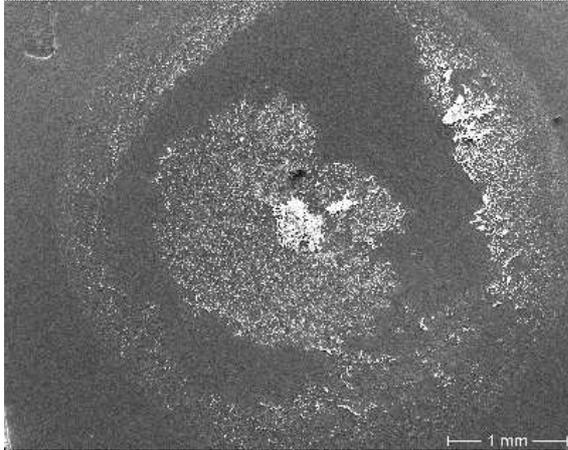


Abb. 4-61: Muster der Substanzreste auf der PTFE-Folie nach dem Abreißen des Lyophilisates.



Abb. 4-62: Das Lyophilisat hat nur in der Mitte und am Rand Kontakt zu der Folie gehabt.

Somit lässt sich auch erklären, warum die Haftfestigkeit trotz einer Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit abnehmen kann. Dies zeigt sich bei der Versuchsreihe mit 125 µg HPMC E50 (vgl. Tabelle 13 und Abb. 4-54).

4.4.1.4 Sonstige Erkenntnisse zur Haftfestigkeit (Veränderung des Anlagendesigns)

Während der Arbeiten mit dem Mini-Gefriertrockner wurde das Anlagendesign immer wieder geringfügig verändert, um sowohl die Herstellungsbedingungen als auch die Handhabung im täglichen Betrieb zu optimieren (vgl. Kapitel 2). Im folgenden Versuch wird untersucht, welche Auswirkungen eine solche Veränderung auf die Produkteigenschaften haben kann.

Der Unterschied von Prototyp 3 zu Prototyp 4 liegt darin, dass jetzt nicht mehr die gesamte Kondensatorfläche (Messingrohr von 25 cm Länge und 25 mm Durchmesser) in Kontakt mit dem Kühlmedium steht, sondern es wird ein etwa 15 cm langes Messinghalbrohr durch Wärmeentzug gekühlt. Dieses Halbrohr steht über einem, auf der Oberseite geöffneten, hohlen Kupferzylinder von etwa 1,5 cm Durchmesser in direktem Kontakt mit dem Flüssigstickstoff (vgl. Abb. 4-7). Zudem wird die anfällige Trockenkammer aus Acrylglas ersetzt durch eine Messingkammer.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei Anwendung der gleichen Gefriertrocknungsmethode resultieren daraus folgende Veränderungen:

- Geringfügige Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit bei identischer Ventilstellung. Dies spricht für eine Verbesserung der Dichtigkeit der Anlage nach Austausch der Acrylglastrockenkammer.
- Verbesserung des Endvakuums von 0,012 mbar auf 0,006 mbar (vgl. a).
- Durch Reduzierung der Kondensatorfläche um etwa den Faktor 3, wird das Gas in der Trocknungskammer langsamer abgekühlt. Dies führt zu einem deutlich langsameren Wärmeentzug der flüssigen Probe.
- Deutlich verbesserte Handhabung der Anlage (keine Kondenswasserbildung außen an der Trockenkammer).

Die Temperatur- und Druckkurven in Abb. 4-63 wurden unter identischen Bedingungen (Methode 2: Evakuiergeschwindigkeit 13,4 mbarL/s, Ventilstellung = 530, mit 0,272 % Fluorescein-Natrium und 1 % HPMC E50), in den Prototypen 3 und 4 aufgezeichnet.

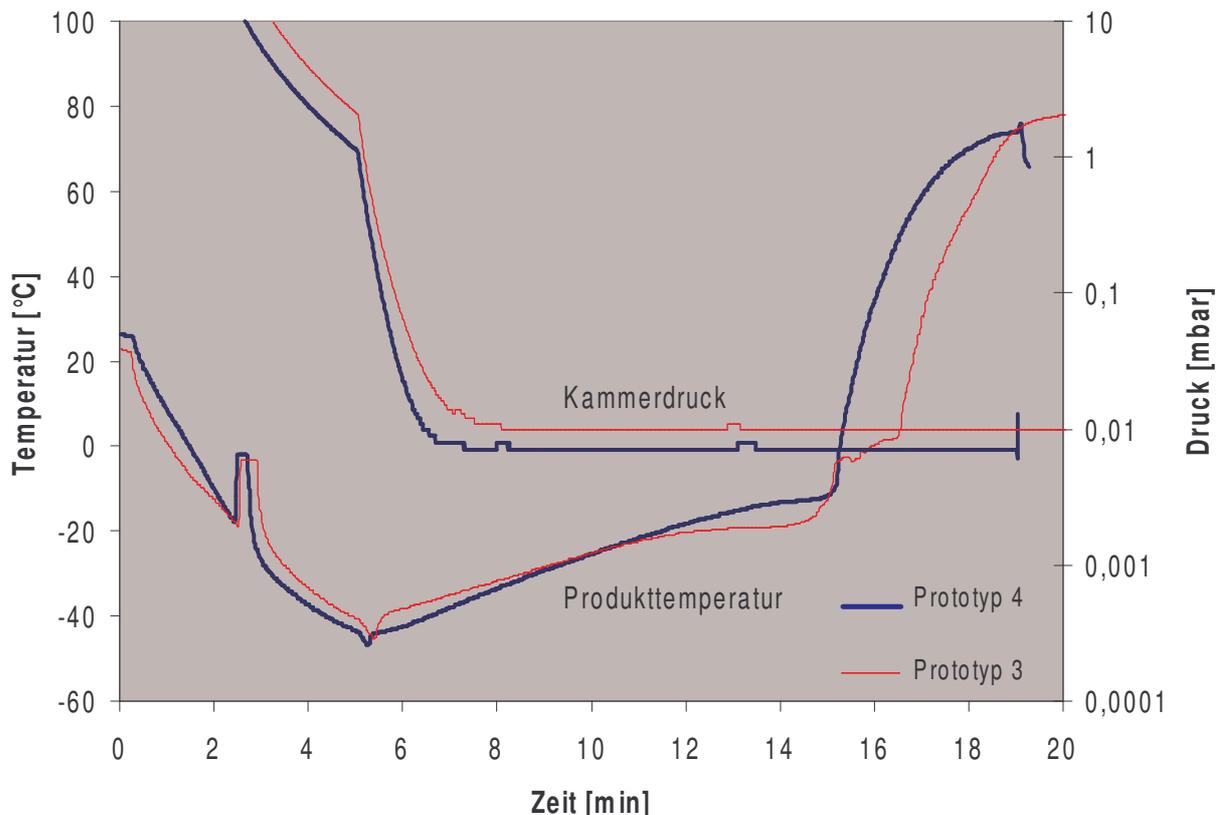


Abb. 4-63: Temperatur- und Druckverlauf für identische Proben bei der gleichen Methode und unterschiedlichem Gefriertrockner-Design.

Bei Prototyp 4 lässt sich neben der deutlichen Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit (Linksverschiebung der Druckkurve) auch die Verbesserung des Endvakuums etwa um den Faktor 2 erkennen (Abb. 4-63, Druckkurve).

Betrachtet man die Temperaturkurven, so sind für die Primär- und die Sekundärtrocknungsphasen, unter Berücksichtigung eventueller Unterschiede in der Position des Thermoelementes, die Temperaturverläufe gleich. Auch die Dauer der Sublimationsphase ist bei beiden Prototypen identisch. Eine deutliche Abweichung der Temperaturverläufe voneinander zeigt sich allerdings für die Einfrierphase. Diese spielt aber die entscheidende Rolle für die späteren Produkteigenschaften, wie zum Beispiel Haftfestigkeit der Lyophilisate auf der PTFE-Folie. Deshalb ist die Einfrierphase in Abb. 4-64 zur näheren Untersuchung vergrößert dargestellt.

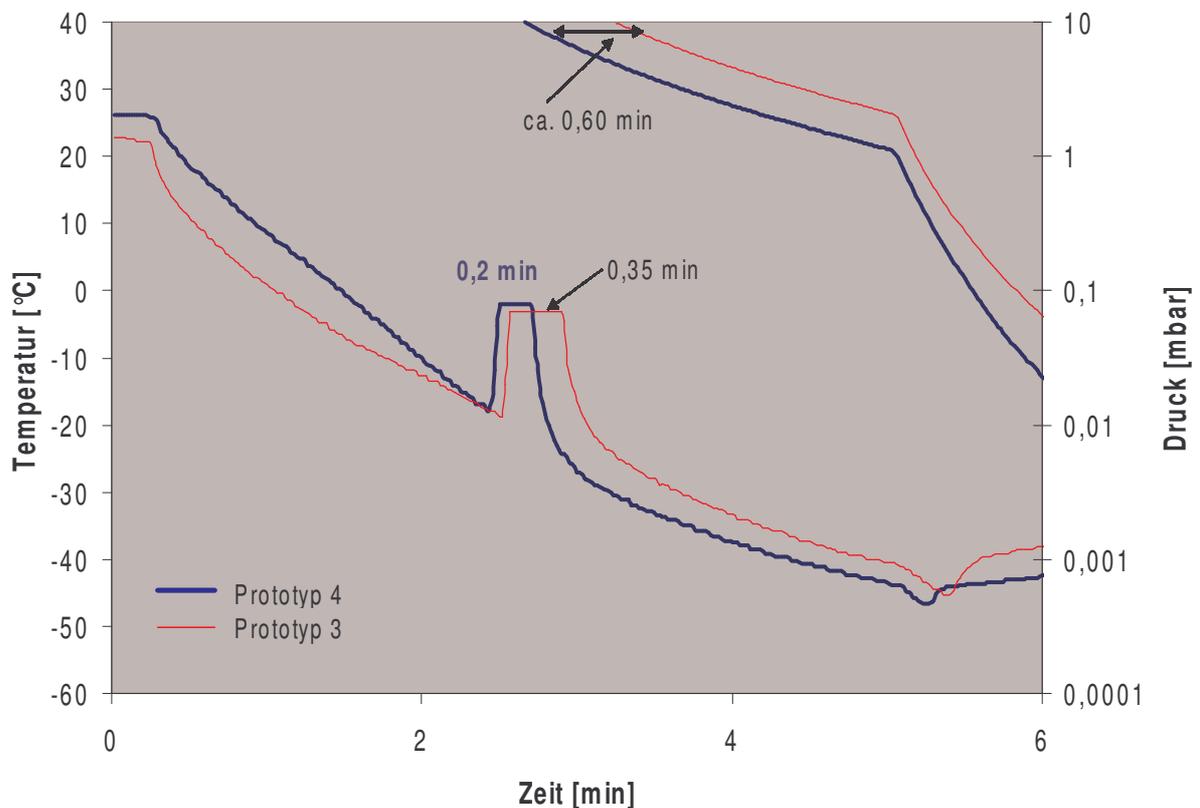


Abb. 4-64: Einfrierkurven mit Plateauphasen und zugehörigen Druckverläufen für identische Proben bei der gleichen Methode und unterschiedlichem Gefriertrockner-Design (Methode 2, 1 % Polymergehalt und 0,272 % Wirkstoffgehalt in der Lösung).

Die Änderungen im Anlagendesign führen zu einem veränderten Verlauf sowohl der Abkühl- als auch der Durchfrierphase. Die Dauer der Plateauphase wird unter den neuen Bedingungen wesentlich verkürzt (dicke Linie). Wie bereits in Kapitel 4.4.1.1 untersucht, resultiert eine kürzere Plateauphase in einer Zunahme der Haftfestigkeit.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Daraus sollten für den Prototyp 4 bei gleicher Methode höhere Haftfestigkeiten resultieren. Um dies zu untersuchen werden Proben sowohl mit 13,4 mbarL/s als auch 33,5 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit in beiden Prototypen hergestellt. Die Ergebnisse der anschließenden Abreißtests sind in Tabelle 16 und Abb. 4-65 dargestellt. Für die mit dem Prototyp 4 hergestellten OLCS ergibt sich im Mittel eine Erhöhung der Haftfestigkeit um ca. 30-40 % gegenüber den mit dem alten Anlagendesign hergestellten Proben (Abb. 4-65). Für beide Einfriermethoden zeigt sich mit der neuen Anlage auch eine deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Haftfestigkeiten (vgl. Rel.St.Abw. in Tabelle 16).

Anlage	Prototyp 3		Prototyp 4	
Ventilstellung	V = 600	V = 530	V = 600	V = 530
	7,3	6,5	13,0	10,3
	7,6	7,4	13,4	10,6
	8,1	8,0	14,6	11,8
	8,2	8,6	13,7	12,8
	8,6	8,9	14,3	13,0
	9,1	9,8	14,5	13,1
	9,2	9,9	16,3	13,4
	11,1	11,3	18,0	13,7
	11,4	12,2		13,8
	11,6	12,2		14,0
	12,1	13,4		14,6
	12,5	13,6		15,0
	14,4	13,9		15,3
	15,4	14,0		15,8
				17,6
Min [g]	7,3	6,5	13,0	10,3
Max [g]	15,4	14,0	18,0	17,6
Mittelwert [g]	10,47	10,69	14,73	13,65
St.Abw. [g]	2,56	2,58	1,66	1,91
Rel.St.Abw. [%]	24,5	24,1	11,3	14,0
Anzahl [n]	14	14	8	15

Tabelle 15: Rohdaten der Haftfestigkeitsuntersuchungen für Prototyp 3 und 4 bei mittlerem und schnellem Einfrieren (Polymergehalt 250 µg, Wirkstoffgehalt 68 µg).

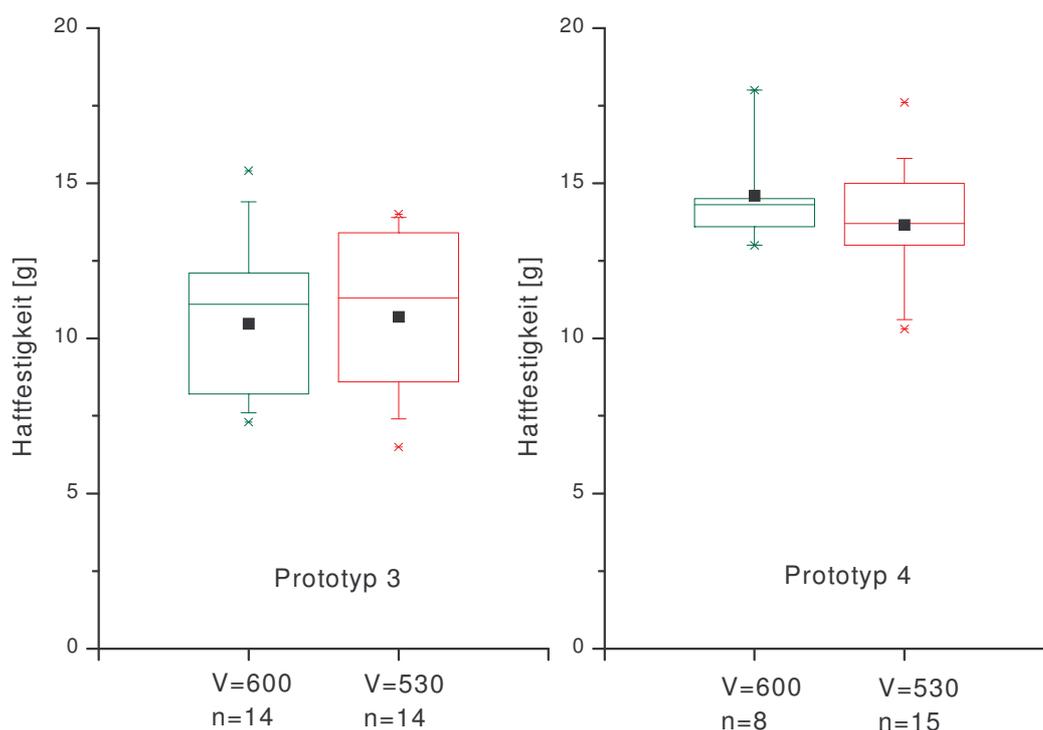


Abb. 4-65: Veränderung der Haftfestigkeit bei unterschiedlichem Anlagendesign und sonst identischen Versuchsbedingungen.

Ein modifiziertes Anlagendesign kann zu Veränderungen der Prozesse führen. Daraus können deutliche Unterschiede in den OLCS-Eigenschaften resultieren. Um mit verschiedenen Prototypen OLCS mit identischen Eigenschaften herzustellen, ist es daher notwendig, die Prozessparameter entsprechend anzupassen.

