

TRÄGERLYOPHILISATE FÜR DIE AUGENHEILKUNDE

**Entwicklung einer neuen Gefriertrocknungstechnik
und in-vitro Tests**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

vorgelegt von

Olena Krasichkova

aus Nowograd-Wolynski (Ukraine)

Bonn 2006

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

Erster Referent: Prof. Dr. R. Süverkrüp

Zweiter Referent: Prof. Dr. G. Lee

Eingereicht am: 20.10.2006

Tag der Promotion: 11.12.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Richard Süverkrüp am Institut für Pharmazeutische Technologie an der Rheinischen Friedrichs-Wilhelms Universität Bonn.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Süverkrüp danke ich von ganzem Herzen für die Vergabe eines interessanten Themas, für viele Ideen und Denkanstöße, für hervorragende Arbeitsbedingungen und für unerschöpfende Hilfsbereitschaft bei Problemen aller Art. Die Arbeit im Institut unter seiner Betreuung hat mir sehr viel Spaß gemacht und die Möglichkeiten eröffnet viel Neues zu lernen. An die gemeinsamen Kongressen und Tagungen in den USA und Europa, sowie an interessante und freundliche Diskussionen denke ich gerne zurück.

Herrn Prof. Dr. G. Lee danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prüfungsbesitzes.

Herrn Prof. Dr. M. Diestelhorst danke ich für großes Interesse an meiner Arbeit und Übernahme des Prüfungsbesitzes. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. U. Jaehde für Übernahme des Prüfungsbesitzes.

Mein herzlicher Dank gilt an Herrn G. Feldkeller für seine Hilfsbereitschaft bei allen technischen Problemen und die Fertigung der Einzelbauteile der Anlage. Ebenso möchte ich mich bei Herrn F. Scholl für die technischen Arbeiten in der Werkstatt bedanken

Herrn J. Hohmann möchte ich für sein Engagement bei der Erstellung einer automatischen Ablaufsteuerung der Gefriertrocknung und seine Unterstützung bei alltäglichen elektronischen Problemen danken.

Kristina Piskorz und Frau M. Simpson möchte ich für die freundliche Unterstützung des Uni-Alltags danken.

Der Fa. Carl Zeiss (Jena) und besonders Frau Dr. H. Keutel und Herrn M. Patzwald möchte ich für die Bereitstellung des NIR-Spektrometers und eine fachliche Auskunft

bei der Durchführung der NIR-Messungen danken. Ebenso danke ich Jörg Tonnellier für die Einführung in die NIR-Spektroskopie.

Bei den Studenten Christian Hosselmann, Hendrik Schwarze und Partice Lux bedanke ich mich für ihre Motivation und Zuverlässigkeit bei der Durchführung von Versuchen im Rahmen ihrer Wahlpflichtfachprojekte.

Bei allen Mitarbeitern der Pharmazeutischen Technologie der Universität Bonn möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, freundliche Atmosphäre, und schöne gemeinsame Zeit bedanken. Besonderer Dank gilt an meinen Zimmerkollegen Inge Lehrach, Michael Melichar und Matthias Schwerdtfeger für stete Hilfsbereitschaft, viele nützliche Diskussionen und Ratschläge.

Ich danke allen meinen Freunden in Bonn, die mir während der gesamten Zeit aufbauend zur Seite standen. Besonders danke ich Jurij Burkanov für Hilfe bei Flash-Animation und Natalia Burkanova, dass sie für alle meine Posterpräsentationen das Fotomodell war.

Mein ganz besonderer Dank gilt an meiner Familie, die mich auch aus der Ferne aufgemuntert hat und nie an mir gezweifelt hat.

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit

„Wenn wirkliches Neuland betreten wird, kann es vorkommen, dass nicht nur neue Inhalte aufzunehmen sind, sondern dass auch die Struktur des Denkens sich ändern muss, wenn man das Neue verstehen will.“

Werner Heisenberg

Auszüge dieser Arbeit wurden an folgender Stelle vorab veröffentlicht:

- Krasichkova O, Süverkrüp R.

A Precision Freeze-drying Method for the Ophthalmic Lyophilisate Carrier Systems (OLCS)

Abstract und Poster im Rahmen des International Meeting on Pharmaceutics and Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg, March 2004

- Süverkrüp R, Krasichkova O, Diestelhorst M, Maier S.

Production of Ophthalmic Lyophilisate Carriers by Fast Precision Freeze Drying (FPFD)

Abstract und Poster im Rahmen Annual Conference of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL 2004

- Süverkrüp R, Grunthal S, Krasichkova O, Maier S, Weichselbaum A, Neff B, Diestelhorst M, Dinslage S, Lux A.

The Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS): Development of a Novel Dosage Form, Freeze-drying Technique, and In-vitro Quality Tests.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004; 57: 269-277

- Krasichkova O, Süverkrüp R, Hosselmann Ch, Schwarze H, Diestelhorst M.

Productiun, In-process Control and In-vitro Testing of Hyaluronic Acid/ Dextran Ophthalmic Lyophilisate Systems (OLCS)

Abstract und Poster im Rahmen des World Meeting on Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Geneva, March 2006

- Krasichkova O., Süverkrüp R., Diestelhorst M.

Fast Precision Freeze-Drying of Ophthalmic Lyophilisate Carrier Systems (OLCS)

Abstract und Poster im Rahmen des Annual Meeting of American Association of Pharmaceutical Scientists, Nashville, TN, 2005

- Süverkrüp R., Krasichkova O., Diestelhorst M.

Fast Precision Freeze Drying (FPFD) of Hyaluronic Acid / Dextran Ophthalmic Lyophilizate Carrier Systems (OLCS)

Abstract und Poster im Rahmen des Annual Conference of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Ft. Lauderdale, FL 2006

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Zielsetzung	1
I Theoretischer Teil	4
I 1. Gefriertrocknung	4
I 1.1 Phasen der Gefriertrocknung.....	5
I 1.1.1 Einfrieren.....	5
I 1.1.2 Primärtrocknung.....	10
I 1.1.3 Sekundärtrocknung.....	15
I 1.2 Aufbau einer konventionellen Gefriertrocknungsanlage.....	15
I 1.2.1 Trockenkammer.....	16
I 1.2.2 Kondensator.....	18
I 1.2.3 Vakuum-Belüftungssysteme.....	19
I 1.3 Prozessüberwachung.....	20
I 1.3.1 Druckmessung.....	20
I 1.3.2 Temperaturmessung.....	22
I 1.3.3 Wägesysteme.....	23
I 1.3.4 Kalorimetrisches Monitoring.....	23
I 1.3.5 Feuchtesensor.....	24
I 1.3.6 „Windmill Device“.....	24
I 1.3.7 Restgasanalyse.....	24
I 1.3.8 Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS).....	25
I 2. Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS) – eine neue Arzneiform für die Augenheilkunde	27
I 2.1 Problematik der konventionellen Augentropfen.....	27
I 2.2 OLCS – Charakterisierung der Arzneiform.....	28
I 2.3 Qualitätsrelevante Parameter der OLCS.....	32
II Materialien und Methoden	35
II 1. Herstellung von OLCS	35
II 1.1 Herstellung der Lösungen.....	36
II 1.2 Charakterisierung der Lösungen.....	40

II 1.2.1 Oberflächenspannung	40
II 1.2.2 Viskosität	40
II 1.3 Herstellung der Applikatoren	41
II 1.4 Auftropfen und Beladen der Trockenkammer.....	44
II 1.5 Gefriertrocknung.....	44
II 1.6 Entladen der Trockenkammer, Verpackung und Etikettierung.....	44
II 2 Charakterisierung der Lyophilisate	45
II 2.1 Bestimmung der Haftfestigkeit zwischen dem Tropfen und der Trägerfolie und der Strukturfestigkeit von Lyophilisaten.....	45
II 2.1.1 Bestimmung der Haftfestigkeit.....	45
II 2.1.2 Bestimmung der Strukturfestigkeit.....	47
II 2.2 Wassergehaltsbestimmung	49
II 2.3 Dynamische Wasserdampfsorption (DVS, Dynamic Vapour Sorption)	52
II 2.4 Charakterisierung der Tropfenform der OLCS.....	53
II 2.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	54
II 3. Chemometrische und statistische Auswertungsmethoden.....	56
II 3.1 Chemometrie.....	56
II 3.1.1 Spektrenvorbehandlung.....	57
II 3.1.2 Validierung.....	57
II 3.2 Faktorenversuchsplanung.....	59
II 3.2.1 Varianzanalyse des Modells	59
II 3.2.2 „Lack of Fit“-Test.....	59
II 3.2.2 Effekt-Test.....	59
III Ergebnisse.....	61
III 1 Innovative Gefriertrocknungstechnik.....	61
III 1.1 Zielsetzung und Konzept für die Entwicklung einer schnellen Gefriertrocknungstechnik mit präzise kontrollierten Herstellungsbedingungen.....	61
III 1.2 Entwicklung der Gefriertrocknungsanlage.....	66
III 1.2.1 Prototyp I.....	66
III 1.2.2 Prototype IIa und IIb.....	67

III 1.3 Konzept für die aseptische Herstellung.....	71
III 1.4 Kontrolle der Herstellungsbedingungen.....	73
III 1.4.1 Kerntemperatur des Tropfens.....	73
III 1.4.2 Oberflächentemperatur.....	74
III 1.4.3 Kontrolle des Druckverlaufs.....	75
III 1.4.4 Beurteilung der Temperatur-/Druckprofile.....	75
III 1.4.5 Steuerung der Einfriergeschwindigkeit.....	78
III 1.4.6 Inline Überwachung des Restwassergehaltes mittels NIRS	81
III 2 Charakterisierung von OLCS.....	92
III 2.1 Charakterisierung der Lösung	92
III 2.1.1 Viskosität.....	92
III 2.1.2 Oberflächenspannung.....	95
III 2. 2 Charakterisierung von Lyophilisaten.....	96
III 2.2.1 Untersuchung der Haftfestigkeit und Strukturefestigkeit von HF-OLCS.....	96
III 2.2.2 Untersuchung der Haftfestigkeit und Strukturefestigkeit von NaHD-OLCS.....	106
III 2.2.3 Einfluss der Folienprägung auf Haftfestigkeit von OLCS.....	115
III 2.2.4 Form der Lyophilisate.....	119
III 2.2.5 Sorptionsisothermen mittels DVS.....	120
III 2.2.6 REM-Untersuchungen der Lyophilisate.....	122
III 2.2.7 Untersuchung der Haftfestigkeit von HF-Lyophilisaten an den Laborprototypen I und IIa.....	130
IV Diskussion und Ausblick.....	138
Zusammenfassung.....	146
V Anhang.....	150
VI Literaturverzeichnis.....	156
VII Abkürzungen und Symbole.....	167

Einleitung und Zielsetzung

Die meisten Arzneimittel zur lokalen Therapie der Augenkrankheiten sind wässrige Augentropfen, deren Anwendung aus mehreren Gründen problematisch ist. Häufig sind sie nicht gut verträglich, weshalb die Compliance mangelhaft ist. Auch die Dosis ist schlecht kontrollierbar und systemische Nebenwirkungen sind bei manchen Wirkstoffen, z.B. β -Sympatomimetika und α_2 -Rezeptorantagonisten, nicht selten [10]. Um die wesentlichen Nachteile der konventionellen Augenarzneiformen zu beseitigen, wurden Trägerlyophilisate (Ophthalmic Lyophilisate Carrier System, OLCS) als neue Arzneiform für die Augenheilkunde, entwickelt [7, 8, 9] und in klinischen Studien erfolgreich getestet [12, 50, 82, 90].

Dabei handelt es sich um ein einzeldosiertes Applikationssystem, das aus einem gefriergetrockneten Tropfen und einer Trägermembran besteht. Die Arzneiform bietet folgende Vorteile gegenüber den traditionellen wässrigen Augentropfen:

- Bessere chemische Stabilität für hydrolyseempfindliche Wirkstoffe
- Abwesenheit von Konservierungsmitteln, Puffersubstanzen für die pH- Wert-Einstellung und isotonisierenden Zusätze
- Genauere Dosierung
- Bessere Handhabung

Für die gute Applizierbarkeit sind die Haftfestigkeit der Lyophilisate auf der Trägermembran und ihre Strukturfestigkeit von entscheidender Bedeutung. Die Herstellung von OLCS mit definierten physikalisch-chemischen Eigenschaften erfordert eine präzise Kontrolle der Prozessparameter. Dies kann durch die konventionellen Gefriertrocknungsanlagen nicht gewährleistet werden.

Bei konventionellen Labor- und Produktions- Gefriertrocknungsanlagen sind die Prozessbedingungen wegen der Größe der Stellflächen nicht homogen [31, 70] und nicht vollständig kontrollierbar. Die FDA-Guidance „Inspection of Lyophilisation of Parenterals“ betont, dass das Scale-up in der Gefriertrocknung unter Umständen komplizierter ist als bei anderen Verfahren und umfangreiche Kenntnisse über physikalisch-chemische Eigenschaften des Produktes erfordert [25].

In den letzten Jahren legen die Zulassungs- und Aufsichtsbehörden Wert darauf, dass Hersteller von Arzneimitteln die wissenschaftlichen Grundlagen des Herstellungsprozesses verstehen, sich um eine kontinuierliche Optimierung der kritischen Parameter bemühen, die Qualität des Produktes laufend verbessern und deren wertbestimmende Eigenschaften im Sinne des „Six Sigma“ Konzepts innerhalb enger Grenzen halten [1]. Die ICH Q8 Guideline „Pharmaceutical Development“ verlangt, dass während der Entwicklungsphase möglichst viele Erkenntnisse über das Produkt und den Herstellungsprozess gewonnen werden sollen, damit der zulässige Bereich der variablen Produktionsparameter (Design Space), die Inprozess-Kontrolle und die Freigabeproofung sowie Produktspezifikation möglichst vollständig definiert werden können [61]. Dies kann durch die Einführung der Process Analytical Technology (PAT), Risikoanalyse, Faktorenversuchsplanung und durch Anwendung von chemometrischen Methoden erreicht werden. Der Schlüsselgedanke der PAT besteht darin, dass die Qualität nicht in das Produkt geprüft werden kann, sondern eingebaut bzw. eingeplant wird [60]. Die Risikoanalysen dienen der Erkennung der kritischen Parameter, deren Zusammenhänge und Wechselwirkungen mit Hilfe der Faktorenversuchsplanung beschrieben werden können. Die oben genannten regulatorischen Empfehlungen wurden in dieser Arbeit besonders beachtet.

Die von S. Maier angefangene Entwicklung einer neuen Gefriertrocknungstechnik [52] wird mit dieser Arbeit fortgesetzt.

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt die wichtigsten Aspekte der Designentwicklung und Prüfung des Konzepts der neuen Gefriertrocknungstechnik. Folgende Ziele werden für die Entwicklung gesetzt:

- Steuerung und genaue Kontrolle der Herstellungsbedingungen bei jedem OLCS
- Kurze Trocknungszeiten
- Designkonzept für die aseptische Herstellung
- Verwendung von Standardvakuumbauteilen
- Vermeidung der scale-up Problematik
- Übergang von einem chargenorientierten zum quasi-kontinuierlichen Prozess

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den Untersuchungen der Produkteigenschaften. Die Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit der Lyophilisate wurden in Abhängigkeit von den Faktoren Einfriergeschwindigkeit, Wirkstoffgehalt und Polymergehalt sowie deren Wechselwirkungen an zwei Rezepturen untersucht. Um Lyophilisate möglichst umfassend zu charakterisieren, werden sie rasterelektronmikroskopisch untersucht und ihren Porengrößenverteilungen quantitativ ausgewertet. Die Wasseraufnahme aus der Atmosphäre wurde durch die Sorptionsisothermen quantifiziert. Die Benetzung der Trägerfolie wurde durch Messungen des Kontaktwinkels und der Oberflächenspannung bestimmt und der Einfluss der Prägung der PTFE-Folie auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate untersucht.

I Theoretischer Teil

I 1. Gefriertrocknung

Lyophilisation oder Gefriertrocknung ist ein schonendes Trocknungsverfahren, bei dem Wasser aus dem festen gefrorenen Zustand direkt in die Dampfphase sublimiert.

Dieses Verfahren findet die Anwendung in Biotechnologie, Medizin, Pharma- und Lebensmittelindustrie [47, 48].

In der Pharmazie bietet diese Technik folgenden Nutzen:

- Stabilitätsverbesserung von hydrolyseempfindlichen Stoffen,
- Trocknung von thermolabilen Stoffen
- Löslichkeitsverbesserung von schwerlöslichen Wirkstoffen.

Lyophilisate werden in Ampullen oder Infusionsflaschen in den Handel gebracht und dann gelöst. Sie können auch in Doppelkammerfertigspritzen, Tablettenblistern oder als „Bulkware“ gefertigt werden. In den USA werden 46 % der von der FDA geprüften biopharmazeutischen Arzneimittel (Proteine, Peptide und Impfstoffe) in Form von Lyophilisaten auf den Markt gebracht [11].

Hohe Investitions- und Betriebskosten, sowie hoher Energieaufwand bei der Gefriertrocknung führen zu teuren Prozessen [99]. Nach Angaben von Jennings werden für die Lyophilisate 8-10% der Produktionskosten aller Medikamente ausgegeben [31]. Trotz der Vorteile dieser Technik ist die Entwicklung und Produktion der Lyophilisate oft kompliziert und aufwändig. Das liegt einerseits an empfindlichen „problematischen“ Wirkstoffen, die gefriergetrocknet werden, aber andererseits auch daran, dass es bei der Entwicklung von Gefriertrocknungsanlagen seit den 60-er Jahren keine nennenswerten technischen Neuerungen gegeben hat [31]. Der „FDA Guide to Inspection of Lyophilisation of Parenterals“ listet folgende Nachteile dieser Technik auf [25]:

- Lange Prozesszeiten
- Notwendigkeit eines sterilen Rekonstitutionsmediums (für Lyophilisate in Ampullen und Infusionsflaschen)
- Teure und komplizierte Anlage und Prozesse

- Kompliziertes Scale-up

Murgatroyd fügt zu dieser Liste noch die chargenorientierte Herstellung der konventionellen Gefriertrocknungstechnik zu [56].

I 1.1 Phasen der Gefriertrocknung

Der klassische Gefriertrocknungsprozess besteht aus drei Phasen: Einfrierphase, Primärtrocknung und Sekundärtrocknung

I 1.1.1 Einfrieren

Das Einfrieren ist der erste Schritt in der Gefriertrocknung, in dem im Wesentlichen die Produkteigenschaften festgelegt werden. Hier wird die flüssige Lösung in der Regel bei Atmosphärendruck durch Abkühlen in den festen Aggregatzustand überführt.

Bei Abwesenheit von Kristallisationskeimen lässt sich reines Wasser bis -40°C unterkühlen. Die Moleküle lagern sich zu Clustern zusammen. Sinkt die Temperatur, nimmt die Größe des Clusters zu bis eine spontane homogene Keimbildung erfolgt [75, 100].

Enthält die Lösung eine heterogene Verunreinigung, so wird an deren Oberfläche eine heterogene Nukleation ausgelöst. Die Unterkühlung ist umso weniger ausgeprägt, je ähnlicher die Oberfläche der Verunreinigung dem Eiskristall ist. Je nach Temperatur und Druck kann das Eis acht verschiedene Kristallformen ausbilden [31]. Im Temperaturbereich von -150°C bis 0°C zeigt das Eis eine stabile Kristallmodifikation mit hexagonalem Gitter.

Die Lösungen von kristallinen Stoffen weisen ein eutektisches Einfrierverhalten auf. Das Wasser beginnt auszukristallisieren und die Konzentration der restlichen Lösung nimmt zu (Gefrierkonzentration) bis der eutektische Punkt erreicht wird. Der eutektische Punkt gibt das Mischungsverhältnis der Komponenten an, bei dem die tiefste Temperatur (eutektische Temperatur, T_e) für das thermodynamische Gleichgewicht zwischen festem und flüssigem Zustand erreicht wird [19]. Die Gefrierkonzentration kann zur Ausfällung schlecht löslicher Substanzen, zu pH- und pK_a -Wert - Änderungen in den Puffersystemen, und als Folge davon zu Aktivitätsverlust bei Proteinen führen [3, 8, 20, 62, 80]. Abbildung I-1 zeigt als

Beispiel die pH-Änderung eines Zitronensäure-Phosphatpuffer-Gemisches, bei dem es beim Einfrieren und Auftauen zu einer deutlichen Hysterese der pH-Werte kommt.

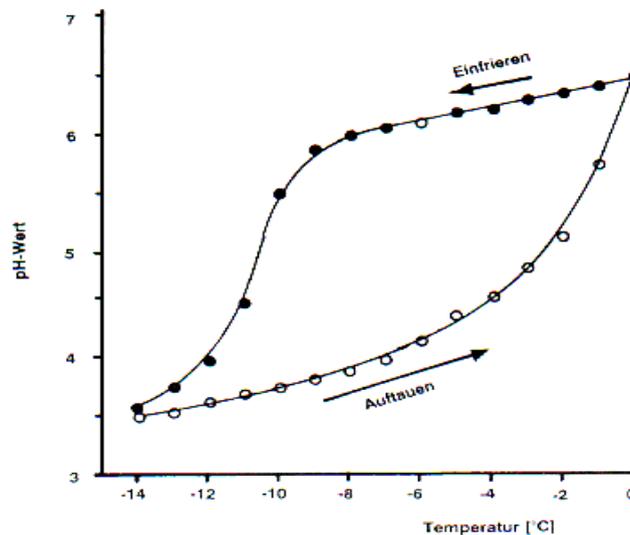


Abb. I-1: pH-Änderung bei der Gefrierkonzentration eines Zitronensäure-Phosphatpuffer Systems [75]

Stoffe, die in der Lösung zur Übersättigung neigen, wie z.B. Zuckerhydrate, kristallisieren unter dem eutektischen Punkt nicht vollständig, sondern erstarren als amorphes Glas nach der Unterkühlung ohne vollständige Phasentrennung (Abb. I-2). Die Viskosität im Glaszustand ist extrem hoch und die Diffusion der Inhaltsstoffe vernachlässigbar klein. Die Temperatur, bei der der Übergang in den festen Zustand erfolgt, wird als Glasübergangstemperatur (T_g') bezeichnet [2]. Bei Temperaturen zwischen T_g' und T_e , bildet sich eine gummiähnliche metastabile amorphe Struktur, die unter Umständen kollabieren kann. Das kann zum Zusammenbruch des porösen Lyophilisates führen. Dieser Temperaturbereich wird als Kollapstemperatur (T_c) bezeichnet. Die Kollapstemperatur hängt vom Restwassergehalt des Produktes ab [66, 77].

Die Kristallgröße und Kristallform des Eises und damit auch die Porosität des Fertigproduktes hängen von der Einfriereschwindigkeit ab. Ein Beispiel für den Temperaturverlauf für eine schnelle, mittlere und langsame Einfriereschwindigkeit ist in Abbildung I-3 gegeben.

Mit zunehmender Abkühlgeschwindigkeit nehmen die Größe der Eiskristalle und damit der Durchmesser der Poren im Lyophilisat ab. Diese Poren werden in der englischen Literatur auch als „ice ghosts“ bezeichnet. Abbildung I-4 zeigt ein Beispiel

der Abhängigkeit der mittleren Porendurchmesser von der Einfriergeschwindigkeit für eine Dextrinlösung.

T_m = Schmelzpunkt (Saccharose) T_g = Glasübergangstemperatur
 EP = Eutektischer Punkt

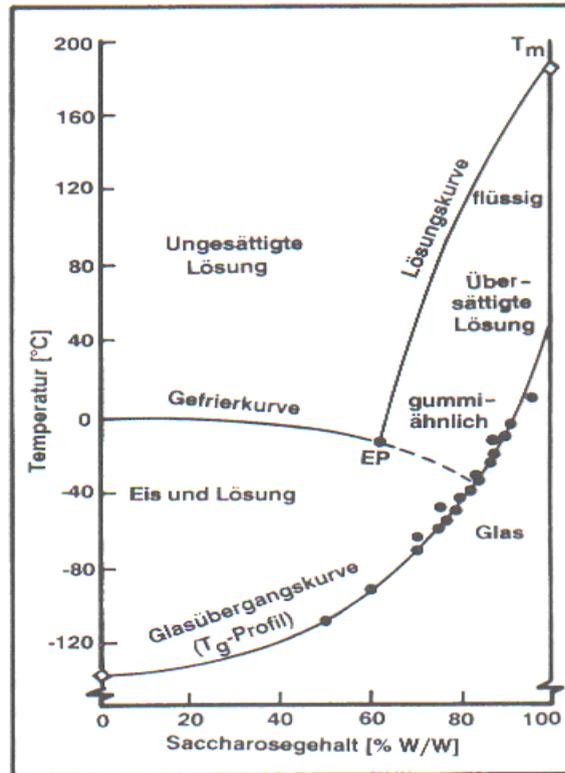


Abb. I-2: Zustandsdiagramm von wässrigen Saccharoselösungen [75].

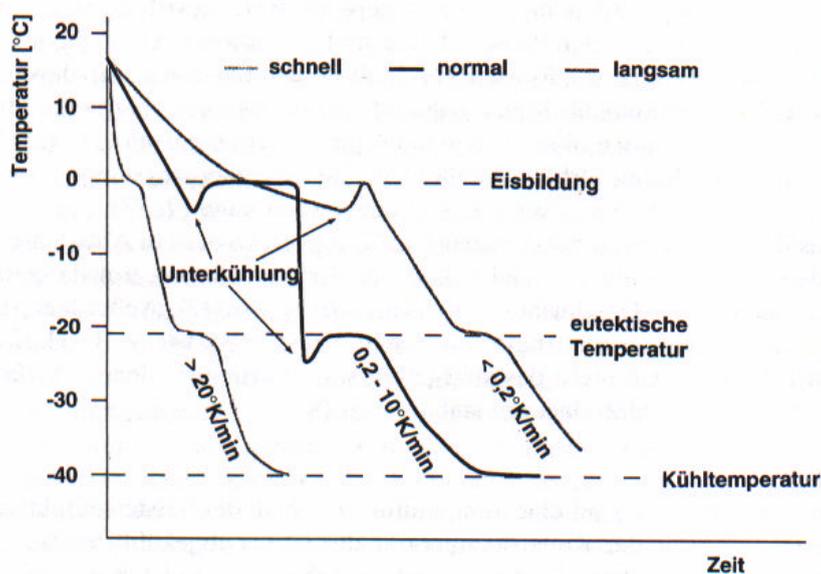


Abb. I-3: Einfrieren bei langsamer, normaler und schneller Abkühlung [75].

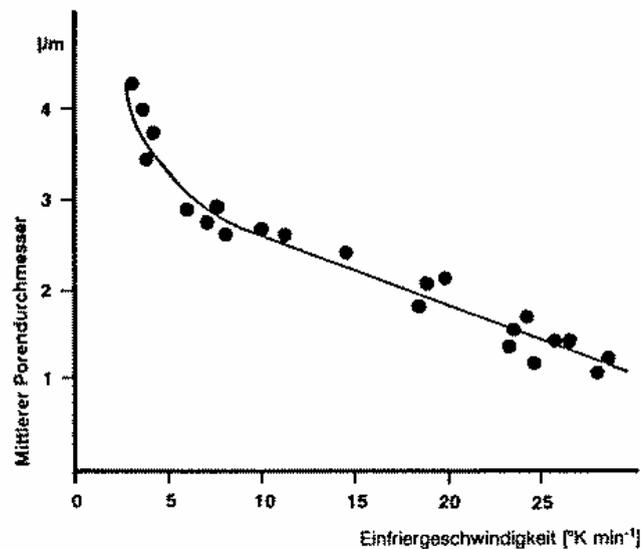


Abb. I-4: Abhängigkeit der mittleren Porendurchmesser gefriergetrockneter Dextrinlösungen von der Einfriergeschwindigkeit [75]

Beim schnellen Abkühlen entstehen kleine Kristalle und eine heterogene Eisstruktur. Die Gefrierkonzentration ist nicht ausgeprägt. Die Bildung amorpher, glasartiger Bereiche wird gefördert. Die Trocknung erfolgt zuerst schnell, wird aber immer langsamer wegen der feinporösen Struktur der bereits getrockneten Anteile.

Bei mittlerer Abkühlgeschwindigkeit werden homogene Eiskristalle gebildet.

Beim langsamen Einfrieren wird die Kristallkeimbildung durch die Unterkühlung verzögert. Nach der Kristallisation bilden sich große Kristalle, die unregelmäßig angeordnet sind, so dass keine geschlossene Oberfläche entsteht, die die Trocknung verlangsamt. Bei sehr langsamer Einfriergeschwindigkeit und deutlicher Unterkühlung kann die Kristallisation aber auch plötzlich einsetzen, sehr schnell verlaufen und zu kleinen Kristallen führen.

Beim Einfrieren von Vials auf Stellflächen ist eine Abkühlgeschwindigkeit von 0,3 bis 5 K/min möglich. Beim „Schockgefrieren“ (Eintauchen in ein Kühlbad mit flüssigem Stickstoff) kann eine Einfriergeschwindigkeit von etwa 160 K/min erreicht werden.

Um dünne Eisschichten zu erzeugen, werden die Gefäße im Kühlbad rotiert und die Flüssigkeit friert an der Wand als gleichmäßige dünne Schicht ein. Bei einem schnell rotierenden senkrecht angeordneten Behälter nennt man das Verfahren „Spin Freezing“, bei einem langsam rotierenden waagrecht angeordneten Behälter „Shell

Freezing“. Die Lösung kann auch durch das Aufsprühen auf die kalte Oberfläche eingefroren werden [23, 82]. Die Folgen des Einfrierens im Kältebad bei $>-60^{\circ}\text{C}$ sind sehr stark ausgeprägte Temperaturgradienten, die zur Gefäßmitte gerichtet sind. Die Lösung friert von außen nach innen schnell und die verbleibende Lösung wird zuerst nach innen und in der Mitte nach oben geschoben. Das gebildete Häutchen schränkt den Wärme- und Stofftransport ein (Abb. I-5).

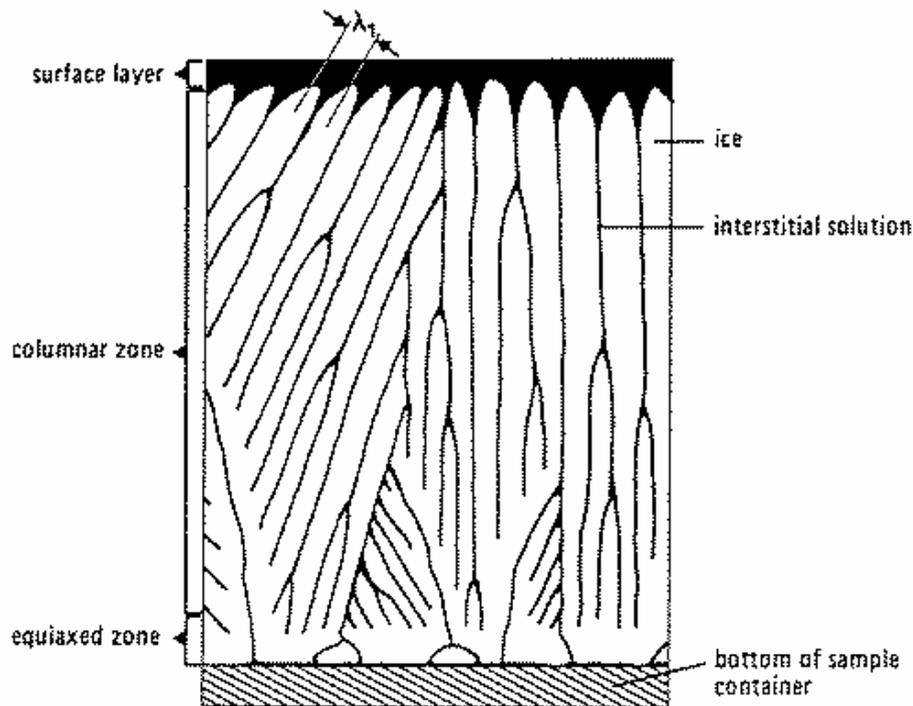


Abb. I-5: Gefrorener Produktkuchen mit Säulenstruktur und Häutchen [39]

„Thermal Treatment“ oder „Annealing“ wird angewendet um amorphes Wasser zur Kristallisation zu bringen [46]. Nach vorsichtiger Erwärmung des Produktes in den Bereich der T_g und folgender Abkühlung bekommen die bereits entstandenen Kristalle die Möglichkeit, weiter zu wachsen. Diese Technik verbessert den Wasserabtransport in der Haupttrocknung.

Beim vakuuminduzierten Einfrieren (engl. „Snap Freezing“) wird die Lösung durch das Anlegen des Vakuums eingefroren [40]. Die Verdampfungs- und Sublimationskälte kühlen die Lösung zuerst bis die Kristallisation einsetzt und dann die eingefrorene Matrix unter die T_c ab. Die Lösung friert zuerst auf der Oberfläche ein. Beim schnellen Evakuieren nicht entgaster Lösungen kann es zum Aufschäumen (engl. „Frothing“) kommen. Das Verdampfen des Wassers in der Einfrierphase kann zur Konzentrationsänderung und damit auch zu chemischen

Reaktionen zwischen den Bestandteilen führen. Die Eissublimation auf der Oberfläche kann häufig bei höheren Temperaturen als der T_c erfolgen. Das führt zu einem Kollaps und der Bildung einer Hautschicht, die den Wasserdampftransport aus den unteren Schichten erschwert. Snap freezing ist geeignet um dünne Lösungsschichten von etwa 3-4 mm Stärke mit relativ hoher T_c einzufrieren.

I 1.1.2 Primärtrocknung

Das Ziel der Primärtrocknung ist es, das gefrorene Wasser aus dem Produkt zu entfernen. Da das Eis unter 0 °C einen Wasserdampfdruck besitzt, wird es durch Sublimation direkt in die Dampfphase überführt (Abb. I-6). Der Wasserdampf kondensiert an der kältesten Stelle des Systems, dem Kondensator.

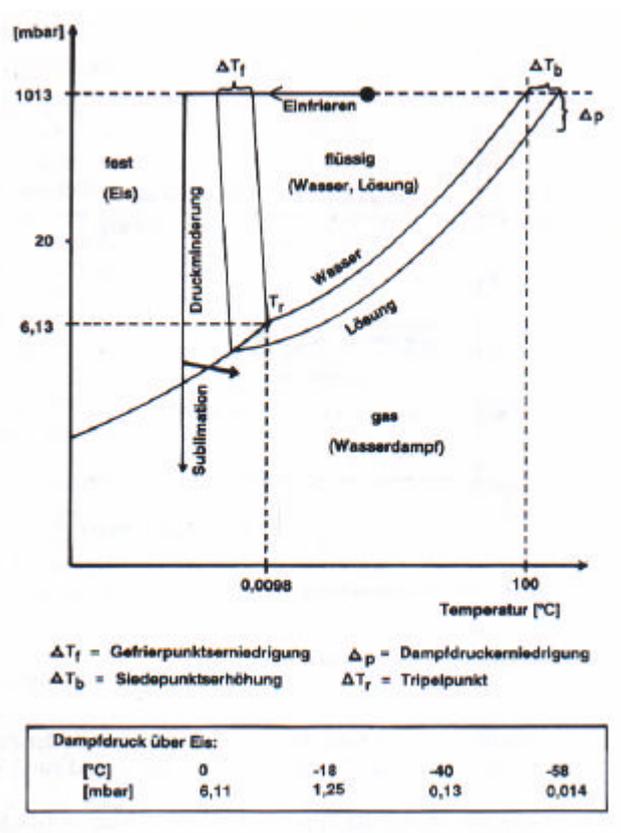


Abb. I-6: Zustandsdiagramm des Wassers und einer wässrigen Lösung und Prozessschritte bei der Gefriertrocknung (nicht maßstäblich) [75]

Die wichtigsten Parameter in der Haupttrocknung bei konventionellen Gefriertrocknungsanlagen sind Produkttemperatur (T_p), Kammerdruck (P_c) und Stellflächentemperatur (T_s).

Die T_p hängt von der Formulierung ab und wird in der Regel knapp unter der Kollapstemperatur (T_c) oder seltener unter der eutektischen Temperatur (T_e) gewählt, um einerseits noch eine ausreichende Energiezufuhr zu sichern und andererseits Schädigungen der Struktur des Lyophilisates und eventuell Aktivitätsverlust bei Proteinen zu vermeiden. Der gewählte P_c soll niedriger sein als der Wasserdampfdruck über dem Eis bei der T_p . Die T_s soll eine entsprechende T_p sicherstellen und hängt vom Wärmetransport von der Stellfläche zum Produkt ab, der überwiegend durch Konvektion erfolgt. Ist das ganze Eis sublimiert, steigt die T_p bis zur T_s an und die Zusammensetzung des Gases in der Trockenkammer ändert sich vom Wasserdampf-Luft/Stickstoff-Gemisch zu fast nur Stickstoff oder Luft. Die Haupttrocknung ist abgeschlossen. Der Endpunkt der Primärtrocknung ist nicht in allen Fällen eindeutig detektierbar.

Trocknungsgeschwindigkeit

Die Primärtrocknung ist meistens die längste Phase der Gefriertrocknung. Die Optimierung der Trocknungsgeschwindigkeit hat eine wirtschaftliche Bedeutung und ist meistens zeitlich und experimentell aufwändig [92]. In der Literatur sind verschiedene Modelle zur Beschreibung der Trocknung vorgestellt [31]. Im Folgenden werden die wesentlichen Grundlagen der Trocknungsgeschwindigkeit nach Pikal beschrieben.

Die treibende Kraft der Sublimation ist das Dampfdruckgefälle bzw. Temperaturgefälle zwischen dem Produkt und dem Kondensator.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{(p_0 - p_c)}{(R_p + R_s)}, \quad \text{(Gl. I-1)}$$

dm/dt – Sublimationsrate, p_0 – Dampfdruck des Eises, p_c – Kammerdruck,
 R_p – Transportwiderstand des getrockneten Produktes,
 R_s – Widerstand des Stopfens auf dem Vial

Da der Dampfdruck von Eis mit der Temperatur exponentiell zunimmt, kann die Trocknungsgeschwindigkeit durch die Erhöhung der Temperatur beschleunigt werden. Der Zusammenhang wird durch die Clausius-Clapeyronsche Gleichung beschrieben (Gl. I-2).

$$\int_{p_1}^{p_2} \frac{dp}{p} = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\Delta H}{RT^2} dT, \quad (\text{Gl. I-2})$$

Um ein Gramm Eis zu entfernen, müssen ca. 650 Kalorien (2700 Joule) an die Sublimationsfront übertragen werden [43]. Die für die Sublimation verbrauchte Energie wird dem Produkt in Form von Wärmeenergie zugeführt. Im System stellt sich ein Pseudo-Steady-State Zustand ein [63, 69]. In diesem Fall bedeutet das, dass die Wärme, die dem Produkt zugefügt wird, und die Wärme, die durch Sublimation entfernt wird, ungefähr gleich sind und dass die Temperaturänderung im Produkt sehr gering ist. Die Sublimationsrate hängt von der zugeführten Wärmemenge ab.

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \cdot \left(\frac{dm}{dt} \right), \quad (\text{Gl. I-3})$$

dQ – Verbrauchte pro Zeit dt Wärmemenge, dm/dt – Sublimationsrate, ΔH_s – Sublimationsenergie

Die Effizienz der Wärmezufuhr hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie Kammerdruck, Sublimationsgeschwindigkeit, Containersystem und Auslegung der Gefriertrocknungsanlage. Der Wärmefluss von den Stellflächen zum Produkt in Vials wird durch Gleichung I-4 beschrieben.

$$\frac{dQ}{dT} = A_v K_v (T_s - T_p), \quad (\text{Gl. I-4})$$

dQ/dt – Wärmefluss von der Stellfläche zum Produkt, A_v – Querschnittsfläche eines Vials, K_v – Wärmeübergangskoeffizient, T_s – Stellflächentemperatur, T_p – Produkttemperatur am Boden des Vials

Der Wärmeübergangskoeffizient besteht aus Anteilen der drei verschiedenen Wärmeübergangsmechanismen.

$$K_v = K_c + K_r + K_g, \quad (\text{Gl. I-5})$$

K_c – Anteil durch direkten Kontakt mit den Stellflächen, K_r – Anteil durch die Strahlung, K_g – Anteil durch Wärmeleitung über die Gasphase

Eine der Möglichkeiten, die Trocknungsgeschwindigkeit zu beschleunigen, ist die Minimierung des Wasserdampftransportwiderstandes. Der Transport des Wasserdampfes durch das trockene poröse Lyophilisat stellt den größten Widerstand dar im Vergleich zum Widerstand der halbgeschlossenen Stopfen und Gaswiderstand in der Trockenkammer (Abb. I-7).

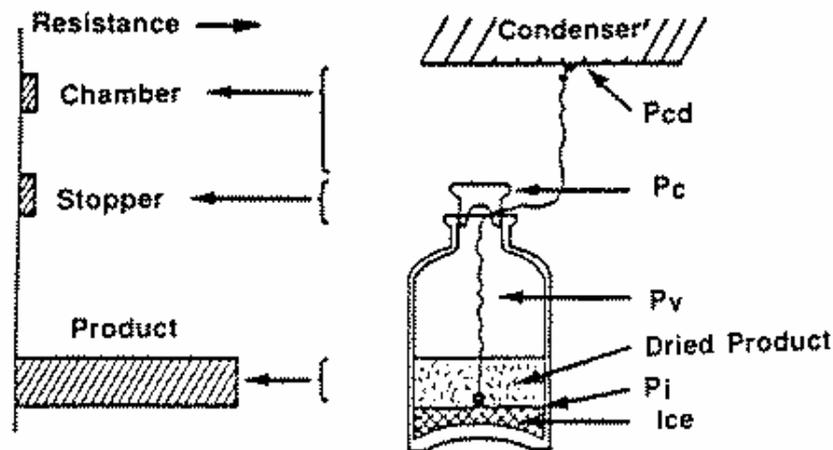


Abb. I-7: Widerstände für den Wasserdampf [69]

Die Diffusion von Gasen durch poröse Festkörper kann durch drei Mechanismen charakterisiert werden. Die Normaldiffusion beschreibt den Stofftransport für den Fall, dass der Porendurchmesser groß ist gegenüber der mittleren freien Weglänge (MFW) der diffundierenden Moleküle. Hier sollen noch zusätzlich zur ungestörten molekularen Diffusion Labyrinth- und Porositätsfaktoren berücksichtigt werden. Ist der Porendurchmesser kleiner als die MFW, kollidieren die Moleküle mit der Porenwand häufiger als miteinander. Diese Diffusion wird als Knudsen-Flow bezeichnet. Der Knudsen-Flow findet dann statt, wenn der Porendurchmesser klein und der Druck sehr niedrig ist [33]. Liegen die Porendurchmesser in der Größenordnung der Moleküldurchmesser, wird der Stofftransport durch eine konfigurale Diffusion beschrieben.

Die Porendurchmesser des Lyophilisationskuchens beträgt typischerweise 15-60 μm . Unter den üblichen Temperatur- und Druckverläufen bei der Gefriertrocknung ist die MFW viel größer als der Porendurchmesser und die Diffusion wird durch den Knudsen-Flow charakterisiert. Der Widerstand des freien Molekularflusses wird durch die Gleichung I-6 beschrieben.

$$R_p = l \frac{t^2}{e} \frac{3}{2} \left(\frac{f}{2-f} \right) \frac{1}{d} \sqrt{\frac{pRT}{2M_1}}, \quad (\text{Gl. I-6})$$

R_p – der Widerstand des freien Molekularflusses für den trockenen Kuchen, l – Dicke der porösen Schicht, e – Porosität, d – Durchmesser der Kapillare, M_1 – Molekulargewicht von Wasser, t – Gewundenheit, f – Akkommodationswahrscheinlichkeit

Der Produktwiderstand hängt außerdem von der Schichtdicke des Kuchens, Art und Konzentration der Bestandteile ab. In Abbildung I-8 sind verschiedene Sublimationsmechanismen dargestellt.

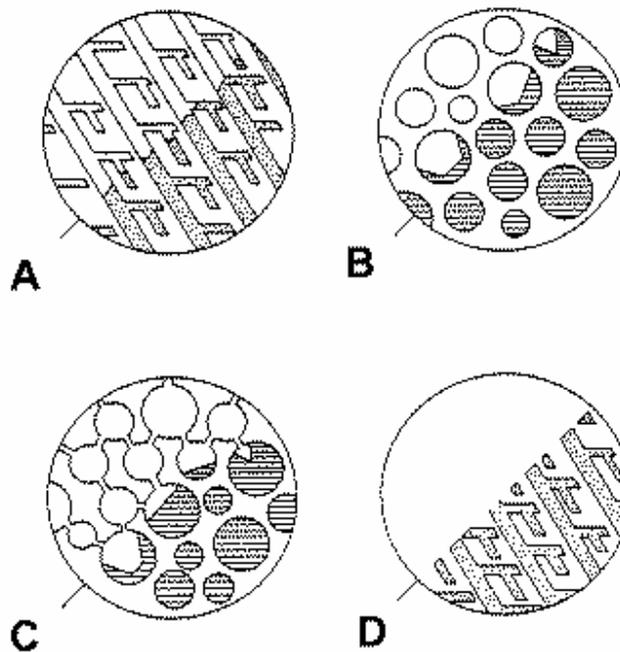


Abb. I-8: Sublimationsmechanismen [74]

A – Direkte Sublimation. Bei eutektischen Gemischen wird der Wasserdampf über Kanäle (engl. "Ice Ghosts") abtransportiert, die sich bilden, wenn das Lösungsmittel verdampft.

B – Diffusion durch die Matrix. Bei amorphen Strukturen diffundiert das molekular eingeschlossene Wasser durch die Hilfsstoffmatrix.

C – Entweichen durch Rissbildung. Bei großem Widerstand der Hilfsstoffmatrix kann es zur Rissbildung kommen.

D – Kollaps. Wenn die Trocknungstemperatur über die Kollapstemperatur ansteigt, kollabiert die Struktur des Lyophilisatskuchens.

Die Porengröße kann ebenso durch den Grad der Unterkühlung beeinflusst werden. Die Abnahme der Eisbildungstemperatur um 1 °C erhöht die Trocknungszeit um etwa 3 % [79]. Sogar bei gut kontrollierten Prozessen kann die Eisbildungstemperatur schwanken. Um die Eisbildungstemperatur zu kontrollieren wurde von Rambhatla et

al eine Eisnebeltechnik entwickelt, bei der die Keime der Lösung von außen zugefügt werden [71].

Der Ausmaß des Wasserdampftransportwiderstandes von Stopfen und Kammer ist weniger ausgeprägt und wird durch Gleichungen I-8 und I-7 beschrieben [69].

$$R_s = (P_v - P_c) / m, \quad (\text{Gl. I-7})$$

R_s – Widerstand von halbgeschlossenen Stopfen, P_v – Gesamtdruck im Vial, P_c – Kammerdruck, m – Sublimationsgeschwindigkeit pro Vial

$$R_c = (P_c - P_{cd}) m N, \quad (\text{Gl. I-8})$$

R_c – Kammerwiderstand, P_{cd} – Druck im Kondensatorraum, N – Anzahl der Vials in der Kammer

I 1.1.3 Sekundärtrocknung

In der Nachrocknung wird das nicht gefrorene Wasser, das oberflächlich adsorbiert oder als Kristall- oder Konstitutionswasser im Feststoff enthalten ist, aus dem Produkt entfernt [64, 65]. Das Ziel der Sekundärtrocknung ist es, den Restwassergehalt des Produktes auf das für die Stabilität optimale Niveau zu bringen, das in einigen Fällen weniger als 1 % ist [92]. Je nach Zusammensetzung können amorphe Stoffe nach der Haupttrocknung 5-30 % Restwasser enthalten [75]. Die Nachrocknung wird meistens bei höheren Temperaturen durchgeführt. Bei amorphen Substanzen soll die Temperaturerhöhung langsam erfolgen um den Kollaps der Struktur zu vermeiden. Die Nachrocknung von amorphen und hochkonzentrierten Substanzen dauert länger und erfordert höhere Temperaturen.

I 1.2 Aufbau einer konventionellen Gefriertrocknungsanlage

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Technik, die in wesentlichen Details erheblich von kontinuierlichen Gefriertrocknungsanlagen abweicht. Um die Unterschiede deutlich zu machen, wird der Aufbau der einzelnen

Baugruppen im Folgenden ausführlich dargestellt. Eine schematische Darstellung einer Gefriertrocknungsanlage ist an Abbildung I-9 gegeben.

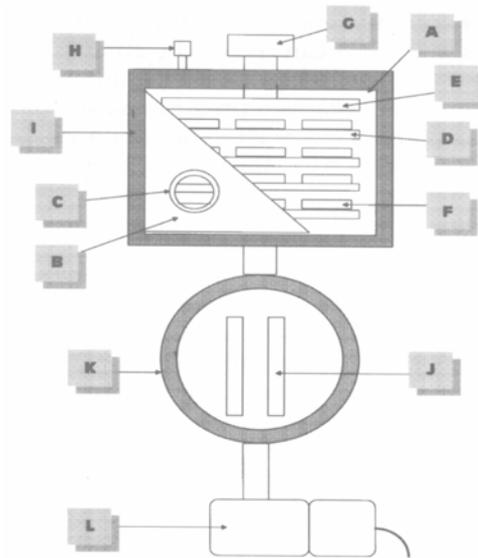


Abb. I-9: Allgemeines Layout des Gefriertrockners [31]

A – Trockenkammer, B – Tür in die Trockenkammer, C – Einsichtsfenster,
D – temperierbare Stellflächen, E – temperierbare Flächen („unusable shalves“),
G – hydraulisches Rammensystem, H – Drucksensor, I – thermische Isolierung,
J – Kondensierbare Flächen in der Kondensatorkammer, K und L - Vakuumpumpensystem

I 1.2.1 Trockenkammer

Die Trockenkammer ist ein Vakuumkessel, in dem das Produkt auf den Stellflächen positioniert wird. Die Trockenkammer soll robust sein, um extreme Temperatur- und Druckdifferenzen zwischen dem Inneren der Kammer und der Umgebung auszuhalten. Damit die für den Prozess notwendigen niedrigen Druckniveaus erreicht werden können, muss die Trockenkammer vakuumdicht sein. Bei Systemen, die für die aseptische Herstellung eingesetzt werden, darf durch potentielle Leckstellen keine Luft eindringen, die auch die mikrobiologische Qualität des Produktes gefährden kann. Außer durch reale Lecks kann das Vakuum auch durch virtuelle Lecks beeinträchtigt werden. Darunter versteht man Lecks, die aus internen Quellen in der Kammer stammen, z.B. Entweichen von Gasen aus Elastomeren oder adsorbierten Gasen an der Oberfläche. Wird die Trockenkammer dampfsterilisiert, müssen alle Innenteile und die Oberflächen mit dem Wasserdampf inert sein. Die Anlage und die Oberflächen sollen leicht zu reinigen sein und leicht das Kondensat abführen. Für die Fertigung des Inneren der Trockenkammer wird am häufigsten 316L Stahl verwendet. Silikone werden für die Abdichtung der Kammer bevorzugt, da

sie eine gute Elastizität bei den hohen und niedrigen Temperaturen aufweisen und für die Dampfsterilisation geeignet sind. Die Trockenkammern werden in drei Formen gebraucht: Glocke mit Grundplatte, rechteckige Kammer oder Zylinder und Tunnel mit rundem Querschnitt [57]. Die glockenförmigen Trockenkammern werden meistens für Laboranlagen verwendet. Sie sind kostengünstig aber nicht heißdampfsterilisierbar. Die Trockenkammern in modernen Gefriertrocknern sind mit Reinigungs- (Cleaning in Place, CIP) und Sterilisationssystemem (Sterilisation in Place, SIP) ausgestattet [95].

Die Größe der Gefriertrocknungsanlage ist oft durch die Stellflächen definiert. Die Stellflächen der kleinen Pilotanlagen haben die Größe von 8 ft² (0,74 m²) bis 36 ft² (3,3 m²), Produktionsanlagen haben Flächen von 120 ft² (11,1 m²) bis 220 ft² (20,4 m²). In der pharmazeutischen Industrie werden seltener Anlagen mit Stellflächen von 400 ft² (37,2 m²) bis 600 ft² (55,7 m²) verwendet [31].

Die Stellflächen haben drei Hauptfunktionen:

- Sicherstellen der erforderlichen Einfriertemperatur
- Zufuhr der Energie in der Trocknungsphase
- Als Verschlussplatten für Vials und Infusionsflaschen

Es ist wichtig, dass die Temperaturunterschiede auf einer Stellfläche und zwischen verschiedenen Stellflächen nicht zu groß werden, um gleiche Trocknungsbedingungen in allen Vials zu gewährleisten. Das ist vor allem bei großen Produktionsvolumina schwierig zu erreichen. Eine serpentinartige Kühl- und Heizrohre innerhalb einer Stellfläche, sowie eine Parallelführung zu verschiedenen Stellflächen sollen die gleichmäßige Temperaturverteilung unterstützen. Die Gleichmäßigkeit der Temperaturverteilung in der Charge hängt auch von der Position der Probe in der Trockenkammer, Beschaffenheit der Oberfläche der Trockenkammer und vom Füllungsgrad der Trockenkammer ab. Es ist bekannt, dass die Proben am Rand der Stellflächen durch die zusätzliche Wärmestrahlung von Wänden bei den höheren Temperaturen getrocknet werden als die Proben, die sich in der Mitte der Stellfläche befinden [70]. Eine zusätzliche Strahlungsquelle können auch unvollständig isolierte Türen oder Fenster darstellen. Oft wird unter der Kammerdecke eine temperierbare aber nicht als Stellfläche nutzbare Platte eingebaut, um die zusätzliche Wärmestrahlung von oben auszugleichen und das Produkt auf den oberen Stellflächen gleichen Temperaturen wie auf den anderen

Stellflächen auszusetzen. Inhomogene Temperaturverteilung innerhalb der Charge kann zu ungleichen Restwassergehalten, unterschiedlichen Trocknungsgeschwindigkeiten und unter Umständen zum Kollaps der Produktstruktur bei einem Teil der Charge führen.

I 1.2.2 Kondensator

Hauptfunktion des Kondensators ist die Entfernung des Wasserdampfes aus dem System. Ein interner Kondensator befindet sich in der Kammer mit den Stellflächen. Bei dieser kompakten Bauweise können Produktions-, Transport- und Installationskosten gespart werden. Die Trocknung verläuft bei dieser Anordnung des Kondensators schneller, weil der Abstand zwischen dem Produkt und Kondensator gering ist. Der Nachteil dieses Kondensatortyps ist die begrenzte Größe und Kapazität. Wenn die Kammer belüftet wird, kann das bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck zum Anstieg des Wasserdampfpartialdruckes und damit zum Anstieg der Restfeuchte im Produkt führen [31].

Externe Kondensatoren befinden sich in einer separaten Kammer und sind besonders praktikabel bei Anlagen, deren Stellflächen über 120 ft² groß sind [31]. Bei hygroskopischen Stoffen kann das vorteilhaft sein, weil der Kondensatorraum vor der Belüftung isoliert werden kann und das Produkt besser vor Feuchtigkeit geschützt ist.

Jennings unterscheidet zwei Haupttypen des Kondensators: Plattenkondensatoren und Spiralkondensatoren. Die Kondensationsfläche eines Plattenkondensators kann durch den Einbau von zusätzlichen Platten erweitert werden. Bei einer unhomogenen Eisverteilung auf Kondensationsflächen können Eisbrücken zwischen den Platten ausgebildet werden, die den Wasserdampftransport aus der Kammer erschweren, was zur Erhöhung des Kammerdrucks und damit auch der Produkttemperatur führt. Dies kann einen Kollaps des Produktes oder Verlängerung der Trocknungszeit zur Folge haben. Spiralkondensatoren werden dagegen aus einem Rohr gefertigt und sind weniger gefährdet hinsichtlich der potentiellen Leckstellen.

