

TRÖPFCHENLYOPHILISATE FÜR DIE AUGENHEILKUNDE

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katja Gruner

aus

Berlin

Bonn 2010

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

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Süverkrüp

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Lamprecht

Tag der Promotion: 14.03.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Auszüge dieser Arbeit wurden an folgender Stelle vorab veröffentlicht:

Droplet Generation and Freezing of Spherolyophilizates

K. Gruner, R. Süverkrüp

Abstract und Poster im Rahmen des 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, 2008

Characterization of Spherolyophilizates

K. Gruner, R. Süverkrüp

Abstract und Poster im Rahmen des DPhG Annual Meeting, Bonn, 2008

Latanoprost Ophthalmic Lyophilizate Carrier Systems (OLCS)

K. Gruner, R. Süverkrüp, M. Diestelhorst

Abstract und Poster im Rahmen des ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, 2009

Spherolyophilizates as Ophthalmic Drug Delivery Systems

R. Süverkrüp, K. Gruner, M. Diestelhorst

Abstract und Poster im Rahmen des ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, 2009

The Ocular Bioavailability of Latanoprost Lyophilizate 0.75 µg Compared With Xalatan® 1.5 µg

M. Diestelhorst, S. Fauser, K. Gruner and R. Sueverkruep

Abstract und Poster im Rahmen des ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, 2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 2 | Theoretischer Teil | 7 |
| 2.1 | Gefriertrocknung | 7 |
| 2.1.1 | Stand der Technik | 7 |
| 2.1.1.1 | Aufbau eines konventionellen Gefriertrockners | 7 |
| 2.1.1.2 | Anlagentypen | 9 |
| 2.1.1.3 | Trends in der pharmazeutischen Industrie | 10 |
| 2.1.1.4 | Zukunft | 12 |
| 2.1.2 | Der Gefriertrocknungsprozess | 13 |
| 2.1.2.1 | Einfrieren | 13 |
| 2.1.2.2 | Primärtrocknung | 17 |
| 2.1.2.3 | Sekundärtrocknung | 24 |
| 2.1.3 | Atmosphärische Gefriertrocknung | 25 |
| 2.1.4 | Sprühgefriertrocknung | 26 |
| 2.2 | Verfahrenstechniken zur Tröpfchenlyophilisation | 29 |
| 2.2.1 | Tropfenerzeugung durch Versprühen | 29 |
| 2.2.1.1 | Tropfengrößenverteilungen | 31 |
| 2.2.2 | Einfrieren | 37 |
| 2.2.2.1 | Nukleation in Tröpfchen | 38 |
| 2.2.2.2 | Wärmeübergänge beim Einfrieren | 41 |
| 2.2.2.3 | Einfriermethoden für Tröpfchenlyophilisate | 42 |
| 2.2.3 | Trocknung | 44 |
| 2.2.3.1 | Atmosphärische Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung | 46 |
| 2.3 | Lyophilisate für die Augenheilkunde | 54 |
| 2.3.1 | Problematik konventioneller Augentropfen | 55 |
| 2.3.2 | Ophthalmic Lyophilizate Carrier System (OLCS) | 58 |
| 2.3.3 | Sphärolyophilisate für die Anwendung am Auge | 60 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3 | Materialien und Methoden | 63 |
| 3.1 | Materialien und Zubereitungen | 63 |
| 3.1.1 | Wirkstoff: Latanoprost | 63 |
| 3.1.2 | Gerüstbildner | 66 |
| 3.1.2.1 | Mannitol und Trehalose | 66 |
| 3.1.2.2 | Polymere | 68 |
| 3.1.3 | Zusätze | 71 |
| 3.2 | Herstellung von Sphärolyophilisaten | 75 |
| 3.2.1 | Düsen zur Tropfenerzeugung | 76 |
| 3.2.1.1 | Tropfenerzeugung durch Abtropfen und laminaren Strahlzerfall | 76 |
| 3.2.1.2 | Tropfenerzeugung durch Ink-Jet Technologie | 78 |
| 3.2.2 | Verfahren zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchen im Vakuum (Prototyp I) | 80 |
| 3.2.2.1 | Beschreibung und Funktionsweise der Anlage | 81 |
| 3.2.2.2 | Vorgehensweise zum Betrieb der Anlage | 82 |
| 3.2.3 | Verfahren zum Einfrieren von Tröpfchen unter Atmosphärendruck (Prototypen IIa und b) | 82 |
| 3.2.3.1 | Beschreibung und Funktionsweise der Anlagen | 83 |
| 3.2.3.2 | Vorgehensweise zum Betrieb der Anlage | 84 |
| 3.2.4 | Verfahren zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung (Prototyp III) | 85 |
| 3.2.4.1 | Beschreibung und Funktionsweise der Anlage | 85 |
| 3.2.4.2 | Messsysteme zur Überprüfung von Temperatur und Strömung | 87 |
| 3.3 | Untersuchungen an der Tropfenstrahldüse | 89 |
| 3.3.1 | Charakterisierung des Abtropfverhaltens | 89 |
| 3.3.2 | Optimierung der Frequenz des piezoelektrischen Tropfengenerators | 90 |
| 3.3.3 | Durchsatz | 91 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.4 | Charakterisierung des Sprühstrahls | 92 |
| 3.4 | Charakterisierung von Sphärolyophilisaten | 95 |
| 3.4.1 | Charakterisierung der Ausgangslösungen | 95 |
| 3.4.1.1 | Viskosität | 95 |
| 3.4.1.2 | Oberflächenspannung | 96 |
| 3.4.1.3 | Glasübergangstemperatur | 96 |
| 3.4.2 | Charakterisierung der Lyophilisate | 97 |
| 3.4.2.1 | Partikelgrößenverteilung | 98 |
| 3.4.2.2 | Restfeuchte | 99 |
| 3.4.2.3 | Rasterelektronenmikroskopie | 100 |
| 3.4.2.4 | Spezifische Oberfläche | 101 |
| 3.4.2.5 | Rekonstitutionszeit | 102 |
| 3.4.2.6 | Wasserdampfaufnahme | 102 |
| 3.4.2.7 | Schütt- und Stampfdichte | 103 |
| 3.4.2.8 | Fließeigenschaften | 104 |
| 3.4.2.9 | Sedimentationsgeschwindigkeit | 105 |
| 3.4.3 | Applikation von Sphärolyophilisaten | 109 |
| 3.5 | Herstellung von Trägerlyophilisaten | 112 |
| 3.5.1 | Applikatoren | 112 |
| 3.5.2 | Lösungen | 113 |
| 3.5.2.1 | Herstellen von wirkstofffreien Lösungen | 113 |
| 3.5.2.2 | Herstellung von Lösungen mit Latanoprost | 114 |
| 3.5.3 | Einfrieren und Trocknung | 115 |
| 3.5.4 | Verpackung und Etikettierung | 115 |
| 3.6 | Charakterisierung von Trägerlyophilisaten | 116 |
| 3.6.1 | Charakterisierung der Ausgangslösungen | 116 |
| 3.6.1.1 | Viskosität | 116 |
| 3.6.1.2 | Oberflächenspannung | 116 |
| 3.6.1.3 | Kontaktwinkelmessungen | 116 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.6.1.4 | Einfrier- und Schmelzverhalten | 117 |
| 3.6.2 | Charakterisierung von Lyophilisaten | 117 |
| 3.6.2.1 | Restfeuchte | 118 |
| 3.6.2.2 | Rasterelektronenmikroskopie | 118 |
| 3.6.2.3 | Rekonstitutionszeit | 118 |
| 3.6.2.4 | Wasserdampfaufnahme | 118 |
| 3.6.2.5 | Dichte | 119 |
| 3.6.2.6 | Haffestigkeit | 119 |
| 3.6.2.7 | Strukturefestigkeit | 121 |
| 3.6.3 | Gehalt von Latanoprost und Latanoprost-Säure | 121 |
| 3.6.3.1 | Gleichförmigkeit der Masse | 121 |
| 3.6.3.2 | Enzymimmunoassay | 122 |
| 3.6.3.3 | Ergänzende Verfahren zur Gehaltsbestimmung | 129 |
| 3.6.4 | Untersuchung zur okularen Bioverfügbarkeit | 133 |
| 3.6.4.1 | Tierversuch | 133 |
| 3.6.4.2 | Gehaltsbestimmung – Enzymimmunoassay | 134 |
| 3.7 | Statistische Auswertung | 135 |
| 3.7.1 | Faktorenversuchsplanung | 135 |
| 3.7.1.1 | Varianzanalyse (ANOVA) | 135 |
| 3.7.2 | Bewertung der okularen Bioverfügbarkeit | 140 |
| 3.7.2.1 | Mittelwertsvergleich (t-Test) | 142 |
| 3.7.2.2 | Berechnung des Konfidenzintervalls | 142 |
| 4 | Ergebnisse | 145 |
| 4.1 | Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von Sphärolyophilisaten | 145 |
| 4.1.1 | Zielsetzung | 145 |
| 4.1.2 | Verfahren zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchen im Vakuum (Prototyp I) | 145 |
| 4.1.3 | Verfahren zum Einfrieren von Tröpfchen unter Atmosphärendruck (Prototypen IIa und b) | 147 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.1.3.1 | Ermittlung der benötigten Strecke zum Durchfrieren von Tröpfchen | 147 |
| 4.1.3.2 | Temperaturverlauf im geschlossenen Einfrierrohr | 148 |
| 4.1.4 | Verfahren zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung (Prototyp III) | 148 |
| 4.1.4.1 | Temperaturverteilung in der ACD-Gefriertrocknungsanlage | 149 |
| 4.1.4.2 | Temperaturverlauf im Einfrierteil | 152 |
| 4.1.4.3 | Beeinflussung der Strömungsgeschwindigkeit in der Trockenkammer | 161 |
| 4.1.4.4 | Abschlussbemerkung | 166 |
| 4.2 | Untersuchungen zur Tropfenbildung an der DropJet Düse | 168 |
| 4.2.1 | Charakterisierung des Abtropfverhaltens | 168 |
| 4.2.2 | Optimierung der Frequenz des Piezogenerators | 171 |
| 4.2.3 | Durchsatz | 175 |
| 4.2.4 | Charakterisierung des Sprühstrahls | 177 |
| 4.3 | Charakterisierung von Sphärolyophilisaten | 181 |
| 4.3.1 | Charakterisierung der Ausgangslösungen | 181 |
| 4.3.1.1 | Viskosität und Oberflächenspannung | 181 |
| 4.3.1.2 | Glasübergangstemperatur | 184 |
| 4.3.2 | Versuche zur Herstellung der Lyophilisate | 186 |
| 4.3.2.1 | Herstellung von Sphärolyophilisaten mit typischen Rezepturen für Trägerlyophilisate | 186 |
| 4.3.2.2 | Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Partikel-größenverteilung | 187 |
| 4.3.3 | Charakterisierung der Lyophilisate | 192 |
| 4.3.3.1 | Partikelgrößenverteilungen | 194 |
| 4.3.3.2 | Restfeuchte | 197 |
| 4.3.3.3 | Strukturuntersuchungen durch Rasterelektronenmikroskopie | 198 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.3.3.4 | Einflüsse der Zusammensetzung auf die spezifische Oberfläche | 204 |
| 4.3.3.5 | Rekonstitutionszeit | 208 |
| 4.3.3.6 | Wasserdampfaufnahme | 209 |
| 4.3.3.7 | Schütt- und Stampfdichte | 211 |
| 4.3.3.8 | Fließeigenschaften | 213 |
| 4.3.3.9 | Sedimentationsgeschwindigkeit | 215 |
| 4.3.4 | Applikation von Sphärolyophilisaten | 220 |
| 4.4 | Charakterisierung von Trägerlyophilisaten | 223 |
| 4.4.1 | Charakterisierung der Ausgangslösungen | 224 |
| 4.4.1.1 | Viskosität und Oberflächenspannung | 224 |
| 4.4.1.2 | Kontaktwinkelmessungen | 226 |
| 4.4.2 | Versuche zur Herstellung von Lyophilisaten mit Ethanol und tert-Butanol | 228 |
| 4.4.2.1 | Einfrier- und Schmelzverhalten | 229 |
| 4.4.2.2 | Haft- und Strukturfestigkeit von Lyophilisaten mit Ethanol und tert-Butanol | 232 |
| 4.4.3 | Charakterisierung von wirkstofffreien Lyophilisaten | 234 |
| 4.4.3.1 | Restfeuchte | 234 |
| 4.4.3.2 | Strukturuntersuchungen durch Rasterelektronenmikroskopie | 235 |
| 4.4.3.3 | Rekonstitutionszeit | 239 |
| 4.4.3.4 | Wasserdampfaufnahme | 240 |
| 4.4.3.5 | Dichte | 242 |
| 4.4.3.6 | Haftfestigkeit | 243 |
| 4.4.3.7 | Strukturfestigkeit | 245 |
| 4.4.4 | Abschlussbemerkung | 247 |
| 4.4.5 | Charakterisierung von Lyophilisaten mit Latanoprost | 248 |
| 4.4.5.1 | Physikochemische Eigenschaften | 248 |
| 4.4.5.2 | Gleichförmigkeit der Masse | 251 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.4.5.3 | Latanoprostgehalt von Trägerlyophilisaten | 252 |
| 4.4.5.4 | Zusätzlich durchgeführte Gehaltsbestimmungen | 258 |
| 4.4.6 | Untersuchung zur okularen Bioverfügbarkeit | 262 |
| 4.4.6.1 | Mittelwertsvergleich (t-Test) | 267 |
| 4.4.6.2 | Berechnung des Konfidenzintervalls | 267 |
| 4.4.6.3 | Abschlussbemerkung | 268 |
| 5 | Diskussion und Ausblick | 269 |
| 5.1 | Sphärolyophilisate | 271 |
| 5.1.1 | Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von Sphärolyophilisaten | 271 |
| 5.1.2 | Untersuchungen zur Tropfenbildung an der DropJet Düse | 277 |
| 5.1.3 | Charakterisierung von Sphärolyophilisaten | 282 |
| 5.2 | Trägerlyophilisate | 288 |
| 5.2.1 | Charakterisierung von Trägerlyophilisaten | 288 |
| 5.2.2 | Latanoprostgehalt | 292 |
| 5.2.3 | Okulare Bioverfügbarkeit am Kaninchenauge | 297 |
| 5.3 | Lyophilisate als Arzneimittel zur Anwendung am Auge | 299 |
| 6 | Zusammenfassung | 301 |
| 7 | Anhang | 309 |
| 7.1 | Kalibrierkurven der Temperaturmessgeräte | 309 |
| 7.2 | Charakterisierung von Einzelkomponenten Prototyp III | 309 |
| 7.2.1 | Temperierung der Kryostaten | 309 |
| 7.2.2 | Regelung des Heizstabs | 310 |
| 7.2.3 | Lüfter | 311 |
| 7.3 | Ergebnisse für die statistische Auswertung der Faktorenversuchspläne | 313 |
| 7.3.1 | Partikelgrößenverteilung von Sphärolyophilisaten | 313 |
| 7.3.2 | Spezifische Oberfläche von Sphärolyophilisaten | 316 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 319 |
| 9 | Abkürzungen und Formelzeichen | 337 |

| | | |
|------------|----------------------|------------|
| 9.1 | Abkürzungen | 337 |
| 9.2 | Formelzeichen | 339 |

1 Einleitung und Zielsetzung

Der Begriff Tröpfchenlyophilisate umfasst kleinteilige gefriergetrocknete Produkte, die aus einzelnen Partikeln bestehen. Die Tröpfchen können aus einer Lösung oder Suspension entweder durch Versprühen in einem Trägergas oder Auftragen auf einen Träger erzeugt werden. Anschließend werden sie eingefroren und gefriergetrocknet. Die verwendete Lösung oder Suspension kann einen oder mehrere Arzneistoffe sowie Hilfsstoffe enthalten.

Für die Herstellung von Lyophilisaten gibt die pharmazeutische Industrie jährlich 8 bis 10 % ihrer Produktionskosten aus, das waren 1999 mehr als 8 Milliarden Dollar [66]. Durch die wachsende Zahl der vermarkteten biopharmazeutischen Produkte nimmt der Bedarf an gefriergetrockneten Darreichungsformen stetig zu [2].

Die Herstellung pulverförmiger Lyophilisate aus einzelnen Partikeln eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, die über die bisherige pharmazeutische Verwendung von Lyophilisaten hinausgehen.

Derzeit werden Lyophilisate hauptsächlich in Vials zur Herstellung von Injektions- oder Infusionslösungen angeboten. Einen geringeren Anteil machen Produkte in Ampullen, in Fertigspritzen und Schmelztabletten aus. Da die Lyophilisation direkt in der Primärverpackung erfolgt, ist man bei der Herstellung auf eine Darreichungsform beschränkt.

Tröpfchenlyophilisate, die aus Haufwerken von kugelförmigen Einzelpartikeln bestehen, werden aufgrund ihrer Form als Sphärolyophilisate bezeichnet. Die Bulkware könnte aufgrund der guten Fließfähigkeit in Vials, Ampullen, Spritzen, Kapseln oder Blister abgefüllt werden. Die hohe Porosität und das aerodynamische Verhalten ermöglichen die Verwendung als Arzneimittel in Pulverapplikatoren zur Inhalation oder zur topischen Anwendung, wie zum Beispiel am Auge. Die Abscheidung in der Lunge und die Arzneistoffaufnahme werden durch die schnelle Rekonstitution in der feuchten Umgebung der Atemwege begünstigt.

Eine besondere Darreichungsform sind die Trägerlyophilisate, die auch als Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS) bezeichnet werden. Hierbei

handelt es sich um Einzeltropfen, die auf einer Trägermembran eingefroren und getrocknet werden. Diese dienen zur topischen Anwendung am Auge und werden durch Abstreifen über das untere Augenlid in den Bindehautsack eingebracht.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, eine Anlage zur Herstellung von Sphärolyophilisaten zu entwickeln und die hergestellten Lyophilisate hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften zu charakterisieren.

Die Herstellung von Sphärolyophilisaten umfasst folgende Prozessschritte:

- Tropfenerzeugung
- Einfrieren
- Trocknung

Basierend auf diesem Konzept wurden verschiedene Prototypen von Gefriertrocknungsanlagen entwickelt, bei denen unterschiedliche Sprüh- und Einfrierverfahren getestet wurden. Eine Versuchsanlage zur Trocknung von Sphärolyophilisaten wurde ebenfalls aufgebaut und hinsichtlich der Temperatur- und Strömungsverhältnisse untersucht, die praktische Umsetzung des Trocknungsverfahrens wird derzeit in einem Folgeprojekt realisiert. Die Trocknung wurde daher in einem konventionellen Gefriertrockner durchgeführt.

Für die Tropfenerzeugung wurden verschiedene Düsen untersucht. Um kleine Tropfen mit einer möglichst monodispersen Tropfengrößenverteilung zu erhalten, wurde das Prinzip der Inkjet- Technologie zur Tropfenerzeugung angewendet. Dazu wurde ein piezoelektrisch gesteuerter Tropfengenerator der Firma Microdrop Technologies verwendet.

Beim Einfrieren wurde zunächst die Technik des vakuuminduzierten Einfrierens erprobt. Beim so genannten „snap freezing“ wird durch Anlegen von Vakuum dafür gesorgt, dass das flüssige Produkt durch die frei werdende Verdunstungsenergie schnell abkühlt, sodass es an der Oberfläche einfriert. Durch Sublimation des Oberflächeneises kühlt das Produkt weiter ab und der flüssige Kern friert ein [66,72,73]. Diese Einfrieremethode ist sehr schnell und besonders gut geeignet für geringe Produktvolumina. Maier und Krasichkova

verwendeten diese Technik erfolgreich für die Herstellung von OLCS [74,88]. Das Einfrieren von 25 μL Flüssigkeit dauerte so nur wenige Sekunden. Der Prozess der Tropfenerzeugung konnte allerdings im Vakuum nicht realisiert werden. Probleme waren das Zerplatzen von Tropfen, ein schnelles Zufrieren der Düsenöffnung oder die Erzeugung eines gefrorenen Strahls anstelle einzelner Tröpfchen.

Eine weitere Möglichkeit kleine Flüssigkeitsmengen schnell einzufrieren, ist das Versprühen in eine kalte Umgebung bei Atmosphärendruck. Diese Technik ist als Sprühgefriertrocknung bekannt, wird aber meist so angewendet, dass entweder Tröpfchen direkt in eine gekühlte Flüssigkeit, meist Flüssigstickstoff, oder in den Gasraum über einer Kühlflüssigkeit gesprüht werden. Die gefrorenen Tröpfchen müssen anschließend von der Kühlflüssigkeit separiert werden. Technisch einfach zu realisieren ist das Erzeugen von kalter Luft durch Kühlung mit Flüssigstickstoff. In der Versuchsanlage wurde dazu ein doppelwandiges Stahlrohr verwendet. Der Hohlzylinder wurde mit Flüssigstickstoff befüllt und diente so zur Abkühlung der Luft, die sich im inneren Teil befand. Die Tröpfchen wurden bei Temperaturen von etwa $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ im inneren Teil des Zylinders eingefroren. Dies hat den Vorteil, dass die Tröpfchen nicht in Kontakt mit der Kühlflüssigkeit kommen und man die Partikel nicht von der Kühlflüssigkeit abtrennen muss. Durch das Einsprühen in die gekühlte Kaltluft konnten die erzeugten Tropfen unter Erhalt ihrer Form wie beim vakuuminduzierten Einfrieren in nur wenigen Sekunden eingefroren werden. Die Trocknung dieser Partikel wurde in einem konventionellen Gefriertrockner durchgeführt.

Die Produkteigenschaften der hergestellten Lyophilisate wurden in Abhängigkeit der Sprühbedingungen und der Zusammensetzung der verwendeten Ausgangslösung mit verschiedenen Hilfsstoffen untersucht. Qualitätsbeeinflussende Parameter wie Restfeuchte, Wasserdampfsorption und die Rekonstitutionszeit des Pulvers wurden analysiert. Weiterhin wurde die Struktur der Lyophilisate rasterelektronenmikroskopisch untersucht und die spezifische Oberfläche ermittelt. Die Partikelgrößenverteilung, die Dichte, die Fließeigenschaften und das aerodynamische Verhalten wurden untersucht. Die

Versprühbarkeit der Lyophilisatpartikel wurde mit einem Pulverapplikator zur Anwendung am Auge getestet.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Charakterisierung von wirkstoffhaltigen Trägerlyophilisaten zur Anwendung am Auge. Die Herstellung der Trägerlyophilisate erfolgte im Gegensatz zu den Arbeiten von Maier und Krasichkova mit einer vereinfachten Methode [74,88].