4.4.2 Einfluss auf die Druckfestigkeit der Lyophilisate

Weichselbaum stellte fest, dass das Polymergerüst der Lyophilisate so beschaffen sein sollte, dass es sich leicht verformen lässt, um auf diese Weise eine angenehme Applikation am Auge zu ermöglichen, aber sie quantifizierte die Strukturfestigkeit nicht [82]. Sie prüfte die Lyophilisate nur sensorisch mit den Fingern und kam zu dem Ergebnis, dass Lyophilisate mit einem hohen Polymergehalt (3-5 % in der Ausgangslösung) zwar einerseits sehr stabil, andererseits jedoch so hart waren, dass sie nur schlecht oder gar nicht am Auge appliziert werden konnten.

Ziel der folgenden Versuchsreihen ist, die Strukturfestigkeit der Lyophilisate in Abhängigkeit von verschiedenen Einflussfaktoren zu bestimmen. Schließlich soll versucht werden, diese Ergebnisse zu quantifizieren.

4.4.2.1 Einfluss der Einfriermethode auf die Druckfestigkeit

In diesem Versuch soll die Druckfestigkeit von Lyophilisaten mit 375 µg HPMC E50 und 68 µg Fluorescein-Natrium, hergestellt bei unterschiedlichen Einfrierbedingungen, verglichen werden. Die Wahl der Evakuiergeschwindigkeiten erfolgt in Anlehnung an die Haftfestigkeitsuntersuchungen des Kapitels 4.4.1.3.

Abb. 4-66 zeigt Druckfestigkeitsprofile, wie sie sich nach Berechnung des zurückgelegten Weges aus der Messzeit ergeben.

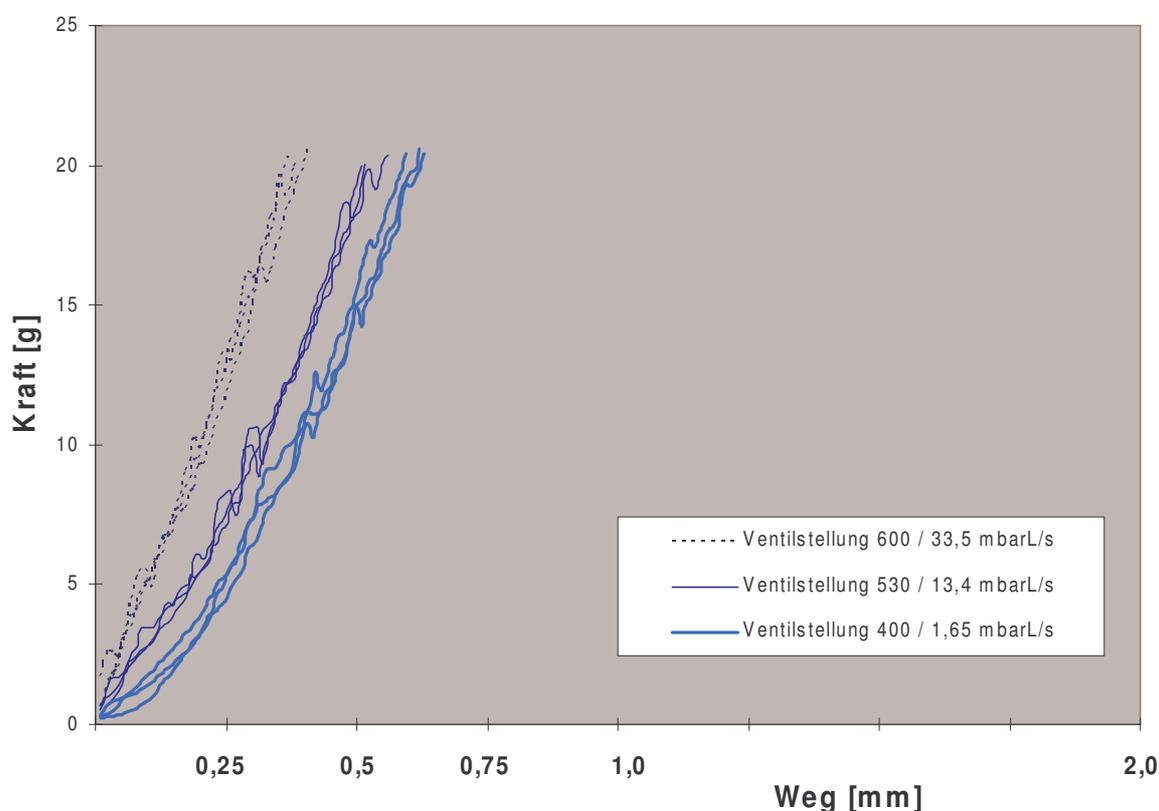


Abb. 4-66: Abhängigkeit der Druckfestigkeit von der Einfriermethode. Einfach dosierte OLCS mit 375 µg Polymergehalt, dargestellt je n = 3.

Je weiter eine Kurve nach rechts verschoben ist, desto geringer ist die Druckfestigkeit. Obwohl nur relativ gering, lassen sich Festigkeitsunterschiede in Abhängigkeit von der Einfriereschwindigkeit erkennen. Eine höhere Evakuiergeschwindigkeit scheint zu einer höheren Druckfestigkeit zu führen. Die Reproduzierbarkeit innerhalb der einzelnen Methoden ist sehr gut.

4.4.2.2 Einfluss des Polymergehaltes auf die Druckfestigkeit

Es wird die Druckfestigkeit von Lyophilisaten mit 68 μg Fluorescein-Natrium und 125 μg , 250 μg bzw. 375 μg HPMC untersucht. Die Lyophilisate werden nach identischen Einfrierbedingungen, Evakuieren mit 33,5 mbarL/s (Ventilstellung = 600), hergestellt.

Im nachfolgenden Diagramm (Abb. 4-67) sind die entsprechenden Druckfestigkeitsprofile graphisch dargestellt.

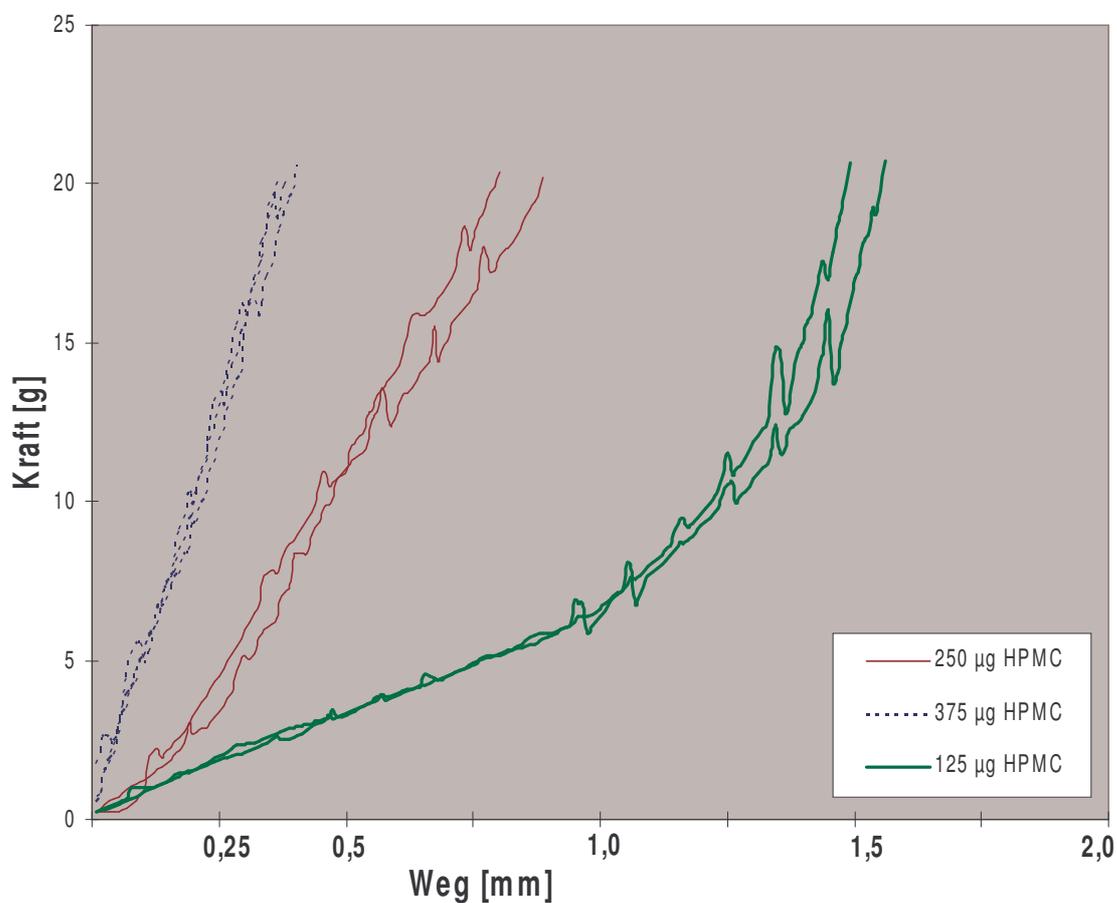


Abb. 4-67: Abhängigkeit der Druckfestigkeit vom eingesetzten Polymergehalt.

Erwartungsgemäß nimmt die Druckfestigkeit mit steigendem Polymergehalt stark zu. Dieser Effekt ist wesentlich ausgeprägter als der Einfluss der Einfriermethode (vgl. Abb. 4-66).

4.4.2.3 Quantifizierung der Druckfestigkeit

Um verschiedene Druckfestigkeitsprofile direkt miteinander vergleichen zu können, ist eine numerische Darstellung günstig. Zur Quantifizierung der Druckfestigkeit soll die Steigung der Druckkurven herangezogen werden. Dabei müssen jedoch diejenigen Eigenschaften der Lyophilisate berücksichtigt werden, die unabhängig von der Druckfestigkeit der inneren Struktur den Kurvenverlauf beeinflussen. Eine Korrektur der Druckprofile ist notwendig.

So zeigen Lyophilisate, die unterschiedlich schnell eingefroren wurden, deutliche Unterschiede in ihrem äußeren Erscheinungsbild.

Beim Einfrieren unter Atmosphärendruck oder bei niedrigen Evakuiergeschwindigkeiten wie zum Beispiel 1,65 mbarL/s ergibt sich eine äußere Form, wie in Abb. 4-68 dargestellt. Die Lyophilisate haben am höchsten Punkt der Halbkugel eine deutlich erkennbare Spitze durch Gefrierkonzentration. Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 4-69 einen Tropfen, der mit 13,4 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit eingefroren wurde. Seine Oberfläche ist durchgehend halbkugelförmig.

Diese unterschiedlichen Oberflächenformen sind der Grund dafür, dass Druckprofile von Lyophilisaten hergestellt mit niedriger Evakuiergeschwindigkeit im unteren Bereich einen aufwärts gekrümmten Kurvenverlauf aufweisen (Abb. 4-66, rechte Kurve), während sich bei Druckfestigkeitsmessungen der OLCS eingefroren mit höheren Evakuiergeschwindigkeiten ein nahezu linearer Kurvenverlauf zeigt (Abb. 4-66, linke Kurve).

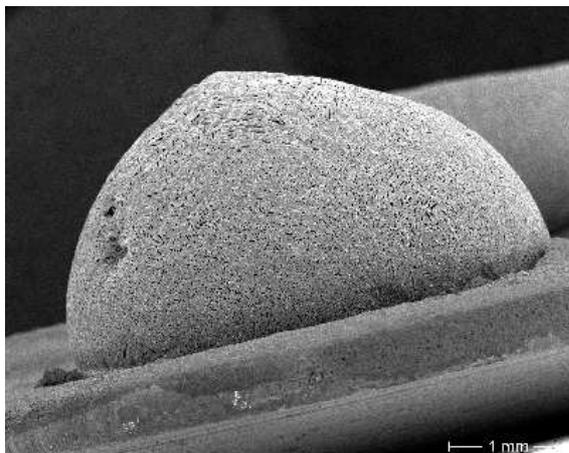


Abb. 4-68: Langsames Einfrieren (1,65 mbarL/s) führt zur Bildung einer spitzen Oberflächenstruktur.

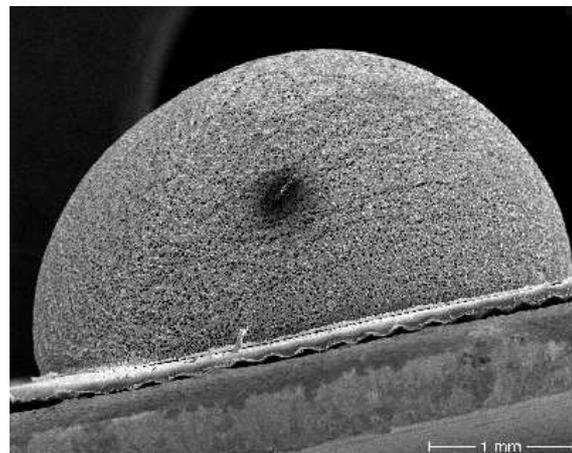


Abb. 4-69: Schnellere Evakuiergeschwindigkeiten, wie hier 13,4 mbarL/s, erzeugen eine halbkugelförmige Oberfläche.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Eine zusätzliche Fehlerquelle stellt zu Beginn der Messung die PTFE-Folie dar. Sie ist zum Teil leicht gewölbt und kann nicht immer vollständig plan auf den Aluminiumblock gelegt werden.

Um diese Fehlerquellen auszuschalten und eine wahre Aussage über die innere Strukturfestigkeit der Lyophilisate zu bekommen, wird der während des ersten viertel Millimeters aufgezeichnete Teil der Druckprofile nicht mit zur Berechnung herangezogen.

Bei einem Polymergehalt von 125 µg sind die Lyophilisate so weich, dass sie bereits lange vor Erreichen der 20-Gramm-Grenze (vgl. Methode, Kapitel 3.2.5) komplett zusammengedrückt sind, erkennbar an dem plötzlich einsetzenden, starken Anstieg der Druckwerte nach dem linearen Teil (Abb. 4-67). Auch dieser Kurventeil würde das Ergebnis verfälschen. Deshalb werden auch die Werte > 1 mm nicht bei der Berechnung berücksichtigt.

Für die so erhaltenen Kurvenstücke wird nun durch Anlegen einer Geraden an jedes einzelne Kurvenstück und Berechnung der Geradengleichung die Steigung als Maß für die Druckfestigkeit ermittelt. Dies ist in Abb. 4-70 an 3 Kurven beispielhaft demonstriert. Somit ergibt sich als Einheit der Druckfestigkeit g/mm.

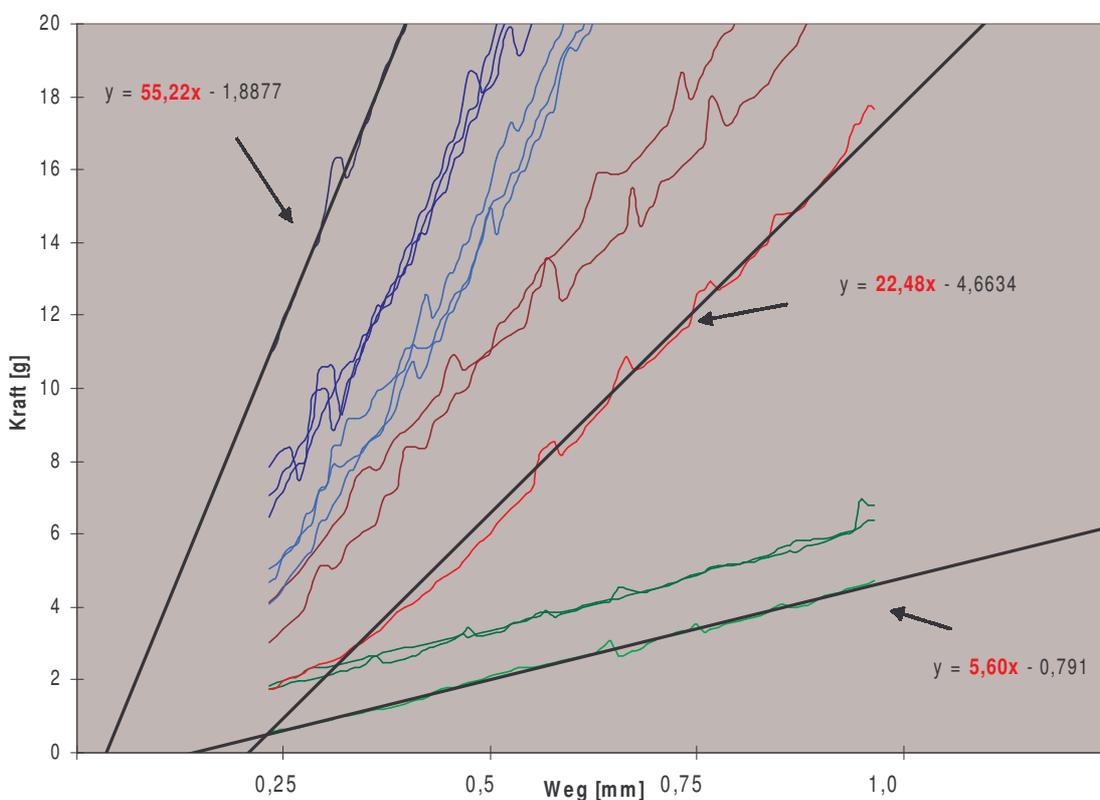


Abb. 4-70: Durch Anlegen einer Geraden und Berechnung der Geradengleichung wird die Steigung der Kurvenstücke ermittelt.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für jeweils $n = 5$ Druckprofile von einfach dosierten Lyophilisaten mit 3 verschiedenen Polymerkonzentrationen (125 μg , 250 μg und 375 μg HPMC E50) hergestellt nach je 4 unterschiedlichen Einfriermethoden (Evakuiergeschwindigkeiten von 1,65 mbarL/s, 10 mbarL/s, 13,5 mbarL/s und 33,5 mbarL/s) werden auf diese Weise die Druckfestigkeitswerte berechnet. Die Ergebnisse sind nachfolgend sowohl tabellarisch (Tabelle 17) als auch graphisch in einem Diagramm (Abb. 4-71) zusammengestellt.