An Kondensatoren werden folgende Anforderungen gestellt [57]:

1. Die Oberfläche des Kondensators muss genügend groß sein, so dass die sich bildende Eisschicht den Wärmedurchgang von der Eisoberfläche durch die Eisschicht nicht wesentlich behindert. Die Wärmeleitfähigkeit des Eises ist von seiner Struktur abhängig und beträgt für dichtgefrorenes Eis 6,3 kJ/m K h. Bei

einem schneeartigen Eis reduziert sich die Wärmeleitfähigkeit um eine Zehnerpotenz. Jennings gibt als allgemeine Regel an, dass die Oberfläche des Kondensators größer als die Stellfläche des Produktes sein soll [31].

2. Damit die Kondensation gleichmäßig über die gesamte Kühlschlange erfolgt soll die Temperaturdifferenz des Kühlmittels am Ein- und Ausgang möglichst klein sein.
3. Die Permanentgase sammeln sich an den tiefsten Stellen des Kondensators, stören die Kondensation des Wasserdampfes und fördern die Bildung vom Schneeeis. Sie müssen nach Möglichkeit abgesaugt werden.
4. Um die Trocknungsgeschwindigkeit nicht zu beeinträchtigen, soll der Diffusionsweg der Wassermoleküle in der Dampfphase kurz, weit und gerade sein [57].

Je nach Art des Kühlmittels und des verwendeten Kompressors, kann der Kondensator auf unterschiedlich tiefe Temperaturen abgekühlt werden. Mit konventionellen Kühlmitteln können Temperaturen zwischen -45°C und -100°C , mit flüssigem Stickstoff auch -70°C bis ca. -150°C erreicht werden.

I 1.2.3 Vakuum- und Belüftungssysteme

Laut Oetjen hat das Vakuumsystem zwei Hauptfunktionen [57]:

- den Luftpartialdruck in der Trockenkammer und am Kondensator zu erniedrigen
- die Permanentgase und nicht kondensierbare Gase, die in die Kammer durch reale oder virtuelle Lecks gelangt sind, und die aus dem Produkt frei werdende Gase zu entfernen.

Am häufigsten werden in Gefriertrocknungsanlagen Drehschiebervakuumpumpen und Rootspumpen verwendet [78]. Die Leistung der Pumpe wird durch den erreichbaren Enddruck und die Evakuiergeschwindigkeit bestimmt. Um die Saugleistung zu erhöhen, werden zweistufige Pumpen oder eine Kombination aus Vorpumpe und Drehkolbenpumpe eingesetzt. Die ölgedichteten Pumpen haben den Nachteil, dass eine gewisse Menge Öldampf gegen den Luftstrom in die Kammer diffundieren kann. Diese Kontamination des Produktes kann zur Gefährdung der mikrobiologischen Qualität und zu chemischen Veränderungen des Produktes führen. Nach Jennings ist die Ölrückströmung vom Kammerdruck und von der Betriebstemperatur der Pumpe abhängig. Höhere Betriebstemperaturen der

Vakuumpumpen fördern nicht nur den Dampfdruck des Öls sondern auch seine Zersetzung. Um die Ölrückströmung zu eliminieren werden Vorpumpen, Abscheider, Absorptionsfallen, sowie auch die Trockenläufer-Pumpen eingesetzt.

Die Belüftungssysteme dienen [78]:

- zum Dosieren von Gasen zur Druckregelung während des Trocknungsvorgangs
- zur spezifischen Druckanpassung für den Stopfenverschluss
- zur Druckangleichung / Belüftung am Ende des Trocknungsvorgangs.

Die Belüftung kann mit unterschiedlichen Gasen erfolgen, z.B. mit steriler Luft oder Stickstoff.

I 1.3 Prozessüberwachung

Die wichtigsten Kontrollparameter der Gefriertrocknung sind Temperatur, Druck und Zeit. Man unterscheidet zwischen den abhängigen und unabhängigen Variablen. Zu den unabhängigen Variablen der konventionellen Gefriertrocknung gehören Zeit, Stellflächentemperatur und Kammerdruck. Die abhängigen Variablen (z.B. Produkttemperatur) werden durch die Änderung der Prozessbedingungen und unabhängigen Variablen beeinflusst. Die Messung der oben genannten Parameter liefert allerdings nicht immer die notwendige Information über den Prozess. Die Produkttemperatur, z.B., wird nur in einem Vial gemessen, das nicht unbedingt für die ganze Charge repräsentativ ist. Die Thermoelemente, die in Vials eingebracht werden, können den Kristallisationsprozess beeinflussen und stellen bei aseptisch hergestellten Produkten ein Risiko dar. Deshalb werden auch alternative Techniken in Betracht gezogen, die eine Endpunktbestimmung von Haupt- und Sekundärtrocknung, sowie eine direkte und indirekte Information über Produkteigenschaften erlauben. Im Folgenden werden einige Möglichkeiten zur Prozessüberwachung in der Gefriertrocknung vorgestellt.

I 1.3.1 Druckmessung

Pirani-Röhre

Das Messprinzip der Pirani-Röhre basiert auf der Wärmeleitfähigkeit von Gasen. Ein schematischer Aufbau des Pirani-Rohrs ist in Abbildung I-10 dargestellt.

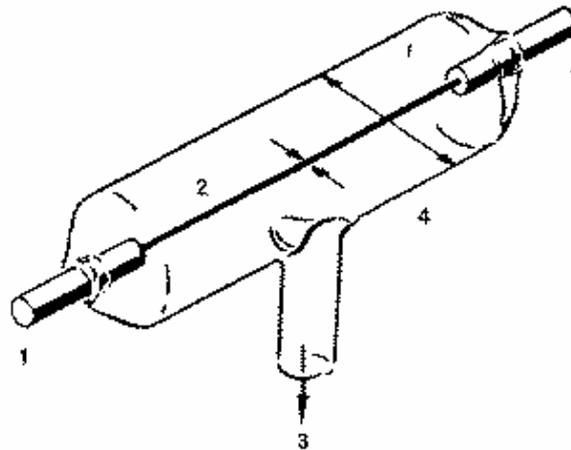


Abb. I-10: Wärmeleitungsvakuummeter (Pirani-Rohr) [57]

1 – Drahtaufhängung, 2 – Draht ($d = 5$ bis $20 \mu\text{m}$), 3 – Anschluss, 4 – Gehäuse

Der Draht wird elektrisch beheizt und gibt Wärmeenergie an das Gas ab, das ihn umgibt. Seine Temperatur wird konstant gehalten. Die Stromstärke und damit die abgegebene Wärmemenge, ist dem Gasdruck proportional, hängt aber auch von der Zusammensetzung des Gases ab. Das Gerät wird in der Regel mit Stickstoff oder Luft kalibriert. Da in der Trocknungsphase die Gasphase in der Kammer überwiegend aus Wasserdampf besteht, der eine zwei Mal größere Wärmekapazität als Stickstoff besitzt, werden oft höhere Messwerte angezeigt [39].

Kapazitives Manometer

Der schematische Aufbau des kapazitiven Manometers ist der Abbildung I-11 zu entnehmen.

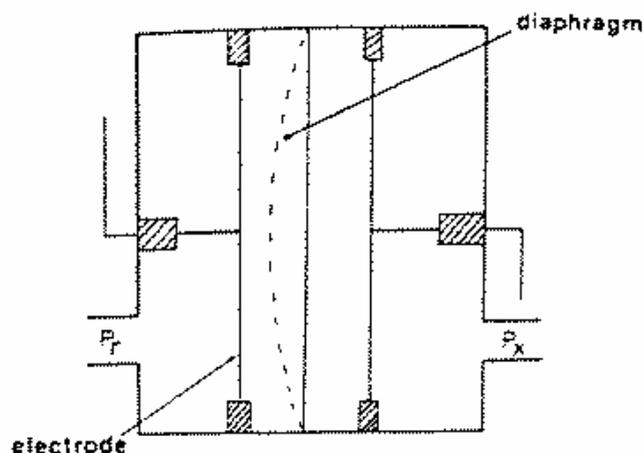


Abb. I-11: Kapazitives Manometer (schematische Darstellung) [39]

Eine flexible Membran befindet sich zwischen zwei Kondensatorplatten. Durch die Einwirkung des Gasdrucks deformiert sich die Membran. Die Durchbiegung der Membran führt zur Änderung der Kapazität des Kondensators, die dem Druck proportional ist. Die Messung ist unabhängig von der Gasart.

I 1.3.2 Temperaturmessung

Widerstandsthermometer

Dem Messprinzip liegt eine temperaturabhängige elektrische Widerstandsänderung der Metalle zugrunde. Die Selbsterwärmung dieser Thermometer kann die Produkttemperatur erhöhen.

Thermoelemente

An der Anschlussstelle von zwei miteinander verbundenen Metallen entsteht bei einem Temperaturgefälle eine thermoelektrische Spannung. Diese Spannung ist temperaturabhängig. Thermoelemente sind klein und nicht selbsterwärmend.

Barometrische Temperaturmessung (BTM)

BTM ist eine berührungslose Temperaturmessung während der Trocknungsphase. Das Ventil zwischen der Trockenkammer und dem Kondensator (Abb. 19) wird für eine kurze Zeit geschlossen. Der Druckanstieg in der Trockenkammer wird in definierten Zeitabständen aufgenommen und daraus die Temperatur an der Sublimationsoberfläche berechnet. Er hängt von den Trocknungsbedingungen, dem Gefriertrocknertyp, sowie Art und Anzahl der Proben ab. Die Messung liefert keine Information über die Temperatur in einzelnen Proben, sondern nur über das Gesamtsystem [55]. Tang et al. untersuchte die BTM bei heterogenen Produkttemperaturen und stellte fest, dass die durch BTM bestimmte Temperatur immer annähernd der kältesten Produkttemperatur im Gefriertrockner entspricht [91].

IR-Thermometer

IR-Sensoren bieten eine Möglichkeit, die Oberflächentemperatur des Produktes berührungslos zu messen. Im Wellenlängenbereich von 0,7 μm bis 18 μm emittiert jeder Körper Wärmestrahlung, die von einem IR-Sensor registriert wird. Die IR-Sensoren werden hauptsächlich für die Messung von höheren Temperaturen, wie z.B. bei der Herstellung von Legierungen, verwendet. Die in der letzten Zeit entwickelten empfindlichen Sensoren erlauben Temperaturmessungen auch bei niedrigeren Temperaturen (bis -40°C) und können damit auch in der Gefriertrocknung eingesetzt

werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass bei der Messung die Hintergrundstrahlung miterfasst wird und dass bei Lyophilisaten in Flaschen oder Vials nur die Glastemperatur bestimmt wird [68].

I 1.3.3 Wägesysteme

Ein Wägesystem dient dem online Monitoring des Trocknungsverlaufes. Die kontinuierliche Aufnahme des Probengewichtes erlaubt Rückschlüsse auf die Prozessgeschwindigkeit und das Prozessende und kann für die Optimierung der Trocknungszyklen eingesetzt werden. Das Gerät ist aber nicht sterilisierbar und kann nicht bei der aseptischen Herstellung verwendet werden [74].

I 1.3.4 Kalorimetrisches Monitoring

Jennings entwickelte eine kalorimetrische Überwachungsmethode für die Gefriertrocknung [31, 32]. Dabei kann die Wärmeübergangszahl und die Gesamtenergie für jeden Schritt des Prozesses bestimmt werden. Die Methode liefert online kalorimetrische Information, die eine Aussage über Trocknungsgeschwindigkeit und genaue Endpunkterkennung der Haupt- und Sekundärtrocknung erlaubt. Der Sensor besteht aus einem leeren Referenzgefäß und einem mit der Probe gefüllten Gefäß, die beide Thermoelemente enthalten. Um die Wärmeübertragungszahl und die Gesamtenergie während der Gefriertrocknung zu bestimmen, wird der Sensor kalibriert und die Wärmeübergangskoeffizienten in der Einfrierphase und in der Trocknungsphase bestimmt.

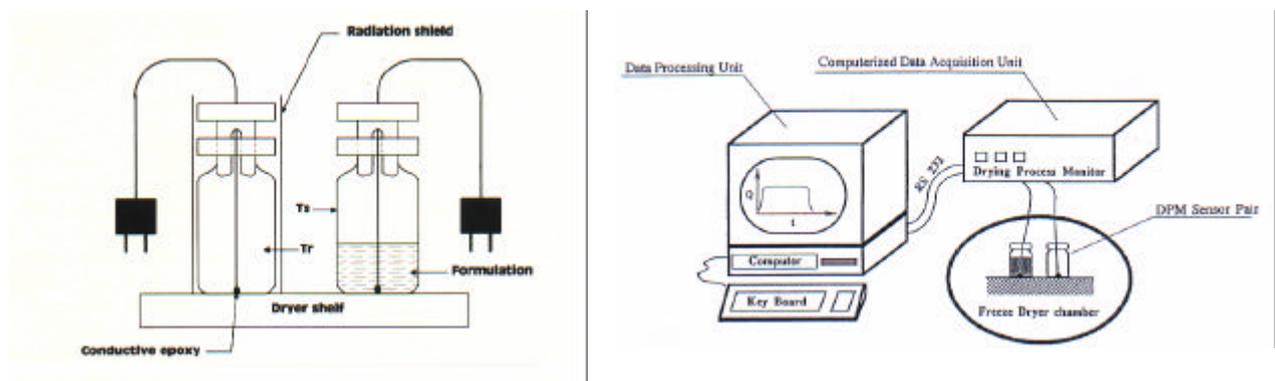


Abb. I-12: Schematischer Apparatenaufbau für das kalorimetrische Monitoring der Gefriertrocknung [31, 32]

I 1.3.5 Feuchtesensor

Das Gerät misst die Änderung des dielektrischen Verlustfaktors in einem Kondensator. Steigt der Wasserdampfpartialdruck in der Trockenkammer, so sinkt der dielektrische Verlustfaktor. Die Korrelation zwischen dem dielektrischen Verlustfaktor und der relativen Restfeuchte erlaubt die Verwendung dieses Gerätes als Feuchtesensors. Der Nachteil des Gerätes besteht darin, dass das Ergebnis temperaturabhängig und damit auch die Kalibrierung aufwändig ist. Trotz dieses Nachteils ist das Meßsystem empfindlich genug, um den Endpunkt der Haupttrocknung zu detektieren [31].

I 1.3.6 „Windmill Device“

Das Messprinzip nutzt die Stärke des Wasserdampfstroms aus. Das Gerät besteht aus empfindlichen Windrädchen, die in den Wasserdampfstrom eingebracht werden. Die Drehgeschwindigkeit der Windräder hängt von der Strömungsgeschwindigkeit und der Menge des Wasserdampfes ab [31]. Das Instrument kann entweder über den Vials angebracht werden, oder, wenn der Querschnitt zwischen der Trockenkammer und dem Kondensator verengt ist, in dieser Öffnung eingesetzt werden. Im letzten Fall kann die Trocknungsgeschwindigkeit beeinträchtigt werden. Die rotierenden Teile des Gerätes schließen seine Anwendung bei der aseptischen Herstellung aus [68].

I 1.3.7 Restgasanalyse

Mittels Massenspektroskopie wird die Zusammensetzung der Gasatmosphäre in der Trockenkammer bestimmt. Die Methode ist für die Bestimmung des Partialwasserdampfdrucks empfindlicher als Feuchtesensoren oder kapazitive Manometer und ist sowohl für Trocknungsüberwachung als auch für die Endpunktbestimmung der Haupt- und Sekundärtrocknung sehr gut geeignet. Wegen der hohen Kosten und der komplizierten Auswertung der Ergebnisse wird das Meßsystem allerdings nicht oft für die Trocknungsüberwachung eingesetzt. Eine andere Einsatzmöglichkeit in der Gefriertrocknungstechnik sind die Suche nach realen und virtuellen Leckstellen, sowie Ölrückströmungen [31].

I 1.3.8 Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS)

NIRS bietet eine Möglichkeit, Untersuchungen an Stoffen schnell, zerstörungsfrei und ohne Probenvorbereitung durchzuführen. Seit der Anwendung der multivariaten chemometrischen Analyse sind auch quantitative Untersuchungen sowohl von chemischen als auch von physikalischen Parametern von Stoffen mittels NIRS möglich [6, 72, 73, 84].

In der pharmazeutischen Industrie wird NIRS für die Identitäts- und Qualitätskontrolle sowie für die Prozess-Überwachung und online-Gehaltsbestimmung eingesetzt.

Mit der Publikation der FDA-Initiative „Process Analytical Technology“ (PAT) nimmt die Bedeutung der NIRS weiterhin zu. NIRS ist eine der wichtigsten Instrumente der PAT. Sie erlaubt atline- (die Probe wird vom Prozess isoliert und in der Prozessumgebung analysiert), inline- (die Probe wird vom Prozess abgezweigt, analysiert und ggf. zurückgeführt) und online- (die Probe wird im laufenden Prozess analysiert) Messungen und kann bei der Umstellung auf parametrische oder zeitliche Freigabe behilflich sein.

Eine Reihe der Forschungsarbeiten bestätigen die Eignung der NIRS für die Restfeuchtebestimmung von Lyophilisaten als eine Alternative zur Karl-Fischer-Titration [34, 45, 49, 51, 72, 76, 83]. Kürzlich wurden auch Arbeiten über die Prozessüberwachung durch NIR in der Gefriertrocknung publiziert [7, 68, 72, 85]. Die Messungen wurden durch die Seitenwand, durch den Boden des Vials oder mit einem in das Vial eingeführten NIR-Sensor im Reflexion-Modus durchgeführt. Dabei treten aber Probleme auf, die durch die geringe Eindringtiefe des NIR-Strahls, inhomogene Feuchteverteilung im Produkt während der Trocknung oder Annahme einer Messstelle in der Trockenkammer, die nicht für die Charge repräsentativ ist, verursacht werden.

Brülls et al. publizierten Untersuchungen über die Überwachung des Gefriertrocknungsprozesses [7]. Der NIR-Sensor wurde in den Vials 1 mm über dem Boden angebracht. Als Modellformulierung diente PVP-Lösung. Mittels NIRS war es möglich die Unterkühlung, den Endpunkt der Eiskristallbildung, sowie den Endpunkt der Haupt- und Sekundärtrocknung zu detektieren. Die Ergebnisse waren sehr gut mit der Produkttemperatur korrelierbar und lieferten mehr Information über den Prozess als die bloße Betrachtung des Temperaturverlaufs. Die Desorptionsgeschwindigkeit und der Steady-state-Zustand, bei dem die Trocknung

abgeschlossen ist, könnten mittels NIRS viel präziser bestimmt werden. Der Nachteil dieser Methode ist eine mögliche Beeinflussung der Kristallbildung und der Trocknung durch die NIR-Sonde.

Presser untersuchte ebenfalls die Möglichkeit der Online-Feuchteverfolgung in Lyophilisaten mittels NIRS. Die Reflexions-Messungen wurden durch die Seitenwand des Vials durchgeführt. Nach der Kalibrierung der Methode korrelierten die Messergebnisse gut mit den Referenzwerten. Die Abweichungen in der relativen Restfeuchte betragen zwischen 0,4 % und 1 % und waren auf inhomogene Feuchteverteilung im Produkt zurückzuführen. Wegen der geringeren Eindringtiefe war der Endpunkt der Primärtrocknung nicht eindeutig detektierbar. Außerdem stellte er eine leichte Temperaturabhängigkeit der Spektren fest [68].

Sukowski et al ersetzte die Restfeuchtebestimmung von einzelnen Proben mittels Karl-Fischer Titration durch eine in-line Inspektion der kompletten Charge mittels NIR [85]. Die Messungen wurden durch den Vialboden durchgeführt.

I 2. Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS) – eine neue Arzneiform für die Augenheilkunde

I 2.1 Problematik der konventionellen Augentropfen

Etwa 92 % aller Augenarzneimittel sind wässrige Lösungen oder Suspensionen. Trotz einer breiten Anwendung sind Augentropfen eine problematische Arzneiform. Um die Verträglichkeit zu verbessern, sollen die wässrigen Augentropfen isotonisch und isohydrisch sein. Der schmerzfreie Bereich liegt im pH-Intervall zwischen 7,0 und 9,0 und bei einer Osmolalität zwischen 250 und 300 mosmol/kg. Da viele Arzneistoffe in diesem Bereich nicht ausreichend stabil sind, liegt bei vielen Augentropfen zahlreicher Arzneimittelhersteller der eingestellte pH-Wert weit unterhalb des physiologischen Bereiches [41].

Das Volumen der Tränenflüssigkeit beträgt unter normalen Bedingungen ca. 7 μL , wovon 1 μL auf den präcornealen Tränenfilm und etwa 3 μL auf jeden Randmeniskus entfallen. Bei der Anwendung von Augentropfen werden je nach Arzneimittel ca. 20 μL bis 50 μL Flüssigkeit appliziert. Die Applikation von solchen Volumina löst einen reflexbedingten Wimpernschlag aus, der den Abfluss des Wirkstoffes über den Tränen-Nasengang und damit das Risiko von systemischen Nebenwirkungen erhöht. Gelegentlich fließt ein großer Anteil der Lösung über die Wange ab. In diesem Fall werden Augentropfen oft unterdosiert. Je größer das applizierte Volumen ist, desto größer ist die Abflussrate über den Tränen-Nasengang [97]. Die systemischen Nebenwirkungen können besonders bei der Anwendung von beta-Blockern bei Asthmapatienten kritisch sein [10].

Da der Kopf bei der Verabreichung von Augentropfen nach hinten rekliniert werden muss, haben besonders ältere Patienten oft Probleme, die Applikation ohne Hilfe richtig durchzuführen. Der Kontakt der Tropferspitze mit der Cornea während der Applikation kann Verletzungen und Schmerzen verursachen. Oft wird der Tropfen auf die Wange aufgebracht oder statt einem Tropfen werden mehrere appliziert. Viele Patienten berühren bei der Applikation die Tropferspitze mit Finger, Wimpern, Augenlidern oder Bindehaut. Das führt zur mikrobiellen Kontamination der Tropferspitze und der ganzen Lösung.

Die mikrobiologische Qualität der Augentropfen wird durch Konservierungsmittel sichergestellt. Diese reizen Bindehaut und Hornhaut [14, 94]. Ihre Anwendung kann nur durch das positive Nutzen/Risiko-Verhältnis gerechtfertigt werden, denn die Folge einer Infektion wiegt meist schwerer als die Veränderungen, die durch Konservierungsmittel verursacht werden [17]. Außerdem müssen Unverträglichkeiten der Konservierungsmittel mit Wirkstoffen, Behältnissen, Verschlussmaterialien und auch das pH-Optimum ihrer Wirkung beachtet werden.

Mehrere Versuche wurden vorgenommen, um ein oder gleichzeitig mehrere Probleme der Augentropfenanwendung zu lösen. Dazu gehören z. B.

- Einzeldosisophthiolen, und das COMOD-System, die keine Konservierungsmittel enthalten;
- Doppelkammerbehälter (wie Timpilo[®]), bei dem der pH-Wert während der Lagerung etwa 3 beträgt und vor der Anwendung mit der Pufferlösung auf 6,6 eingestellt wird;
- Inserte [18, 86] (zu denen auch New Ophthalmic Delivery System, NODS oder auch Ocuser[®] gehören), die die Verweildauer des Wirkstoffes am Applikationsort verlängern

Um die Nachteile der Augentropfenanwendung zu eliminieren, wurden am Lehrstuhl für pharmazeutischen Technologie der Universität Bonn als neue Arzneiform Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS) entwickelt.

I.2.2 OLCS - Charakterisierung der Arzneiform

OLCS ist ein einzeldosiertes konservierungsmittelfreies Applikationssystem für die Augenheilkunde, das aus einem gefriergetrockneten Tropfen, einer hydrophoben Trägermembran und einem Handgriff besteht (Abb. I-13) [87, 88, 89].

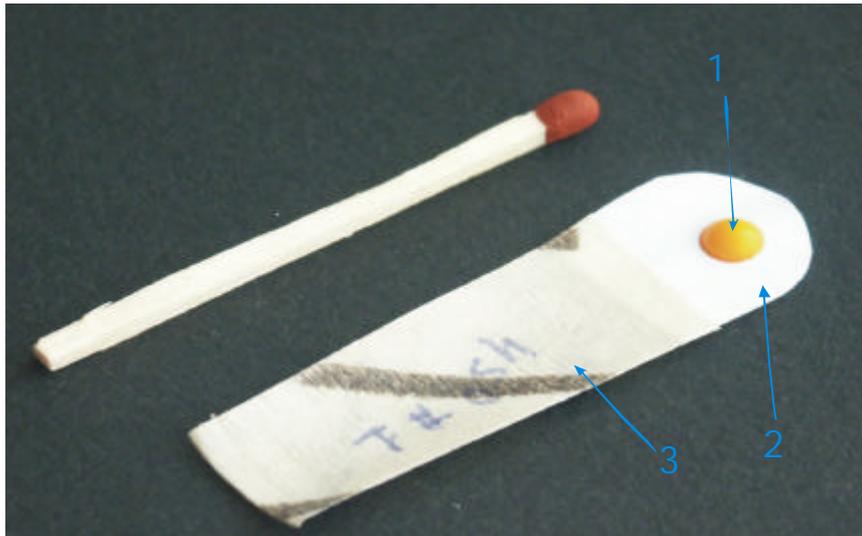


Abb. I-13: OLCS

1 – Gefriergetrockneter Tropfen, 2 – PTFE-Membran, 3 – Papierträger

Der lyophilisierte Tropfen enthält ein Polymer (Gelbildner), wenn nötig einen niedrigmolekularen Gerüstbildner, und einen oder mehrere Wirkstoffe, die gelöst, aber auch dispergiert oder suspendiert vorliegen können. Nach dem Kontakt mit der Tränenflüssigkeit bildet das Polymer ein Gel und verlängert damit die Wirkstofffreisetzung. Reicht die eingesetzte Menge an Polymer für eine stabile Lyophilisatstruktur aus, so übernimmt das Polymer gleichzeitig die Funktion eines Gerüstbildners. Wenn das nicht der Fall ist, muss zusätzlich eine ausreichende Menge an Strukturbildnern zugesetzt werden. Grunthal untersuchte die Eignung von Polymeren wie Gelatine, Hyaluronsäure, Hypromellose, Polyvinylpyrrolidon und Polyvinylalkohol für die Herstellung von OLCS und die Eigenschaften von verschiedenen Folien. Alle von untersuchten Polymere waren für diesen Zweck gut geeignet. Die PTFE-Folie zeigte die geringste Gesamtoberflächenspannung von allen untersuchten Folien [24]. Sie ist chemisch inert, physiologisch unbedenklich und im Temperaturbereich von -200 °C bis $+250\text{ °C}$ stabil [52]. Der Papierhandgriff dient der besseren Handhabung während der Applikation.

Bei der Applikation wird das Lyophilisat zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten. Der Zeigefinger befindet sich an der dem Auge abgewandten Seite der Folie hinter dem Tropfen. Das Unterlid wird leicht nach unten gezogen und der Tropfen wird durch das Abstreifen über die Unterlidkante in den Bindehautsack appliziert. Das Lyophilisat wird durch die Tränenflüssigkeit aufgelöst und der Wirkstoff freigesetzt (Abb. I-14).



a. Position des Daumens und Zeigefingers vor der Applikation



b. 1 Minute nach Applikation (Foto S. Dinslage)

Abb. I-14: Applikation von OLCS

Das Applikationssystem hat eine Reihe von Vorteilen gegenüber traditionellen Augentropfen. Einige sind auf den niedrigen Wassergehalt der Lyophilisate zurückzuführen, wie z.B.:

- Konservierungsmittelfreiheit
- Bessere chemische Stabilität besonders für hydrolyseempfindliche Stoffe
- Bessere topische Verträglichkeit, da der pH-Wert und die Osmolalität nicht eingestellt werden müssen

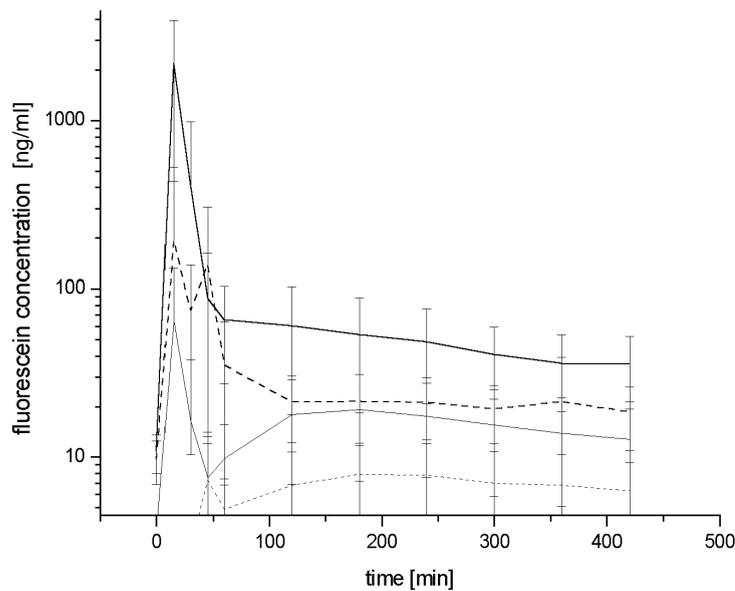
Weitere Vorteile sind:

- Präzise Dosierung. Durch das Einbringen der exakten Einzeldosis wird die Überdosierung durch mehrfaches Eintropfen, das Auslaufen des Wirkstoffes durch überschüssiges Flüssigkeitsvolumen, sowie auch der Einfluss der Viskosität, der Oberflächenspannung und der Eigenschaften des Tropfers auf das Volumen des applizierten Tropfens ausgeschlossen.
- Einfachere und sichere Anwendung. Die Applikation der Lyophilisate fordert keine Reklination des Kopfes und kann in sowohl aufrechter als auch liegender Körperhaltung durchgeführt werden. Durch die weiche und flexible Trägermembran ist das Risiko von mechanischen Schädigungen am Auge sehr gering.
- Reduzierte systemische Nebenwirkungen. Da kein zusätzliches Flüssigkeitsvolumen eingebracht wird, wird der Abfluss des Wirkstoffes durch den Tränennasengang vermindert.

- Bessere Bioverfügbarkeit. Durch den Einsatz von viskositätserhöhenden Polymeren kann die Kontaktzeit mit der Cornea verlängert werden und dadurch die Resorption verbessert werden.

Die Verträglichkeit von Hypromellose-OLCS wurde im Vergleich mit konventionellen Augentropfen (Lacrisic[®], Alcon-Thilo, D-Freiburg) getestet. Die Studie zeigte keinen signifikanten Unterschieden zwischen beiden Arzneiformen [90].

In klinischen Studien mit OLCS, die 68 µg Fluorescein enthielten, wurde die Fluorescein-Konzentration in Cornea und Vorderkammer gemessen. Dinslage verglich die Konzentrationen in den ersten drei Stunden nach der Applikation. Sowohl in der Cornea als auch in der Vorderkammer war die Konzentration nach der Verabreichung von Lyophilisaten signifikant höher [12]. Steinfeld untersuchte die Bioverfügbarkeit in den ersten 30 min nach der Applikation und die Langzeitbioverfügbarkeit 12 Stunden nach der Verabreichung. Die mittlere Konzentration in Cornea war nach der Verabreichung von OLCS 4 Mal höher nach 2 min, 16 Mal höher nach 14 min und 5 Mal höher nach 30 min. Die Konzentration in der Vorderkammer war bei OLCS nach 14 min 6 Mal höher. Die Ergebnisse der Langzeitbioverfügbarkeit zeigten, dass nach der Applikation von OLCS die mittlere Konzentration in der Vorderkammer bis zu 8 Stunden und in der Cornea bis zu 12 Stunden signifikant höher war. Lux untersuchte die Bioverfügbarkeit von fluoresceinhaltigen OLCS mit 204 µg im Vergleich zur Applikation von drei Tropfen einer wässrigen konservierungsmittelfreien Fluoresceinlösung, die 68 µg Farbstoff zum Antropfen enthielt, im Abstand von 15 min. Die mittlere Bioverfügbarkeit in der Cornea war nach der Applikation der Lyophilisate 11 Mal höher und in der Vorderkammer war die Konzentration im Mittel fast 9 Mal höher als nach der Gabe von konventionellen Augentropfen [50].



- Mittlere Fluoresceinkonzentration in der Cornea nach der Verabreichung von OLCS (68 µg Fluorescein pro OLCS)
- Mittlere Fluoresceinkonzentration in der Vorderkammer nach der Verabreichung von OLCS (68 µg Fluorescein pro OLCS)
- - - - - Mittlere Fluoresceinkonzentration in der Cornea nach der Verabreichung von drei konventionellen Augentropfen (68 µg Fluorescein pro Tropfen)
- · - · - · - Mittlere Fluoresceinkonzentration in der Vorderkammer nach der Verabreichung von drei konventionellen Augentropfen (68 µg Fluorescein pro Tropfen)

Abb. I-15: Bioverfügbarkeit von Fluorescein-OLCS [90]

I 2.3 Qualitätsrelevante Parameter der OLCS

Um die pharmazeutische Qualität einer Arzneiform sicherzustellen, muss sie den Anforderungen der Arzneibuchmonographie oder der Zulassungsspezifikation entsprechen. Einige OLCS-Qualitätsparameter sind untersucht worden und für einige wurden die Spezifikationsgrenzen angegeben. Die wichtigsten Qualitätsparameter der OLCS und deren mögliche Einflussfaktoren sind als Ishikawa-Modell in Abbildung I-16 dargestellt.

Als eine Arzneiform zur Anwendung am Auge muss OLCS den allgemeinen Anforderungen des EuAB für Augenarzneimittel entsprechen [16]. Diese Anforderungen sind Sterilität, Gleichförmigkeit des Gehaltes und der Masse und Freiheit von Partikeln im gelösten Zustand. Bei Suspensions-OLCS muss selbstverständlich die Anforderung an die Teilchengröße nach Auflösung des Lyophilisates eingehalten werden.

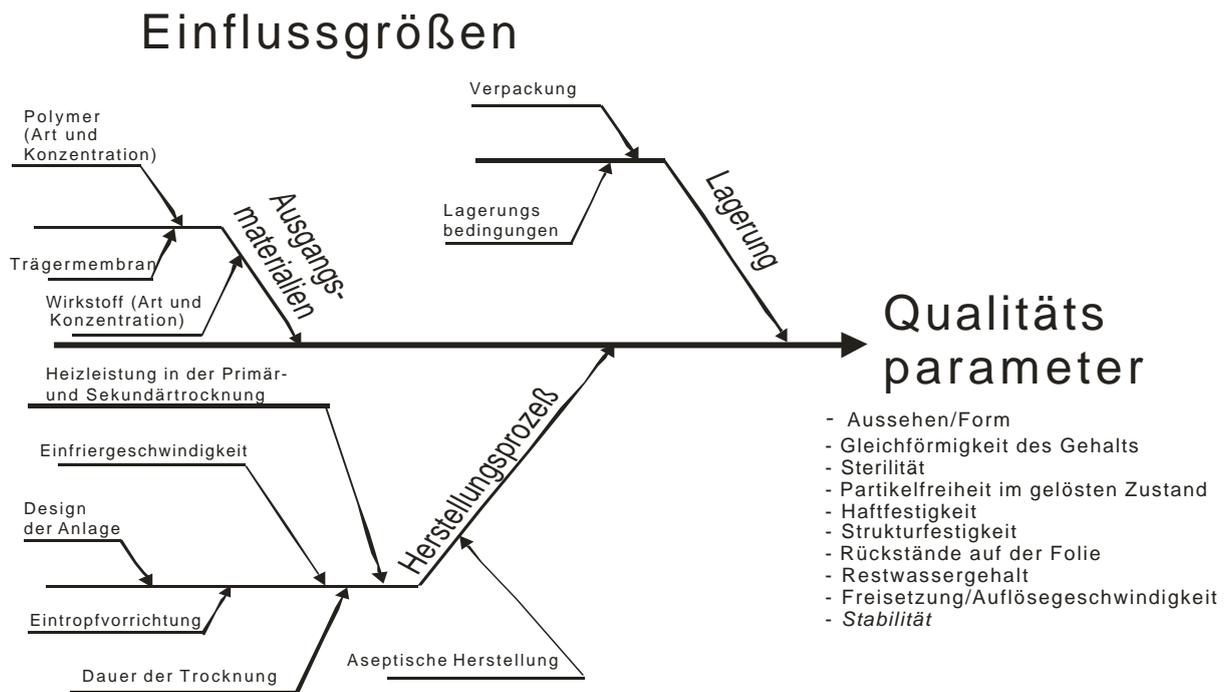


Abb. I-16: Qualitätsrelevante Parameter: Ishikawa-Modell [42]

Die Haftfestigkeit zwischen dem Tropfen und der Trägermembran und die Strukturfestigkeit der Lyophilisate sind entscheidende Kriterien für die erfolgreiche und bequeme Applizierbarkeit der OLCS. Ist die Haftfestigkeit zu hoch, lassen sich die Lyophilisate nicht vollständig abstreifen und die applizierte Dosis ist zu niedrig. Ist die Haftfestigkeit zu gering, können die Tropfen schon bei Erschütterungen während des Transports oder der Lagerung abfallen. Weichselbaum stellte fest, dass sich die OLCS am besten applizieren lassen, wenn die Haftfestigkeit zwischen 20 mN und 200 mN liegt [98]. Der Parameter Strukturfestigkeit wird in verschiedenen Bereichen zur Charakterisierung der Materialien verwendet, wie z.B. Lebensmittel- oder Lack- und Farbindustrie, und wird meistens mit einem Penetrometer gemessen. Bei der Applikation wird auf den Tropfen ein gewisser Druck ausgeübt. Weist der Tropfen keine ausreichende Strukturfestigkeit auf, kann er während der Applikation zusammengedrückt werden und lässt sich dann nicht mehr leicht abstreifen. Ist die Strukturfestigkeit zu hoch, ist das Fremdkörpergefühl am Auge verstärkt oder unter Umständen die Applikation schmerzhaft. Bei der Applikation von OLCS mit sehr hoher Strukturfestigkeit kann man sogar eine Verletzung des Auges nicht ausschließen. Eine Spezifikation konnte für diesen Qualitätsparameter noch nicht angegeben werden. Maier stellte fest, dass eine positive Korrelation zwischen der erforderlichen Strukturfestigkeit und der Haftfestigkeit der Lyophilisate besteht. Je

höher die Haftfestigkeit ist, desto höher sollte auch die Strukturfestigkeit des Lyophilisates sein [52].

Um eine präzise Dosierung sicher zu stellen soll die auf der Trägermembran nach der Applikation verbleibende Wirkstoffmenge möglichst gering sein. Maier untersuchte die Restwirkstoffmenge nach der Applikation von Fluorescein/HPMC-OLCS. Die applizierbare Menge war von der Einfriermethode und vom Wirkstoffgehalt abhängig. Bei einem optimalen Verhältnis von Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit ließen sich mehr als 90 % der Wirkstoffdosis reproduzierbar verabreichen.

Die klinischen Studien mit Pilocarpin und Tropicamid zeigten eine geringere Bioverfügbarkeit von OLCS, die im konventionellen Laborgefrieretrockner hergestellt wurden, im Vergleich zu den Handelspräparaten der Augentropfen. Gründe dafür waren eine nicht vollständige Applikation und vermutlich eine zu hohe Haftfestigkeit. Die Prüfmethode zur Bestimmung der Haftfestigkeit und der Strukturfestigkeit waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht entwickelt. Die Untersuchung der Reste auf der Folie bei pilocarpinhaltigen OLCS zeigte, dass in einigen Fällen bis zu 80 % des Wirkstoffes nach der Applikation auf der Folie wiedergefunden wurden und der verabreichte Dosisanteil dementsprechend etwa nur 20 % betrug [90,98].

Die Restfeuchte der Lyophilisate kann besonders bei biotechnologischen Wirkstoffen Stabilität und Lagerungstemperatur beeinflussen. Sie hängt von der Zusammensetzung der Lyophilisate und von den Herstellungsbedingungen ab.

Die Auflösengeschwindigkeit und die Wirkstofffreisetzung der OLCS können durch die Wahl eines entsprechenden Polymers gesteuert werden. Weichselbaum untersuchte die Verträglichkeit von OLCS aus verschiedenen Polymeren (HPMC, HEMC, HEC, Natriumhyaluronat, Natriumhyaluronat+Mannitol, PVP) und stellte unterschiedliche Verweilzeiten im Bindehautsack je nach Polymertyp und Polymerkonzentration von 10 min (für OLCS, die aus einer 2 % PVP 90- oder einer 0,5 % Natriumhyaluronat-Lösung hergestellt wurden) bis 2 h (für OLCS, die aus einer 1,5 % HPMC E4M – Lösung hergestellt wurden) fest. Dabei traten in keinem Fall Reizerscheinungen am Auge auf [98].

II Materialien und Methoden

II 1. Herstellung von OLCS

Die Herstellung von OLCS besteht aus folgenden Schritten:

- Herstellung der Lösung
- Herstellung der Applikatoren
- Auftropfen und Beladen der Trocknungskammer
- Gefriertrocknung
- Entladen der Trocknungskammer, Verpackung und Etikettierung

Die Lyophilisate, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, waren für die in-vitro Prüfung bestimmt und wurden nur gelegentlich von den an der Entwicklung beteiligten am Auge appliziert. Sollen Lyophilisate am Menschen angewendet werden, müssen sie vor allem den Anforderungen des Arzneibuches an Sterilität entsprechen [16]. Da die Sterilisation im Endbehälter für diese Arzneiform nur durch Strahlensterilisation möglich ist und deshalb außerhalb der verfolgten technischen Möglichkeiten lag, müssen einige Schritte der Herstellung unter aseptischen Bedingungen im Reinraum Klasse A erfolgen. Eine Übersicht gibt Abbildung II-1. In dieser Arbeit wird nur ein Konzept der aseptischen Herstellung dargestellt. Die erforderliche Validierung der aseptischen Herstellung sowie die Media-fill-Prozedur [53] sprengen den Rahmen dieser Arbeit und werden im Rahmen eines Diplomprojektes untersucht.

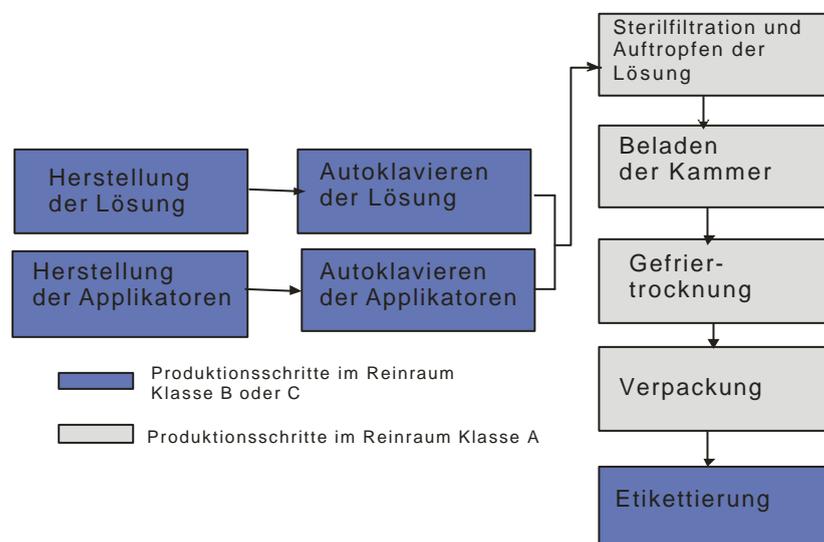
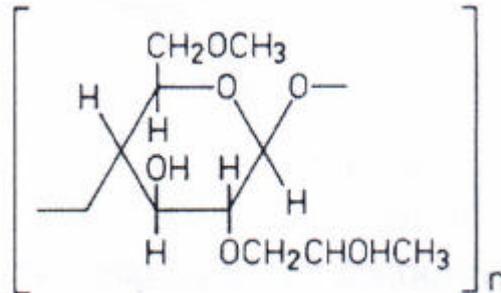


Abb. II-1: Herstellungsschritte der OLCS

II 1.1 Herstellung der Lösungen

Materialien

Hypromellose (Hydroxypropylmethylcellulose, HPMC)



Methocel[®] E50 Premium LV EP [54]

Chargen-Bez.: QJ09012405

Lieferant: Colorcon

Viskosität nach EuAB.: 52 mPa*s

Culminal[®] MHPC 400

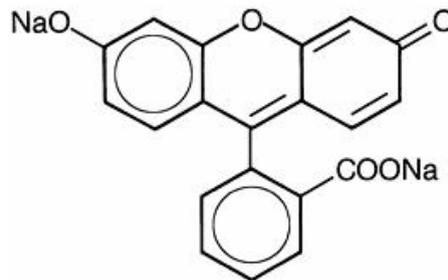
Chargen-Bez.: VK1881

Lieferant: Hercules

Viskosität nach EuAB.: 400 mPa*s

Hypromellose ist ein Propylenglycolether der Methylcellulose. Methyl- und Hydroxypropylgruppen sind über Etherbrücken mit den Anhydroglukose-Kernen der Cellulose verbunden. Die Herstellung erfolgt durch Einwirken von Methylchlorid und Ethylenoxid auf Alkalicellulose. Je nach Molekulargewicht unterscheidet man Produkte verschiedener Viskositätsgrade. Hypromellose ist zur Anwendung in der Ophthalmologie zugelassen und wird zur Viskositätserhöhung und zur Verbesserung der Haftfähigkeit und Verweildauer wässriger Augenpräparate, insbesondere künstlicher Tränenflüssigkeiten eingesetzt [14].

Fluorescein-Natrium



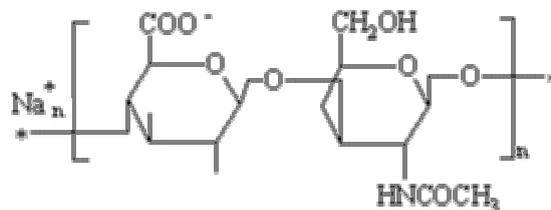
Eu.AB

Lieferant: Synopharm GmbH

Chargen-Bez.: 9904B092

Fluorescein-Natrium (Dinatriumsalz des Resorcinphthaleins) ist ein wasserlöslicher Farbstoff, der bei pH-Werten größer 5 eine intensiv grüne Fluoreszenz zeigt. Die wässrigen Lösungen sind lichtempfindlich und inkompatibel mit Säuren. In der Ophthalmologie wird Fluorescein zur Darstellung von Hornhautverletzungen und kleinen Fremdkörpern, für Augenhintergrunddiagnostik und zur Überprüfung des Sitzes von Haftschalen verwendet. Fluorescein wird bei lokaler Applikation am Auge nicht resorbiert, jedoch lässt sich durch den Zusatz von Hilfsstoffen wie 0,5 % Hydroxypropylmethylcellulose oder Benzalkoniumchlorid, die Permeabilität erhöhen [14]. In dieser Arbeit wurde Fluorescein-Natrium als Modellwirkstoff bei hypromellosehaltigen Lyophilisaten eingesetzt.

Natriumhyaluronat



Lieferant: Synopharm GmbH & Co.KG [30]

Chargen-Bez.: 0411A047

Mr: 1 550 000

Herstellung durch biotechnologische Verfahren, Verwendung von *Streptococcus zooepidemicus*

Natriumhyaluronat ist das Natriumsalz der Hyaluronsäure. Es besteht aus den Disacharideinheiten D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin [16]. Hyaluronsäure kann aus Hahnenkämmen extrahiert werden oder durch biotechnologische Verfahren, bei denen vor allem *Streptococcus zooepidemicus* eingesetzt wird, gewonnen werden [38]. Natriumhyaluronat zeigt eine hohe Wasserbindungskapazität [101]. Es ist Bestandteil der Synovialflüssigkeit, des Kammerwassers im Auge und der Lympheflüssigkeit. Auf Grund der viskoelastischen Eigenschaften findet Natriumhyaluronat eine Anwendung in der Ophthalmologie, Orthopädie und der kosmetischen Chirurgie. Die rheologischen Eigenschaften hängen von der Konzentration und dem Molekulargewicht ab. In der Ophthalmologie wird es zum Schutz der cornealen Endothelzellen in der intraocularen Chirurgie, als Ersatz des Kammerwassers oder der Tränenflüssigkeit bei der Behandlung des trockenen Auges, für die Verlängerung der präcornealen Verweilzeit und als Vehikel für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung verwendet [4]. Natriumhyaluronat ist monographiert im Europäischen Arzneibuch. Da die Lyophilisate, die im Rahmen dieser Arbeit aus Natriumhyaluronat hergestellt worden sind, nicht für die Untersuchungen am Menschen bestimmt wurden, wurde in dieser Arbeit Natriumhyaluronat für kosmetische Zwecke verwendet.

Dextran 40

EuAB

Lieferant: Fresenius

Chargen-Bez.: 1301A-07758

Dextran ist ein Polysaccharid, das durch Fermentation der Saccharose durch bestimmte Stämme von *Leuconostoc mesenteroides* erhalten wird. Es sind 1,6-a-verknüpfte Polymere der Glukose. Die Dextrane werden anschließend hydrolysiert und nach ihrer relativen Molekularmasse fraktioniert. Man erhält die Dextran-Typen 40, 70, 110 und 150 (entsprechend einer Molekularmasse von 40000, 70000 usw.). Dextran erhöht die Viskosität der wässrigen Lösungen nur unbedeutend, ist aber als Hilfsstoff für die Anwendung am Auge zugelassen. Dextran ist oft ein Bestandteil von gefriergetrockneten Arzneimitteln und hat die Funktion eines Gerüstbildners. In dieser Arbeit wurde Dextran 40 für die Verbesserung der Strukturfestigkeit von natriumhyaluronathaltigen Lyophilisaten verwendet.

Geräte

Waage Sartorius, Typ BP 210S (d=0,1 mg), Sartorius GmbH, Göttingen

Membranpumpe, KNF, VWR International, Darmstadt

Membranfilter 0,45 µm, RC55, Ø 47mm, Schleichter & Schuell, Dassel

Herstellung der HPMC/Fluorescein (HF)-Lösung

- Das Becherglas mit einem Rührstäbchen wird tariert und die entsprechende Menge gereinigtes Wasser wird in das Becherglas eingewogen. Das mit Alufolie abgedeckte Becherglas wird auf einem beheizbaren Magnetrührer auf 80 - 90°C erhitzt.
- Die abgewogene Menge HPMC wird auf die Wasseroberfläche aufgestreut und die Suspension wird kaltgerührt bis eine klare Lösung entsteht (Dauer ca. 1,5 h).
- Die abgewogene Menge Fluorescein-Natrium wird zugesetzt, das verdunstete Wasser wird ersetzt und die Lösung umgerührt.
- Die Lösung wird mit Hilfe des Vakuum-Filtrationsgerätes durch ein Membranfilter (Porenweite 0,45 µm) filtriert und 1 h bei 300 mbar Unterdruck entgast.

Die fertige Lösung wird in ein braunes Weithalsglas abgefüllt, verschlossen und etikettiert.

Herstellung der Natriumhyaluronat/Dextran (NaHD)-Lösung

- Das Becherglas mit einem Rührstäbchen wird tariert und die entsprechende Menge gereinigtes Wasser wird im Becherglas eingewogen. Die abgewogene Menge Dextran wird auf die Wasseroberfläche aufgestreut.
- Die Suspension wird gerührt bis eine klare Lösung entsteht (Dauer 15 ca. min).
- Die abgewogene Menge Natriumhyaluronat wird zugesetzt und weiter gerührt bis die Lösung klar ist (Dauer ca. 40 min).
- Die Lösung wird filtriert, entgast und etikettiert, wie es in der Vorschrift zur Herstellung der HF-Lösung beschrieben ist.

Die Lösungen werden innerhalb von zwei Tagen aufgebraucht und nicht zur Herstellung von OLCS zur Applikation am Menschen angewendet.

II 1.2 Charakterisierung der Lösungen

II 1.2.1 Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung wurde nach der Wilhelmy-Plattenmethode mit einem Tensiometer gemessen.

Geräte

Krüss Processor Tensiometer K100, Krüss GmbH

Platinplatte PL21 (Breite 19,9 mm; Tiefe 0,2 mm; Höhe 10 mm), Krüss GmbH

Probegefäß SV10 Glas Vessel 43,5 ml; 50 mm

Messbedingungen

Messtemperatur $20 \pm 1^\circ\text{C}$

Detektionsgeschwindigkeit 6 mm/min

Detektionsempfindlichkeit 0,01g

Eintauchtiefe 2 mm

Werte für Mittelwert 10

Standardabweichung 0,2 mN/m

Durchführung der Messung

Die Platinplatte und das Probegefäß wurden vor jeder Messung gereinigt und ausgeglüht. Das Gefäß wurde mit Prüflösung vorgespült, dann auf 2/3 aufgefüllt und mindestens 10 min im Thermostattopf temperiert. Nachdem die Platte angehängt worden ist, wurde das Gefäß mit der Prüflüssigkeit bis kurz unter die Platte gebracht. Die Messung erfolgte vollautomatisch.

Auswertung

Wenn die Standardabweichung unter $0,2 \text{ mN}\cdot\text{m}$ lag, wurde aus den letzten zehn Messwerten ein Mittelwert gebildet.

II 1.2.2 Viskosität

Die Viskositätsmessungen wurden an einem Rotationsviskosimeter mit einer Doppelspalt Zylinder-Becher Einrichtung durchgeführt.

Geräte

Rotationsviskosimeter Roto Visco 1 Haake, Thermo Electron Corporation, Karlsruhe

Messbecher DG 42 RO (Doppelspalt), Thermo Electron Corporation, Karlsruhe Rotor
DG 43 DIN 53544 Ti

Messbedingungen

Das Messprogramm bestand aus folgenden Schritten:

- Änderung der Schergeschwindigkeit von 10 s^{-1} bis 1000 s^{-1} . Die Schergeschwindigkeit wird stufenartig erhöht und es wird gewartet bis die resultierende Schubspannung sich nicht mehr ändert.
- Messung bei einer konstanten Schergeschwindigkeit von 1000 s^{-1} 60 s lang.
- Änderung der Schergeschwindigkeit von 1000 s^{-1} bis 10 s^{-1} . Die Schergeschwindigkeit wird stufenartig erniedrigt und es wird gewartet bis die Schubspannung sich nicht mehr ändert.

Durchführung

Vor jeder Messung wurde der Becher mit dem Thermostat auf $20 \pm 1^\circ\text{C}$ temperiert. Nachdem der Nullpunkt des Gerätes eingestellt ist, wurden 9 ml Probenvolumen in den Spalt des Bechers pipettiert. Vor der Messung wurde die Temperierung noch einmal überprüft. Die Messung erfolgte vollautomatisch.

Auswertung

Zur Auswertung der Viskosität wurden die Mittelwerte bei 1000 s^{-1} berechnet.

II 1.3 Herstellung der Applikatoren

Geräte

Autoklav VST 40/60, Biotron Labortechnik GmbH, Hilden

Trockenschrank Modell 400, Memmert, Schwabach

Folienschweißgerät: Polystar® 244, Rische+Herfurt GmbH, Hamburg

Materialien

Ungesinterte PTFE-Folie 0,1 x 300mm NT/JB, Performance Plastic Products 3P GmbH, Karben

Autoklavierband: Autoclave Tape, 3M Medical Products Division, St. Paul (USA)

Zellstofftupfer: Pur-Zellin®, 4 x 5 cm, Hartmann

Autoklavierfolie

70 % Isopropanol- Lösung

Durchführung

Ein etwa DIN A4 großer Bogen der PTFE-Folie wurde aus der Rolle ausgeschnitten und mit 70 % Isopropanol von beiden Seiten gereinigt. Der Bogen wurde in 15 mm x 10 mm Stücke geschnitten. Aus dem Autoklavierklebeband wurden ca. 4 cm lange Streifen hergestellt. Das Ende des PTFE-Stückes (ca. 2-3 mm) wurde auf die selbstklebende Seite des Streifens des Autoklavierklebebands geklebt. Der andere Streifen des Autoklavierklebebands wurde darüber geklebt. Der ganze Applikator wurde auf die Breite 10 mm abgeschnitten. Die Ecken und Kanten der PTFE-Folie wurden mit einer Nagelschere abgerundet. Der PTFE-Teil des Applikators wurde noch einmal mit 70 % Isopropanol und einem Steriltupfer gereinigt. Danach wurden die Applikatoren mit einer Pinzette in ein Metallkästchen mit perforiertem Boden gelegt und nicht mehr mit den Händen angefasst. Der Metallkästchen wurde in Autoklavierfolie eingeschweißt und anschließend autoklaviert (15 min, 121°C, 2 bar). Die autoklavierten Applikatoren wurden bei 45°C im Trockenschrank getrocknet.