Trägerlyophilisate sind eine moderne Alternative zu konventionellen Augentropfen. Vorteile sind die gute Verträglichkeit, der Verzicht auf Inhaltsstoffe wie Konservierungsmittel und Puffer, die chemische Stabilisierung hydrolyseempfindlicher Arzneistoffe, die einfache Handhabung und präzise Dosierung.

Die Arbeiten an dieser Arzneiform begannen bereits 1996. Grunthal und Weichselbaum [57,151] beschäftigten sich mit der Entwicklung der Arzneiform, der Entwicklung von Prüfsystemen zur Charakterisierung von OLCS sowie klinischen Studien zu Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit von Modellarzneistoffen.

Maier und Krasichkova [74,88] entwickelten und verbesserten neue Techniken zum Gefriertrocknen von OLCS. Dabei konnten die Herstellungsbedingungen für jedes Lyophilisat kontrolliert und die Prozesszeiten für die Herstellung von Einzellyophilisaten verkürzt werden. Die Sicherheit des Verfahrens zur aseptischen Herstellung wurde durch eine Media Fill Prozedur nachgewiesen [77]. Für Trägerlyophilisate mit Fluorescein konnte eine erhöhte Bioverfügbarkeit gegenüber Augentropfen gezeigt werden [22,84].

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer gut verträglichen, einfach zu handhabenden Arzneiform für den UV- und hydrolyseempfindlichen Arzneistoff Latanoprost. Das im Handel befindliche Latanoprost- Monopräparat Xalatan® ist der Marktführer der verordneten Glaukomamittel [83].

Weiterhin wurden die Einflüsse der Zusammensetzung auf die physikochemischen Eigenschaften der Trägerlyophilisate untersucht. Wie auch für Sphärolyophilisate wurden Bestimmungen zur Restfeuchte, Rekonstitutionszeit, Wasseraufnahme und zur Mikrostruktur durchgeführt. Außerdem wurden spezielle Eigenschaften für OLCS wie die Haftfestigkeit auf dem Träger und die Strukturfestigkeit ermittelt. Die Gehaltsbestimmungen

wurden mit einem Enzymimmunoassay durchgeführt. Zusätzlich wurde von M. Kassack und D. Eßer vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Düsseldorf eine HPLC-Methode entwickelt und ausgewählte Lyophilisate von einem externen Analysenlabor (Cayman Chemical, USA - Ann Arbor (MI)) zur Kontrolle durch LC-MS analysiert.

Mit den latanoprosthaltigen Trägerlyophilisaten wurde in Zusammenarbeit mit M. Diestelhorst (Zentrum für Augenheilkunde; Universität Köln) eine Vorstudie zur okularen Bioverfügbarkeit im Vergleich zum Handelspräparat Xalatan[®] am Kaninchenauge durchgeführt.

2 Theoretischer Teil

2.1 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) ist ein Trocknungsverfahren, bei dem das Lösungs- oder Dispersionsmittel durch Einfrieren in den festen Zustand überführt wird und anschließend durch Sublimation direkt in die Gasphase übergeht.

Dieses schonende Trocknungsverfahren wird in der Pharmazie besonders für thermolabile oder hydrolyseempfindliche Arzneistoffe eingesetzt. Die Zubereitungen sind lagerungsstabil und lassen sich nach Zugabe von Wasser schnell auflösen oder dispergieren. Zugesezte Hilfsstoffe können den Wirkstoff stabilisieren und ihm ein angenehmes Aussehen verleihen.

Von Nachteil sind die lange Prozessdauer und die hohen Kosten für Anschaffung, Betrieb und Wartung solcher Anlagen. Daher werden meist nur teure und hochwirksame Arzneistoffe gefriergetrocknet.

Die wichtigsten gefriergetrockneten Produkte für die pharmazeutische Industrie sind Antibiotika, Impfstoffe und Diagnostika. Dazu gehören auch biotechnologisch hergestellte Produkte, die hauptsächlich aus Proteinen bestehen. Die meisten Erzeugnisse werden in Vials vertrieben, seltener sind Ampullen, Spritzen, Kartuschen oder Schmelztabletten.

2.1.1 Stand der Technik

2.1.1.1 Aufbau eines konventionellen Gefriertrockners

Konventionelle Gefriertrockner, wie sie für die Herstellung von Arzneimitteln verwendet werden, besitzen prinzipiell denselben Aufbau wie in Abbildung 2-1 schematisch gezeigt [31].

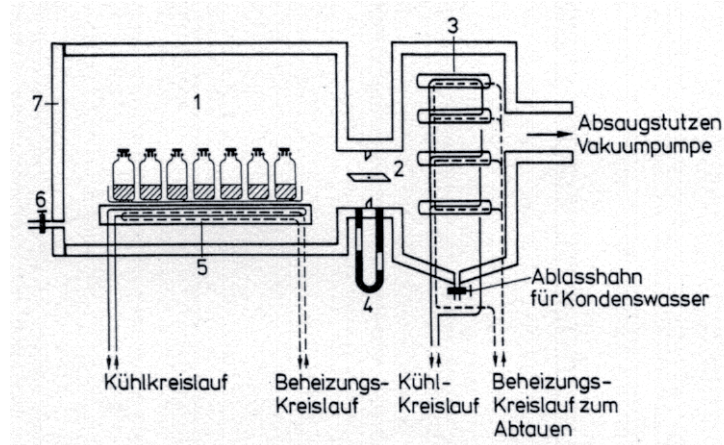


Abb. 2-1 Schematische Darstellung eines Gefriertrockners: 1 - Trocknungskammer, 2 - Absperrklappe, 3 - Kondensator, 4 - Differenzdruck-Manometer, 5 - Stellfläche, 6 - Be- und Entlüftungshahn, 7 – Beschickungstür [31]

Der Gefriertrockner verfügt über eine evakuierbare Kammer, in der sich beheiz- und kühlbare Stellflächen für das Produkt befinden. Damit ist es möglich das Produkt zunächst bei Atmosphärendruck einzufrieren und zu kühlen oder ihm während der Trocknung Energie zuzuführen. Bei den meisten Geräten werden die Stellflächen auch zum Verschließen der Vials benutzt, indem sie zusammengefahren werden und so die vorher aufgesetzten Stopfen in die Hälse der Gefäße hineindrücken.

Im zweiten Teil der Kammer befindet sich der Kondensator. Er besteht aus Kühlschlangen oder -platten, die mit einem Kältemittel versorgt werden. Hier wird das in die Gasphase übergegangene Lösungs- oder Dispersionsmittel aus dem Produkt in Form von Eis auf tiefgekühlten Flächen abgeschieden. Der Kondensator muss daher nach dem Prozess enteist werden, dazu kann das Eis nach Ende der Trocknung abgetaut oder mechanisch entfernt werden.

Wenn die Trockenkammer und der Kondensator wie in Abbildung 2-1 räumlich voneinander getrennt sind, spricht man von einem Zweikammersystem, es gibt aber auch Einkammersysteme.

Der Unterdruck in der Kammer wird über eine Vakuumpumpe erzeugt. Nach Beendigung der Trocknung wird die Kammer durch mit Feinfiltern ausgestattete Belüftungsventile wieder auf Normaldruck gebracht. Werden Vials gefriergetrocknet, können diese sowohl im Vakuum als auch nach dem Begasen mit Inertgas direkt in der Anlage verschlossen werden.

Die Steuerung des Gefriertrocknungszyklus erfolgt computergestützt. Zahlreiche Möglichkeiten zur Prozessüberwachung können zusätzlich installiert werden. Während des Einfrierens und der Trocknung sollten verschiedene Parameter überwacht werden. Als wichtigste Prozessgrößen sind hier die Temperaturen der Stellflächen, des Produkts und des Kondensators sowie der Druck in der Kammer und im Kondensatorraum zu nennen.

Die Temperaturmessung im Produkt erfolgt mit Widerstandsthermometern oder Thermoelementen. Berührungslos messen barometrische Temperatursensoren oder IR-Thermometer. Gebräuchliche Druckmesssysteme sind Pirani-Vakuummeter, bei denen das Messsignal von der Zusammensetzung des Gases abhängt und kapazitive Druckaufnehmer, die davon unabhängig sind. Sie befinden sich meist zwischen Trocknungs- und Kondensatorkammer und dienen zur Endpunktbestimmung der Trocknung.

Für die Reinigung und Sterilisation der Anlage können CIP- und SIP- Systeme („Cleaning In Place“, „Sterilization In Place“) integriert sein. Dies ist besonders wichtig für die aseptische Fertigung von Arzneimitteln. Die Sterilisation kann mit Wasserdampf oder durch Begasung mit H_2O_2 (Vapourized Hydrogen Peroxide, VHP) erfolgen [98].

2.1.1.2 Anlagentypen

Je nach Verwendungszweck kann man verschiedene Anlagentypen unterscheiden. Zum Trocknen kleiner Produktmengen, die bis zu 10 kg Wasser enthalten, benutzt man Labor- und Pilotanlagen.

Laboranlagen sind für einen breiten Anwendungsbereich ausgelegt. Sie bestehen meist aus kombinierbaren Modulen wie zum Beispiel zusätzlichen Stellflächen oder Aufsätzen für Kolben. Oft besitzen sie eine vollständige Abdeckung aus Plexiglas, die das visuelle Verfolgen des Trocknungsprozesses ermöglicht. Sie sind geeignet für Versuche im Labormaßstab und anspruchslöse Produkte, da der Gefriertrocknungszyklus meist nicht exakt steuerbar ist.

Pilotanlagen werden für die Entwicklung von Produktionsprozessen eingesetzt. Sie besitzen eine ähnliche Geometrie und vergleichbare Temperiersysteme wie Anlagen für die Produktion und ermöglichen daher das Upscaling auf den

eigentlichen Produktionsprozess. Meist verfügen diese Anlagen über Entnahmegерäte zum Probenzug während des Prozesses.

Zum Trocknen großer Produktmengen eignen sich Produktionsanlagen. Es gibt Ein- und Zweikammerbautypen. Diese arbeiten voll computergestützt und können zusätzlich mit Systemen zur Prozessüberwachung ausgestattet werden. Für die aseptische Fertigung bieten die jeweiligen Hersteller automatisierte Be- und Entladesysteme an. Produktkontamination durch den Menschen sollen dabei vermieden werden. Bei der Verarbeitung von toxischen Produkten wird zusätzlich die Isolator-technologie zum Schutz von Personen und deren Umfeld eingesetzt. Konventionelle Produktionsanlagen können maximal mit ca. 100 bis 200 kg Füllgut bestückt werden [67].

2.1.1.3 Trends in der pharmazeutischen Industrie

Verfolgt man die Entwicklungen bei den verschiedenen Herstellern von Gefriertrocknern, kann man einen Trend zur Verbesserung der Prozessüberwachung und Steuerung sowie zur Automatisierung von Prozessabläufen feststellen. Auch bei der Konfektionierung und den Behältnissen für Lyophilisate gibt es innovative Trends.

Im Rahmen der PAT-Initiative (Process Analytical Technology) der FDA, deren Ziel es ist, den Herstellungsprozess vollständiger zu verstehen und zu steuern, werden Mess- und Steuerungssysteme entwickelt und verbessert. Neue Messinstrumente, die im Gefriertrockner implementiert werden können, sind zum Beispiel die Mikrowaage (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, D- Osterode) und NIR-Sonden [35] zur Bestimmung der Produktfeuchte.

Eine Möglichkeit zur gleichzeitigen Prozessüberwachung und Steuerung bietet die manometrische Temperaturmessung im SMART Freeze-DryerTM (FTS, US-Stone Ridge). Während des Prozesses werden manometrische Temperaturmessungen durchgeführt, die für Berechnungen von Dampfdruck an der Sublimationsfront, Produktwiderstand, Produkttemperatur, Wärmefluss und Massentransfer benutzt werden [140]. Bei Kenntnis dieser Parameter lässt sich der Prozess automatisch steuern, das heißt Druck und Temperatur können während des Prozesses angepasst werden. Dies ist vor allem bei der Entwicklung von Gefriertrocknungsprozessen hilfreich.

Eine neue Methode zur Bestimmung des Massenflusses während des Gefriertrocknens ist die „Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy“ (TDLAS) [54]. Dabei wird die Konzentration des Wasserdampfs im Verbindungsrohr zwischen Kammer und Kondensator in einem definierten Winkel zum Gasstrom NIR-spektroskopisch gemessen. Aus der Konzentration des Wasserdampfs und der Fließgeschwindigkeit kann der Massenfluss durch das Verbindungsstück berechnet werden. Die erhaltenen Daten ermöglichen die Bestimmung der Menge des entfernten Wassers und können wiederum zur Prozesssteuerung benutzt werden.

Zur Automatisierung von Prozessabläufen bieten die meisten Hersteller Be- und Entladungsverfahren mit schienengeführten Robotersystemen an.

Ein vollständig automatisiertes Gefriertrocknungskonzept ist bei der Gefriertrocknungsanlage RAYCON™ (GEA Process Engineering A/S, DK-Soeborg) realisiert. Diese besteht aus einem Trocknungstunnel mit automatischem Transport der Trays und kontinuierlichem Enteisungssystem. Die befüllten, gefrorenen Trays werden über eine Luftschleuse einzeln ins Vakuum eingebracht, in einem Magazin gesammelt und dann in den Trocknungstunnel gefahren. Alle Abschnitte des Trocknungsprozesses sind automatisiert. Nach der Trocknung werden die Trays entleert, gewaschen und zurückgeführt. Der Prozess kann in Chargen oder kontinuierlich ablaufen, die größte Gefriertrocknungseinheit hat eine Sublimationsrate von ca. 500 kg Wasser pro Stunde. RAYCON™ Anlagen sind geeignet für die Produktion von Bulkware wie Pellets oder Granulate zur oralen Anwendung. Wegen der strengen Anforderungen der Zulassungsbehörden an die mikrobiologische Qualität parenteral verabreichter Arzneimittel ist die Fertigung von Sterilprodukten jedoch nicht möglich. In der Lebensmitteltechnologie hat sich die Tunnelgefriertrocknung, bei der im kontinuierlichen Prozess ein wesentlich höherer Produktdurchsatz als bei konventionellen Anlagen erzielt wird, durchgesetzt.

Interessante Entwicklungen auf den Gebieten Konfektionierung und Behältnisse sind beispielsweise die Lyoseal™ Technologie (Biocorp Inc., US-Princeton), die Gefriertrocknung in Kartuschen sowie das Lyogard® System.

Lyoseal™ ist ein Stopfenverschluss mit speziellem Design, der das Verbördeln direkt im Gefriertrockner ermöglicht. Die Herstellung von Kartuschen, z.B. das Doppelkammersystem V-LK® (Vetter Pharma International GmbH, D-Ravensburg) ist für den sofortigen Gebrauch in Spritzen oder Insulinpens durch den Patienten gedacht. Lyogard® Systeme sind Behälter zum Trocknen von Bulkware die mit einer wasserdampfdurchlässigen PTFE-Membran (W.L. Gore & Associates Inc., US-Elkton) versehen sind. Die nur für das Sublimat durchlässige Membran verhindert die Verunreinigung des Produkts mit Partikeln oder Bakterien und reduziert das Risiko von Crosskontaminationen.

2.1.1.4 Zukunft

In der Lebensmittelindustrie hat sich die kontinuierliche Gefriertrocknung für die Produktion von Kaffee und Tee etabliert. Die Gefriertrocknung pharmazeutischer Produkte ist immer noch ein typischer Batch-Prozess. Eine kontinuierliche Fertigung ist auch für die pharmazeutische Industrie ein wünschenswertes Ziel.

Die Herstellung von gefriergetrockneten Parenteralia unterliegt strengen regulatorischen Vorschriften. In den Richtlinien „Guide to Inspections of Lyophilization of Parenterals“ der FDA [1] werden definierte Prozessbedingungen gefordert, der Prozess muss validiert sein und die Prozessbedingungen müssen kontrolliert werden. Besonders wichtig ist die Einhaltung aseptischer Bedingungen während des gesamten Herstellungsprozesses.

Bereits 1975 gab es ein erhebliches Interesse an kontinuierlichen Gefriertrocknungssystemen [66], jedoch gibt es bis heute Schwierigkeiten mit der Umsetzung. Die Aufrechterhaltung der festgelegten Prozessbedingungen während der Herstellung stellt eins der Probleme dar. Wenn bei einem kontinuierlichen Verfahren neues Produkt in den Trocknungsprozess gelangt, steigt die Konzentration von Wasserdampf in der Trockenkammer an. Der erhöhte Feuchtegehalt kann wiederum das bereits getrocknete Produkt beeinflussen [95]. Ein weiteres Problem stellt die aseptische Fertigung dar. Bei der chargenweisen Produktion wird der Gefriertrockner nach jedem Trocknungszyklus sterilisiert. Wenn die Be- und Entladung des Gefriertrockners aseptisch erfolgen, kann die Sterilität theoretisch auch bei einer kontinuierlichen

Anlage während des gesamten Herstellungsprozesses aufrechterhalten werden. Eine sterilisierbare Anlage zu konstruieren wäre aber mit hohen zusätzlichen Kosten verbunden. Außerdem stellen Zykluszeiten über mehrere Tage eine Schwierigkeit dar. Wenn die Dauer der einzelnen Verfahrensschritte sehr lang ist und diese hintereinander ausgeführt werden, würde der Prozess insgesamt länger dauern als die Trocknung chargenweise erfolgt. Nach Berechnungen von Jennings lohnt sich ein kontinuierlicher Prozess erst dann, wenn die Prozessdauer auf ein Fünftel bis ein Zehntel des Ausgangswertes reduziert wird [66].

2.1.2 Der Gefriertrocknungsprozess

Der Prozess der Gefriertrocknung verläuft in 3 Schritten: dem Einfrieren, der Primärtrocknung und der Sekundärtrocknung. Beim Einfrieren wird das Produkt in den festen Aggregatzustand überführt. Die Primärtrocknung dient der Entfernung von freiem Wasser durch Sublimation. Bei der Sekundärtrocknung wird anschließend das gebundene Wasser durch Desorption entfernt.

2.1.2.1 Einfrieren

Im ersten Schritt wird die flüssige Lösung oder Suspension bei Atmosphärendruck in den festen Aggregatzustand überführt. Während des Einfrierens wird dazu die Temperatur der Stellflächen gesenkt um Wärme aus der Flüssigkeit abzuführen. Die Wärme wird hauptsächlich durch Konvektion übertragen, dabei entsteht im Gefriergut ein von außen nach innen gerichteter Temperaturgradient. Im einfachsten Fall werden eine feste Phase und die Grenzflächen zwischen reinem Eis und den gelösten oder suspendierten Stoffen ausgebildet.

Eisbildung und Einfrieren von Lösungen

Beim Einfrieren von Wasser muss die Temperatur unter 0 °C gesenkt werden. Voraussetzung für das Einfrieren ist die Bildung von Nukleationskeimen. Sie entstehen an ausreichend großen, hexagonalen, sehr kurzlebigen submikroskopischen Aggregaten von Wasser [52,116]. Mit sinkender Temperatur bleiben diese Aggregate länger bestehen, damit ist die Wahrscheinlichkeit zur Nukleation erhöht. Der Vorgang der Keimbildung in

reinem Wasser wird auch als homogene Nukleation bezeichnet. Reines Wasser lässt sich ohne Keimbildung bis zu -40 °C unterkühlen [52,108]. Da in reinem Wasser aber oft partikuläre Verunreinigungen enthalten sind, erfolgt die als heterogene Nukleation bezeichnete Keimbildung an diesen Teilchen. Diese Lösungen lassen sich dann nur auf ungefähr -20 °C unterkühlen [52]. An die Nukleation schließt sich der Vorgang des Eiskristallwachstums an. Die gelösten Bestandteile werden beim Einfrieren aufkonzentriert bis sie eine kritische Konzentration erreicht haben. Dann können sie entweder in reiner Form bzw. als Hydrat auskristallisieren oder als unterkühlte Flüssigkeit erstarren.

Lösungen mit gut kristallisierenden Inhaltsstoffen zeigen ein eutektisches Einfrierverhalten. Wird beim Abkühlen am eutektischen Punkt die kritische Gefrierkonzentration erreicht, kristallisieren Wasser und die gelösten Substanzen nebeneinander aus. Bei diesem Mischungsverhältnis wird die tiefste Erstarrungstemperatur der Lösung, die eutektische Temperatur T_e , erreicht.

Bei Lösungen mit Zuckern oder Polymeren, die zur Übersättigung neigen, findet dagegen keine Kristallisation sondern ein Glasübergang statt. Bei der Glasbildung steigt die Viskosität der Mischung so stark an, dass keine Kristallisation stattfinden kann. Die Mischung erstarrt unterhalb des eutektischen Punkts ohne vollständige Phasentrennung als amorphes Glas. Die Temperatur, bei der dieser Übergang erfolgt, wird als Glasübergangstemperatur T_g' bezeichnet.

Mehrkomponentensysteme zeigen ein komplizierteres Verhalten, dabei können ein oder mehrere gelöste Substanzen auskristallisieren, andere jedoch in den Glaszustand übergehen. In vielen Fällen erhält man eine hochviskose amorphe Substanz mit kristallinen Anteilen [98].

Um den vollständigen Übergang von der flüssigen in die feste Phase zu ermöglichen, muss das Gut beim Einfrieren unter die eutektische Temperatur oder die Glasübergangstemperatur abgekühlt werden. Außerdem muss die Einfrierzeit so lang sein, dass die Flüssigkeit vollständig durchgefroren wird.

Gefrierkonzentration

Die mit dem Einfrieren verbundene Aufkonzentrierung kann zu unerwünschten Folgeerscheinungen führen. In einfachen Lösungen können schlecht lösliche Substanzen ausgefällt werden. Durch die Aufkonzentrierung von verwendeten Puffern mit unterschiedlich löslichen Bestandteilen kann sich durch Auskristallisieren von Puffersalzen der pH-Wert ändern. Empfindliche Arzneistoffe können so geschädigt werden. Bei Proteinen kann die Aufkonzentrierung von Puffersalzen zur Denaturierung und damit einem Wirkungsverlust führen [26].

Durch den Zusatz kryoprotektiver Hilfsstoffe können Schädigungen beim Einfrieren durch Gefrierkonzentration vermieden werden. Die Stabilisierung erfolgt vielfach durch die Ausbildung eines glasartigen Zustands durch Hilfsstoffe wie Glycerol oder Trehalose.

Einfriergeschwindigkeit

Die Struktur und das Trocknungsverhalten des Produkts werden durch den Einfrierschritt festgelegt. Ob die gelösten Substanzen auskristallisieren und welche Form von Eiskristallen sich bildet, hängt dabei nicht nur von der Zusammensetzung der Formulierung sondern auch von der Einfriergeschwindigkeit und der Nukleationstemperatur ab [98,121].