Evakuiergeschwindigkeit [mbarL/s]	Polymergehalt im OLCS [μg]	Mittelwert der Druckfestigkeit [g/mm]	St.Abw. der Druckfestigkeit [g/mm]
1,65	125	5,81	0,34
	250	22,11	1,58
	375	47,07	5,83
10,0	125	6,65	2,04
	250	25,49	4,95
	375	52,68	8,96
13,4	125	5,84	0,33
	250	25,14	3,39
	375	43,83	4,94
33,5	125	5,46	0,65
	250	25,99	6,89
	375	51,19	7,78

Tabelle 16: Druckfestigkeitswerte in Abhängigkeit von Polymergehalt und Evakuiergeschwindigkeit: statistische Auswertung, jeweils $n = 5$.

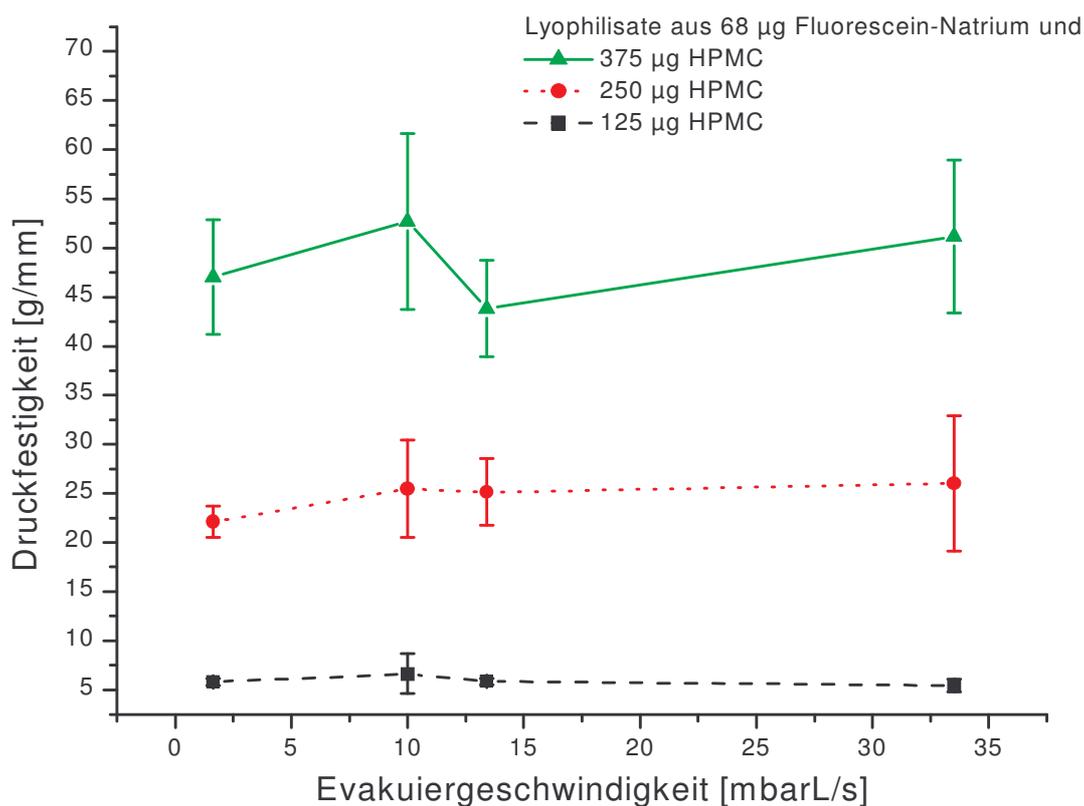


Abb. 4-71: Abhängigkeit der Druckfestigkeit von Polymergehalt und Evakuiergeschwindigkeit der jeweiligen Einfriermethode (jeweils $n = 5$, ein Fehlerbalken entspricht einer Standardabweichung).

Statistisch soll nun überprüft werden, inwieweit die beiden Faktoren Polymergehalt und Evakuiergeschwindigkeit einen signifikanten Einfluss auf die Druckfestigkeit der Lyophilisate haben.

Varianzhomogenität der Stichproben liegt nicht vor ($p < 0,001$), daher wird für jeden Faktor getrennt ein nicht-parametrischer Test durchgeführt.

Evakuiergeschwindigkeit:

Für die Datenserie „Abhängigkeit der Druckfestigkeit von der Evakuiergeschwindigkeit“ wird die Annahme homogener Varianzen mit $p = 0,415$ nicht verletzt.

Es liegt keine Normalverteilung vor ($p = 0,043$), somit ist wiederum der Kruskal-Wallis-Test indiziert.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Dieser zeigt auf den vier Niveaus für die Evakuiergeschwindigkeit keinen Unterschied der Druckfestigkeitsmittelwerte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, $H = 0,355 > \chi^2_{(3; 0,05)} = 7,81$; $p = 0,949$).

Der post-hoc durchgeführte, bei Varianzhomogenität indizierte Fischer's Least Significance Difference (LSD)-Test ergibt für die vier Niveaus folgendes:

Evakuiergeschw. [mbarL/s]	1,65	10,0	13,4	33,5
1,65		p = 0,630	p = 0,838	p = 0,708
10,0			p = 0,493	p = 0,915
13,4				p = 0,562

Tabelle 17: p-Werte für die Evakuiergeschwindigkeiten auf allen drei Niveaus des Polymergehaltes. Keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Für die Druckfestigkeit der Lyophilisate auf den vier Niveaus der Evakuiergeschwindigkeit lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied erkennen. Die Evakuiergeschwindigkeit hat demnach keine signifikante Wirkung auf die Druckfestigkeit.

Polymergehalt:

Für die Datengruppen „Druckfestigkeit in Abhängigkeit vom Polymergehalt“ ergibt sich keine Varianzhomogenität ($p < 0,001$).

Auf den drei Niveaus des Polymergehaltes unterscheiden sich die Druckfestigkeitsmittelwerte höchst signifikant ($H = 51,819 > \chi^2_{(2; 0,05)} = 5,99$; $p < 0,001$). Dieser höchst signifikante Unterschied besteht nach dem Games-Howell-Test zwischen jeder der drei Polymerkonzentrationen (jeweils $p < 0,001$). Der Polymergehalt hat einen sehr starken Einfluss auf die Druckfestigkeit der Lyophilisate.

Die statistische Auswertung belegt, dass man den Einfluss der Evakuiergeschwindigkeit auf die Strukturfestigkeit der Lyophilisate vernachlässigen kann. Allein der Polymergehalt hat einen starken Einfluss. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass auch die Porengröße nur geringfügig durch die Einfrierbedingungen beeinflusst wird. Dies soll im Folgenden überprüft werden.

Es wurden Lyophilisate mit 375 μg HPMC E50 und 68 μg Fluorescein-Natrium nach unterschiedlichen Einfriermethoden hergestellt, Vertikalschnitte angefertigt und im REM auf ihre Porengröße hin untersucht (Abb. 4-72 bis Abb. 4-74).

Abb. 4-72 bis Abb. 4-74: Vertikalschnitte von Lyophilisaten aus 375 µg HPMC E50 und 68 µg Fluorescein-Natrium hergestellt unter verschiedenen Einfrierbedingungen.

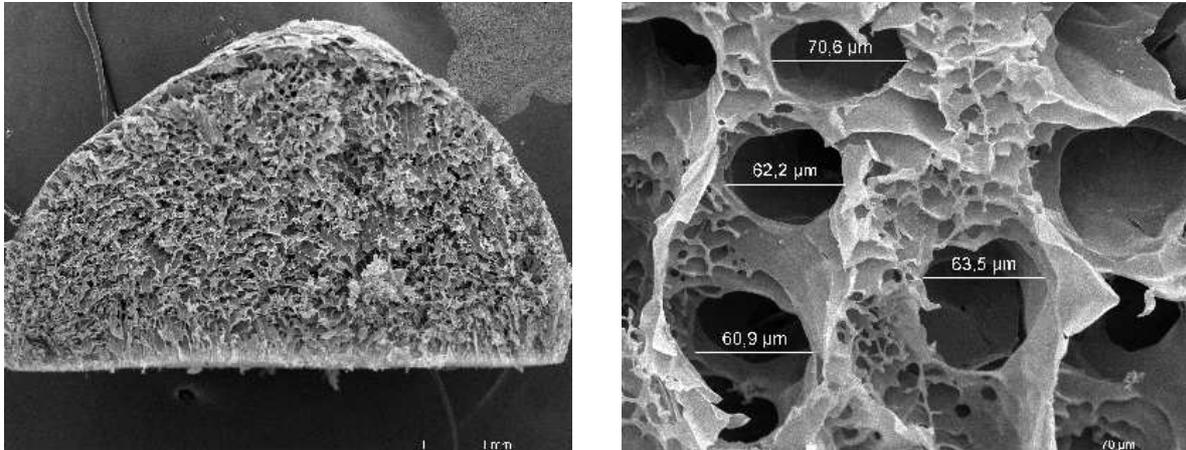


Abb. 4-72 a und b: Vertikalschnitt eines Lyophilisates hergestellt durch Einfrieren unter Atmosphärendruck. Es gibt zwei Porenpopulationen. Der durchschnittliche Porendurchmesser der großen Poren beträgt etwa 60-70 µm.

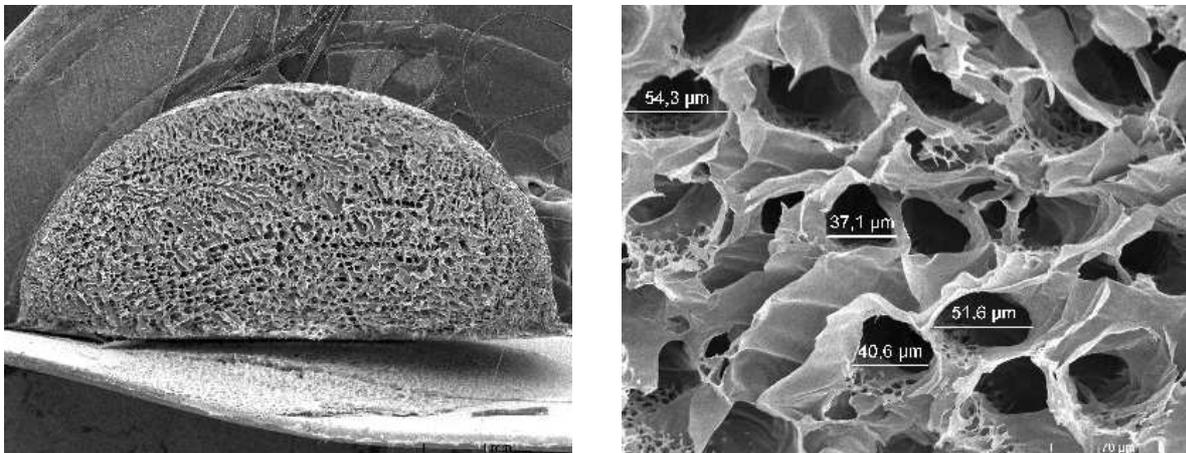


Abb. 4-73 a und b: Vertikalschnitt eines Lyophilisates hergestellt durch Einfrieren mit einer Evakuiergeschwindigkeit von 13,4 mbarL/s. Der durchschnittliche Porendurchmesser beträgt etwa 40-50 µm.

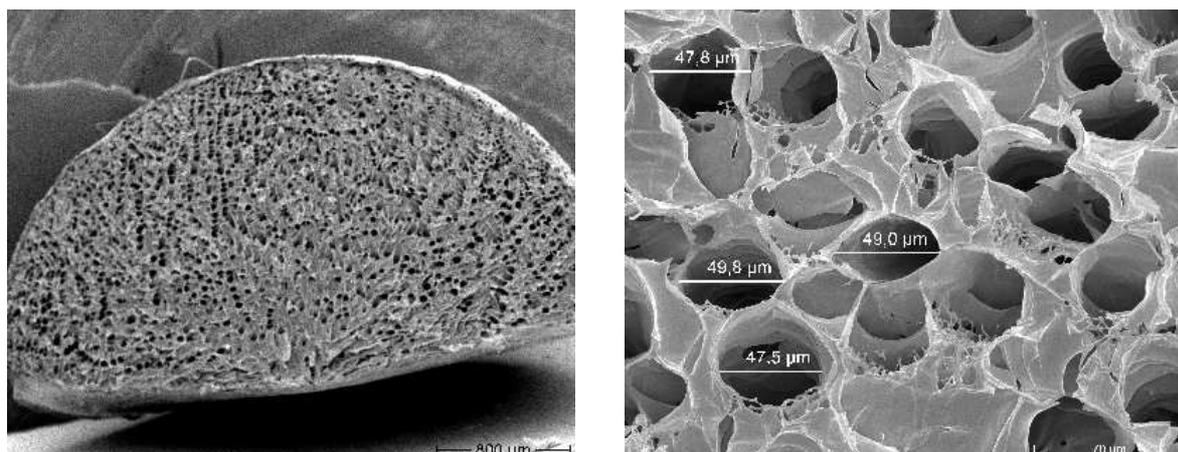


Abb. 4-74 a und b: Vertikalschnitt eines Lyophilisates hergestellt durch Einfrieren mit einer Evakuiergeschwindigkeit von 33,5 mbarL/s. Der durchschnittliche Porendurchmesser beträgt etwa 50 µm.

Die Bestimmungen der Porendurchmesser (je n = 4) ergeben zwar keine Unterschiede beim vakuuminduzierten Einfrieren mit 13,4 mbarL/s und 33,5 mbarL/s, allerdings führt das Einfrieren unter Atmosphärendruck im Mittel zu deutlich größeren Poren (Tabelle 19). Dies hat offensichtlich weder einen maßgeblichen Einfluss auf die Strukturfestigkeit noch auf die Dauer der Sublimationstrocknung (vgl. Kapitel 4.3.3).

	Atmosphärendruck	Evakuiergeschw.	Evakuiergeschw.
	0 mbarL/s	13,4 mbarL/s	33,5 mbarL/s
Porengröße in [µm]	70,6	54,3	47,8
	62,2	37,1	49,8
	60,9	40,6	49,0
	63,5	51,6	47,5
Minimum	60,9	37,1	47,5
Maximum	70,6	54,3	49,8
Mittelwert	64,30	45,90	48,53
St.Abw.	4,33	8,34	1,07
Rel.St.Abw. [%]	6,74	18,17	2,20

Tabelle 18: Porengröße im Vertikalschnitt bei unterschiedlichen Einfrieremethoden: statistische Auswertung.

4.4.3 Erkenntnisse zu Haft- und Druckfestigkeiten durch klinische Studien

Weichselbaum berichtete, dass Lyophilisate, deren Abstreifkraft über 20 g lag, sich nicht mehr ohne Probleme am Auge abstreifen ließen. Ebenso könnten Lyophilisate mit Werten unter 2 g nur mit Schwierigkeiten transportiert werden, da geringe äußere Einwirkungen bereits zu einer Abtrennung vom Träger führen könnten. Beide Erscheinungen sind unerwünscht. Zudem sollte das Polymergerüst der Lyophilisate so beschaffen sein, dass es sich relativ leicht verformen lässt, um auf diese Weise eine angenehme Applikation am Auge zu ermöglichen [82].

Durch klinische Studien sollen für beide Eigenschaften (Ablösbarkeit und Druckfestigkeit) geeignete, rezepturübergreifende Wertebereiche für eine gute In-vivo-Applizierbarkeit gefunden und mit Hilfe der beschriebenen Testmethoden quantifiziert werden. Dabei erfolgt die Variation dieser Eigenschaften über die Herstellungsparameter Polymergehalt der Rezeptur und Einfriermethode durch entsprechende Einstellung am Mini-Gefriertrockner.

Eine in der Ophthalmologie gängige Methode zur Bestimmung der Abflussgeschwindigkeit des Kammerwassers ist die nächtliche Applikation von insgesamt 6 Tropfen Fluoresceinlösung (68 µg pro Tropfen) über einen Zeitraum von 3 Stunden, die für Patient und Arzt aufwendig und unangenehm ist.