Prägung der Folie

Für die Prägung der PTFE-Folie wurden zwei Matrizen nach Maßen in Abbildungen II-2 und II-3 hergestellt. Die passenden Kunststoffpatrizen wurden als Abdrucke der jeweiligen Matrizen gefertigt.

Geräte

Metallmatrize 1, Brandt & Co., Leipzig

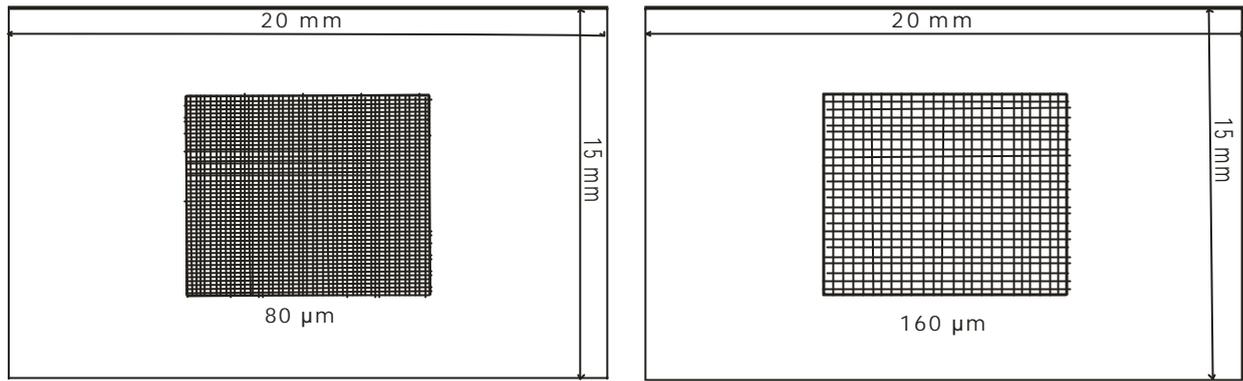
Metallmatrize 2, Brandt & Co., Leipzig

Patrize 1 aus Palavit G[®] (Zubereitung auf Basis von Methacrylaten, Hersteller: Heraus Kulzer GmbH, Hanau), Zahntechniker B. Mohr, Praxis Dr. Kromminge, Bornheim

Patrize 2 aus Palavit G[®] (Zubereitung auf Basis von Methacrylaten, Hersteller: Heraus Kulzer GmbH, Hanau), Zahntechniker B. Mohr, Praxis Dr. Kromminge, Bornheim

Hydraulische Presse Beckman P16, Glenrothes, UK

Miniatur-Druckkraftsensor Typ 8413, Burster, Gernsbach



a. Matrize 1

b. Matrize 2

Abb. II-2: Schematische Darstellung der Matrizen, Ansicht von oben

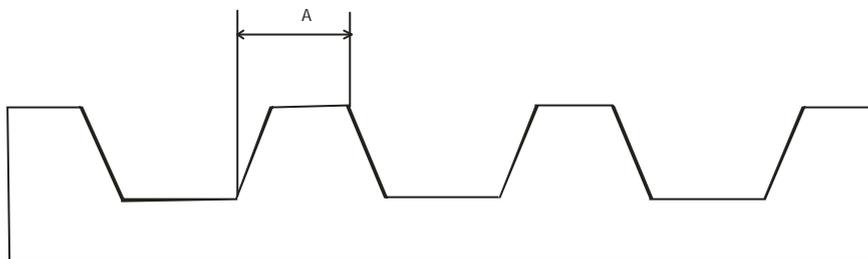
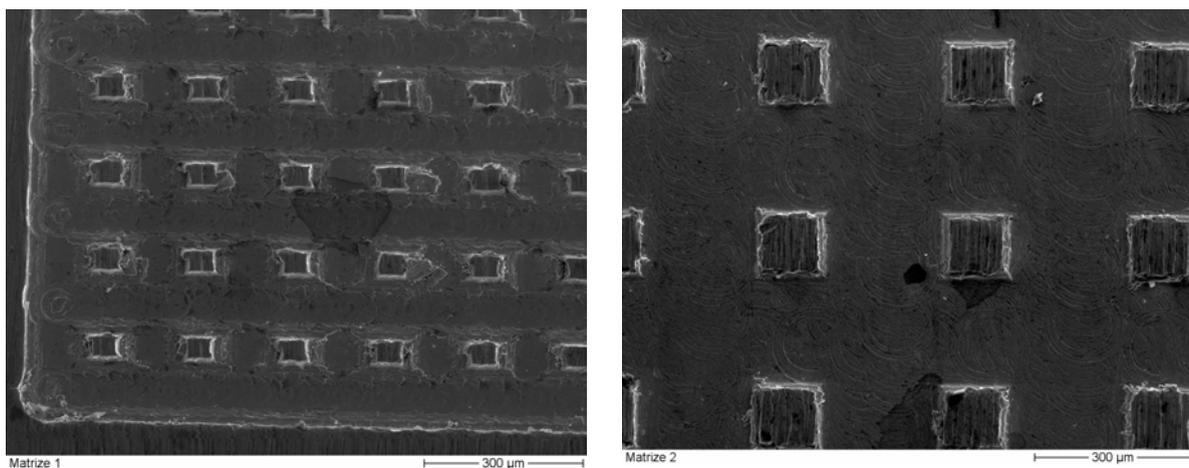


Abb. II-3: Abmessungen für Matrizen

Metallmatrize	A
1	80
2	160

Tab. II-1: Vorgaben zur Herstellung der Matrizen



a. Matrize 1

b. Matrize 2

Abb. II-4: REM-Aufnahmen der Matrizen

Durchführung

Die PTFE-Folie des OLCS-Applikators wurde zwischen Matrize und Patrize eingespannt. Eine Kraft von 300 N wurde mit Hilfe der hydraulischen Presse auf die Matrize ausgeübt und 5 sec. gehalten.

II 1.4 Auftropfen und Beladen der Trockenkammer

Geräte

Dosierpipette, Eppendorf Multipette® plus, Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg mit Combitip Biopur® SollwertEinstellung

Durchführung

Der Applikator wurde auf der PTFE-Platte des Verschlusses am Papierhandgriff mit zwei Magneten befestigt. 25 µl der Lösung wurde auf die PTFE-Folie des Applikators mit der Dosierpipette aufgetropft. Der Verschluss wurde vorsichtig in die Trocknungskammer überführt und mit einer Laborklammer befestigt. Beim Auftropfen und Beladen der Kammer ist darauf zu achten, dass der Tropfen möglichst kugelförmig bleibt und nicht auf der PTFE-Folie spreitet.

II 1.5 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung wurde ausführlich im Kapitel III 1 beschrieben.

II 1.6 Entladen der Trockenkammer, Verpackung und Etikettierung

Packmittel

Sterile Polypropylen (PP)-Tube No. 184-261, Greiner Labortechnik.

Durchführung

Nach der Trocknung wurde die Trockenkammer mit sterilem Stickstoffgas bei einem Überdruck von ca. 0,5 mbar belüftet, der Verschluss mit OLCS aus der Kammer entnommen, das fertige OLCS in ein steriles Polypropylenröhrchen verpackt und etikettiert.

II 2 Charakterisierung der Lyophilisate

II 2.1 Bestimmung der Haftfestigkeit zwischen dem Tropfen und der Trägerfolie und der Strukturfestigkeit von Lyophilisaten

Die Bestimmung der Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit der Lyophilisaten erfolgte mit der gleichen Einrichtung (s. Abb. II-5).

Geräte

- Feinwaage Mettler Toledo PB 3002-S, Delta Range[®] d= 0,01 / 0,1 g
- Datenerfassungs-Software Toledo[®] , Mettler
- Apparat zur Bestimmung der Haftfestigkeit / Strukturfestigkeit (Eigenbau der Werkstatt des Institut für Strahlen und Kernphysik, Ing. B. Neff).

Der Apparat besteht aus einem Gestell, das die Waage trägt und einer Vorrichtung, die durch einen Gleichstrommotor so angehoben und gesenkt werden kann, dass eine Umdrehung einem Weg von 0,5 mm entspricht (Abb. II-5). Bei einer Spannung von 10 V, die hier angelegt wurde, lag die Drehzahl bei 107 Umdrehungen pro Stunde. Durch Wechsel der Polarität wurde die Drehrichtung geändert.

II 2.1.1 Bestimmung der Haftfestigkeit

Durchführung

Der Apparat zur Bestimmung der Haftfestigkeit ist in Abbildung II-5 dargestellt. Das OLCS wurde mit einer Klammer und einem Draht so an der unterschäligen Aufhängung der Waage befestigt, dass das Lyophilisat unmittelbar unter der Abreißkante hing und die Trägerfolie an der Widerlage anlag. Nach Tarierung der Waage wurde die Abreißvorrichtung mit einer Geschwindigkeit von 0,892 mm/min abwärts bewegt. Der Kraft/Zeit-Verlauf wurde aufgenommen und in ein Kraft/Weg-Diagramm umgerechnet (Abb. II-7).

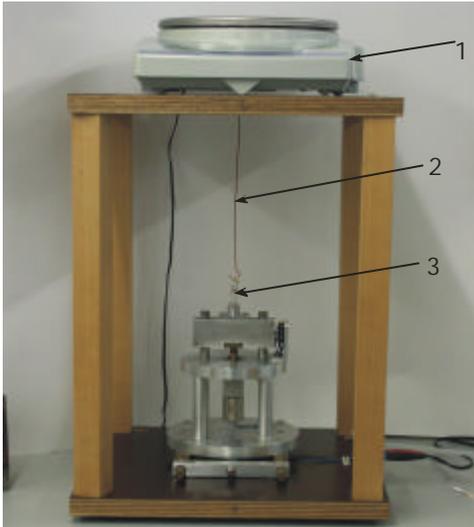


Abb. II-5: Apparat zur Bestimmung der Haftfestigkeit

1 – Waage, 2 – Draht,
3 - Klammer

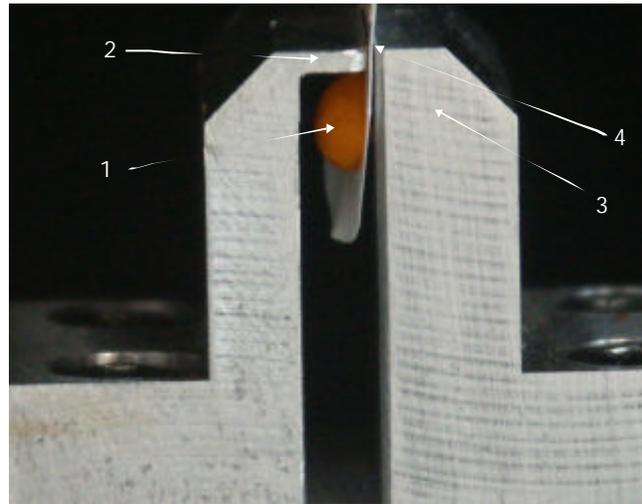
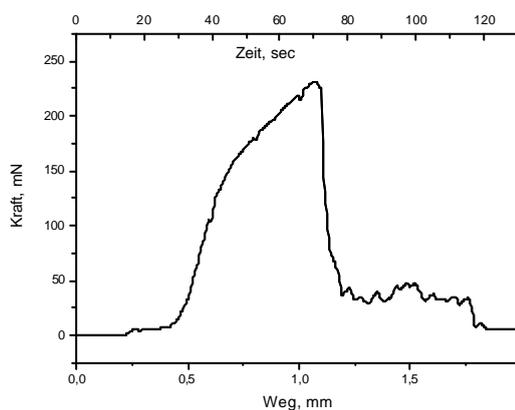


Abb. II-6: Detailansicht OLCS eingebracht zwischen den Abreißwänden

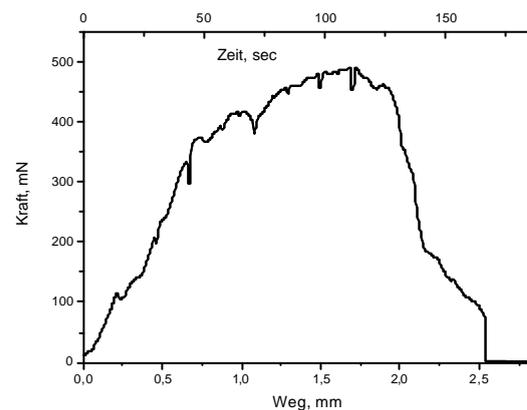
1 – OLCS, 2 – Abreißkante, 3 – Widerlage, 4 –
200 µm Spalt

Auswertung

Für die Charakterisierung der Haftfestigkeit wurde das Maximum der Kraft bestimmt (Abb.II-7a). Diese Methode hat den Nachteil, dass die Tropfen sich im Spalt verkeilen können und das Ergebnis durch die Reibungskraft verfälscht wird. Im Kraft/Weg- oder Kraft/Zeit-Diagramm ist in diesem Fall ein Maximum-Plateau zu sehen (Abb.II-7b).



a. Normalfall – kein Verkeilen



b. Artefakt - Verkeilen

Abb. II-7: Kraft-Weg Diagramm der Haftfestigkeit

II 2.1.2 Bestimmung der Strukturfestigkeit

Durchführung

Für die Bestimmung der Strukturfestigkeit wird die Abreißvorrichtung überbrückt und das Lyophilisat plan auf die Brücke gelegt (Abb. II-8).

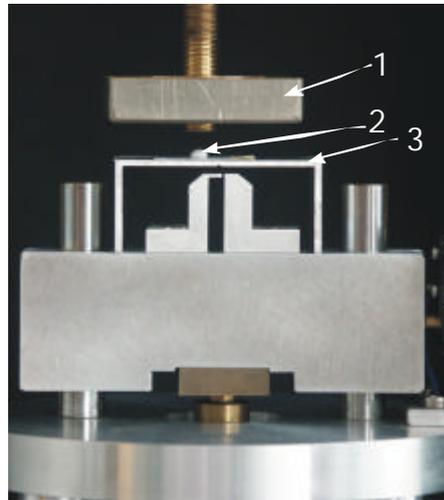
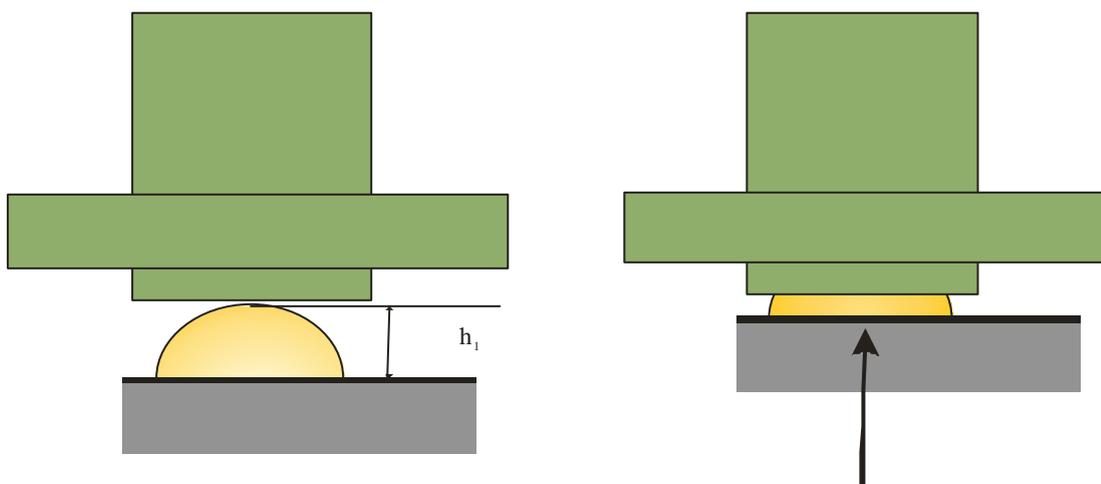


Abb. II-8: Detailansicht: Apparat zur Prüfung der Strukturfestigkeit

1 – Gewicht, 2 – OLCS, 3 – horizontale Platte

An den Draht wurde ein Gewicht an einem Gewindestift mit der Gesamtmasse von 157 g gehängt. Der Durchmesser des Stiftes betrug 7 mm. Der Tropfen wurde in der Mitte unter dem Gewindestift positioniert. Bewegte sich der Aluminiumblock nach oben, wurde der Tropfen zusammengepresst (Abb. II-9).



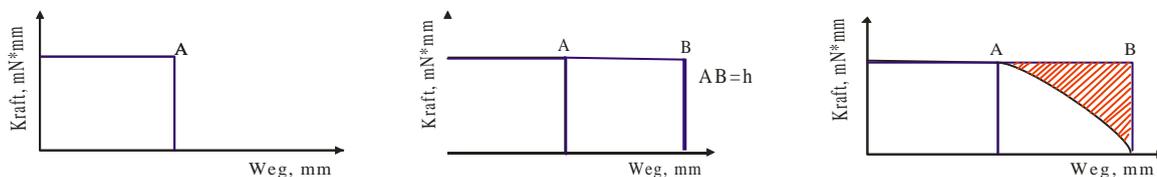
a. Vor der Prüfung

b. Nach der Prüfung

Abb. II-9: Schematische Darstellung der Prüfung auf Strukturfestigkeit

Auswertung

Die Strukturfestigkeit wurde durch die Energie charakterisiert, die erforderlich war, um die Tropfen um einen konstanten Betrag von 0,7 mm zu komprimieren (Abb. II-11). Um die Vorgehensweise bei der Prüfung auf Strukturfestigkeit anschaulich zu machen, kann man für eine gegebene Kraft drei theoretische Fälle unterscheiden. Im ersten Fall ist der Tropfen so fest, dass er nicht zusammengepresst werden kann. Hier fällt die Kraft sofort nachdem der Tropfen das Gewicht erreicht hat um den vollen Betrag des Gewichtes, ab (Abb. II-10a). Die Strecke h , die der Höhe des Tropfens entspricht, kann nicht zurückgelegt werden. Weist der Tropfen keinen Widerstand beim Zusammenpressen, kann die Strecke h ohne Kraftänderung zurückgelegt werden. In diesem Fall wird keine Energie gebraucht um den Tropfen zusammenzupressen (Abb. II-10b). Im dritten Fall verformt sich der Tropfen und die die Kraft ändert sich beim Zurücklegen der Strecke h wird. Die Energie, die notwendig ist um den Tropfen zusammenzupressen, kann durch die Fläche zwischen der Kurve der Kraftabnahme und der Gewichtskraft ohne Tropfen (einem Leerlauf) charakterisiert werden (Abb. II-10c).



a. Inkompressibler Tropfen

b. kein Widerstand

c. Tropfen mit Widerstand

Abb. II-10: Schematische Darstellung der Auswertung der Strukturfestigkeit

Diese Auswertungsmethode hat einige Nachteile. Die Form und damit die Höhe des Tropfens schwanken innerhalb enger Grenzen, aber erkennbar. Auch die Trägerfolien sind nicht vollkommen eben. Die Tropfen, die einen höheren Widerstand aufwiesen, wurden nicht vollständig zusammengepresst und das Diagramm wurde im unteren Teil nicht auswertbar. Aus diesen Gründen wurde zur Charakterisierung der Strukturfestigkeit die Energie berechnet, die notwendig ist, um den Tropfen um 0,7 mm zu komprimieren. Diese entspricht der schraffierten Fläche in Abbildung II-11.

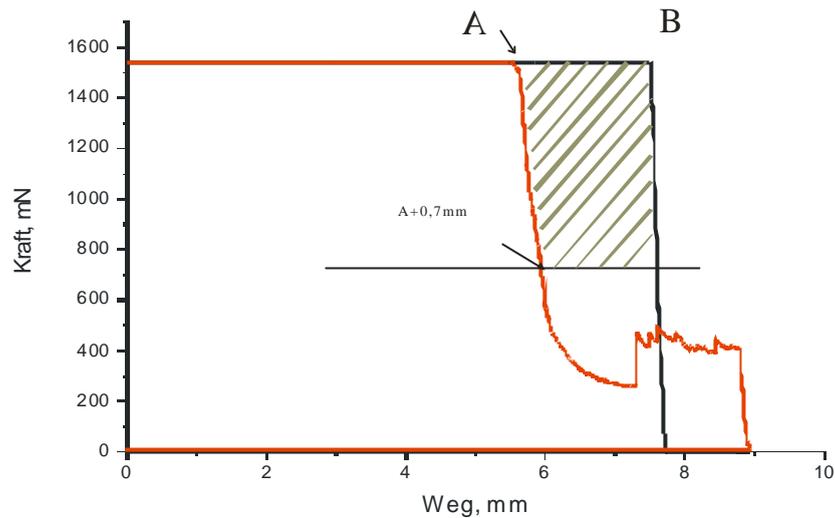


Abb. II-11: Kraft-Weg Diagramm der Strukturfestigkeit

II 2.2 Wassergehaltbestimmung

Der Restwassergehalt wurde thermogravimetrisch bestimmt. Dabei wird die Massenänderung einer Substanz in Abhängigkeit von Temperatur oder Zeit gemessen.

Geräte

TGA 7, Pyris, Perkin Elmer, D-Überlingen

Messbedingungen

Stickstoffstrom – 10 ml/min

- Messprogramm 1 (Untersuchung der Substanzen auf Zersetzung)
 1. 1 min lang 60 °C halten
 2. Aufheizen von 60°C auf 300°C bei 1°C/min
 3. 20 min lang 300°C halten
- Messprogramm 2 (Wassergehaltbestimmung von HF- Lyophilisaten)
 1. 1 min lang 60 °C halten
 2. Aufheizen von 60°C auf 150°C bei 10°C/min
 3. 20 min lang 150°C halten
- Messprogramm 3 (Wassergehaltbestimmung von NaHD-Lyophilisaten)
 1. 1 min lang 60 °C halten
 2. Aufheizen von 60°C auf 180°C bei 10°C/min
 3. 5 min lang 180°C halten

Durchführung

Der Tiegel wurde vor jeder Messung gereinigt, ausgeglüht und anschließend tariert. Danach wurde die Probe in den Tiegel eingewogen und die Messung gestartet. Für die Untersuchung der Substanzen auf Zersetzung wurde die Mischung aus Methocel E 50 und Fluorescein (Massenverhältnis 1:1) oder Natriumhyaluronat und Dextran (Massenverhältnis 1:1) nach dem Messprogramm 1 aufgeheizt. Die Wassergehaltbestimmung erfolgte nach den Messprogrammen 2 oder 3 für entsprechend HF- und NaHD-Lyophilisaten.

Auswertung

Um die Substanzen auf Zersetzung zu untersuchen, wurden die Signale der Gewichtsabnahme in % und der Temperaturänderung als Zeitfunktion dargestellt (Abb. II-12 und II-13). Das TGA Thermogramm der HF-Mischung (Abb. II-12) zeigt, dass die Masse dieser Mischung im Temperaturbereich von 60°C bis 200°C nach Entfernung des adsorbierten Wassers annähernd konstant ist. Erst ab 220°C nimmt die Masse schnell ab, was auf eine Zersetzung zurückzuführen ist.

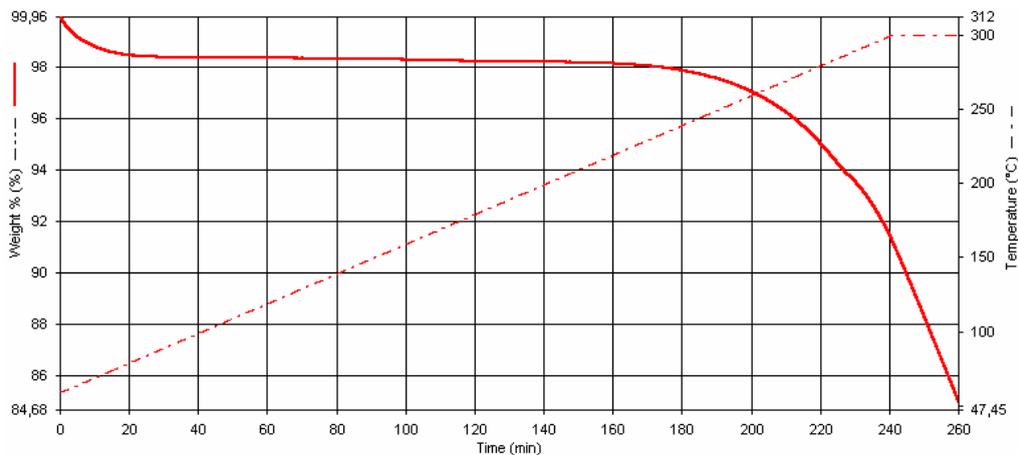


Abb. II-12: Thermogramm der HF-Mischung nach dem Messprogramm 1

Bei NaHD-Lyophilisaten (Abb. II-14) nimmt die Masse schon ab 200°C schnell ab und zeigt die Zersetzung der Substanzen an. Die dunkelbraune Verfärbung der beiden Mischungen am Ende der Messung ist ein weiterer Hinweis auf die Zersetzung.

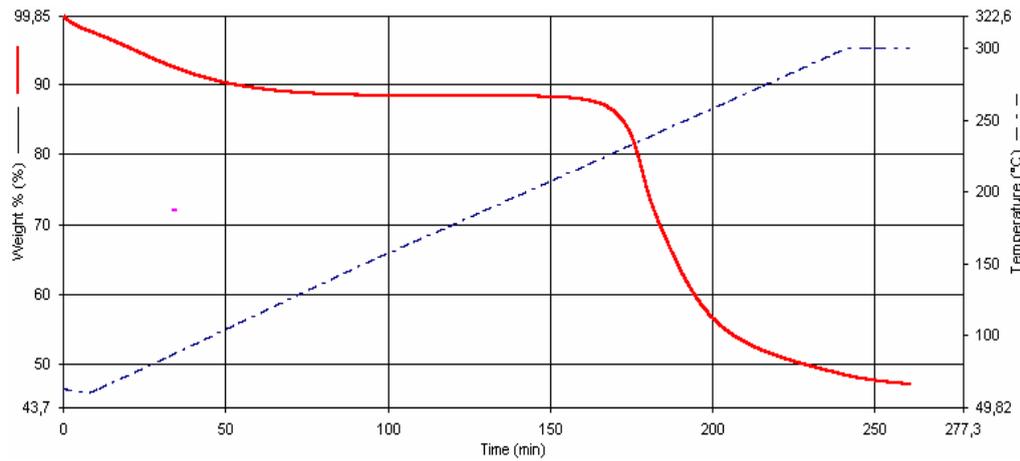


Abb. II-13: Thermogram der NaHD-Mischung nach dem Messprogramm 1

Der Wassergehalt von OLCS wurde als Trocknungsverlust in % angegeben. Beispiele der Thermogramme sind in Abbildungen II-14 und II-15 dargestellt.

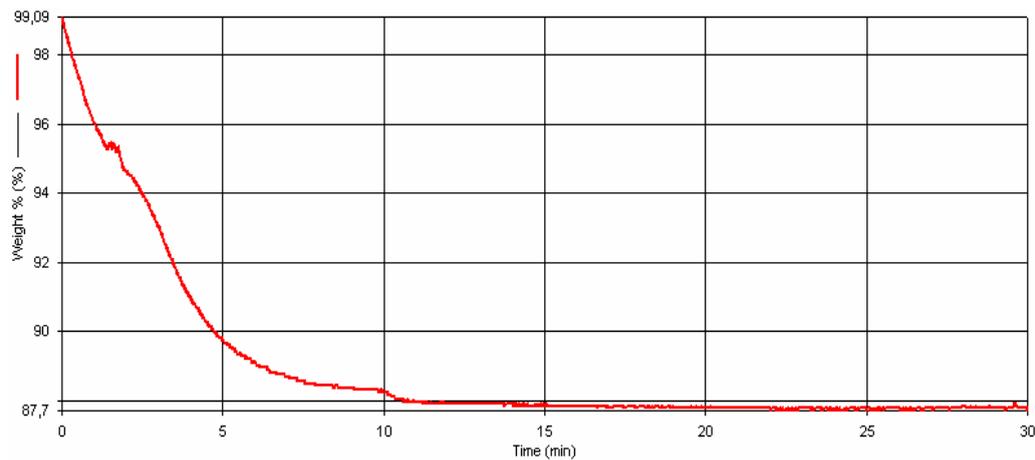


Abb. II-14: Beispiel für ein Thermogramm des HF- Lyophilisates

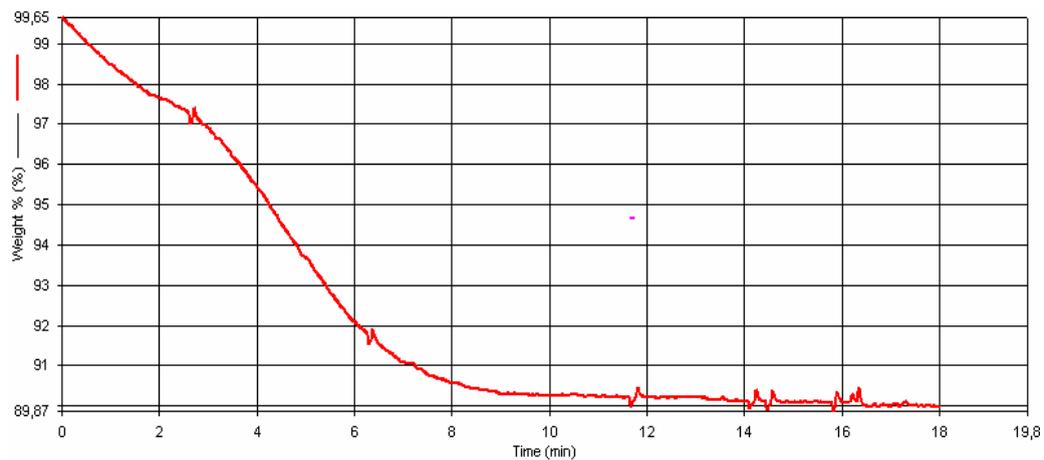


Abb. II-15: Beispiel für ein Thermogramm des NaHD-Lyophilisates

II 2.3 Dynamische Wasserdampfsorption (DVS, Dynamic Vapour Sorption)

DVS ermöglicht folgende Untersuchungen an Substanzen

- Adsorptions/Desorptions-Isothermen
- Kinetik von Feuchteaufnahme und Abgabe
- Sorptionswärmen
- Diffusions- und Permeabilitätskonstanten
- Glasübergangstemperaturen und andere morphologische Änderungen

In der pharmazeutischen Industrie wird die DVS für die Stabilitätsprüfungen von Wirk- und Hilfsstoffen, die Verpackungskontrolle, die Charakterisierung des amorphen Anteils von Substanzen und die Untersuchung der feuchtebedingten morphologischen Änderungen verwendet.

In dieser Arbeit wurde mittels DVS das Feuchteaufnahmevermögen der Lyophilisate untersucht.

Geräte

DVS – 1/1000, Surface Measurement System (SMS) Ltd UK

Technische Daten:

Genauigkeit:

- Waage: 0,1µg
- Temperatureinstellung im Inkubator: 0, 1 °C
- Temperaturmessung Sensoren: 0,3°C
- Volumenstrom (Massenflussregler): 0,4 ml/min
- Feuchtenmessungen Sensoren: 1, 5 % RH

Aufbau des Gerätes

Der gesamte Aufbau des DVS-Gerätes mit Ausnahme der Massenflussregler befindet sich in einem Inkubator (Abb. II-16). Die beiden Massenflussregler steuern den jeweiligen Anteil des Gesamtmassenstroms. Dabei wird ein Teil des Gasstroms durch einen Dampfsättiger geleitet und zu 100 % relativer Feuchte (RH) mit Wasser bzw. Lösemittel gesättigt. Durch den zweiten Massenflussregler fließt trockenes Gas und vermischt sich mit dem feuchtigkeitsgesättigten Gas, so dass eine Mischung mit definierter Feuchte in die Kammer gelangt. Die aktuellen Werte für Temperatur und Feuchte werden durch Sensoren angezeigt. Das Gas strömt an den Wägeschälchen vorbei und die Massenänderungen werden von der Waage detektiert.

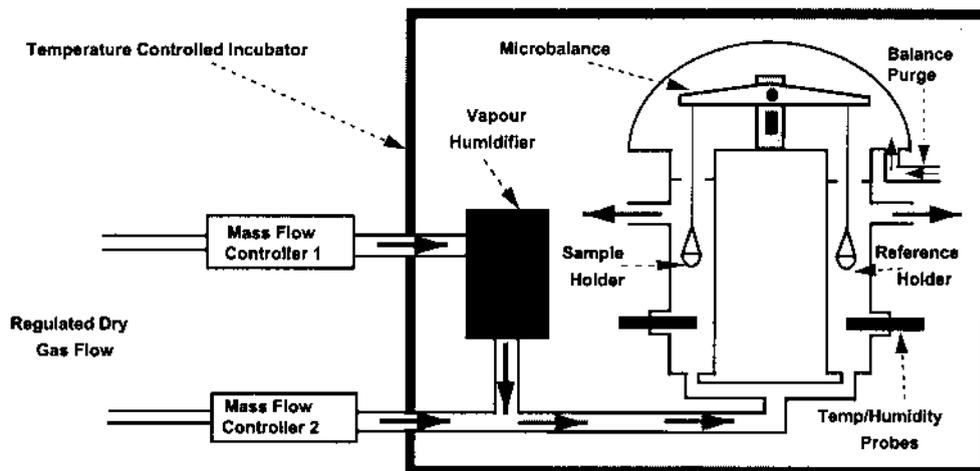


Abb. II-16: Schematische Darstellung des DVS-Gerätes [15]

Messbedingungen

Stickstofffluss 200 ml/min

Messtemperatur 25°C

Durchführung

Vor jeder Messung wurde die Waage tariert. Der Tropfen wurde von der PTFE-Folie abgetrennt und in das saubere trockene Schälchen gelegt. Die Probe wurde eingewogen und das Messprogramm gestartet. Zuerst wurde die Probe auf 0% RH getrocknet. Die Messungen wurden bei unterschiedlichen Feuchten von 0% bis 98% in zehn Stufen durchgeführt. Jede Stufe dauerte so lange bis die Massenänderung pro Zeit (dm/dt) kleiner als 0,0005 % war.

Auswertung

Zur Auswertung wurden $dm/Zeit$ - und dm/RH -Plots erstellt.

II 2.4 Charakterisierung der Tropfenform der OLCS

Die Form des Tropfens wurde über den Kontaktwinkel charakterisiert.

Geräte

Kontaktwinkelmessgerät G1, Okular mit zehnfacher Vergrößerung, Krüss, Hamburg

Kaltlichtquelle: Fibre Optic Light Source EK1, Euromex, Arnhem

Durchführung

Die PTFE-Folie mit dem gefriergetrockneten Tropfen wurde vom Papierträger abgeschnitten und mit einer Pinzette auf den Probentische des Kontaktwinkelmessgerätes gelegt. Der Kontaktwinkel wurde an beiden Seiten des Tropfens bestimmt.

II 2.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde eingesetzt, um die Struktur der Lyophilisate zu untersuchen und um das Muster der Prägematrizen zu vermessen.

Geräte

- Rasterelektronenmikroskop Hitachi S2460 N, Tokyo
- Sputter Coater S 150 B, Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK

Im REM werden die Proben von einem Elektronenstrahl abgerastet. Durch die Wechselwirkungen zwischen dem einfallenden Strahl und der Leitschicht entstehen Sekundärelektronen. Sie werden in einem Detektor in Spannungssignale umgewandelt, verstärkt und an eine Kathodenstrahlröhre weitergeleitet. Die Kathodenstrahlröhre setzt die Signale in ein digitales Bild um.

Messbedingungen

Sputtern: Stromstärke 15 mA, 3 x 2 min, nach dem Aufbringen des Leitsilbers noch 3 x 2 min

REM:

- Beschleunigungsspannung – 15 kV und 20 kV für die Untersuchung der Oberfläche der Lyophilisate.
- Arbeitsvakuum $5,3 \cdot 10^{-5}$ mbar

Probenvorbereitung

Für die Untersuchung der inneren Struktur von Lyophilisaten wurden Vertikalschnitte von Tropfen angefertigt. Dafür wurden die Lyophilisate für 1 bis 2 Minuten in flüssigen Stickstoff eingetaucht und danach schnell mit einer Rasierklinge durchgeschnitten. Diese Prozedur wurde bei einer relativen Luftfeuchtigkeit unter 30% durchgeführt. Die Probe wurde auf den Aluminiumnieten befestigt.

Um das Anlösen der Lyophilisate durch das Leitsilber zu verhindern, wurde die Probe zuerst mit einer Goldschicht versehen. Danach wurde eine leitende Verbindung zwischen der Probe und den Aluminiumnieten durch die Leitsilbersuspension hergestellt und anschließend wurde die Probe noch einmal mit einer Goldschicht versehen. Die Untersuchung der Prägematrizen erfolgte ohne Probenpräparation, das Versehen mit einer leitenden Goldschicht ist hier nicht notwendig.

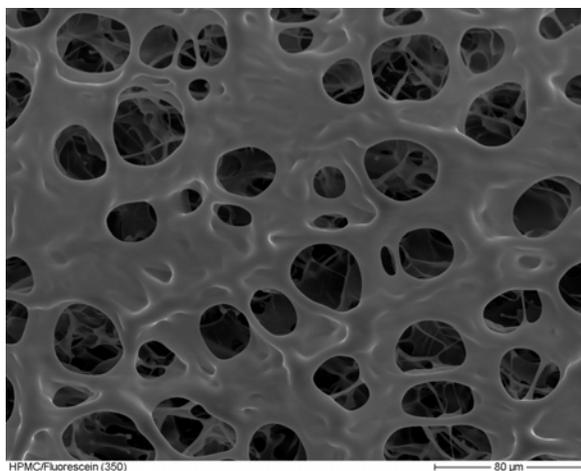
Bildanalyse

Die Bildanalyse wurde durchgeführt, um die Porengrößenverteilung von einigen OLCS REM-Aufnahmen zu bestimmen.

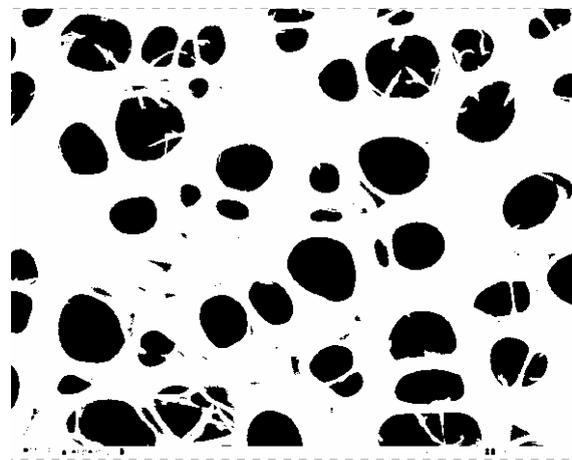
Software: Able Image Analyser™, Version 1.3b, Mu Labs, Ljubljana, Slowenien

Durchführung:

- Skalenkalibrierung. Einer bestimmten Distanz in Pixel wird eine Distanz in μm zugeordnet.
- Das Bild wird in den Schwarz-Weiß-Modus überführt (Abb.II-17). Bei Bedarf wird die Grauskalierung nachgestellt.
- Berechnung der schwarzen Flächen in Pixel und μm^2 .



a. REM-Aufnahme von OLCS



b. Schwarz-Weiß-Modus des Bildes

Abb. II-17: Bildanalyse von REM-Aufnahmen

II 3. Chemometrische und Statistische Auswertungsmethoden

II 3.1 Chemometrie

Zur quantitativen Auswertung der NIR-Spektren wird die Chemometrie eingesetzt, weil eine genaue Zuordnung der Banden zu bestimmten funktionellen Gruppen wegen den starken Schwingungsüberlagerungen von C-H, O-H und NH Gruppen nicht möglich ist [6]. Chemometrie ist ein multivariates Verfahren und dient der mathematischen Darstellung des Zusammenhanges zwischen den spektralen Daten und den chemischen und physikalischen Eigenschaften der untersuchten Substanz [58]. Am häufigsten werden Hauptkomponentenanalyse, Regression (Principal Component Analysis, PCA; Principal Component Regression, PCR) und Partial Least Square (PLS)-Regression verwendet [26, 27, 73].

In der PCA wird die ursprüngliche Datenmatrix X durch zwei kleinere Matrizen angenähert, die den Zusammenhang zwischen den Faktoren und den ursprünglichen Variablen beschreiben. Die Matrix T beinhaltet die komprimierten Daten aus der Matrix X, die Matrix P enthält die Regressionskoeffizienten. Dabei gilt folgender Zusammenhang:

$${}_nX^P = {}_nT^{d*} {}_dP^T + {}_nE^P, \quad (\text{Gl. II-1})$$

X – Datenmatrix aus n Zeilen (Proben) und p Spalten (Wellenlängen)

T – Faktorenmatrix („Score-matrix“) mit n Zeilen und d Spalten (Faktoren)

P – Ladungsmatrix mit d Zeilen und p Spalten

E – Residuen-Matrix mit n Zeilen und p Spalten

In der PCR wird durch eine Regression der kleinsten Fehlerquadrate von der Datenmatrix Y auf die Faktorenmatrix die Ladungsmatrix Q berechnet.

$${}_nY^m = {}_nT^{d*} {}_dQ^T + {}_nF^m, \quad (\text{Gl. II-2})$$

Y - Datenmatrix aus n Zeilen und m Spalten

T – Faktorenmatrix mit n orthogonalen Zeilen und d Spalten

Q - transponierte Ladungsmatrix mit d Zeilen und m Spalten

F – Residuen-Matrix mit n Zeilen und m Spalten

In der PCA werden die Faktoren nach der maximalen Varianz so berechnet, dass der erste Faktor die größte Varianz besitzt, der zweite die zweitgrößte Varianz, die durch vorhergehende Komponenten nicht erfasst wurde, usw. Bei der Berechnung der Faktorenmatrix T nach PLS beschreiben die Hauptkomponenten nicht nur die größte Varianz der X-Matrix, sondern weisen gleichzeitig auch die höchste Korrelation mit der Y-Matrix auf und enthalten damit auch die relevantesten Unterschiede hinsichtlich der Referenzwerte.

In dieser Arbeit wird zur Beschreibung einer Y-Variablen PLS angewendet.

II 3.1.1 Spektrenvorbehandlung

Die Spektrenvorbehandlung wird durchgeführt, um einerseits Störeffekte zu reduzieren und andererseits die wichtigen Unterschiede, die bei unbehandelten Spektren nicht deutlich sichtbar sind, hervorzuheben. Zu den Störeffekten gehören z.B. hohes Signal/Rausch-Verhältnis oder Verschiebung der Basislinie des Spektrums. Diese Störeffekte können z.B. durch unzureichende Auflösung des Gerätes, durch Korngrößenunterschiede oder durch Änderung der Probenpositionierung und –schichtdicke verursacht werden. In dieser Arbeit wurde bei NaHD-OLCS-Spektren die zweite Ableitung nach Savitzky-Golay mit der Segmentbreite von zehn Punkten und Polynomgrad 2 vorgenommen. Die Ableitungen verbessern die visuelle Auflösung der Spektren und vermindern die Basislinienverschiebung. Bei der Ableitung nach Savitzky-Golay wird in einem Segment der Kurve, dessen Größe frei wählbar ist, das Polynom berechnet. Aus der Ableitung des Polynoms ergibt sich ein neuer Datenpunkt, der in der Mitte des Segmentes liegt. So wird durch die schrittweise Verschiebung des Segmentes das gesamte Spektrum neu berechnet. Der Glättungseffekt hängt vom Polynomgrad und von der Segmentbreite ab. Je größer die Segmentbreite und je kleiner der Polynomgrad ist, desto ausgeprägter ist die Glättungswirkung.

II 3.1.2 Validierung

Die Validierung dient der Überprüfung der Robustheit und Zuverlässigkeit des NIR-Kalibrationsmodells. Am häufigsten werden Testvalidierung und Kreuzvalidierung verwendet. Wegen der geringen Anzahl der Spektren wurde in dieser Arbeit zur Beurteilung der Kalibrationsmodelle nur die Kreuzvalidierung eingesetzt. Hier werden alle Proben sowohl für die Kalibrierung als auch für die Validierung der Modelle

verwendet. Dabei wird ein Spektrum aus dem Datensatz entfernt und mit den restlichen Daten das Kalibrationsmodell berechnet. Dann wird dieses Modell zur Vorhersage der entfernten Daten verwendet. Dieser Vorgang wird so häufig wiederholt, bis alle Spektren einmal entfernt wurden.

Zur Beurteilung der Güte der Kalibrationsmodelle und Sicherheit der Vorhersage werden von der Software Unscrambler® NIR-Leistungsparameter berechnet [28].

SEC/SEP (standard error of calibration / standard error of prediction) beschreiben eine zufällige Streuung und werden nach der Formel berechnet.

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i^{pred} - y_i^{meas} - Bias)^2} \quad (\text{Gl. II-3})$$

Bei SEC werden für die Berechnung Kalibrationsdaten herangezogen, bei SEP die Werte des Validierungssets. SEC und SEP haben die Einheit der Y Variablen und sollen im Idealfall möglichst klein sein.

RMSE (root mean square error) beschreibt sowohl einen systematischen als auch einen zufälligen Fehler. Je nachdem, ob man die Werte des Kalibrierungs- oder Validierungssets verwendet, erhält man RMSEC (root mean square error of calibration) oder RMCEP (root mean square error of prediction). RMSE hat die Einheit der Y Variablen und soll im Idealfall möglichst klein sein.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i^{pred.} - y_i^{meas.})^2} \quad (\text{Gl. II-4})$$

Bias umfasst den systematischen Fehler des Modells, hat die Einheit der y-Variablen und soll im Idealfall nahezu null sein.

$$Bias = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i^{pred.} - y_i^{meas.}) \quad (\text{Gl. II-5})$$

Bestimmtheitsmaß (R^2) und Korrelationskoeffizient (r) bestimmen den Anteil der Summe der der Quadrate der Abweichungen, der durch die Hauptkomponenten erklärt wird.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{pred.} - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i^{meas.} - \bar{y})^2} \quad (\text{Gl. II-6})$$

Der Regressionskoeffizient wird als Wurzel aus dem Bestimmtheitsmaß bestimmt.

$$r = \sqrt{(R^2)} \quad (\text{Gl. II-7})$$

II 3.2 Faktorenversuchsplanung

Die meisten Experimente wurden als Faktorenversuchspläne mit Hilfe des Programm JMP IN erstellt und ausgewertet [35]. Die jeweiligen Faktorenversuchspläne und die dazugehörigen Modellgleichungen sind in entsprechenden Kapiteln zusammen mit den Ergebnissen dargestellt. Für die Auswertung wurden die Varianzanalyse und „Lack of Fit-Test“ des Modells, der Effekt-Test und die Bestimmung der Koeffizienten der Modellgleichung herangezogen.

II 3.2.1 Varianzanalyse des Modells

Bei der Varianzanalyse des Gesamtmodells wird die statistische Anpassung der Ergebnisse durch das Modell mit der Beschreibung der Daten durch den Mittelwert (MW) verglichen. Ist das Signifikanzniveau (p) entsprechend klein, sind die Ergebnisse durch das Gesamtmodell besser angepasst als nur durch den MW.

II 3.2.2 „Lack of Fit“- Test

Der „Lack of Fit“- Test wird bei mehrfachen Wiederholungen der Messungen durchgeführt. Hier wird der Zufallsfehler („pure error“) mit dem Fehler der mangelhaften Anpassung („Lack of Fit“) verglichen. Ein signifikantes Ergebnis des „Lack of Fit“-Tests weist daraufhin, dass zusätzliche Faktoren, die einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße haben können, nicht im Modell enthalten sind oder dass die Daten besser an ein Modell mit höherem Polynomgrad angepasst werden sollten.

II 3.2.3 Effekt-Test

Die Nullhypothese beim Effekt-Test lautet: der Effekt ist gleich Null. Der F-Wert ist die mittlere Summe der Abweichungsquadrate des Effektes geteilt durch die mittlere

Summe der Abweichungsquadrate des Fehlers. Ist das Signifikanzniveau kleiner als 0,05, hat der Effekt einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße.

III Ergebnisse

III 1 Innovative Gefriertrocknungstechnik

III 1.1 Zielsetzung und Konzept für die Entwicklung einer schnellen Gefriertrocknungstechnik mit präzise kontrollierten Herstellungsbedingungen

Zu Beginn der Entwicklung wurden die OLCS in einem konventionellen Laborgefrierdrockner hergestellt [24, 98]. Dabei war die Variabilität der Haftfestigkeit sowohl innerhalb einer Charge als auch zwischen verschiedenen Chargen groß, weil die Herstellungsbedingungen nicht vollständig kontrolliert werden konnten [98]. Die Nachteile der konventionellen Gefriertrocknungstechnik wurden bereits im Kapitel I 1 beschrieben. Gegenstand dieser Arbeit waren Designentwicklung und Konzeptprüfung einer innovativen Gefriertrocknungstechnik für die Herstellung von OLCS. S. Maier entwickelte in seinem Promotionsprojekt einen Mini-Gefrierdrockner [52], mit dem die Herstellungsbedingungen besser reproduziert werden konnten als in konventionellen Laborgefrierdrocknern. Durch die Herstellung jeweils eines Lyophilisates in einer kleinen Trockenkammer konnte er die Haftfestigkeit deutlich besser reproduzieren. Um die Trocknung zu beschleunigen, wurden folgende technische Neuerungen eingeführt:

- Verkleinerung des Volumens der Trockenkammer
- Energiezufuhr durch Strahlung
- Trocknung im Feinvakuum (unter 0,01mbar)
- Extreme Temperaturgradienten zwischen der Probe und dem Kondensator.

Die Geschwindigkeit des Einfriervorganges nach der „snap-freezing“-Technik wurde durch die Stellung eines Feinvakuumventils eingestellt. Als Prozessparameter konnten Druck und Kerntemperatur des Tropfens kontrolliert werden. Die im Vorgängerprojekt verwendete Anlage wurde als Einzelanfertigung in den Werkstätten der Pharmazeutischen Technologie und des Instituts für Strahlen- und Kernphysik gebaut. Eine GMP-gerechte Herstellung von OLCS war mit dieser Anlage nicht durchführbar. Die Reinigung der Anlage, die teilweise aus dem Polyacrylschaumstoff, wie Rohacel[®], bestand, war problematisch. Die Lyophilisate konnten nicht unter aseptischen Bedingungen hergestellt werden, weil der

Kühlmittelbehälter von der Trockenkammer räumlich nicht abgetrennt war und die Sterilisation der Einzelteile der Anlage nicht möglich war. In dieser Arbeit wurde die Anlage unter Beibehalt des Prinzips weiterentwickelt. Bei der Designplanung wurden folgende Ziele verfolgt

- Flexibilität der Anlage und Verwendung von Standardbauteilen aus der Vakuumtechnik
- Designkonzept für die aseptische Herstellung
- Präzise Kontrolle der Herstellungsbedingungen
- Kurze Trocknungszeiten
- Übergang von der Chargenherstellung zum quasi-kontinuierlichen Prozess
- Vermeidung des Scale-up

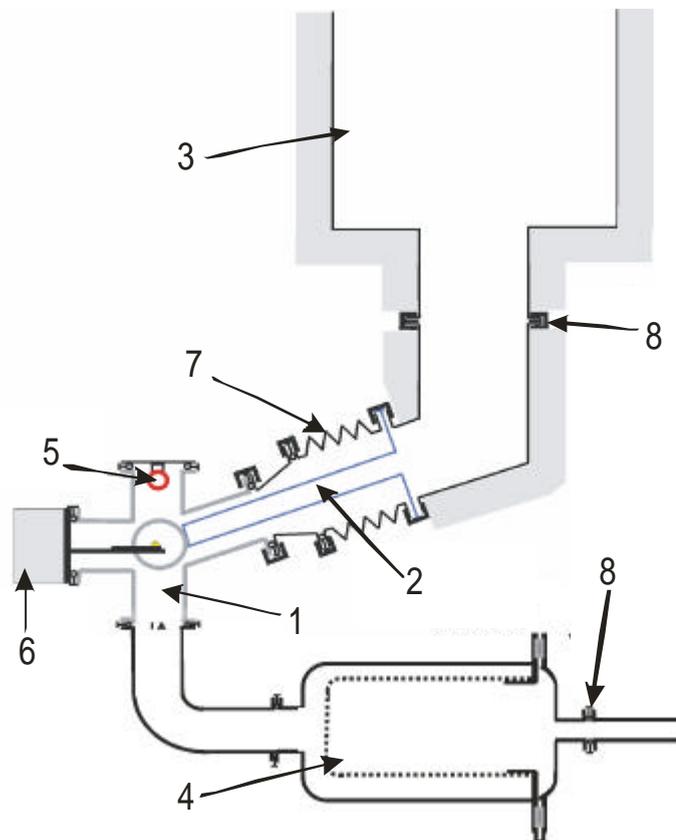


Abb. III-1: Schematische Darstellung der Anlage

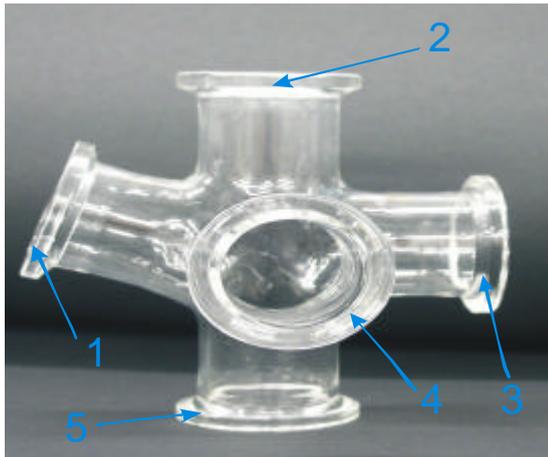
1 – Trockenkammer, 2 – Kondensator, 3 – Kühlmittelbehälter, 4 – Gasfilter, 5 – Heizung, 6 – OLCS-Verschluss, 7 – flexibler Federungskörper, 8 – Trennstellen für die Sterilisation

Im Folgenden werden die wichtigsten Bestandteile der Anlage näher beschrieben.

Die Lyophilisate werden auch hier einzeln unter genau kontrollierten Herstellungsbedingungen gefertigt. Die wesentlichen Teile der Anlage sind Industriestandardvakuumteile der Firma Ilmvac GmbH, Ilmenau und nur die die Trockenkammer, der Kondensator und der Verschluss waren Sonderanfertigungen. Durch mechanische Enteisung des Kondensators oder durch den Wechsel des Kühlaufsatzes auf dem Kondensator kann das Kondensat nach jeder Trocknung schnell entfernt und der Prozess quasi-kontinuierlich gestaltet werden. Um die Produktionskapazität zu vergrößern, können mehrere Kammern parallel betrieben werden. Ist der Prozess für eine Kammer entwickelt, so ist kein Scale-up erforderlich, um die Produktion im größeren Maßstab durchzuführen. Beim Ausfall einer oder mehreren Trockenkammern können die restlichen Kammern weiter benutzt werden. Abbildung III-1 zeigt eine schematische Darstellung der Anlage.

Trockenkammer

Die Trockenkammer ist aus Borosilikatglas gefertigt (Glasbläserei, H. Eich, Bonn) und hat ein Gesamtvolumen von ca. 150ml. Sie besteht aus fünf DN25 Flanschen. Die Flansche dienen zum Anschluss des Vakuum- und Belüftungssystems, des Kondensators, des Heizelementes, zum Beladen und Entladen der Probe und zur Prozessüberwachung (Kontrolle der Oberflächentemperatur oder des Restwassergehaltes durch NIRS). Der Laborprototyp IIb der Gefriertrocknungsanlage wurde mit zwei Typen der Trockenkammern betrieben, die sich in der Anordnung der Flansche unterscheiden. Der Typ A ist für die in-line Überwachung des Restwassergehaltes und der Typ B für die in-line Kontrolle der Oberflächentemperatur bestimmt. Beim Kammertyp A sind der Seitenflansch und der obere Flansch im rechten Winkel angeordnet. Beim Kammertyp B sind die beiden oberen Flansche in einem Winkel von 30° angebracht. Der Anschluss des Vakuum- Belüftungssystems erfolgt beim Kammertyp A an dem seitlichen Flansch, beim Kammertyp B an dem unteren Flansch. Der Flansch für den Fingerkondensator ist bei den beiden Kammern um Winkel 15° gegen die Wagerechte geneigt, weil diese Steigung für die Entlüftung des Kondensators notwendig ist.