Kristallgröße und Kristallform bestimmen die spätere Porosität des Produkts. Bei sehr hohen Einfriergeschwindigkeiten von mehr als 20 K/min entstehen kleine Kristalle in einer heterogenen Eisstruktur und die Ausbildung glasartiger amorpher Bereiche wird gefördert. Dies ist vorteilhaft für die Vermeidung von Gefrierkonzentration aber von Nachteil für die Trocknung, da der Produktwiderstand (siehe Kapitel 2.1.2.2) bei kleinporigen Gütern größer ist. Homogene Eisstrukturen werden bei mittlerer Einfrierrate von ca. 0,2 bis 10 K/min ausgebildet, die entstehenden Kristalle sind größer. Der Zusammenhang zwischen Porengröße und Einfriergeschwindigkeit für schnelles und moderates Abkühlen ist beispielhaft für eine 20 %-ige Dextranlösung in Abbildung 2-2 dargestellt [144].

Sehr langsames Einfrieren (Einfrierate $< 0,2$ K/min) führt zunächst zu einer starken Unterkühlung der Lösung aus der sich dann sehr schnell kleine Eiskristalle bilden [116].

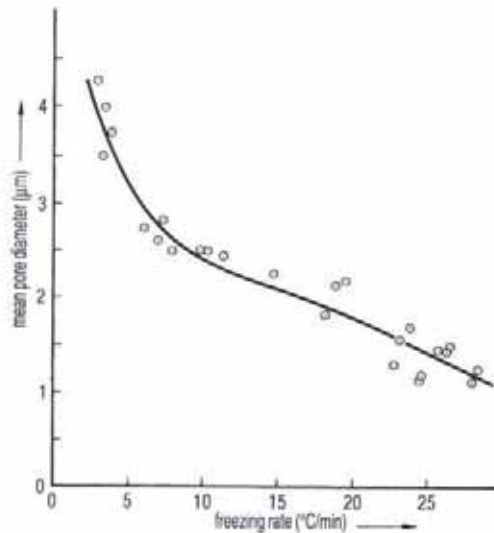


Abb. 2-2 Abhängigkeit der mittleren Porendurchmesser der Einfriereschwindigkeit für eine 20 %-ige Dextranlösung [144]

Durch die Größe der Eiskristalle wird für die Trocknung der Diffusionswiderstand der bereits getrockneten Schicht festgelegt. Mit einer gezielten Temperaturerhöhung nach dem Einfrieren auf eine Temperatur oberhalb des Gefrierpunkts kann man den Kristallisationsprozess positiv beeinflussen. Dieser Vorgang, auch als Tempern oder Annealing bezeichnet, hat einen starken Einfluss auf den Kristallisationsvorgang von Arznei- und Hilfsstoffen sowie die Größenverteilung der Eiskristalle und führt zu größeren homogen verteilten Poren im Produkt [140]. Da es sich um langsame Vorgänge handelt, wird diese Temperatur für mehrere Stunden beibehalten. Einige biologische Produkte, beispielsweise Proteine, vertragen große Eiskristalle jedoch nicht und müssen deshalb so eingefroren werden, dass kleine Kristalle entstehen [27].

Das Einfrieren findet in der Praxis hauptsächlich in Vials oder Schalen direkt auf den Stellflächen des Gefriertrockners statt, alternativ auch extern in einem Gefrierschrank. Daneben gibt es Verfahren zum Einfrieren in Flaschen oder Kolben, die in einem Kältebad senkrecht mit hoher oder waagrecht mit niedriger Geschwindigkeit rotieren. Diese Techniken werden als „spin freezing“

und „shell freezing“ bezeichnet und werden zur Reduktion der Schichtdicke beim Einfrieren großer Füllvolumina eingesetzt [98]. Flüssige Zubereitungen zur Herstellung von Schmelztabletten können direkt im Blister durch Versprühen von flüssigem Stickstoff eingefroren werden [5]. Außerdem gibt es das Verfahren des vakuuminduzierten Einfrierens (snap freezing) für kleine Flüssigkeitsmengen [66,72,140].

2.1.2.2 Primärtrocknung

Bei der Primärtrocknung wird gefrorenes Wasser durch Sublimation entfernt. Dazu wird der Kammerdruck unter den Wasserdampfpartialdruck von Eis gesenkt. Durch die tiefe Temperatur ist der Dampfdruck an der Eis-Wasserdampf-Phasengrenze ebenfalls erniedrigt und Wassermoleküle können aus dem Eis in die Gasphase übergehen. Sie scheiden sich nach Übersättigung der Gasphase am wesentlich kälteren Kondensator ab.

Die Sublimation von Wasser findet an der Grenzfläche zwischen Eis und Umgebungsgas statt. Aus dem Phasendiagramm des Wassers kann man ablesen, dass eine Sublimation erst unterhalb des Tripelpunktes, bei einer Temperatur von 0,0098 °C und einem Wasserdampfpartialdruck von 6,13 mbar, stattfindet. Wassermoleküle gehen in die Gasphase über wenn der Dampfdruck in der Gasphase geringer ist. Sind andere Moleküle im Gasraum vorhanden, kommt es zu Kollisionen und einige Wassermoleküle kehren zurück zur Grenzfläche. Die Phasengrenze von Eis und Wasserdampf ist in Abbildung 2-3 [66] dargestellt. Die Sublimation von Wassermolekülen ist abhängig vom Wasserdampfpartialdruck, Moleküle anderer Art können diese aber ebenfalls durch Kollisionen mit den austretenden Wassermolekülen behindern. Die Sublimation wird also auch vom Gesamtdampfdruck des Systems beeinflusst.

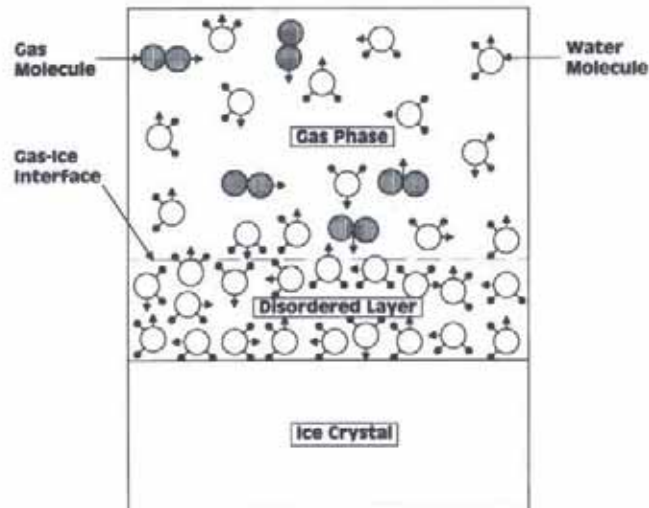


Abb. 2-3 Sublimation an der Phasengrenze Eis-Wasserdampf (Pfeile symbolisieren den Bewegungsimpuls der Wasser- und Gasmoleküle) [66]

Die Primärtrocknung wird von 2 Transportmechanismen bestimmt. Zum einen vom Stofftransport der Wassermoleküle von der Eis-Wasserdampf-Phasengrenze zum Kondensator und zum anderen von der Energie, die wieder zugeführt werden muss, da dem Produkt während der Sublimation Wärmeenergie entzogen wird.

Stofftransport

Eine Besonderheit bei der Gefriertrocknung in Vials im Gegensatz zu den meisten Trocknungsprozessen, die bei hohen Temperaturen ablaufen, ist, dass sich sofort ein Produktwiderstand aus der entstandenen getrockneten Schicht ergibt. Grund dafür ist der fehlende Flüssigkeitstransport in den Kapillaren des Trocknungsguts, weil Lösemittelmoleküle die Poren und Kapillaren nur einzeln in der Gasphase passieren können. Daher verläuft die Trocknungsfront von oben nach unten durch das Produkt.

Der Stofftransport bei der Sublimationstrocknung kann durch Diffusion oder Strömung erfolgen. Welche der beiden Bewegungsarten vorliegt, wird durch das Verhältnis der mittleren freien Weglänge (MFW) im Bezug zur Porengröße bestimmt. Die mittlere freie Weglänge ist der Weg, den ein Gasmolekül zurücklegen kann, ohne mit einem weiteren Molekül zu kollidieren. Sie hängt ab vom Durchmesser der Moleküle, der Temperatur und dem Druck:

$$MFW = \frac{k \cdot T}{\pi \cdot d^2 \cdot P} \quad \text{Gl. 2-1}$$

MFW – Mittlere freie Weglänge [m], k – Boltzmann-Konstante [J/K], T – Temperatur [K],
d – Durchmesser der Gasmoleküle [m], P – Druck [N/m²]

Bei niedrigem Druck und niedriger Temperatur, bei denen die Gefriertrocknung stattfindet, ist die mittlere freie Weglänge für Gasmoleküle recht groß. So beträgt sie bei einem Dampfdruck von 1 mbar für Wasserdampf bei – 30 °C 35 µm, während sie bei Atmosphärendruck nur das Tausendste, also 0,035 µm beträgt. Die Porengröße gefriergetrockneter Produkte beträgt im Allgemeinen um 20 µm, Poren die von eutektischen Kristallen stammen, sind sogar noch kleiner [102].

Ist die mittlere freie Weglänge größer als die Porengröße, erfolgt der Stofftransport durch die Knudsensche Molekularbewegung. Hierbei ist der Massenstrom dem Dampfdruckgefälle direkt proportional [102]:

$$G = A \cdot \frac{4}{3} \cdot \frac{d}{l} \cdot \left(\frac{M}{2\pi RT} \right)^{\frac{1}{2}} \cdot \Delta P \quad \text{Gl. 2-2}$$

G - Massenfluss [g/s], A - Querschnittsfläche [m²], d - Porendurchmesser [m], l - Weg (m),
M - Molekulargewicht [g/mol], R - allgemeine Gaskonstante [J mol⁻¹K⁻¹], T - absolute Temperatur [K], ΔP - Dampfdruckgefälle [Pa]

Der Trocknungsvorgang lässt sich nur durch die Erhöhung des Wasserdampfpartialdruckgradienten beschleunigen. Der Dampfdruck steigt exponentiell mit Erhöhung der Temperatur. Um die Trocknung zu beschleunigen, muss daher die Temperatur des Gutes erhöht werden, damit der Dampfdruckunterschied größer wird. Das weitere Absenken des Umgebungsdrucks würde hier nicht zur Erhöhung der Trocknungsgeschwindigkeit führen [75].

Die Diffusion von Wassermolekülen durch Knudsensche Diffusion kann auch als Produktwiderstand ausgedrückt werden. Die Produktmatrix wird dabei vereinfacht als ein System von Kapillarröhrchen betrachtet [102]:

$$R_p = l \cdot \left(\frac{\tau^2}{\varepsilon} \right) \cdot \left(\frac{3}{2} \right) \cdot \left(\frac{f}{2-f} \right) \cdot \left(\frac{1}{d} \right) \cdot \left(\frac{\pi RT}{2M} \right) \quad \text{Gl. 2-3}$$

R_p – Produktwiderstand [cm² Pa hr/g], l – Schichtdicke [cm], τ – Gewundenheit (engl. tortuosity),
ε – Porosität, f – Besetzungskoeffizient der Schicht, d – Porendurchmesser [µm], R - allgemeine Gaskonstante [J mol⁻¹K⁻¹], T - absolute Temperatur [K], M – Molekulargewicht [g/mol]

Hier wird deutlich, dass die Schichtdicke des Produkts und die Beschaffenheit der Eismatrix den Wasserdampftransport bestimmen.

Gegenüber dem Produktwiderstand sind der Stopfen- und der Kammerwiderstand bei typischen gefriergetrockneten Produkten gering, siehe Abbildung 2-4 [102]. Beim Transport von Wassermolekülen durch den Stopfen muss der Stopfenwiderstand überwunden werden. Dieser ist abhängig von der Geometrie des Stopfens. Der Kammerwiderstand ist bedingt durch die Bauform der Trockenkammer und durch die Anordnung des Eiskondensators. Meist ist der Kondensator mehr als 10 cm vom Produkt entfernt und räumlich von der Trockenkammer getrennt.

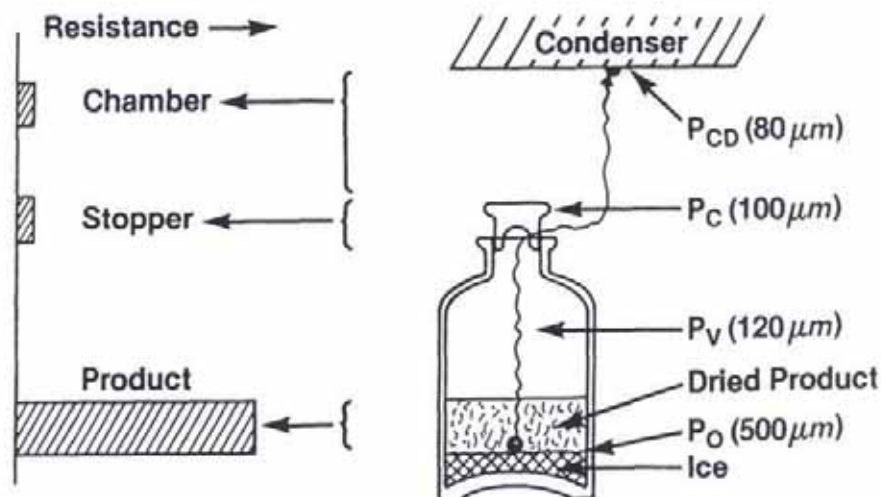


Abb. 2-4 Trocknungswiderstände bei der Vial-Gefrier Trocknung [102]

Wärmeübertragung

Zur Sublimation von Eis werden große Energiemengen benötigt, das sind pro Kilogramm Eis rund 2850 kJ. Ohne Zufuhr von Energie würde die Sublimation immer mehr verlangsamt und käme zum Erliegen, wenn die Temperatur an der Eis-Wasserdampf-Phasengrenze die Temperatur des Kondensators erreicht hat. Daher muss sichergestellt sein, dass an der Trocknungsfront genügend Energie zur Sublimation zur Verfügung steht. Die benötigte Wärmeenergie kann durch Wärmeleitung, Konvektion oder Strahlung zugeführt werden. Für die Gefrier Trocknung von Vials sind die Mechanismen der Wärmeübertragung in Abbildung 2-5 dargestellt [116].

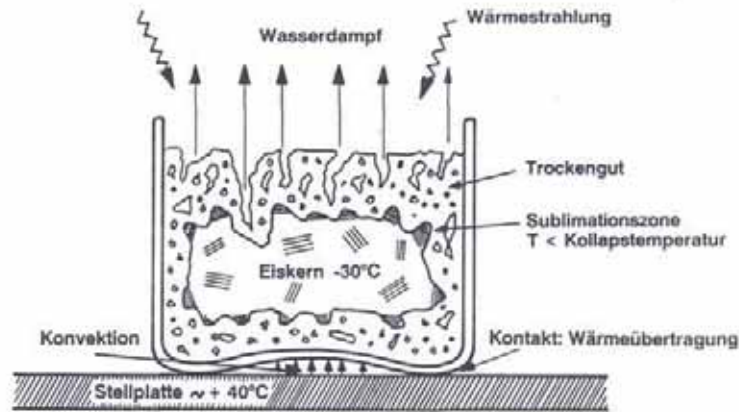


Abb. 2-5 Mechanismen der Wärmeübertragung für Vials [116]

Nachfolgend werden die Mechanismen der Wärmeübertragung nach Pikal [102] erläutert. Der Wärmeübergang für ein Vial kann demnach vereinfacht mit Gleichung 2-4 beschrieben werden.

$$\frac{dQ}{dt} = A_v \cdot K_v \cdot (T_s - T_p) \quad \text{Gl. 2-4}$$

dQ/dt – Wärmefluss von der Stellfläche zum Produkt [J/s], A_v – Querschnittsfläche des Vials [m^2], K_v – Wärmeübergangskoeffizient [$W/(m^2K)$], T_s – Temperatur der Stellfläche [K], T_p – Produkttemperatur am Boden des Vials [K]

Der Wärmeübergangskoeffizient für ein Vial ergibt sich aus der Übertragung durch Konvektion, durch Strahlung und durch Kontakt mit den Stellflächen. Die Wärmeübertragung durch Konvektion des Restgases spielt dabei die größte Rolle. Dabei kommt es, abhängig vom Kammerdruck, zur Übertragung durch Kollision von Gasmolekülen zwischen Stellfläche, Boden und den Glaswänden der Vials. Die Wärmeübertragung und damit die Sublimationsgeschwindigkeit können zwischen den einzelnen Vials in der Kammer variieren. So kommt es zum Beispiel bei randständigen Vials einer Packung zur zusätzlichen Wärmeübertragung durch Strahlung von den Wänden der Kammer.

In Gleichung 2-5 ist der Wärmefluss von den Stellflächen aufgezeichnet. Die über die Stellflächen zugeführte Wärmemenge wird anfangs zum Erwärmen des gefrorenen Produkts benötigt, dies wird im zweiten Teil der Gleichung beschrieben. Während des Hauptteils der Primärtrocknung wird die Temperatur an der Phasengrenze konstant gehalten und der zweite Term geht gegen Null.

Die Sublimationsgeschwindigkeit hängt dann von der zugeführten Wärmemenge ab.

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \cdot \left(\frac{dm}{dt} \right) + m_s \cdot c_v \frac{\partial T}{\partial t} \quad \text{Gl. 2-5}$$

dQ/dt – Wärmefluss von den Stellflächen [J/s], ΔH_s Sublimationswärme [J/kg],
 dm/dt – Sublimationsrate [kg/s], m_s – Masse der Probe [kg], c_v – spezifische Wärme [J/kgK],
 $\partial T/\partial t$ – Temperaturanstieg pro Zeit [K/s]

Bleibt die zugeführte Wärmemenge konstant, ist die Sublimationsrate abhängig vom Dampfdruckgefälle zwischen Produkt und Kondensator. Zusätzlich werden der flächennormierte Produkt- und Stopfenwiderstand berücksichtigt, der Kammerwiderstand kann vernachlässigt werden.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A_p (P_0 - P_c)}{R_p + R_s} \quad \text{Gl. 2-6}$$

dm/dt – Sublimationsrate [kg/s], A_p – Fläche Produkt [cm²], P_0 – Dampfdruck des Eises [Pa],
 P_c – Kammerdruck [Pa], R_p – Transportwiderstand des getrockneten Produkts [cm² Pa hr/g],
 R_s – Stopfenwiderstand [m²K/W]

Die Primärtrocknung ist der zeitintensivste Schritt bei der Gefriertrocknung. Um den Prozess effektiv zu gestalten, sollten die Temperaturen bei der Trocknung möglichst hoch sein, dabei aber die T_e oder T_g' nicht überschreiten. Die Temperatur an der Sublimationsoberfläche wird über den Kammerdruck bestimmt. Dieser wird barometrisch oder aus der Wärmeleitfähigkeit des Gases mittels Pirani-Vakuummeter ermittelt. Bei bekanntem Kammerdruck kann man näherungsweise über den Wasserdampfpartialdruck über dem Eis die Produkttemperatur schätzen. Die Temperatur bei verschiedenen Wasserdampfpartialdrücken ist in Abbildung 2-6 dargestellt [95].

| °C | mbar | Torr | °C | mbar | Torr |
|-----|----------|--------|------|------------------------|------------------------|
| 100 | 1,013.00 | 760.00 | -10 | 2.60 | 1.95 |
| 50 | 123.32 | 92.51 | -12 | 2.17 | 1.63 |
| 40 | 73.74 | 55.32 | -14 | 1.81 | 1.36 |
| 30 | 42.42 | 31.82 | -16 | 1.51 | 1.13 |
| 20 | 23.38 | 17.54 | -18 | 1.25 | 0.94 |
| 18 | 20.63 | 15.48 | -20 | 1.04 | 0.78 |
| 16 | 18.17 | 13.63 | -22 | 0.85 | 0.64 |
| 14 | 15.98 | 11.99 | -24 | 0.71 | 0.53 |
| 12 | 14.02 | 10.52 | -26 | 0.57 | 0.43 |
| 10 | 12.28 | 9.21 | -28 | 0.47 | 0.35 |
| 8 | 10.73 | 8.05 | -30 | 0.39 | 0.29 |
| 6 | 9.34 | 7.01 | -40 | 0.13 | 9.71×10^{-2} |
| 4 | 8.13 | 6.10 | -50 | 3.94×10^{-2} | 2.96×10^{-2} |
| 2 | 7.05 | 5.29 | -60 | 1.07×10^{-2} | 8.08×10^{-3} |
| 0 | 6.11 | 4.58 | -70 | 2.58×10^{-3} | 1.94×10^{-3} |
| -2 | 5.17 | 3.88 | -80 | 5.33×10^{-4} | 4.00×10^{-4} |
| -4 | 4.37 | 3.28 | -100 | 1.33×10^{-5} | 1.00×10^{-5} |
| -6 | 3.68 | 2.76 | -120 | 1.31×10^{-7} | 9.85×10^{-6} |
| -8 | 3.11 | 2.33 | -150 | 7.00×10^{-12} | 5.25×10^{-12} |

Abb. 2-6 Dampfdruck von Wasser bei verschiedenen Temperaturen [95]

Steigt die Temperatur während der Primärtrocknung über die eutektische Temperatur oder die Glasübergangstemperatur, kann dies zum Schmelzen oder Kollaps des Produkts führen.

Beim Schmelzen geht das gefrorene Gut an den wärmsten Stellen durch Temperaturerhöhung wieder in den flüssigen Zustand über. Das im Produkt enthaltene Gas, meist CO₂, kann unter Vakuum expandieren und steigt auf, dabei geben flüssige Bereiche des Systems nach und das Produkt bekommt an der Oberseite charakteristische Blasen. Dieses Phänomen wird auch Schäumen oder Frothing genannt. Das Frothing ist unerwünscht, da es zu Instabilitäten von Arzneistoffen, zum Beispiel zur Aggregation von Proteinen, führen kann.

Bei amorph erstarrten Systemen kann das Überschreiten der Kollapstemperatur T_c zu einem Zusammenbruch der Produktmatrix, dem so genannten Shrinkage oder Kollaps, führen. Als Kollapstemperatur T_c wird die Temperatur bezeichnet, bei der die Viskosität der amorphen Produktmatrix in der getrockneten Region unter Verlust ihrer porösen Struktur durch Erwärmen abnimmt [103]. Das Produkt geht vom glasförmigen in den flüssigen Zustand über und fließt zusammen. Jennings bezeichnet einen stark ausgeprägten Kollaps als Meltback [66]. Ein Kollaps kann lokal oder über die gesamte Produktmatrix

verteilt auftreten. Dies kann nicht nur zu einem unattraktiven Aussehen des Produkts sondern auch zu einem Wirkungsverlust bei Arzneistoffen und veränderten Lösungseigenschaften führen.