Um den Aufwand für diese Untersuchung zu verringern, sollte in einer klinischen Studie (Studie 1) ermittelt werden, ob durch eine einmalige Applikation eines hoch dosierten Fluoresceinlyophilisates (204 µg Wirkstoffdosis) die gleichen diagnostischen Konzentrationen in der Vorderkammer und der Cornea erreicht werden können wie bei dreimaligem Tropfen des Handelspräparates (Fluorescein SE[®] 0,17 % (68 µg pro Tropfen), Alcon) im 15minütigen Abstand [38]. In Hinsicht auf die OLCS-Herstellung mit dem Mini-Gefriertrockner Prototyp 3 sollte getestet werden, ob die gewählte Rezeptur (250 µg HPMC E50 und 204 µg Fluorescein-Natrium pro OLCS) und die ausgesuchte Methode (Methode 2: Evakuiergeschwindigkeit 13,4 mbarL/s, vgl. Abb. 4-30, Kapitel 4.4.1.1) zur gewünschten Haftfestigkeit und somit zu einer angenehmen In-vivo-Applikation führen.

Die In-vitro-Testmethode zum Ablöseverhalten ergab für diese Lyophilisate eine durchschnittliche Haftfestigkeit von 14,4 g (St.Abw. 3,9 g, n = 10, vgl. Tabelle 10).

Die Studie wurde mit 22 Probanden durchgeführt. In 19 Fällen ließen sich die Lyophilisate leicht applizieren und lösten sich nahezu vollständig vom Applikator. Bestätigt wurde dies anhand der Restmengenbestimmung auf der PTFE-Folie durch Fluoreszenzspektroskopie, bei der sich eine durchschnittliche Restmenge an Fluorescein von 2,4 % (St.Abw. 1,3 %, n = 18) ergab. Bei 3 Studienteilnehmern erfolgten die Applikationen nur unvollständig (Mittelwert der Restmengen = 55,6 %, St.Abw. 17,7 %, n = 3). Dies ließ sich aber nach Angaben des studienbegleitenden Arztes auf fehlerhafte Anwendungen zurückführen. Die Studie zeigte, dass mit einem einzelnen Lyophilisat eine Dreifachdosis Fluorescein-Natrium applizierbar ist. Gegenüber einer dreimaligen Augentropfenapplikation zeigt das OLCS eine signifikant bessere Bioverfügbarkeit (bis zu elfmal höhere Konzentrationen in der Cornea) bei gleicher Arzneistoffdosis [38].

In Studie 2 sollte die einmalige Gabe der handelsüblichen Augentropfen (Fluorescein SE[®] 0,17 %, Alcon) mit der neuen Darreichungsform im Hinblick auf Applizierbarkeit und Bioverfügbarkeit verglichen werden. Dabei wurde die gleiche Wirkstoffdosis von 68 µg zum gleichen Zeitpunkt einmalig in das Auge eingebracht [72].

Die OLCS-Klinikmuster mit 250 µg HPMC E50 und 68 µg Fluorescein-Natrium wurden mit dem Prototyp 4 des Mini-Gefriertrockners hergestellt. Weil sich die Lyophilisate der ersten Studie gut von der PTFE-Folie ablösen ließen, sollten für die Herstellung dieser OLCS-Klinikmuster zum Einfrieren ähnliche Bedingungen angewendet werden. Da Versuche mit dem Prototyp 4 gezeigt hatten, dass sich bei identischen Versuchsbedingungen die Haftfestigkeiten gegenüber Prototyp 3 erhöhen (vgl. Kapitel 4.4.1.4), wurde jetzt eine leicht reduzierte Evakuiergeschwindigkeit von 11,6 mbarL/s eingestellt. Es ergab sich für diese Lyophilisate in vitro eine Haftfestigkeit von 12,7 g (St.Abw. 2,2 g, n = 10), gut vergleichbar mit den Werten der ersten Studie.

Im Laufe der Studie 2 mit 20 Probanden zeigte sich, dass 45,5 % (20 von 44) der Lyophilisate schlecht zu applizieren waren. Sie verschmierten beim Kontakt mit der Tränenflüssigkeit und ließen sich nicht vollständig von der Folie ablösen. Die Restmengenanalyse dieser OLCS ergab eine nicht applizierte Fluoresceinmenge von 70,8 % (St.Abw. 7,7 %, n = 20) gegenüber einer Restmenge von 2,1 % (St.Abw. 0,9 %, n = 24) bei Klinikmustern mit guter Applizierbarkeit.

Rückstellmuster beider Studien lieferten als Anhaltswert für die Druckfestigkeit der OLCS der Studie 1 einen Wert von 62,4 g/mm (St.Abw. 4,3 g/mm, n = 3), für die der Studie 2 einen Wert von nur 29,0 g/mm (St.Abw. 4,5 g/mm, n = 3).

Bei annähernd gleicher Haftfestigkeit führt die Reduktion des Wirkstoffgehaltes um 67 % zu einer um 53,5 % verringerten Druckfestigkeit. Anzunehmen ist, dass dies der Grund für die schlechte Applizierbarkeit bei 20 der 44 OLCS war.

Dennoch zeigt die Auswertung der erfolgreich applizierten Lyophilisate eine signifikant bessere Bioverfügbarkeit [72].

In Studie 3 mit 26 Probanden sollte überprüft werden, ob bei einfachem Fluoresceingehalt durch ein Anheben der Druckfestigkeit in den Wertebereich der Studie 1 (55-65 g/mm) eine bessere Applizierbarkeit als in Studie 2 erreicht werden kann. Da der Wirkstoffgehalt mit 68 µg vorgegeben ist, der Feststoffgehalt aber als Variable genutzt werden kann die Druckfestigkeit zu erhöhen, wurde für die neuen, einfach dosierten Klinikmuster ein Polymergehalt von 1,5 % HPMC E50 in der Ausgangslösung gewählt. Damit sollte sich nach Abb. 4-71 eine Druckfestigkeit von 45-55 g/mm ergeben. Da eine solche Variation des Polymergehaltes auf 1,5 % mit einer starken Haftfestigkeitserhöhung einhergeht, muss die optimale, niedrigere Evakuiergeschwindigkeit ermittelt werden, bei der eine Haftfestigkeit im Bereich von 12 bis 14 g beibehalten wird. Nach Abb. 4-54 (Kapitel 4.4.1.3) ist bei 375 µg Polymergehalt der entsprechende Wert für die Evakuiergeschwindigkeit 5,5 mbarL/s. Mit einer Ventilstellung von 470 wird diese Evakuiergeschwindigkeit erreicht.

Nach diesen Vorgaben wurden Klinikmuster gefertigt und vorab in vitro auf ihre Eigenschaften untersucht. Der erwartete Wert für die Druckfestigkeit liegt bei 45-55 g/mm. Das ermittelte Ergebnis brachte einen Wert von 51,6 g/mm (St.Abw. 5,3 g/mm, n = 5). Für die Haftfestigkeit wird 12 g bis 14 g vorausgesagt. Die In-vitro-Untersuchungen ergaben 12,7 g (St.Abw. 4,9 g, n = 10).

Erwartungsgemäß ließen sich diese Lyophilisate ähnlich gut und vollständig applizieren wie die OLCS der Studie 1 mit der dreifachen Wirkstoffkonzentration. Bestätigt wurde dies anhand der Restmengenbestimmung durch Fluoreszenzspektroskopie, bei der sich eine durchschnittliche Restmenge an Fluorescein von 0,7 % (St.Abw. 0,6 %, n = 21) ermitteln ließ. In 5 Fällen kam es durch Anwendungsfehler zu einer unvollständigen Ablösung (Mittelwert 63,2 %, St.Abw. 51,1 %, n = 5).

Der erhöhte Polymergehalt machte sich in vivo durch ein länger anhaltendes Fremdkörpergefühl bemerkbar. Dies führte zu einer schlechteren Akzeptanz durch die Probanden gegenüber den OLCS der Studie 2. Ein Unterschied im Fremdkörpergefühl gegenüber den OLCS der Studie 1 mit der dreifachen Wirkstoffkonzentration war jedoch nicht auszumachen.

Auch Weichselbaum fand, dass mit ansteigender Polymerkonzentration das Fremdkörpergefühl zu Beginn der Applikation zunahm. Sie stellte fest, dass bei einer HPMC-E50-Konzentration von 2 % in der Ausgangslösung eine OLCS-Applikation gut möglich und das Fremdkörpergefühl nur schwach ausgeprägt ist [82]. Doch schon ab einem Polymergehalt von 1,5 % empfindet der Patient das Fremdkörpergefühl als unangenehm, wie Studie 3 belegt. Damit die Verträglichkeit der OLCS nicht wesentlich schlechter als die der konventionellen Augentropfen ist, sollte eine Polymerkonzentration über 1,5 % in der Lösung vermieden werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine gute Applikation der OLCS nicht nur von der Haftfestigkeit, sondern auch von der Druckfestigkeit abhängt. Aufgrund der besonderen Applikationsweise der OLCS (Andrücken und Abstreifen, vgl. Abb. 2-8, Kapitel 2.1.2) gibt es für jede Haftfestigkeit eine dazu gehörende, optimale Druckfestigkeit, die ermittelt werden muss. Je niedriger die Haftfestigkeit, umso niedriger kann auch die Druckfestigkeit gewählt werden. Bei der Wahl der Haftfestigkeit muss immer gewährleistet bleiben, dass sich das Lyophilisat nicht vor der Applikation vom Träger löst. Die Obergrenze ist erreicht, wenn die Druckfestigkeit ein nicht mehr akzeptables Fremdkörpergefühl im Auge verursacht.

Die Ergebnisse zeigen, dass es mit dem Mini-Gefriertrockner möglich ist, in einem bestimmten Bereich nahezu jedes gewünschte Verhältnis von Haft- und Druckfestigkeit einzustellen. Somit können für jede Augentropfenrezeptur die optimalen Eigenschaften eingestellt werden, die eine leichte und vollständige Applikation der Lyophilisate gewährleisten.

Da in Studie 3 das Fremdkörpergefühl als zu stark beurteilt wurde, wäre ein Ansatz für eine weitere klinische Studie, die Polymerkonzentration der Lösung und damit die Druckfestigkeit wieder zu reduzieren (z. B. 1 % HPMC E50 mit etwa 30 g/mm Druckfestigkeit). Dann müsste allerdings auch die Haftfestigkeit entsprechend niedriger als 12 bis 14 g gewählt werden. Bei einer minimalen akzeptablen Haftfestigkeit von 2 g bleibt genügend Spielraum für eine Anpassung dieser Eigenschaft.

4.4.4 Restmengenbestimmung auf den Trägerfolien

Nachfolgend werden die Restmengen an Fluorescein-Natrium auf den Trägerfolien nach In-vitro-Abreißtests ermittelt. Es sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse abhängig von Einfriermethode, Wirkstoffgehalt und Polymergehalt sind. Um eine Aussage darüber zu erhalten, wie sich die unterschiedlichen Lyophilisate in den klinischen Studien vom Träger abgelöst haben, bzw. ob sie geeignet sind, eine gewünschte Wirkstoffdosis zu applizieren, wurde auch auf diesen Trägern der zurückgebliebene Anteil Fluorescein bestimmt. Anhand der jeweils zugehörigen In-vitro-Ergebnisse soll schließlich geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der In-vivo-Applikation und dem Abreißtest festgestellt werden kann.

4.4.4.1 Abhängigkeit der Restmengen von den Einfrierbedingungen

In diesem Versuch wurden Lyophilisate verwendet, die mit 0,272 % Fluorescein-Natrium und 0,5 %, 1,0 % oder 1,5 % HPMC E50 in der Ausgangslösung sowie bei vier unterschiedlichen Einfrierbedingungen hergestellt worden waren (Prototyp 4).

Die nach dem In-vitro-Abreißtest auf der PTFE-Folie zurückgebliebene Fluorescein-Natrium-Menge wurde quantitativ ermittelt. Es sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Einfriermethode und der Restmenge besteht.

Schon die makroskopische, visuelle Betrachtung der Fluoresceinrückstände auf den PTFE-Folien lässt vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen den Einfriergeschwindigkeiten und der Restmenge auf dem Applikator besteht (Abb. 4-75). Bei OLCS, die durch vakuuminduziertes Einfrieren mit einer Evakuiergeschwindigkeit von 13,4 mbarL/s hergestellt wurden, scheint nach dem Abreißtest die größte Fluoresceinmenge auf dem Träger zurückgeblieben zu sein.

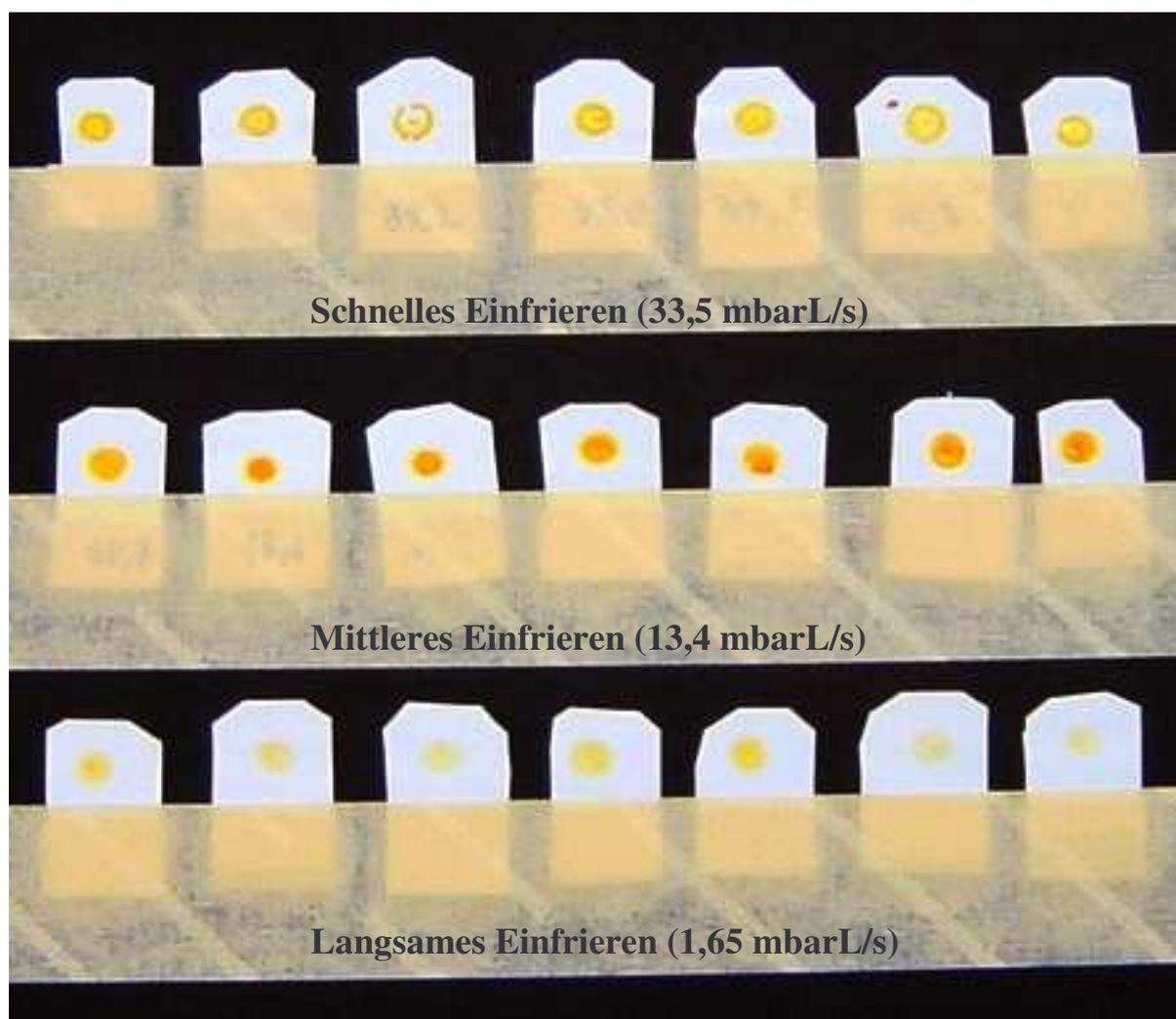


Abb. 4-75: Vergrößerte Darstellung der PTFE-Folien nach erfolgten Abreißtests. In Abhängigkeit von der Einfrieremethode ergeben sich unterschiedliche Rückstandsmuster. Alle abgebildeten OLCS enthalten 375 µg HPMC E50 und 68 µg Fluorescein-Natrium.

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (Abb. 4-76) zeigt nahezu auf der kompletten Kontaktfläche zur Folie eine verhältnismäßig dicke Schicht nicht abgelösten Lyophilisates. Die Porenstruktur ist deutlich sichtbar.

Bei schnellem Einfrieren der Lösung (33,5 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit) ist ein mittlerer Wert für die Restmengen anzunehmen. Die REM-Aufnahme (Abb. 4-77) zeigt, dass das Lyophilisat nur im Zentrum und am Rand mit der PTFE-Folie in Kontakt stand, dazwischen befindet sich ein Bereich ohne Rückstände (vgl. Kapitel 4.4.1.3).