Typ A: für Überwachung des Restwassergehaltes durch NIRS



Typ B: für Überwachung der Oberflächentemperatur des Tropfens

Abb. III-2: Trockenkammer

- 1 – Flansch zum Einführen des Kühlfingerkondensators,
- 2 – Flansch zum Anschluss des Heizelementes (Halogenlampe),
- 3 – Flansch zum Beladen und Entladen der Proben,
- 4 – Flansch zum Anschluss des Vakuum- Belüftungssystems,
- 5 – Flansch zum Anschluss des NIR-Sensors,
- 5* - Flansch zum Anschluss des Zink-Selenide-Fensters

Kondensator

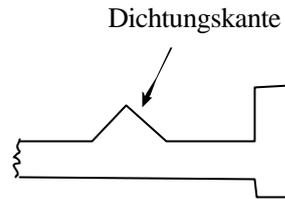
Um eine hohe Trocknungsgeschwindigkeit zu erreichen, soll der Abstand zwischen dem Kondensator und der Probe der mittleren freien Weglänge der Wassermoleküle beim Endvakuum der Trocknungsphase entsprechen. Um den Trocknungsprozess weiter zu beschleunigen soll der Temperaturgradient zwischen der Probe und dem Kondensator möglichst groß sein.

Der Kondensator ist als Kühlfinger ausgeführt und wurde durch die Werkstatt der Pharmazeutischen Technologie (Universität Bonn) aus vorgefertigten Standardteilen gefertigt. Dabei handelt es sich um ein an einer Seite geschlossenes Kupferrohr (Länge 120 mm, Durchmesser 12 mm, Wandstärke 1mm) mit einer DN 40 Dichtplatte (Fa. Klein, Sankt Augustin) an der anderen Seite für den Anschluss an das Kühlsystem. Der Kühlfinger befindet sich in der Trockenkammer im 2-3 cm von der Probe entfernt und wird mit flüssigem Stickstoff gefüllt (Abb. III-3). Er ist wegen seiner Neigung selbst entlüftend. Kupfer hat gute wärmeleitende Eigenschaften und kann durch seine gute Verformbarkeit als Dichtung bei niedrigen Temperaturen verwendet werden. Dabei dient eine scharfe Kante an der DN 40 Dichtplatte als

Dichtungsstelle. Der Nachteil solcher Metaldichtungen ist, dass sie nur ein Mal verwendet werden können.



Dichtungskante



Schematische Darstellung der Dichtungsstelle am Kühlfinger

Abb. III-3: Kühlfinger

Um den Prozess kontinuierlich zu gestalten, wird auf dem Kühlfinger ein wechselbarer Kühlaufsatz angebracht (Abb. III-4) oder die Kühlfläche des Kondensators kann nach jeder Trocknung mechanisch enteist werden. Zwischen das Kühlsystem und die Trockenkammer wird ein flexibler Federungskörper aus Edelstahl als Wärmewiderstand eingebaut.

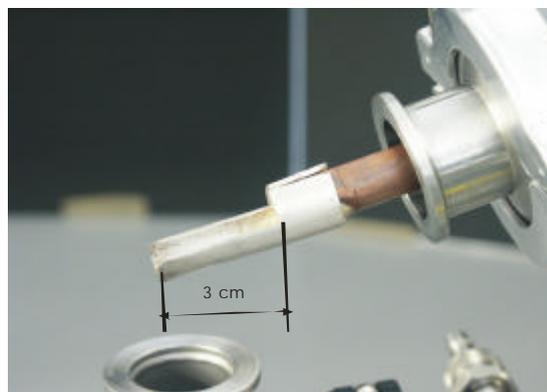


Abb. III-4: Kühlfingerkondensator mit dem Kühlaufsatz aus Silber

Heizung

Die zur Verdampfung des Wassers erforderliche Sublimationsenergie wurde dem Produkt als Wärmestrahlung zugeführt. Als Quelle diente ein Heizelement im oberen Flansch. Im Prototyp I und IIa wurde ein Glühdraht als Heizelement verwendet, im Prototyp II b wurde er durch eine Halogenlampe ersetzt.

Vakuum- und Belüftungssystem

- Vakuumpumpe Trivac D8A, Firma Leybold-Heraus, Köln
- Gassterilfilter:
 - Filtergehäuse Modell 7M19LSB00040, Sartorius, Göttingen
 - Filterpatrone, Sartofluor® 518 LG,0,2 m, Sartorius, Göttingen
- Feinvakuumventil Gasdosierventil EVN 116, Pfeifer Vacuum GmbH, Asslar
- Elektromagnetische Durchgangsventile VS mit DN16 Anschlüssen, Ilmvac, Ilmenau

Da die Energie der Probe durch Strahlung zugeführt wird, ist das Restgas nicht für die Wärmeübertragung erforderlich und die Trocknung kann im Feinvakuum (<0,01 mbar) stattfinden. Die Probe wird vakuuminduziert eingefroren (snap freezing). Dabei wird Evakuiergeschwindigkeit durch die Stellung des Feinvakuumventils eingestellt. Ist die Trocknung abgeschlossen, wird die Anlage mit Stickstoff bei schwachem Überdruck von ca. 50 mbar durch den Sterilfilter belüftet. Die Umschaltung zwischen Evakuierung und Belüftung erfolgte im letzten Laborprototyp der Anlage automatisch mittels Magnetventilen.

III 1.2 Entwicklungsgang der Gefriertrocknungsanlage

III 1.2.1 Prototyp I

Mit dem ersten Laborprototyp wurde das Funktionsprinzip der Anlage getestet (Abb. II-5 und III-6). Teile, die in Kontakt mit Stickstoff waren (Kühlmittelbehälter und Verbindungsrohr), wurden von außen mit Styropor isoliert und mit Aluminiumblech verkleidet. Auf dem Kühlfinger wurde ein Kühlaufsatz aus Kupfer angebracht. Als Heizelement diente eine Drahtspirale (NiCr, Durchmesser 0,2 mm, Proxxon®) mit einer Gesamtlänge von 10 cm. Die Einschaltung der Heizung in der Trocknungsphase, sowie die Regulierung der Heizleistung erfolgten manuell über einen Transformator. Während der Trocknung wurden Kerntemperatur, Oberflächentemperatur und Kammerdruck kontrolliert. Die Datenerfassung erfolgte über die „32 Kanal Monitor“-Software (Ingenieurbüro Hucke, Solingen). Am Ende der Trocknung wurde die Anlage durch manuelle Betätigung des Kugelhahns mit Stickstoff belüftet.

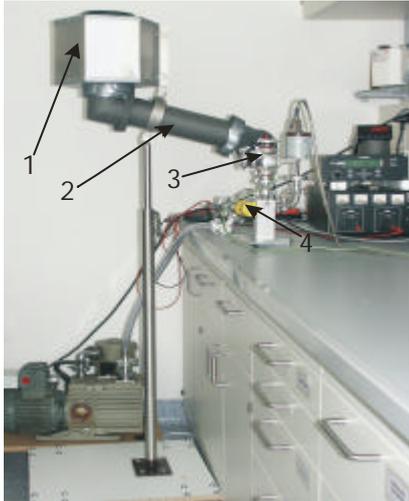


Abb. III-5: Prototyp I

- 1 – Kühlmittelbehälter,
- 2 – Verbindungsrohr,
- 3 – Trocknungskammer
- 4 - Feinvakuumventil

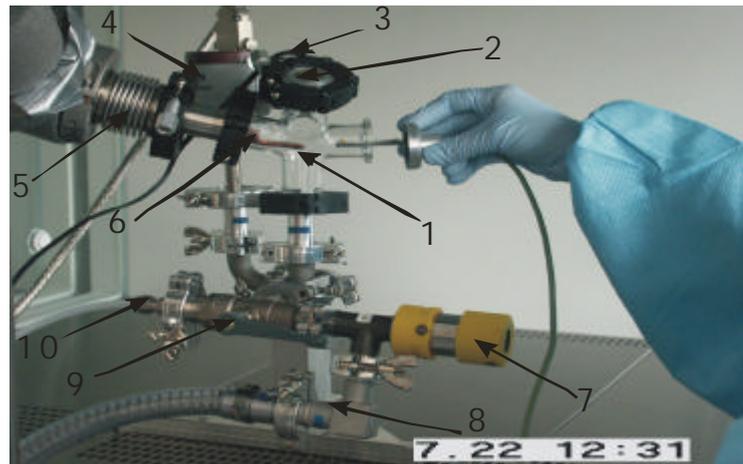


Abb. III-6: Trocknungskammer unter der LAF-Werkbank mit OLCS auf der Trägerplatte des Verschlusses

- 1 – Trocknungskammer, 2 – Zink-Selenid-Fenster,
- 3 – Heizung, 4 – Vakuumsensor, 5 – flexibler Federungskörper, 6 – Kühlaufsatz aus Kupfer, 7 – Feinvakuumventil, 8 – Vakuumanschluss, 9 – Kugelhahn, 10 - Stickstoffgasanschluss

Bei den ersten Vorversuchen wurden folgende Probleme festgestellt:

- Durch das manuelle Umschalten zwischen dem Evakuieren und dem Belüften der Trocknungskammer, sowie durch das manuelle Einschalten der Heizung war die Trocknungsdauer nicht exakt reproduzierbar
- Beim Belüften der Trockenkammer mit Stickstoffgas bestand die Gefahr der mikrobiellen Kontamination des Produktes
- Die Heizleistung war nicht ausreichend und die Heizdrähte brannten häufig durch

III 1.2.2 Prototyp IIa und IIb

Steuerungssoftware: EASY-SOFT5, Moeller GmbH, Bonn

Datenerfassungssoftware: 32-Kanal-Monitor, Hücke Software, Solingen [36]

Laborprototyp IIa

Der zweite Laborprototyp diente der Herstellung von kleinen OLCS-Chargen für Forschungszwecke. Die Anlage hatte zwei Trocknungskammern mit unabhängigen Kühlsystemen und einem gemeinsamen Vakuum-Belüftungssystem (Abb. III-7). Die manuelle Tätigkeit beschränkte sich nur auf das Beladen und Entladen der

Trocknungskammer. Die Umschaltung zwischen Evakuierung und Belüftung der Trocknungskammer und damit auch die Dauer der Einfrierphase und der Trocknungsphase erfolgten über Magnetventile und war durch die Software (EASY-SOFT5) kontrolliert. Das Schema des Herstellungszyklus und der automatischen Ablaufsteuerung sind in den Abbildungen III-8 und III-9 dargestellt. Die Kammern starten zeitlich versetzt, so dass eine Kammer dann evakuiert werden kann, wenn die Einfrierphase in der anderen abgeschlossen ist.

Zwischen der Trocknungskammer und dem Vakuum-Belüftungssystem wurde ein Gasfilter eingebaut. Der Kühlaufsatz aus Kupferblech wurde durch den Kühlaufsatz aus Silber (Juwelier Kripp, Bonn Bad Godesberg) ersetzt (Abb. III-4). Der Draht der Heizspirale wurde durch einen oxidationsbeständigen Draht (Chromaloy O[®], Fe75/Cr20/Al5, Durchmesser 0,25 mm, Fa. Godfellow) ersetzt. Um die Strahlung fokussiert auf den Tropfen zu richten, wurde um die Heizspirale herum ein Schirm aus Aluminiumblech gebaut (Abb. III-10). Die Heizleistung wurde über die angelegte Spannung und Stromstärke reguliert, die Heizung wurde automatisch über die Steuerungssoftware ein- und ausgeschaltet. Im Laufe der Trocknung konnte die Heizung automatisch zwischen zwei Stufen umgeschaltet werden, so dass unterschiedliche Heizleistungen in der Haupt- und Sekundärtrocknung möglich waren. Alle Lyophilisate für diese Arbeit wurden bei einer konstanten Heizleistung hergestellt.

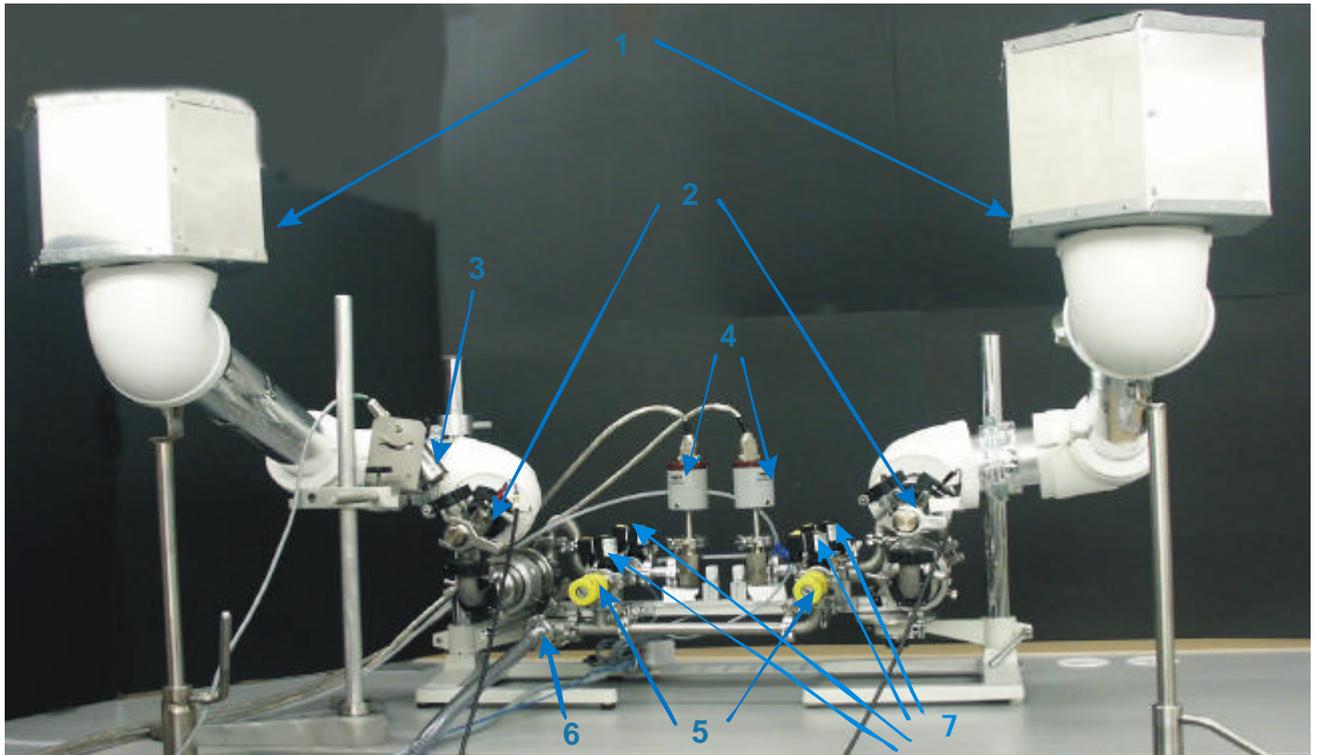


Abb. III-7: Laborprototyp IIa mit zwei Trocknungskammern

- 1 – Kühlmittelbehälter, 2 – Trocknungskammer, 3 – IR-Thermometer,
 4 – Vakuumsensor, 5 – Feinvakuumentile, 6 – Vakuumanschluss, 7 – Magnetventile

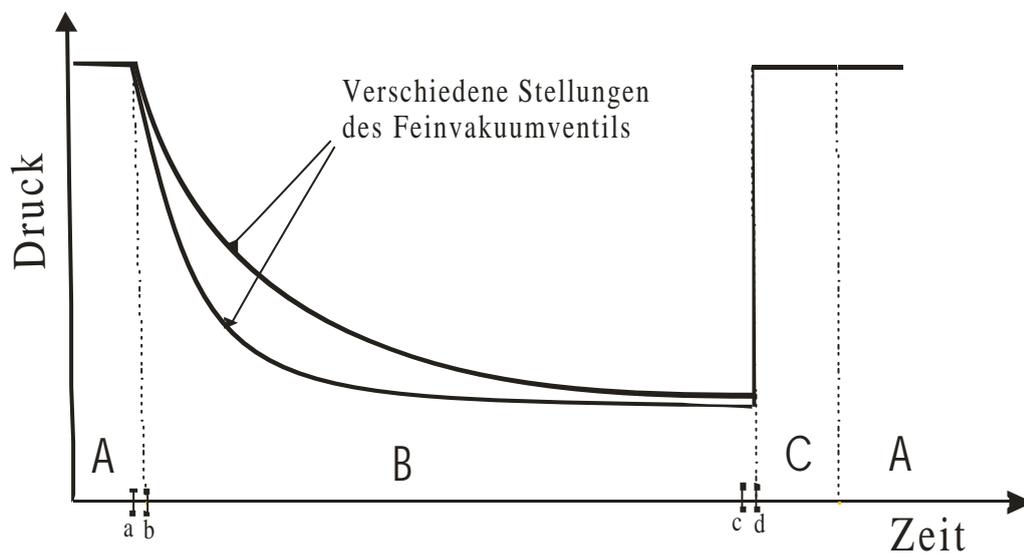


Abb. III-8: Schematische Darstellung des Herstellungszyklus von OLCS:

- A – Beladen der Trocknungskammer, B – Gefriertrocknungszyklus,
 C – Entladen der Trocknungskammer
 a – Magnetventil zum Belüften ist geschlossen,
 b – Magnetventil zum Evakuieren ist offen,
 c – Magnetventil zum Evakuieren ist geschlossen,
 d – Magnetventil zum Belüften ist offen

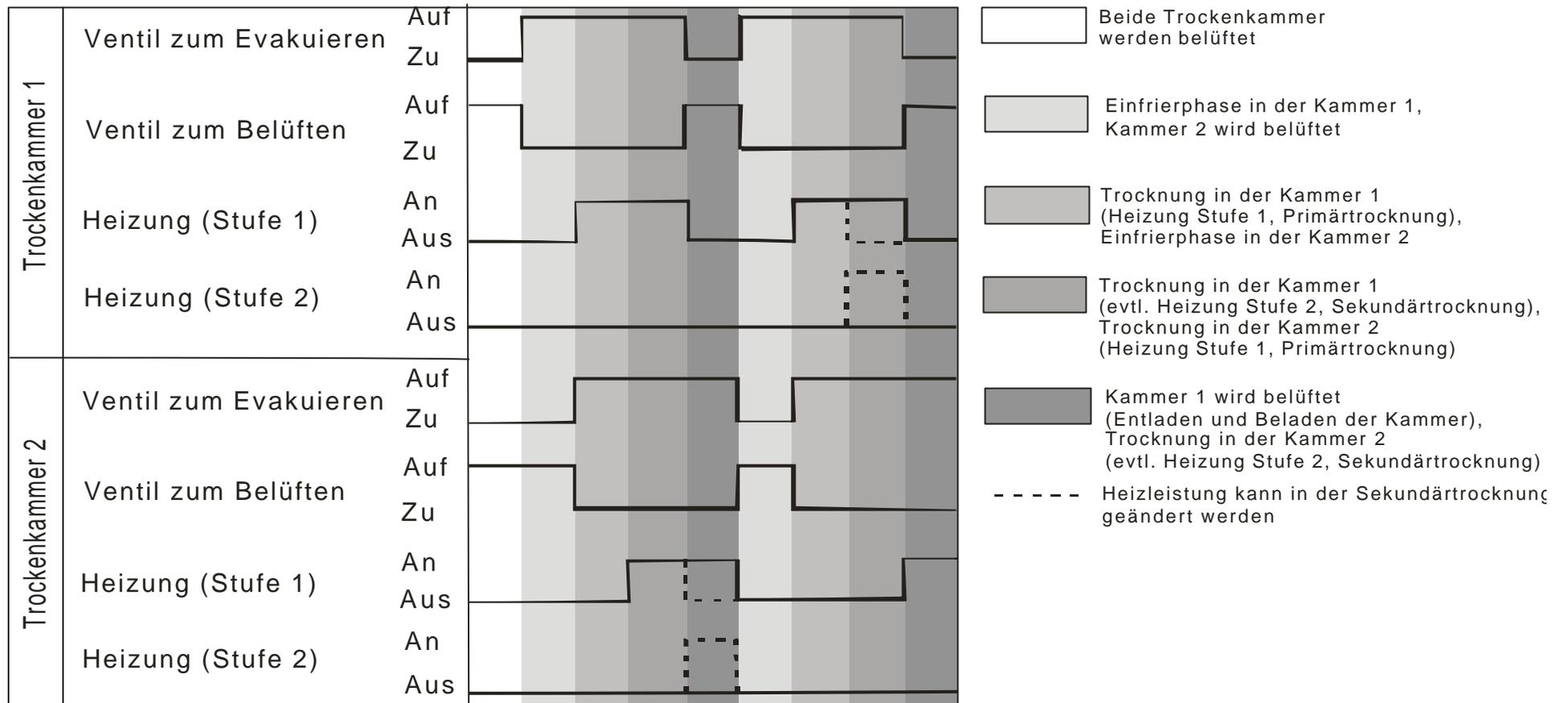


Abb.III-9: Umschalteschema der automatischen Ablaufsteuerung



Abb. III-10: Heizspirale mit dem Schirm aus Aluminiumblech

Prototyp IIb

Im Prototyp IIb wurde statt der Heizspirale eine Halogenlampe (Halostar Starlite®, 50 W, Osram, Augsburg) eingebaut. Sie diente gleichzeitig als Energiequelle für die Trocknung und als Lichtquelle für die Restfeuchtebestimmung mittels NIRS (s. Kapitel III 1.4.7). Sie stellt weniger Risiken als die Heizdrähte bei der aseptischen Herstellung dar.

III 1.3 Konzept für die aseptische Herstellung

Der Kühlmittelbehälter ist räumlich von der Trockenkammer abgetrennt und kann sich im Reinraum Klasse B oder C befinden. Die Trockenkammer und die Teile, die für die aseptische Herstellung kritisch sind, können unter der LAF-Werkbank (Reinraum Klasse A in B) oder in einem Isolator (Reinraum Klasse A in C) betrieben werden. Diese Teile (Trockenkammer und Zubehör) werden vor der Produktion abgebaut (Abb. III-1), gereinigt, wieder zusammengebaut und doppelt in Autoklavierfolie eingeschweißt. Die Teile werden dampfsterilisiert und unter der LAF-Werkbank oder in einem Isolator zusammengebaut. Vor der Inbetriebnahme der Anlage wird sie auf Vakuumdichtigkeit überprüft. Die maximale Leckrate wird im Rahmen der Qualifizierung und Validierung der Anlage festgelegt, um eine erforderliche Evakuiergeschwindigkeit zu gewährleisten und die mikrobiologische

Qualität des Produktes durch eindringende Luft nicht zu gefährden. Die Integrität des Filters wird vor und nach der Produktion geprüft (Abb. III-11).

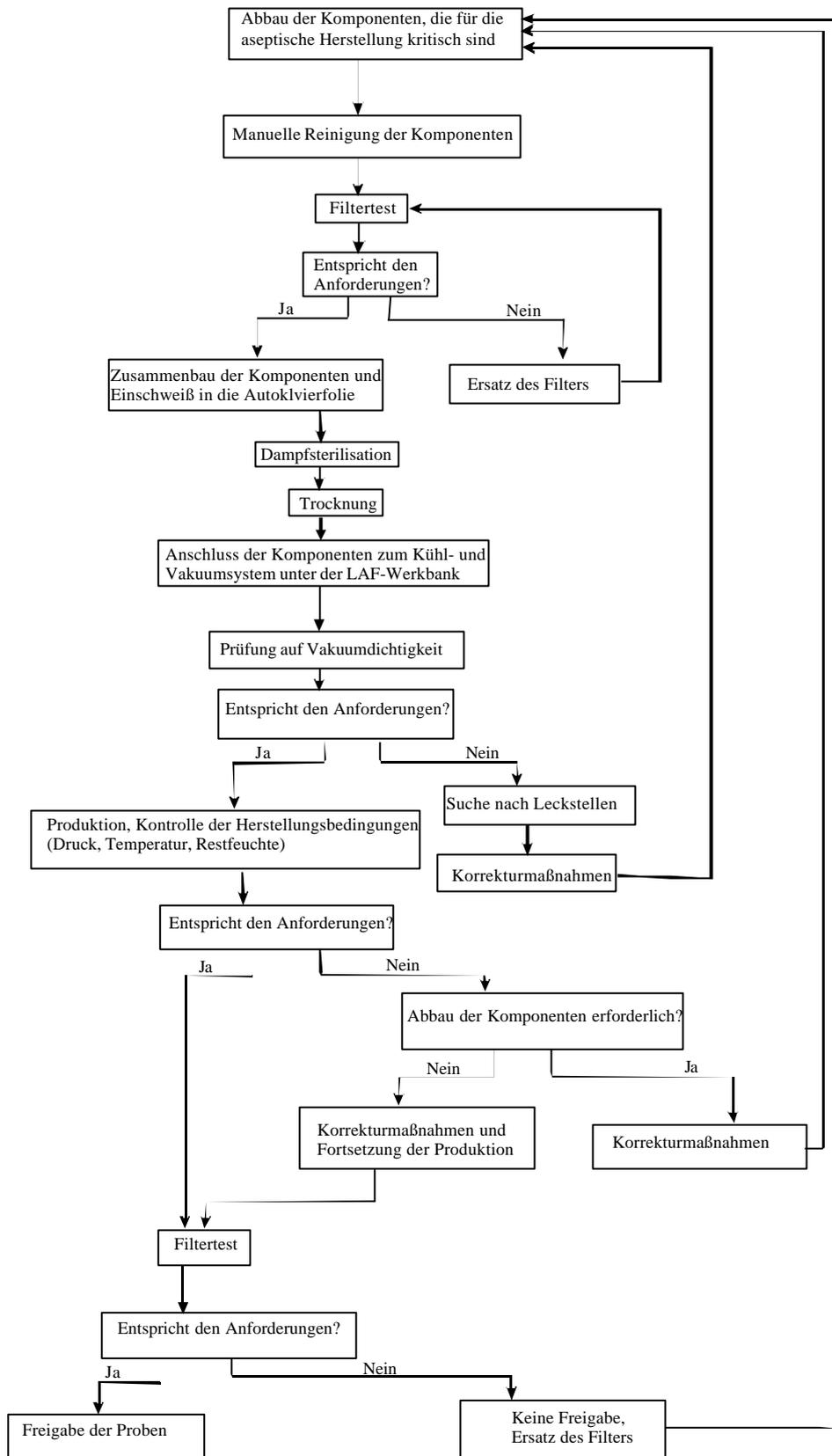


Abb. III-11: Arbeitsablauf bei der aseptischen Herstellung von OLCS inklusive der Vorbereitung der Anlage

III 1.4 Kontrolle der Herstellungsbedingungen

III 1.4.1 Kerntemperatur des Tropfens

Geräte

Thermoelement Ni/Cr-Ni, Jumo (Messkopf 0,5 mm, Messbereich -200°C bis 1150°C)
Temperaturmessgerät INFINITY INFT 1001, Newport Electronics (Messbereich -200°C bis 900°C, Auflösung 0,1°C, Genauigkeit 0,6 °C)

Die Messung der Kerntemperatur des Tropfens wurde bereits von S. Maier beschrieben. Das Thermoelement wurde auf der unteren Seite des OLCS-Verschlusses vakuumdicht eingebaut und der Messkopf über ein kleines Loch (Durchmesser 2 mm) in die obere Seite des Verschlusses geführt und so befestigt, dass er ca. 1 mm über dem Verschluss ist. Die untere Seite des Verschlusses wurde mit einer dünnen Schicht Rohacef[®] isoliert.

Die PTFE-Folie des OLCS-Applikators wurde mit einer Nadel perforiert und auf den Verschluss gelegt. Das Thermoelement wurde vorsichtig mit einer Pinzette durch das Loch der PTFE-Folie eingedrückt. Der Tropfen wurde auf der PTFE-Folie so aufgebracht, dass das Thermoelement möglichst in der Mitte des Tropfens lag (Abb. III-12).



**Abb. III-12: Thermoelement eingebettet in den Tropfen
auf der Trägerplatte des Verschlusses**

Diese Methode diente der Prozessentwicklung und Prozessvalidierung. Für die Prozessüberwachung ist sie nicht geeignet, weil die aseptische Herstellung nicht mehr sichergestellt werden kann. Außerdem können die Oberfläche und Wärmekapazität des Thermoelements den Kristallisationsprozess beeinflussen.

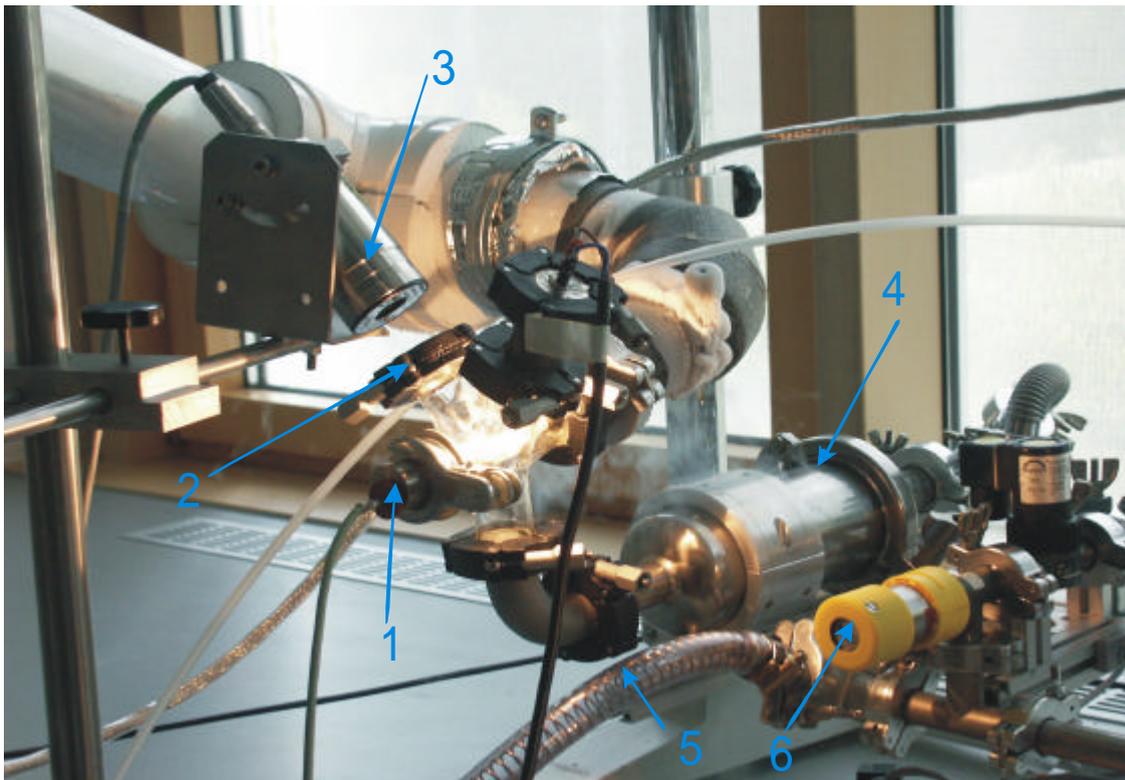
III 1.4.2 Oberflächentemperatur

Geräte

Infratherm Pyrometer IN 5 plus, Impac

Messbereich -32°C bis 900°C ,

Das IR-Thermometer (Pyrometer) wurde auf einem Stativ befestigt (Abb. III-13). Es arbeitet rein passiv indem es über seine Linse die Wärmestrahlung vom Objekt aufnimmt und sie in elektrische Signale umwandelt.



**Abb. III-13: Gefriertrocknungsanlage mit der Trockenkammer
für die Messung der Oberflächentemperatur**

- 1 – Verschluss, 2 – Zink-Selenid-Fenster,
3 – IR-Thermometer, 4 – Sterilgasfilter,
5 – Vakuumanschluss, 6 - Feinvakuumventil

Das Messfeld hängt von der Entfernung zum Objekt ab (Abb. III-14). Für die Messung der Oberflächentemperatur an einem OLCS wurde ein Abstand von 100 mm gewählt. In diesem Fall hat das Messfeld 2 mm Durchmesser (Durchmesser des Tropfens ca. 4 mm). Mit dem Laserpilotlicht kann das IR-Thermometer auf den Tropfen ausgerichtet werden.

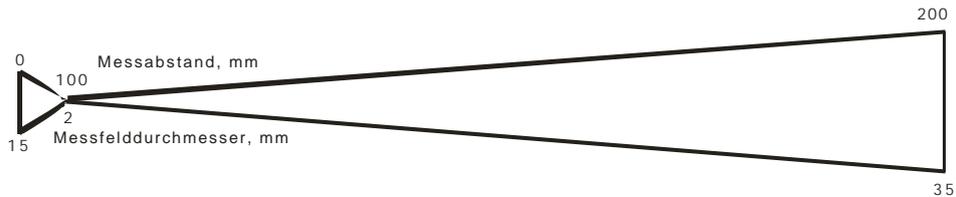


Abb. III-14: Messfeld in Abhängigkeit von der Entfernung zum Objekt (ohne Maßstab)

Bei der Kalibrierung des IR-Thermometers muss der Emissionsgrad der Substanz eingestellt werden. Dies geschieht durch den Vergleich mit einem Berührungsthermometer oder durch die Temperaturmessungen von Substanzen mit einem bekannten Emissionsgrad. Da die Emissionseigenschaften des Tropfens davon abhängen, ob er noch flüssig, gefroren oder bereits oberflächlich getrocknet ist, sind die Emissionswerte variabel. Für die Temperaturmessung wurde der in der Bedienungsanleitung empfohlene Emissionsgrad für Wasser (0,95) eingestellt.

III 1.4.3 Kontrolle des Druckverlaufs

Zur Druckmessung wurde ein kapazitiver Druckaufnehmer verwendet

Geräte

Absolutdruckaufnehmer MKS Baratron Typ 626

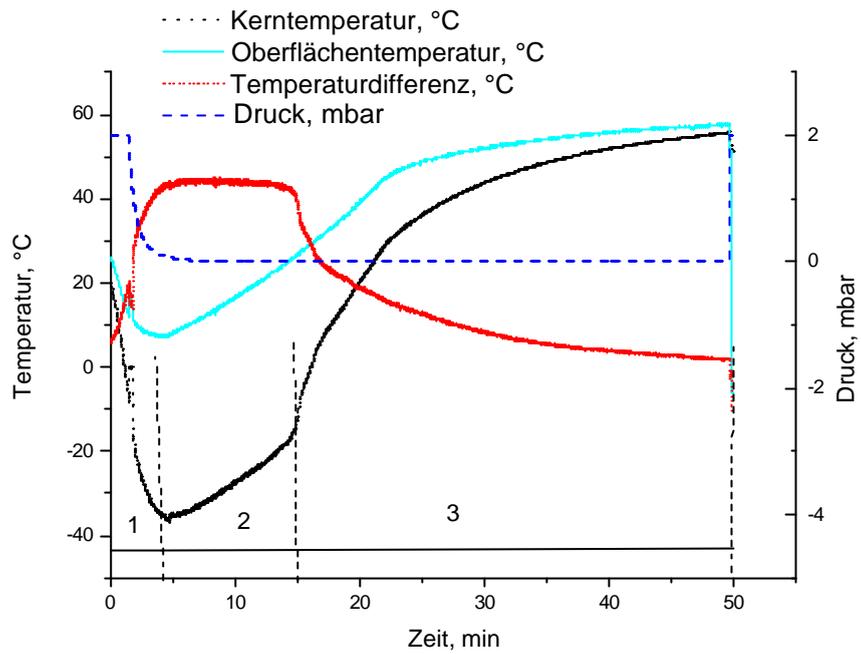
Betriebsgerät Typ PR 4000 S

III 1.4.4 Beurteilung der Temperatur-/Druckprofile

Abbildungen III-15 und III-16 zeigen Beispiele für Temperatur- und Druckprofile. Die drei Phasen der Gefriertrocknung sind an den Temperaturprofilen deutlich erkennbar. Der Gefriertrocknungszyklus wird am Beispiel des Temperatur-/Druckprofils in Abbildung III-15 erklärt. Am Anfang zeigt das Thermoelement 20°C und das IR-Thermometer 23 °C. Wird die Kammer evakuiert, verdampft ein Teil der Flüssigkeit von der Tropfenoberfläche und der Verlust der Verdunstungs- und Sublimationsenergie kühlt die restliche Flüssigkeit ab. Je nach Evakuiergeschwindigkeit wird weitere Wärme dem Tropfen durch das kalte Gas entzogen, das durch den Fingerkondensator gekühlt wird. Die Kerntemperatur sinkt bis -14°C, die Oberflächentemperatur nur bis etwa 3°C. Die Lösung ist unterkühlt. Werden Kristallisationskeime gebildet, so wird Wärme freigegeben und beide Temperaturen steigen sprunghaft an. Die Lösung gefriert. Das Thermoelement zeigt dabei eine

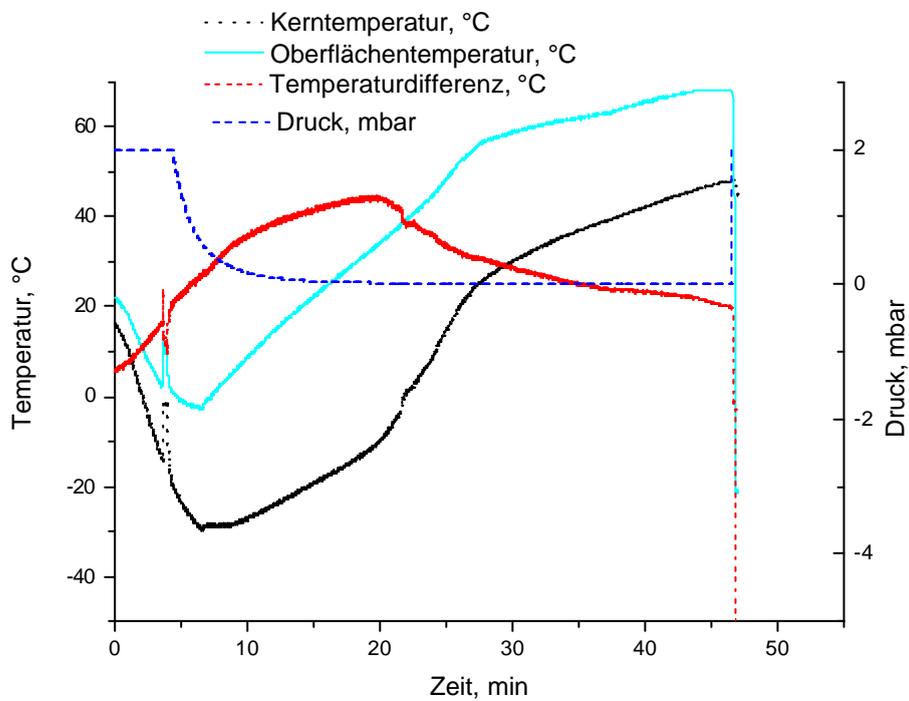
Temperatur von etwa -1°C . Nachdem die Probe durchgefroren ist, sinkt die Temperatur schnell wieder. Ab etwa -35°C beginnt die Haupttrocknung. Um den Energieverlust zu kompensieren wird die Heizung eingeschaltet. Die Temperatur nimmt im Laufe der Haupttrocknung langsam zu, bleibt aber deutlich unter der Kollapstemperatur. Ist das Eis vollständig sublimiert, steigt die Kerntemperatur schnell an und es beginnt die Sekundärtrocknung. In dieser zweiten Trocknungsphase wird Haft- und Hydratwasser entfernt.

In Abbildungen III-1 und III-16 wurden die Temperaturdifferenzen zwischen der Oberflächentemperatur und der Kerntemperatur gegen die Zeit aufgetragen. Am Anfang des Prozesses betragen die Unterschiede nur wenige Grad. Während des Einfrierens sinkt die Kerntemperatur tiefer als die Oberflächentemperatur und die Temperaturdifferenz wird damit größer. Obwohl der Abstand zwischen den beiden Messpunkten nur etwa 1 bis 2 mm beträgt, werden in der Haupttrocknung Temperaturdifferenzen über 40°C beobachtet. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich schon in der Einfrierphase auf der Oberfläche des Tropfens eine trockene Schicht bildet und Lyophilisate als porösen Körper gute thermische Isolatoren sind. Ist die Haupttrocknung abgeschlossen, steigt die Kerntemperatur schneller an und die Temperaturdifferenz wird kleiner. Im Idealfall ist die Temperaturdifferenz am Ende des Prozesses gleich Null. In manchen Fällen betragen die Temperaturdifferenzen während der Sekundärtrocknung etwa 20°C (Abb. III-16). Dies kann durch nicht exakte Positionierung des IR-Sensors oder Thermoelements erklärt werden. Trotz der Unterschiede sind die beiden Temperaturprofile sehr ähnlich und die Oberflächentemperatur kann für die Prozessüberwachung verwendet werden.



**Abb. III-15: Beispiel für ein Temperatur-/ Druckprofil
(HF- OLCS, Ventilstellung 600)**

1- Einfrierphase, 2 – Haupttrocknung, 3 - Sekundärtrocknung



**Abb. III-16: Beispiel für ein Temperatur-/ Druckprofil
(HF-OLCS, Ventilstellung 530)**

Abbildung III-17 zeigt als Beispiel ein Temperatur-/Druckprofil, wenn zwei Trockenkammern gleichzeitig betrieben werden. Die Oberflächentemperatur von OLCS wurde in einer und der Druck in beiden Trockenkammern gemessen. Der Ablauf des Gefriertrocknungszyklus ist so programmiert, dass der Prozess in der ersten Trockenkammer erst dann beginnen kann, wenn die Einfrierphase in der zweiten Trockenkammer abgeschlossen ist, und umgekehrt. Wird der Prozess in einer Trockenkammer gestartet, so steigt der Druck in der anderen Trockenkammer kurz an (Abb.II-17).

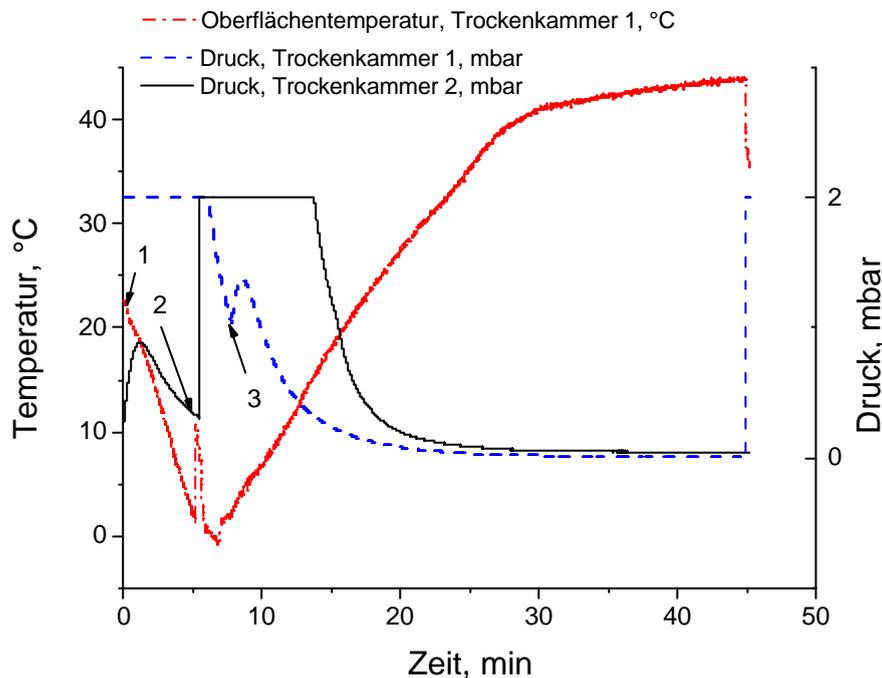


Abb. III-17: Temperatur-/Druckprofil mit zwei gleichzeitig laufenden Trocknungskammern

- 1 – Prozessbeginn in Trockenkammer 1,
- 2 – Trocknung abgeschlossen in Trockenkammer 2,
- 3 – Prozessbeginn in Trockenkammer 2

III 1.4.5 Steuerung der Einfriergeschwindigkeit

Da die Probe vakuuminduziert eingefroren wird, hängt die Einfriergeschwindigkeit von der Evakuiergeschwindigkeit ab und kann über die Stellung des Feinvakuumventils eingestellt werden. Der Zusammenhang zwischen der Evakuiergeschwindigkeit und der Stellung des Feinvakuumventils ist in Abbildung III-18 gegeben.

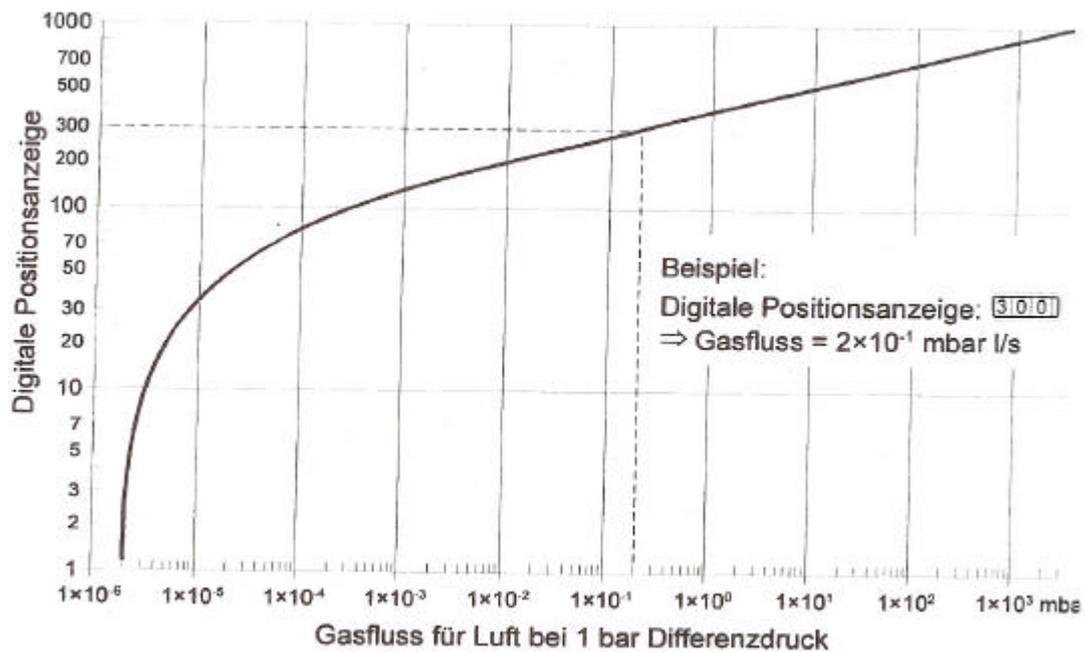


Abb. III-18: Zusammenhang zwischen der Positionsanzeige des Feinvakuumsventils und Evakuiergeschwindigkeit [67]

Abbildung III-19 zeigt die Kerntemperatur des Tropfens und Druckprofile. Tabelle III-1 stellt eine Übersicht über die Einfrierzeiten bei drei verschiedenen Stellungen des Feinvakuumsventils dar. Laut Literatur nimmt die Unterkühlung mit zunehmender Einfriereschwindigkeit ab [75]. In diesem Fall ist die Tendenz zwar erkennbar, aber nicht stark ausgeprägt. Allerdings sind die einzufrierenden Volumina auch sehr klein.

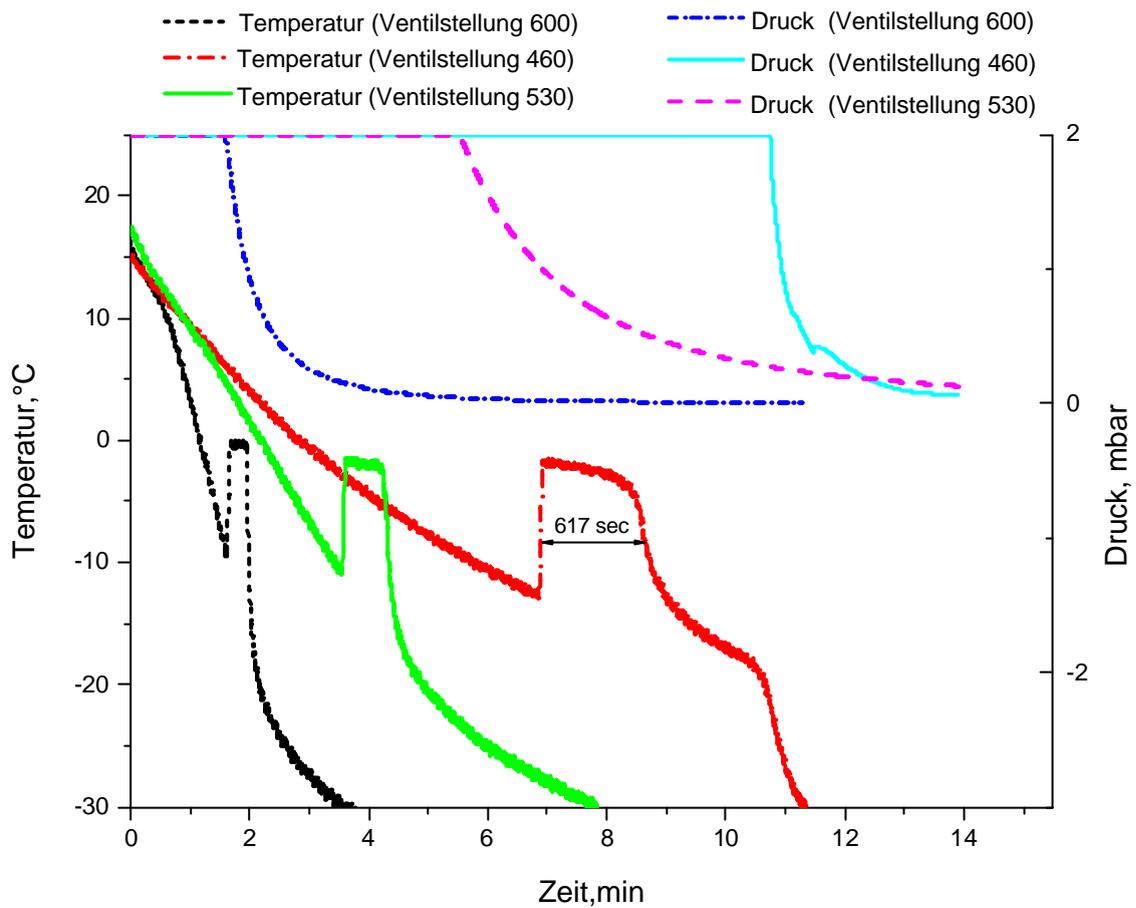


Abb. III-19: Temperatur- und Druckprofile in der Einfrierphase bei verschiedenen Stellungen des Feinvakuumsventils (am Beispiel des NaHD-OLCS)

Einfriergeschwindigkeit	Ventilstellung in der Einfrierphase	Einfrierzeit, sec
schnelle	600	109
Mittlere	530	239
Langsame	460	617

Tab. III-1: Einfrierzeiten bei verschiedenen Ventilstellungen

III 1.4.6 Inline Überwachung des Restwassergehaltes mittels NIRS

Theoretischer Hintergrund

Wasser ist ein guter Absorber der elektromagnetischen Strahlung. Die Absorption erfolgt durch die Anregung der stark polarisierten OH-Bindungen des Wassermoleküls. Das gesamte Vibrations-Absorptions-Spektrum des flüssigen Wassers ist in Abbildung III-20 dargestellt [9].

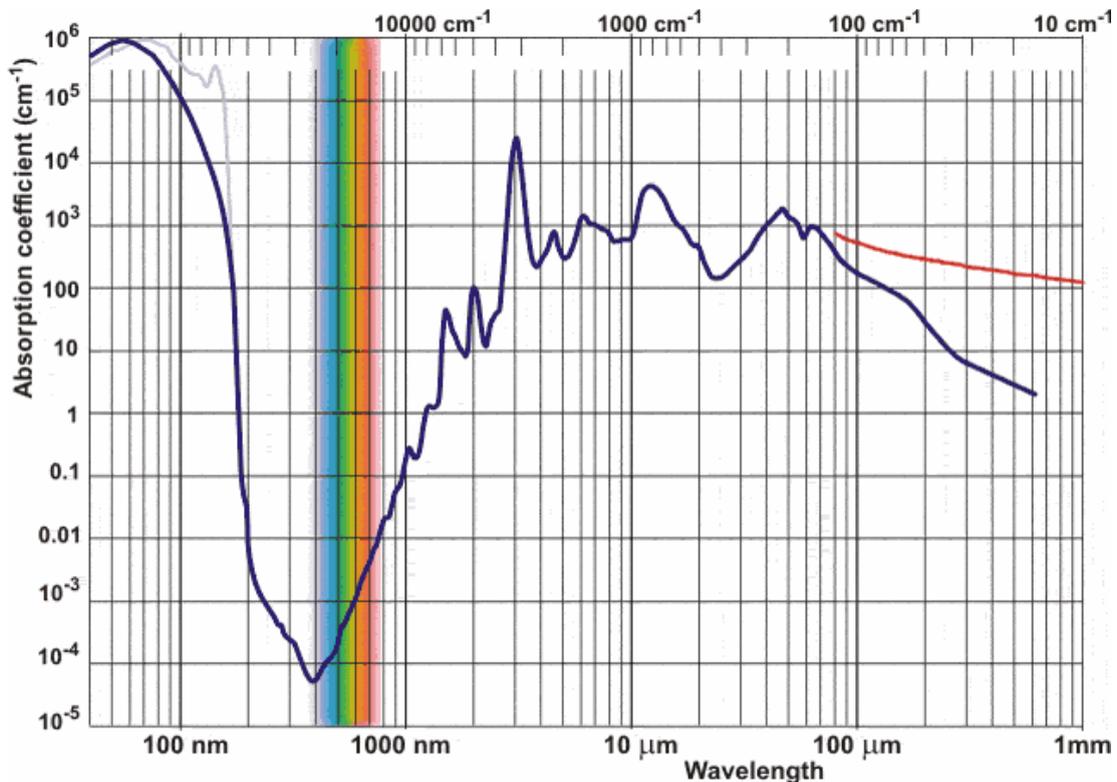


Abb. III-20: Vibration-Absorptions-Spektrum von Wasser [9]

Die niedrige Absorption im NIR-Bereich erlaubt es, Messungen ohne Probenvorbereitung durchzuführen. Ein NIR-Absorptionsspektrum von Wasser bei Schichtdicken von 0,1 und 10 mm ist in Abbildung III-21 dargestellt.