2.1.2.3 Sekundärtrocknung

Die Sekundärtrocknung dient der Entfernung von oberflächlich anhaftendem Wasser durch Desorption bei höheren Temperaturen und niedrigem Druck.

Bei kristallinen Produkten kann das Wasser als Hydrat-, Kristall oder oberflächlich gebundenes Wasser vorliegen, bei amorphen Systemen ist es in der Matrix gebunden. Geschwindigkeitsbestimmend sind bei kristallinen Gerüsten die Desorption und Verdampfung, bei amorphen Systemen die Diffusion der Wassermoleküle aus der amorphen Phase [96,104].

Zur Entfernung des molekular gebundenen Wassers wird deutlich mehr Energie als zur Sublimation des Eises benötigt. Daher werden bei der Sekundärtrocknung die Stellflächen im Vakuum so hoch erhitzt wie es das Trocknungsgut zulässt, beispielsweise bis auf 50°C. Die Trocknungsgeschwindigkeit ist anfangs hoch und nähert sich nach einiger Zeit einem Plateau an. Pikal zeigte, dass die Sekundärtrocknung bei amorphen Produkten mit hoher spezifischer Oberfläche schneller verläuft, als bei Produkten mit kleinerer Oberfläche. Er führt dies auf die, durch die große Oberfläche beschleunigte Diffusion von, im amorphen Feststoff gebundenem, Wasser zurück [104].

Der Restfeuchtegehalt wird durch die Dauer der Sekundärtrocknung bestimmt. Im Allgemeinen sollen Restfeuchten um 1 % erreicht werden, um eine optimale Stabilisierung des Produkts zu gewährleisten [140]. Für einige Produkte empfiehlt sich ein höherer Restfeuchtegehalt, wie zum Beispiel für virale Vakzine [56,107] oder andere Proteine, bei denen bestimmte dimerisierungsfähige Domänen durch eine Hydrathülle geschützt werden und so die Bildung von Assoziaten verhindert wird [76,89].

2.1.3 Atmosphärische Gefriertrocknung

Schon vor Jahrhunderten nutzten Menschen die Gefriertrocknung bei Atmosphärendruck zur Konservierung biologischer Strukturen. Beispiele dafür sind die Inkas, die diese Methode zur Haltbarmachung von Kartoffeln benutzten, indem sie daraus einen Brei herstellten, den sie in den Bergen einige Tage trocknen ließen. Die Bedingungen in den Anden, Temperaturen unter dem Gefrierpunkt und niedriger Luftdruck, sind dazu ideal. Bei den Wikingern, die ebenfalls unter trockenen, kalten Umweltbedingungen lebten, wurde die Gefriertrocknungstechnik zur Konservierung von Fisch benutzt. Der so genannte Stockfisch ist mehrere Jahre haltbar und war daher ein weit verbreitetes Nahrungsmittel während langer Seefahrten. Seit dem Mittelalter bis heute ist der leicht konservierbare Stockfisch vor allem in katholischen Mittelmeerländern eine beliebte Fastenspeise.

Die atmosphärische Gefriertrocknung wird im Gegensatz zur konventionellen Gefriertrocknung ohne das Anlegen von Vakuum durchgeführt. Der Trocknungsprozess besteht im Wesentlichen aus dem Einfrieren des Produkts und der Entfernung von Wasser in einem trockenen Gasstrom bei niedriger Temperatur. Die Trocknung des Gases kann entweder durch Zugabe von Absorbentien in das zu trocknende Gut oder durch Passieren eines Kondensators beziehungsweise einer mit Absorbentien gefüllten Kammer erreicht werden.

Meryman zeigte experimentell, dass die Entfernung von Wasserdampf von der Trocknungsfront durch die bereits trockene Zone des gefrorenen Produkts hauptsächlich vom Gradienten des Wasserdampfpartialdrucks und nicht vom Gesamtgasdruck des Systems abhängt [91].

Bei tiefen Temperaturen ist der Dampfdruck des Wassers sehr klein, wie in Abbildung 2-6 gezeigt. Daher ist die Geschwindigkeit mit der Wassermoleküle aus Eis in die Gasphase übergehen gering. Der Anteil Wassermoleküle, der pro Zeiteinheit in die Gasphase übergeht, hängt dabei nur vom umgebenden Dampfdruck ab. Werden diese Wassermoleküle aus der umgebenden Gasphase entfernt, können weitere Moleküle aus dem gefrorenen Produkt sublimieren.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Trocknung ist die als Massentransfer bezeichnete Diffusion von Wassermolekülen im trockenen Produkt und im umgebenden Gas [94]. Im Vergleich zur Vakuumgefriertrocknung wird der Prozess meist bei höheren Temperaturen um -10 °C durchgeführt, da Luft bei hohen Temperaturen mehr Feuchtigkeit aufnehmen kann [39].

Das Potential der Gefriertrocknung bei Atmosphärendruck liegt hauptsächlich in der Vereinfachung des Prozesses, der Reduktion der Kosten und der Energieersparnis [60,91,154]. Berechnungen von Claussen et al. zufolge beträgt bei atmosphärischer Gefriertrocknung der spezifische Energiebedarf für die Trocknung etwa 0,2 bis 0,7 kWh pro kg Wasser. Für die Vakuumgefriertrocknung müssen dagegen etwa 2,5 kWh oder mehr pro kg Wasser aufgewendet werden [39]. Verkürzte Prozesszeiten im Gegensatz zur Vakuumgefriertrocknung lassen sich hingegen nur bei geringer Schichtdicke der zu trocknenden Materialien erreichen [60,155]. Werden Absorbentien direkt in das zu trocknende Gut gegeben, was wegen der verkürzten Diffusionsstrecke sinnvoll ist, muss das Produkt später wieder vom Absorbens getrennt werden [98].

Neuere Veröffentlichungen zeigen, dass die Kombination von atmosphärischer Gefriertrocknung mit der Sprühgefrieretechnik eine geeignete Alternative für die Partikelherstellung mittels Gefriertrocknung darstellen kann. Durch das Versprühen wird ein Trocknungsgut mit minimaler Größe und Schichtdicke erhalten, das nur einen geringen Produktwiderstand aufweist. Vorteilhaft sind die kurzen Trocknungszeiten und die hohe Produktqualität des so erhaltenen Pulvers [94,115,149].

2.1.4 Sprühgefriertrocknung

Die konventionelle Gefriertrocknung von Lösungen oder Suspensionen in Vials oder Schalen führt zu festen, porösen und kuchenartigen Produkten. Für einige Anwendungen werden jedoch frei fließende Pulver mit bekannter Partikelgröße, Größenverteilung und Partikelmorphologie bevorzugt, die mit der konventionellen Gefriertrocknungstechnik nicht hergestellt werden können. Das

Verfahren der Sprühgefriertrocknung eröffnet zahlreiche Möglichkeiten zur Herstellung solcher Pulver, deren Eigenschaften durch Einstellen der Prozessbedingungen variiert werden können.

Der Sprühgefriertrocknungsprozess besteht aus den folgenden Schritten:

- Versprühen einer Lösung oder Suspension,
- Einfrieren in Flüssigkeiten oder Gasen mit Schmelz- oder Siedepunkten unter -100 °C
- Trocknung des gefrorenen Produkts durch Sublimation und Desorption

Für das Versprühen von Flüssigkeiten gibt es verschiedene Möglichkeiten, zum Beispiel mit Zweistoffdüsen, Tropfengeneratoren oder Ultraschalldüsen. Die Herstellungstechniken von Tropfen werden in Kapitel 2.2.1 erläutert.

Beim Einfrieren sind verschiedene Varianten möglich. Zum einen kann direkt in eine kryogene Flüssigkeit hineingesprüht werden, auch als „Spray-freezing into liquid“ bezeichnet [87,158]. Zum anderen kann das Einfrieren in einer gekühlten Gasphase, „Spray-freezing into vapour“ [149] oder im Gasraum über einer tiefkalten Flüssigkeit, „Spray-freezing into vapour over liquid“ [129] erfolgen. Eine weitere Möglichkeit ist das Aufsprühen auf einen gekühlten Zylinder, von dem die gefrorenen Tropfen anschließend abgekratzt werden [134]. Die anschließende Sublimationstrocknung kann entweder bei niedrigen Temperaturen im Vakuum oder unter Atmosphärendruck in einem Kaltluftstrom stattfinden.

Die Vorteile von sprühgefriergetrockneten Pulvern beruhen auf den stabilisierenden Effekten der Gefriertrocknung in Kombination mit den vielfältigen Möglichkeiten zur Modifizierung der Eigenschaften der Partikel und den daraus resultierenden Anwendungsmöglichkeiten. Mit Ausbeuten von über 90 % kann der Prozess der Sprühgefriertrocknung sehr effektiv sein [86].

Besonders im Bereich der biopharmazeutisch hergestellten Produkte wie Proteine ist diese Technik interessant. Eine Liste mittels Sprühgefriertrocknung hergestellter Pulver mit biotechnologischen Arzneistoffen findet man bei Maa und Costantino [86], darunter finden sich zum Beispiel monoklonale Antikörper, Wachstumsfaktoren und Enzyme. Das wichtigste Anwendungsgebiet für

biotechnologische Produkte sind Parenteralia, die nach Rekonstitution subkutan, intramuskulär oder intravenös verabreicht werden können.

Mit dem ProLease[®]-Verfahren können aus empfindlichen biotechnologischen Arzneistoffen verlängert freisetzende Mikrokapseln mit bioabbaubaren Polymeren hergestellt werden [139]. Dabei wird der Wirkstoff zur Stabilisierung sprühgefriergetrocknet und dann zu Mikropartikeln verarbeitet.

Sprühgefriergetrocknete Partikel mit hoher Porosität und geringer Dichte können ähnlich wie die bekannten „Large Porous Particles“ [50], die durch Mikroverkapselung hergestellt werden, zur Inhalation verwendet werden [87,135,146]. Eine Anwendungsmöglichkeit für Partikel mit hoher Dichte ist die intradermale Applikation mit nadelfreien Injektionssystemen [85,113,129].

Eine weitere Möglichkeit zur Anwendung des Verfahrens besteht in der Verbesserung der Löslichkeit von schwerlöslichen Arzneistoffen durch die Herstellung von porösen Partikeln mit großer Oberfläche [64,114].

2.2 Verfahrenstechniken zur Tröpfchenlyophilisation

Tröpfchenlyophilisate sind kleinteilige gefriergetrocknete Produkte, die aus Einzelpartikeln bestehen. In dieser Arbeit wurden 2 Typen dieser Lyophilisate entwickelt: Trägerlyophilisate und Sphärolyophilisate. Trägerlyophilisate werden durch Auftropfen auf einen Träger, vakuuminduziertes Einfrieren oder Einfrieren über flüssigem Stickstoff und anschließende konventionelle Gefriertrocknung hergestellt. Trägerlyophilisate wurden zur Anwendung am Auge entwickelt, das Tropfenvolumen entspricht daher dem Dosiervolumen handelsüblicher Augentropfen, das sind ca. 25 bis 60 μL [65]. Bei den Sphärolyophilisaten ist der Herstellungsvorgang komplexer. Hierbei werden zunächst Tropfen durch Versprühen erzeugt, in einem kalten Gas eingefroren, aufgefangen und gefriergetrocknet oder bei kontinuierlicher Herstellung direkt nach dem Einfrieren gefriergetrocknet und anschließend vom Trägergas abgetrennt. Der optimale Durchmesser der Sphärolyophilisate hängt von der Anwendung ab. Für die Anwendung am Auge sind Durchmesser von etwa 100 bis 500 μm zweckmäßig.

2.2.1 Tropfenerzeugung durch Versprühen

Das Herstellen feiner Tropfen aus Flüssigkeiten in einer umgebenden Gasphase bezeichnet man allgemein als Zerstäuben. Das Zerstäuben führt zur Vergrößerung der Oberfläche der versprühten Flüssigkeit. Für die Trocknung bedeutet dies eine Verbesserung von Stofftransport und Wärmeübertragung. Versprüht werden können Lösungen, Suspensionen, Emulsionen oder Schmelzen. In der Pharmazie gibt es zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten der Sprühtechnik, wie zum Beispiel beim Coaten und Dragieren, beim Granulieren oder beim Sprühtrocknen.

Je nach Art der Energiezufuhr für die Tropfenerzeugung unterteilt man verschiedene Arten von Zerstäubern in Einstoffdüsen, Zweistoffdüsen, rotierende Scheiben, Ultraschallzerstäuber, elektrostatische Zerstäuber, Tropfengeneratoren und Zerstäuber, bei denen verschiedene Wirkungsweisen kombiniert sind. Die Eigenschaften eines Sprühs werden durch die gewählte Düse festgelegt. Welche Eigenschaften der Sprüh aufweisen muss, zum

Beispiel Tropfengröße, Flüssigkeitsdurchsatz und Tropfengeschwindigkeit, hängt von der jeweiligen Aufgabenstellung ab.

Vom Strömungszustand wird bestimmt auf welche Art die Flüssigkeit zerteilt wird. Bei rohrförmigen Düsen werden dabei mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit die Mechanismen Auslaufen, Abtropfen, Zertropfen, Zerwellen und Zerstäuben unterschieden, siehe Abbildung 2-7 [148]. Auf der Abszisse ist der Einfluss der Oberflächenspannung der Flüssigkeit unter Berücksichtigung von Flüssigkeitsdichte, Rohrdurchmesser und Viskosität dargestellt. Auf der Ordinate ist die Reynoldszahl Re zur Charakterisierung der Strömung aufgetragen. Die Reynoldszahl ist eine dimensionslose Kennzahl und beschreibt das Verhältnis von Trägheitskräften zur Flüssigkeitsviskosität.

$$Re = \frac{v \cdot \rho \cdot d}{\eta} \quad \text{Gl. 2-7}$$

Re – Reynoldszahl, v – Strömungsgeschwindigkeit [m/s], ρ – Dichte der Flüssigkeit [g/cm³],
 d – Rohrdurchmesser [m], η – dynamische Viskosität [Pas]

Die im Diagramm dargestellte Grenze bei $Re=2300$ entspricht in rohrförmigen Systemen dem Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung.

Mit zunehmender Oberflächenspannung bzw. σ^* , dem quadratischen Kehrwert der Ohnesorge-Zahl, ist zur Erzeugung der jeweiligen Zerfallsform, die in Abbildung 2-7 mit „a“ bis „e“ bezeichnet sind, eine höhere Ausströmgeschwindigkeit bzw. Reynoldszahl notwendig.

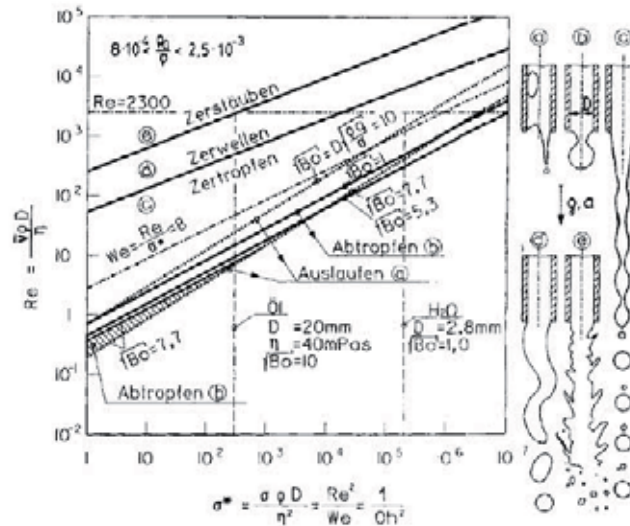


Abb. 2-7 Strömungszustände an rohrförmigen Düsen: a - Auslaufen, b - Abtropfen, c - Zertropfen, d - Zerwellen, e – Zerstauben (v – Strömungsgeschwindigkeit, ρ – Dichte, D – Rohrdurchmesser, σ^* – quadratischer Kehrwert der Ohnesorge-Zahl, σ – Oberflächenspannung, η – Viskosität, Re – Reynolds-Zahl, We – Weber-Zahl, Oh – Ohnesorge-Zahl, Bo – Bond-Zahl) [148]

Weitere physikalische Größen, die bei der Tropfenbildung eine Rolle spielen, werden neben der Reynoldszahl durch die Ohnesorge-Zahl und die Weber-Zahl charakterisiert. Die Ohnesorge-Zahl ist eine dimensionslose Kenngröße und gibt das Verhältnis der Zähigkeit eines Fluids zu den Oberflächenkräften an:

$$Oh = \frac{\eta}{\sqrt{\sigma \cdot \rho \cdot d}} \quad \text{Gl. 2-8}$$

Oh – Ohnesorge-Zahl, v – Strömungsgeschwindigkeit [m/s], ρ – Dichte der Flüssigkeit [g/cm³], d – Rohrdurchmesser [m], η – dynamische Viskosität [Pas]

Die Weber-Zahl ist ebenfalls dimensionslos und beschreibt das Verhältnis der an den Tropfen angreifenden Trägheitskräften zu den Oberflächenkräften:

$$We = \frac{v^2 \cdot \rho \cdot d}{\sigma} \quad \text{Gl. 2-9}$$

We – Weber-Zahl, v – Strömungsgeschwindigkeit [m/s], ρ – Dichte der Flüssigkeit [g/cm³], d – Rohrdurchmesser [m], σ – Oberflächenspannung [Nm⁻¹]

2.2.1.1 Tropfengrößenverteilungen

Ein wichtiges Ziel bei der Herstellung von Tröpfchenlyophilisaten ist es, Produkte mit einer möglichst engen Teilchengrößenverteilung zu erhalten. Daher werden in den nächsten beiden Abschnitten zunächst die grundlegenden Mechanismen für das Abtropfen und den laminaren Strahlzerfall sowie das

Inkjet-Prinzip als gewählte Methoden zur Erzeugung monodisperser Tropfen beschrieben.

Abtropfen und laminarer Strahlzerfall

Beim Abtropfen und beim laminaren Strahlzerfall (Zertropfen, siehe Abbildung 2-7 „c“) werden Tröpfchenkollektive mit engen Größenverteilungen erhalten. Das Abtropfen ist die einfachste Variante zur Tropfenerzeugung. Die Tropfen werden gebildet, wenn sich ein Gleichgewicht zwischen Kapillarkraft und Gravitation eingestellt hat, dies tritt nur bei langsamen Flüssigkeitgeschwindigkeiten auf. Bei höherem Flüssigkeitsdurchsatz entsteht nach Austritt aus einer Kapillare zunächst ein zylindrischer Flüssigkeitsstrahl. An der Oberfläche des Flüssigkeitsstrahls bilden sich zentralsymmetrische Oberflächenwellen aus, die den Strahl destabilisieren und zum Zerfall in einzelne Tropfen führen [148].

Nach Rayleigh beträgt die optimale Störwellenlänge, bei der ein Flüssigkeitsstrahl am schnellsten zerfällt, das 4,51-fache des Düsendurchmessers [111]. Beim Austreten des Flüssigkeitsstrahls hat dieser denselben Durchmesser wie die Düse. Beim Zerfall des Strahls werden Einzeltropfen aus Flüssigkeitszylindern gebildet, deren Höhe einer Störwellenlänge entspricht. Setzt man deren Volumina gleich, so ergibt sich für den Tropfendurchmesser ungefähr das Doppelte wie für den Düsendurchmesser, siehe Gleichungen 2-10 und 2-11:

$$\frac{\pi}{4} \cdot d_s^2 \cdot 4,51 \cdot d_D = d_T^3 \cdot \frac{\pi}{6} \quad \text{Gl. 2-10}$$

$$1,89 \cdot d_D = d_T \quad \text{Gl. 2-11}$$

d_s – Strahldurchmesser [μm], d_D – Düsendurchmesser [μm], d_T – Tropfendurchmesser [μm]

In der Praxis entstehen zwischen den Einzeltropfen auch kleinere Satellitentropfen. Um dies zu vermeiden, kann man den Strahl durch gezielte Schwingungsanregung oder durch pulsirtes Abtropfen aus der Düse so modulieren, dass nahezu monodisperse Tropfen entstehen [156].

Zur Beurteilung der Breite der Partikelgrößenverteilung dient der so genannte Span-Faktor [156]. Je näher er an 0 liegt, desto enger ist die Verteilung. Ganz besonders bevorzugt sind Span-Faktoren kleiner als 0,1.

$$b = \frac{x_{90} - x_{10}}{x_{50}} \quad \text{Gl. 2-12}$$

b – Span-Faktor, x_n – volumenbezogener Durchmesser bei dem n % der Verteilung unter diesem Durchmesser liegen ($n=10, 50, 90$) [μm]

Für logarithmisch normalverteilte Partikelgrößenfunktionen dient die geometrische Standardabweichung σ_g (Gleichung 2-13) zur Abschätzung der Dispersität. Meist wird eine Verteilung als monodispers bezeichnet, deren geometrische Standardabweichung einen Wert von 1,2 nicht übersteigt [68].

$$\sigma_g = e^{\sigma_x} \quad \text{Gl. 2-13}$$

σ_g – geometrische Standardabweichung, σ_x – Standardabweichung der logarithmierten Ausgangswerte y ($x=\ln y$)

Nach Definition des VDI (Verein Deutscher Ingenieure, Guideline 3491, [34]) werden Tropfenkollektive als monodispers bezeichnet, wenn sie die Voraussetzung nach Gleichung 2-14 erfüllen:

$$\frac{d_a - d_m}{d_m} < 0,1 \quad \text{Gl. 2-14}$$

d_a – mittlerer anzahlbezogener Durchmesser [μm], d_m – mittlerer massenbezogener Durchmesser [μm]

Ink-Jet Technologie

Das Prinzip des Strahlzerfalls durch Anregung eines Fluids mit Piezoelementen wird schon seit Beginn der 70-er Jahre beim Drucken in der Inkjet-Technologie genutzt. Generell unterscheidet man zwei verschiedene Grundtechniken.

Beim Continuous-Jet-Verfahren werden in einer unter hohem Druck stehenden Flüssigkeit hochfrequente Druckwellen erzeugt, sodass der Strahl nach Austreten aus der Düse nach dem Rayleigh - Prinzip in einzelne Mikrotröpfchen zerfällt (siehe Abbildung 2-8a). Nicht alle Tropfen des erzeugten Strahls sollen das Papier erreichen, daher wird die Tropfenkette aufgeladen und einzelne

Tropfen durch ein elektrisches Feld abgelenkt. Nicht benötigte Tinte wird wieder zurückgeführt.