Das langsame Einfrieren annähernd unter Atmosphärendruck (Evakuiergeschwindigkeit 1,65 mbarL/s) hinterlässt mit bloßem Auge kaum noch sichtbare Spuren an Fluorescein-Natrium (Abb. 4-75). Erst im Rasterelektronenmikroskop ist eine dünne Schicht Lyophilisatrückstand erkennbar (Abb. 4-78).

Abb. 4-76 bis Abb. 4-78: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Lyophilisatrückstände auf der PTFE-Folie nach erfolgtem Abreißtest (375 µg HPMC E50, 68 µg Fluorescein-Natrium).

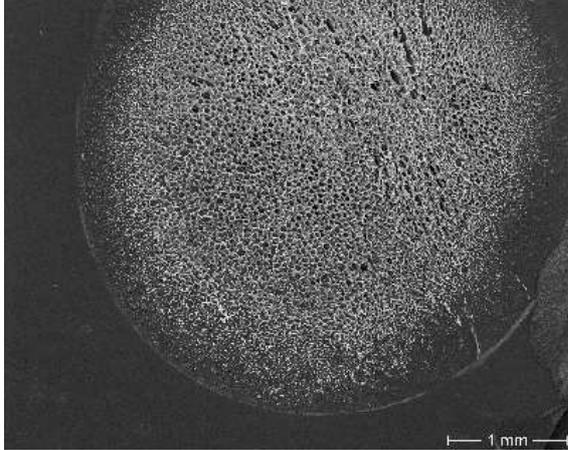


Abb. 4-76: Rückstand bei mittlerer Einfriergeschwindigkeit mit 13,4 mbarL/s.

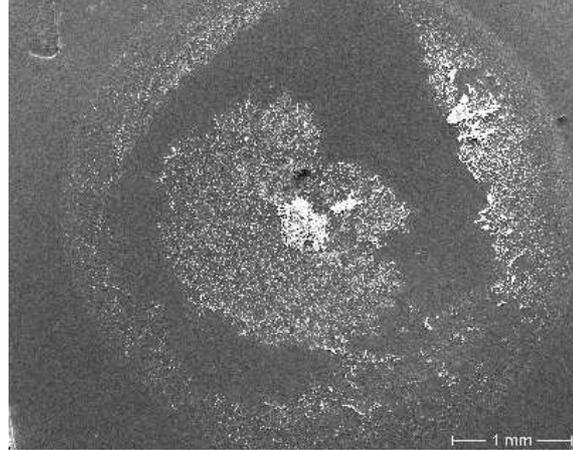


Abb. 4-77: Rückstandsmuster bei schnellem Einfrieren mit 33,5 mbarL/s.

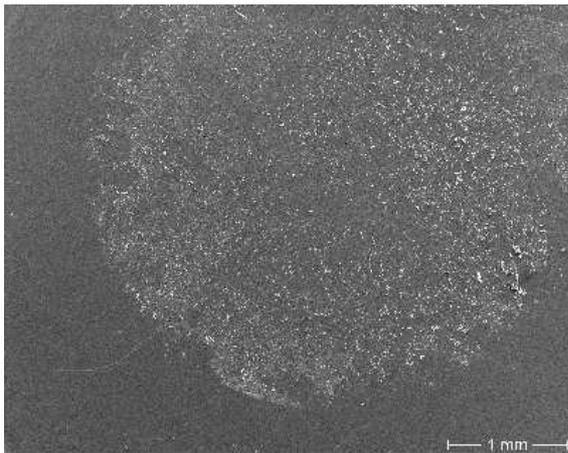


Abb. 4-78: Restmenge an Lyophilisat nach langsamem Einfrieren mit 1,65 mbarL/s.

Durch die analytische Bestimmung der Restmengen mittels Fluoreszenzspektroskopie konnten diese Ergebnisse quantifiziert werden (Abb. 4-79).

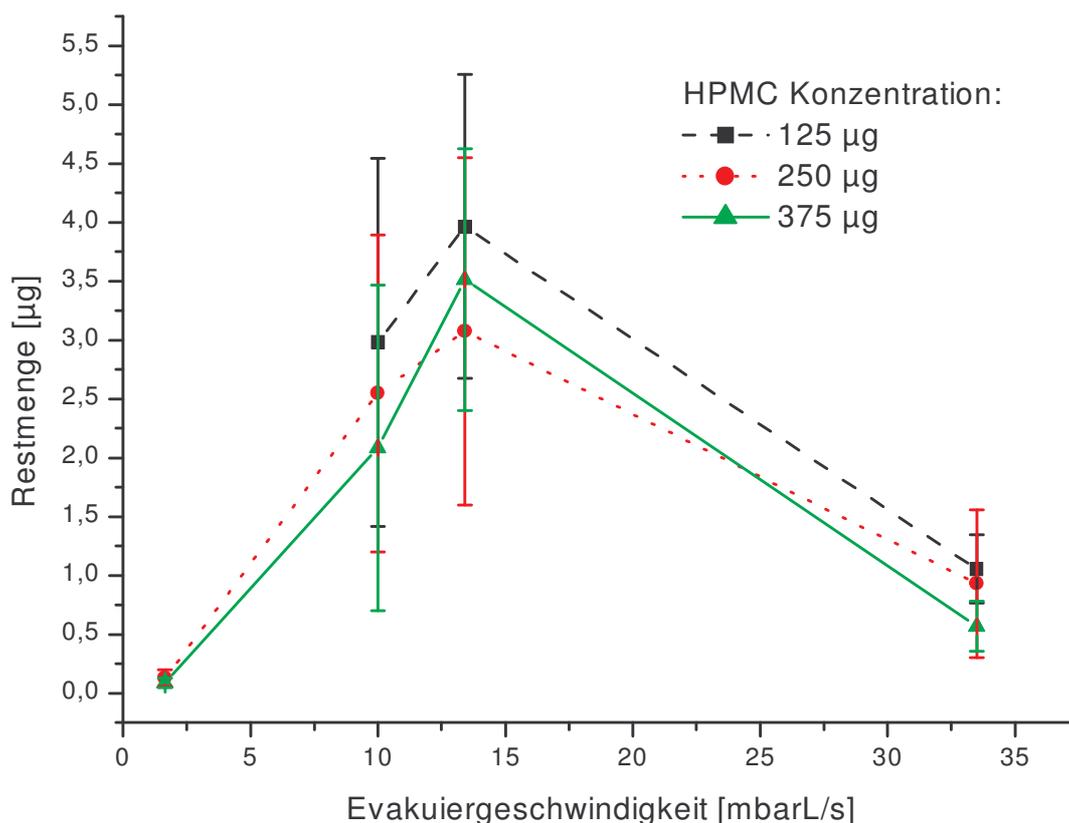


Abb. 4-79: Restmengen an Fluorescein-Natrium auf den PTFE-Folien nach erfolgten Abreißtests in Abhängigkeit von der Evakuiergeschwindigkeit beim Einfrieren. Der Ausgangsgehalt an Wirkstoff beträgt 68 µg (jeweils n = 5, ein Fehlerbalken entspricht einer Standardabweichung).

Abb. 4-79 zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Restmengen von der Einfriermethode. Die Fluoresceinmenge nimmt zunächst mit Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit und somit auch mit einer größer werdenden Haftfestigkeit der Lyophilisate nahezu linear zu. Die größte Restmenge ergibt sich, wie der visuelle Eindruck nahe gelegt hatte, bei einer Evakuiergeschwindigkeit von 13,4 mbarL/s. Eine weitere Erhöhung der Einfriereschwindigkeit (33,5 mbarL/s) resultiert dann jedoch in einer deutlichen Reduktion der auf dem PTFE zurückgebliebenen Fluoresceinmenge, nahezu vergleichbar mit den Ergebnissen bei langsam eingefrorenen OLCS. Hier wird deutlich, dass zwischen dem Einfrieren mit einer Evakuiergeschwindigkeit von 13,4 mbarL/s und 33,5 mbarL/s grundlegende Veränderungen beim Einfrierprozess stattfinden müssen.

Bei allen Rückstandsbestimmungen betragen die Restmengen im Mittel weniger als 6 % des Ausgangsgehaltes.

4.4.4.2 Abhängigkeit der Restmenge vom Wirkstoffgehalt

Untersucht wurde, ob die zurückbleibende Fluoresceinmenge nach In-vitro-Abreißtests im Zusammenhang mit dem Wirkstoffgehalt der Lyophilisate steht. Dazu werden OLCS mit 204 µg Fluorescein-Natrium, hergestellt bei unterschiedlichen Einfrierbedingungen, auf ihre Restmenge hin untersucht und die Ergebnisse mit den entsprechenden Lyophilisaten mit 68 µg Wirkstoffgehalt verglichen (Polymergehalt 250 µg, beide hergestellt mit Prototyp 3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Evakuiergeschw. [mbarL/s]	Restmengenmittelwert [µg] (Gehalt 204 µg, n = 5)	St.Abw.	Restmengenmittelwert [µg] (Gehalt 68 µg, n = 5)	St.Abw.	Verhältnis der Restmengenmittelwerte (Ausgangs-verhältnis 3 : 1)
0	0,22	0,23	0,13	0,07	1,69 : 1
13,4	5,87	1,79	1,55	0,72	3,79 : 1
33,5	2,48	2,15	0,4	0,19	6,2 : 1

Tabelle 19: Einfluss der Wirkstoffkonzentration auf die Restmenge (in µg) in Abhängigkeit von der Evakuiergeschwindigkeit. Mittelwerte, Standardabweichungen und Verhältnisse zueinander.

Wie zu erwarten war, erhöht sich mit der Wirkstoffkonzentration der Lyophilisate auch die Rückstandsmenge auf den Folien. Unter der Voraussetzung, dass der Wirkstoff im gesamten Lyophilisat homogen verteilt ist, sollten sich die Restmengen wie die Wirkstoffdosen zueinander verhalten, das heißt, das Verhältnis sollte jeweils 3 : 1 betragen. Nur im Fall des Evakuierens mit 13,4 mbarL/s ist das Ausgangsverhältnis des Fluoresceingehaltes nahezu gleich geblieben. Aufgrund von Gefrierkonzentration kann sich dieses Verhältnis verschieben. Wie in Kapitel 4.4.1.1 beschrieben, lässt sich bei der mittleren Einfriergeschwindigkeit eine Gefrierkonzentration nicht erkennen. Beim langsamen Einfrieren unter Atmosphärendruck nimmt das Verhältnis deutlich ab. Es findet sich demnach bei den hochdosierten Lyophilisaten weniger Wirkstoff als Rückstand auf der Folie als erwartet. Dies ist ein Hinweis für eine Gefrierkonzentration in Richtung Lyophilisatoberfläche, wie sie bereits in Kapitel 4.4.1.1 für langsames Einfrieren beschrieben wurde. Wird die hochdosierte Fluoresceinlösung dagegen schnell eingefroren wie beim vakuuminduzierten Einfrieren mit 33,5 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit, so steigt das Ausgangsverhältnis stark an.

Nach dem Abreißtest bleibt also mehr Wirkstoff auf der PTFE-Folie zurück, als dies nach der eingesetzten Fluoresceinmenge zu erwarten wäre. Eine zur Bodenfläche hin gerichtete Gefrierkonzentration könnte dafür der Grund sein.

4.4.4.3 Abhängigkeit der Restmengen vom Polymergehalt

Untersucht wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem HPMC-Gehalt der Ausgangslösung und den Wirkstoffrestmengen auf der PTFE-Folie nach Haftfestigkeitsuntersuchungen. Dazu dienten die Werte aus Kapitel 4.4.4.1. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 4-80 dargestellt.

Dabei ergibt sich kein nennenswerter Unterschied im Restgehalt in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration. Da sich allerdings die Haftfestigkeiten bei Erhöhung der Polymerkonzentration stark änderten (in Abb. 4-80 für 13,4 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit durch die entsprechenden Mittelwerte der Haftfestigkeiten angedeutet), kann somit auch ein direkter Zusammenhang zwischen der Haftfestigkeit und der Restmenge ausgeschlossen werden.

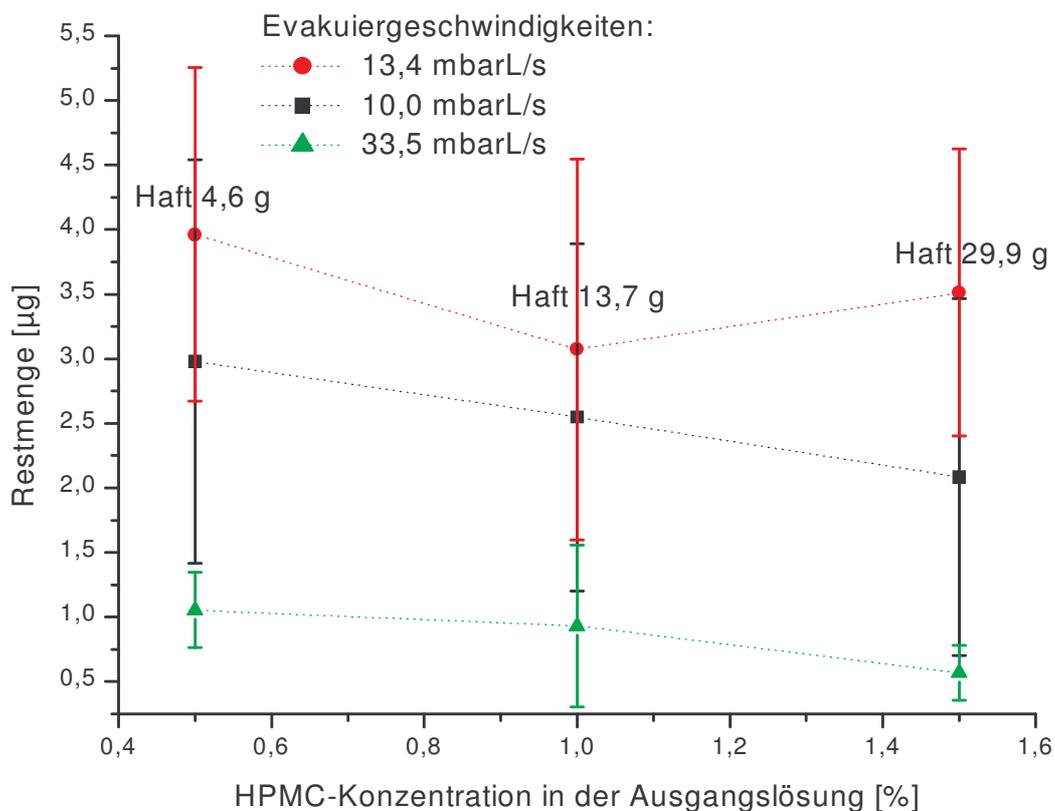


Abb. 4-80: Zusammenhang zwischen der HPMC-Konzentration und der Restmengen an Fluorescein-Natrium. Die Lyophilisate hatten einen Gehalt von je 68 µg und wurden mit unterschiedlichen Einfriergeschwindigkeiten hergestellt (jeweils n = 5, ein Fehlerbalken entspricht einer Standardabweichung).

4.4.4.4 Vergleichbarkeit von In-vivo- und In-vitro-Ergebnissen

Um eine Aussage treffen zu können, inwieweit der Abreißtest geeignet ist, die In-vivo-Applizierbarkeit zu simulieren, wurden für die drei im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten klinischen Studien (vgl. Kapitel 4.4.3) die Restmengen nach erfolgreicher In-vivo-Applikation mit den entsprechenden Ergebnissen nach In-vitro-Abreißtests verglichen. OLCS, die sich in den klinischen Tests nicht gut applizieren ließen, werden in diesem Vergleich nicht berücksichtigt. In Tabelle 21 sind die wichtigsten Ergebnisse aller drei klinischen Studien zusammengefasst.

	Studie 1			Studie 2			Studie 3		
Wirkstoffgehalt [μg]	204			68			68		
HPMC-Gehalt [μg]	250			250			375		
Evakuiergeschw. [mbarL/s]	13,4			11,6			5,5		
Haftfestigkeit [g]	14,4 \pm 3,9 (n=10)			12,7 \pm 2,2 (n=10)			12,7 \pm 4,9 (n=10)		
Druckfestigkeit [g/mm]	62,4 \pm 4,3 (n=3)			29,0 \pm 4,5 (n=3)			51,6 \pm 5,3 (n=5)		
	in vitro	in vivo		in vitro	in vivo		in vitro	in vivo	
Applizierbarkeit		gut	schl.		gut	schl.		gut	schl.
Restmenge (Mittelwert) [μg]	6,87	4,82	113,5	1,55	1,46	48,14	0,35	0,45	42,97
Restmenge (St.Abw.) [μg]	1,79	2,61	36,2	0,72	0,64	5,24	0,25	0,41	34,73
Stichprobenumfang n	4	18	3	11	24	20	11	21	5

Tabelle 20: Zusammenfassung der In-vitro- und In-vivo-Ergebnisse der Lyophilisate, die in den jeweiligen klinischen Studien zur Anwendung gekommen sind.

Trägt man nun die ermittelten Restmengen nach In-vitro-Abreißtests gegen die entsprechenden Werte nach guter In-vivo-Applikation auf (Tabelle 21, schwarze Umrandungen), so ergibt sich annähernd eine Gerade (Abb. 4-81).