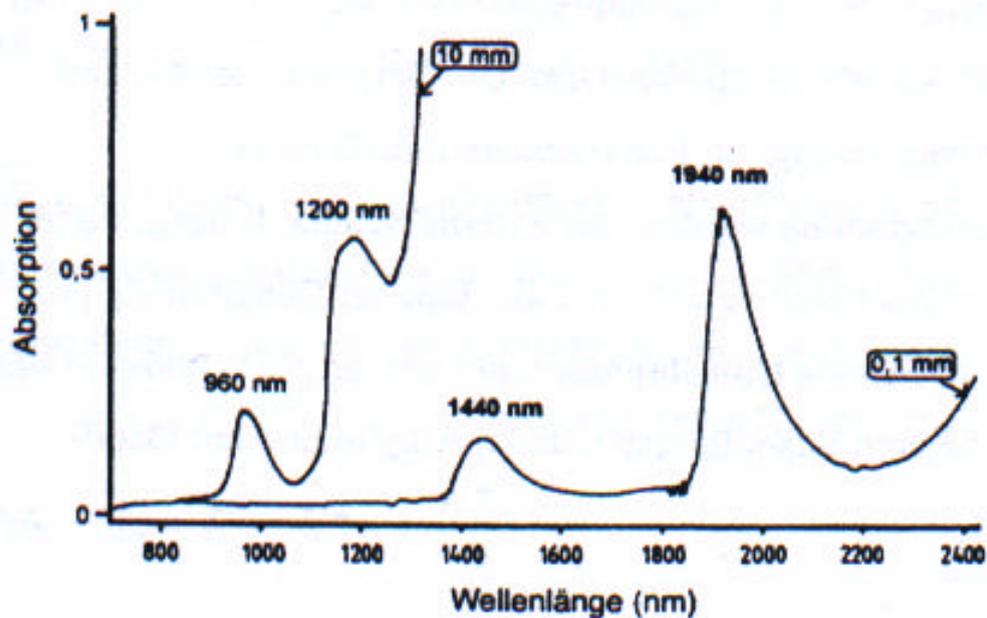


Abb. III-21: NIR-Absorptionsspektrum des Wassers [5]

Bei der Schichtdicke von 0,1 mm sind zwei Absorptionsmaxima zu erkennen: bei 1940 nm die Kombinationsschwingungen aus OH-Valenz- und Deformationsschwingungen und bei 1440 nm die erste Oberschwingung der OH-Valenzschwingungen. Bei der Schichtdicke von 10 mm sind zwei weitere Absorptionsmaxima zu sehen: bei 1200 nm eine schwache Kombinationsschwingung und bei 960 nm die zweite Oberschwingung der OH-Valenzschwingungen. Die genaue Position der einzelnen OH-Banden im Spektrum ist vom Aggregatzustand, sowie von der Temperatur abhängig und kann sich je nach deren Einfluss zu größeren und kleineren Wellenlängen verschieben. Abbildung III-22 zeigt die Absorptionsspektren von Eis bei verschiedenen Temperaturen [23]. Mit steigender Temperatur wird die Form des Spektrums glatter. Die Absorption steigt mit der Temperatur und das Zentrum einiger Absorptionsbanden verschiebt sich zu kürzeren Wellenlängen.

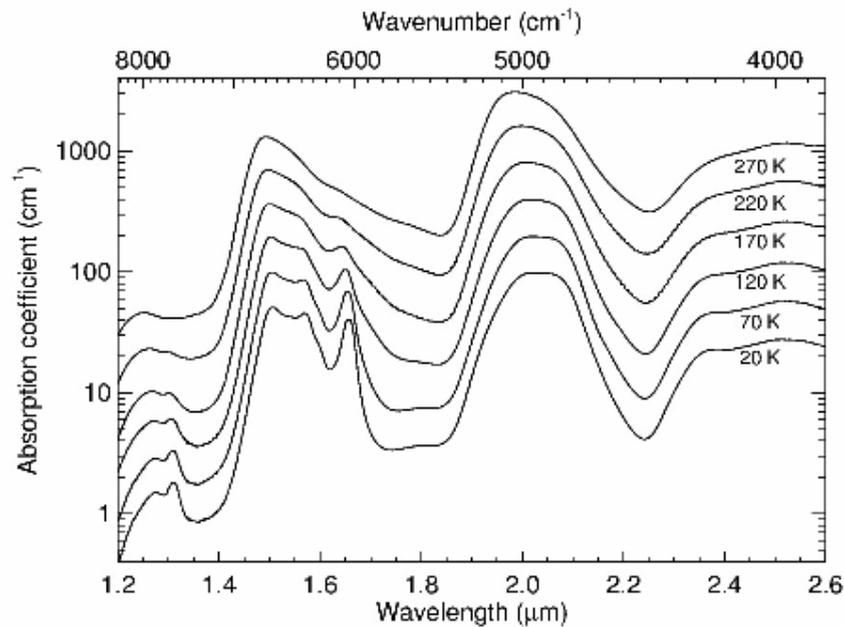


Abb. III-22: NIR-Absorptionsspektren des Eises [23]

Geräte

- Corona Remote Spektrometer mit InGa-As Sensor Array, Carl Zeiss, Jena
- Glasoptik mit Lichtleiteranschluss, Carl Zeiss, Jena
- Leuchtdiode, Carl Zeiss, Jena
- Unscrambler[®], Software für die Datenauswertung, CAMO ASA, Oslo, Norway [93.]

Die geringe Schichtdicke der Probe (2 bis 3 mm) ermöglicht es, Messungen im Transmissionsmodus durchzuführen. Dabei wurde die Halogenlampe, die als Heizquelle in der Trocknungsphase verwendet wird, gleichzeitig als NIR-Lichtquelle eingesetzt. Sie wurde am oberen Flansch der Trockenkammer eingebaut. An der Stelle, wo der Tropfen eingebracht werden soll, wurde in die Trägerplatte des Verschlusses ein Loch mit 5 mm Durchmesser gebohrt. Die Empfangsoptik mit dem Lichtleiter wurde in den unteren Flansch der Trockenkammer eingebaut. Der Lichtleiter wurde über die ganze Länge vakuumdicht in einen PVC-Schlauch eingeschlossen. Genau wie bei dem IR-Thermometer hängt auch hier das Messfeld von der Entfernung zur Probe ab. Beim Abstand von ca. 4 cm hatte das Messfeld der Optik einen Durchmesser von 2 mm, deshalb wurde nur ein Teil des Lyophilisates erfasst. Die genaue Positionierung des Verschlusses wurde mit Hilfe einer Leuchtdiode eingestellt, die an Stelle des Spektrometers über den Lichtleiter an die

Optik angeschlossen wird. Abbildung III-23 zeigt den Aufbau der Trockenkammer bei NIR in-line Restfeuchtebestimmung.

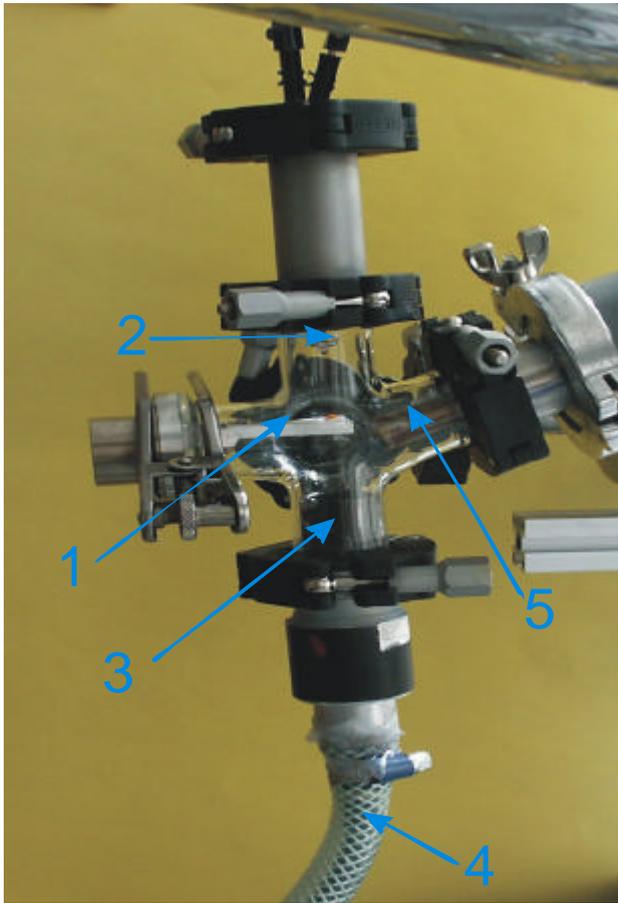


Abb. III-23: Trockenkammer mit eingebrachter NIR-Optik

- 1- Verschluss (besteht aus Deckel und Trägerplatte)
- 2- Halogenlampe
- 3- NIR-Optik
- 4- Lichtleiter, eingeschlossen in vakuumdichten PVC-Schlauch
- 5- Kühlfingerkondensator

Der Trocknungsverlauf wurde durch NIRS an HF- und NaHD-OLCS folgender Zusammensetzung untersucht (Angaben pro Tropfen):

Zusammensetzung der Rezepturen

NaHD-OLCS:

Na Hyaluronat 25 µg

Dextran 500 µg

HF-OLCS:

Fluorescein 136 µg

Methocel 250 µg

Herstellungsbedingungen

- Stellung des Feinvakuumventils 530
- Heizleistung in der Trocknungsphase 9 W

Messbedingungen

- Aufnahme der Spektren im Bereich von 960 bis 1690 nm
- 10 Scans für das Mittelwertspektrum

- Auflösung 2 nm
- Referenz-Standard – PTFE-Folie ohne Tropfen

Inline Aufnahme der Spektren

Zunächst sollte überprüft werden, ob unter den oben ausgeführten Bedingungen Spektren im Transmissionsmodus aufgenommen und für die Charakterisierung des Trocknungsverlaufs genutzt werden können.

Die Spektren wurden an jeweils einem Tropfen im Zeitabstand von 5 min aufgenommen (Abb. III-24 und III-25). Auffällig bei den beiden Rezepturen sind die Transmissionsänderungen im Bereich von 1450 nm bis 1650 nm. Bei HF-OLCS ist auch eine sprunghafte Transmissionsänderung im Bereich zwischen 20 und 35 min erkennbar.

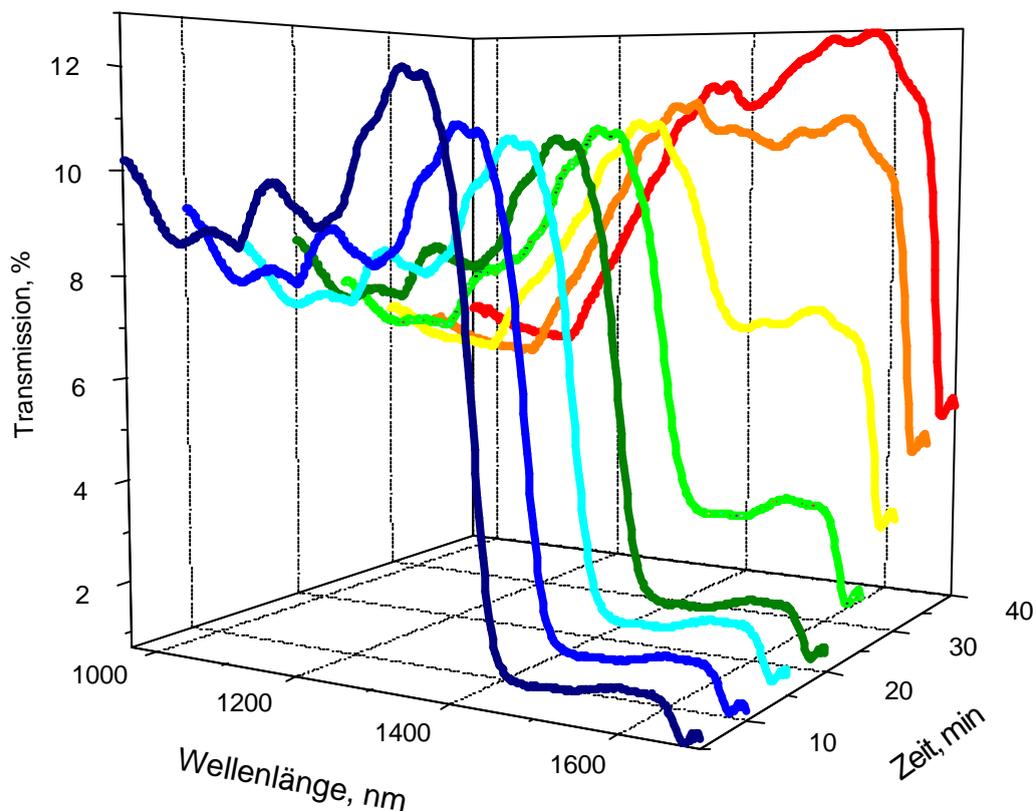


Abb. III-24: Trocknungsverlauf von HF-OLCS

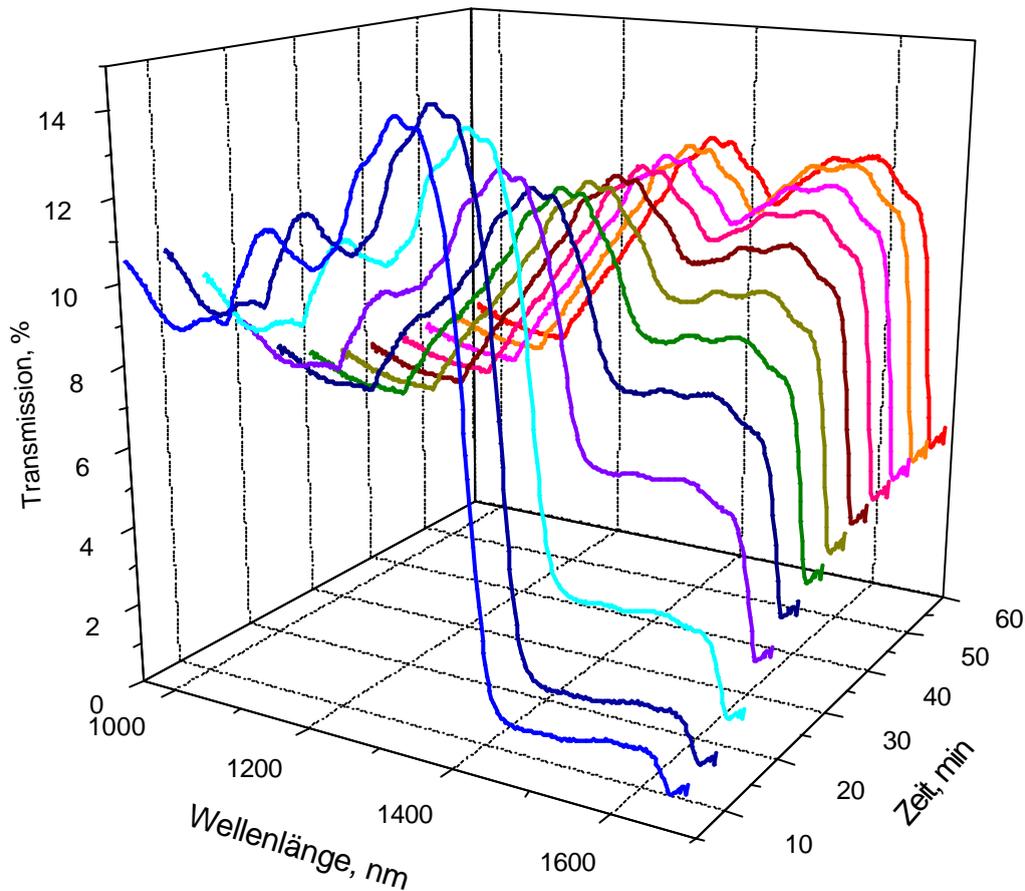


Abb. III-25: Trocknungsverlauf von NaHD-OLCS

Erstellung der Kalibrierungsmodelle

In folgenden Versuchen sollen die Kalibrierungsmodelle für die oben genannten Rezepturen erstellt werden und damit überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen Spektren und Referenzwerten möglich ist. Als Referenzmethode wurde die Thermogravimetrie verwendet.

Die Spektren wurden in Zeitabständen von 2-3 min aufgenommen. Sofort nach der Aufnahme wurde die Trocknung gestoppt und die Probe entnommen. Der Tropfen wurde rasch mit einer abgeschnittenen Insulinspritze in einen TGA-Tiegel überführt, der sich in einer Vertiefung einer mit Flüssigstickstoff gekühlten Aluminiumplatte befand (Abb. III-26). Zu den TGA-Bedingungen s. Kapitel II 2.2.

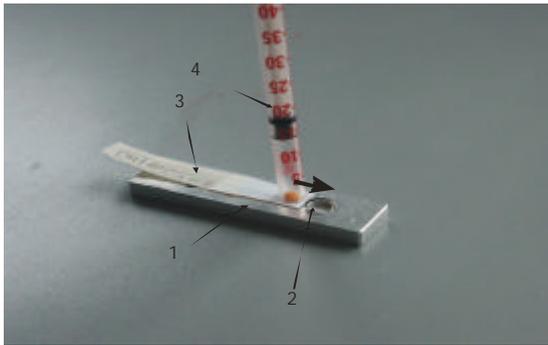


Abb. III-26: Aluminiumplatte mit TGA-Tiegel und OLCS-Streifen

- 1 – Aluminiumplatte
- 2 – TGA-Tiegel
- 3 – OLCS-Streifen
- 4 – Abgeschnittene Insulinspritze

Kalibrierungsmodell für HF-OLCS

Für die Berechnung des Kalibrierungsmodells wurde eine PLS-Regression von 24 Spektren im Bereich von 1500 bis 1600 nm ohne Spektrenvorbehandlung durchgeführt.

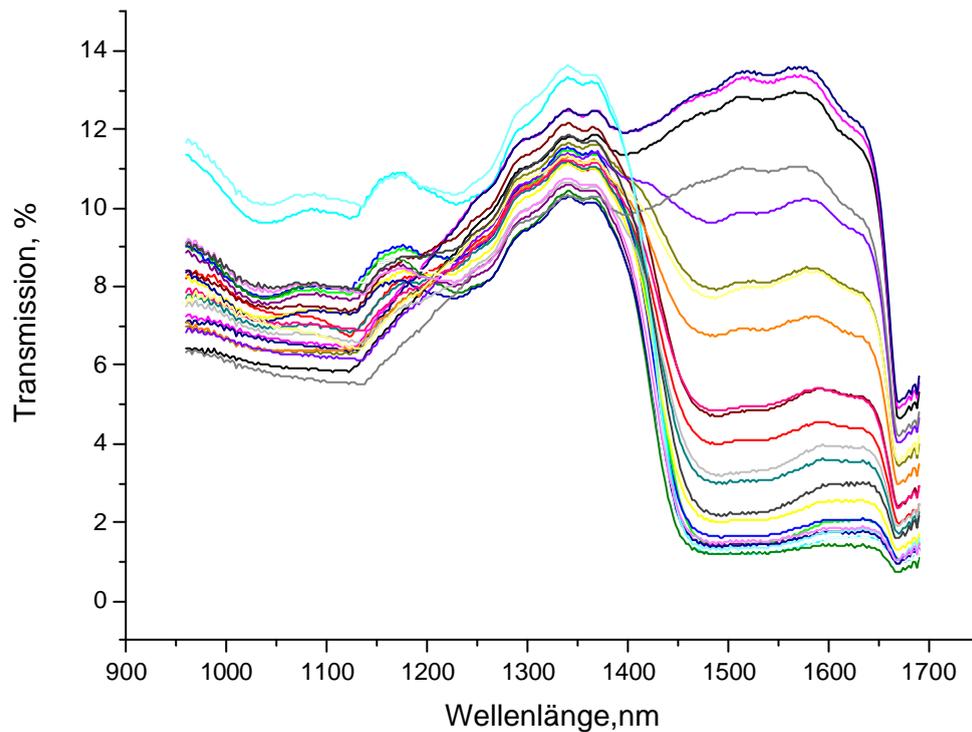


Abb. III-27: Transmissionsspektren für Kalibrierungsmodell von HF-OLCS

Abbildung III-28 und Tabelle II-2 stellen die Ergebnisse der Kreuzvalidierung dar. Das Modell enthielt PLS-Hauptkomponente.

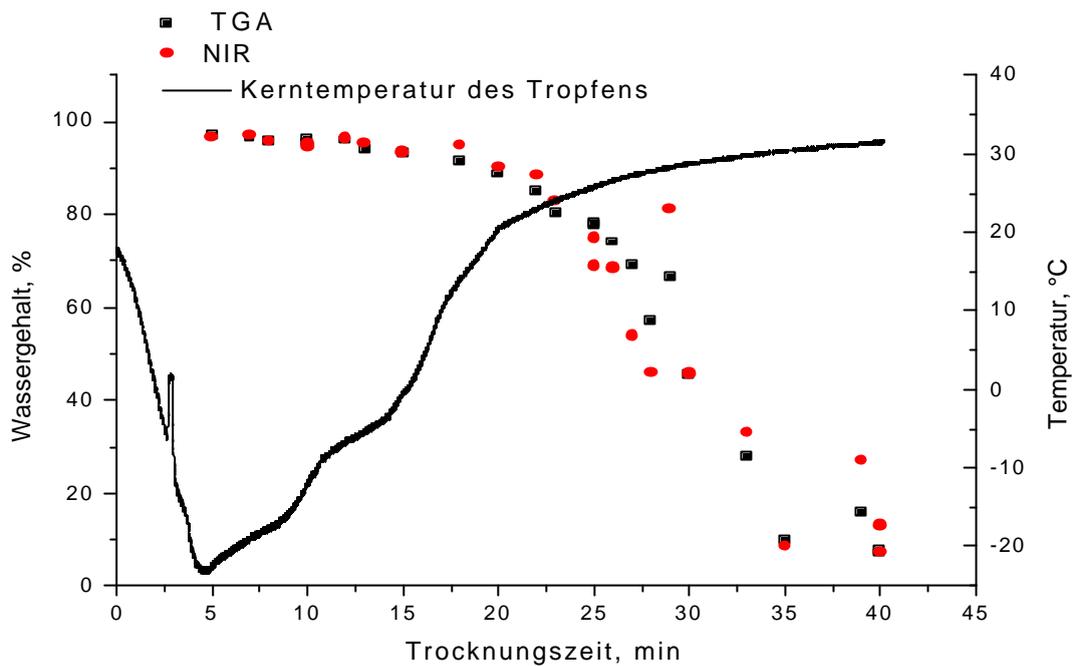


Abb. III-28: Kalibrierungsmodell nach Kreuzvalidierung (HF-OLCS)

	Steigung	Offset	Korrelations- koeffizient	RMSEC/ RMESEP	SEC/ SEP	Bias
Kalibrierung	0,965599	2,35389	0,9827	5,790986	5,915538	$2,56 \cdot 10^{-6}$
Validierung	0,960272	2,799619	0,9801	6,207189	6,340250	0,073367

Tab. III-2: NIRS-Leistungsparameter (HF-OLCS)

Kalibrierungsmodell für NaHD-OLCS

Eine Erstellung der Kalibrierungsmodelle mit weniger als sechs PLS-Hauptkomponenten und einem Korrelationskoeffizienten größer als 0,7 war ohne Spektrenvorbehandlung nicht möglich. Die Ableitungen sollen die Auflösung verbessern und die Verschiebung der Ordinate (Offset) reduzieren.

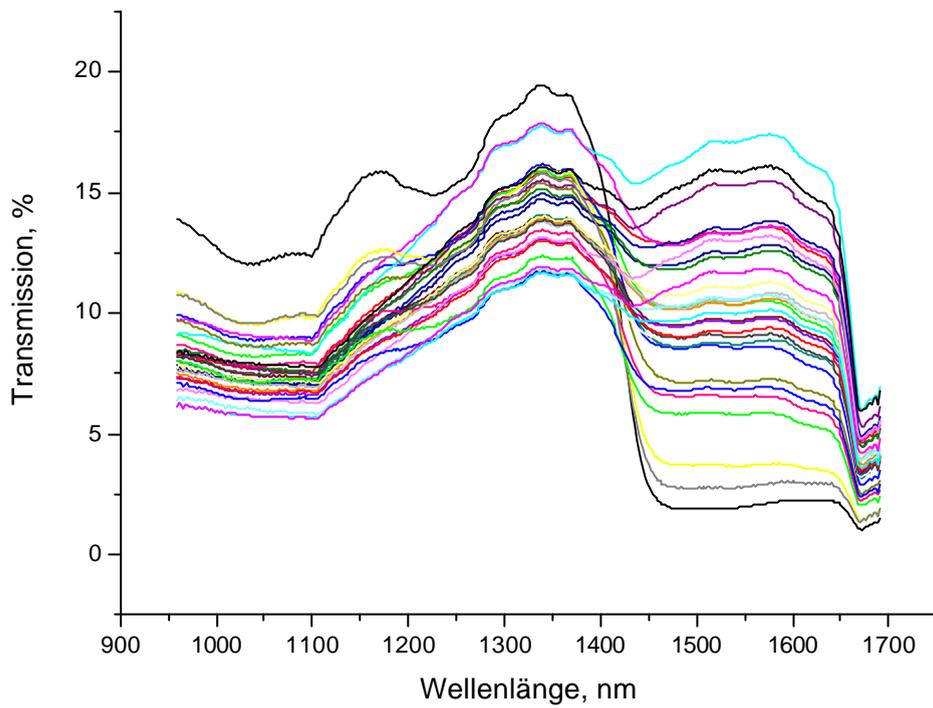


Abb. III-29: Transmissionsspektren für Kalibrierungsmodell (NaHD-OLCS)

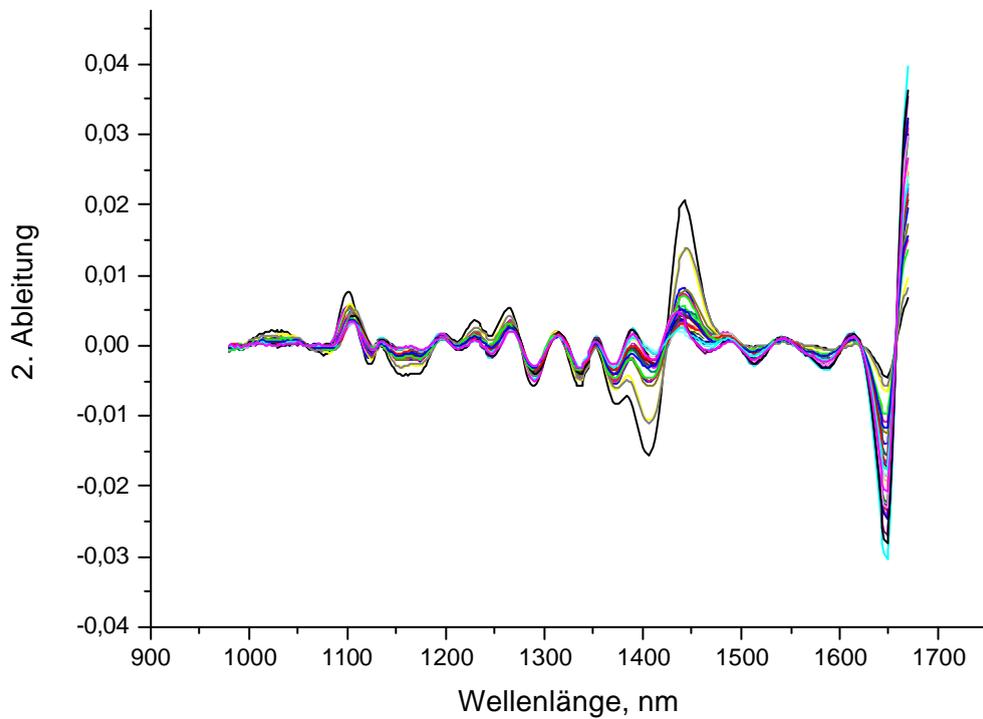


Abb. III-30: Zweite Ableitung der Spektren nach Savitzky-Golay (NaHD-OLCS)

Für die Berechnung eines Kalibrierungsmodells wurde eine PLS-Regression nach Anpassung eines Polynom 2.Grades im Spektralbereich von 1362 bis 1420 nm mit zweiter Ableitung nach Savitzky-Golay durchgeführt. Die Ergebnisse der Kreuzvalidierung sind in Abbildung III-31 und in Tabelle III-3 zusammengefasst. Für das Modell wurden drei PLS-Hauptkomponenten verwendet.

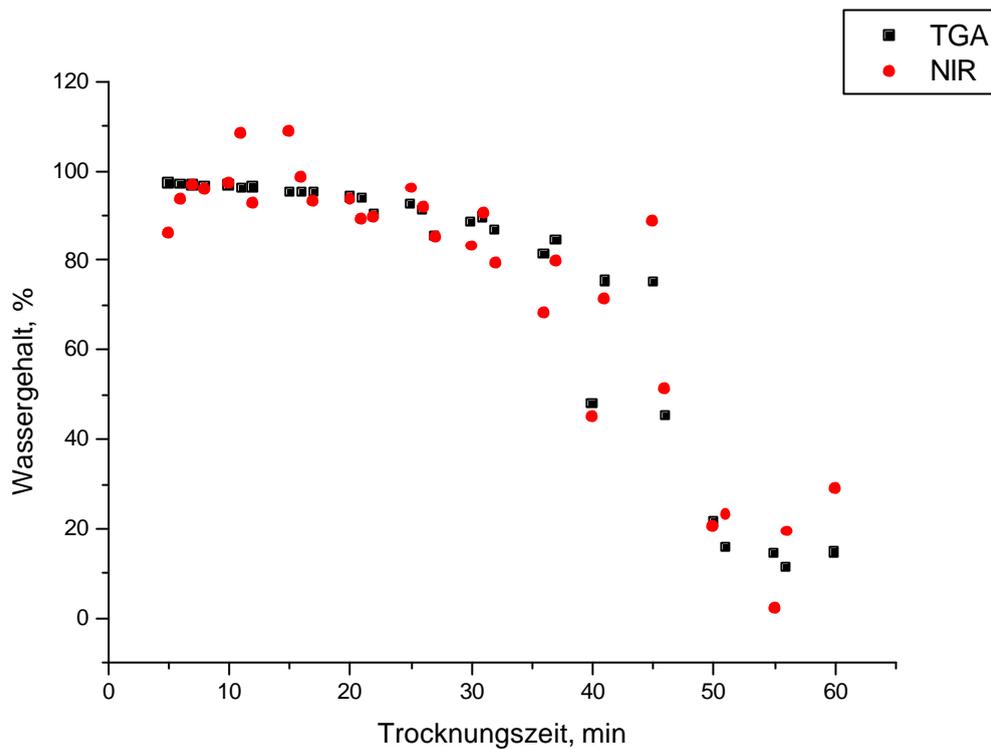


Abb. III-31: Kalibrierungsmodell nach Kreuzvalidierung (NaHD-OLCS)

	Steigung	Offset	Korrelations- koeffizient	RMSEP	SEP	Bias
Kalibrierung	0,966815	2,5	0,983268	5,3789	5,470856	$1,462 \cdot 10^{-6}$
Validierung	0,952431	3,82395	0,970321	7,152043	7,270207	0,240148

Tab.III-3: NIR-Leistungsparameter (NaHD-OLCS)

Beurteilung der Ergebnisse

Die Versuche zeigen, dass eine in-line Restfeuchteüberwachung von OLCS mittels NIRS im Transmissionsmodus möglich ist. Der Trocknungsverlauf war bei beiden untersuchten Rezepturen gut anhand der Spektren erkennbar (Abb. III-24 und III-25). Anhand der HF-Spektren lassen sich auch Primär- und Sekundärtrocknung durch

eine sprunghafte Transmissionsänderung nach etwa 20 min unterscheiden. Die Abweichungen zwischen den vorhergesagten Werten und den Referenzwerten treten bei HF-OLCS in der Sekundärtrocknung stärker auf (Abb. III-28). Das Modell für HF-OLCS mit einer Hauptkomponente ohne Spektrenvorbehandlung ist einfacher im Vergleich zum Modell für NaHD-OLCS (2.Ableitung nach Savitzky-Golay, drei Hauptkomponenten). Auch die NIR-Leistungsparameter nach Kreuzvalidierung zeigen eine bessere Korrelation, geringeren Offset und höhere Vorhersagegenauigkeit (RMSEP) für das Modell mit HF-OLCS (Tab.III-2 und III-3). Der Bias ist deutlich höher bei NaHD-OLCS, was verglichen mit dem HF-Modell auf einen höheren systematischen Fehler zurückzuführen ist. Die Unterschiede in den Korrelationsmodellen sind auf unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften der beiden Rezepturen zurückzuführen. Die NaHD-Lösung hat eine größere Oberflächenspannung und damit haben die Tropfen den größeren Kontaktwinkel mit der PTFE-Folie (s. Kapitel III 2.1.2 und III 2.2.4). Die möglichen Gründe der Abweichungen bei beiden Korrelationsmodellen sind:

- Manuelle Handhabung beim Auftropfen und Beladen der Trockenkammer
- Temperaturabhängigkeit der Spektren
- Streuung der Referenzmethode

Durch das manuelle Auftropfen und Beladen der Trockenkammer kann der Kontaktwinkel zwischen dem Tropfen und der PTFE-Folie sowie die Position des Tropfens nicht genau reproduziert werden. Dabei durchdringt der NIR-Strahl bei flachen Tropfen eine geringere Schichtdicke. Genauigkeit und Vorhersagesicherheit sind in beiden Modellen nur grob sichergestellt (Tab. III-2 und III-3). Die Berechnung der Korrelationsmodelle diente lediglich der Prüfung des Konzepts, das sich erfolgreich erwiesen hat.

III 2 Charakterisierung von OLCS

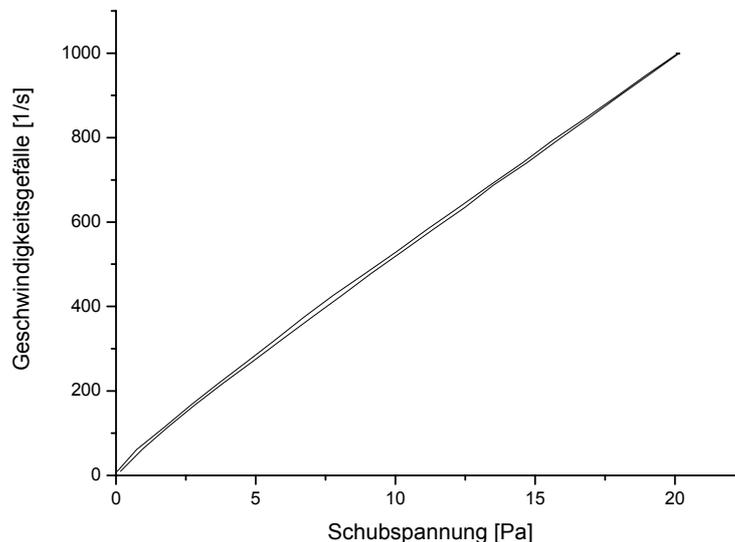
III 2.1 Charakterisierung der Lösung

III 2.1.1 Viskosität

Die Viskosität beeinflusst die Filtrierbarkeit der Lösung und die Form des Tropfens. Hinsichtlich der Filtrierbarkeit sind die niedrigviskosen Lösungen vorteilhaft, aber sie sind sehr empfindlich und neigen leichter zur Spreitung auf der PTFE-Folie. Die Kontaktzeit der Lyophilisate aus hochviskosen Lösungen ist in der Regel länger und die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe höher. Sie können aber auch das Fremdkörpergefühl im Auge verstärken.

In diesem Versuch wurden die Viskosität und Fließverhalten von HF- und NaHD-Lösungen untersucht.

Die HF-Lösungen weisen ein nahezu idealviskoses Fließverhalten auf. Das Rheogramm der am höchsten konzentrierten Lösung zeigt fast einen linearen Zusammenhang zwischen Schubspannung und Geschwindigkeitsgefälle (Abb. III-32).



**Abb. III-32: Rheogramm der HF-Lösung
(HPMC 1,5 % (m/m) Fluorescein 0,816 % (m/m))**

In Abbildung III-33 sind die Viskositäten beim Geschwindigkeitsgefälle von 1000 1/s in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lösung dargestellt. Die Viskosität steigt annähernd exponentiell mit zunehmender HPMC-Konzentration an.

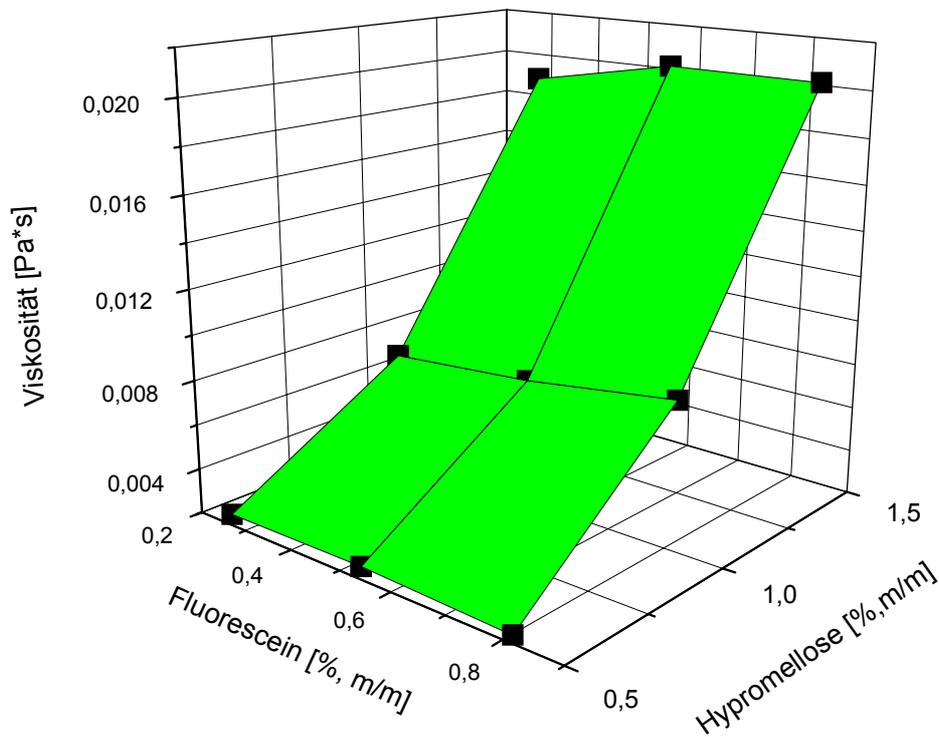
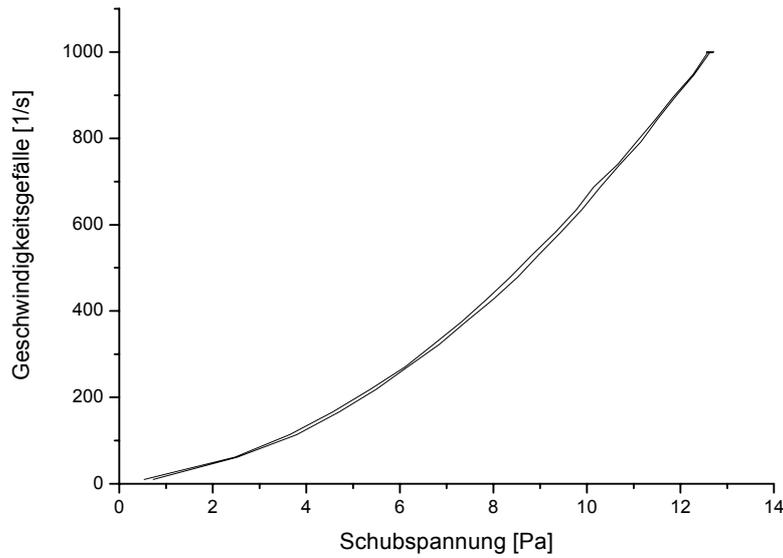


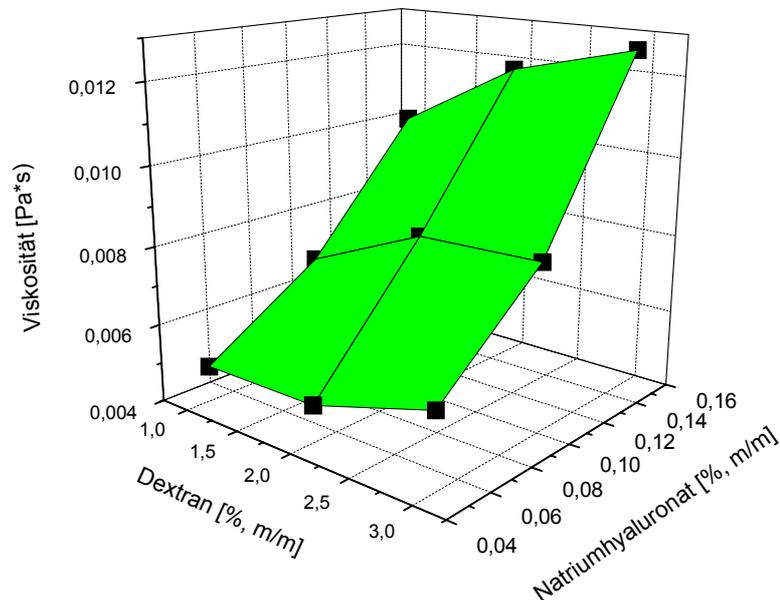
Abb. III-33: Viskosität von HF-Lösung bei 1000 1/s

Im Gegensatz zu den HF-Lösungen weisen die NaHD-Lösungen ein strukturviskoses Fließverhalten auf. Ein Beispiel gibt das Rheogramm in Abbildung III-34.

Die Viskosität ist hier nicht wie bei idealviskosen Flüssigkeiten konstant, sondern nimmt mit zunehmender Schubspannung ab. Ein Vergleich der Viskositäten ist in diesem Fall nicht trivial. Beim Geschwindigkeitsgefälle 1000 1/s ist das Fließverhalten annähernd idealviskos. Ein Vergleich der Viskositäten bei 1000 1/s in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lösung gibt Abbildung III-35.



**Abb. III-34: Rheogramm der NaHD-Lösung
(Natriumhyaluronat 0,15 % (m/m), Dextran 3 % (m/m))**



**Abb. III-35: Viskosität bei 1000 1/s in Abhängigkeit von
Natriumhyaluronat- und Dextran-Konzentration**

Die Viskosität steigt mit steigender Dextran- und vor allem mit steigender Natriumhyaluronat-Konzentration an.

Erwartungsgemäß wurde die Viskosität sowohl bei HF- als auch bei NaHD-Lösungen durch Substanzen mit höherem Molekulargewicht beeinflusst. So hat Fluorescein mit

einem Molekulargewicht von 332,3 g/mol in der Konzentration von 0,272 bis 0,816 % keinen Einfluss auf die Viskosität. Das Molekulargewicht des Dextran ist zwar größer als das des Fluorescein, aber deutlich geringer als das des Natriumhyaluronat. Deshalb ist auch der Einfluss des Dextran in der Konzentration von 1 bis 3 % auf die Viskosität der NaHD-Lösungen nicht stark ausgeprägt.

III 2.1.2 Oberflächenspannung

Die Haftfestigkeit der Lyophilisate kann durch die Benetzbarkeit der PTFE-Folie beeinflusst werden. Je besser sie benetzbar ist, desto mehr Kontaktfläche hat der Tropfen mit der Folie und desto größer ist die Haftfestigkeit. Die Benetzbarkeit kann durch den Kontaktwinkel charakterisiert werden. Der Zusammenhang wird durch die Young-Gleichung beschrieben:

$$\cos \Theta = \frac{\gamma_{SL} - \gamma_{SG}}{\gamma_{LG}} \quad (\text{Gl. III-1})$$

Θ - Kontaktwinkel

γ_{LG} - Oberflächenspannung

γ_{SL} - Grenzflächenspannung Festkörper/Flüssig

γ_{SG} - Grenzflächenspannung Festkörper/Gas

Die Oberflächenspannung der eingesetzten Lösungen wurde untersucht und die Ergebnisse sind in den Tabellen III-4 und III-5 zusammengefasst.

Zusammensetzung der Lösung		Oberflächenspannung, mN/m	St.Abw., mN/m
Hypromellose, % (m/m)	Fluorescein, % (m/m)		
0,5	0,272	47,19	0,17
0,5	0,544	47,36	0,11
0,5	0,816	46	0,14
1	0,272	46,27	0,1
1	0,544	46,8	0,1
1	0,816	44,8	0,18
1,5	0,272	47,96	0,15
1,5	0,544	46,51	0,17
1,5	0,816	43,64	0,19

Tab. III-4: Oberflächenspannung der HF-Lösungen (n=3)

Zusammensetzung der Lösung		Oberflächenspannung, mN/m	St.Abw., mN/m
Natriumhyaluronat, % (m/m)	Dextran, % (m/m)		
0,05	1	72,7	0,182
0,05	2	72,49	0,139
0,05	3	73,16	0,1
0,1	1	72,43	0,14
0,1	2	72,3	0,14
0,1	3	73,39	0,12
0,15	1	73,05	0,14
0,15	2	72,92	0,13
0,15	3	72,34	0,13

Tab. III-5: Oberflächenspannung der NaHD-Lösungen (n=3)

Die Oberflächenspannung der HF-Lösungen ist niedriger als die des verwendeten Wassers (72,2 mN/m). Dabei besteht kein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Inhaltsstoffe und der Oberflächenspannung.

Die Oberflächenspannung der NaHD-Lösungen unterscheidet sich dagegen kaum von der des Wassers. Bei OLCS, die aus NaHD-Lösungen hergestellt wurden, wurde ein höherer Kontaktwinkel zwischen der PTFE-Folie und dem Tropfen gemessen (s. Kapitel 2.2.4). Der Kontaktwinkel schwankt durch die Inhomogenität der Oberfläche der Folie und Erschütterung der Tropfen bei der Handhabung.

III 2.2 Charakterisierung von Lyophilisaten

III 2.2.1 Untersuchung der Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von HF-OLCS

Die Haftfestigkeit von HF-Lyophilisaten wurde bereits von S. Maier untersucht. Dabei stellte er fest, dass die Haftfestigkeit sowohl von der Einfriergeschwindigkeit als auch vom Feststoffgehalt abhängt. Bei langsam eingefrorenen OLCS fand er eine geringere Haftfestigkeit als bei mittelschnell und schnell eingefrorenen OLCS. Bei Proben mit höherem Feststoffgehalt lag das Maximum der Haftfestigkeit bei mittlerer Einfriergeschwindigkeit. Die Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von HF-OLCS wurde

hier in einem Box-Behnken-Faktorenversuchsplan in Abhängigkeit von folgenden Faktoren untersucht:

- Hypromellose (Methocel E50)-Konzentration
- Fluorescein-Natrium-Konzentration
- Einfriergeschwindigkeit (Stellung des Feinvakuumentils)

Jeder Faktor wurde auf drei Niveaus variiert. Die HPMC wurde in den für die Viskositätserhöhung bei Augentropfen üblichen Konzentrationen von 0,5 % bis 1,5 % (125 µg bis 375 µg pro Tropfen) eingesetzt. Die Fluorescein-Konzentration wurde von 0,272 % bis 0,816 % in der wässrigen Lösung (von 68 µg bis 204 µg pro Tropfen) variiert. Das untere Niveau der Fluorescein-Konzentration (68 µg pro Tropfen) entspricht der Einzeldosis in konventionellen Augentropfen, z. B. Fluorescein SE-Augentropfen[®], Alcon –Thilo. Die Rezepturen für die Herstellung der Lösungen sind in Tabelle III-6 angegeben.

Die Einfriergeschwindigkeit wurde durch die Evakuiergeschwindigkeit eingestellt. Wird die Trockenkammer langsam evakuiert, so reicht die Verdampfungskälte unter Umständen nicht aus, um den Tropfen vollständig einzufrieren und die flüssigen Restbestandteile schäumen in der Trocknungsphase auf („Frothing“). Wird die Kammer zu schnell evakuiert, zerreißt der Tropfen. Die kleinste Evakuiergeschwindigkeit, die noch zum Einfrieren des Tropfens unter die Kollapstemperatur führte, lag bei 6 mbar*L*s⁻¹ (Ventilstellung 460). Um die Trocknung zu beschleunigen, wurde in diesem Fall nach dem Einfrieren des Tropfens die Evakuiergeschwindigkeit auf 45 mbar*L*s⁻¹ (Ventilstellung 700) erhöht. Die größte Evakuiergeschwindigkeit in der Einfrierphase, die nicht zum Zerreißen des Tropfens führte, lag bei 40 mbar*L*s⁻¹ (Ventilstellung 600). Tabelle III-7 gibt eine Übersicht der untersuchten Faktoren und der jeweiligen Niveaus.

Rezepturen		Konzentration in der Lösung, % (m/m)	µg pro Tropfen (25 µL)
Rezeptur 1	Methocel E50	0,5	125
	Fluorescein	0,272	68
Rezeptur 2	Methocel E50	0,5	125
	Fluorescein	0,544	136
Rezeptur 3	Methocel E50	0,5	125
	Fluorescein	0,816	204
Rezeptur 4	Methocel E50	1	250
	Fluorescein	0,272	68
Rezeptur 5	Methocel E50	1	250
	Fluorescein	0,544	136
Rezeptur 6	Methocel E50	1	250
	Fluorescein	0,816	204
Rezeptur 7	Methocel E50	1,5	375
	Fluorescein	0,272	68
Rezeptur 8	Methocel E50	1,5	375
	Fluorescein	0,544	136
Rezeptur 9	Methocel E50	1,5	375
	Fluorescein	0,816	204

Tab. III-6: HF-OCS: Zusammensetzung der Rezepturen

Faktoren		Niveaus		
		-	0	+
Hypromellose, µg pro Tropfen	X ₁	125	250	375
Fluorescein-Natrium, µg pro Tropfen	X ₂	68	136	204
Stellung des Feinvakuumentils in der Einfrierphase	X ₃	460	530	600

Tab. III-7: HF-OLCS: Faktoren und Niveaus

In diesem Faktorenversuchsplan wurden alle Haupteffekte, die Wechselwirkungen und die quadratischen Glieder des folgenden Modells untersucht:

$$Y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + a_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + a_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + a_{11} \cdot x_1^2 + a_{22} \cdot x_2^2 + a_{33} \cdot x_3^2 + \varepsilon, \quad (\text{Gl. III-2})$$

Y – Zielgröße (Haftfestigkeit bzw. Strukturfestigkeit), a_0 – Mittelwert, x_1, x_2, x_3 – untersuchte Faktoren: x_1 – HPMC-Konzentration, x_2 – Fluorescein-Konzentration, x_3 – Ventilstellung, a_1, a_2, a_3 – Haupteffekte des linearen Teils, a_{11}, a_{22}, a_{33} – Haupteffekte des quadratischen Teils, a_{12}, a_{13}, a_{23} – Wechselwirkungen, ε – Reststreuung des Modells

Im Box-Behnken-Faktorenversuchsplan liegen die Faktorkombinationen im gleichen Abstand vom Zentrum auf einer Kugel [37]. Abbildung III-36 gibt eine grafische Darstellung der Faktorkombinationen.

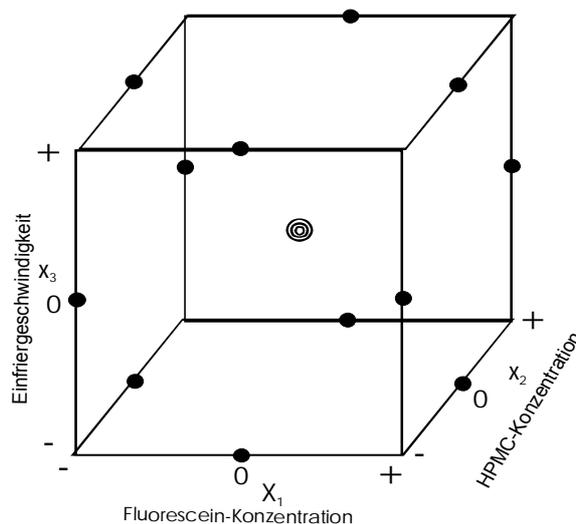
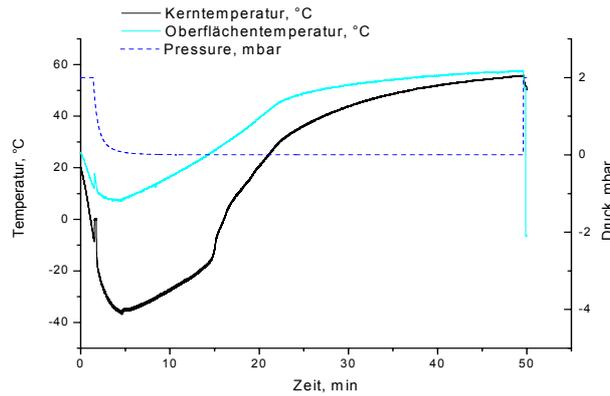


Abb. III-36: Grafische Darstellung des Box-Behnken-Versuchsplanes mit drei Faktoren

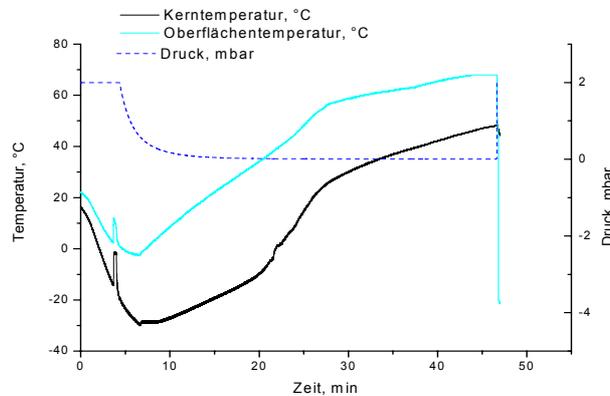
Um eine gleichmäßige Wichtung der Ergebnisse sicherzustellen, wurde jeder Versuch auf der Kugeloberfläche fünf Mal wiederholt, die Faktorkombinationen im Mittelpunkt 15 Mal.

Bestimmung der Herstellungsparameter

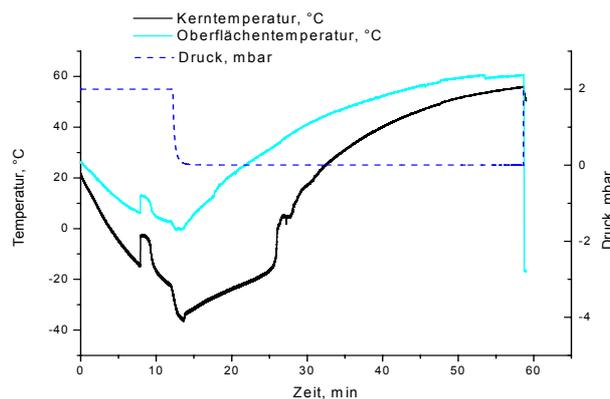
Um die Dauer der Einfrier- und der Trocknungsphase zu ermitteln, wurden die Temperatur-/Druckprofile mit manuellem Einschalten der Heizung aufgenommen (Abb. III-37 – III-39).



**Abb. III-37: Gefriertrocknungszyklus von HF-OLCS
(Stellung des Feinvakuumentils 600)**



**Abb. III-38: Gefriertrocknungszyklus von HF-OLCS
(Stellung des Feinvakuumentils 530)**



**Abb. III-39: Gefriertrocknungszyklus von HF-OLCS
(Stellung des Feinvakuumentils in der Einfrierphase 460)**

Die Lyophilisate wurden mit dem Prototyp IIb unter den in Tabelle III-8 angegebenen Bedingungen hergestellt.

	Stellung des Feinvakuumsventils in der Einfrierphase	Dauer der Einfrierphase, min	Dauer der Trocknungsphase, min	Heizleistung in der Trocknungsphase, W
1	600	4	45	40
2	530	6	40	40
3	460	13	45	40

Tab. III-8: HF-OCS: Herstellungsbedingungen

Haftfestigkeit

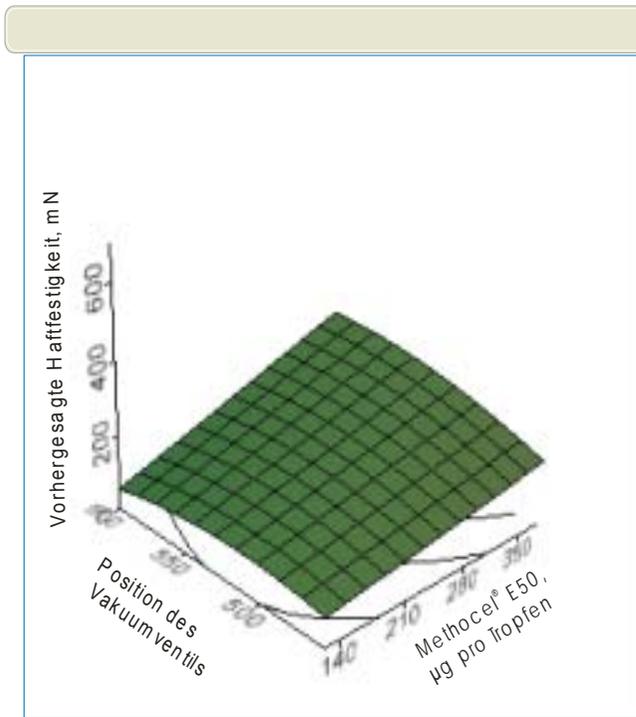
Die Messdaten der Haftfestigkeit sind im Anhang in Tabelle VIII-1 dargestellt.

Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse als Antwortflächen (Abb. III-40) zeigen, dass die Haftfestigkeit der Lyophilisate mit steigender Hypromellose-Konzentration deutlich zunimmt. Weniger ausgeprägt aber im gleichen Sinne gilt das auch für die Abhängigkeit von der Fluorescein-Konzentration. Der Effekt der Einfriergeschwindigkeit ist dagegen geringfügig. Alle drei Flächen weisen eine leichte Krümmung mit einem Maximum der Haftfestigkeit bei mittlerer Einfriergeschwindigkeit (Ventilstellung 530) auf.

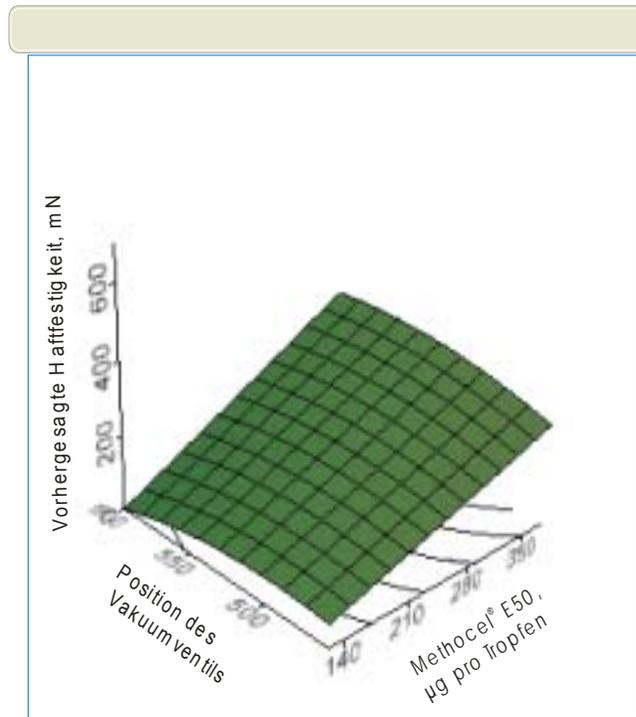
Strukturfestigkeit

Die Daten der Strukturfestigkeit sind im Anhang in Tabelle VIII-2 dargestellt.

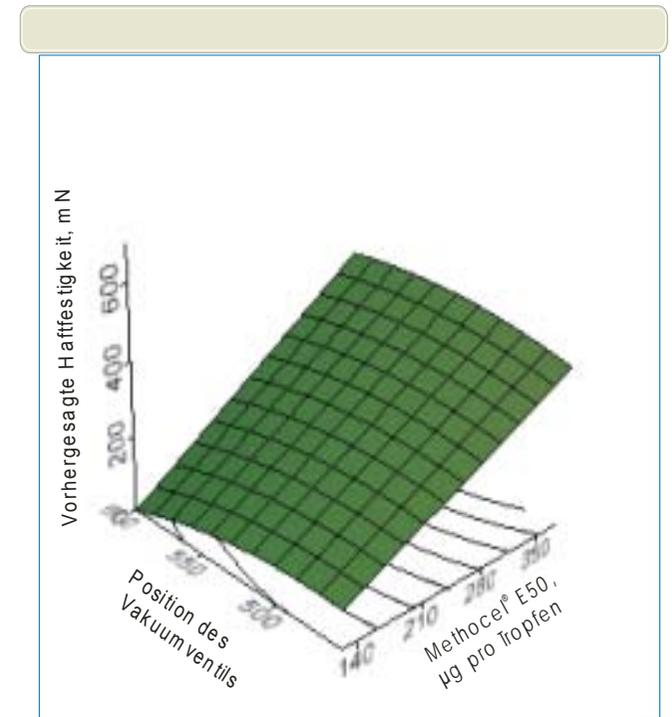
Die Strukturfestigkeit steigt mit steigenden HPMC- und Fluorescein-Konzentrationen, wobei der Einfluss der HPMC-Konzentration viel stärker ist (Abb. III-41). Die Einfriergeschwindigkeit hat kaum Einfluss auf die Strukturfestigkeit.



a. 68 µg Fluorescein pro Tropfen

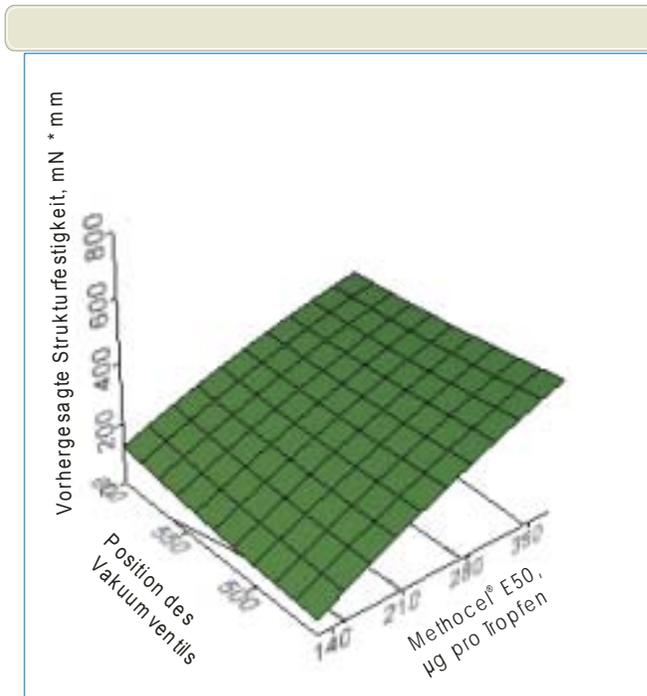


b. 136 µg Fluorescein pro Tropfen

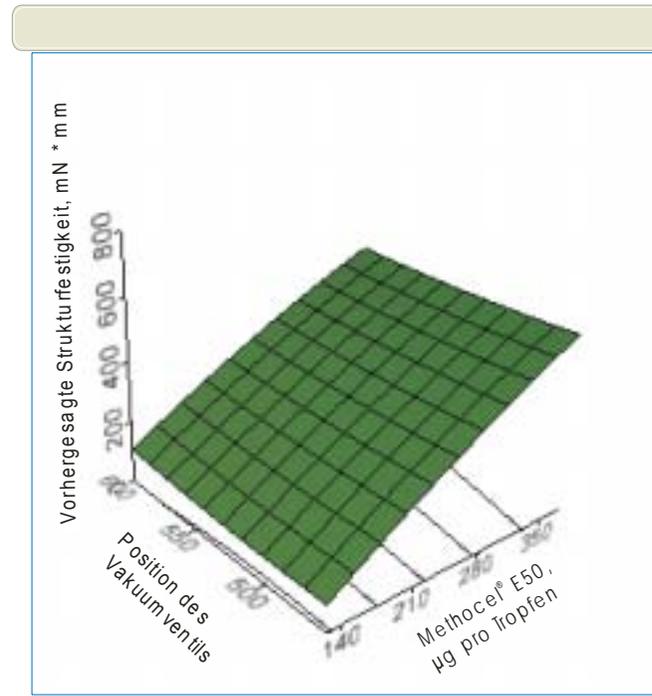


c. 204 µg Fluorescein pro Tropfen

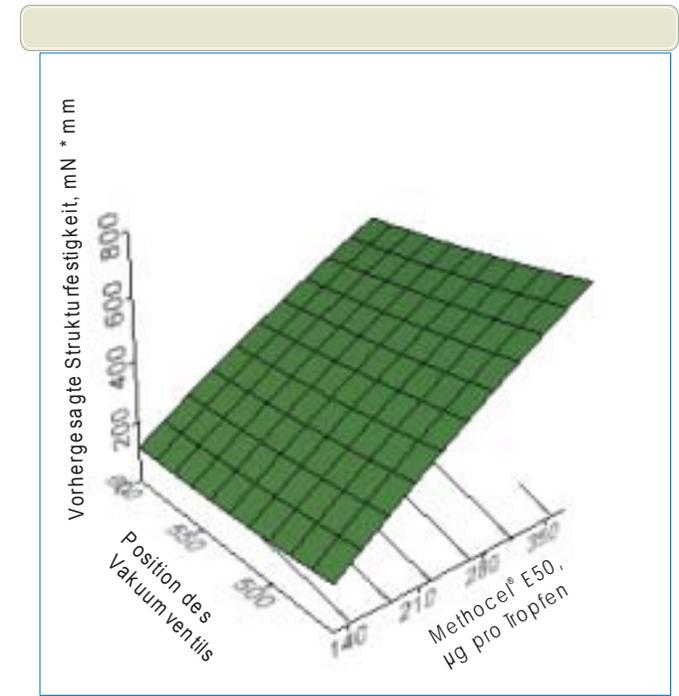
Abb. III-40: Haftfestigkeit von HF-Lyophilisaten



a. 68 µg Fluorescein pro Tropfen



b. 136 µg Fluorescein pro Tropfen



c. 204 µg Fluorescein pro Tropfen

Abb. III-41: Strukturfestigkeit von HF-Lyophilisaten

Statistische Auswertung

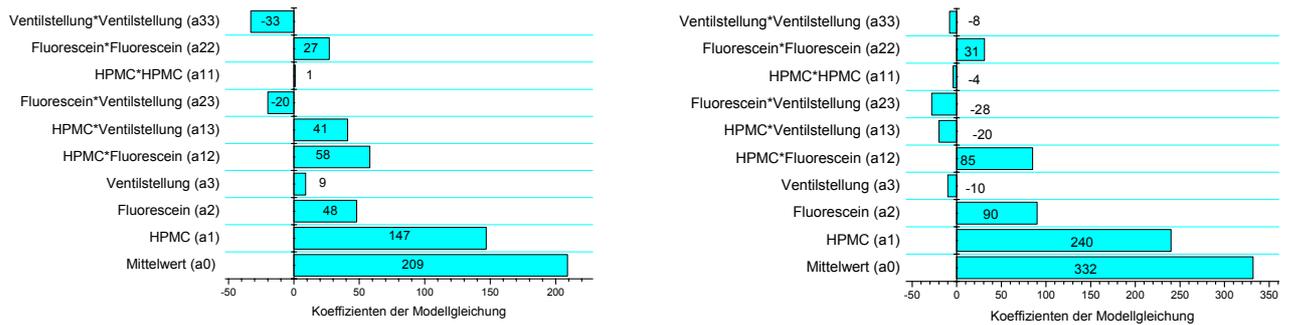
Die HPMC- und Fluorescein-Konzentrationen haben einen hochsignifikanten Einfluss sowohl auf die Haftfestigkeit als auch auf die Strukturfestigkeit der Lyophilisate. Der Effekt von HPMC wird zusätzlich durch die Fluorescein-Konzentration und die Einfriergeschwindigkeit beeinflusst, da die beiden Wechselwirkungen HPMC*Fluorescein und HPMC*Ventilstellung einen hochsignifikanten bzw. signifikanten Einfluss auf die beiden Zielgrößen aufweisen. Der Effekt der Fluorescein-Konzentration auf die Strukturfestigkeit wird signifikant durch die Einfriergeschwindigkeit verstärkt. Im quadratischen Teil des Modells hat die Fluorescein-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die Strukturfestigkeit.

	FG	Haftfestigkeit			Strukturfestigkeit		
		SQA	F	p	SQA	F	p
HPMC	1	859838	145,6	<0,0001	2310460	999,3	<0,0001
Fluorescein	1	93741	15,9	0,0002	324904	140,5	<0,0001
Ventilstellung	1	3538	0,6	0,4417	4324	1,9	0,1762
HPMC*Fluorescein	1	66747	11,3	0,0013	145930	63,1	<0,0001
HPMC*Ventilstellung	1	331230	5,6	0,0208	8172	3,5	0,0646
Fluorescein*Ventilstellung	1	8088	1,4	0,2462	15963	6,9	0,0107
HPMC*HPMC	1	39	0,01	0,9358	250	0,1	0,7436
Fluorescein*Fluorescein	1	13918	2,4	0,1296	17492	7,5	0,0077
Ventilstellung*Ventilstellung	1	20121	3,4	0,0695	1251	0,54	0,4647

Tab. III-9: Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von HF-OLCS: Effekt –Test

FG – Zahl der Freiheitsgrade, SQA – Summe der Quadrate der Abweichungen, F – F-Wert

Abbildung III-42 zeigt das Ausmaß der Effekte. Die Zahlen im Balkendiagramm entsprechen den Zahlenwerten der Koeffizienten in der Modelgleichung. Die HPMC-Konzentration zeigt erwartungsgemäß den stärksten Einfluss.



a. Haftfestigkeit

b. Strukturfestigkeit

Abb. III-42: Koeffizienten der Modellgleichung

In der Varianzanalyse wird die Summe der Abweichungsquadrate des Modells und des Gesamtfehlers verglichen. Der hochsignifikante Unterschied für beide Zielgrößen deutet daraufhin, dass die Daten durch die Modelle besser beschrieben werden als durch den jeweiligen Mittelwert.

	FG	Haftfestigkeit				Strukturfestigkeit			
		SQA	Varianz	F	p	SQA	Varianz	F	p
Modell	9	1101977	122442	20,7	<0,0001	2829853	314428	136	<0,0001
Fehler	65	383904	5906			150282	2312		
Gesamt	74	1485881				2980136			

Tab. III-10: Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von HF-OLCS: Varianzanalyse

Der Lack of Fit–Test stellt einen Vergleich zwischen dem reinen Zufallsfehler („Pure Error“) (Fehler der Wiederholungen innerhalb einer Gruppe) und dem mangelhaften Anpassungsfehler (Lack of Fit –Fehler, Differenz zwischen dem Gesamtfehler und dem Pure Error – Fehler) dar. Der festgestellte signifikante Unterschied in der Haftfestigkeit bedeutet, dass die Daten nicht vollständig durch das Modell oder den angegebenen Polynomgrad beschrieben wurden, oder dass andere, nicht kontrollierte Faktoren zusätzlich einen Einfluss auf die Zielgrößen haben.

	FG	Haftfestigkeit				Strukturfestigkeit			
		SQA	Varianz	F	p	SQA	Varianz	F	p
Lack of Fit	3	93439	31146	6,6	0,0006	22878	7626	3,7	0,016
Pure Error	62	290465	4685			127404	2055		
Gesamtfehler	65	383904				150282			

Tab.III-11: Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von HF-OLCS: „Lack of Fit Test“

III 2.2.2 Untersuchung der Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von NaHD-OLCS

Die Untersuchung der Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von NaHD-OLCS erfolgte in einem vollen 3³-Faktorenversuchsplan. Tabelle III-12 gibt eine Übersicht über die untersuchten Faktoren und deren Niveaus. Das Modell wird durch die Gleichung III-3 beschrieben.

$$Y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + a_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + a_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + a_{11} \cdot x_1^2 + a_{22} \cdot x_2^2 + a_{33} \cdot x_3^2 + \varepsilon, \quad (\text{Gl. III-3})$$

Y- Zielgröße (Haftfestigkeit bzw. Strukturfestigkeit), a_0 – Mittelwert, x_1, x_2, x_3 – untersuchte Faktoren: x_1 – Natriumhyaluronat-Konzentration, x_2 – Dextran-Konzentration, x_3 – Ventilstellung, a_1, a_2, a_3 – Haupteffekte des linearen Teils, a_{11}, a_{22}, a_{33} – Haupteffekte des quadratischen Teils, a_{12}, a_{13}, a_{23} – Wechselwirkungen, ε – Reststreuung des Modells

Faktoren		Niveaus		
		-	0	+
Natriumhyaluronat, µg pro Tropfen	X_1	12,5	25	37,5
Dextran, µg pro Tropfen	X_2	250	500	750
Stellung des Feinvakuumventils in der Einfrierphase	X_3	460	530	600

Tab. III-12: NaHD-OLCS: Faktoren und Niveaus

Das obere Niveau der Natriumhyaluronat-Konzentration wurde durch die Viskosität der Lösung mit einem Gehalt von 0,15 % (37,5 µg pro Tropfen) begrenzt, da höher konzentrierte Lösungen sich schlecht filtrieren lassen. Um die Strukturfestigkeit der Lyophilisate zu verbessern, wurde Dextran als Gerüstbildner in Konzentrationen von 250 bis 750 µg pro Tropfen zugesetzt, das die Viskosität nur geringfügig erhöht (s. Kapitel 2.1.1). Die Zusammensetzung der Rezepturen ist in Tabelle III-13 aufgeführt.

Die Auswahl der Einfriergeschwindigkeit wurde bereits für HF-Lyophilisate im Kapitel III-2-2.1 beschrieben.

Rezepturen		Konzentration in der Lösung, % (m/m)	µg pro Tropfen (25 µL)
Rezeptur A	Natriumhyaluronat	0,05	12,5
	Dextran	1	250
Rezeptur B	Natriumhyaluronat	0,05	12,5
	Dextran	2	500
Rezeptur C	Natriumhyaluronat	0,05	12,5
	Dextran	3	750
Rezeptur D	Natriumhyaluronat	0,1	25
	Dextran	1	250
Rezeptur E	Natriumhyaluronat	0,1	25
	Dextran	2	500
Rezeptur F	Natriumhyaluronat	0,1	25
	Dextran	3	750
Rezeptur G	Natriumhyaluronat	0,15	37,5
	Dextran	1	250
Rezeptur H	Natriumhyaluronat	0,15	37,5
	Dextran	2	500
Rezeptur I	Natriumhyaluronat	0,15	37,5
	Dextran	3	750

Tab. III-13: NaHD-OLCS: Zusammensetzung der Rezepturen

Die grafische Darstellung der Versuchskombinationen zeigt Abbildung III-43. Die Versuche im Mittelpunkt wurden dreifach durchgeführt. Die Gesamtanzahl der Versuchskombinationen beträgt 29, jede davon wurde fünf Mal wiederholt. Mit geringerem Aufwand hätten vergleichbare Ergebnisse auch mit dem Box-Behnken Design erzielt werden könnten, auf das die Autoren erst später aufmerksam wurden.

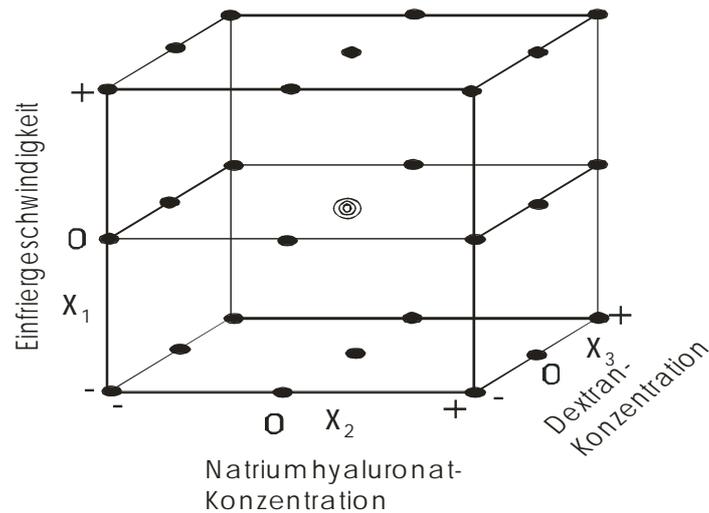


Abb. III-43: Grafische Darstellung der Versuchskombinationen bei einem 3³-Faktorenversuchsplan

Bestimmung der Herstellungsparameter

Analog zu HF-Lyophilisaten wurden bei NaHD-Lyophilisaten die Temperatur- und Druckprofile (III-44 – III-46) bei manuellem Einschalten der Heizung aufgenommen, um die Dauer der Einfrier- und Trocknungsphase festzulegen. Die Lyophilisate wurden mit dem Prototyp IIb unter den in Tabelle III-14 ausgeführten Bedingungen hergestellt.

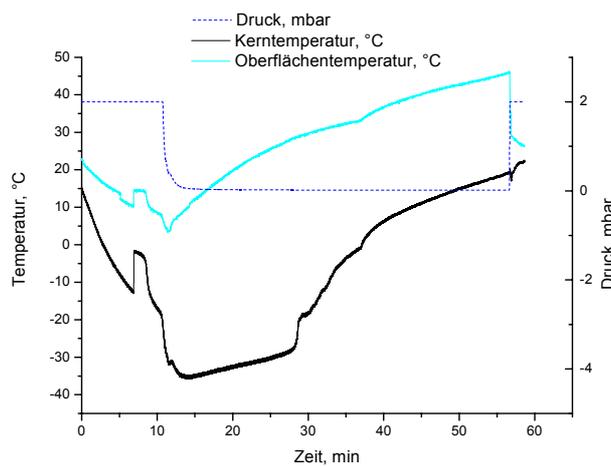


Abb. III-44: Temperatur- und Druckprofile von NaHD-OLCS (Ventilstellung 460)

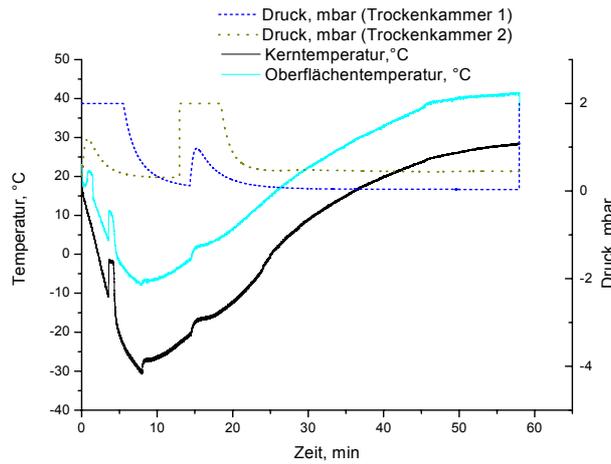


Abb. III-45: Temperatur- und Druckprofile von NaHD-OLCS (Ventilstellung 530)

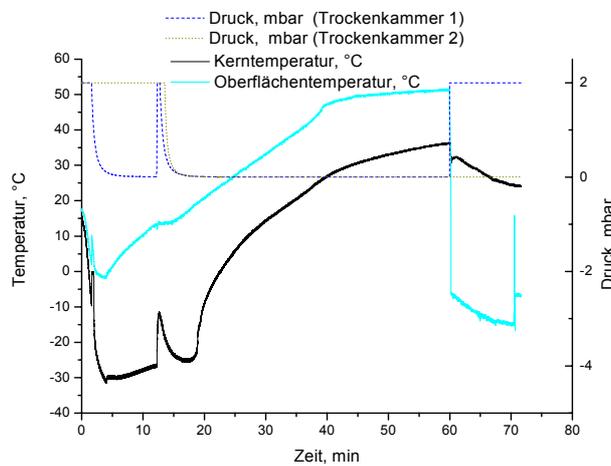


Abb. III-46: Temperatur- und Druckprofile von NaHD-OLCS (Ventilstellung 600)

In den Abbildungen III-45 und III-46 steigen Temperatur und Druck nach 15 bzw. 12 Minuten kurz an, weil zu diesem Zeitpunkt der Prozess in der zweiten Trocknungskammer gestartet wurde.

	Stellung des Feinvakuumsventils in der Einfrierphase	Dauer der Einfrierphase, min	Dauer der Trocknungsphase, min	Heizleistung in der Trocknungsphase, W
1	600	4	56	40
2	530	7	50	40
3	460	12	48	40

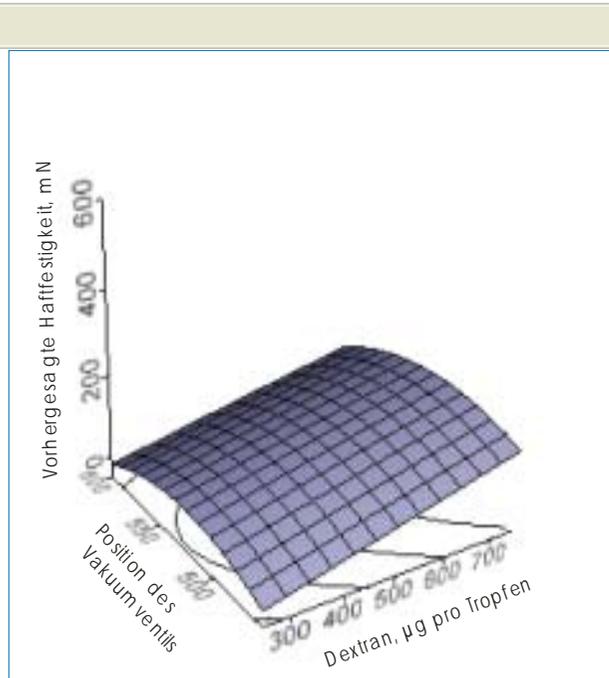
Tab. III-14: NaHD-OLCS: Herstellungsbedingungen

Haftfestigkeit

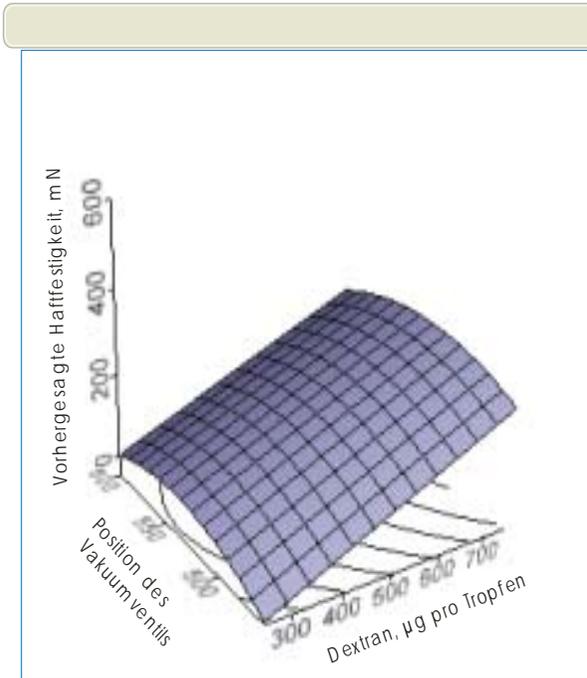
Die Daten der Haftfestigkeit sind tabellarisch im Anhang (Tab. III-3) zusammengefasst. Die graphische Auswertung zeigt, dass die Haftfestigkeit mit steigender Dextran- und Natriumhylanuronat-Konzentration zunimmt (Abb.III-47). Die Krümmung der Kurven mit dem Maximum der Haftfestigkeit bei mittlerer Einfriergeschwindigkeit ist hier deutlicher ausgeprägt als bei der Haftfestigkeit von HF-Lyophilisaten.

Strukturfestigkeit

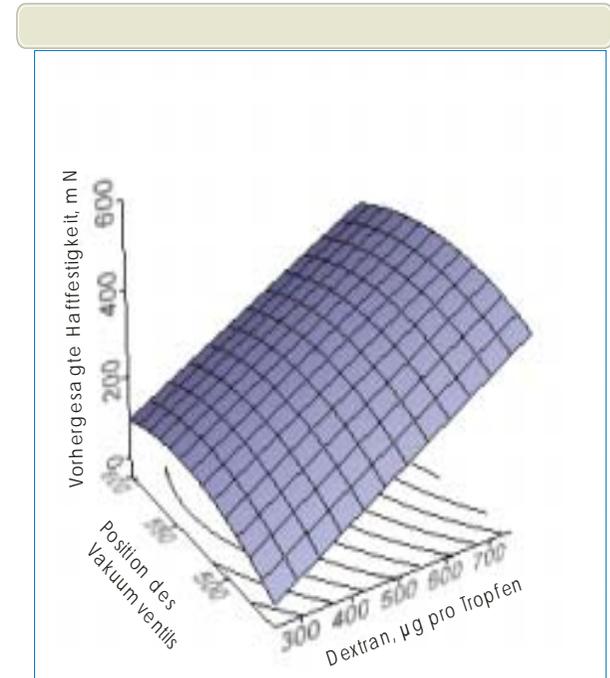
Die Daten der Strukturfestigkeit sind im Anhang (Tabelle VIII-4) dargestellt. Ähnlich, wie bei HF-Lyophilisaten nimmt die Strukturfestigkeit mit dem steigenden Feststoffgehalt (Dextran- und Natriumhyaluronat-Konzentration) zu (Abb.III-48). Die Einfriergeschwindigkeit hat kaum einen Einfluss auf die Strukturfestigkeit von NaHD-OLCS.



a. 12,5 µg Natriumhyaluronat pro Tropfen

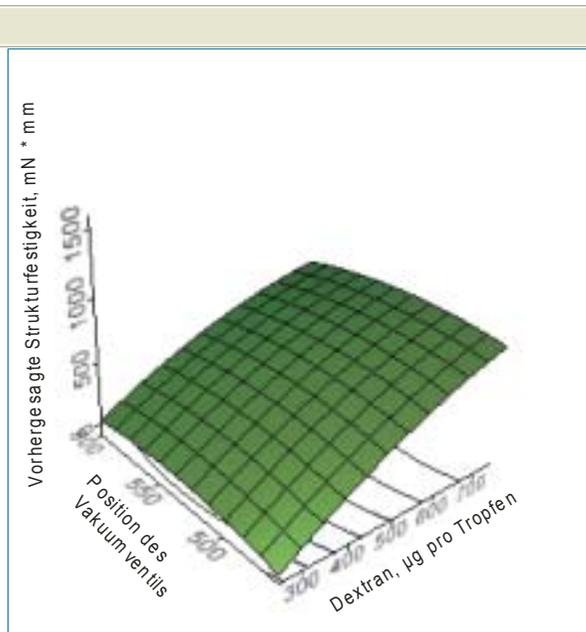


b. 25 µg Natriumhyaluronat pro Tropfen

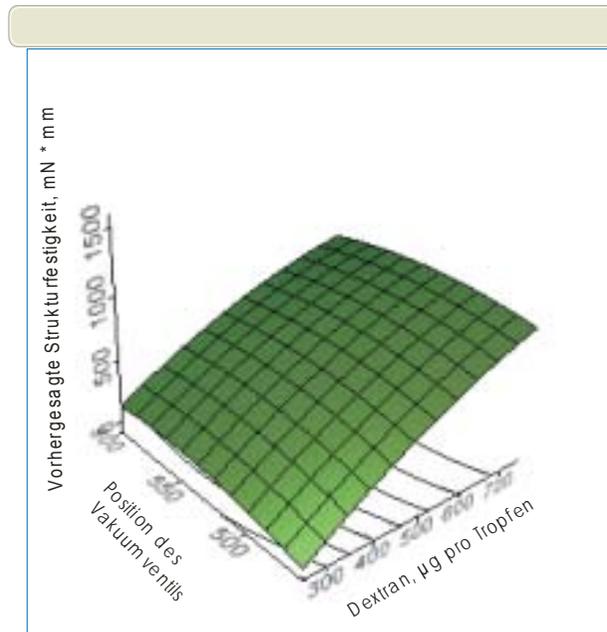


c. 37,5 µg Natriumhyaluronat pro Tropfen

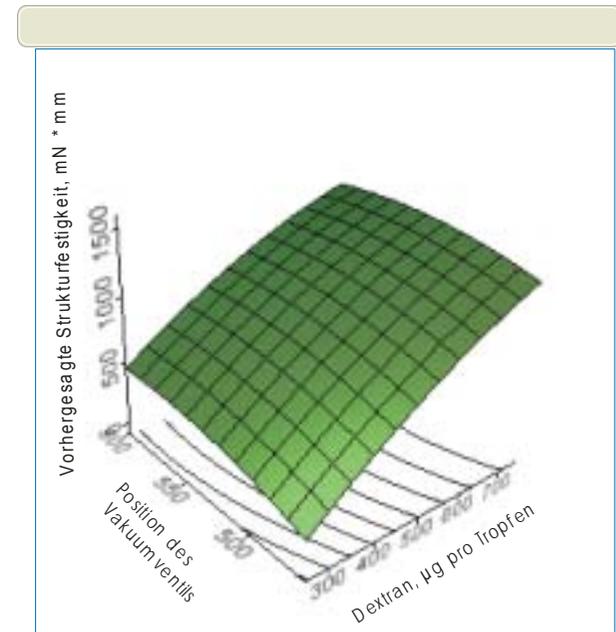
Abb. III-47: Haftfestigkeit von NaHD-Lyophilisaten



a. 12,5 µg Natriumhyaluronat pro Tropfen



b. 25 µg Natriumhyaluronat pro Tropfen



c. 37,5 µg Natriumhyaluronat pro Tropfen

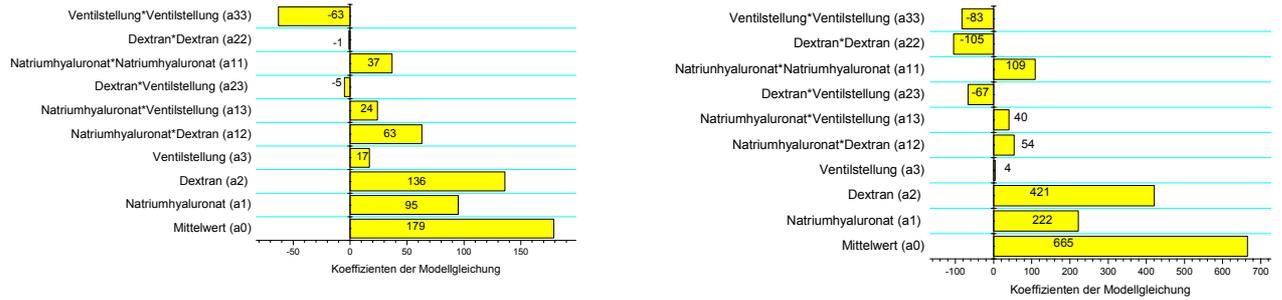
Abb. III-48: Strukturfestigkeit von NaHD-Lyophilisaten

Statistische Beurteilung

Natriumhyaluronat- und Dextran-Konzentrationen beeinflussen sowohl die Haftfestigkeit als auch die Strukturfestigkeit der OLCS hochsignifikant (Tab. III-15). Dabei ist der Effekt der Dextran-Konzentration stärker ausgeprägt (Abb. III-49). Der Einfluss der Dextran-Konzentration auf die Haftfestigkeit wird zusätzlich durch die Natriumhyaluronat-Konzentration und der Einfluss auf die Strukturfestigkeit durch die Ventilstellung verstärkt. Für die Strukturfestigkeit sind die Koeffizienten der quadratischen Glieder von den Versuchsvariablen Einfriergeschwindigkeit, Fluorescein- und Dextran-Konzentration signifikant von Null verschieden. Für die Haftfestigkeit gilt das nur für die Ventilstellung.

	FG	Haftfestigkeit			Strukturfestigkeit		
		SQA	F	p	SQA	F	p
Natriumhyaluronat	1	811851	36,23	<0,0001	4447974	76,53	<0,0001
Dextran	1	1667470	74,42	<0,0001	15918297	273,89	<0,0001
Ventilstellung	1	25439	1,15	0,2885	1705	0,03	0,8643
Natriumhyaluronat* Dextran	1	239730	10,7	0,0014	173911	2,993	0,0859
Natriumhyaluronat* Ventilstellung	1	35746	1,6	0,2087	97698	1,7	0,1970
Dextran* Ventilstellung	1	1565	0,07	0,7920	267952	4,61	0,0336
Natriumhyaluronat* Natriumhyaluronat	1	45819	2,045	0,1550	391691	6,74	0,0105
Dextran* Dextran	1	62	0,003	0,9582	363816	6,26	0,0135
Ventilstellung* Ventilstellung	1	129945	5,8	0,0174	227805	3,92	0,0498

Tab. III-15: Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von NaHD-OLCS: Effekt –Test



a. Haftfestigkeit

b. Strukturfestigkeit

Abb. III-49: Koeffizienten des Modells

Ähnlich wie bei der Varianzanalyse der Ergebnisse von Haft- und Strukturfestigkeit von HF-Lyophilisaten, werden auch hier die Daten besser durch die Modelle als durch die Mittelwerte beschrieben (Tab. III-15).

	FG	Haftfestigkeit				Strukturfestigkeit			
		SQA	Varianz	F	p	SQA	Varianz	F	p
Modell	9	2943436	327048	14,6	<0,0001	21820640	2424516	41,7158	<0,0001
Fehler	135	3024845	22406			784169	58120		
Gesamt	144	5968281				29666809			

Tab. III-15: Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von NaHD-OLCS: Varianzanalyse

Der Lack of Fit-Test deutet auf nicht ausreichenden Polynomgrad des Modells oder auf Existenz nicht kontrollierter Faktoren hin, die die Zielgrößen signifikant beeinflussen können.

	FG	Haftfestigkeit				Strukturfestigkeit			
		SQA	Varianz	F	p	SQA	Varianz	F	p
Lack of Fit	17	868971	51116	2,8	0,0006	5680465	334145	18,21	<0,0001
Pure Error	118	2155874	18270			2165704	18353		
Gesamtfehler	135	3024845				7846170			

Tab. III-16: Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von NaHD-OLCS: Lack of Fit Test

III 2.2.3 Einfluss der Folienprägung auf Haftfestigkeit von OLCS

Theoretischer Hintergrund und Zielsetzung des Versuches

Das Phänomen der Selbstreinigung von Lotusblüten wurde zum ersten Mal von Prof. W. Barthlott beschrieben [29]. Er entdeckte die Mikrostrukturierung der Oberfläche. Die Außenhaut der Lotusblätter hat kleine Noppen, die 5-10 µm hoch und 10-15 µm voneinander entfernt sind. Diese Noppen sind ihrerseits von einer feinen Struktur aus Wachskristallen mit einem Durchmesser von ca. 100 nm überzogen. Das Verhalten von Wasser auf einer Oberfläche hängt von ihrer Rauigkeit ab. Die Mikrostrukturierung einer hydrophoben schlecht benetzbaren Oberfläche führt zur weiteren Verschlechterung der Benetzbarkeit. Dabei wird die Kontaktfläche zwischen dem Tropfen und dem Blatt verkleinert. Beim Abrollen eines Wassertropfens auf dem Blatt haften die Schmutzpartikel auf der Tropfenoberfläche und werden entfernt. Der Lotuseffekt wird seit Jahren in der Lack- und Farbindustrie und seit kurzem auch in der Keramik-, Glas- und Textilindustrie eingesetzt.

In dieser Versuchreihe wurde durch Prägung eine Mikrostruktur auf die PTFE-Folie aufgebracht und die Auswirkung auf die Haftfestigkeit für HF- und NaHD-OLCS untersucht. Die Lyophilisate wurden bei der mittleren Einfriergeschwindigkeit (Ventilstellung 530) unter in der Tabelle III-8 und III-14 entsprechend aufgeführten Herstellungsbedingungen hergestellt. Die Zusammensetzung der Lyophilisate entsprach der Rezeptur 5 (Tab. III-6) für HF-OLCS und der Rezeptur E (Tab. III-13) für NaHD-OLCS. Für die Prägung wurden zwei Matrizen, Matrize 1 mit dem feinen und Matrize 2 mit dem groben Raster, und zwei als Abdruck hergestellte Kunststoffpatrizen verwendet. Die Angaben zur Mikrostrukturierung der Matrizen sind in Kapitel II 1.3 beschrieben. Die geprägte Folie hat auf der Seite, die der Kunststoffpatrize zugewandt war, die gleiche Struktur, wie beim Matrizenraster mit den Spitzen nach oben. Die geprägte Folie auf der Matrizenenseite zeigt ein inverses Bild. Hier stellen die Spitzen des Matrizenrasters die Vertiefungen in der Folienprägung dar.

Einfluss der Folienprägung auf die Haftfestigkeit von HF-OLCS

In diesem Versuch wurden bei einem kategorischen Faktor die fünf folgenden Niveaus variiert:

- ohne Prägung
- Prägung durch Matrize 1, (der Tropfen wurde auf der Seite der Matrize aufgebracht)
- Prägung durch Matrize 1, (der Tropfen wurde auf der Seite der Matrize aufgebracht)
- Prägung durch Matrize 2
- Prägung durch Matrize 2

Die Messergebnisse sind in Tabelle VIII-5 (Anhang) und in Abbildung III-50 dargestellt.

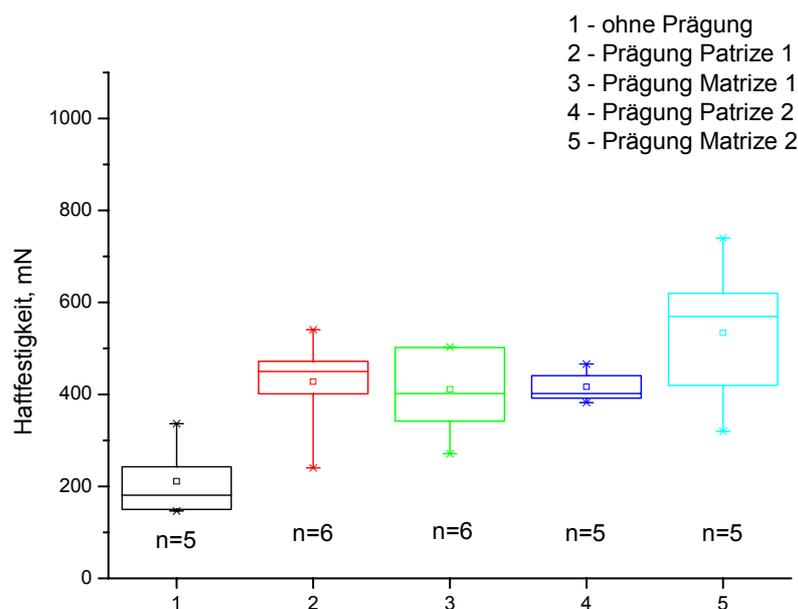


Abb. III-50: Haftfestigkeit von HF-OLCS in Abhängigkeit von Folienprägung

Tabelle III-17 der Varianzanalyse zeigt, dass die Streuung innerhalb der Gruppen kleiner ist als zwischen den Gruppen. Die Haftfestigkeit der Lyophilisate, die mit einer nicht geprägten Folie hergestellt wurden, war signifikant geringer als bei Lyophilisaten mit geprägten Folien. Ein signifikanter Anstieg der Haftfestigkeit wurde für das Niveau Prägung mit Matrize 2 festgestellt.

	FG	SQA	Varianz	F-Wert	p
Prägung	4	274861	68715,2	6,4202	0,0014
Fehler	22	235465	10703,0		
Gesamt	26	510326			

**Tab. III-17: Einfluss der Folienprägung auf die Haftfestigkeit von HF-OLCS:
Varianzanalyse**

Parameter	p
Mittelwert	<0,0001
Prägung durch Patrize 1	0,4725
Prägung durch Matrize 1	0,7798
Prägung durch Patrize 2	0,6923
Prägung durch Matrize 2	0,0036
Ohne Prägung	0,0001

**Tab. III-18: Einfluss der Folienprägung auf die Haftfestigkeit von HF-OLCS: Ausmaß
der Effekte**

Einfluss der Folienprägung auf die Haftfestigkeit von NaHD-OLCS

In diesem Versuch wurden bei einem kategorischen Faktor drei Niveaus variiert. Hier wurde der Tropfen bei einer geprägten Folie nur auf die Seite der Metallmatrize aufgebracht.

Niveaus:

- ohne Prägung
- Prägung durch Matrize 1
- Prägung durch Matrize 2

Die Messergebnisse sind in Tabelle VIII-6 (Anhang) und Abbildung III-51 dargestellt.

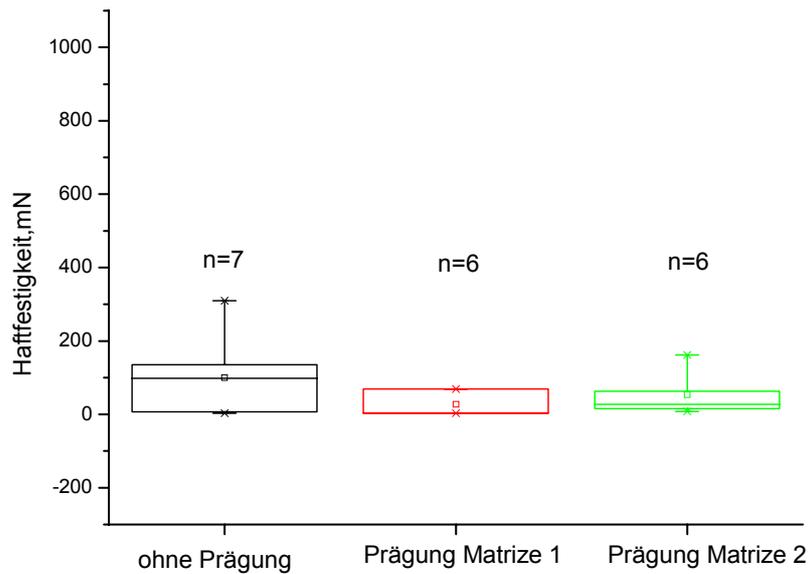


Abb. III-51: Haftfestigkeit von NaHD-OLCS in Abhängigkeit von Folienprägung

Die Haftfestigkeit der Lyophilisate, die mit nicht geprägter Folie hergestellt wurden, ist höher. Aufgrund der Streuung der Ergebnisse wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern festgestellt (Tab.III-19 und III-20).

	FG	SQA	Varianz	F-Wert	p
Prägung	2	17674,41	8837,21	1,6086	0,2319
Fehler	16	88175,69	5510,98		
Gesamt	18	105850,11			

Tab. III-19: Einfluss der Folienprägung auf die Haftfestigkeit von NaHD-OLCS:

Varianzanalyse

Parameter	p
Mittelwert	0,0028
Prägung durch Matrize 1	0,1972
Prägung durch Matrize 2	0,7866
Ohne Prägung	0,1117

Tab. III-20: Einfluss der Folienprägung auf die Haftfestigkeit von NaHD-OLCS: Ausmaß der Effekte

Die Erwartung, dass durch die Prägung der PTFE-Folie die Haftfestigkeit der Lyophilisate reduziert werden kann, hat sich bei den beiden Rezepturen nicht bestätigt. Im Gegensatz zu NaHD-OLCS zeigen HF-Lyophilisate sogar eine Zunahme der Haftfestigkeit bei der geprägten Folie, was eventuell auf eine bessere Benetzbarkeit der PTFE-Folie durch HF-Lösungen zurückzuführen ist.

III 2.2.4 Form der Lyophilisate

Da die Form des Tropfens die Haftfestigkeit von Lyophilisaten beeinflusst, ist sie ein wichtiges Kriterium für die gute Applizierbarkeit. Breitere Tropfen haben mehr Kontaktfläche zwischen dem Tropfen und der Folie und besitzen eine höhere Haftfestigkeit. Die Form des Tropfens wird durch den Kontaktwinkel charakterisiert. Wie schon in Kapiteln III 2.1.1 und III 2.2.2 erläutert wurde, wird der Kontaktwinkel durch die Oberflächenspannung, die Zeit in flüssigem Zustand und durch Vibration und Stöße beeinflusst. Dabei sind die niedrigviskosen Tropfen viel empfindlicher. Die Faktoren, die zurzeit nicht vollständig kontrolliert werden können, sind die manuelle Handhabung beim Auftropfen und Beladen der Trocknungskammer und die Inhomogenität der Folienoberfläche.

In diesem Versuch wurde der Kontaktwinkel zwischen den NaHD- und HF-Lyophilisaten verglichen. Die beiden Lyophilisattypen wurden bei der mittleren Einfriergeschwindigkeit (Ventilstellung 530) im Laborprototyp IIb hergestellt. Die Herstellungsbedingungen sind den Tabellen III-8 und III-14 zu entnehmen. Die Zusammensetzung der Lösung war mit Rezeptur E (Tab. III-13) für NaHD - Lyophilisate und Rezeptur 5 (Tab. III-6) für HF-Lyophilisate identisch. Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII-7 (Anhang) und in Abbildung III-52 als Box-Plot dargestellt. Wie aufgrund der Messungen der Oberflächenspannung zu erwarten war, haben die NaHD-Lyophilisate den größeren Kontaktwinkel zwischen dem Tropfen und der Folie. Diese liegt in den meisten Fällen über 90°.

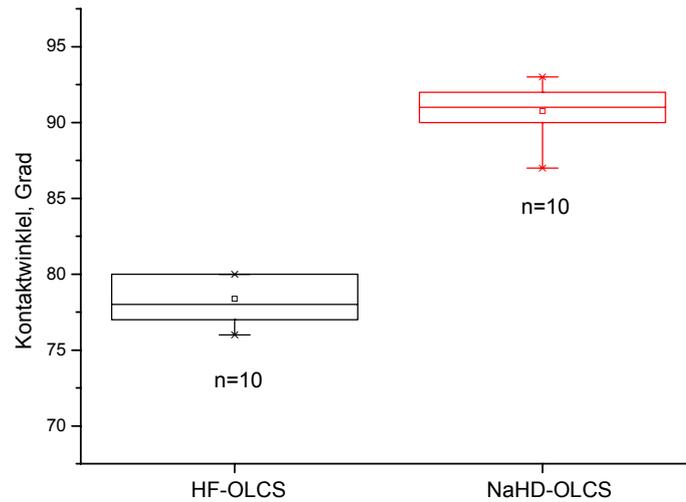


Abb. III-52: Kontaktwinkel zwischen Tropfen und Folie

Die HF-Tropfen sind mit einem Kontaktwinkel zwischen 75° und 80° wesentlich breiter. Der t-Test zeigt einen hochsignifikanten Unterschied der Mittelwerte des Kontaktwinkels ($p < 0,0001$) bei annähernd gleicher Streuung.

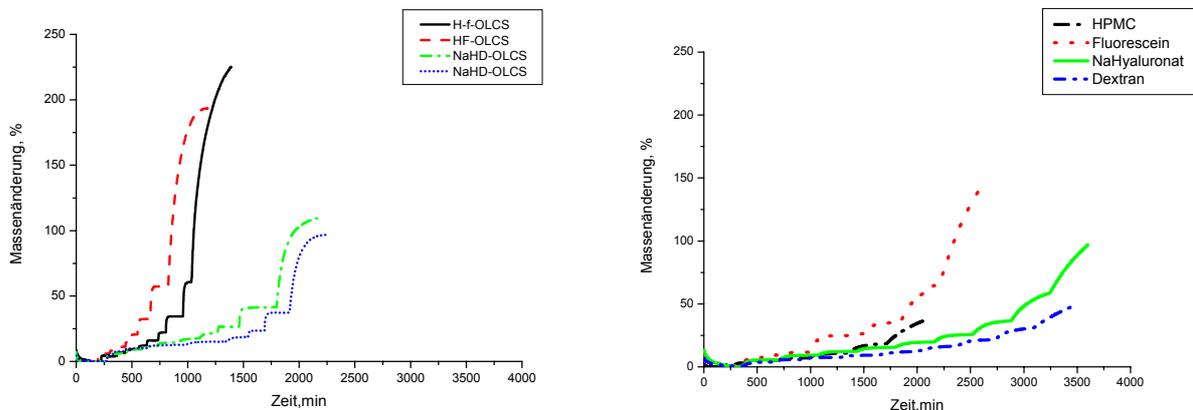
III 2.2.5 Sorptionsisothermen mittels DVS

Die Lyophilisate bestehen im Wesentlichen aus leicht wasserlöslichen und gut benetzbaren Kohlenhydraten und ihre Hydrophilie ist aufgrund ihrer Porenstruktur und großen inneren Oberfläche besonders ausgeprägt. Anhand der Adsorptionsisothermen wurde untersucht, wie viel Wasser die OLCS in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit bei 25 °C aufnehmen können und wie schnell sich das Gleichgewicht einstellt. Diese Untersuchungen sind wichtig für die spätere Auswahl der Verpackung und Festlegung der Lagerungsbedingungen.

Wegen der langen Dauer der Messung wurden jeweils nur zwei Proben von NaHD- und HF-Lyophilisaten und als Vergleich die Wasserabsorption von einzelnen Substanzen (Fluorescein, HPMC, Natriumhyaluronat und Dextran) untersucht.

Die Lyophilisate wurden bei der mittleren Einfriergeschwindigkeit (Ventilstellung 530) unter in der Tabelle III-8 und III-14 entsprechend aufgeführten Herstellungsbedingungen hergestellt. Die Zusammensetzung der Lyophilisate entsprach der Rezeptur 5 (Tab. III-6) für HF-OLCS und der Rezeptur E (Tab. III-13) für NaHD-OLCS.

Abbildung III-53 zeigt die Kinetik der Wasserabsorption von OLCS und einzelnen Substanzen. Aus der Massenänderung ergibt sich die nach einer Zeit aufgenommene Menge an Feuchte. Erwartungsgemäß nehmen die Lyophilisate das Wasser schneller auf als ihre Bestandteile. Vergleicht man einzelne Bestandteile, ist die Wasseraufnahme von HPMC am schnellsten abgeschlossen, gefolgt von Fluorescein. In der Kinetik der Wasseraufnahme der Lyophilisate ist ein deutlicher Unterschied zwischen HF- und NaHD-OLCS zu sehen. Die Feuchteaufnahme von HF-OLCS erfolgt fast zwei Mal schneller.



a. OLCS

b. einzelne Substanzen

Abb. III-53: DVS-Messungen von OLCS

Die Massenänderung bis 65 % RH ist bei allen Lyophilisaten fast gleich und beträgt ungefähr 20 % (Abb. III-59). Erst ab 65 % RH nehmen die HF-OLCS mehr Wasser auf. Auffällig ist der sprunghafte Gewichtsanstieg ab 87 % RH bei allen Proben. Im Gegenteil dazu erfolgt die Wasseraufnahme von einzelnen Substanzen schon von Anfang an unterschiedlich, z. B. haben Fluorescein und Natriumhyaluronat eine Massenänderung von ca. 25 % und HPMC von 7 % bei 65 % RH. Dextran und HPMC zeigen keine sprunghafte Massenänderung auch bei der RH ab 87 %. Erwartungsgemäß ist die Massenänderung der Lyophilisate besonders bei RH ab 87 % viel deutlicher ausgeprägt. Das ist auf eine viel höhere Porosität der Lyophilisate zurückzuführen. Vergleicht man nur die Massenänderung von Lyophilisaten, ist ebenso ein deutlicher Unterschied zwischen HF- und NaHD-OLCS zu sehen. Die Massenänderung von HF-Lyophilisaten ist fast zweimal höher als die von NaHD-OLCS. Vermutlich ist die Struktur von HF-OLCS durch den geringeren Feststoffgehalt (386 µg pro Tropfen) poröser als die Struktur von NaHD-OLCS

(Feststoffgehalt 525 µg pro Tropfen). Um diese Hypothese zu bestätigen sind noch weitere Versuche notwendig, die den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Die Wasseraufnahme von OLCS führte zur Änderung ihrer Form und Struktur.

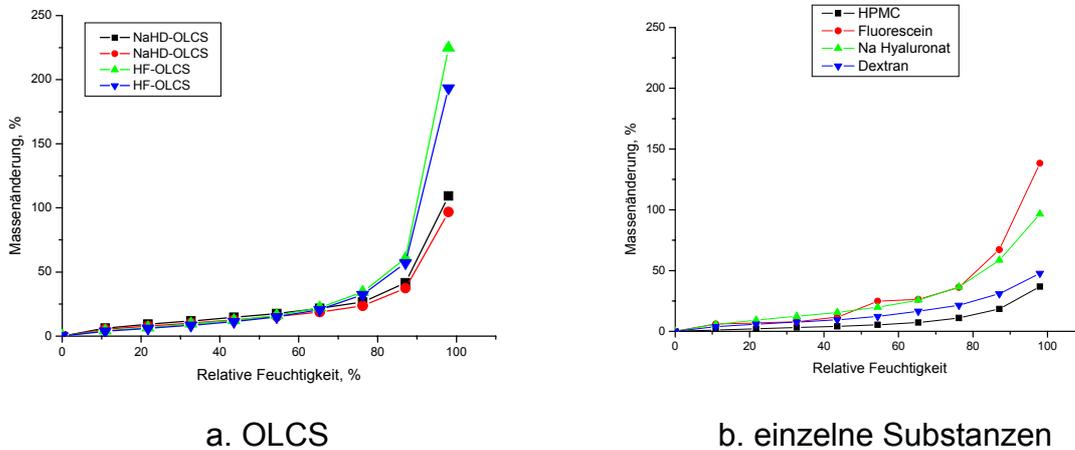


Abb. III-54: Adsorptionsisothermen

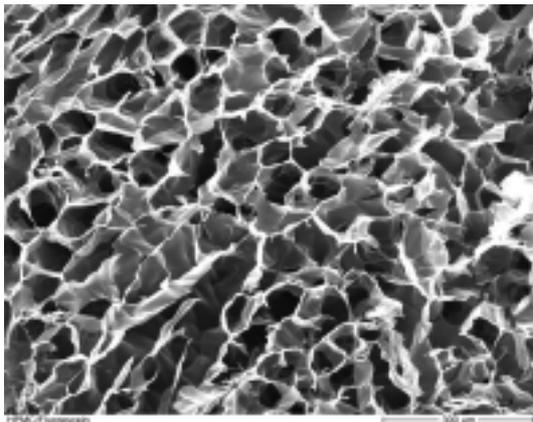
III 2.2.6 REM-Untersuchungen der Lyophilisate

Die Porenstruktur der Lyophilisate hat sowohl Einfluss auf die Dauer des Herstellungsprozesses als auch auf die Eigenschaften des Produktes. Größe und Form der Poren und Kanäle, die auch „Ice Ghosts“ genannt werden [59], bestimmen den Widerstand des Wasserdampfes in der Primärtrocknung und damit auch die Trocknungsgeschwindigkeit. Die Geometrie der „Ice Ghosts“ hat einen Einfluss auf die Auflösungsgeschwindigkeit. Die Art (amorph oder kristallin) der Porenstruktur beeinflusst die Stabilität des Produktes. S. Maier stellte fest, dass die Haffestigkeit der OLCS von der Porenstruktur abhängig ist, die durch die Einfriergeschwindigkeit und den Feststoffgehalt beeinflusst wird [52].