Das durch den Einsatz in haushaltsüblichen Tintendruckern bekannte Drop-on-Demand-Verfahren (DoD) dient zur Erzeugung von Einzeltropfen. Bei diesem Verfahren regt man eine Flüssigkeitssäule mit Piezoaktuatoren an. Die erzeugten Druckwellen breiten sich in einem Kanal aus und durch Überdruck werden die Tröpfchen aus einer Düse ausgestoßen (Abbildung 2-8b). Alternativ dazu kann der Tropfenausstoß auch durch thermische, elektrostatische oder akustische Anregung der Flüssigkeit ausgelöst werden [59,79].

Beide Techniken eignen sich zur Herstellung monodisperser Tropfenkollektive. Beim Continuous-Jet-Verfahren werden hohe Frequenzen (um 100 kHz) eingesetzt, der Tropfendurchmesser ist, entsprechend der Theorie von Rayleigh, ungefähr doppelt so groß wie der Düsendurchmesser. Im Gegensatz dazu werden beim DoD-Verfahren niedrigere Frequenzen von bis zu 2 kHz verwendet, die entstehenden Tropfen können unter besonderen Bedingungen sogar kleiner als der Düsendurchmesser sein [157].

Um ein scharfes Druckbild zu erreichen, sind die Flugstrecken der Tröpfchen beim Tintenstrahldruck so kurz, dass sie durch die Luft kaum abgebremst werden. Das ist bei der Herstellung von Sphärolyophilisaten anders, wo ausreichend lange Flugstecken erforderlich sind, um die Tröpfchen vor dem Auftreffen einzufrieren.

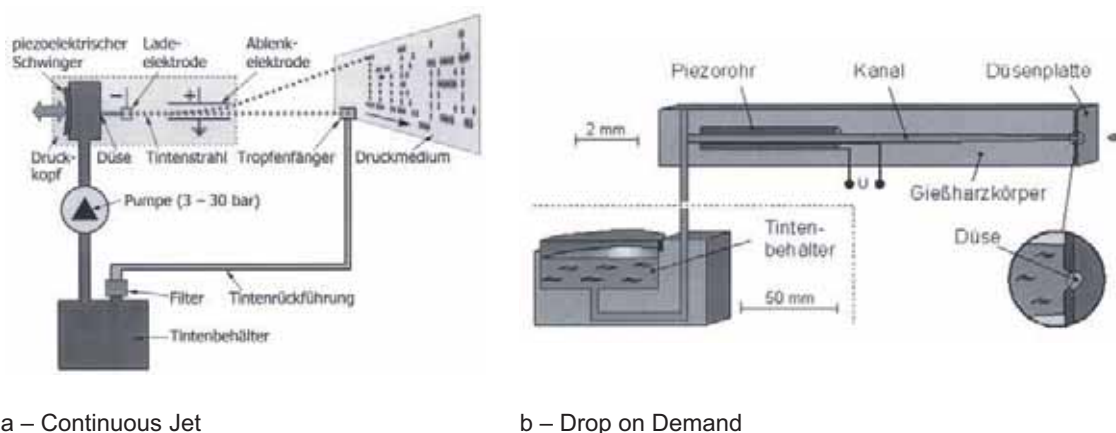


Abb. 2-8 Mechanismen der Tropfenerzeugung in der Inkjet-Technologie [150]

Ein grundlegendes Problem bei der Verwendung von Tropfengeneratoren ist, dass die erzeugten Mengen des versprühten Guts sehr gering sind und daher für industrielle Anwendungen nicht besonders attraktiv erscheinen. Zur Erhöhung des Durchsatzes können mehrere Tropfengeneratoren zu einem Sprühkopf zusammengefasst werden oder mehrere Düsen mit einem Generator betrieben werden. INOTECH (INOTECH Biotechnologies Ltd., CH-Basel) bietet eine Verkapselungsmaschine mit bis zu 100 zusammengeschalteten Düsen und Durchflussraten von 1 bis 100 L/h bei Partikelgrößen von 0,5 bis 3 mm an [18]. Brenn et al. entwickelten einen Tropfengenerator, dem eine Düsenplatte mit 62 Laserbohrungen ($d=63\ \mu\text{m}$) vorgesetzt wird, die maximale Durchflussrate konnte so auf 13,7 L/h erhöht werden [34]. Die Düsenplatte muss hinsichtlich ihres Designs auf den Durchmesser, die räumliche Anordnung und Ausrichtung der Laserbohrungen abgestimmt sein.

Die Größe der erzeugten Tröpfchen ist sowohl von den Betriebsbedingungen der verwendeten Düse, wie Durchmesser, Durchflussrate und Anregungsfrequenz des Piezokristalls, als auch von den Eigenschaften der Flüssigkeit, wie Viskosität und Oberflächenspannung abhängig. Von besonderem Interesse ist die Herstellung besonders kleiner Partikel, deren Durchmesser wenige Mikrometer beträgt. So können wirkstoffhaltige Partikel produziert werden, die direkt als inhalative Arzneiformen eingesetzt werden.

Die einfachste Methode kleinere Tropfen zu erhalten ist die Verkleinerung der Düse. Eine Verringerung des Düsendurchmessers ist aber nicht unbegrenzt möglich, da mit sinkender Düsengröße auch die Verstopfungsgefahr und Zerbrechlichkeit steigt und hochviskose Medien nicht mehr gefördert werden können. Chen und Basaran haben die Einflüsse verschiedener Signalformen zur Ansteuerung ringförmiger Piezos bei Kapillardüsen (DoD-Prinzip) auf die Tropfenbildung untersucht und festgestellt, dass Unterschiede in der Geschwindigkeitsverteilung der Flüssigkeit innerhalb der Düse auftreten können [36]. Mit bestimmten Wellenprofilen lassen sich Tropfen ausformen, die kleiner sind als die Kapillare, allerdings nur für einen engen Viskositätsbereich der verwendeten Flüssigkeit. Bei einem Düsendurchmesser von 70 μm erreichten sie Tropfendurchmesser von nur 32 μm . Rensch (MicroFab Technologies, Inc.)

testete erfolgreich bekannte Signalformen mit einem eigens entwickelten Signalgenerator zur Umsetzung komplexer Wellenformen, bemerkt aber auch, dass eine optimale Tropfenbildung nur unter sehr eingeschränkten Bedingungen, je nach Düse und Flüssigkeit, möglich ist [112]. Bei Verwendung einer Kapillare (DoD) mit 30 µm Durchmesser konnte die Tropfengröße auf 10 bis 20 µm reduziert werden.

Aufgrund der höheren Flüssigkeitsdurchsätze bietet sich das Continuous-Jet-Verfahren für kontinuierliche Prozesse wie zum Beispiel für die Sprühtrocknung an. Hingegen ist das DoD-Prinzip besser geeignet, wenn besonders kleine Tropfen erzeugt werden sollen.

In der pharmazeutischen Forschung werden Tropfengeneratoren bisher nur vereinzelt eingesetzt. Generell möglich sind die Verwendung zur Erzeugung von monodispersen Aerosolen oder die gezielte Einzeldosierung flüssiger Produkte. Bei Patel et al. wird der Einsatz von Tropfengeneratoren zur Herstellung von Lactosepartikeln gleicher Größe in der Sprühtrocknung beschrieben [100]. Die von den Autoren als „hybrid spray-drying“ bezeichnete Technik kann zur Produktion von Partikeln mit einheitlichen Eigenschaften im Mikro- oder Nanometerbereich eingesetzt werden. Die Modellierung von Trocknungskinetiken für die Prozessentwicklung kann vereinfacht werden, weil nur eine Tropfengröße und Flugbahn betrachtet werden müssen [101].

Die Firma INOTECH (INOTECH Biotechnologies Ltd., CH-Basel) nutzt den gesteuerten Tropfenzerfall zum Verkapseln von Zellen, Mikroorganismen, Enzymen und Arzneistoffen in mikropartikuläre Form durch Versprühen einer Suspension in eine Härtelösung [18]. Die erzeugten Partikel in der Tropfenkette können zusätzlich aufgeladen werden und werden dann durch Anlegen eines elektrischen Felds in verschiedene Richtungen verteilt, um Kollisionen einzelner Tropfen während des Flugs zu vermeiden. Auch bei Taylor ist das Inkjet-Tropfengefrieren als Strategie zur Formulierung komplexer biologischer Materialien wie Viren, Plasmide, Liposomen, DNA-Polymer-Komplexe oder ganzer Zellen in der Biotechnologie beschrieben [141].

Bei Antohe und Wallace werden weitere Möglichkeiten zur Nutzung der Inkjet-Technologie in der Pharmakotherapie aufgezeigt [24]. Beschrieben werden das

Aufbringen wirkstoffhaltiger Überzüge auf Stents zur Implantation in Gefäße bei Herzoperationen, die Herstellung bioabbaubarer Mikropartikel für die Tumortherapie, die Fertigung künstlicher Nervenbahnen mit Wachstumsfaktoren und die Wirkstoffbeschickung von Mikronadeln in transdermalen Pflastern.

2.2.2 Einfrieren

Auf das Einfrieren, als erstem Verfahrensschritt bei der Gefriertrocknung, wurde bereits in Kapitel 2.1.2.1 eingegangen. In diesem Abschnitt werden daher die Besonderheiten beim Einfrieren von Tröpfchen, auch im Vergleich zu Lösungen in Vials, sowie die verwendeten Einfrierverfahren beschrieben.

Für die Meteorologie ist das Einfrieren von Tropfen von großer Bedeutung und wird seit einigen Jahrzehnten untersucht, es ist aber nicht klar, inwiefern dies auf pharmazeutische Problemstellungen übertragbar ist.

Zunächst wird der physikalische Vorgang des Einfrierens eines Tröpfchens in einem kalten Gas erläutert. Nach Hindmarsh et al. [62] können dabei fünf Phasen unterschieden werden:

1. Abkühlen und Unterkühlung der Lösung
2. Nukleation
3. Wärmefreisetzung (Rekaleszenz)
4. Einfrieren
5. Abkühlen des Feststoffs

Zur Verdeutlichung wird in Abbildung 2-9 der Temperatur-Zeit-Verlauf beim Einfrieren eines Tropfens mit den einzelnen Phasen gezeigt.

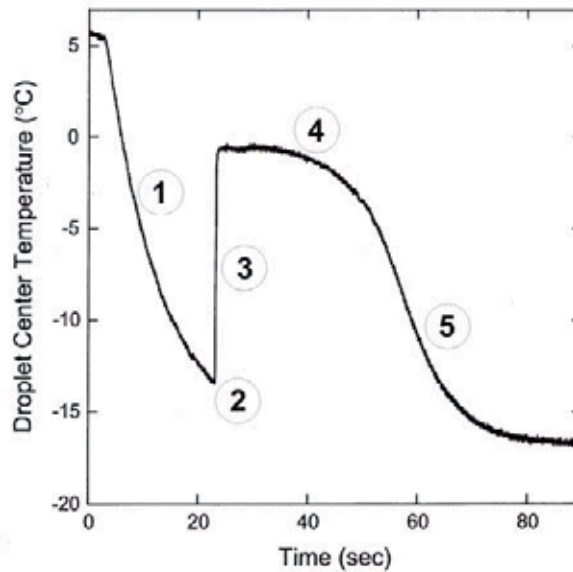


Abb. 2-9 Temperaturverlauf beim Einfrieren eines Tropfens 20 %-iger Saccharoselösung in einem -16 °C kalten Luftstrom [62]

Zunächst wird die Flüssigkeit unter den Gefrierpunkt abgekühlt. Nach der spontanen Bildung von Nukleationskeimen wird schnell relativ viel Wärme freigesetzt, Eiskristalle wachsen und die Lösung friert durch. Der Tropfen gefriert weiter und gibt dabei Wärmeenergie an seine Umgebung ab bis er vollständig durchgefroren ist. Während des Gefriervorgangs bleibt seine Temperatur weitgehend konstant. Danach kühlt der feste Tropfen ab bis er die Umgebungstemperatur erreicht.

2.2.2.1 Nukleation in Tröpfchen

Wie schon in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben, wird der Einfriervorgang durch homogene oder heterogene Nukleation ausgelöst. Für diesen Zusammenhang ist von Bedeutung, an welcher Stelle die Nukleation bei einem Tröpfchen zuerst stattfindet.

Für die homogene Nukleation werden drei unterschiedliche Möglichkeiten diskutiert:

- Die Nukleation beginnt im Inneren des Tröpfchens und die Eiskristalle wachsen von dort aus nach außen [48,70].
- Der Nukleationsvorgang findet an der Oberfläche des Tropfens statt und die Eiskristalle wachsen von außen nach innen [136].

- Das Gefrieren beginnt im Tropfeninneren, dann wird eine Eisschicht über der gesamten Tropfenoberfläche ausgebildet, von der aus der Tropfen radial von außen nach innen durchfriert [49,108].

Die Einfrierrate für Tropfen hängt von der Anzahl kritischer Keime, die pro Zeiteinheit gebildet werden, der Nukleationsrate, ab. Die Bestimmung der Nukleationsrate soll Aufschluss darüber geben, ob der Prozess im Tropfeninneren stattfindet, also volumenabhängig ist, oder an der Oberfläche beginnt. Zur Untersuchung dieser Phänomene wurden Messungen an einzelnen oder Kollektiven von Wassertröpfchen bei Temperaturen von -30 bis -40 °C vorgenommen und die Nukleationsrate bestimmt. Krämer et al. sowie Duft und Leisner fanden, dass die Nukleationsrate einzelner Wassertropfen proportional zum Flüssigkeitsvolumen ist und folgerten, dass die Nukleation im Tropfeninneren stattgefunden haben muss [48,70]. Tabazadeh et al. kommen zu anderen Ergebnissen und schließen daraus, dass die Nukleation bevorzugt an der Oberfläche des Tropfens stattfindet [136]. Die dritte Möglichkeit wird bei Dye und Hobbs sowie Pruppacher und Klett beschrieben [49,108]. Demnach friert ein geringer Wasseranteil im Tropfeninneren und setzt Bindungswärme frei. Dabei wird die Temperatur des Tropfens auf 0 °C angehoben und eine dünne Eisschicht bildet sich an der Tropfenoberfläche, die in Kontakt zur kalten Umgebung steht, aus. Danach friert der Tropfen radial von außen nach innen, wobei die Geschwindigkeit, mit der dieser Prozess fortschreitet, davon abhängig ist, wie gut die entstehende Bindungswärme an die Umgebung abgegeben werden kann.

Bei der heterogenen Nukleation ist das Einfrieren davon abhängig, ob sich der Nukleationskeim bereits im Tröpfchen befindet oder aus der Umgebung mit dem Tropfen in Wechselwirkung tritt. Die Nukleation setzt dabei abhängig vom Ort des Keims ein. Nukleationskeime an der Tropfenoberfläche wirken effektiver als im Tropfen suspendierte Teilchen [105]. Die heterogene Nukleation ist für pharmazeutische Zusammenhänge wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung, da bei sterilfiltrierten Lösungen in keimfreier Umgebung das Auftreten von Kristallkeimen weitgehend ausgeschlossen wird. Im Zusammenhang mit der Sprühgefriertrocknung ist das Problem bisher nicht untersucht worden.

Selbst für das einfache Modell eines Wassertropfens ist der Prozess der Eiskristallbildung in einem unterkühlten Tropfen noch nicht ganz verstanden. An einem pharmazeutisch relevanten System wurde der Vorgang von Hindmarsh et al. untersucht, dazu wurden Video- und Magnetresonanzbilder einer gefrierenden Saccharoselösung (20 % m/m, Tropfendurchmesser 2 mm) aufgenommen [62]. Auf den Bildern ist zu erkennen, dass die Nukleation, erkennbar als weiße Fläche, im unteren Segment des Tropfens beginnt und von dort aus radial nach außen hin fortschreitet (Abbildung 2-10). Inwiefern dies auf Tropfen anderer Zusammensetzung und Größe übertragbar ist, bleibt fraglich.

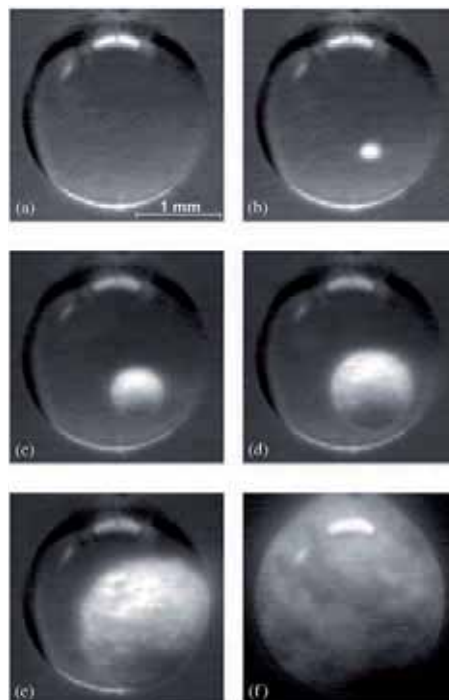


Abb. 2-10 Videobilder eines Tropfens 20 %-iger Saccharoselösung: Rekaleszenzstadium (Tropfen an Glasfilament in -25 °C kaltem Luftstrom, 0,2 s Zeit zwischen den Einzelbildern) [62]

Messtechnisch sind Temperaturgradienten in Tropfen schwer zu erfassen. Bei der Verwendung invasiver Methoden, zum Beispiel beim Einbringen von Temperatursensoren, wird der Einfriervorgang durch das Messgerät verändert. Nichtinvasive Methoden wie IR-Messungen erfassen nur die Oberfläche der Tropfen. Optische Methoden liefern zwar Ergebnisse über Vorgänge im Inneren des Tropfens, sind aber wiederum nicht quantitativ.

2.2.2.2 Wärmeübergänge beim Einfrieren

Energetisch lässt sich der Einfrierprozess grob in mehrere Teilvorgänge zerlegen. Im ersten Schritt wird Wärme vom Gefriergut auf das umgebende kältere Gas übertragen, dadurch wird das Gut abgekühlt. Die Wärmemenge pro Zeit ist dabei nach Gleichung 2-15 abhängig von der Temperaturdifferenz zwischen Gut und Umgebung sowie der Oberfläche und dem Wärmeübergangskoeffizienten:

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = K \cdot A \cdot \Delta T \quad \text{Gl. 2-15}$$

$\Delta Q/\Delta t$ – Wärmemenge pro Zeit [J/s], K – Wärmeübergangskoeffizient [W/m²K],
 A – Oberfläche [m²], ΔT – Temperaturdifferenz von Gut zur Umgebung [K]

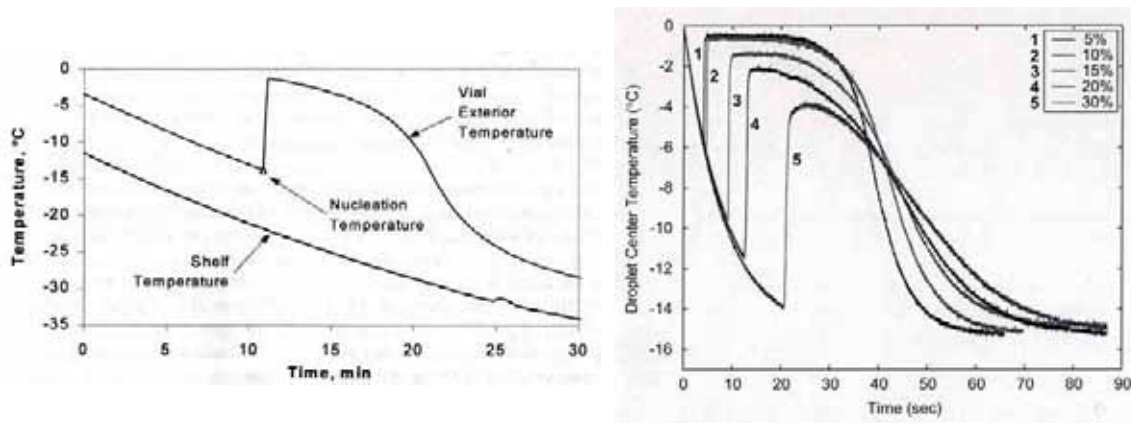
Im zweiten Schritt wird Umwandlungswärme durch die Nukleation und die Kristallisation frei:

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = K \cdot A \cdot \Delta T + Q_n + Q_c \quad \text{Gl. 2-16}$$

$\Delta Q/\Delta t$ – Wärmemenge pro Zeit [J/s], K – Wärmeübergangskoeffizient [W/m²K],
 A – Oberfläche [m²], ΔT – Temperaturdifferenz von Gut zur Umgebung [K],
 Q_n – Nukleationswärme [J/s], Q_c – Kristallisationswärme [J/s]

Diese muss wiederum in die Umgebung abgeführt werden. Sind die Nukleation und Kristallisation abgeschlossen, wird der entstandene Feststoff weiter gekühlt. Wenn man statt Wärmeübergängen Temperaturveränderungen betrachtet, müssten die spezifische Wärme der Flüssigkeit und des Eises berücksichtigt werden, die jedoch wiederum temperaturabhängig ist.

Im Vergleich zu Lösungen in Vials, setzt die Nukleation beim Einfrieren von Tröpfchen schon nach kurzer Zeit ein und der Einfriervorgang schreitet schnell fort. In Abbildung 2-11 sind beispielhaft experimentell ermittelte Temperaturverläufe beim Einfrieren einer Lösung im Vial auf der Stellfläche eines Gefriertrockners und von Lösungstropfen unterschiedlicher Konzentration in einem kalten Luftstrom aufgezeigt.



a –Vial [120]

b – Tropfen [63Zahlen ergänzt]

Abb. 2-11 Zeitlicher Verlauf des Einfrierens von Lösungen [a: 10 %-ige Hydroxyethylstärkelösung, $V = 2 \text{ mL}$ (in 5 mL Vial); b: 5 – 30 %-ige Saccharoselösung, $V = 2 \mu\text{L}$ ($R = 0,78 \text{ mm}$), $T = -15 \text{ }^\circ\text{C}$, $v = 0,42 \text{ m/s}$, Nukleationskeim Silberiodid]

Beim konventionellen Einfrieren muss neben dem Einfriervorgang der Lösung zusätzliche Zeit für die Wärmeübertragung zwischen Stellfläche und Vial aufgewendet werden. Die Anfangstemperatur der Stellfläche wird von der Lösung im Vial erst nach ca. 10 Minuten erreicht [120]. Bei einem Tröpfchen wird ebenfalls Zeit zur Wärmeübertragung von der Umgebung auf die Tropfenoberfläche benötigt, jedoch läuft dieser Vorgang wesentlich schneller ab als bei Vials. Das wird auch für den Einfriervorgang von Trägerlyophilisaten angenommen, da die Trägermembran nur wenige Millimeter dick ist. Betrachtet man den Gefriervorgang im Vial, dauert dieser weitere 10 Minuten, während bei den Tropfen das Einfrieren nach wenigen Sekunden abgeschlossen ist.