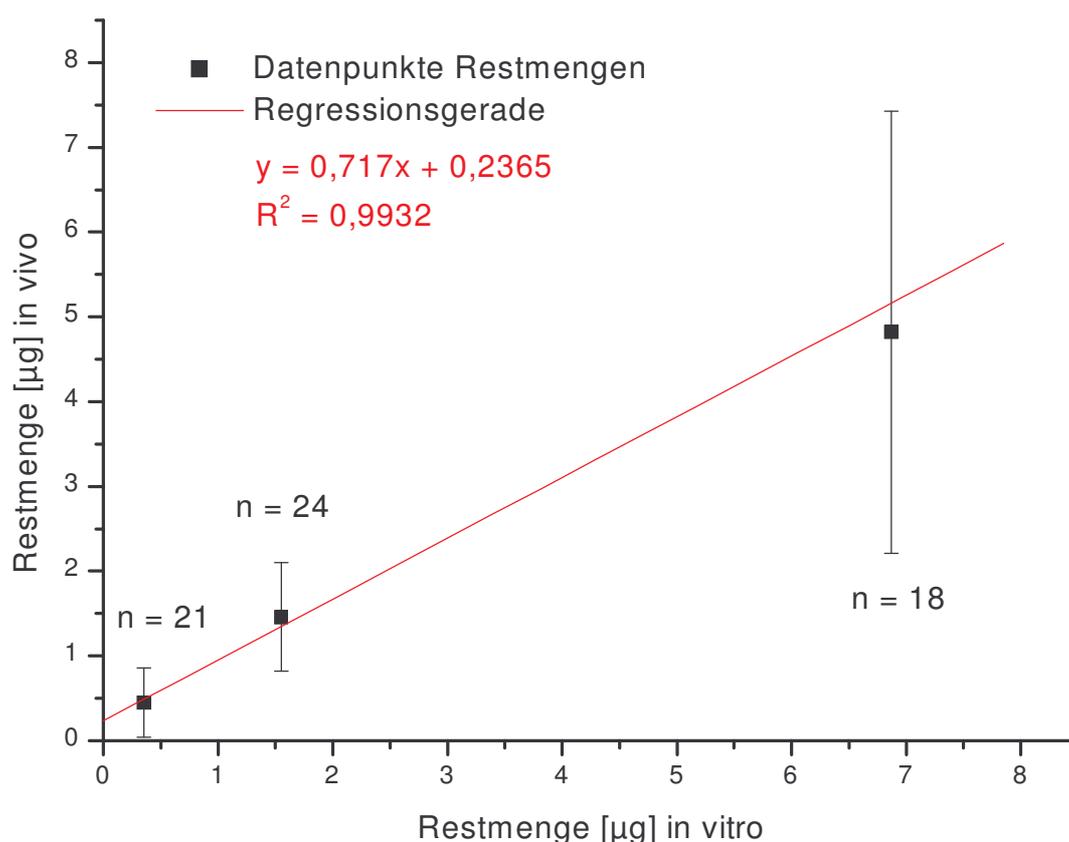


Abb. 4-81: Zusammenhang zwischen den Restmengen an Fluorescein-Natrium auf den PTFE-Folien nach In-vitro-Abreißtest und In-vivo-Applikation bei jeweils identischer Rezeptur und Herstellungsmethode. Ein Fehlerbalken entspricht einer Standardabweichung.

Das Bestimmtheitsmaß von 0,9932 spricht für eine gute Korrelation der In-vitro- und In-vivo-Daten. Der In-vitro-Abreißtest mit anschließender Quantifizierung der Restmengen lässt also tendenziell eine Voraussage der Größenordnung der Restmenge nach In-vivo-Applikation zu. Somit erhält man eine Aussage über den zur Anwendung kommenden Teil der Dosis.

4.4.5 Effekte durch Variation der Einfrierbedingungen im Mini-Gefriertrockner – Zusammenfassung und Diskussion

Um die Herstellung der OLCS so einfach und schnell wie möglich zu gestalten, findet der Einfrierprozess direkt im Mini-Gefriertrockner statt. Da im Mini-Gefriertrockner eine temperierbare Stellfläche fehlt, sind die Einfrierbedingungen über diese nicht regelbar. Die Temperatur des Kondensators lässt prinzipiell nur eine

Einfriergeschwindigkeit zu. Die Kondensatorfläche kühlt das Gas, das der einzufrierenden Lösung durch Konvektion Wärme entzieht.

Durch das Variieren des Prozessparameters Evakuiergeschwindigkeit ergab sich die Möglichkeit, verschiedene Einfrierbedingungen und ihre Effekte auf das Produkt zu untersuchen.

Durch Verminderung des Gasdrucks im Gefriertrockner kommt es zu einem stärkeren Verdampfen des verwendeten Lösungsmittels. Die dazu benötigte Energie wird der Lösung in Form von Wärme von der Oberfläche her entzogen. Dies kann bei entsprechend schnellem Evakuieren bis zur Eisbildung führen. Durch Variation der Geschwindigkeit, mit der die Kammer evakuiert wird, lässt sich eine Lösung somit unterschiedlich schnell abkühlen. Dieser Effekt kann im Mini-Gefriertrockner nicht getrennt vom konvektiven Wärmeentzug des Kondensators genutzt werden. Dadurch ergeben sich, je nach Evakuiergeschwindigkeit, Einfrierbedingungen, die interessante Auswirkungen auf die Eigenschaften des Endproduktes zeigen.

Wird kein Vakuum angelegt, so erfolgt der Wärmeentzug allein durch Konvektion. Da sich ein Teil des Kondensators unterhalb des Produktes befindet, kühlt die Lösung in Kondensatornähe am schnellsten ab und erreicht zuerst die Kristallisationstemperatur. Dies führt dazu, dass sich die ersten Eiskristalle an der Unterseite des Lösungstropfens bilden und in Richtung des herrschenden Temperaturgradienten senkrecht nach oben in die Flüssigkeit wachsen.

Wird dagegen von Beginn an evakuiert, so behindert dies den konvektiven Wärmeentzug von der Unterseite der Lösung. Dieser Effekt wird mit steigender Evakuiergeschwindigkeit stärker, weil immer weniger Gasmoleküle für Konvektion zur Verfügung stehen. Die Kühlung von unten wird weitestgehend unterbunden. Konträr verhält sich gleichzeitig der Einfluss, den das Evakuieren auf die flüssige Lösung hat. Mit einer Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit wird die Abkühlung der Lösung an der Grenzfläche Flüssigkeit – Gasraum ausgeprägter. Die ersten Eiskristalle bilden sich an der Flüssigkeitsoberfläche und wachsen ins Tropfeninnere darunter.

Ab einer bestimmten Evakuiergeschwindigkeit kommt es demnach zu einer Umkehr der Einfrierrichtung. Diese Richtungsumkehr des Eiskristallwachstums hat entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften der späteren Lyophilisate. Das Intervall der Evakuiergeschwindigkeit, in dem diese Umkehr vermutet wird, liegt für den Mini-Gefriertrockner zwischen 13,4 mbarL/s und 33,5 mbarL/s. Dafür sprechen

verschiedene Beobachtungen, deren gemeinsame Interpretation diesen Schluss zulassen.

Bodenstruktur: Beim Einfrieren unter Atmosphärendruck und beim langsamen Evakuieren mit 13,4 mbarL/s ergibt sich eine offene, poröse Bodenstruktur (Abb. 4-31 und Abb. 4-39). Evakuieren mit 33,5 mbarL/s führt dagegen zu einer teilweise dicht geschlossenen Bodenfläche, in deren Zentrum auskristallisierter Wirkstoff nachweisbar ist (Abb. 4-46, Abb. 4-47 und Abb. 4-51).

Diese Gefrierkonzentration deutet darauf hin, dass das Eiskristallwachstum zum Boden hin ausgerichtet war (Abb. 4-52). Die Methode mit 13,4 mbarL/s lässt keine Gefrierkonzentration erkennen (Abb. 4-37). Einfrieren unter Atmosphärendruck erzeugt dagegen eine deutliche Aufkonzentrierung gelösten Wirkstoffs an der Oberfläche (Abb. 4-33). Die langsam von unten nach oben wachsenden Eiskristalle schieben den Wirkstoff bis an die Oberfläche vor sich her. Dadurch ergibt sich eine geschlossene Oberflächenstruktur (Abb. 4-34), die sich in ähnlicher Weise auch beim Evakuieren mit 13,4 mbarL/s finden lässt (Abb. 4-40). Die Lyophilisatoberfläche beim vakuuminduzierten Einfrieren mit 33,5 mbarL/s ist dagegen sehr offenporig (Abb. 4-50).

Einfrieren unter Atmosphärendruck sowie mit 13,4 mbarL/s führt zu Lyophilisaten, die nach dem Entfernen von der PTFE-Folie eine plane Auflagefläche zeigen (Abb. 4-62 und Abb. 4-61). Unter vakuuminduziertem Einfrieren mit 33,5 mbarL/s entsteht eine keilförmige Auflagefläche mit einem Winkel von etwa 166° (Abb. 4-55). Dies lässt sich durch ein Kristallwachstum von der Oberfläche aus nach innen erklären. Das radiale Kristallwachstum zum Zentrum der Bodenfläche lässt sich anhand raster-elektronenmikroskopischer Aufnahmen belegen. Den deutlichsten Hinweis geben die langen dünnen Kanäle, die parallel zur Trägerfolie, sternförmig zur Mitte der Auflagefläche hin verlaufen (Abb. 4-44, Abb. 4-45 und Abb. 4-46). Im Gegensatz zu diesem horizontalen Eiswachstum zeigen die unter den beiden anderen Bedingungen hergestellten Lyophilisate Bodenstrukturen, die auf ein vertikal nach oben gerichtetes Kristallwachstum deuten.

Die Ausbildung der keilförmigen Bodenstruktur beim schnellen vakuuminduzierten Einfrieren ist auch der Grund dafür, dass bei den Lyophilisaten mit einfachem Wirkstoffgehalt (68 μg) zwischen 13,4 mbarL/s und 33,5 mbarL/s eine deutlich geringere Zunahme der Haftfestigkeit zu verzeichnen ist (Abb. 4-54). Die Lyophilisate lösen sich bei der Keilbildung ringförmig von der Folie. Nur der Außenrand und das

Zentrum der Unterseite sind noch mit ihr verbunden. Die Haftkraft nimmt ab. Dieser Effekt ist unabhängig vom Polymergehalt der Lyophilisate und führt bei 125 µg HPMC-Gehalt sogar zu einem Rückgang der Haftfestigkeit (Abb. 4-54).

Bei hochdosierten Lyophilisaten (204 µg) steigt die Haftfestigkeit bei einer Evakuiergeschwindigkeit von 33,5 mbarL/s dagegen stark an (Abb. 4-53). Eine Aufkonzentrierung des gelösten Wirkstoffs an der Kontaktfläche zur Folie ist eine mögliche Erklärung.

Eine Untersuchung der Rückstandsmengen an Wirkstoff, nach erfolgtem Abreißtest für beide beschriebenen Dosierungen, untermauert dies (Tabelle 20). Bei langsamem Einfrieren unter Atmosphärendruck ist das Verhältnis der Restmengen mit 1,7 : 1 deutlich kleiner als das Ausgangsverhältnis (3 : 1 bzw. 204 µg zu 68 µg). Eine Aufkonzentrierung an der Oberfläche hat diesen reduzierten Wirkstoffgehalt an der Lyophilisatunterseite zur Folge. Umgekehrt ist im Fall des vakuuminduzierten Einfrierens mit 33,5 mbarL/s ein Restmengenverhältnis von 6,2 : 1 wesentlich höher als erwartet. Die Konzentrierung des Wirkstoffs an der Kontaktfläche zur Trägerfolie beruht auf einem von oben nach unten hin gerichteten Kristallwachstum während der Einfrierphase. Beim Evakuieren mit 13,4 mbarL/s ist keine Gefrierkonzentration nachweisbar. Mit einem Rückstandsverhältnis von 3,8 : 1 ist für diesen Fall annähernd das Ausgangsverhältnis erreicht.

Schließlich zeigt die graphische Darstellung der Rückstandsmengen bei Lyophilisaten mit 68 µg Wirkstoffgehalt, abhängig von Einfrierbedingungen und Polymergehalt, eindeutig eine Veränderung zwischen 13,4 mbarL/s und 33,5 mbarL/s. Von 1,65 mbarL/s über 10,0 mbarL/s bis 13,4 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit nehmen die Restmengen unabhängig vom Polymergehalt linear stark zu. Bei 33,5 mbarL/s fallen die Werte plötzlich deutlich ab (Abb. 4-79).

Die Zusammenstellung der verschiedenen Effekte belegt, dass sich zwischen einer Evakuiergeschwindigkeit von 13,4 mbarL/s und 33,5 mbarL/s die Einfrierrichtung umkehrt. Durch ein Entgasen der Lösungen könnten eventuell noch höhere Evakuiergeschwindigkeiten erreicht und reproduzierbar angewendet werden, ohne dass „Frothing“ (Schäumen) die Proben zerstört. Eine genauere Untersuchung dieses Bereiches könnte weitere interessante Effekte zeigen, die sich zur Einstellung bestimmter Eigenschaften der Lyophilisate eignen könnten.

4.4.6 Restfeuchtebestimmung der Lyophilisate nach Karl Fischer

Jeweils 5 Lyophilisate mit 68 µg Fluorescein-Natrium und 125 µg, 250 µg und 375 µg HPMC E50, hergestellt unter verschiedenen Einfrierbedingungen, wurden nach der Karl-Fischer-Methode auf ihre Restfeuchte untersucht. Der Prototyp 4 des Mini-Gefriertrockners diente zur Herstellung. Es wurde überprüft, ob Evakuiergeschwindigkeit und Polymergehalt die Restfeuchte beeinflussen.

Die Ergebnisse der Restfeuchtebestimmung sind in Abb. 4-82 dargestellt.

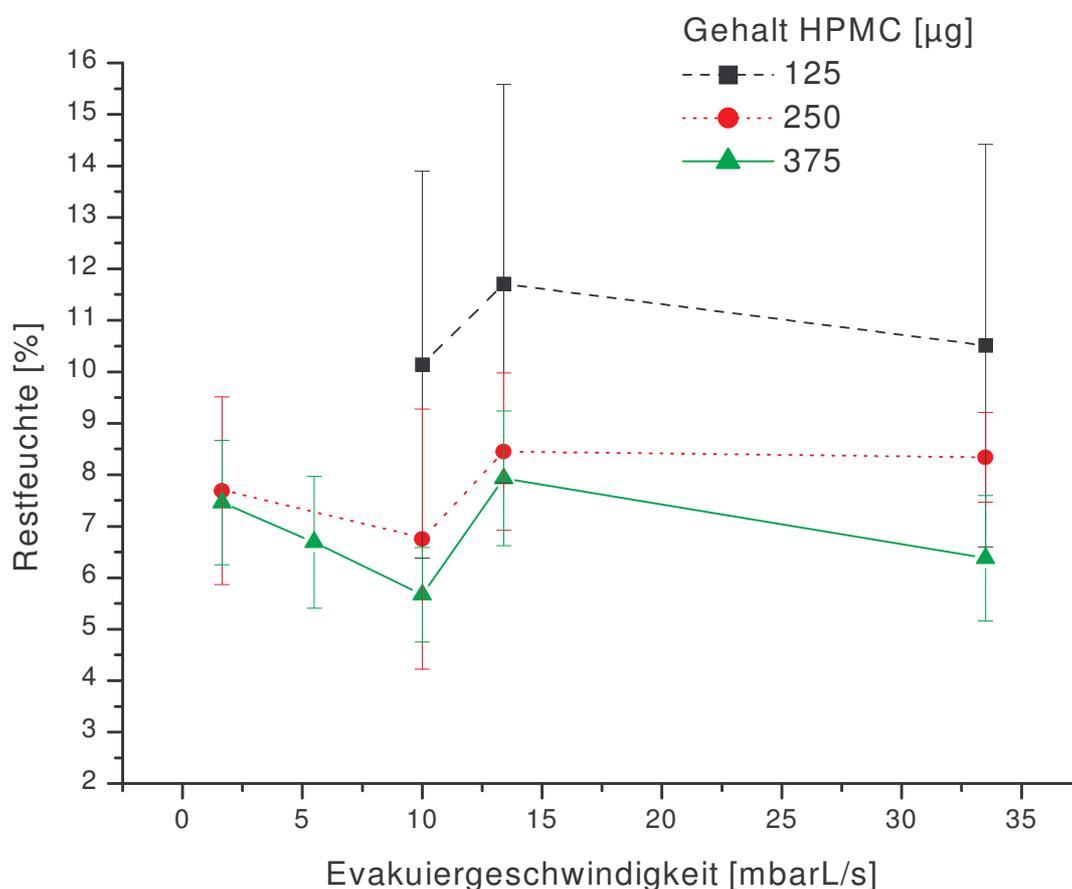


Abb. 4-82: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Restfeuchtebestimmung von Lyophilisaten mit 68 µg Wirkstoff in Abhängigkeit von Einfrierbedingungen und Polymergehalt (jeweils n = 5, ein Fehlerbalken entspricht einer Standardabweichung).

Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Restfeuchte vom Polymergehalt. Auch eine Abhängigkeit von der Einfriermethode könnte eventuell bestehen.

Die Zunahme der Restfeuchte bei abnehmendem Polymergehalt lässt sich dadurch erklären, dass die Wärmeübertragung auf und in das halbkugelförmige Lyophilisat

während der Sekundärtrocknung schwieriger wird, je weniger Strukturmaterial für eine Wärmeleitung zu Verfügung steht. Da sich die Wärmestrahlung der IR-Strahlungsheizung nur auf die obersten Schichten des Lyophilisates beschränkt, kann die Wärmeübertragung ins Lyophilisatinnere nur durch Wärmeleitung über die Feststoffbrücken erfolgen [66]. Daher erwärmen sich die Lyophilisate schlechter, je geringer der Polymergehalt und damit je filigraner die Struktur ist. Da die Sekundärtrocknungsrate stark von der Temperatur des Produktes abhängt, ist sie bei niedrigem Polymergehalt geringer und somit im Resultat die Restfeuchte größer.

Um den möglichen Einfluss der Evakuiergeschwindigkeit auf die Restfeuchte zu diskutieren, soll hier auf die Einfrierbedingungen und die daraus resultierenden Strukturen eingegangen werden. Da die Restfeuchtedifferenzen innerhalb einer Versuchsreihe gleichen Polymergehaltes sehr gering sind und die Werte stark streuen, sollen im Folgenden nur Vorschläge gemacht werden, wodurch sich ein entsprechender Kurvenverlauf ergeben könnte.

Die sich durch das langsame Einfrieren von unten nach oben ergebende Gefrierkonzentration bei einer Evakuiergeschwindigkeit von 1,65 mbarL/s führt zur Ausbildung einer dichten und porenarmen Oberfläche. Diese behindert bei der Sekundärtrocknung die Desorption und könnte zu der leicht erhöhten Restfeuchte führen. Mit zunehmender Evakuiergeschwindigkeit (5,5 mbarL/s und 10,0 mbarL/s) nimmt der Effekt der Gefrierkonzentration an der Oberfläche ab und die Struktur wird offener. Der Abtransport von Wassermolekülen wird erleichtert, die Restfeuchte sinkt.

Bei einer weiteren Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit auf 13,4 mbarL/s wird durch den gleichzeitigen Wärmeentzug von unten durch die kalte Kondensatorfläche und von oben durch verdampfendes Lösungsmittel eine gleichmäßige Abkühlung des Tropfens erreicht. Das Fehlen eines Temperaturgradienten führt zur Ausbildung großer, gleichmäßiger Kristalle. Dies ergibt nach der Primärtrocknung große, gleichförmige Poren. Daraus resultiert allerdings eine kleinere innere Oberfläche und somit eine verringerte Sekundärtrocknungsrate. Bei gleicher Dauer der Nachtrocknung könnte daraus die wiederum erhöhte Restfeuchte resultieren.

Bei der hohen Evakuiergeschwindigkeit von 33,5 mbarL/s führt der schnelle und starke Wärmeentzug an der Tropfenoberfläche durch Verdampfung des Lösungsmittels dort schnell zur Eisbildung. Da der innere Teil des Tropfens noch nicht so stark abgekühlt ist, kommt es zur Ausbildung eines deutlichen Temperaturgradienten. Es

entstehen kleine, nadelförmige Kristalle, die nach erfolgter Sublimation eine große innere Oberfläche zurücklassen. Zusätzlich ist ein Merkmal des schnellen Einfrierens eine offene, großporige Oberflächenstruktur. Beides erleichtert die Sekundärtrocknung und könnte tendenziell zu einer Abnahme der Restfeuchte führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Restfeuchte der OLCS insgesamt höher ist als dies erwartet wurde. Die Lyophilisate mit einem Polymergehalt von 125 µg enthalten eine mittlere Restfeuchte von 10-12 %. Die durchschnittliche Restfeuchte der Lyophilisate mit 250 µg und 375 µg Polymergehalt liegt mit 6-8 % deutlich niedriger. Um bei den letzt genannten Lyophilisaten Restfeuchten < 5 % zu erreichen, und so mikrobielles Wachstum sowie chemische Reaktionen zu unterbinden, sollte die Sekundärtrocknungszeit in zukünftigen Versuchen etwas verlängert werden.

5 Zusammenfassung

Um eine angenehme und vollständige Applikation zu gewährleisten, müssen die Ophthalmic Lyophilisate Carrier Systems (OLCS) genau definierte mechanische Eigenschaften aufweisen. Nur dann sind sie voll funktionsfähig und es lassen sich ihre deutlichen Vorteile gegenüber konventionellen Augentropfen zeigen. Diese definierten Eigenschaften bezüglich Haft- und Druckfestigkeit der Lyophilisate lassen sich nur mit kontrollierten, für jedes einzelne OLCS reproduzierbaren Herstellungsbedingungen erreichen. Gebräuchliche Gefriertrocknungsanlagen bzw. Einfrieremethoden, bei denen der Durchsatz großer Stückzahlen im Vordergrund steht, sind ungeeignet, solch homogene Bedingungen für jedes einzelne Objekt zu erzeugen. Deshalb wurde im Zuge dieser Arbeit ein Mini-Gefriertrockner entwickelt, der die reproduzierbare Einstellung homogener Einfrier- und Trocknungsbedingungen für jedes OLCS ermöglichte. Dies konnte durch während der einzelnen Herstellungsprozesse aufgezeichnete Temperatur- und Druckkurven gezeigt werden. Durch Optimierung ließ sich die Dauer der Primärtrocknungsphase auf 12 Minuten reduzieren. Abhängig von der Geschwindigkeit der verwendeten Einfriermethode resultierten daraus maximale Prozesszeiten um 20 Minuten.

Die energieeffiziente, schnelle und reproduzierbare Herstellung von OLCS wurde durch den besonderen Aufbau des Mini-Gefriertrockners erreicht. Das kleine Volumen der Trocknungskammer ermöglicht ein schnelles Einstellen des angestrebten Prozessvakuums. Die Kondensatorfläche ist groß gegenüber der Oberfläche des zu trocknenden Gutes. Durch direkten Kontakt des Kondensators mit dem Flüssigstickstoff lassen sich in kurzer Zeit sehr tiefe Temperaturen erreichen. Der Stickstoffverbrauch ist durch den hochisolierenden Werkstoff Rohacell[®] und das Design des Gefriertrockners gering. Zudem ist dieses Kühlmedium kostengünstig, umweltfreundlich und gut verfügbar. Zusätzlich zu einer Minimierung der Diffusionsstrecke durch kurze Distanz zwischen Trockengut und Kondensator wird aufgrund hohen Vakuums auch der Diffusionswiderstand stark reduziert. Schließlich ermöglicht die Strahlungsheizung eine gezielte und schnell variierbare Zufuhr der Wärmeenergie direkt von oben auf das Produkt.

Durch die Kombination von normalem Einfrieren aufgrund von Wärmeentzug durch das gekühlte Gas in der Trockenkammer und vakuuminduziertem Einfrieren mit verschiedenen diskreten Evakuiergeschwindigkeiten wurden unterschiedliche Einfrieremethoden entwickelt. Diese unterscheiden sich statistisch signifikant in der Länge ihrer Plateauphasen, welche das Auskristallisieren des Lösungsmittels und der gelösten Stoffe indizieren. Die Dauer der Plateauphase bestimmt maßgeblich die Zeit, die zum Eiskristallwachstum zur Verfügung steht, und somit die Struktur des Lyophilisates nach der Gefriertrocknung.

Beim langsamen Einfrieren (unter Atmosphärendruck oder 1,65 mbarL/s Evakuiergeschwindigkeit) ist die Plateauphase sehr lang. Die ersten Kristalle bilden sich schnell an der Unterseite des Tropfens, danach schreitet das Kristallwachstum langsam nach oben fort. Es kommt zur Gefrierkonzentration und dadurch zu sehr dichten Strukturen an der Oberfläche. Die kleinen Kristalle im Kontaktbereich zur Folie resultieren nach dem Trocknen in filigranen Porenwänden, die das Lyophilisat nur schwach haften lassen. Beim Einfrieren mit mittlerer Geschwindigkeit (Evakuieren mit 10,0 bis 13,4 mbarL/s) kommt es zu einer gleichmäßigen Abkühlung des Tropfens. Beim anschließenden Durchfrieren zeigt sich keine Gefrierkonzentration. Nach dem Trocknen resultieren sehr homogene, hexagonale bis runde Poren mit dicken Wänden, die deutlich fester auf der PTFE-Folie haften.

Die Haftfestigkeitsuntersuchungen, die Aufklärung der Lyophilisatstrukturen durch REM sowie die visuelle und quantitative Auswertung der Restmengen Fluorescein auf den PTFE-Folien nach In-vitro-Abreißtests zeigen, dass es bei einer Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit einen Punkt gibt, ab dem sich die Eigenschaften der Lyophilisate deutlich ändern. Grund dafür ist die Richtungsumkehr des Eiskristallwachstums bei Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit von 13,4 mbarL/s auf 33,5 mbarL/s. Bei den beiden bisher beschriebenen Methoden erfolgte die Eisbildung zuerst an der Tropfenunterseite und das Kristallwachstum war zur Oberfläche hin gerichtet. Beim „snap freezing“ durch rasches Evakuieren kommt es zuerst an der Oberfläche des Tropfens zur Eisbildung. Da diese rasch erfolgt, ist das Innere des Tropfens noch kaum abgekühlt. Der gebildete starke Temperaturgradient führt zur Ausbildung nadelförmiger Kristalle, die schnell entlang des Gradienten zur Tropfenmitte hin wachsen. Die Plateauphase ist sehr kurz. Das schnelle, gerichtete Durchfrieren verursacht eine Gefrierkonzentration, die hier zum Zentrum der Lyophilisatunterseite ausgerichtet ist. Es resultiert eine teilweise sehr dichte, geschlossene

Kontaktflächenstruktur zur Folie. Daneben bildet sich wegen des gerichteten Durchfrrierens in Richtung Tropfenunterseite ein Eiskeil, der teilweise zu einer Ablösung des gefrorenen Tropfens von der PTFE-Folie führt. Je nach Zusammensetzung des Lyophilisates kann einer dieser beiden Effekte überwiegen und somit die Haftfestigkeit entweder deutlich verstärken, gar nicht verändern oder sogar abschwächen. Ersteres ist zum Beispiel bei hohen Wirkstoffkonzentrationen der Fall, letzteres bei geringem Polymer- und Wirkstoffgehalt.

Eine Erhöhung der Evakuiergeschwindigkeit resultiert jeweils in einer Verkürzung der Plateauphase. Bis auf wenige Ausnahmen, aufgrund der Keilbildung, steigt dadurch die Haftfestigkeit der Lyophilisate auf dem Träger deutlich an.

Auch der Polymergehalt beeinflusst die Haftung der Lyophilisate. Die Haftfestigkeit nimmt mit steigender Polymerkonzentration statistisch höchst signifikant zu, wobei sich dieser Effekt bei größeren Evakuiergeschwindigkeiten verstärkt. Beide Faktoren sind zur Einstellung der Haftfestigkeit geeignet.

Mit der Apparatur zur Bestimmung der Strukturfestigkeit ließen sich Druckprofile in Abhängigkeit von Polymergehalt und Einfriermethoden aufzeichnen. Die statistische Auswertung der Daten zeigt keine signifikante Wirkung der Evakuiergeschwindigkeit auf die Druckfestigkeit der Lyophilisate, obwohl eine Bestimmung des mittleren Porendurchmessers einen deutlichen Unterschied in der Porengröße zwischen dem vakuuminduzierten Einfrieren und dem Einfrieren bei Atmosphärendruck ergab. Dagegen ist die Druckfestigkeit höchst signifikant abhängig vom Polymergehalt. Eine Erhöhung der Polymerkonzentration der Ausgangslösung führt zu einer wesentlichen Verstärkung der Strukturfestigkeit des resultierenden Lyophilisates.

Die durchgeführten klinischen Studien erbrachten neben den guten biopharmazeutischen Ergebnissen hilfreiche Erkenntnisse zu den Parametern Haft- und Druckfestigkeit. Das bereits von Weichselbaum genannte Intervall von Haftfestigkeiten zwischen 2 g und 20 g erwies sich als zweckmäßig [82]. Es zeigte sich jedoch, dass ein geeignetes Verhältnis von Haft- und Druckfestigkeit gefunden werden muss, um die gute und vollständige Applizierbarkeit der OLCS zu gewährleisten. Eine alleinige Angabe der Haftkraft reicht also nicht aus. Aufgrund der besonderen Applikationsweise der OLCS gibt es für jedes Haftfestigkeitsintervall einen dazu gehörenden, optimalen Druckfestigkeitsbereich, der experimentell ermittelt werden muss. Durch die beiden Parameter Evakuiergeschwindigkeit und Polymergehalt lässt sich in dem physiologisch akzeptablen Bereich (HPMC E50-Gehalt $\leq 1,5$ % in der Lösung,

Haftfestigkeit ≤ 20 g) mit dem Mini-Gefriertrockner nahezu jedes Verhältnis von Druck- und Haftfestigkeit gezielt einstellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer Verstärkung der Haftfestigkeit auch die Druckfestigkeit entsprechend erhöht werden muss, um ein Zusammendrücken und Verschmieren des Lyophilisates bei der Applikation zu vermeiden. Bei geringer Haftfestigkeit kann auch die Strukturfestigkeit entsprechend reduziert werden.

Die Restmengenuntersuchungen belegen, dass bei einem richtigen Größenverhältnis dieser beiden Eigenschaften in vivo mehr als 90 % der Wirkstoffdosis reproduzierbar appliziert werden kann. Die applizierbare Menge lässt sich bereits zuvor mit dem In-vitro-Abreißtest näherungsweise ermitteln. Sie ist sowohl abhängig von der Einfriermethode als auch vom Wirkstoffgehalt. Der Polymergehalt spielt dagegen keine Rolle.

Die Restfeuchtebestimmung der Lyophilisate ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Restfeuchte und Haft- oder Druckfestigkeit. Ein geringerer Polymergehalt führt jedoch zu einem nicht unerheblichen Anstieg der Restfeuchte. Die Einfrierbedingungen haben dagegen keinen deutlichen Einfluss.

Insgesamt ist die Restfeuchte der hergestellten Lyophilisate als etwas zu hoch zu bewerten. Um hinsichtlich der Stabilität Nachteile zu vermeiden, sollte die Sekundärtrocknungsphase dahingehend verlängert werden, dass Restfeuchten < 5 % erhalten werden.

Mit dem Mini-Gefriertrockner wurde eine Apparatur entwickelt, die zur reproduzierbaren Herstellung von OLCS mit genau definierten Eigenschaften sehr gut geeignet ist. Ziel weiterer Arbeiten mit dem Mini-Gefriertrockner sollte die Rezepturfindung und Methodenentwicklung für einen klinisch relevanten Wirkstoff sein, um in klinischen Studien mit einer größeren Anzahl OLCS die entscheidenden Vorteile dieser Applikationsform gegenüber konventionellen Augentropfen klar herauszustellen.