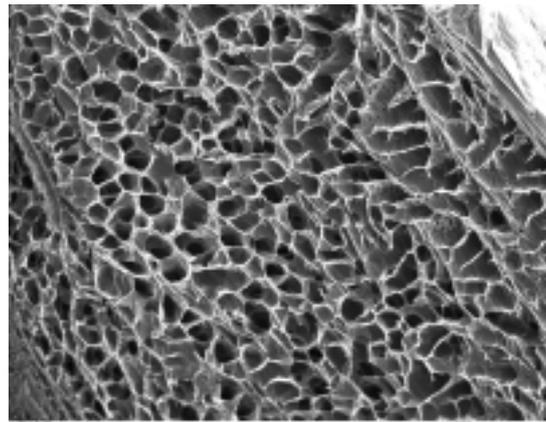
Die halbkugelförmigen OLCS-Tropfen weisen eine lockere innere Struktur und eine dichtere Hautschicht auf der Oberfläche des Tropfens auf. Daher wird der Einfluss der Einfriergeschwindigkeit und des Feststoffgehaltes auf die innere Struktur, Oberflächen- und Bodenstruktur von HF- und NaHD-OLCS mittels REM untersucht. Alle Lyophilisate wurden mit dem Laborprototyp IIb der Gefriertrocknungsanlage nach den in Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 ausgeführten Rezepturen und Bedingungen hergestellt. Für einige Proben wurde eine Bildanalyse durchgeführt, um die Porengrößenverteilung zu quantifizieren.

Innere Struktur der Lyophilisate.

Die innere Porenstruktur des Lyophilisates wird durch das Einfrierverfahren, die Bedingungen der Haupttrocknung, sowie durch die Art und Konzentration der Inhaltsstoffe festgelegt [59]. In der Einfrierphase wird eine Matrix aus Eiskristallen und Zwischenbereichen der anderen Bestandteile gebildet. Durch das Verdampfen der Eiskristalle während der Primärtrocknung entsteht ein poröses schwammartiges Gerüst.

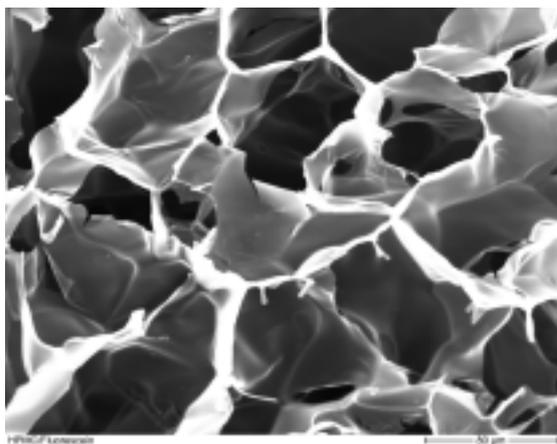


a. Stellung des Feinvakuumventils 460

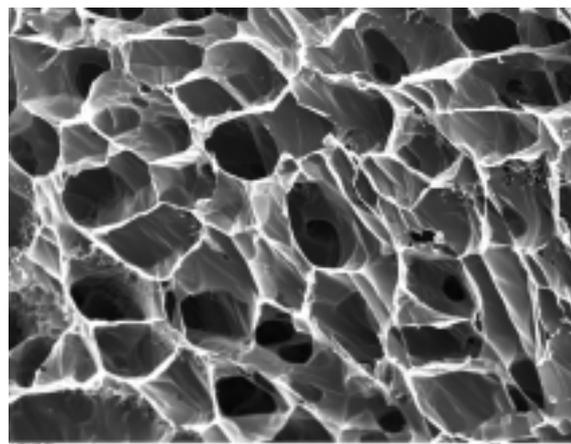


b. Stellung des Feinvakuumventils 600

**Abb. III-55: REM-Aufnahme von HF-OLCS, vertikaler Schnitt
(250 μg HPMC und 68 μg Fluorescein pro Tropfen), Vergrößerung 110**



a. Stellung des Feinvakuumventils 460

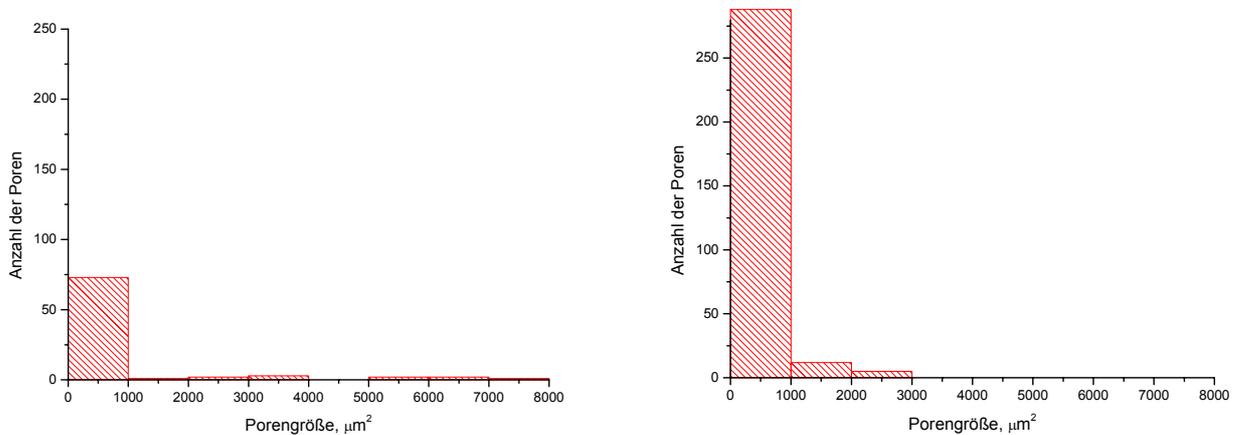


b. Stellung des Feinvakuumventils 600

**Abb. III-56: REM-Aufnahme von HF-OLCS, vertikaler Schnitt
(250 μg HPMC und 68 μg Fluorescein pro Tropfen), Vergrößerung 350**

Die Abbildungen III-55 und III-56 zeigen den Einfluss der Einfriergeschwindigkeit auf die Porenstruktur der HF-OLCS. Beide Proben weisen eine wabenförmige Textur auf.

Die langsam eingefrorene Probe hat viel größere und weitere Poren (Abb. III-56a). Die Anzahl der Poren ist dagegen bei langsam eingefrorenen Proben geringer. Einen quantitativen Vergleich stellen die Histogramme der Porengrößenverteilungen in Abbildung III-57 dar.

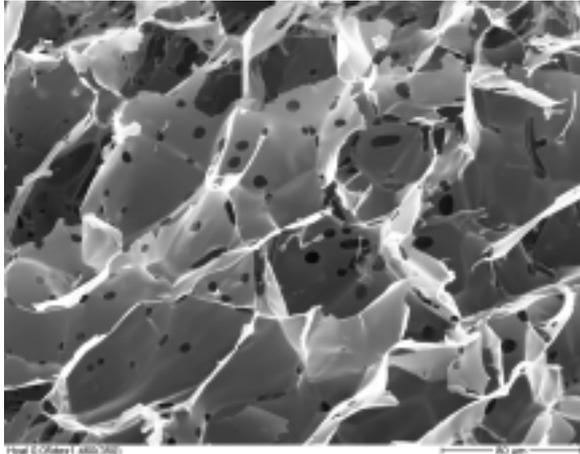


a. Bildanalyse der Abb. III-56a

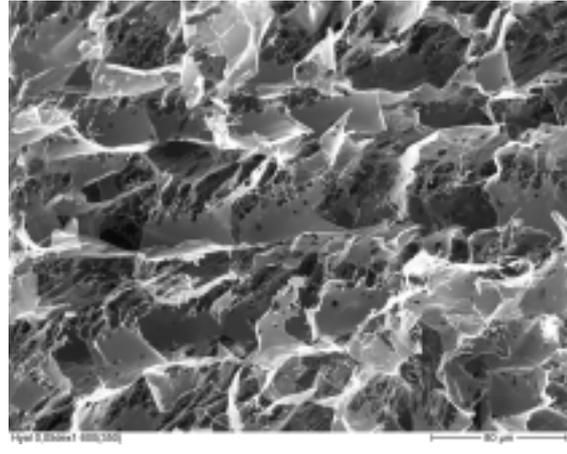
b. Bildanalyse der Abb. III-56b

Abb. III-57: Histogramm der Porengrößenverteilung

Abbildungen III-58 und III-59 zeigen den Einfluss der Einfriereschwindigkeit und des Feststoffgehaltes auf die Porenstruktur der NaHD-OLCS. Die langsam eingefrorene Probe in Abbildung III-58a hat eine lockere Textur ohne eine bestimmte Anordnung. Die schnell eingefrorene Probe (Abb. III-58b) besteht aus mehrlagigen Schichten der längsgeordneten blattartigen Feststoffbereiche. Die beiden Proben (Abbildung III-58) weisen neben der groben Porenstruktur noch kleine runde Löcher in den Wänden der Matrix auf. Die grobe Struktur der beiden Proben wird in der Einfrierphase gebildet. Die kleineren Löcher in den Wänden der Textur entstehen in der Primärtrocknung und sind eine Folge des mini-Collaps. In diesem Fall werden die Eiskristalle durch eine leichte Überwärmung in der Trocknungsphase lokal angelöst, was aber nicht zum vollen Strukturverlust führt. Dieses Phänomen wurde auch von Overchashier bei Sacharose beobachtet [59]. Proben mit einem geringeren Feststoffgehalt (Abb. III-58b und III-59b) haben eine lockerere Textur als Proben mit einem höheren Feststoffgehalt. Der vertikale Schnitt durch die NaHD-OLCS, die mittelschnell eingefroren wurden, zeigt eine Struktur, die säulenförmig und teilweise wabenförmig ist (Abb. 59b).



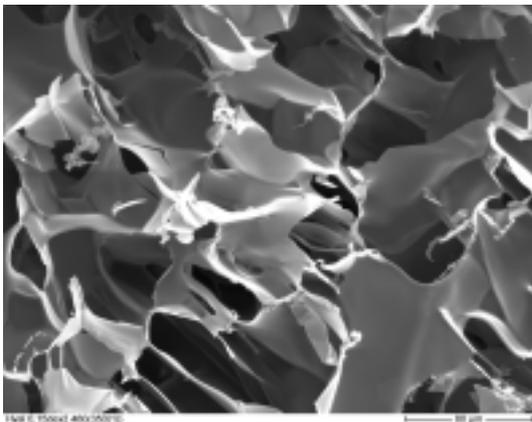
a. Stellung des Feinvakuumventils 460



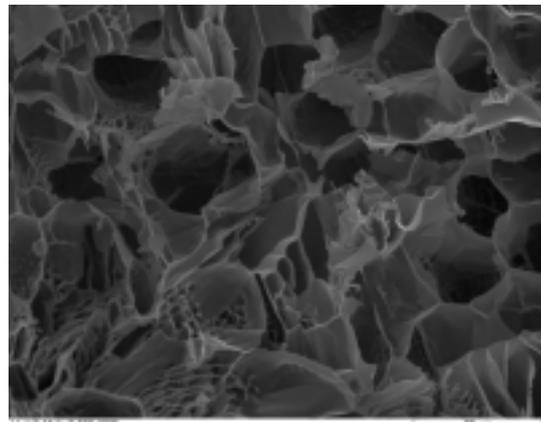
b. Stellung des Feinvakuumventils 600

Abb. III-58: REM-Aufnahme von NaHD-OLCS, vertikaler Schnitt

(12,5 µg Natriumhyaluronat und 250 µg Dextran pro Tropfen), Vergrößerung 350



a. Stellung des Feinvakuumventils 460



b. Stellung des Feinvakuumventils 530

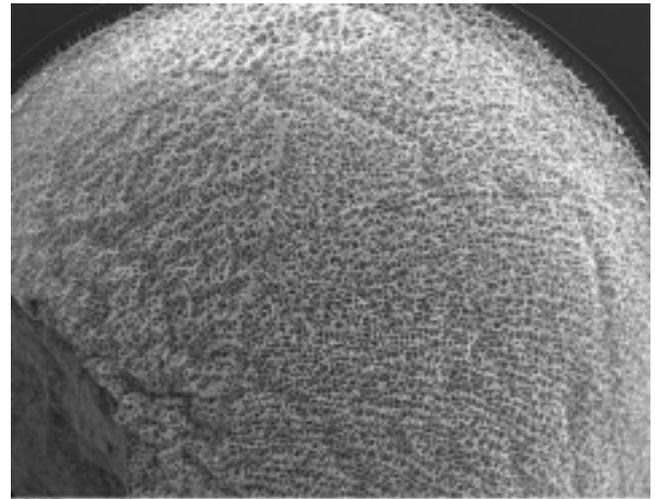
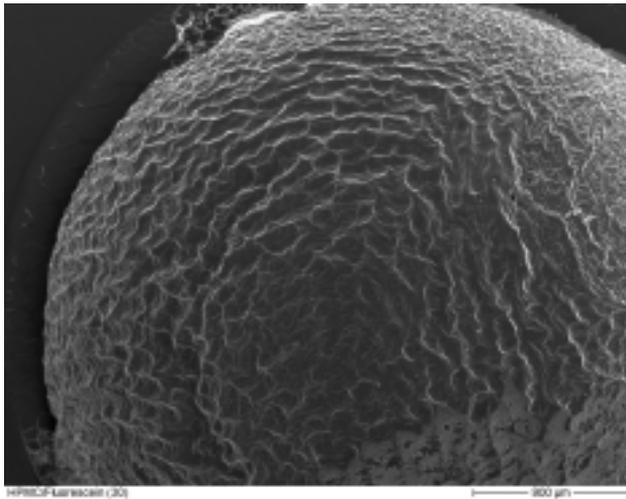
Abb. III-59: REM-Aufnahme von NaHD-OLCS, vertikaler Schnitt

(37,5 µg Natriumhyaluronat und 500 µg Dextran pro Tropfen), Vergrößerung 350

Oberfläche des Tropfens

Die Oberfläche des Tropfens ist mit einer Hautschicht überzogen, die eine dichtere Struktur hat als das Inneren des Tropfens. Die Bildung der Hautschicht wird laut Jennings [31] durch die Entstehung einer heterogenen Matrix in der Einfrierphase verursacht. Die Porengröße in der Hautschicht beeinflusst den Wasserdampftransport und ist damit einer der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte in der Trocknung. Jennings berichtet, dass sich in manchen Fällen die Zusammensetzung der Hautschicht und des Produktkuchens signifikant unterscheidet [31]. Die Oberfläche der schnell eingefrorenen HF-OLCS ist gleichmäßig, locker und porös (Abb. III-60b). Im Gegensatz dazu ist die Oberfläche

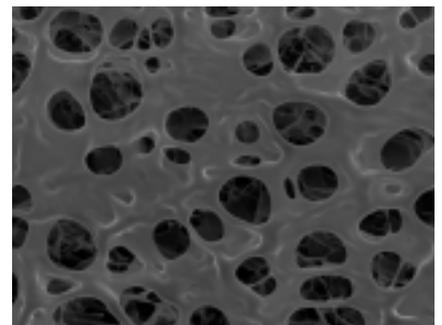
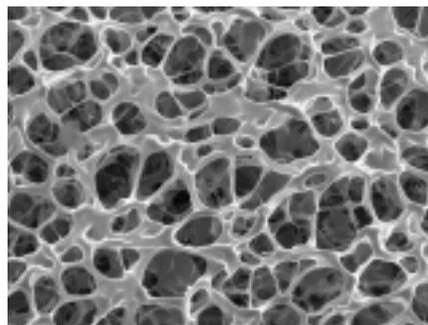
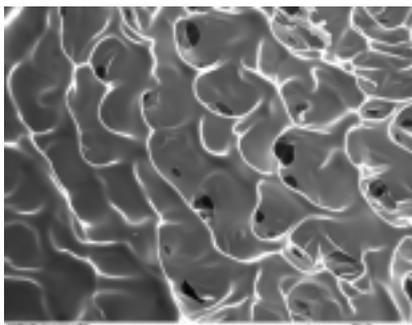
der langsam eingefrorenen OLCS gleicher Zusammensetzung geschlossen und es sind nur wenige Poren hauptsächlich am Rand des Tropfens zu sehen (Abb.III-61a). Der Vergleich der Abbildungen III-61b und III-61c zeigt den Einfluss des Polymergehaltes auf die Porenstruktur der Hautschicht von HF-OLCS. Die Probe mit höherem Polymergehalt hat eine dichtere Oberflächenstruktur mit geringerer Porenanzahl. Die Abbildungen III-62a und III-62b zeigen die Porengrößenverteilungen im Vergleich.



a. Stellung des Feinvakuumventils 460

b. Stellung des Feinvakuumventils 600

**Abb. III-60: REM-Aufnahme von HF-OLCS, Oberfläche
(125 µg HPMC und 136 µg Fluorescein pro Tropfen), Vergrößerung 30**

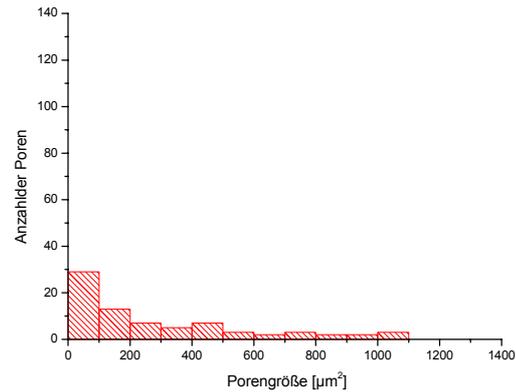
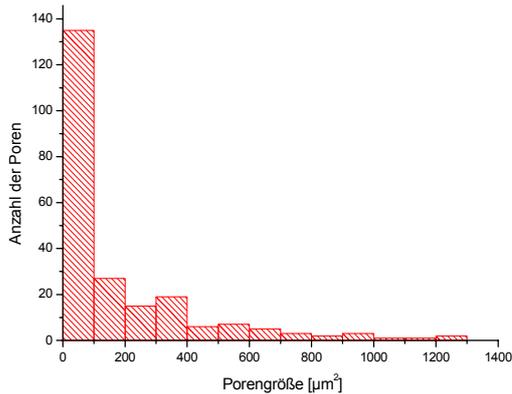


a. 125 µg HPMC und 136 µg Fluorescein pro Tropfen, Stellung des Feinvakuumventils 460

b. 125 µg HPMC und 136 µg Fluorescein pro Tropfen, Stellung des Feinvakuumventils 600

c. 375 µg HPMC und 136 µg Fluorescein pro Tropfen, Stellung des Feinvakuumventils 600

Abb. III-61: REM-Aufnahme von HF-OLCS, Oberfläche, Vergrößerung 350

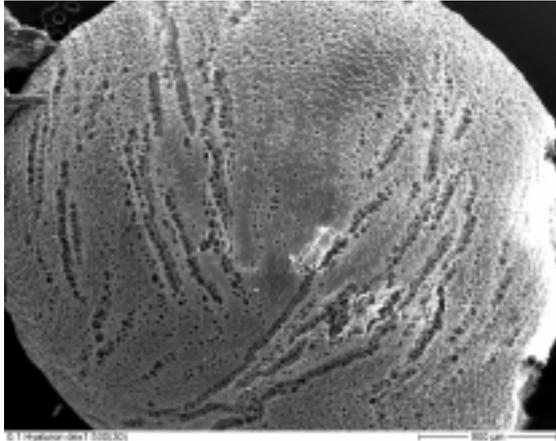


a. Bildanalyse von Abb. III-61b

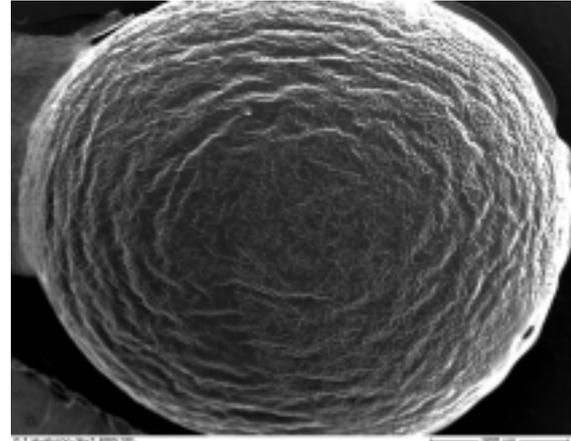
b. Bildanalyse von Abb. III-61c

Abb. III-62: Histogramm der Porengrößenverteilung

Abbildungen III-63a, III-63b und III-64a stellen einen Vergleich der Oberflächenstrukturen von NaHD-OLCS gleicher Zusammensetzung bei drei Einfriergeschwindigkeiten dar. Hier sind die Unterschiede nicht so deutlich zu sehen, wie bei den HF-Lyophilisaten. Die schnell eingefrorene Probe hat eine geschlossene Oberfläche. Poren sind bei dieser Vergrößerung fast nicht erkennbar (Abb. III-63b). Auf der Oberfläche der langsam und mittelschnell eingefrorenen Proben sind mehrere Kanäle mit Poren zu sehen (Abb. III-63a und III-64a). Die poröseste Oberfläche hat die Probe, die bei einer mittleren Einfriergeschwindigkeit eingefroren wurde (Abb. III-63a). Die Proben mit dem höheren Dextran-Gehalt weisen keine sichtbaren Veränderungen in der Oberflächenstruktur gegenüber den Proben mit niedrigerem Dextran-Gehalt auf, die bei gleichen Bedingungen hergestellt wurden (Abb. III-64a und III-64b).

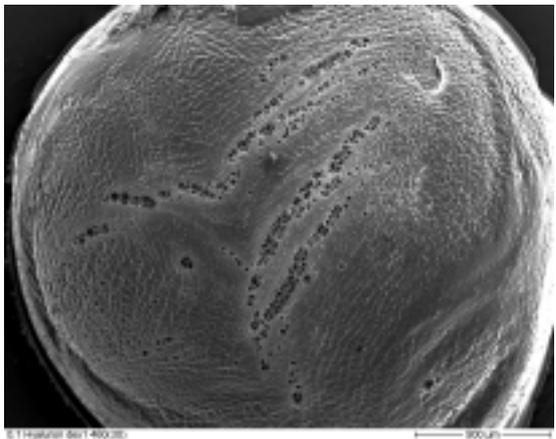


a. Stellung des Feinvakuumventils 530

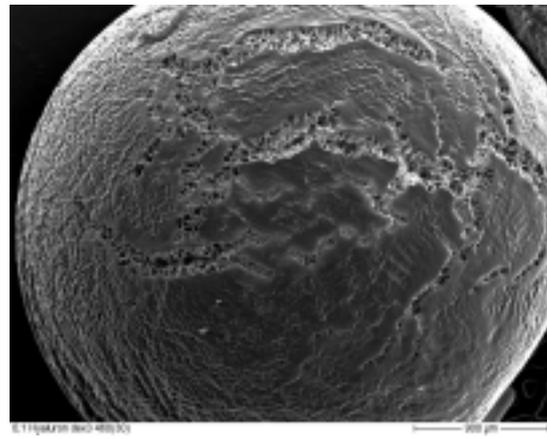


b. Stellung des Feinvakuumventils 600

Abb. III-63: REM-Aufnahme von NaHD-OLCS, Oberfläche (12,5 µg Natriumhyaluronat und 250 µg Dextran pro Tropfen), Vergrößerung 30



a. 12,5 µg Natriumhyaluronat und 250 µg Dextran pro Tropfen



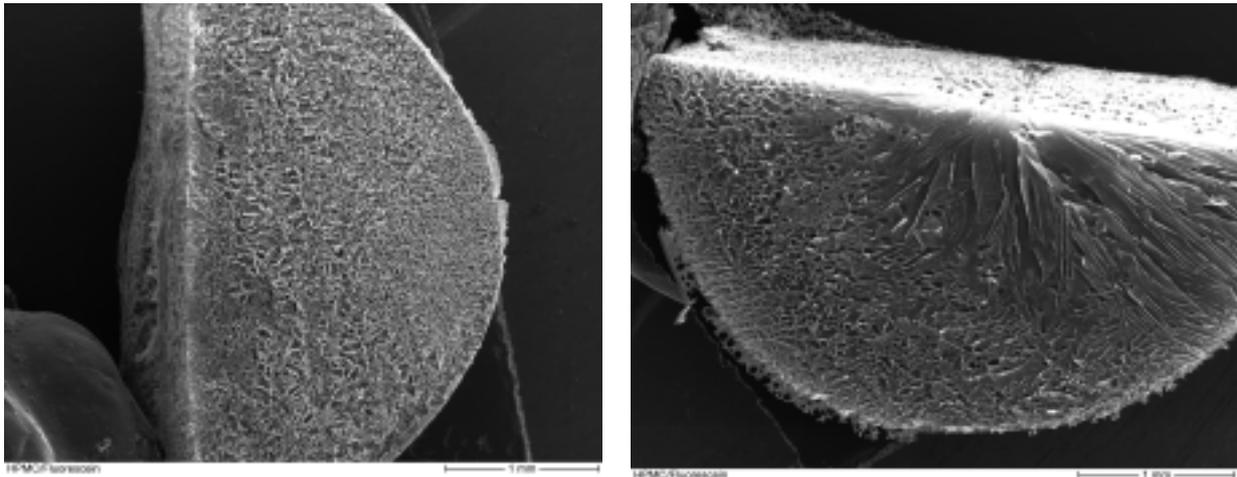
b. 12,5 µg Natriumhyaluronat und 750 µg Dextran pro Tropfen

Abb. III-64: REM-Aufnahme von NaHD-OLCS, Oberfläche (Stellung des Feinvakuumventils 460), Vergrößerung 30

Bodenstruktur des Tropfens

Die Porenstruktur des Bodens hat eine Auswirkung auf die Haftfestigkeit der Lyophilisate. Die langsam eingefrorenen Proben von HF- Lyophilisaten haben eine gleichmäßige Bodenstruktur (Abb.III-65a und III-66a). Schnell eingefrorene Proben haben Bereiche ohne bestimmte Anordnung der Kristalle (Abb. III-66b) und Bereiche mit ausgeprägt zur Mitte des Tropfens gerichteten Kristallen (Abb. III-66c). Laut Literatur ist die Richtung der Kristalle durch den extremen Temperaturgradienten im Produktkuchen in der Einfrierphase bedingt (s. Kapitel I 1.1.1) [39]. Die zur

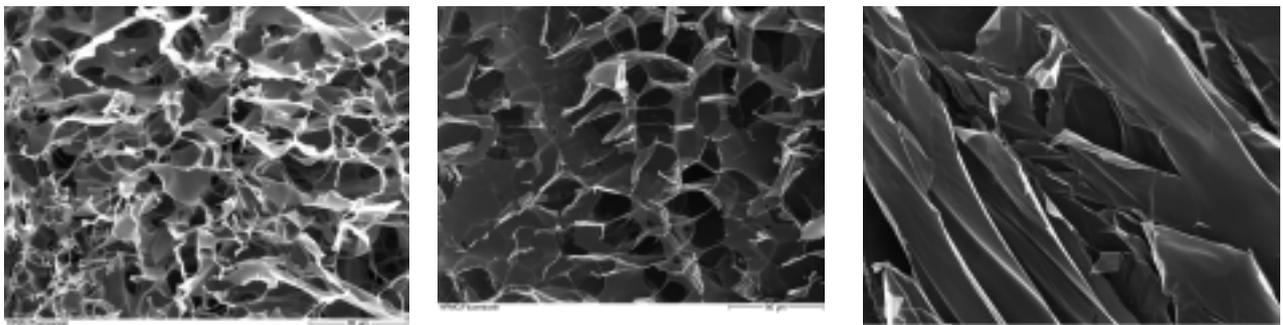
Tropfenmitte gerichtete Kristalle wurden auch von S. Maier bei schnell eingefrorenen OLCS beobachtet [52].



a. Stellung des Feinvakuumventils 460

b. Stellung des Feinvakuumventils 600

**Abb. III-65: REM-Aufnahme von HF-OLCS, Boden des Tropfens
(250 µg HPMC und 68 µg Fluorescein pro Tropfen), Vergrößerung 30**



a. Stellung des
Feinvakuumventils 460

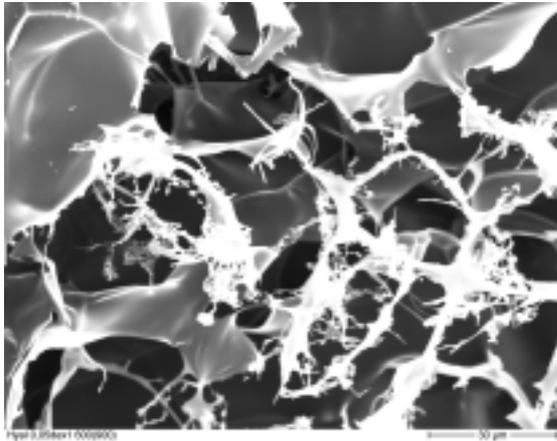
b. Stellung des
Feinvakuumventils 600

c. Stellung des
Feinvakuumventils 600

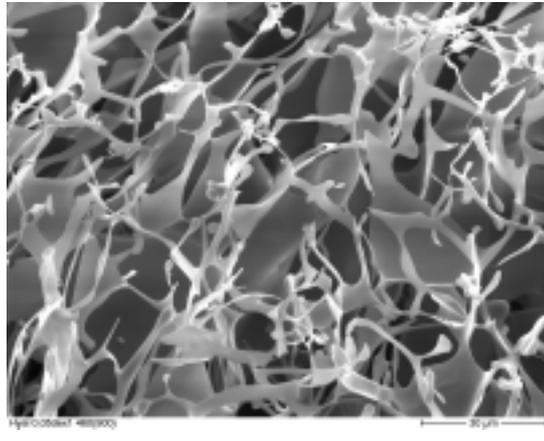
**Abb. III-66: REM-Aufnahme von HF-OLCS, Boden des Tropfens
(250 µg HPMC und 68 µg Fluorescein pro Tropfen), Vergrößerung 350**

Bei NaHD-OLCS ist ein deutlicher Unterschied in der Bodenstruktur zwischen den Proben mit niedrigerem und mit höherem Feststoffgehalt zu sehen (Abb. III-67a, III-67b und III-68a, III-68b). Die Proben mit dem niedrigeren Feststoffgehalt haben eine sehr lockere Bodenstruktur. Besonders bei den langsam eingefrorenen Proben werden nur fadenförmige Verbindungen zur PTFE-Folie beobachtet. Die Bodenstruktur der Lyophilisate mit höherem Feststoffgehalt ist wesentlich dichter

(Abb. III-68a und III-68b). Deshalb ist auch Haftfestigkeit von Lyophilisaten mit dem höheren Feststoffgehalt höher (s. Kapitel III 2.2.2).

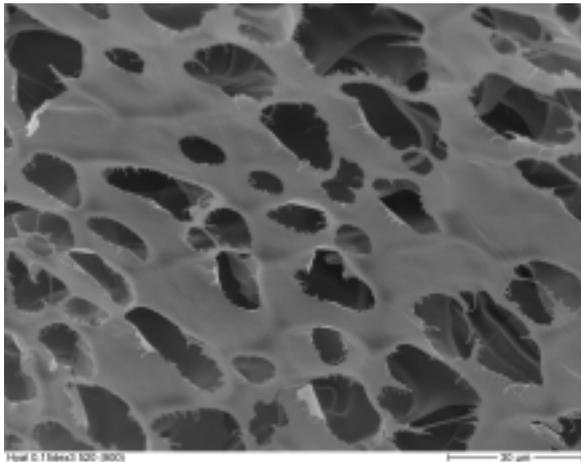


a. Stellung des Feinvakuumventils 600

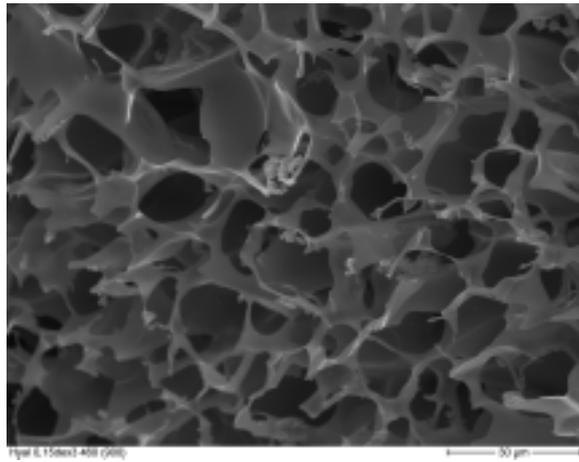


b. Stellung des Feinvakuumventils 460

Abb. III-67: REM-Aufnahme von NaHD-OLCS, Boden des Tropfens (12,5 µg Natriumhyaluronat und 500 µg Dextran pro Tropfen), Vergrößerung 900



a. Stellung des Feinvakuumventils 530



b. Stellung des Feinvakuumventils 460

Abb. III-68: REM-Aufnahme von NaHD-OLCS, Boden des Tropfens (37,5 µg Natriumhyaluronat und 750 µg Dextran pro Tropfen), Vergrößerung 900

III 2.2.7 Untersuchung der Haftfestigkeit von HF-Lyophilisaten an den Laborprototypen I und IIa

Untersuchung der Haftfestigkeit von HF-OLCS, die am Laborprototyp I hergestellt wurden

Der Aufbau des Prototyps I der Anlage wurde bereits im Kapitel III 1.2.1 beschrieben. Zunächst wurde getestet, ob die Herstellung von Lyophilisaten mit der Anlage

möglich ist. Danach wurde die Haftfestigkeit der Lyophilisate in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit und der Heizleistung in der Trocknungsphase untersucht. Die Versuche wurden als 2²-Faktorenversuchsplan geplant und durchgeführt.

Beim Prototyp I war das zu evakuierende Volumen der Trockenkammer und der Zusatzteile geringer als bei den Prototypen IIa und IIb. Die kleinste Ventilstellung, bei der das Einfrieren des Tropfens möglich war, lag bei 400. Nachdem der Tropfen bei der Ventilstellung 400 eingefroren war (nach 20 min), wurde die Ventilstellung auf 700 geändert. Abbildung III-69 zeigt Beispiele für Temperatur- und Druckprofile für langsame und schnelle Einfriergeschwindigkeit. Tabelle III-21 gibt eine Übersicht über Faktoren und Niveaus. In dem Faktorenversuchsplan sollen die Haupteffekte und die Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren untersucht werden. Als Polymer wurde in dieser Versuchsreihe HPMC 400 (Culminal®) eingesetzt.

Faktoren		Niveaus	
		-	+
Ventilstellung in der Einfrierphase	x ₁	400	600
Heizleistung, W	x ₂	6	11

Tab. III-21: Haftfestigkeit von HF-Lyophilisate, untersucht am Prototyp I: Faktoren und Niveaus

Rezeptur:

Fluorescein 68 µg pro 25 µL Tropfen

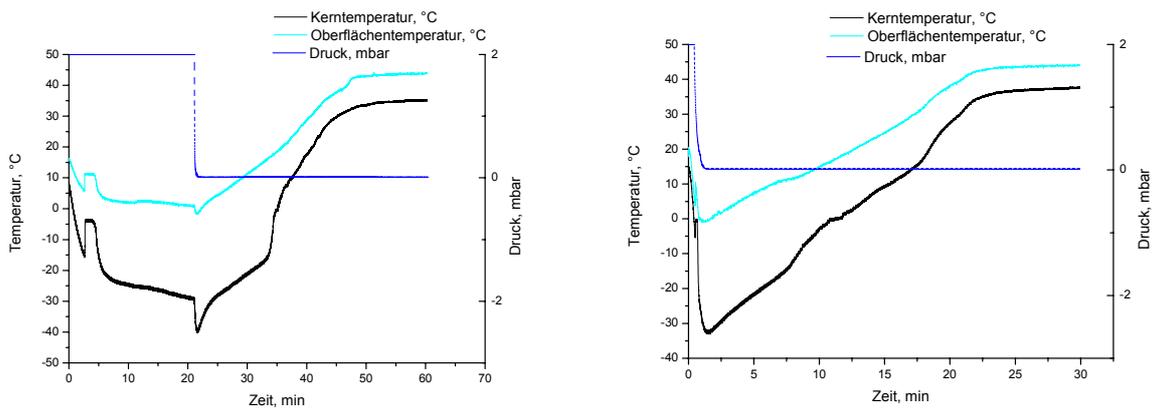
Culminal® 250 g pro 250 µg pro 25 µL Tropfen

Das Modell wurde durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$Y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + \varepsilon \quad \text{(GI.III-4)}$$

Y – Zielgröße (Haftfestigkeit), a₀ – Mittelwert, x₁ – Ventilstellung, und x₂ – Heizleistung, a₁, a₂ – Haupteffekte, a₁₂ – Wechselwirkung, ε – Reststreuung

Von Nachteil bei der Auswertung dieser Versuchsreihe war, dass nicht die gleiche Anzahl Wiederholungen pro Versuchkombination gewählt wurde. Die Messdaten sind im Anhang in Tabelle VIII-8 dargestellt. Abbildung III-70 gibt eine graphische Darstellung an.



a. Ventilstellung 400

b. Ventilstellung 600

Abb. III-69: Temperatur- Druckprofile von HF-OLCS

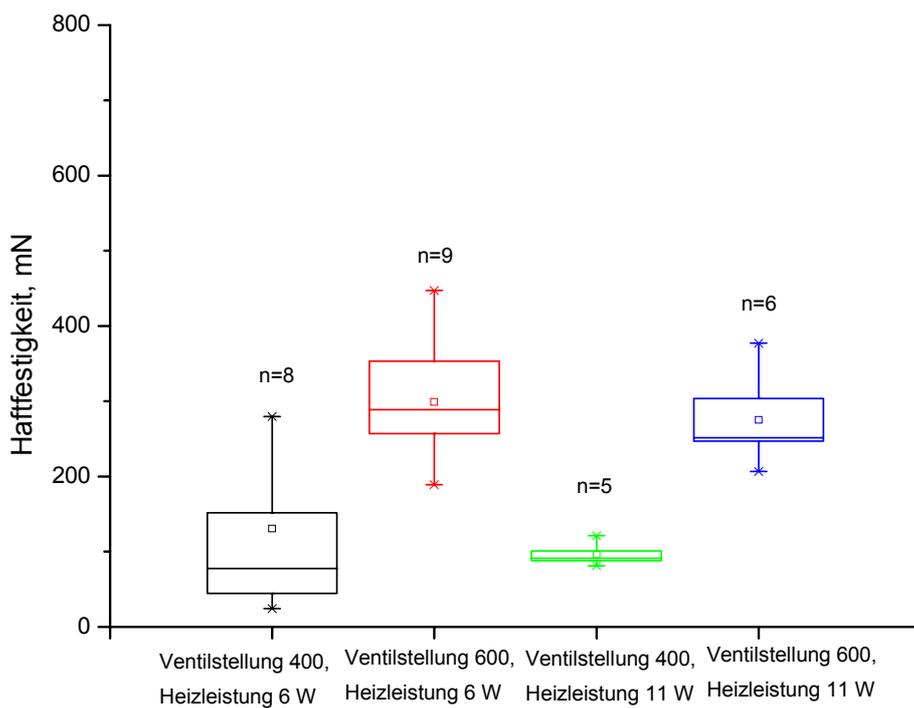


Abb. III-70: Haftfestigkeit der HF-Lyophilisate in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit und der Heizleistung in der Trocknungsphase (untersucht am Prototyp I)

Die Varianzanalyse bestätigt, dass die Daten mit dem Modell gut korrelierbar sind (Tab. III-22).

	FG	SQA	Varianz	F-Wert	P
Model	3	211512,39	70504,1	12,3071	<0,0001
Fehler	24	137489,76	5728,7		
Gesamt	27	349002,15			

Tab. III-22: Haftfestigkeit von HF-OLCS, hergestellt am Prototyp I: Varianzanalyse des Models

	FG	SQA	F-Wert	P
Ventilstellung	1	119933	20,94	0,0001
Heizleistung	1	5539	0,97	0,3353
Ventilstellung*Heizleistung	1	183	0,032	0,8597

Tab. III-23: Haftfestigkeit von HF-OLCS, hergestellt am Prototyp I: Effekt-Test

Mit steigender Einfriergeschwindigkeit nimmt die Haftfestigkeit signifikant zu. Das bestätigt auch die Ergebnisse von S. Maier für HF-OLCS [52]. Die Heizleistung sowie die Wechselwirkung zwischen der Heizleistung und der Ventilstellung zeigen keinen signifikanten Einfluss.

Untersuchung der Haftfestigkeit von HF-OLCS, die am Laborprototyp IIa hergestellt wurden

Das Ziel dieser Versuchsreihe war, den Einfluss der Fluorescein-Konzentration und der Einfriergeschwindigkeit auf die Haftfestigkeit von HF-OLCS, die mit dem Prototyp IIa hergestellt wurden, zu untersuchen. Die Versuchsreihe wurde als 2²-Faktorenversuchsplan durchgeführt und ausgewertet. Das Modell wird durch die Gleichung III-5 beschrieben.

$$Y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + \varepsilon \quad \text{(Gl.III-5)}$$

Y – Zielgröße (Haftfestigkeit), a₀ – Mittelwert, x₁ – Ventilstellung in der Einfrierphase und x₂ – Fluorescein-Konzentration, a₁, a₂ – Haupteffekte, a₁₂ – Wechselwirkung, ε – Reststreuung

Faktoren		Niveaus	
		-	+
Ventilstellung	x_1	500	600
Fluorescein-Konzentration, μg pro Tropfen	x_2	68	204

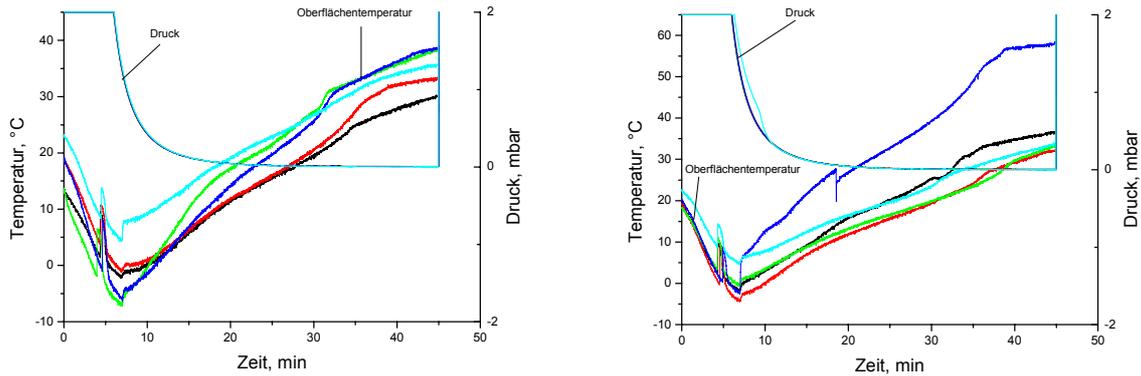
Tab. III-24: Haftfestigkeit von HF-OLCS, hergestellt am Prototyp IIa: Faktoren und Niveaus

Als Matrixpolymer wurde Hypromellose (Methocel[®] E 50) in einer Konzentration von 250 μg pro Tropfen verwendet. Die Auswahl der Fluorescein-Konzentration wurde bereits im Kapitel 2.2.1 erläutert. Die Herstellungsbedingungen wurden experimentell mit Hilfe der Temperaturprofile ermittelt und sind in Tabelle III-25 dargestellt.

	Stellung des Feinvakuumsventils in der Einfrierphase	Dauer der Einfrierphase, min	Dauer der Trocknungsphase, min	Heizleistung in der Trocknungsphase, W
1	600	4	41	5,7
2	500	7	38	5,7

Tab. III-25: Herstellungsbedingungen von HF-OLCS (Prototyp IIa)

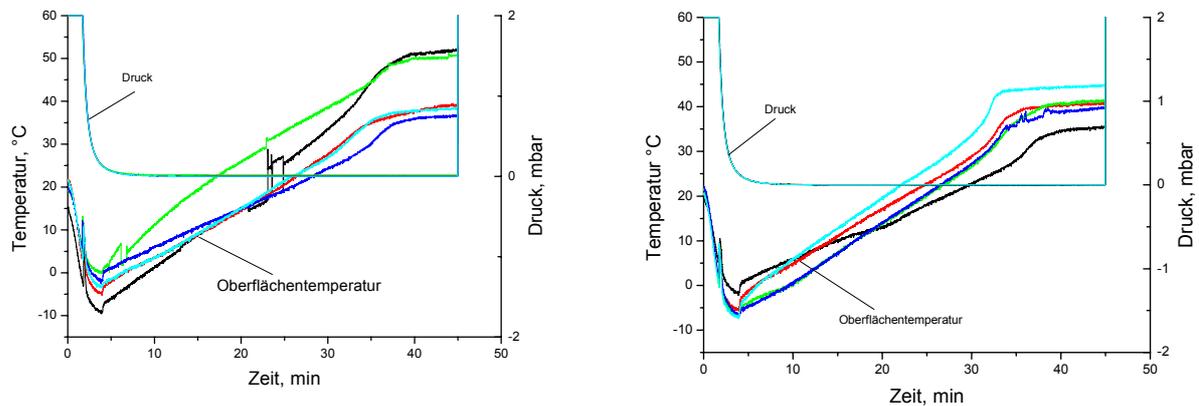
Während der Herstellung wurden von jedem Lyophilisat die Oberflächentemperatur und der Druck in der Trockenkammer verfolgt. Die entsprechenden Temperatur- und Druckprofile sind in Abbildungen III-71 und III-72 dargestellt. Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Herstellungsbedingungen zu treffen, wurden jeweils fünf Temperatur-/Druckprofile von OLCS verglichen, die unter gleichen Bedingungen hergestellt wurden.



a. 68 µg Fluorescein pro Tropfen

b. 204 µg Fluorescein pro Tropfen

Abb. III-71: Temperatur- und Druckprofile von fünf OLCS, Ventilstellung 500



a. 68 µg Fluorescein pro Tropfen

b. 204 µg Fluorescein pro Tropfen

Abb. III-72: Temperatur- und Druckprofile von fünf OLCS, Ventilstellung 600

Die Druckprofile sind bei allen vier Diagrammen exakt reproduzierbar. Die Temperaturprofile sind am besten bei der Ventilstellung 600 und einer Fluorescein-Konzentration von 204 µg pro Tropfen reproduzierbar. Bei allen vier Diagrammen treten in der Trocknungsphase stärkere Temperaturabweichungen als in der Einfrierphase auf. Die Kristallisations- und die Trocknungsphasen sind immer fast gleich lang. Die Temperaturabweichungen in der Trocknungsphase sind wahrscheinlich auf eine Verschiebung des Messfeldes des IR-Thermometers zurückzuführen.

In Abbildung III-73 sind die Ergebnisse der Hafffestigkeit dargestellt. Wie auch bei den Untersuchungen am Prototyp I, zeigt auch hier die Varianzanalyse, dass der

Unterschied zwischen SQA des Fehlers und des Modells hochsignifikant ist und dass die Daten durch das Modell besser beschrieben werden als durch den Mittelwert. Der Einfluss der Fluorescein-Konzentration auf die Haftfestigkeit ist hochsignifikant und am stärksten ausgeprägt. Die Niveaus der Evakuiergeschwindigkeit wurden in dieser Versuchsreihe enger ausgewählt und der Einfluss der Einfriergeschwindigkeit bleibt anders als bei Prototyp I unter der Signifikanzschwelle. Eine mögliche Ursache liegt in der Änderung des Anlagendesigns. Mit dem Einbau des Sterilgasfilters wird das zu evakuierende Volumen größer.

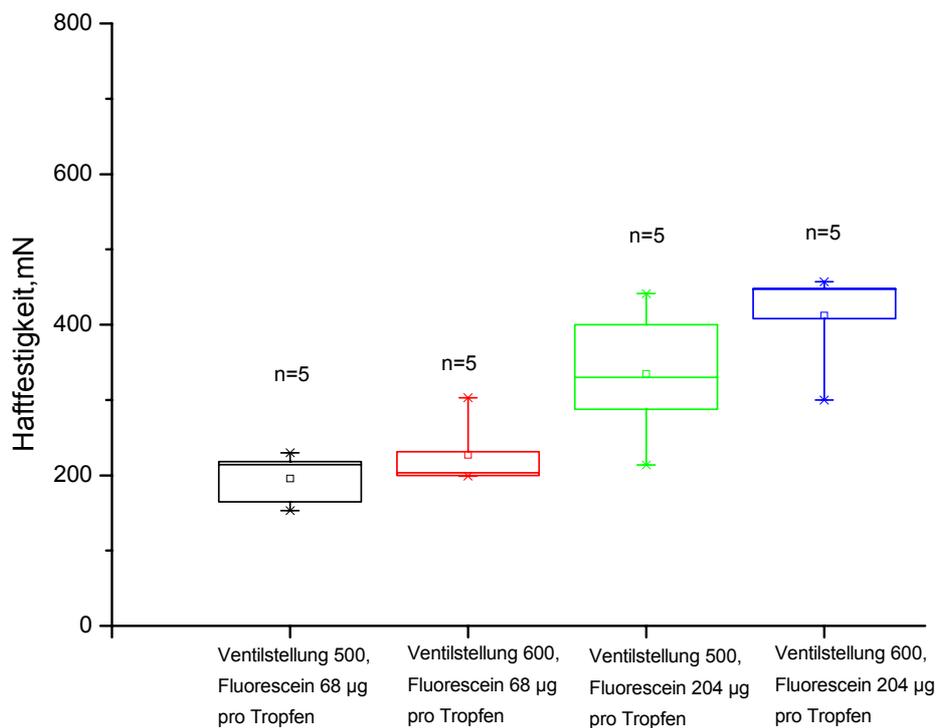


Abb. III-73: Haftfestigkeit von HF-OLCS in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit und der Fluorescein-Konzentration (untersucht am Prototyp IIa)

	FG	SQA	Varianz	F-Wert	P
Model	3	148076	49359	12,69	0,0002
Fehler	16	62257	3891		
Gesamt	19	210333			

Tab. III-26: Haftfestigkeit in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit und Fluoresceinkonzentration: Varianzanalyse

	FG	SQA	F-Wert	p
Ventilstellung	1	14835	3,81	0,0686
Fluoresceinkonzentration	1	130589	33,56	<0,0001
Ventilstellung*Fluoresceinkonzentration	1	2652	0,68	0,4212

Tab. III-27: Haftfestigkeit in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit und Fluoresceinkonzentration: Effect-Test

Nach der Prüfung der Haftfestigkeit wurden die fluoresceinfarbenen Reste auf der PTFE-Folie fotografiert (Abb. III-74 und III-75). Dabei lässt sich deutlich erkennen, dass die Struktur der Lyophilisate an der Kontaktstelle mit der Folie bei schnell und langsam eingefrorenen OLCS unterschiedlich ist. Die OLCS-Reste von langsam eingefrorenen Proben sind gleichmäßig über die Kontaktfläche verteilt. Bei den schnell eingefrorenen Proben erkennt man in den meisten Fällen eine stärkere Kontur am Rand des Tropfens und in die Mitte angeordnete Kristalle.



a. 68 µg Fluorescein pro Tropfen



b. 204 µg Fluorescein pro Tropfen

Abb. III-74: Fluorescein-Reste nach der Prüfung der Haftfestigkeit, Ventilstellung 500



a. 68 µg Fluorescein pro Tropfen



b. 204 µg Fluorescein pro Tropfen

Abb. III-75: Fluorescein-Reste nach der Prüfung der Haftfestigkeit, Ventilstellung 600

IV Diskussion und Ausblick

OLCS eröffnen eine neue Applikationsmöglichkeit von Wirkstoffen in der Ophthalmologie, die zahlreiche Vorteile gegenüber traditionellen Arzneiformen bietet, wie z.B. bessere chemische Stabilität, Abwesenheit von Konservierungsmitteln, Isotonie- und Pufferzusätzen, genaue Dosierung und bessere Handhabung. Das Prinzip der Trägerlyophilisate lässt sich auch auf andere Einsatzgebiete übertragen, in denen eine gezielte und präzise Anbringung des Wirkstoffes an den Applikationsort erforderlich ist, z.B. in der Zahnheilkunde und der Neurochirurgie.

Alle Vorteile dieser Arzneiform sind nur dann von Nutzen, wenn bestimmte Qualitätsparameter sichergestellt sind. Dazu gehören allgemeine Anforderungen des Arzneibuches an Augenarzneimittel, wie z.B. Sterilität, aber auch spezielle Qualitätskriterien für diese Arzneiform. Für die bequeme und vollständige Applizierbarkeit sind Haftfestigkeit, Strukturfestigkeit und Form der Lyophilisate entscheidend. Sie werden durch den Herstellungsprozess, durch Art und Konzentration der Inhaltsstoffe sowie durch die Oberflächeneigenschaften der Trägermembran beeinflusst.

Weichselbaum und Maier haben an einigen Beispielen gezeigt, wie das Ablöseverhalten einiger Lyophilisate von den Herstellungsbedingungen abhängt [52, 98]. Die erforderlichen Qualitätskriterien können nur durch kontrollierte Herstellungsbedingungen erreicht werden, die für jede OLCS-Rezeptur optimiert werden müssen. Bei konventionellen Gefriertrocknungsanlagen bei denen die gleichzeitige Herstellung von großen Stückzahlen im Vordergrund kann die notwendige Präzision nicht sichergestellt werden, weil die Herstellungsbedingungen in solchen Anlagen nicht homogen sind.

Um die Reproduzierbarkeit der Herstellungsbedingungen zu verbessern und die Prozesszeit zu reduzieren, wurde bei einem von S. Maier entwickelten Mini-Gefriertrockner das Prinzip der Einzelherstellung eingesetzt. Der wesentliche Nachteil dieser Anlage bestand darin, dass das Anlagendesign nicht für die aseptische Herstellung konzipiert wurde, weil die Trockenkammer nicht vom Kühlmittelbehälter abgetrennt werden konnte und einige kritische Teile der Anlage nicht sterilisierbar waren. Die Anlage wurde aus Bauteilen, die in den Werkstätten

des pharmazeutischen Instituts und des Instituts für Strahlen- und Kernphysik gefertigt wurden, gebaut.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklung der neuen Gefriertrocknungstechnik unter Berücksichtigung der GMP-Anforderungen und der FDA PAT-Initiative fortgesetzt. Trockenkammer und Kühlmittelbehälter sind räumlich abgetrennt und können sich in unterschiedlichen Reinraumklassen befinden oder die Trockenkammer kann in einen Isolator eingebaut werden. Die meisten Teile der Anlage sind Standardvakuumbauteile. Das Prinzip der neuen Gefriertrocknungstechnik unterscheidet sich von den konventionellen Gefriertrocknungsanlagen in mehreren Punkten (Tab. IV -1), und lässt sich aber auf die Gefriertrocknung von anderen Arzneiformen übertragen, wie z.B. Lösungen in Vials [22, 81]. Die wichtigsten FDA PAT Prinzipien, die in dieser Arbeit implementiert wurden, sind „inline“ Prozessüberwachung, zeitnahe Information über die Produktqualität, Fokus auf den kontinuierlichen Prozess und Verwendung von kleinen Anlagen. Der wesentliche Vorteil der neuen Gefriertrocknungstechnik besteht darin, dass sich ein zukünftiger Laborprototyp mit automatischer Beladeeinheit und zukünftige Produktionsanlagen im wesentlichen in der Anzahl der Trockenkammern vom heutigen Prototyp mit zwei Kammern unterscheiden werden. Größe und Geometrie der Kammer blieben aber unverändert. Daher wäre beim Übergang von der Prozessentwicklung zur Produktion kein Scale-up erforderlich.