2.2.2.3 Einfrieremethoden für Tröpfchenlyophilisate

Die Besonderheit von Träger- und Sphärolyophilisaten ist, dass es sich im Gegensatz zu Flüssigkeiten in Vials um sehr geringe Flüssigkeitsmengen handelt. Daher können hier Einfrierverfahren zum Einsatz kommen, die für größere Mengen Liquida nicht geeignet sind.

Eine einfache Methode ist das Einfrieren in der Gasphase über flüssigem Stickstoff. Durch die tiefen Temperaturen wenige Grad über dem Siedepunkt von Stickstoff kann das zu trocknende Gut in sehr kurzer Zeit eingefroren werden. Zum Einfrieren von Aerosoltröpfchen wird diese Methode auch eingesetzt. Da man die Tröpfchen nicht separat auffangen kann, werden sie meist direkt in flüssigen Stickstoff eingesprüht, was in der Literatur auch als

„Spray freezing into liquid“ bezeichnet wird. Zum Einfrieren von Sprays bietet sich das auch „Spray freezing into vapour“ genannte Einfrieren in einem kalten Trägergas an. Damit die versprühte Flüssigkeit schnell erstarrt, muss die Temperatur des Gases sehr gering sein. Verschiedene Autoren geben dafür Temperaturen von -65 bis unter -100 °C an [101,106,149]. Dies erreicht man zum Beispiel mit flüssigem Stickstoff als Kühlmittel.

Zur Herstellung von Trägerlyophilisaten eignet sich auch das Verfahren des vakuuminduzierten Einfrierens. Beim so genannten snap-freezing wird dem Produkt durch Anlegen von Vakuum zuerst Verdampfungs- und dann, nach Einfrieren der Tropfenoberfläche, Sublimationswärme entzogen. Dadurch kommt es bei kleinen Flüssigkeitsvolumina zur Abkühlung des gesamten Gutes unter die T_e oder T_g' und somit zum Gefrieren [66]. Sind in der zu trocknenden Flüssigkeit Gase enthalten, können diese jedoch zum Aufschäumen führen. Außerdem ist es möglich, dass das Verdampfen von Wasser zur Gefrierkonzentration im Produkt führt.

Beim Einfrieren über flüssigem Stickstoff, in einem kalten Trägergas sowie beim snap freezing sind die Einfriergeschwindigkeiten sehr groß. Die Einfrierdauer kann dadurch auf wenige Sekunden bis Minuten reduziert werden. Schnelle Einfrierverfahren bieten außerdem den Vorteil, dass die Gefrierkonzentration und Phasentrennung im Gut minimiert werden [52,98]. Neben der Entstehung kleiner Eiskristalle wird jedoch auch die Bildung amorpher glasartiger Bereiche gefördert, sodass bei Lösungen in Vials die zunächst hohe Trocknungsgeschwindigkeit durch den zunehmenden Widerstand des feinporigen Produkts mit der Zeit abnimmt [116]. Wegen der geringen Schichtdicke ist dies für Tröpfchenlyophilisate wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung.

Das Einfrierverhalten von Trägerlyophilisaten mit verschiedenen Methoden ist bereits untersucht worden. Weichselbaum hat die Einfriergeschwindigkeiten bei verschiedenen Einfrierverfahren bestimmt [151]. Sowohl beim Einfrieren über Trockeneis als auch über flüssigem Stickstoff konnten schnelle Einfrierraten von mehr als 20 °C/min erzielt werden. Über Trockeneis wurden Einfrier-temperaturen von -20 °C nach ca. 3 Minuten, über flüssigem Stickstoff schon

nach ca. 30 Sekunden erreicht. Maier und Krasichkova setzten in speziell gefertigten Gefriertrocknungsapparaturen das vakuuminduzierte Einfrieren erfolgreich zur Herstellung von OLCS ein [74,88]. Die Einfrierzeit für Flüssigkeitsmengen von 25 μ L betrug je nach Evakuierungsgeschwindigkeit 3 bis 13 min.

2.2.3 Trocknung

Die Mechanismen der Primär- und Sekundärtrocknung wurden bereits in den Kapiteln 2.1.2.2 und 2.1.2.3 behandelt.

Die Trocknungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Schichtdicke des zu trocknenden Gutes. Die Zeitdauer, die zur Trocknung des jeweiligen Produkts benötigt wird, nimmt in der aufgeführten Reihenfolge ab:

- Gefriertrocknung in Vials, dicke Schicht (Füllhöhe 1 bis 2 cm)
- Gefriertrocknung in Vials, dünne Schicht (Füllhöhe 1 bis 10 mm)
- Gefriertrocknung von Einzelpartikeln

Trägerlyophilisate werden bei Nutzung eines konventionellen Gefriertrockners in Schalen in den Gefriertrockner eingebracht und getrocknet. Im Gegensatz zur Vialgefriertrocknung ist die Trocknungsdauer aufgrund der geringen Schichtdicken stark verkürzt. Weichselbaum ermittelte für OLCS, abhängig von den Trocknungsbedingungen des verwendeten Geräts, Trocknungszeiten von 80 bis 90 Minuten. Neben der Trocknung im konventionellen Gefriertrockner können Trägerlyophilisate auch mit neuen Gefriertrocknungstechniken, wie von Maier und Krasichkova eingesetzt, hergestellt werden [74,88]. Bei diesen neuen Techniken findet die Trocknung eines OLCS jeweils in einer kleinen Kammer mit eigenem Kondensator statt. Dadurch werden die Trocknungszeiten verkürzt und die Prozessbedingungen können genauer kontrolliert werden als in großen Kammern, bei denen die Bedingungen zwangsläufig weniger homogen sind [110]. Die Produktion läuft quasi-kontinuierlich, ein Scale-Up der im Labor entwickelten Prozesse ist nicht notwendig. Die Trocknungszeiten für ein Lyophilisat betragen etwa 20 bis 60 Minuten und sind somit wesentlich kürzer als bei konventioneller Gefriertrocknung. Zur Steigerung des Durchsatzes können im Prinzip auch mehrere dieser Kammern zusammengeschlossen werden. Die in dieser Arbeit hergestellten OLCS wurden dagegen in einem

konventionellen Laborgefrieretrockner lyophilisiert, da die Trocknungsgeschwindigkeit für den untersuchten Zusammenhang nicht entscheidend war.

Die Partikel von Sphärolyophilisaten sind deutlich kleiner als OLCS-Tröpfchen. Sie wurden in Vials mit großem Öffnungsdurchmesser in einem konventionellen Gefrieretrockner getrocknet. Untersuchungen von Liapis zufolge verläuft die Trocknung der Tröpfchen ähnlich wie bei Lösungen in Vials [80]. Die gefrorenen Partikel bilden im Gefäß ein poröses Bett mit ungesättigten Bereichen, durch die der Transport von Wasserdampf stattfindet, siehe Abbildung 2-12. Im Trocknungsverlauf bildet sich auch in den einzelnen Partikeln eine poröse Matrix aus, daher spricht man von einer bidispersen Porenverteilung im Gut. Wie bei der Gefrieretrocknung von Lösungen wandert im weiteren Verlauf die Sublimationsfront von oben nach unten durch das Produkt.

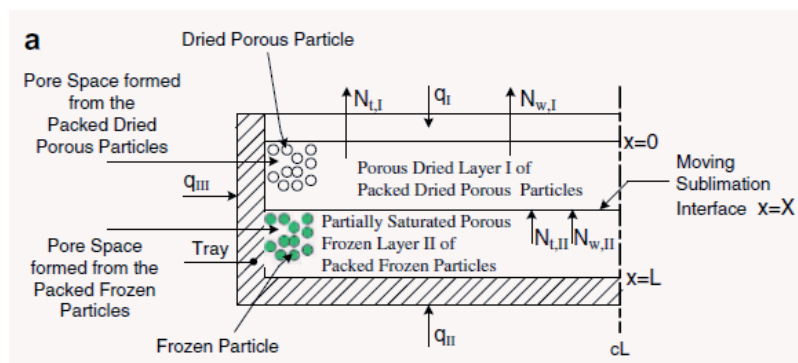


Abb. 2-12 Schematische Darstellung des Trocknungsverlaufs gefrorener Partikel in Schalen [80]

Liapis und Bruttini entwickelten ein mathematisches Modell zur Simulation des Trocknungsprozesses für Vials mit dicker Schicht, nach dem die Trocknung sprühgefrorener Partikel verglichen mit der Vialgefrieretrocknung bei gleicher Schichtdicke des Gutes etwa gleich lang dauert, die Trocknungsgeschwindigkeit jedoch durch den geringeren Gesamtwasseranteil in einem gefrorenen Spray trotzdem geringer ist [80]. Grund dafür sind die verringerte Wärmeübertragung über die Stellflächen in die poröse Matrix und der erhöhte Produktwiderstand aufgrund kleinerer Poren zwischen den gefrorenen Partikeln im Vergleich zur auskristallisierten Lösung. Die Trocknungsgeschwindigkeit kann erhöht werden, wenn die Füllhöhe des Vials bzw. die Schichtdicke des gefrorenen Pulverbetts verringert, der Partikeldurchmesser vergrößert und die Zwischenraumporosität erhöht wird. Im

Gegensatz zu sprühgetrockneten Partikeln ändert sich die Größe gefriergetrockneter Teilchen während der Trocknung nicht.

Noch höhere Trocknungsgeschwindigkeiten können möglicherweise erreicht werden, wenn einzelne Tröpfchen im freien Flug getrocknet werden. Dazu wurde das im folgenden Abschnitt beschriebene Verfahren zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahlgefrier Trocknung entwickelt. Von Vorteil sind die geringe Schichtdicke der gefrorenen Tröpfchen und die guten Möglichkeiten des Stofftransports und der Wärmeübertragung durch das kontinuierlich strömende Trägergas.

2.2.3.1 Atmosphärische Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefrier Trocknung

Konzept

Bei der atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefrier Trocknung (Atmospheric Counter Current Lyophilization, ACD-Lyophilization) handelt es sich um ein Gefrier Trocknungsverfahren, bei dem einzelne Tröpfchen in einem kalten Trägergas eingefroren und gefriergetrocknet werden. Das Verfahren kombiniert die Vorteile der Sprühgefrier Trocknung mit der Gefrier Trocknung unter Atmosphärendruck und ist zum Patent angemeldet [133]. Abbildung 2-13 zeigt eine schematische Zeichnung der Gefrier Trocknungsanlage.

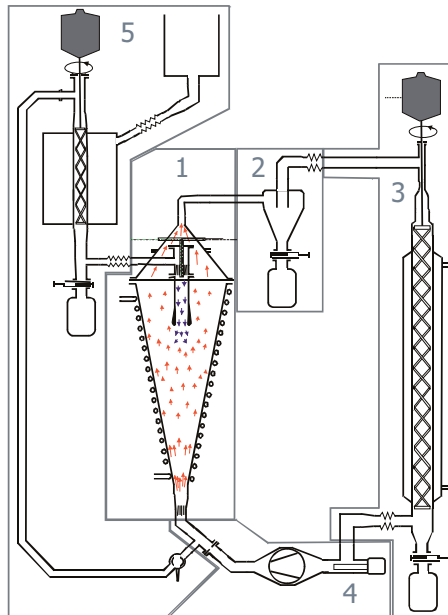


Abb. 2-13 Prototyp zur Atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung (Atmospheric Counter-current Drop-jet lyophilization, ACD-Lyophilization): 1 – Trockenkammer mit Tropfengenerator und Einfrierrohr, 2 – Feststoffabscheider und Produktentnahme, 3 – Hauptkondensator mit Abstreifspirale und Kondensatentnahme, 4 – Gebläse und Strömungsteiler, 5 – Tiefkühlkondensator mit Abstreifspirale und Kondensatentnahme (Maße: Trockenkammer – Höhe 85 cm, Durchmesser am Übergang zum Gebläse 5 cm, Maximaldurchmesser des Konus 30 cm, Einfrierrohr – Höhe 52 cm, Durchmesser 5 cm)

Der gesamte Herstellungsprozess besteht aus sechs Schritten:

1. Tropfenerzeugung
2. Einfrieren
3. Sedimentation
4. Trocknung
5. Abtrennen der trockenen Partikel vom Trägergas
6. Regeneration des Trockengases

Bei der atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung werden Tröpfchen im fallenden Teilstrom eines tiefgekühlten Arbeitsgases eingefroren. Anschließend sedimentieren sie in der Trockenkammer in einem entgegengerichteten Strom eines trockenen Trägergases, bis sich etwa im unteren Viertel der Kammer ein Kräftegleichgewicht zwischen Gravitation und Auftrieb einstellt. Die gefrorenen Tröpfchen werden unterhalb der eutektischen Temperatur oder der Glasübergangstemperatur im kalten Trägergas getrocknet und werden im weiteren Verlauf durch den Verlust an Masse nach oben hin aus der Trockenkammer ausgetragen. Die Abtrennung der wasserfreien Partikel erfolgt danach in einem Zyklon. Das mit Wasserdampf beladene Trägergas wird beim Passieren des Hauptkondensators regeneriert, gegebenenfalls erwärmt,

und anschließend wieder in zwei Teilströme zum Einfrieren und Trocknen zerlegt.

Das Verfahren ist zum kontinuierlichen Betrieb geeignet. Ziel dabei ist es, monodisperse Tropfen mit gleichen aerodynamischen Eigenschaften zu erzeugen. Der Vorteil monodisperser Tropfen ist, dass sie einen einheitlichen Trocknungsverlauf aufweisen. Die getrockneten Partikel besitzen dann alle die gleichen Produkteigenschaften, wie zum Beispiel Größe, Oberflächenmorphologie, Wassergehalt und Porosität.

Dieses neue Konzept konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig praktisch umgesetzt werden, da die einzelnen Schritte wie Sedimentation und Trocknung so eng miteinander verknüpft sind, dass es schwer ist, sie isoliert voneinander zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden Temperatur- und Strömungsmessungen durchgeführt. Diese dienen als Grundlage für weitere Berechnungen, die in einem Folgeprojekt mit Experten der numerischen Strömungsmechanik zur Optimierung der Temperatur- und Strömungsverhältnisse für die atmosphärische Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung durchgeführt werden. Anhand der Berechnungen können die Betriebsparameter zum Betrieb der ACD-Anlage festgelegt werden und gegebenenfalls die Apparategeometrie zur praktischen Durchführung angepasst werden.

Theoretische Voraussetzungen

Zur Umsetzung des Konzepts zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung müssen zunächst einige theoretische Vorüberlegungen gemacht werden. Das Gefriertrocknungskonzept beruht zum einen auf der Trocknung von Partikeln im gefrorenen Zustand unter Atmosphärendruck und zum anderen auf der Abtrennung von Partikeln durch Unterschiede im Sedimentationsverhalten bei verschiedenen Feuchtigkeitsgehalten.

Prozessbedingt müssen in der Gefriertrocknungsanlage an den einzelnen Funktionseinheiten unterschiedliche Temperaturen vorliegen. Zum Einfrieren der Tröpfchen innerhalb kürzester Zeit werden, wie in Abschnitt 4.1.3 gezeigt, Temperaturen unter -100 °C benötigt. Die Trocknungstemperaturen müssen

unterhalb der eutektischen oder der Glasübergangstemperatur der gefrorenen Lösung liegen, dürfen aber nicht zu gering sein, damit der Stofftransport im Trocknungsgut noch möglich ist. Daher sollte die Temperatur in der Trockenkammer auf etwa -20 bis -40 °C eingestellt werden. Zu bedenken ist dabei, dass sich die Eigenschaften des Trägergases Luft bei verschiedenen Temperaturen verändern. In Tabelle 2-1 sind einige Eigenschaften von Luft bei Temperaturen von 20 bis -150 °C dargestellt. Stark temperaturabhängig sind die Dichte und die Viskosität der Luft.

| Temperatur [°C] | Dichte [kg/m ³] | Kinematische Viskosität [m ² /s] x 10 ⁻⁶ | Spezifische Wärmekapazität [KJ/(kg K)] | Wärmeleitfähigkeit [W/(m K)] |
|-----------------|-----------------------------|--|--|------------------------------|
| 20 | 1,205 | 15,11 | 1,005 | 0,0257 |
| 0 | 1,293 | 13,30 | 1,005 | 0,0243 |
| -50 | 1,543 | 9,55 | 1,005 | 0,0204 |
| -100 | 1,980 | 5,95 | 1,009 | 0,0160 |
| -150 | 2,793 | 3,08 | 1,026 | 0,0116 |

Tab. 2-1 Eigenschaften von Luft bei Temperaturen von 20 bis -150°C [19]

Zur Trocknung und Abtrennung der getrockneten Partikel vom Trägergas müssen in der Trockenkammer abhängig von der Größe der Partikel definierte Strömungsbedingungen eingestellt werden. Das Ausmaß der Strömung richtet sich dabei nach der Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel im Trägergas. Das Stokessche Gesetz in Gleichung 2-17 beschreibt den Einfluss der Eigenschaften des Partikels und des strömenden Gases auf die Sedimentationsgeschwindigkeit des Partikels:

$$v_{TS} = \frac{\rho_P \cdot d_P^2 \cdot g \cdot C_c}{18\eta}, \quad \text{Re} < 0,1 \quad \text{Gl. 2-17}$$

v_{TS} – Sedimentationsgeschwindigkeit [m/s], ρ_P – Partikeldichte [kg/m³], d_P – Partikeldurchmesser [m], g – Fallbeschleunigung [m/s²], C_c – Cunningham Slipkorrekturfaktor (für Partikel $\gg 1 \mu\text{m}$ $C_c=1$), η - dynamische Viskosität des umgebenden Gases [kg/(ms)], Re – Reynolds-Zahl

Für die Trocknung der gefrorenen Partikel muss die Strömungsgeschwindigkeit so eingestellt werden, dass die Tröpfchen in einem Gleichgewichtszustand im laminaren Strom des Trägergases schweben. Dabei stellt sich ein

Gleichgewicht zwischen der Gravitationskraft und dem entgegengerichteten Strömungswiderstand ein. Dieses Gleichgewicht ist abhängig von Partikeldichte und -durchmesser und der Viskosität des umgebenden Gases. Der Cunningham Slipkorrekturfaktor beschreibt den Einfluss der Geschwindigkeit des Gases relativ zur Partikeloberfläche. Für Partikel mit einem Durchmesser größer $1 \mu\text{m}$ ist dieser Einfluss vernachlässigbar. Nähert sich die Partikelgröße mit abnehmendem Durchmesser jedoch der mittleren freien Weglänge der Gasmoleküle an, spielt die Geschwindigkeit des Gases eine immer größer werdende Rolle. Das Stokessche Gesetz gilt nur für Partikel, die in Luft laminar umströmt werden, was für die Betrachtung der Strömungsverhältnisse in der ACD-Anlage näherungsweise angenommen wird. Das laminare Strömungsverhalten wird durch einen Strömungsgleichrichter eingestellt, der sich am unteren Ende der Trockenkammer befindet.

Grafisch verdeutlicht wird dies in Abbildung 2-14. Hier sind die Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeiten für verschieden große Tropfen unterschiedlicher Dichte in Luft und Wasser bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ dargestellt. Man sieht, dass die Sedimentationsgeschwindigkeit bei sehr großen Tropfendurchmessern vom linearen Zusammenhang abweicht. In diesem Bereich wird der Partikel nicht mehr laminar umströmt.

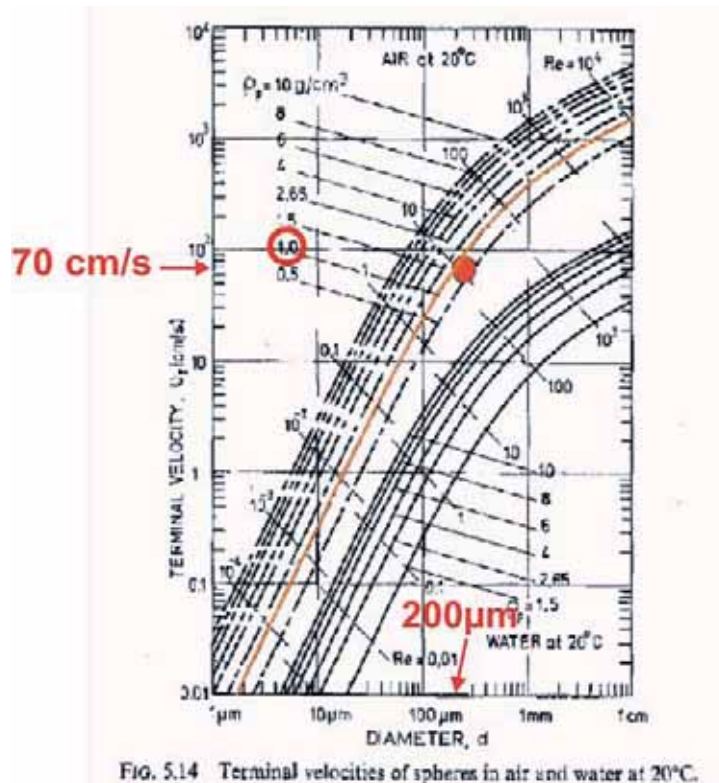


Abb. 2-14 Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeit von kugelförmigen Körpern verschiedener Dichte in Luft und Wasser bei 20 °C [40]

Legt man näherungsweise die Gleichgewichtsgeschwindigkeit eines 200 μm großen Tropfens mit einer Dichte von 1 g/cm³ bei 20 °C als Zielgröße fest, sollte die Strömungsgeschwindigkeit im unteren Drittel der Trockenkammer etwa 70 cm/s betragen. Die Strömungsgeschwindigkeit wird, laminare Strömung vorausgesetzt, unter Einbeziehung des Querschnitts mit Gleichung 2-18 in den Volumenstrom umgerechnet:

$$Q = \frac{dV}{dt} = v \cdot A \quad \text{Gl. 2-18}$$

Q – Volumenstrom [m³/s], V – Volumen [m³], t – Zeit [s], v – Strömungsgeschwindigkeit [m/s], A – Querschnitt [m²]

Dies ist wichtig, da die Messpunkte, an denen die Strömungsgeschwindigkeit kontrolliert wird, einen anderen Querschnitt aufweisen als die Trockenkammer. Die Partikel befinden sich nach dem Einfrieren zur Trocknung im unteren Drittel der Trockenkammer. Der Durchmesser der Kammer beträgt dort etwa 10 cm, entsprechend einem Querschnitt von ca. 80 cm². Bei einer vorgegebenen Strömungsgeschwindigkeit von 0,7 m/s errechnet sich der Gleichgewichtsvolumenstrom an dieser Stelle zu 5,6 L/s.