6 Anhang

6.1 Zeichen und Symbole

α	Signifikanzniveau
bd	Baud
c_e	Spezifische Wärme von Eis [J/(g · K)]
c_w	Spezifische Wärme von Wasser [J/(g · K)]
CO ₂	Kohlendioxid
Cr	Chrom
cSt	Zentistokes
d	Durchmesser [m] oder [mm]
d	Wirkungsquerschnitt von H ₂ O –Gasmolekülen: $3,7 \cdot 10^{-10}$ [m]
ΔH_v	Molare Verdampfungswärme [J/mol] oder [J/g]
Δp	Dampfdruckerniedrigung [mbar]
ΔT_b	Siedepunktserniedrigung [°C]
ΔT_f	Gefrierpunktserniedrigung [°C]
ΔT_r	Tripelpunkt
H	Testgröße für den H-Test nach Kruskal und Wallis
H ₂ O	Wasser
η	Dynamische Viskosität [cP] oder [mPa·s]
J	Joule
k	Boltzmann-Konstante [J/K]
K	Konstante der Kapillare des Ubbelohde-Viskosimeters [cSt/s]
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
λ	Wellenlänge [nm]
mbar	Millibar
min	Minute
n	Stichprobenanzahl, Stoffmenge [mol]
N	Newton
N_A	Avogadrokonstante [mol ⁻¹]

Ni	Nickel
P	Druck [mbar]
p	Druck [mbar], Signifikanzniveau, Irrtumswahrscheinlichkeit
Pa	Pascal
P_c	Kammerdruck [mTorr]
P_c	Kammerdruck [N/m ²], [mbar] oder [Pa]
ρ	Dichte [1000 kg/m ³]
π	Pi [3,1415]
Q_e	Schmelzwärme von Eis [J/mol] oder [J/g]
Q_{ges}	Gesamte Wärmemenge [J/g]
®	Geschütztes Warenzeichen
R	Allgemeine Gaskonstante [8,314 J/mol K]
R^2	Bestimmtheitsmaß
s_m	Strecke [m]
t	Durchflusszeit [s]
t	Zeit [s]
T	Temperatur [°C] oder [K]
T	Temperatur [°C] oder [K]
T_c	Kollapstemperatur [°C]
T_g	Gastemperatur [°C] oder [K]
T_p	Produkttemperatur [°C]
T_s	Stellflächentemperatur [°C]
ν	kinematische Viskosität [cSt]
V	Volumen [L], Ventilstellung, Volt
V_t	Volumen pro Zeiteinheit [m ³ /sec]; durchsetztes Volumen [m ³]
ν	Hagenbach-Korrekturfaktor [s]
$\bar{\nu}$	Geschwindigkeit [m/s]
W	Watt
W_{ges}	Gesamte Energiemenge [J/g]
χ^2	Chi-Quadrat, Testgröße für den χ^2 -Test
z	Anzahl der Partner, mit denen das Molekül kollidiert

6.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis Of Variances, Varianzanalyse
BTM	Barometrische Temperaturmessung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
DAB	Deutsches Arzneibuch
d. h.	das heißt
DIN	Deutsche Industrienorm
EDO	Einzeldosisophthiole
Endtemp.	Endtemperatur
engl.	englisch
et al.	et alii
Evakuiergeschw.	Evakuiergeschwindigkeit
Fa.	Firma
GT-Anlage	Gefriertrocknungsanlage
Haft	Haftfestigkeit
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
hrs.	Stunden
IR	Infrarot
LSD	Least Significance Difference
Max	Maximum
max.	maximal
MFW	Mittlere Freie Weglänge
Min	Minimum
min.	mindestens
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NIR	Nahinfrarotspektroskopie
OLCS	Ophthalmic Lyophilisate Carrier System
PC	Personal Computer
PE	Polyethylen
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch

PTFE	Polytetrafluorethylen
rel.	relativ
Rel.St.Abw.	Relative Standardabweichung
REM	Rasterelektronenmikroskopie
s. o.	siehe oben
schl.	schlecht
sec	Sekunde
sog.	so genannt
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
St.Abw.	Standardabweichung
Temp.	Temperatur
USP	United States Pharmacopoeia
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

- (1) Arzneimittel-Kompendium der Schweiz 2002.
- (2) Bauer KH, Frömming KH, Führer C. Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. 7. Auflage. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2002: 130-132.
- (3) Brown MM, Brown GC, Spaeth GL. Improper Topical Self-Administration of Ocular Medication among Patients with Glaucoma. Can J Ophthalmol. 1984; 19: 2.
- (4) Brülls M, Rasmuson A. Heat Transfer in Vial Lyophilisation. International Journal of Pharmaceutics. 2002; 246: 1-16.
- (5) Bruttini R, Rovero G, Baldi G. Use of a pilot plant for the kinetic study of the process of lyophilisation. Farmaco Ed Prat. Issue Nov. 1986; 41: 347-357.
- (6) Bruttini R, Rovero G, Baldi G. Experimentation and Modelling of Pharmaceutical Lyophilization using a Pilot Plant. Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal. 1991; 45: Abstract.
- (7) Bühl A & Zöfel P. SPSS für Windows. Version 6.1 – Praxisorientierte Einführung in die moderne Datenanalyse. Bonn, Paris: Addison-Wesley Publishing Company; 1995.
- (8) Burger A, Wachter H. Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. 8. Auflage. Berlin: de Gruyter; 1998.
- (9) Christ GmbH: Gefriertrocknung und Vakuumkonzentration – Das Christ Seminar – Grundlagen der Gefriertrocknung, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode/Harz.

- (10) Christiani R. Techniker Kalender 1976. 22. Ausgabe. Konstanz: Dr.-Ing. P. Christiani GmbH; 1976.
- (11) Cook C, Cox G. Freeze drying – from technique to technology. Laboratory Equipment Digest. 1988; 26(3): 107-110.
- (12) Daniels R. Galenische Tricks für Arzneiformen am Auge. Pharm. Ztg. 2003; 19:21-29.
- (13) Deutsches Arzneibuch. 9. Auflage (DAB9). Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- (14) Diestelhorst M, Grunthal S, Süverkrüp R. Dry Drops: a new preservative-free drug delivery system. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 1999; 237: 394-398.
- (15) Diestelhorst M. Betablocker, Prostaglandin-Analoga: Die Therapie muss patientenfreundlicher werden, in: Erb C, Krieglstein GK. Glaukom Fragen zur Praxis. Köln: Agamede Verlag; 2000: 166-179.
- (16) Dinslage S, Weichselbaum A, Süverkrüp R, Diestelhorst M, Krieglstein GK. Fluorescein Lyophilisate: Pharmacokinetics of Fluorescein in the Human Anterior Segment. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2000; 41(4).
- (17) Dolan JP. Use of Volumetric Heating to Improve Heat Transfer during Vial Freeze-Drying. Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia; 1998.
- (18) Dolder R, Skinner F. Ophthalmika Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel. 4. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1990: 354-372, 399.

- (19) Eckhardt B. Lyophilisation von niedermolekularen Substanzen, Peptiden und Proteinen, in: Essig D, Oschmann R. Lyophilisation. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1993.
- (20) Flink J. in: Goldblith SA et al. Freeze Drying and Advanced Food Technology. Academic Press; 1975: 143f.
- (21) Fluorescein-Natrium, Prüfzertifikat, Firma Synopharm GmbH, Barsbüttel; 1999.
- (22) Franks F. Improved Freeze-Drying: An Analysis of the Basic Scientific Principles. Process Biochemistry. 1989; 24(1): Supplement: ProBioTech: III-VII.
- (23) Gölker C. Gefriertrocknung biotechnologischer Produkte. J Pharm Tech. 1989; 10: 30.
- (24) Greaves RIN. Centrifugal Vacuum Freezing: Its Application to the Drying of Biological Materials from the Frozen State. Nature. 1944; 153: 485-487.
- (25) Grunthal S. Dry Drops – Entwicklung und Prüfung eines Trockengel-Applikators zur Anwendung am Auge. Dissertation, Bonn; 1996.
- (26) Infinity[®] Meters, INFT 1001, Operator's Manual, Newport Electronics GmbH, Deckenpfronn.
- (27) Jennings TA. Lyophilization for the Pharmaceutical Industry. Seminar Notes. Phase Instruments, Inc., Bala Cynwyd, Pennsylvania, USA; 1993.
- (28) Jennings TA. Role of Product Temperature in the Lyophilization Process. Insight Journal (online: www.phase-technologies.com). April 1998; 1(2).
- (29) Jennings TA. Lyophilization: Introduction and Basic Principles. Denver, Colorado, USA: Interpharm Press; 1999.

- (30) Jumo Mess- und Regeltechnik, Typenblatt 90.1221 für Mantel-Thermoelemente nach DIN 43 710 und IEC 584, M. K. Juchheim GmbH & Co., Fulda, Deutschland.
- (31) Kang HW, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatine scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999; 20: 1339-1344.
- (32) Kircher W. Hinweise zur richtigen Aufbewahrung und Anwendungstechnik von Arzneimitteln, in: Gebler H, Kindl G. *Pharmazie für die Praxis*. 3. Auflage. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 1998: 212-214.
- (33) Kramer M. Innovatives Einfrierverfahren zur Minimierung der Prozesszeit von Gefriertrocknungszyklen. Dissertation, Erlangen-Nürnberg; 1999.
- (34) Kruss B. Prozessparameter und ihre Auswirkungen auf die Produktqualität, in: Essig D, Oschmann R. *Lyophilisation*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1993.
- (35) Kyprianidou-Leodidou TC, Botsaris GD. Freeze Concentration of Aqueous Solutions, in: Myerson AS, Toyokura K. *Crystallization as a Separations Process*. ACS Symposium Series 438, American Chemical Society. Washington, DC, USA; 1990.
- (36) List PH. *Arzneiformenlehre*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1985: 282-287.
- (37) List PH, Schmidt PC. *Technologie Pflanzlicher Arzneizubereitungen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1984: 220-222, 361-364.
- (38) Lux A, Maier S, Süverkrüp R, Diestelhorst M. Comparative Bioavailability Study of Fluorescein. 3 Eye Drops Vs A Single Lyophilisate (Abstract and Poster). ARVO Meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA; Mai 2002.

- (39) Lyophilisation für Praktiker. Seminarunterlagen. APV Kurs 465, Bonn; 13.-14. September 2000.
- (40) MacKenzie AP. The Physico-Chemical Basis for the Freeze-Drying Process. Development of Biological Standards. 1977; Volume 36, International Symposium on Freeze-Drying of Biological Products, Washington, D.C., USA. 1976: 51-67.
- (41) Maier S, Neff B, Diestelhorst M, Süverkrüp R. Rapid Freeze-Drying on a Small Scale and the Dependence of the Adhesion Force Between Lyophilisates and Hydrophobic Carriers Upon Freezing Conditions. Abstract und Poster. EUFEPS 3rd World Congress on Drug Absorption and Drug Delivery, Kopenhagen, Dänemark; 2001.
- (42) Maier S, Neff B, Diestelhorst M, Süverkrüp R. Optimization of Manufacturing Conditions and Excipients for an Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS). Abstract und Poster. ADRITELF / APV / APGI 4th World Meeting, Florenz, Italien; April 2002.
- (43) Menges G. Werkstoffkunde Kunststoffe. 4. Auflage. Hauser Verlag.
- (44) Meryman HT. Sublimation freeze-drying without vacuum. Science. 1959; 130: 628-629.
- (45) Methocel[®] Product Specifications and Certificate of Analysis, Colorcon Limited, Dartford Kent, England; 2000.
- (46) Metrohm 756 KF Coulometer, Gebrauchsanweisung, Metrohm AG, Herisau, Schweiz.
- (47) Metrohm 774 Oven Sample Processor, Gebrauchsanweisung, Metrohm AG, Herisau, Schweiz.

- (48) MKS Instruments, Produktinformation und Datenblatt Kapazitätsmanometer MKS Baratron[®] Serie 600, München.
- (49) MKS Instruments, Benutzerhandbuch MKS Typ PR 4000 S Einkanal-Betriebsgerät für Baratron[®] Druckaufnehmer, Kompaktdruckregler oder Gasflussregler / -monitore, München; Mai 1997.
- (50) Murgatroyd K. The Freeze Drying Process, in: Cameron P. Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice. Buffalo Grove, IL, USA: Interpharm Press, Inc.; 1997.
- (51) Nail SL. The Effect of Pressure on Heat Transfer in the Freeze-Drying of Parenteral Solutions. Journal of the Parenteral Drug Association. 1980; 34(5): 358-368.
- (52) Nail SL, Schwegman JJ, Kamp V. Analytical Tools for Characterization of Frozen Systems in the Development of Freeze-Dried Pharmaceuticals. American Pharmaceutical Review. 2000; 3(4): 17-25.
- (53) Oetjen GW. Gefriertrocknung in der biologisch-pharmazeutischen Forschung und Industrie. DKV-Tagungsbericht 1996, 23. Jahrgang, Band 3, Leipzig, 20.-22. November 1996.
- (54) Oetjen GW. Gefriertrocknen. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1997.
- (55) Pfeiffer Vacuum, Gebrauchsinformation Gasdosier-/Absperrventil EVN 116, Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar.
- (56) Pikal MJ. Use of Laboratory Data in Freeze Drying Process Design: Heat and Mass Transfer Coefficients and the Computer Simulation of Freeze Drying. Journal of Parenteral Science and Technology. 1985; 39(3): 115-138.

- (57) Pikal MJ. Freeze Drying, in: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Volume 6. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1992: 275-303.
- (58) Pikal MJ. Heat and Mass Transfer in Low Pressure Gases: Applications to Freeze Drying, in: Amidon G, Lee P, Topp L. Transport Process in Pharmaceutical Systems, New York: Marcel Dekker, Inc.; 1999: 611-686.
- (59) Pikal MJ, Shah S, Senior D, Lang JE. Physical Chemistry of Freeze-Drying: Measurement of Sublimation Rates for Frozen Aqueous Solutions by a Microbalance Technique. Journal of Pharmaceutical Science. 1983; 72(6): 635-650.
- (60) PTFE-Produktinformation. Firma 3P GmbH, Karben.
- (61) Rahm H. Fortbildungskurs der Gesellschaft Schweizerischer Industrie-Apotheker (GISA). 1979/1980; Lektion 6: 37.
- (62) Rohacell[®] Handbuch. Röhm Kunststoffe, Röhm GmbH Chemische Fabrik, Darmstadt.
- (63) Rote Liste. Aulendorf / Württemberg: Editio Cantor Verlag; 2000.
- (64) Roy ML, Pikal MJ. Process Control in Freeze Drying: Determination of the End Point of Sublimation Drying by an Electronic Moisture Sensor. Journal of Parenteral Science and Technology. Issue March-April 1989; 43: 60-66.
- (65) Rücker G, Neugebauer M, Willems GG. Instrumentelle pharmazeutische Analytik. 2. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1992: 102-108.
- (66) Rupprecht H. Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung, in: Essig D, Oschmann R. Lyophilisation. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1993.

- (67) Sachs L. Statistische Methoden – Planung und Auswertung. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1993: 312.
- (68) Saeger H, Taskis CB, Syrop M, Lee TJ. Structure of Products Prepared by Freeze-Drying Solutions Containing Organic Solvents. *Journal of Parenteral Science Technology*. 1985; 39(4): 161-179.
- (69) Schelenz G, Engel J, Rupprecht H. Sublimation During Lyophilisation Detected by Temperature Profile and X-ray Technique. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995; 113: 133-140.
- (70) Schoen MP, Braxton BK, Gatlin LA, Jefferis III RP. A Simulation Model for the Primary Drying Phase of the Freeze-Drying Cycle. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995; 114: 159-170.
- (71) Snowman JW. Lyophilization under Barrier Technology, in: Groves MJ, Murty R. *Aseptic Pharmaceutical Manufacturing II, Applications for the 1990s*. Buffalo Grove, IL, USA: Interpharm Press, Inc.; 1995.
- (72) Steinfeld PA, Maier S, Süverkrüp R, Diestelhorst M. Comparative Bioavailability Study of Identical Doses of Fluorescein From A New Delivery System (Abstract and Poster), ARVO Meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA; Mai 2002.
- (73) Steward P. Liquid Nitrogen: Why is Progress Slow? Economic and Environmental Factors. *Pharmaceutical Technology Europe*; März 1997: 15-22.
- (74) Strasser G, Steinkogler FJ, Thaler A. Der Augenspiegel – Erste Erfahrungen mit einer Applikationshilfe für Augentropfen. *Firmeninformation Chibret Pharmazeutische GmbH, München*; 1985.
- (75) Stricker H. *Physikalische Pharmazie*. 3. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1987.

- (76) Surborg KH, Junkersdorf A. Der Karl-Fischer-Ofen in der Arzneistoffanalytik. Krankenhauspharmazie. 2001 (22. Jahrgang); 6: 271-273.
- (77) Trappler E. Lyophilization, in: Groves MJ, Murty R. Aseptic Pharmaceutical Manufacturing II, Applications for the 1990s. Buffalo Grove, IL, USA: Interpharm Press, Inc.; 1995.
- (78) USP 24, The United States Pharmacopoeia, 24th Edition, Official Monographs: 731, 843.
- (79) Vitor Cortes F, Van Caekenberghe D. Freeze drying: past, present and future. Ann Med Milit Belg. 1997; 11(1): 10-13.
- (80) Waldman SR, Patrowics TC. Effects of Hydroxypropyl Methylcellulose and Polyvinyl Alcohol on Intraocular Penetration of Topical Fluorescein in Man. Invest Ophthalmol. 1970; 9(12): 96-97.
- (81) Weast RC. Handbook of Chemistry and Physics. 55th Edition. Cleveland, Ohio, USA: Chemical Rubber Company Press; 1974: D-137, D-138.
- (82) Weichselbaum A. Herstellung und Prüfung von Lyophilisaten auf hydrophoben Trägerfolien: Haftfestigkeit und Bioverfügbarkeit. Dissertation, Bonn; 2002.
- (83) Wettlaufer JS, Dash JG. Melting Below Zero. Scientific American; Februar 2000: 34-37.
- (84) Willemer H. Troubleshooting Lyophilization. Pharmaceutical Technology Europe; Mai 1999: 15-22.

- (85) Willemer H, May H. Anforderungen an die Prozesstechnik und Anlagenüberwachung bei Gefriertrocknungsanlagen für Pharmazeutische Produkte. DKV-Tagungsbericht 1988, 15. Jahrgang, München, 16.-18. November 1988.
- (86) Woog H. Stabilisierung von Wirkstoffen durch Gefriertrocknung, in: Essig D, Oschmann R. Lyophilisation. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1993.