Konventioneller Gefriertrockner	Neue Gefriertrocknungstechnik
Viele Gefäße in einer Kammer	Eine Einheit pro Kammer
Eine große Kammer	Mehrere bis viele kleine Kammern
Zykluszeit > 20 h	Zykluszeit 20 min – 60 min
Eismenge pro Trocknungszyklus ca. 50 - 300 kg	Eismenge pro Trocknungszyklus 25 mg
Vollständige Kontrolle der Prozessparameter an jeder Produkteinheit nicht möglich, Inhomogenität der Temperaturprofile	Präzise Kontrolle der Prozessparameter (Druck, IR-Temperatur, NIR-Restfeuchtemessung)
Scale-up von kleinen Laboranlagen	Kein Scale-up notwendig
Chargenorientierter Prozess	Quasi-kontinuierlicher Prozess

Tab. IV-1: Vergleich der neuen und konventionellen Gefriertrocknungstechnik

Das Funktionsprinzip der Gefriertrocknungsanlage wurde an zwei Laborprototypen getestet, von denen der erste eine Trockenkammer hatte, während beim zweiten alle Bauteile doppelt ausgelegt und mit einer automatischen Ablaufsteuerung zeitlich versetzt betrieben wurden. Damit konnten in 12 Stunden bis zu 20 OLCS produziert werden. Die Prüfung des Konzepts der neuen Gefriertrocknungstechnik erwies sich dabei als erfolgreich.

Bei der Prozessentwicklung wurde die Kerntemperatur des Tropfens mit einem Thermoelement gemessen. Für die laufende Prozesskontrolle ist das Thermoelement nicht geeignet, weil es den Kristallisationsprozess beeinflussen kann, und eine kritische Stelle bei der aseptischen Herstellung darstellt. Für die Prozessüberwachung wurde außerhalb der Trockenkammer ein IR-Thermometer befestigt und die Oberflächentemperatur kontaktlos durch ein Zn-Se-Fenster gemessen. Die Auftragung der Differenzen zwischen Kern- und Oberflächentemperatur zeigte deutlich, dass die größten Abweichungen zwischen den beiden Temperaturprofilen während der Haupttrocknung auftreten (Abb. III-15 – III-16). Da der halbkugelförmige Tropfen von außen nach innen trocknet, werden die Temperaturunterschiede mit dem Fortschreiten der Trocknung kleiner und sind am Ende der Trocknung am geringsten. Abbildungen III-71 und III-72 zeigen die Reproduzierbarkeit von IR-Temperaturprofilen bei unterschiedlichen Einfriergeschwindigkeiten und Fluorescein-Konzentrationen. Die Temperaturkurven sind während der Einfrierphasen relativ gut reproduzierbar, weichen aber in der Trocknungsphase deutlich voneinander ab. Ein Problem bei den beiden Temperaturmessmethoden liegt an der Positionierung des Thermoelements bzw. IR-Messfeldes. Schon eine kleine Abweichung von der Mitte des Tropfens verursacht erhebliche Temperaturunterschiede. Da der Aggregatzustand des Produktes sich im Laufe des Prozesses ändert, ist auch eine exakte Kalibrierung des IR-Thermometers nicht möglich. Ein weiterer störender Faktor bei der IR-Temperaturmessung ist die Hintergrundstrahlung, die bei der Messung miterfasst wird. Trotzdem verlaufen die beiden Temperaturprofile aber sehr ähnlich, so dass alle Phasen der Gefriertrocknung am IR-Temperaturprofil erkannt werden und diese Methode zur Prozesskontrolle eingesetzt werden kann.

Die Einfriergeschwindigkeit wurde durch die Stellung des Feinvakuumentils reguliert. Der Einfriervorgang lässt sich nicht in allen Fällen vollständig kontrollieren und steuern, weil die Unterkühlung unterschiedlich ist und die Kristallbildung spontan erfolgt. Trotz guter Reproduzierbarkeit der Evakuiergeschwindigkeit, die durch die exakte Reproduzierbarkeit der Druckprofile belegt ist (Abb. III-71 und III-72), unterscheiden sich die Temperaturprofile der Einfrierphase in manchen Fällen auch in der zeitlichen Verschiebung der Kristallbildung.

Die Messung des Wassergehaltes während der Trocknung durch NIRS liefert zeitnahe Informationen über die Produktqualität. Die erstellten Validierungsmodelle zeigen, dass die Korrelation zwischen den aufgenommenen Spektren und den Referenzwerten und damit auch die Überwachung des Wassergehaltes durch NIR möglich sind. Allerdings muss die Präzision der Modelle für eine genaue Wassergehaltsbestimmung und vor allem für die Endpunkterkennung der Trocknung verbessert werden. Es muss sichergestellt werden, dass die Position des Tropfens zur NIR-Optik immer gleich ist, und die erfasste Schichtdicke im Transmissionsmodus exakt reproduzierbar ist. Weiter muss der Probenumfang für die Kalibrierung und die Validierung erheblich vergrößert werden. Eine genauere Referenzmethode reduziert in diesem Fall die Streuung der Ergebnisse noch weiter.

Die Herstellung der Proben für klinische Studien erfordert eine Validierung der aseptischen Herstellung mit einer „Media Fill“ Prozedur [53] und die Qualifizierung des Gefriertrockners [96], was den Rahmen dieser Arbeit sprengt. Die „Media Fill“ Prozedur wurde erfolgreich im Rahmen eines Diplomprojektes durchgeführt [44]. In der Masterarbeit der Autorin wurden die wesentlichen GMP-relevanten Design-Anforderungen an die Gefriertrocknungsanlage beschrieben und eine Risikoanalyse durchgeführt [42].

Aus der Risikoanalyse der Anlage ergaben sich einige kritische Aspekte, die beim Bau eines Produktionsprototyps in Betracht gezogen werden müsste.

Das Hygienesdesign der Anlage müsste optimiert werden. Die manuelle Reinigung von kritischen Komponenten, wie z.B. Dichtungen, flexiblen Federungskörpern oder Heizungselementen, ist beim Laborprototyp noch möglich. Mit dem Übergang zu automatischen Reinigungs- und Sterilisationssystemen (CIP und SIP) müssten andere technische Lösungen für solche Komponenten eingesetzt werden, wie sie z.B.

von der Fa. Bioengineering für Anlagen für sterile und biotechnologische Produktion angeboten werden [102]. Die Qualität der Materialien und Oberflächen sollten besonders für die kritischen Teilen der Anlage durch Zertifikate belegt werden. In Produktionsanlagen sollten alle Teile, die nicht für die aseptische Herstellung kritisch sind, außerhalb der Reinraumklasse A untergebracht werden.

Das Funktionsprinzip und der Aufbau einiger Bestandteile der Anlage können geändert werden. So ist z.B. das Kühlprinzip des Kondensators für die Funktionsfähigkeit der Anlage nicht entscheidend. Wichtig in diesem Zusammenhang ist nur der ausreichende Temperaturgradient zwischen der Probe und dem Kondensator.

Die Heizung mit einer Drahtspirale oder einer Halogenlampe ist hinsichtlich der aseptischen Herstellung kritisch und hinsichtlich der Funktionsfähigkeit nicht optimal. Ein großer Anteil der Strahlung der Halogenlampe wurde nicht auf das Produkt gerichtet und führte zur übermäßigen Erwärmung der Trockenkammer. In diesem Zusammenhang wäre eine auf das Produkt fokussierte IR-Heizung, die in einem bestimmten für die Anregung von Wassermolekülen erforderlichen Frequenzbereich und Wellenlängenbereich (ca. 2 μm) arbeitet, energieeffizienter. Eine Alternative, die in Betracht gezogen werden kann, ist die Mikrowellenheizung. Dolan stellte fest, dass die Verwendung einer Mikrowellenheizung bei der Gefriertrocknung in Vials die Trocknungszeit im Vergleich zur konventionellen Stellplattenheizung um mehr als ein Drittel reduziert [13].

Um den Prozess kontinuierlich zu gestalten, wurde das Eis von der Oberfläche des Kondensators durch Abkratzen nach jedem Trocknungszyklus entfernt. Diese Prozedur kann automatisiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden qualitätsbestimmende Eigenschaften von OLCS untersucht. Die Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit wurden an zwei Rezepturen (HF- und NaHD-OLCS) im 3^3 -Faktorenversuchspan in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit und der Konzentration der Bestandteile bestimmt. Die Haftfestigkeit der NaHD-OLCS ist im Durchschnitt geringer und ihre Strukturfestigkeit höher als bei den HF-OLCS. Der Unterschied in der Haftfestigkeit zwischen den beiden Rezepturen ist auf unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften der verwendeten Feststoffe zurückzuführen. So ist die Oberflächenspannung von

NaHD-Lösungen mit 72,5 mN/m viel höher als die von HF-Lösungen (45 mN/m). Letztere haben damit auch einen kleineren Kontaktwinkel mit der PTFE-Folie. Wegen des höheren Feststoffgehalts ist auch die Strukturfestigkeit von NaHD-OLCS höher als bei HF-OLCS.

Für beide Rezepturen gilt, dass sowohl die Haftfestigkeit als auch die Strukturfestigkeit mit steigendem Feststoffanteil hochsignifikant zunimmt. Der signifikante Einfluss der Einfriereschwindigkeit auf die Haftfestigkeit lässt sich nur am Prototyp I für HF-Lyophilisate zeigen. Mit dem Einbau der Sterilgasfilter im Laborprototyp II vergrößert sich das zu evakuierende Gasvolumen von ca. 150 ml auf 700 ml, damit nimmt die Evakuiergeschwindigkeit ab. Die Versuche an Prototypen IIa und IIb zeigen weder einen signifikanten Einfluss der Einfriereschwindigkeit in den linearen Gliedern der Modelle auf Haftfestigkeit noch auf die Strukturfestigkeit der beiden Lyophilisattypen. Dabei lässt sich anhand von REM-Aufnahmen feststellen, dass bei langsam eingefrorenen Proben beider Rezepturen die Poren deutlich größer sind, als bei schnell eingefrorenen. In diesem Fall wurden entweder die Niveaus der Einfriereschwindigkeit zu eng gewählt oder die Streuung der durchgeführten Versuche war zu hoch, um die Signifikanz dieses Faktors bei gegebenem Stichprobenumfang festzustellen.

Sowohl die hohe Streuung der Haftfestigkeit und der Strukturfestigkeit als auch die signifikanten „Lack of Fit“-Tests für die beiden Rezepturen weisen auf zusätzliche nicht kontrollierte Faktoren hin, die auf die Zielgrößen einen signifikanten Einfluss haben. Die Risikofaktoren können entweder bei der Herstellung der Lyophilisate oder bei der Messung entstehen (Abb. IV-1).

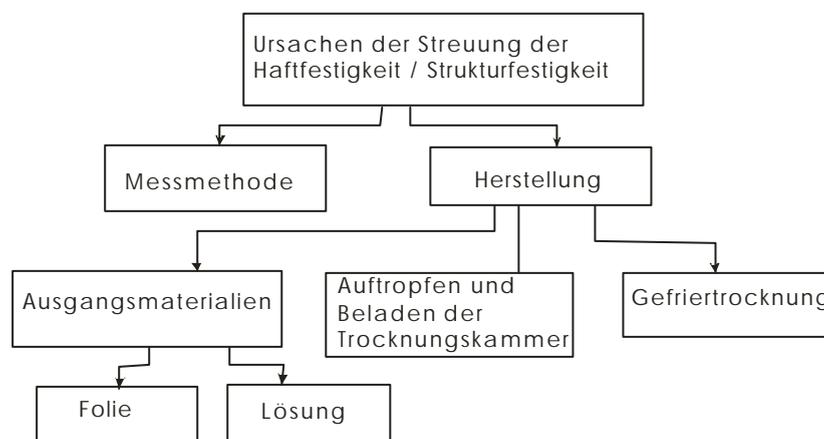


Abb. IV-1: Mögliche Ursachen der Streuung der Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit

Die Problematik der Messmethode der Haftfestigkeit besteht darin, dass der Tropfenrand im Spalt der Abreißvorrichtung festgefahren werden kann. Dieser Fehler tritt besonders bei flacheren Tropfen oder Tropfen mit einer geringen Strukturfestigkeit auf, die während der Messung zusammengedrückt werden können (Abb. IV-2). In diesem Fall verfälschen die Reibungskräfte das Messergebnis und eine zu hohe Haftfestigkeit wird gemessen.

Die Messung und die Auswertung der Strukturfestigkeit kann durch die Anwendung von modernen Geräten, wie z.B. „Texture Analyzer“ mit ausreichend sensiblen Sensoren, wesentlich optimiert und vereinfacht werden.

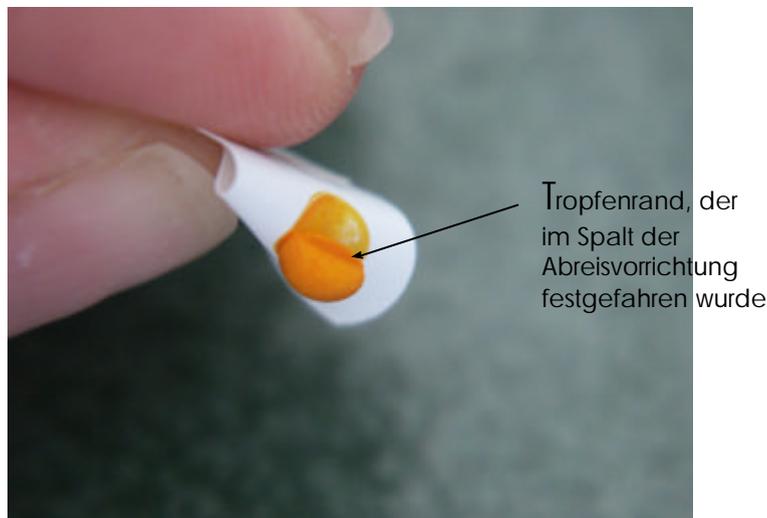


Abb. IV-2: Beispiel für ein Tropfen, der mit dem Rand im Spalt der Abreißvorrichtung festgefahren worden ist.

Die Oberflächeninhomogenitäten und die eventuelle Verunreinigungen der PTFE-Folie können zur Streuung der Ergebnisse weiter beitragen. Für die weitere Reduzierung der Streuung der Haftfestigkeit ist die Automatisierung des Auftropfens der Lösung auf die Trägerfolie und des Beladens der Trocknungskammer erforderlich.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Prägung auf die Haftfestigkeit wurde erwartet, dass die Benetzbarkeit der geprägten PTFE-Folie und damit auch die Haftfestigkeit der Lyophilisate abnehmen. NaHD-OLCS zeigen aber keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Haftfestigkeit bei geprägten und nicht geprägten Folien. HF-OLCS weisen hingegen eine signifikant höhere Haftfestigkeit bei der geprägten Folie auf. Mit der viel niedrigeren Oberflächenspannung benetzt die HF-Lösung besser die Folie als die NaHD-Lösung. Vermutlich vergrößert die

Prägung die Kontaktfläche zwischen der Folie und dem HF-Tropfen und verbessert damit noch weiter die Benetzbarkeit.

Die DVS-Untersuchungen zeigen, dass die Wasseraufnahme aus der Atmosphäre während der Herstellung und Verpackung für die beiden Lyophilisattypen nicht kritisch ist. Die Lagerung der OLCS sollte in wasserdampfdichter Primärverpackung erfolgen. Die Verpackung soll spätestens bei Stabilitätsstudien festgelegt werden.

Die Zusammensetzung und die Herstellungsbedingungen müssen für jede Rezeptur unter Berücksichtigung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen neu entwickelt werden.

Obwohl die neue Gefriertrocknungstechnik in vielen Punkten Vorteile gegenüber den traditionellen Lyophilisationsanlagen bietet, ist die Umsetzung in den Industriemaßstab mit automatischen Tropf- Lade- und Verpackungseinrichtungen sowie Isolatortechnik mit großem technischen Aufwand und finanziellem Risiko verbunden. Die Produktionskapazität einer konzipierten Anlage mit 13 Trockenkammereinheiten würde bei der Trocknungsdauer von 20 min pro OLCS etwa 940 Stück pro 24 Stunden betragen. Bei Optimierung der Herstellungsbedingungen und der Zusammensetzung des OLCS kann der Wasserdampftransportwiderstand durch das trockene poröse Lyophilisat verringert werden und die Trocknungsdauer wahrscheinlich auf etwa 10 min pro OLCS reduziert werden. Als Einsatzgebiet für die neue Gefriertrocknungstechnik ist die Fertigung von hochpreisigen Produkten denkbar, die in kleinen Stückzahlen hergestellt werden und den technischen Aufwand rechtfertigen, der für die Präzision der Herstellungsbedingungen bei empfindlichen Arzneistoffen erforderlich ist.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Gefriertrocknungstechnik für die Herstellung von Trägerlyophilisaten (Ophthalmic Lyophilisate Carrier System, OLCS) entwickelt und das Konzept erfolgreich an zwei Laborprototypen getestet. Das Prinzip der neuen Gefriertrocknungstechnik basierte auf der Einzelherstellung der Lyophilisate unter genau kontrollierten Herstellungsbedingungen.

Während der Herstellung wurden Kammerdruck, Kern- und Oberflächentemperatur bzw. Restwassergehalt kontrolliert. Die Messung der Kerntemperatur des Tropfens erfolgte mit einem Thermoelement und wurde für die Prozessentwicklung eingesetzt. Die Oberflächentemperatur des Tropfens wurde unter Produktionsbedingungen mittels eines außerhalb der Trockenkammer eingebrachten IR-Thermometers überwacht. Für die Kontrolle des Restwassergehaltes wurde NIRS in einem Transmissionsmodus mit einer Halogenlampe, die gleichzeitig als NIR-Lichtquelle und als Energiequelle in der Trocknung eingesetzt wurde, verwendet.

Das Einfrieren der Probe erfolgte vakuuminduziert und die Einfriergeschwindigkeit wurde durch die Stellung des Feinvakuumventils reguliert.

Um die Trocknung zu beschleunigen, wurden folgende technische Besonderheiten eingeführt:

- Kleines Volumen der Trockenkammer
- Energiezufuhr durch Strahlung
- Trocknung im Feinvakuum,
- Kurzer Abstand und extreme Temperaturgradienten zwischen der Probe und dem Kondensator

Durch mechanische Enteisung des Kondensators wurde der Prozess quasi-kontinuierlich gestaltet.

Der Laborprototyp und eine konzipierte Produktionsanlage unterscheiden sich in der Anzahl der Trockenkammern, im Automatisierungsgrad und in den Maßnahmen zur Sicherstellung der mikrobiologischen Qualität. Ist der Prozess für eine Trockenkammereinheit entwickelt, kann er auch auf die anderen direkt ohne Scale up übertragen werden. Der letzte Laborprototyp der Anlage hatte zwei

Trockenkammereinheiten mit separaten Kühlsystemen und einem gemeinsamen Vakuumbelüftungssystem. Der Prozessablauf wurde automatisch gesteuert.

Die Qualitätsparameter von OLCS hängen von physikalisch-chemischen Eigenschaften der Inhaltsstoffe, sowie von den Herstellungsbedingungen ab und wurden an zwei Rezepturen HPMC/Fluorescein (HF-) und Natriumhyaluronat/Dextran (NaHD-) - OLCS untersucht. Für die bequeme Applikation sind die Haftfestigkeit der Lyophilisate auf der Trägermembran, Strukturfestigkeit und die Form des Tropfens sehr wichtig. Am letzten Prototyp der Anlage wurden die Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit von OLCS im Rahmen eines 3³-Faktorenversuchsplanes in Abhängigkeit von der Konzentration der Inhaltsstoffe und der Einfriergeschwindigkeit untersucht. Sowohl die Haftfestigkeit als auch die Strukturfestigkeit wurden bei beiden Rezepturen signifikant durch den Feststoffgehalt und einige Wechselwirkungen der Faktoren beeinflusst. Die Haftfestigkeit der NaHD-OLCS war durchschnittlich geringer als die von HF-OLCS, weil diese Lyophilisate signifikant größere Kontaktwinkel mit der Trägermembran hatten und damit auch geringere Kontaktflächen. Die Einfriergeschwindigkeit hatte nur beim Prototyp I einen signifikanten Einfluss auf die Haftfestigkeit von HF-OLCS. Bei diesem Prototyp konnten die Niveaus der Evakuiergeschwindigkeit und damit auch der Einfriergeschwindigkeit breiter ausgewählt werden, weil die Trockenkammereinheit ohne Sterilgasfilter ein kleineres Volumen hatte. Um die Haftfestigkeit zu reduzieren und dabei den Lotuseffekt zu nutzen, wurde auf die Trägermembran eine Mikrostruktur durch Prägung aufgebracht. Die NaHD-OLCS zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Haftfestigkeit zwischen geprägten und nicht geprägten Trägermembranen, die HF-OLCS sogar eine signifikant höhere Haftfestigkeit für geprägte Membranen. Die Sorptionsisothermen zeigten, dass die Wasseraufnahme aus der Atmosphäre für die Lyophilisate nicht kritisch ist, aber die Lagerung der OLCS in einer wasserdampfdichten Verpackung erfolgen sollte. Die Struktur der Lyophilisate auf der Oberfläche, im Inneren und auf der Rückseite war sowohl von der Einfriergeschwindigkeit als auch vom Feststoffgehalt abhängig. Die Haftfestigkeit und Strukturfestigkeit der OLCS müssen für jede Rezeptur unter Berücksichtigung des Anlagedesigns individuell optimiert werden.

Summary

The goal of this work was to develop of a new freeze-drying technique for the production of Ophthalmic Lyophilizate Carrier Systems (OLCS). The new lyophilisation technique was successfully tested on two laboratory prototypes. The main principle of the new technique is to produce lyophilisates individually in small drying chambers under well controlled operating conditions.

The chamber pressure, core and surface temperatures or residual water content were controlled during the whole freeze drying cycle. The core temperature of the drop was measured by a thermocouple and was used for the process development. The surface temperature of the drop was monitored by an infrared thermometer placed outside the drying chamber. The residual water content was monitored by the NIRS in the transmission mode. A halogen lamp was used simultaneously as a NIR light source and an energy supply for drying.

The OLCS were frozen by snap-freezing and the freezing rate was controlled by setting a vacuum needle valve.

To accelerate the drying rate the following technical features were implemented:

- Small volume of drying chamber
- Energy supply by radiation
- Drying in a fine vacuum (under 0.01 mbar)
- Short distance and extreme temperature difference between the drop and condenser.

By mechanical removal of ice from the condenser, the process can be carried out quasi-continuously.

The laboratory prototype differs from a future production prototype only in the number of drying chambers. If the process is developed for one chamber, no scale-up is needed. The last prototype had two drying chambers with separate cooling systems and common vacuum-back filling system. The freeze drying cycle was controlled by software.

The quality parameters of OLCS depend on the physical-chemical properties of the ingredients and operating conditions. They were tested on two formulations: HPMC/Fluorescein (HF) and Natriumhyaluronat/Dextran (NaHD). For the convenient

application the adhesion force between the carrier membrane and the drop, the structural strength and the shape of the drop are important. With a last prototype of freeze dryer a 3³-factorial design was used to study the influence of the concentration of active ingredients and freezing rate on adhesion force and structural strength. Both adhesion force and structural strength are significantly affected by ingredient concentration and some the interaction of some factors. On the average the adhesion force of NaHD-OLCS was less than of HF-OLCS because the contact angle between the carrier membrane and the drop of NaHD-OLCS was significantly higher and the contact area lower. The freezing rate affected the adhesion force of HF-OLCS produced by laboratory prototype I. The levels in the evacuation rate and therefore in the freezing rate were wider with this prototype because the volume of the drying chamber without a sterile gas filter is smaller. To reduce the adhesion force by using the lotus effect, the carrier membrane was impressed with a microstructure. The NaHD-OLCS showed no significant difference between carrier membranes with and without microstructure. The HF-OLCS had even higher adhesion force with a microstructured carrier membrane. The water absorption from the atmosphere was not critical for OLCS formulation either, but lyophilisates should be stored in a water-vapour-tight packaging. The structure of the surface as well as the structure inside the drops and on the bottom of the drops was affected by the freezing rate and the concentration of ingredients. The adhesion force and structural strength should be optimized for each formulation individually in consideration to the design of the freeze dryer.

V Anhang

Versuchs- code	Versuchsvariablen			Zielgröße						
	Hypromellose, µg pro Tropfen	Fluorescein, µg pro Tropfen	Stellung des Feinvakuumsventils	Haftfestigkeit, mN					MW, mN	St. Abw., mN
(- - 0)	125	68	530	140	58	67,5	51,9	50	73,4	38
(- 0 -)	125	136	460	90	31	72	54	20	53	29
(- 0 +)	125	136	600	77	55	42	60	62	59	13
(- + 0)	125	204	530	104	35	55	125	78	79	36
(0 - -)	250	68	460	240	20	122	129	182	139	82
(0 - +)	250	68	600	159	179	170	168	190,2	173	12
(0 0 0)	250	136	530	240	110	350	350	172	244	107
(0 0 0)	250	136	530	240	180	188	125	201	187	42
(0 0 0)	250	136	530	190	110	261	240	180	196	59
(0 + -)	250	204	460	350	400	130	180	310	274	115
(0 + +)	250	204	600	118	220	173	200	210	184	41
(+ - 0)	375	68	530	242	280	308	225	350	281	50
(+ 0 -)	375	136	460	80	240	250	420	82	214	141
(+ 0 +)	375	136	600	325	430	500	400	260	383	93
(+ + 0)	375	204	530	530	601	500	502	562	539	43

Tab. V-1: Haftfestigkeit von HF-OLCS in einem Box-Behnken Faktorenversuchsplan

Versuchs- code	Versuchsvariable			Zielgröße						
	Hypromellose, µg pro Tropfen	Fluorescein, µg pro Tropfen	Stellung des Feinvakuumsventils	Strukturfestigkeit, mN*mm				MW, mN*mm	St. Abw., mN*mm	
(- - 0)	125	68	530	82,4	93,4	93,9	72,4	94,2	87,3	9,7
(- 0 -)	125	136	460	47,8	96	49,8	97,8	57,5	69,8	25
(- 0 +)	125	136	600	107	92,8	119	76,9	92,8	97,7	16
(- + 0)	125	204	530	148,9	146,8	121,3	152	140,9	142	12,3
(0 - -)	250	68	460	293,4	287,9	216,8	287,3	285,6	404,6	61,7
(0 - +)	250	68	600	277,7	297	328,5	266,1	338,6	301,6	31,4
(0 0 0)	250	136	530	268,1	300,9	375,6	288	390,7	324,7	54,9
(0 0 0)	250	136	530	359,2	289,2	371,1	394,8	333,2	349,5	40,3
(0 0 0)	250	136	530	379,7	287,5	288,4	407,9	248,6	322,4	67,9
(0 + -)	250	204	460	487	478,1	420,2	485,8	451	464,4	28,7
(0 + +)	250	204	600	383,7	389	364,4	389,8	367,8	378,9	12
(+ - 0)	375	68	530	460	400	450,3	408,4	304,4	404,6	61,7
(+ 0 -)	375	136	460	723,3	540,4	569,8	600,5	482,7	583,3	89,5
(+ 0 +)	375	136	600	524,5	494,9	555,9	616,9	459,9	530,4	60
(+ + 0)	375	204	530	757,6	748,5	830,2	804,7	870	802,2	50,7

Tab. V-2: Strukturfestigkeit in einem Box-Behnken Faktorenversuchplan

Versuchs- code	Versuchsvariablen			Zielgröße						
	Na Hyaluronat, µg pro Tropfen	Dextran, µg pro Tropfen	Stellung des Feinvakuum-ventils	Haftfestigkeit, mN				MW, mN	St. Abw., mN	
(- - -)	12,5	250	460	0	0	0	5,3	0	1,1	2,4
(- - 0)	12,5	250	530	0	18	180	0	0	40	78,9
(- - +)	12,5	250	600	0	4	26	6	12,3	9,7	10,2
(- 0 -)	12,5	500	460	0	0	0	0	91,9	18,4	41,1
(- 0 0)	12,5	500	530	3	0	0	15	1	3,8	6,4
(- 0 +)	12,5	500	600	200	101	20	65	10	79,2	76,8
(- + -)	12,5	750	460	201	0	32	54	350	127,4	146,4
(- + 0)	12,5	750	530	355	250	235	320	350	302	56,2
(- + +)	12,5	750	600	78	180	81	70	220	125,8	69,3
(0 - -)	25	250	460	0	0,8	12,3	2,1	0	3	5,2
(0 - 0)	25	250	530	168	64,7	99	120,5	71	104,6	41,9
(0 - +)	25	250	600	85	33,1	28	5	7	31,6	32,3
(0 0 -)	25	500	460	370	157	102	127	230	197,2	107,9
(0 0 0)	25	500	530	65	32,5	19	14	117	49,5	42,7
(0 0 0)	25	500	530	6,9	7	10	4,8	3,55	6,5	2,4
(0 0 0)	25	500	530	48	50,6	435	161,2	160,2	171	141,1
(0 0 +)	25	500	600	7,5	16,3	10,9	13,4	2,2	10,1	5,5
(0 + -)	25	750	460	75	352	244	250	293	242,8	103,3
(0 + 0)	25	750	530	380	170	300	43	907	360	331,6
(0 + +)	25	750	600	310	38	330	300	30,2	201,6	153,4
(+ - -)	37,5	250	460	5	0	0	0	0	1	2,2
(+ - 0)	37,5	250	530	18	120	22	8	1,8	34	48,8
(+ - +)	37,5	250	600	12	9	0	9	3,25	6,65	4,9
(+ 0 -)	37,5	500	460	57,5	450	400	0	22	186	220
(+ 0 0)	37,5	500	530	525	450	625	450	240	458	141,5
(+ 0 +)	37,5	500	600	600	500	550	200	750	520	201,9
(+ + -)	37,5	750	460	370	325	5	570	370	328	204
(+ + 0)	37,5	750	530	500	400	850	600	790	628	190,
(+ + +)	37,5	750	600	170	210	525	550	290	349	177,6

Tab. V-3: Haftfestigkeit von NaHD-OLCS in einem vollständigen 3³ Faktorenversuchsplan

Versuchs- code	Versuchsvariablen			Zielgröße							
	Na Hyaluronat, µg pro Tropfen	Dextran, µg pro Tropfen	Stellung des Feinvakuumventils	Strukturfestigkeit, mN*mm					MW, mN*mm	St. Abw., mN*mm	
(- - -)	12,5	250	460	61	59	85	50	76	143	177,7	
(- - 0)	12,5	250	530	108	69	113	117	95	187	192,5	
(- - +)	12,5	250	600	95	62	68	74	68	180	235,3	
(- 0 -)	12,5	500	460	157	360	349	453	305	356	122,3	
(- 0 0)	12,5	500	530	497	531	542	423	371	505	48,4	
(- 0 +)	12,5	500	600	362	230	217	288	263	339	156,6	
(- + -)	12,5	750	460	884	942	917	917	840	824	204,4	
(- + 0)	12,5	750	530	827	967	1144	934	1171	880	226,6	
(- + +)	12,5	750	600	608	554	535	781	632	615	97,5	
(0 - -)	25	250	460	125	81	184	126	106	195	152,6	
(0 - 0)	25	250	530	320	298	363	292	361	361	98,6	
(0 - +)	25	250	600	218	152	186	146	272	260	192,1	
(0 0 -)	25	500	460	248	372	483	464	451	405	97,9	
(0 0 0)	25	500	530	590	504	470	680	467	540	75,1	
(0 0 0)	25	500	530	356	426	494	531	407	458	65,5	
(0 0 0)	25	500	530	557	516	484	430	363	480	65,7	
(0 0 +)	25	500	600	513	779	689	695	829	655	101,7	
(0 + -)	25	750	460	1033	653	992	1181	1299	864	297,1	
(0 + 0)	25	750	530	918	1291	1006	1111	931	971	283,1	
(0 + +)	25	750	600	1087	841	856	837	907	844	172,1	
(+ - -)	37,5	250	460	122	246	218	161	154	241	131,5	
(+ - 0)	37,5	250	530	315	250	236	229	189	312	126,6	
(+ - +)	37,5	250	600	110	99	124	113	86	209	218,6	
(+ 0 -)	37,5	500	460	471	1229	1040	934	1035	827	346,5	
(+ 0 0)	37,5	500	530	1590	1019	1442	1210	1404	1199	383,2	
(+ 0 +)	37,5	500	600	1359	1667	1466	1809	1547	1380,	469,8	
(+ + -)	37,5	750	460	1654	1366,97	1413	1018	823	1182	463,2	
(+ + 0)	37,5	750	530	1762	1100	1347	1303	1241	1209	449,1	
(+ + +)	37,5	750	600	833	895	906	879	793	822	127,4	

Tab. V-4: Strukturfestigkeit von NaHD-OLCS in einem vollständigen 3³ Faktorenversuchsplan

	Haftfestigkeit, mN				
	ohne Prägung	Prägung Patrize 1	Prägung Matrize 1	Prägung Patrize 2	Prägung Matrize 2
	146,2	450	271	392	620
	242,7	541	342	382	320
	180,6	240	503	441	570
	336,2	464	502	402	420
	150	472	446	466	740
		401	402		
MW, mN	211,14	428	411	416,6	534
St. Abw., mN	79,89	102,5	92,1	35,5	165,8
Rel.St. Abw., %	37,8	23,96	22,4	8,5	31,1

Tab. V-5: Einfluss der Prägung auf die Haftfestigkeit von HF-OLCS

	Haftfestigkeit, mN		
	ohne Prägung	Prägung Matrize 1	Prägung Matrize 2
	42	69	162
	104	4	16
	7	3	44
	3	16	28
	310	69	63
	135	3	8
	98		
MW, mN	99,9	27,3	53,5
St. Abw., mN	105,5	32,6	56,7
Rel. St. Abw., %	105,6	119,4	106

Tab. V-6: Einfluss der Prägung auf die Haftfestigkeit von NaHD-OLCS

	HF-OLCS, Grad	NaHD-OLCS, Grad
	79	82
	75	81
	78	92
	77	90
	80	93
	79	91
	80	87
	80	91
	76	90
	77	92
MW, Grad	78,1	88,9
St. Abw. Grad	1,8	4,2
Rel. St. Abw., %	2,3	4,8

Tab. V-7: Kontaktwinkel von HF- und NaHD-OLCS

Versuchs- code	Versuchsvariablen		Zielgröße								
	Ventilstellung	Heizleistung, W	Haftfestigkeit, mN								
(- -)	400	6	77,8	249	279,5	146,8	44,5	24,1	151,8	71,3	
(+ -)	600	6	353,3	256,8	447	260	189	327,1	288,6	372,5	195,6
(- +)	400	11	121	91	101,1	81,3	87,9				
(+ +)	600	11	206,4	251,2	266,4	303,5	376,9	247			

Tab. V-8: Haftfestigkeit von HF-OLCS in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit und Heizleistung, untersucht am Prototyp I

Versuchs- code	Versuchsvariablen		Zielgröße						
	Ventilstellung	Fluorescein-Konzentration, µg pro Tropfen	Haftfestigkeit, mN					MW, mN	St. Abw., mN
(- -)	500	68	164,6	218	81,4	214	153	166,2	55,5
(+ -)	600	68	231,4	203,4	303	199	200	227,36	44,3
(- +)	500	204	330	263	287,6	441,2	213,7	307,1	85,9
(+ +)	600	204	448	408	457	47	300	332	171,1

Tab. V-9: Haftfestigkeit von HF-OLCS in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit und der Fluorescein-Konzentration, untersucht am Prototyp IIa

VI Literaturverzeichnis

- [1] Altenschmidt W, Häusler H. Produktionsprozesse in der Pharmazie. Statistische Regelung und Analyse. Aulendorf: ECV; 2004.
- [2] Angell CA, Green JL. Thermodynamics and Dynamics of Glassforming Systems in: Costantino HR, Pikal MJ. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.
- [3] Banga AK. Therapeutic Peptides and Proteins. Formulation, Processing, and Delivery Systems. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis; 2006.
- [4] Bernatchez SF, Camber O, Tabatabay C, Gurny R. Use of Hyaluronic Acid in Ocular Therapy in: Edmann P. Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery. Boca Raton: Florida; 1992.
- [5] Beyer J. Nahinfrarotspektroskopische Untersuchungen an pharmazeutischen Hilfsstoffen und festen Arzneiformen. Dissertation, Bonn; 2003.
- [6] Bokobza I. Origin of Near-Infrared Absorption in: Siesler HW., Ozaki Y., Kawata S., Heise HM. Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002.
- [7] Brülls M, Folestad S, Sparén A, Rasmuson A. In-Situ Near-Infrared Spectroscopy Monitoring of the Lyophilisation Process. Pharmaceutical Research. 2003; 20 (3): 494-499.
- [8] Carpenter JF, Chang BS, Randolph TW. Physical Damage to Proteins During Freezing, Drying, and Rehydration in: Costantino HR, Pikal MJ. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.

- [9] Chaplin M. Water structure and behaviour. Molecular Vibration and Absorption. (rev.:17.09.2006. Zugriff: 30.09.2006)
<<http://www.lsbu.ac.uk/water/vibrat.html>>
- [10] Choisy H, Le Goster A, Germain ML, Briois F. Bronchopulmonary side effects of beta-blockers: the place of eye-drops? *Therapy*. 1993; 48: 493-494.
- [11] Costantino HR. Excipients for Use in Lyophilized Pharmaceutical Peptide, Protein, and other Bioproducts in: Costantino HR, Pikal MJ. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.
- [12] Dinslage S, Diestelhorst M, Weichselbaum A, et al. Lyophilisates for drug delivery in ophthalmology: pharmacokinetics of fluorescein in the human anterior segment. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86: 10-13.
- [13] Dolan JP. Use of Volumetric Heating to Improve Heat Transfer During Vial Freeze-Drying. Dissertation, Blacksburg; 1998.
- [14] Dolder R, Skinner F. *Ophthalmika Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel*. 4. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1990: 354-372.
- [15] Dynamic Vapour Sorption User Guide, Version 9.0. July 2003, Surface Measurement System, Ltd, London.
- [16] *Europäisches Arzneibuch*, 5. Ausgabe, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2005.
- [17] Furrer P, Mayer JM, Gurny R. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. *Eur J Pharm Biopharm*. 2002 May; 53 (3): 263-280.
- [18] Fuchs-Koelwel B, Koelwel C, Göpferich A, et al. Verträglichkeit eines neuen Kalzium-Insertes zur kontrollierten medikamentösen Therapie am Auge. *Ophthalmologie*. 2004; 101: 496-499.

- [19] Gölker Ch. Gefriertrocknung biotechnologischer Produkte. Concept-Symposium „Gefriertrocknung in Entwicklung und Produktion“. Frankfurt am Main; 6-7 Dezember 1988.
- [20] Gomez G, Pikal MJ, Rodriguez-Hornedo N. Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions. *Pharmaceutical Research*. 2001; 18, No. 1: 90-97.
- [21] Gribel M, Merz W, Neunhoeffler T. Mathematical modeling and numerical simulation of freezing process of a supercooled melt under consideration of density changes. *Comput Visual Sci*. 1999; 1: 201-219.
- [22] Grimm A, Süverkrüp R. The influence of freezing conditions and lyophilization method on the activity of β -galactosidase and trypsin. 5th World Meeting on Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Geneva; March 2006.
- [23] Grundy WM, Buie MW, Stansberry JA, et al. Near-infrared spectra of ice outer solar system surfaces: Remote determination of H₂O ice temperature. *Icarus*. 1999; 142: 536-549.
- [24] Grunthal S. Dry Drops – Entwicklung und Prüfung eines Trockengelapplikators zur Anwendung am Auge. Dissertation, Bonn; 1996.
- [25] Guide to Inspections of Lyophilization of Parenterals. FDA; July 1993.
- [26] Guidelines for the Development and Validation of Near Infrared (NIR) Spectroscopic Methods. Association of Analytical Chemists within the research based Pharmaceutical Industry; May 2001.
- [27] Heise HM, Winzen R. Fundamental Chemometric Methods in: Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM. *Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002.

- [28] Horn W. Schulungsunterlagen Chemometrieseminar "The Unscrambler[®]". NIR-Support; 2003.
- [29] <<http://www.lotus-effekt.de>> (rev.: 14.03.06 Zugriff: 20.05.2006).
- [30] Hyaluronsäure Natriumsalz Prüfzertifikat. Synopharm, Barsbüttel, Deutschland; 2003.
- [31] Jennings TA. Lyophilization: Introduction and Basic Principles. Denver, Colorado, USA: Interpharm Press; 1999.
- [32] Jennings TA, Duan H. Calorimetric Monitoring of Lyophilization. PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology. 1995; Vol.49, No6: 272-281.
- [33] Jin Hyun N. Modeling of Mass Transport in Porous Media: Freeze Drying and PEM Fuel Cell Application. Ph.D-Thesis, Seoul; 2003.
- [34] Jones JA, Last IR, MacDonald BF, Prebble KA. Development and transferability of near-infrared method for determination of moisture in a freeze-dried injection products. J Pharm Biomed Anal. 1993 Nov-Dec;11 (11-12): 1227-1231.
- [35] JMP, Version 5. SAS Institute Inc. Cary, NC; 1998-2002.
- [36] 32-Kanal-Monitor Flexibles Datenerfassungsprogramm unter Delphi/NI-CW/Win-NT. Benutzer-Handbuch. Solingen; 2001.
- [37] Kleppmann W. Taschenbuch Versuchsplanung. Produkte und Prozesse optimieren. München: Carl Hanser Verlag; 2001.
- [38] Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 5.0. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2006.
- [39] Kramer M. Innovatives Einfrierverfahren zur Minimierung der Prozesszeit von Gefriertrocknungszyklen. Dissertation, Erlangen-Nürnberg; 1999.

- [40] Kramer M, Sennhenn S, Lee G. Freeze-drying using vacuum-induced freezing. *J.Pharm.Sci.* 2002; 91: 433-442.
- [41] Krämer J, Siewert M, Voth G, Blume H. Tolerability of eye drops – an in vitro comparison. *Pharm. Zeitung.* 1992; 137: 28-32.
- [42] Krasichkova O. Design Qualification of a Small-Scale Freeze Dryer for the Manufacture of Ophthalmic Lyophilisate Carrier System. Master-Thesis, Bonn; 2004.
- [43] Kruss B. Prozessparameter und ihre Auswirkungen auf die Produktqualität in: Essig D, Oschmann R. *Lyophilisation.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1993.
- [44] Lachmann B. Mündliche Kommunikation; September 2006.
- [45] Last IR, Prebble KA. Suitability of near-infrared method for the determination of moisture in a freeze-dried injection product containing different amounts of the active ingredient. *J Pharm Biomed Anal.* 1993; 11 (11-12): 1071-1076.
- [46] Lechuga-Ballesteros D, Miller D.P, Duddu S. Thermal Analysis of Lyophilized Pharmaceutical Peptide and Protein Formulations in: Costantino HR, Pikal MJ. *Lyophilization of Biopharmaceuticals.* Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.
- [47] Lemery SA, Mexico DF. Freeze Drying: Past, Present, and Future. *Journal of the Parenteral Drug Association.* 1980; Vol. 34 No.5: 352-357.
- [48] Liapis AI, Pikal MJ, Bruttini R. Research and Development Needs and Opportunities in Freeze-Drying. *Drying Technology.* 1996; 14, No.6: 1265-1300.
- [49] Lin TP, Hsu CC. Determination of residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals using a rapid and none invasive method: near infrared spectroscopy. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2002; 56 (4): 196-205.

- [50] Lux A, Maier S, Süverkrüp R, Diestelhorst M. A comparative bioavailability study of three conventional eye drops versus a single lyophilisate. *British Journal of ophthalmology*. 2003; 87 (4): 436-440.
- [51] MacDonald BF, Prebble KA. Some applications of near-infrared reflectance analysis in the pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal*. 1993 Nov-Dec; 11 (11-12): 1077-1085.
- [52] Maier S. Entwicklung eines Mini-Gefriertrockners. Kontrollierte Herstellung und Charakterisierung von Trägerlyophilisaten zur Anwendung am Auge. Dissertation, Bonn; 2003.
- [53] Manufacture of Sterile Medicinal Products. Annex 1 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice; July 2001.
- [54] Methocel[®] Product Specification and Certificate of Analysis. Colorcon Limited, DartfordKent, England; 2004.
- [55] Milton N, Pikal MJ, Roy ML, Nail SL. Evaluation of Manometric Temperature Measurement as a Method of Monitoring Product Temperature During Lyophilization. *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*. 1997; Vol.51, No1: 7-16.
- [56] Murgatroyd K. The Freeze Drying Process, in: Cameron P. *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice*. Buffalo Grove, IL, USA: Interpharm Press, Inc.; 1997.
- [57] Oetjen GW. *Gefriertrocknen*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1997.
- [58] Otto M. *Chemometrie*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1997.
- [59] Overcashier DE. *Microscopy of Lyophilized Proteins* in: Costantino HR, Pikal MJ. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.

- [60] PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. Guidance for Industry. Pharmaceutical CGMPs; September 2004.
- [61] Pharmaceutical Development Q8. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; November 2005, Step 4.
- [62] Pikal MJ. Freeze-drying of Proteins – process, formulation, and stability. ACS Symposium series. 1994; 567: 120-133.
- [63] 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, No.3: 115-137.
- [64] Pikal MJ, Shah S. Intravial distribution of moisture during the secondary drying stage of freeze-drying. PDA Journal of pharmaceutical science and technology. 1997; 51, No.1: 17-24.
- [65] Pikal MJ, Shah S, Roy ML, Putman R. The secondary drying stage of freeze-drying – drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. International Journal of Pharmaceutics. 1990; 60, No.3: 203-217.
- [66] Pikal MJ, Shah S. The collapse temperature in freeze-drying – dependence on measurement technology and rate of water removal from the glassy phase. International Journal of Pharmaceutics. 1990; 62, No.2-3: 165-186.
- [67] Pfeiffer Vakuum. Gebrauchsinformation Gasdosier-/Absperrventil EVN 116. Pfeifer Vakuum GmbH, Asslar.
- [68] Presser I. Innovative Online Messverfahren zur Optimierung von Gefriertrocknungsprozessen. Dissertation, München; 2003.

- [69] Rambhatla S, Pikal MJ. Heat and Mass Transfer Issues in Freeze-drying Process Development in: Costantino HR, Pikal MJ. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.
- [70] Rambhatla S, Pikal MJ. Heat and Mass Transfer Scale-up Issues during Freeze Drying: I: Atypical Radiation and the Edge Effect. AAPS PharmSciTech 2003; 4 (2): Article 14. (<http://www.aapspharmscitech.org>)
- [71] Rambhatla S, Ramot R, Bhugra C, Pikal MJ. Heat and Mass Transfer Scale-up Issues during Freeze Drying: II: Control and Characterization of the Degree of Supercooling. AAPS PharmSciTech 2004; 5 (4): Article 58. (<http://www.aapspharmscitech.org>).
- [72] Reich G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. Advanced Drug Delivery Reviews. 2005; 57: 1109-1143.
- [73] Rein H. NIR-Vis-Spektroskopie. DAZ. 2000; 50: 45-58.
- [74] Roth C. Ein-Mikro-Waagenverfahren zur kontinuierlichen Bestimmung der Sublimationsgeschwindigkeit während der Gefriertrocknung. Dissertation, Erlangen-Nürnberg; 2000.
- [75] Rupprecht H. Physikalisch chemische Grundlagen der Gefriertrocknung in: Essig D., Oschmann R. Lyophilisation. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1993.
- [76] Savage M, Torres J, Franks L, Masecar B, Hotta J. Determination of adequate moisture content for efficient dry viral inactivation in lyophilized factor VIII by loss on drying near infrared spectroscopy. Biologicals. 1998 Jun; 26 (2): 119-124.
- [77] Shamblin SL. The Role of Water in Physical Transformations in Freeze-dried Products in: Costantino HR, Pikal MJ. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.

- [78] Schilder G. Geräte-technische Grundlagen der Lyophilisation. Unterlagen zum Seminar „Lyophilisation“. Basel: APV; 2005.
- [79] Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilisation for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J Pharm Sci.* 2001; 90: 860-871.
- [80] Shalaev EY, Johnson-Elton TD, Chang LQ, Pikal MJ. Thermophysical properties of pharmaceutically compatible buffers at sub-zero temperatures: Implications for freeze-drying. *Pharmaceutical Research.* 2002; 19 No.2: 195-201.
- [81] Skorupa A, Süverkrüp R. The Inactivation of Galactosidase upon Freezing and Freeze-Drying. 4th International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutica and Pharmaceutical Technology, Nürnberg; March 2004.
- [82] Steinfeld A, Lux A, Maier S, Süverkrüp R, Diestelhorst M. Bioavailability of fluorescein from a new drug delivery system in human eyes. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88: 48-53.
- [83] Stokvold A, Dyrstad K, Libnau FO. Sensitive NIRS measurement of increased moisture in stored hygroscopic freeze dried product. *J Pharm Biomed Anal.* 2002 Jun 1; 28 (5): 867-73.
- [84] Storz E. Untersuchung funktioneller Parameter pharmazeutischer Hilfsstoffe mittels Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS). Dissertation. Bonn; 2003.
- [85] Sukowski L, Ulmschneider M. In-line Process –analytical Technology Based on Qualitative Near-infrared Spectroscopy Modeling. *Pharm. Ind.* 2005; 67 (7): 830-835.
- [86] Sultana Y, Jain R, Aqil M, Ali A. Review of ocular drug delivery. *Curr Drug Deliv.* 2006 Apr; 3(2): 207-217.

- [87] Süverkrüp R, Diestelhorst M. Darreichungsform zur äußerlichen Applikation von ophthalmischen Arzneistoffen und Verfahren zur Herstellung derselben. Deutsches Patent 195 08029 7 (P 95 0002); 7. März 1995.
- [88] Süverküp R, Diestelhorst M. Verfahren zum Herstellen einer Zubereitung eines pharmazeutischen Materials als Lyophilisat und Anlage hierfür. PCT/EP/03/10359 (02083/03010 PCT); 18. September 2003.
- [89] Süverkrüp R, Grunthal S, Diestelhorst M. Form of administration for applying pharmaceutical substances and auxiliary substances, and process for preparation thereof. US Patent 6,228,381; May 8 2001.
- [90] Süverkrüp R, Grunthal S, Krasichkova O, Maier S, Weichselbaum A, Neff B, Diestelhorst M, Dinslage S, Lux A. The ophthalmic lyophilisate carrier system (OLCS): development of a novel dosage form, freeze-drying technique, and in vitro quality tests. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004; 57: 269-277.
- [91] Tang X, Nail S, Pikal M. Evaluation of Manometric Temperature Measurement, a Process Analytical Technology Tool for Freeze-Drying: Part I, Product Temperature Measurement. *AAPS PharmSciTech*. 2006; 7 (1): Article 14. (<http://www.aapspharmscitech.org>).
- [92] Tang X, Pikal MJ. Design of Freeze-Drying Process for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research*. 2004; Vol.21, No.2: 191-200.
- [93] The Unscrambler® User Manual. CAMO ASA, Oslo, Norway; 1998
- [94] Tosti A, Tosti G. Thiomersal: a hidden allergen in ophthalmology. *Contact Dermatitis*. 1988; 18: 268-273.
- [95] Trapler ED. Lyophilization Equipment in: Costantino HR, Pikal MJ. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.

- [96] Trapler ED. Validation of Lyophilization: Equipment and Process in: Costantino HR, Pikal MJ. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004.
- [97] Van Ooteghem MM. Formulation of Ophthalmic Solutions and Suspensions. Problems and Advantages in: Edmann P. Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery. Florida: Boca Raton; 1992.
- [98] Weichselbaum A. Herstellung und Prüfung von Lyophilisaten auf hydrophoben Trägerfolien: Haftfestigkeit und Bioverfügbarkeit. Dissertation, Bonn; 2002.
- [99] Wilk G. Kosten und einige Besonderheiten der Gefriertrocknung. Concept-Symposium „Gefriertrocknung in Entwicklung und Produktion“. Frankfurt am Main; 6-7 Dezember 1988.
- [100] Willemer H. Physikalische Grundlagen der Gefriertrocknung . Fortschritte und Entwicklungstendenzen der Gefriertrocknung. Concept-Symposium „Gefriertrocknung in Entwicklung und Produktion“. Frankfurt am Main; 6-7 Dezember 1988.
- [101] Wohlrab W, Neubert R, Wohlrab J. Hyaluronsäure und Haut. Volume 3. Aachen: Shaker Verlag; 2004.
- [102] <www.bioengineering.ch>. (Zugriff: 19.09.2006).

VII Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
Al	Aluminium
A_v	Querschnittfläche vom Vial
Bez.	Bezeichnung
BTM	Barometrische Temperaturmessung
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CIP	Cleaning in Place
Cr	Chrom
DIN	Deutsche Industrienorm
d	Durchmesser
dm/dt	Sublimationsrate
DVS	Dynamic Vapour Sorption, Dynamische Wasserdampfsorption
engl.	Englisch
evtl.	eventuell
Eu.AB	Europäisches Arzneibuch
f	Akkommodationswahrscheinlichkeit
F	F - Wert
FDA	Food and Drug Administration
FG	Zahl der Freiheitsgrade
Fa	Firma
Fe	Eisen
γ_{LG}	Oberflächenspannung
γ_{SL}	Grenzflächenspannung Festkörper/Flüssig
γ_{SG}	Grenzflächenspannung Festkörper/Gas
GMP	Good Manufacturing Practice
Gl.	Gleichung
HF-	Hypremellose/Fluorescein-
HEC	Hydroxyethylcellulose
HEMC	Hydroxyethylmethylcellulose
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose

VII Abkürzungen und Symbole

ΔH_s	Sublimationsenergie
ICH	International Conference on Harmonisation
InGaAs	Indium/ Gallium/ Arsen
IR	Infrarot
K_c	Wärmeübergangskoeffizient (Anteil durch direkten Kontakt mit den Stellflächen)
K_r	Wärmeübergangskoeffizient (Anteil durch die Strahlung)
K_g	Wärmeübergangskoeffizient (Anteil Wärmeleitung über die Gasphase)
K_v	Wärmeübergangskoeffizient
L	Dicke der porösen Schicht
LAF	Laminar Air Flow
m	Sublimationsgeschwindigkeit pro Vial
M	Molekulargewicht
MFW	Mittlere Freie Weglänge
NaHD	Natriumhyaluronat/Dextran-
Ni	Nickel
NIR/S	Nahinfrarot / Spektroskopie
NODS	New Ophthalmic Delivery System
OH	Hydroxy-
OLCS	Ophthalmic Lyophilisate Carrier System
PAT	Process Analytical Technology
PVP	Polyvinylpyrrolidon
P_c	Kammerdruck
PLS	Partial Least Square
P_0	Dampfdruck des Eises
P_v	Gesamtdruck im Vial
PTFE	Polytetrafluorethylen
dQ/dt	Wärmemenge pro Zeit
R_c	Transportwiderstand der Kammer
Rel. St. Abw.	Relative Standardabweichung
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RH	engl. Relative Humidity, Relative Feuchtigkeit
RMSEC	Root mean square error of calibration

VII Abkürzungen und Symbole

RMSEP	Root mean square error of prediction
R_p	Transportwiderstand des getrockneten Produktes
R_s	Transportwiderstand des halbgeschlossenen Stopfens auf dem Vial
SEC	Standard error of calibration
SEP	Standard error of prediction
SIP	Sterilization in Place
St. Abw.	Standardabweichung
SQA	Summe der Quadrate der Abweichungen
t	Gewundenheit
T	Kontaktwinkel
Tab.	Tabelle
TGA	Thermogravimetrie
T_c	Kollapstemperatur
T_e	Eutektische Temperatur
T_g'	Glasübergangstemperatur
T_p	Produkttemperatur
T_s	Stellflächentemperatur
z.B.	zum Beispiel