Für das Abtrennen der Partikel vom Trägergas muss am weitesten Durchmesser der Trockenkammer ebenfalls eine bestimmte Strömungsgeschwindigkeit eingestellt werden, da die Restfeuchte der Partikel im Wesentlichen von der Gleichgewichtsgeschwindigkeit an dieser Stelle abhängt. Die Geometrie der Trockenkammer ist so gewählt, dass sich die Strömungsgeschwindigkeit nach oben hin verlangsamt, da ihr Durchmesser zunimmt. Bei fortschreitender Trocknung verringert sich die Masse des gefrorenen Tröpfchens während sein Durchmesser gleich bleibt. Die anfängliche Dichte des Tropfens von etwa 1 g/cm^3 nimmt also stetig ab bis der gesamte Wasseranteil entfernt ist. Die endgültige Dichte des Partikels wird durch den Feststoffgehalt der Ausgangslösung bestimmt. Der Einfluss der Partikeldichte auf die Sedimentationsgeschwindigkeit ist im Stokesschen Gesetz, Gleichung 2-17, beschrieben. Demnach verlangsamt sich bei abnehmender Dichte des Partikels auch die Sedimentationsgeschwindigkeit. Für den Trocknungsvorgang in der ACD-Anlage bedeutet dies, dass sich die Geschwindigkeit des Partikels mit abnehmender Dichte verringert und der Partikel durch den Strömungsgradienten in der Trockenkammer während des Trocknungsvorgangs nach oben hin aufsteigt. Am größten Durchmesser der Trockenkammer ist die Strömungsgeschwindigkeit am langsamsten. Die Trockenkammer ist so geformt, dass der Durchmesser im obersten Viertel wieder abnimmt, was einen erneuten Anstieg der Strömungsgeschwindigkeit zur Folge hat. Der Partikel wird nach dem Überschreiten der langsamsten Geschwindigkeit vom Trägergas durch die Geschwindigkeitszunahme nach oben hin aus der Trockenkammer ausgetragen. Durch diesen Vorgang werden die Partikel aus dem strömenden Trägergas erst entfernt, wenn sie durchgetrocknet sind. Zur Berechnung und Einstellung der Strömungsgeschwindigkeit am weitesten Durchmesser der Trockenkammer dient die experimentelle Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit für bereits getrocknete Partikel mit bekanntem Durchmesser und bekannter Dichte. Mit Gleichung 2-17 kann der äquivalente aerodynamische Durchmesser dieser Partikel ermittelt werden. Der aerodynamische Durchmesser eines Partikels ist definiert als der Durchmesser einer Kugel mit einer Dichte von 1 g/cm^3 , die dieselbe Sedimentationsgeschwindigkeit besitzt wie das Partikel selbst. Das Verhalten von Partikeln unterschiedlicher Dichte unter

Sedimentationsbedingungen kann durch die Umrechnung in den aerodynamischen Durchmesser besser eingeschätzt werden als durch den geometrischen Durchmesser. Vereinfacht kann der Zusammenhang von geometrischem und aerodynamischem Durchmesser durch Einsetzen in das Stokessche Gesetz mit Gleichung 2-19 ausgedrückt werden:

$$\rho_p d_p^2 = 1 d_a^2 = d_a^2 \quad \text{Gl. 2-19}$$

ρ_p - Partikeldichte [kg/m^3], d_p - Partikeldurchmesser [m], d_a - aerodynamischer Durchmesser [m]

2.3 Lyophilisate für die Augenheilkunde

In der Augenheilkunde werden Erkrankungen fast ausschließlich lokal behandelt. Die wichtigsten verordneten Präparate sind mit großem Abstand die Glaukommittel, gefolgt von Antiinfektiva und Antiphlogistika [83]. Zur Verabreichung von Arzneistoffen am Auge gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie in Abbildung 2-15 dargestellt. Hauptadministrationswege sind die topische Anwendung auf der Hornhaut (Cornea) und das Einbringen in den Bindehautsack. Mit Hilfe invasiver Techniken können Arzneistoffe auch schwer erreichbaren Augensegmenten zugänglich gemacht werden, wobei die Wirkstofffreisetzung mit verschiedenen Arzneiformen modifiziert werden kann. Im Vergleich zu den topisch angewendeten Arzneimitteln ist dieser Anteil jedoch sehr gering.

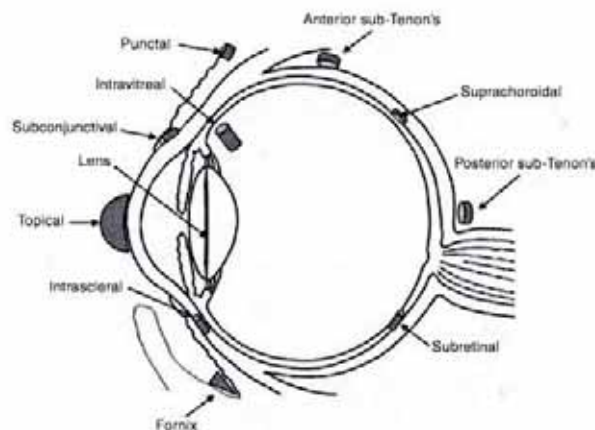


Abb. 2-15 Schematische Darstellung der Applikationswege für Arzneistoffe am Auge [153]
punctal – in die Tränenpunktblöcher, *intravitreal* – in den Glaskörper, *subconjunctival* – unter die Bindehaut, *lens* – Linse, *topical* – topisch, *intrascleral* – in die Lederhaut, *fornix* – Bindehautgewölbe, *subretinal* – unter die Netzhaut, *anterior/posterior sub Tenon's* – unter den vorn/hinten liegenden Teil der Tenonschen Kapsel, *suprachoroidal* – an der Aderhaut anliegend

Der Wirkort von Arzneistoffen ist meist die vordere Augenkammer, die nach außen hin durch die Cornea abgegrenzt ist. Der Stofftransport ins Augeninnere erfolgt meist über die Cornea, aber auch über die Bindehaut (Konjunktiva) und die Lederhaut (Sklera). Kleine lipophile Moleküle passieren vorzugsweise die Cornea während große hydrophile Moleküle auch konjunktival oder skleral aufgenommen werden [65].

Hauptsächlich werden die Arzneistoffe durch passive Diffusion resorbiert. Die Cornea weist eine Sandwich-Struktur aus lipophilem Epithel, hydrophilem

Stroma und lipophilem Endothel auf. Daher werden lipophile Arzneistoffe leicht durch das Epithel aufgenommen, hydrophile Stoffe diffundieren leichter durch das Stroma und ins Kammerwasser. Neben der Lipophilie ist das Permeationsverhalten auch von Molmasse und Ladung abhängig. So wurde zum Beispiel für Antibiotika wie Bacitracin (M 1423 g/mol) eine geringere Permeabilität gefunden als für niedermolekulare Arzneistoffe [53]. Untersuchungen mit dem geladenen Arzneistoff Fluorescein-Natrium zeigen, dass auch dissoziierte Arzneistoffe intraokular verfügbar sind [47]. Begünstigt erfolgt der Transport von Wirkstoffbasen, die zwischen hydrophiler dissoziierter und lipophiler nicht dissoziierter Form wechseln können [69]. Bei der Auswahl von Arzneistoffen und Darreichungsformen kommt es schließlich darauf an, dass der Arzneistoff in ausreichender Konzentration vorliegt und durch die Membran diffundiert.

2.3.1 Problematik konventioneller Augentropfen

Im Europäischen Arzneibuch werden fünf ophthalmologische Darreichungsformen und Zubereitungen aufgeführt: Augentropfen, Augenbäder, Pulver für Augentropfen und Augenbäder, halbfeste Zubereitungen zur Anwendung am Auge sowie Augeninserte. Diese Arzneiformen können meist vom Patienten selbst ohne operative Eingriffe appliziert werden. Über 90 % aller Augenarzneimittel sind Augentropfen in Form wässriger Lösungen oder Suspensionen [78]. Trotz der großen Verbreitung von Augentropfen sollte nicht vergessen werden, dass es sich dabei um eine problematische Arzneiform handelt.

Die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen aus Augentropfen ist gering, denn nur etwa 1 bis 5 % des Wirkstoffs werden resorbiert [65]. Typischerweise werden Volumina von 25 bis 60 μL verabreicht, wobei das maximale Fassungsvermögen des Bindehautsacks nur etwa 30 μL beträgt [147]. Die Verweildauer des Arzneistoffs am Auge wird zusätzlich herabgesetzt durch die stetige Produktion von Tränenflüssigkeit und Kammerwasser. Fließt der Arzneistoff über den Tränen-Nasengang ab, ist zudem das Risiko systemischer Nebenwirkungen erhöht. Dabei ist die Abflussrate durch den Tränen-

Nasenkanal umso größer, je größer das applizierte Volumen ist [147]. Etwa 50 bis 100 % einer verabreichten Dosis werden systemisch verfügbar [65].

Wässrige Augentropfen, die durch mehrmalige Anwendung mit Keimen kontaminiert werden können, müssen zur Aufrechterhaltung der mikrobiologischen Stabilität konserviert werden. Dabei kann es zu Allergien und Reizungen oder sogar zu Langzeitschäden an der Hornhaut durch zugesetzte Konservierungsmittel kommen [30,53,71]. Zur Verbesserung der Verträglichkeit sollen Augentropfen isotonisch und isohydrisch sein. Eine schmerzfreie Applikation ist bei Tonizitäten zwischen 250 und 300 mosmol/kg und bei pH-Werten zwischen 7,3 bis 9,7 möglich [21]. Der pH-Wert liegt jedoch oft im sauren pH-Bereich, da viele Arzneistoffe im Neutralen bis Basischen ausfallen oder durch Hydrolyse und Oxidation zersetzt werden. Die Drainagerate ist bei ungenügender Verträglichkeit durch den gesteigerten Tränenfluss erhöht, sodass weniger Arzneistoff zur topischen Resorption zur Verfügung steht.

Besonders älteren Patienten bereitet die Anwendung von Augentropfen Probleme. Für die Applikation muss der Kopf nach hinten gedehnt werden, die Lösung wird dann von oben ins Auge eingetrofft. Dabei passiert es, dass Patienten mit dem Tropfeinsatz der Flasche die Cornea verletzen, der Tropfen nicht ins Auge gelangt oder mehrere Tropfen gleichzeitig appliziert werden. Bei der Behandlung von 324 Glaukompatienten in 4 Augenarztpraxen in den USA hatten 44 % Probleme bei der Verabreichung von Augentropfen, bei 16 % traten Nebenwirkungen auf [128].

Um die Probleme, die mit Augentropfen als Arzneiform verbunden sind, zu umgehen, wurden neue Arzneiformen entwickelt. Von besonderem Interesse sind dabei die Verlängerung der Wirkdauer von Arzneistoffen mit kurzer biologischer Halbwertszeit und die Reduktion von Nebenwirkungen [53,122]. Zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit wurden neue optimierte Darreichungsformen entwickelt. Zu den bereits zugelassenen Arzneiformen zählen Augentropfen mit erhöhter Viskosität, Augengele oder in-situ gelierende Tropfen, Implantate und Inserte. Die Viskosität von Ophthalmika wird oft erhöht, um die Kontaktzeit am Auge zu verlängern. Nach der Verabreichung wird ein Teil der Lösung in die Tränenflüssigkeit aufgenommen, damit steht ein größeres

Volumen zur Verfügung, der andere Teil verbleibt im Bindehautsack und kann den Tränenfilm bei jedem Lidschlag mit viskoser Lösung versorgen. Dieser Vorgang kann bis zu 20 Minuten andauern. Die Viskosität der entstehenden Lösung sollte dabei 40 bis 50 mPa nicht überschreiten, da sonst die Tränenkanäle verstopfen können wodurch es zu einer vermehrten Tränenbildung mit verstärkter Ausschwemmung des Wirkstoffs kommen kann [147]. In der Entwicklung befinden sich arzneistoffbeschichtete Kunststoffstäbchen, Kontaktlinsen, Kollagenplättchen, Microsprays, liposomale Zubereitungen und Mikroemulsionen [46,53,69,97]. Die Arzneistoffverfügbarkeit wird bei diesen Darreichungsformen durch die verlängerte Kontaktzeit oder eine verbesserte Penetrationsrate gesteigert. Wirkstofffreigaben über einen längeren Zeitraum können mit biokompatiblen, zum Teil bioabbaubaren Implantaten erreicht werden.

Außerdem bietet die Modifikation von Arzneistoffen die Möglichkeit, gut resorbierbare Stoffe als Prodrugs einzusetzen, die erst im Körper zur eigentlichen Wirkform metabolisiert werden. Beispiele dafür sind Prostaglandine wie Latanoprost oder Dipevefrin, die in der Glaukomtherapie angewendet werden [97].

Besondere Vorteile bieten wasserfreie Systeme zur Anwendung am Auge in Form von mikronisierten Pulvern oder Lyophilisaten. Die mikrobielle und chemische Stabilität des Arzneistoffs wird durch die Abwesenheit von Wasser begünstigt. Auf den Zusatz von Konservierungsmitteln kann verzichtet werden, ebenso auf die Einstellung von pH-Wert und Tonizität.

Intuitiv erscheint die Vorstellung, Pulver am Auge zu applizieren wenig attraktiv. Untersuchungen zufolge, werden mikronisierte Pulver und Lyophilisate jedoch gut vertragen. Hardarson et al. untersuchten die Verträglichkeit von reinem Timololmaleat-Pulver und dem mit PVP gefriergetrockneten Wirkstoff am Kaninchenauge. Therapeutische Dosen des Arzneistoffs werden in beiden Fällen ohne Irritationen vertragen [58]. Die Verträglichkeit von Lyophilisaten im Vergleich zu handelsüblichen Augentropfen ist sowohl für wirkstofffreie als auch für wirkstoffhaltige Präparate mit Pilocarpin und Tropicamid untersucht worden. Die OLCS wurden, auch bei Zugabe unterschiedlicher Polymere, gleich gut

oder besser von den Patienten toleriert [45,151]. Das Volumen der Tränenflüssigkeit wird bei der Verabreichung trockener Präparate nicht erhöht, so werden Ausschwemmeffekte durch überschüssige Flüssigkeit unterbunden.

2.3.2 Ophthalmic Lyophilizate Carrier System (OLCS)

Das Ophthalmic Lyophilizate Carrier System besteht aus einem gefriergetrockneten Tropfen, welcher die zur Anwendung am Auge vorgesehene Zubereitung repräsentiert, einer Trägermembran und einem Handgriff, siehe Abbildung 2-16.

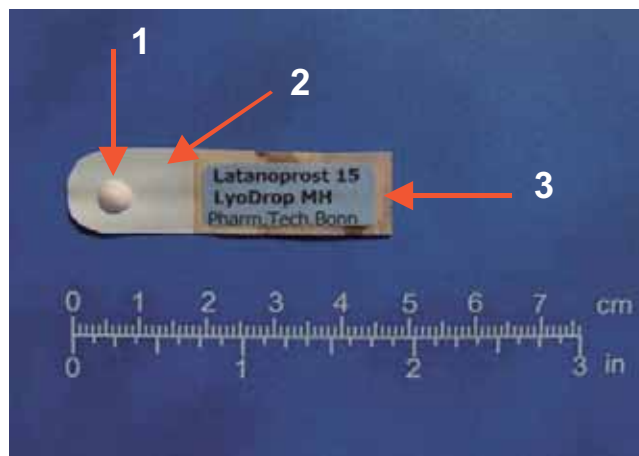


Abb. 2-16 Ophthalmic Lyophilizate Carrier System: 1 – gefriergetrockneter Tropfen, 2 – PTFE-Membran, 3 – Handgriff mit Etikett

Die Tropfen können dabei aus einer Matrix gefriergetrockneter Lösungen oder Suspensionen bestehen, die einen oder mehrere Wirkstoffe enthalten. Die Herstellung von Trägerlyophilisaten wird im Kapitel 2.2 beschrieben. Abhängig von den Eigenschaften der Zubereitung kann die Matrix ein Polymer, einen niedermolekularen Gerüstbildner oder eine Kombination aus beiden enthalten. Der Zusatz weiterer Hilfsstoffe, die den Arzneistoff während der Gefriertrocknung stabilisieren, ist möglich. Der Tropfen befindet sich auf einer hydrophoben Trägerfolie, die zur besseren Handhabung mit einem Handgriff versehen ist. Grunthal untersuchte verschiedene Polymere und Trägerfolien auf ihre Eignung für OLCS. Dabei erwiesen sich Gelatine, Hyaluronsäure, HPMC, PVP und PVA auf einer sterilisierbaren PTFE-Folie als geeignet [57].

Zur Applikation wird das Trägersystem, wie in Abbildung 2-17 gezeigt, zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten und das Lyophilisat über die untere Lidkante in den Bindehautsack abgestreift. Der gefriergetrocknete Tropfen wird in der

Tränenflüssigkeit aufgelöst und der Wirkstoff freigesetzt. Werden gelbildende Polymere verwendet, formt der Tropfen mit der Tränenflüssigkeit ein viskoses Gel, sodass die Verweildauer von Arzneistoffen am Auge verlängert werden kann. Untersuchungen von Weichselbaum ergaben je nach Art und Konzentration des Polymers Verweilzeiten von 10 Minuten bis zu 2 Stunden im Bindehautsack [151].



a – Patient bei Applikation des OLCS



b – Verteilung von Fluorescein 2 Minuten nach Applikation

Abb. 2-17 Applikation eines Fluorescein-OLCS (Fotos M. Diestelhorst)

Neben den bereits beschriebenen Vorteilen wasserfreier Zubereitungen zur Anwendung am Auge lassen sich OLCS einfach vom Patienten selbst verabreichen. Da jedes Lyophilisat genau eine Einzeldosis des Arzneistoffs enthält, werden Über- oder Unterdosierung vermieden. Pharmakokinetische Studien an Patienten, denen hypromellosehaltige OLCS mit Fluorescein als wirksamem Bestandteil verabreicht wurden, zeigten, dass die Anflutungsgeschwindigkeit und Verweildauer in der Vorderkammer im Vergleich zu konventionellen Augentropfen signifikant erhöht ist [47,84,131]. Die Erstellung eines pharmakokinetischen Modells ergab, dass die intraokulare Bioverfügbarkeit für OLCS ungefähr 4-mal höher als für die Augentropfen ist [22].

Die Qualität der Trägerlyophilisate hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Arznei- und Hilfsstoffe sowie von den Herstellungsbedingungen ab. Spezielle Qualitätsmerkmale von OLCS sind die Haft- und Strukturfestigkeit des lyophilisierten Tropfens. Die Durchführung

von Haft- und Strukturfestigkeitsbestimmungen wird in Abschnitt 3.6.2 beschrieben. Ist die Haftfestigkeit zu hoch, lassen sich die Lyophilisate nicht vom Träger abstreifen, ist sie zu niedrig, können sie sich bei Erschütterungen während des Transports oder der Lagerung von der Trägerfolie lösen. Weichselbaum stellte fest, dass die Haftfestigkeit für eine optimale Applikation zwischen 20 bis 200 mN betragen sollte [151]. Eine genügende Strukturfestigkeit des Topfens ist erforderlich, um ein haltbares Gerüst aufzubauen und die Stabilität des Tropfens für die vollständige Applikation zu gewährleisten. Die Strukturfestigkeit sollte dabei nicht zu hoch sein, da dies bei der Anwendung zu einem Fremdkörpergefühl oder Schmerzen führen kann. Genaue Zielwerte für die Strukturfestigkeit gibt es noch nicht, Haft- und Strukturfestigkeit sollten jedoch gemeinsam beurteilt werden. Maier stellte fest, dass bei einer erhöhten Haftfestigkeit auch eine höhere Strukturfestigkeit erforderlich ist [88]. Diese beiden Parameter müssen für jede Rezeptur unter Berücksichtigung der jeweiligen Herstellungsmethode angepasst werden. Des Weiteren sollten die Lyophilisate steril sein, die Gleichförmigkeit der applizierten Arzneistoffmenge sicherstellen und einen geeigneten Restwassergehalt zur Stabilisierung des Wirkstoffs über den Lagerungszeitraum aufweisen.

2.3.3 Sphärolyophilisate für die Anwendung am Auge

Sphärolyophilisate sind gefriergetrocknete Tropfen mit einer engen Partikelgrößenverteilung, wobei die Partikelgröße für die Anwendung am Auge im Mikrometerbereich liegen sollte. Sie enthalten einen oder mehrere Arzneistoffe in einer Matrix. Diese kann aus Gerüstbildnern und geeigneten stabilisierenden Hilfsstoffen für die Gefriertrocknung bestehen. Bei der Herstellung werden Arznei- und Hilfsstoffe meist in Wasser gelöst oder dispergiert. Die Herstellung von Sphärolyophilisaten wurde bereits in Kapitel 2.2 beschrieben. Für die Anwendung am Auge werden 1 bis 3 mg des Lyophilisatpulvers als Einzeldosis in einem Blister verpackt. Der Aufbau des Blisters ist in Abbildung 2-18 dargestellt.

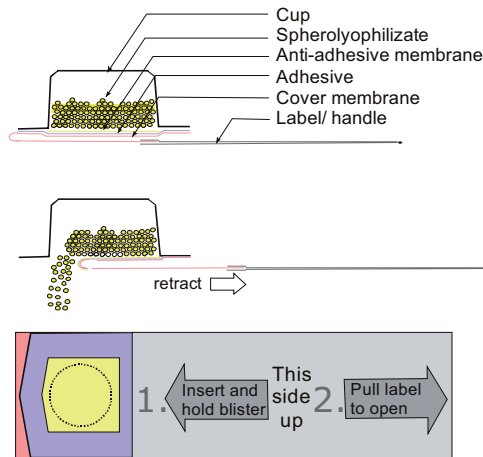


Abb. 2-18 Einzeldosis eines Sphärolyophilisatpulvers im Blister: Blisternapf (cup), nichtklebende Membran an der Innenseite (anti-adhesive membrane), Verklebung der Schutzfolie mit Blistersteg (adhesive, cover membrane), Handgriff mit Etikett (handle, label)

Zur Anwendung am Auge dient ein gesonderter Applikator mit einer Augenkappe (Autodrop[®] Eintropfhilfe für Augentropfenflaschen, Owen Mumford Ltd., UK-Woodstock), einer Aufnahmevorrichtung zum Einschieben des Blisters und einer Vorrichtung zum Erzeugen eines auf die Cornea gerichteten Luftstroms, wie in Abbildung 2-19 dargestellt [132]. Bei Auslösen des Applikationsvorgangs werden die Lyophilisatpartikel vom Luftstrom erfasst und auf der Hornhaut abgeschieden. Dort lösen sie sich in der Tränenflüssigkeit auf oder bilden ein viskoses Gel und der Arzneistoff wird freigesetzt.

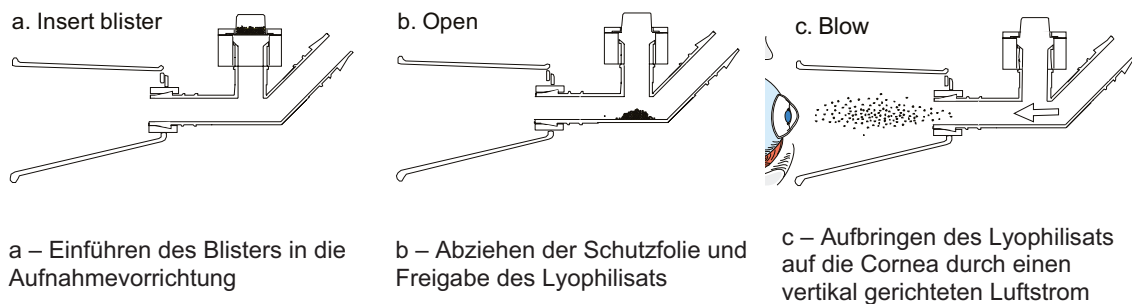


Abb. 2-19 Applikation von Sphärolyophilisaten [132]

Die Handhabung des Augenapplikators ist sehr einfach und auch für Sehbehinderte und Patienten mit eingeschränkter Fingerfertigkeit geeignet. Bei jeder Anwendung wird eine präzise Einzeldosis verabreicht. Eine Verletzung bei der Applikation kann ausgeschlossen werden, da das Auge keinen Kontakt zum Applikator hat. Eine ähnliche Anwendung ist das Mikrospray für die Anwendung am Auge. Untersuchungen an gesunden Patienten zeigten die Überlegenheit

des Sprays im Vergleich zu konventionellen Augentropfen in Bezug auf Handhabung und Verträglichkeit. Die Bioverfügbarkeit für eine fluoresceinhaltige Zubereitung war signifikant besser als bei konventionellen Augentropfen [46]. Bezugnehmend auf die durchgeführten Untersuchungen bei OLCS und Microsprays wird die Verträglichkeit von Sphärolyophilisaten im Vergleich zu Augentropfen mindestens genauso gut eingeschätzt. Auch für die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen werden ähnlich positive Ergebnisse wie für Trägerlyophilisate erwartet.

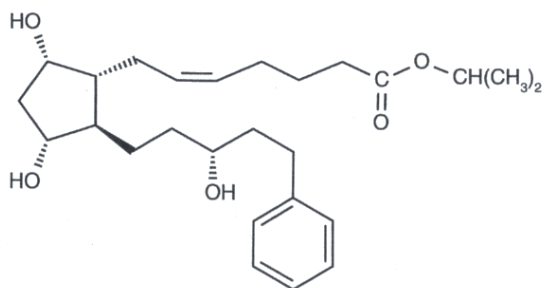
Ophthalmologische Sphärolyophilisate sollten den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs an Augenzubereitungen entsprechen. Allgemein werden Sterilität, Gleichförmigkeit des Gehalts und/oder der Masse und Partikelfreiheit im gelösten Zustand gefordert. Wie bei den Trägerlyophilisaten sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften abhängig von den verwendeten Arznei- und Hilfsstoffen sowie vom Herstellungsvorgang. Wichtige Qualitätsmerkmale für Sphärolyophilisate sind die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung. Für eine schnelle Rekonstitution in der Tränenflüssigkeit ist ein kleiner Partikeldurchmesser im Bereich von wenigen 100 µm von Vorteil. Die Sphärolyophilisate sollten eine gute Fließfähigkeit besitzen und leicht in Luft dispergierbar sein, um eine gleichförmige Dosierung während des Abfüllens und eine vollständige Applikation am Auge zu ermöglichen. Für den Erhalt der Stabilität sowie der Fließfähigkeit und Dispergierbarkeit der Zubereitung ist ein niedriger Restwassergehalt während der gesamten Lagerungsdauer erforderlich.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien und Zubereitungen

3.1.1 Wirkstoff: Latanoprost

Latanoprost



Isopropyl (Z)-7-[(1R,2R,3R,5S)-3,5-dihydroxy-2-[(3R)-3-hydroxy-5-phenylpentyl]-cyclopentyl]-5-heptenoat (IUPAC)

Lieferant: Cayman Chemical, USA-Ann Arbor (MI)

Summenformel: $C_{26}H_{40}O_5$

Molekulargewicht: 432,6 g/mol

Latanoprost ist eine farblose bis gelbliche ölige Substanz. Es ist sehr gut löslich in Acetonitril und gut löslich in Aceton, Ethanol, Ethylacetat, Isopropanol, Methanol und Octanol. Latanoprost ist praktisch unlöslich in Wasser. Für wässrige Phosphatpufferlösungen (pH 7,2) wird eine Löslichkeit von ca. 50 $\mu\text{g/mL}$ angegeben [7].

Latanoprost wird pharmazeutisch zur Senkung des erhöhten Augeninnendrucks bei Patienten mit Offenwinkelglaukom und bei okulärer Hypertension verwendet. Als Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Analogon ist Latanoprost ein selektiver prostanoider FP -Rezeptorantagonist, der den Augeninnendruck durch Steigerung des Kammerwasserabflusses senkt. Die Wirkung tritt nach 3 bis 4 Stunden ein, erreicht ihr Maximum nach 8 bis 12 Stunden und hält bis zu 24 Stunden lang an [3].

Latanoprost wird als pharmakologisch inaktives Isopropylester-Prodrug verabreicht. In der Cornea wird der Ester enzymatisch zur freien Säure, der eigentlichen Wirkform, hydrolysiert und diffundiert ins Kammerwasser. Die wirksame Form ist das 15 R-Enantiomer der Latanoprost-Säure, die Säure des S-Enantiomers besitzt nur etwa 10 % der Wirkung [4]. Untersuchungen von Sjöquist und Stjernschantz zufolge wird beim Menschen die maximale Konzentration im Kammerwasser 1 bis 2 Stunden nach topischer Applikation erreicht. Die Halbwertszeit beträgt 2 bis 3 Stunden. Nach Verabreichung der klinischen Dosis von 1,5 µg Latanoprost wurden im Kammerwasser Konzentrationen von 15 bis 30 ng/mL gemessen. Im Blutplasma wurde die Maximalkonzentration etwa 5 Minuten nach Applikation am Auge erreicht. Dabei wurde eine Konzentration von 53 pg/mL bei einer Halbwertszeit von 17 Minuten erreicht. Im Auge und im Blut wird Latanoprost durch Esterasen hauptsächlich zur freien Säure umgewandelt. In der Leber werden Metaboliten durch β-Oxidation gebildet, die dann nahezu vollständig über die Nieren ausgeschieden werden [125].

Im Handel erhältlich sind Xalatan[®] – Augentropfen mit 0,005 % Latanoprost und das Kombinationspräparat Xalacom[®] – Augentropfen mit 0,005 % Latanoprost und 0,5 % Timolol (Pfizer Pharma GmbH, D-Berlin). Die Haltbarkeit der Lösungen wird vom Hersteller im verschlossenen Zustand mit 3 Jahren angegeben, bei Lagerungsbedingungen von 2 bis 8 °C unter Ausschluss von Licht.

Xalatan[®] 0,005 % Augentropfen

Xalatan[®] Augentropfen wurden als Vergleichszubereitung für die okuläre Bioverfügbarkeit eingesetzt. Folgende Daten sind der Fachinformation entnommen [6]:

Wirkstoff:

Latanoprost

Zusammensetzung:

100 mL Augentropfen enthalten 0,005 g Latanoprost

1 Tropfen enthält etwa 1,5 µg Latanoprost

Benzalkoniumchlorid 0,02 % ist als Konservierungsmittel enthalten

Sonstige Bestandteile:

Benzalkoniumchlorid 0,2 mg/mL

Natriumchlorid

Natriumdihydrogenphosphat 1 H₂O

Dinatriumhydrogenphosphat

Wasser für Injektionszwecke

Darreichungsform:

Lösung

Anwendungsgebiete:

Zur Senkung des erhöhten Augeninnendrucks bei Patienten mit Offenwinkelglaukom und bei okulärer Hypertension.

Dosierung:

Die empfohlene Therapie bei Erwachsenen ist ein Tropfen täglich in den Bindehautsack des erkrankten Auges.

Inhaber der Zulassung:

PHARMACIA GmbH, D-Karlsruhe, ein Unternehmen der Pfizer-Gruppe

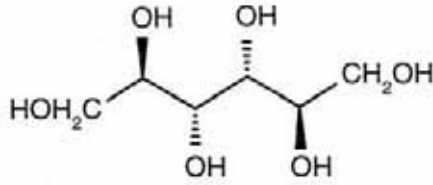
Die Wirkung des Arzneistoffs Latanoprost wurde bereits im vorigen Abschnitt beschrieben. Bei Xalatan[®] Augentropfen handelt es sich um eine sterile, isotonische, gepufferte wässrige Lösung von Latanoprost mit einem pH-Wert von etwa 6,7 [3].

Die Lösung wurde kühl und unter Ausschluss von Licht gelagert. Zusätzlich wurde für die Zubereitung ein pH-Wert von 6 bis 7 mit pH-Indikatorpapier (pH 1-14 mit beiliegender Farbskala, Macherey-Nagel GmbH, D-Düren) ermittelt.

3.1.2 Gerüstbildner

3.1.2.1 Mannitol und Trehalose

Mannitol, Ph.Eur. 6.8



D (-) – Mannitol

Lieferant: VWR International GmbH, D-Darmstadt

Chargen - Bez.: 04H040011

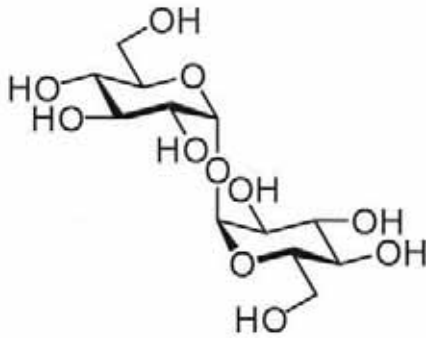
Summenformel: C₆H₁₄O₆

Molekulargewicht: 182,17 g/mol

Mannitol ist ein sechswertiger Alkohol der Mannose und ein Isomer des Sorbitols. Mannitol ist ein weißes geruchloses Pulver mit süßem Geschmack. Es ist leicht löslich in Wasser (18,2 g/100mL) und sehr schwer löslich in Ethanol. Mannitol kann aus Manna oder anderen natürlichen Quellen extrahiert werden. Allgemein wird es durch katalytische oder elektrolytische Reduktion aus Monosacchariden wie Glucose oder Mannose gewonnen.

Lösungen von Mannitol werden aufgrund ihrer osmotischen Wirksamkeit als Diuretikum verwendet. Des Weiteren wird es in der Galenik als Süßungsmittel, als Füllmittel für Tabletten und Kapseln, zur Direkttablettierung, als Isotonisierungsmittel und bei der Lyophilisation eingesetzt. In der Gefriertrocknung ist Mannitol weit verbreitet als Gerüstbildner. Meist bildet sich durch Auskristallisieren des Mannitols ein ansprechend aussehender stabiler Kuchen. Bei schnellem Einfrieren kann es amorph erstarren, was teilweise zum Zerschneiden von Vials führen kann [66,92].

Trehalose



D (+) - Trehalose

Lieferant: VWR International GmbH, D-Darmstadt

Chargen - Bez.: 07E040019

Summenformel: $C_{12}H_{22}O_{11}$

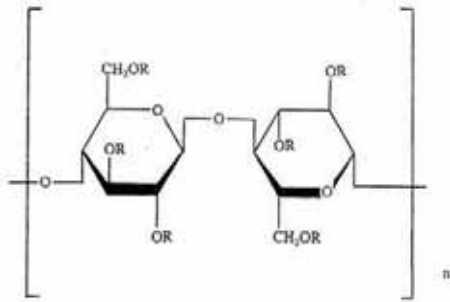
Molekulargewicht: 378,3 g/mol

Trehalose ist ein Disaccharid aus 2 α,α -(1,1) - glykosidisch verbundenen D-Glucoseeinheiten. Es ist ein farbloses, süß schmeckendes Pulver, das in Wasser (68,9 g/100mL) und heißem Alkohol löslich ist. Trehalose kommt unter anderem in Hefen, Bakterien und Pilzen vor. In lebenden Organismen wie zum Beispiel Bärtierchen dient sie zur Stabilisierung von Membranen und Proteinen in Trockenperioden. Trehalose wird aus Presshefe gewonnen. Erst seit wenigen Jahren kann sie industriell durch enzymatischen Abbau von Stärke produziert werden.

In der Lebensmittelindustrie wird Trehalose als mildes Süßungsmittel verwendet. Aufgrund der schützenden Wirkung beim Einfrieren von Zellen und Geweben wird es als Kryoprotektor für Organe eingesetzt. Wie andere Disaccharide kann es in der Gefriertrocknung als Gerüstbildner eingesetzt werden. Veröffentlichungen von Costantino et al. und Sonner et al. zeigen, dass Trehalose aufgrund der Ausbildung von amorphen Strukturen zur Verbesserung der Stabilität von sprühgefriergetrockneten Proteinen beiträgt [41,130]. Kommerziell wird es in der Gefriertrocknung vorwiegend zur Stabilisierung monoklonaler Antikörper verwendet [15].

3.1.2.2 Polymere

Hypromellose, Ph.Eur. 6.8



Disaccharideinheit, R= -H, -CH₃, -CH₂-CHOH-CH₃

Methocel[®] E50 Premium LV EP

Lieferant: Colorcon Ltd., UK-Dartford

Chargen - Bez.: QJ09012405

Synonyme: Hydroxypropylmethylcellulose, HPMC

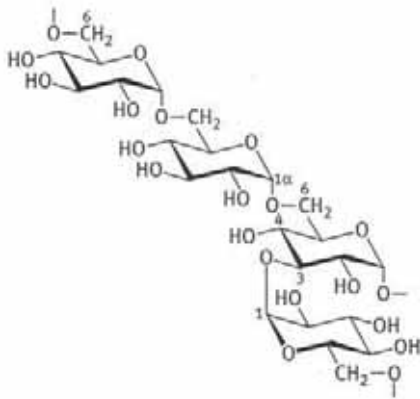
Summenformel: C₈H₁₅O₆-(C₁₀H₁₈O₆)_n-C₈H₁₅O₅

Molekulargewicht: ~23000 g/mol

Hypromellose ist ein Gemisch aus dem Methyl- und dem 2-Hydroxypropylether der Cellulose. Es ist ein weißes geruchloses Pulver, löslich in Wasser und unlöslich in Ethanol. Nach dem Europäischen Arzneibuch werden verschiedene HPMC - Qualitäten durch die Viskosität ihrer 2 %-igen Lösung charakterisiert. Die verwendete HPMC besitzt eine Viskosität von 50 cP. Bei der Herstellung von Hypromellose wird Cellulose mit Natriumhydroxid versetzt und die erhaltene Alkalicellulose mit Methylchlorid und Propylenoxid verethert.

Pharmazeutische Verwendung findet Hypromellose als Filmbildner und Überzugsmittel für Tabletten, als Bindemittel in Tabletten und als viskositätserhöhender Zusatz in flüssigen Zubereitungen. In Augentropfen wird sie häufig als Tränenersatzmittel eingesetzt. Wegen der viskositätserhöhenden Eigenschaften trägt Hypromellose auch zu einer Verlängerung der Verweildauer von Arzneistoffen am Auge bei [42].

Dextran 40, Ph.Eur. 6.8



Lieferant: Fresenius GmbH, D-Bad Homburg

Chargen - Bez.: 1301A-07758

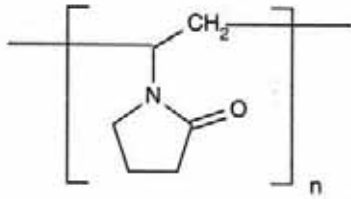
Summenformel: $(C_6H_{10}O_5)_n$

Molekulargewicht: ~ 40000 g/mol

Dextrane sind Gemische aus Polysacchariden, die aus α -(1,6) - verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten aufgebaut sind. Sie werden von Bakterien der Gattung *Leuconostoc* aus Saccharose synthetisiert. Dextran 40 ist ein weißes geruch- und geschmackloses Pulver. Dextrane werden hinsichtlich ihrer Molekülmassen unterschieden. Die Zahl 40 gibt die mittlere relative Molekülmasse in Tausend an.

Dextrane werden in der Pharmazie vorwiegend als Plasmaexpander in parenteralen Zubereitungen eingesetzt. In der Gefriertrocknung dient Dextran als stabilisierender Gerüstbildner.

Polyvinylpyrrolidon, Ph.Eur. 6.8



Polyvidon löslich K29

Lieferant: Gödecke AG, D-Freiburg

Ch.-B.: 3000078

Synonyme: Povidon, PVP

Summenformel: $(C_6H_9NO)_n$

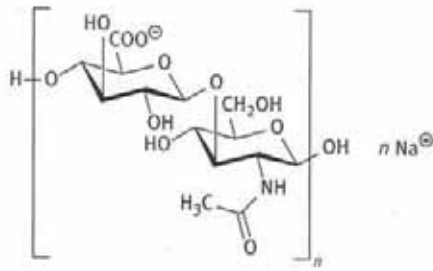
Molekulargewicht: ~ 50000 g/mol

Povidon ist ein kettenförmiges Polymer aus 1-Vinyl-2-Pyrrolidon – Gruppen. Es ist ein weißes geruch- und geschmackloses Pulver. Es ist leicht löslich in Wasser und Ethanol. Verschiedene Qualitäten mit unterschiedlichen Molmassenverteilungen werden mit Hilfe des K-Wertes unterschieden, der die Viskosität wässriger Lösungen relativ zu Wasser ausdrückt. Povidon wird durch Polymerisierung von Vinylpyrrolidon über den Reppe-Prozess erhalten.

In der Pharmazie können Povidone als Plasmaexpander verwendet werden. Meist werden sie als Hilfsstoffe wie Binde- und Überzugsmittel für Tabletten und zur Erhöhung der Viskosität in flüssigen Zubereitungen zur topischen oder oralen Anwendung eingesetzt. In der Gefriertrocknung wird es häufig als Gerüstbildner verwendet. In Kombination mit anderen Gerüstbildnern kann es die Festigkeit von Lyophilisatkuchen erhöhen [28]. In wässrigen Augentropfen wird PVP häufig als viskositätserhöhender Zusatz zur Verlängerung der Retentionszeit verwendet [42].

3.1.3 Zusätze

Hyaluronsäure – Natriumsalz, Ph.Eur. 6.8



Strukturformel des Disaccharidbausteins der Hyaluronsäure ($n=250$ bis 50.000)

Lieferant: Synopharm GmbH, D-Barsbüttel

Ch.-B.: 0411A047

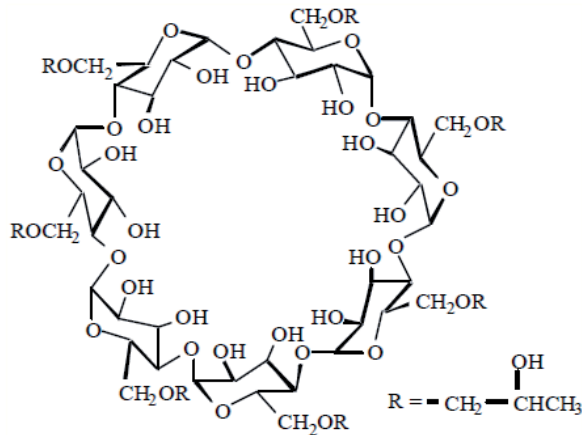
Summenformel: $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$

Molekulargewicht: $\sim 1\,550\,000$ g/mol

Natriumhyaluronat ist das Natriumsalz der Hyaluronsäure. Diese besteht aus alternierenden Einheiten β -(1,3) - glykosidisch verknüpfter D-Glucuronsäure mit N-Acetyl- β -D-glucosamin, die β -(1,4) - glykosidisch miteinander verknüpft sind. Hyaluronsäure wird durch Extraktion aus Hahnenkämmen oder biotechnologisch hergestellt. Hyaluronsäure liegt im menschlichen Bindegewebe an Proteine gebunden oder frei als Bestandteil der Synovialflüssigkeit der Gelenke und im Kammerwasser des Auges vor. Hyaluronsäure besitzt eine sehr hohe Wasserbindungskapazität von bis zum 100-fachen ihres Gewichts [143]. Pharmazeutisch werden Natriumhyaluronatlösungen zur Regeneration von Knorpelsubstanz und Synovialmembran, zur Volumensubstitution bei Augenoperationen und als Ersatz von Tränenflüssigkeit eingesetzt. In der Galenik wird Hyaluronsäure als Hilfsstoff zur Erhöhung der Viskosität verwendet. In Augenzubereitungen wird Hyaluronsäure als mucoadhäsives Polymer eingesetzt. Durch die intensive Wechselwirkung mit der Mucinschicht auf dem Cornea-Epithel verbleibt die Zubereitung über mehrere Stunden am Auge [42,69].

Aus Kostengründen wurde in dieser Arbeit Hyaluronsäure-Natrium für kosmetische Zwecke verwendet, da die Verwendung der experimentellen Zubereitungen am Menschen nicht vorgesehen war.

Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (HP-β-CD), Ph.Eur.6.8



Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- Steinheim

Chargen - Bez.: 027K0768

Synonyme: β - Cyclodextrin - 2 – Hydroxypropylether

Summenformel: (C₆H₉O₅)₇(CH₃H₇O)_{4,5}

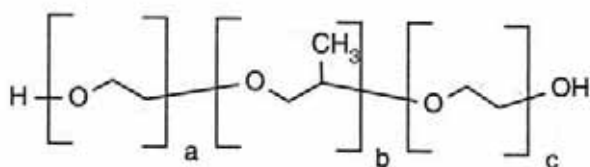
Molekulargewicht: 1396 g/mol

HP-β-CD gehört zur Gruppe der Cyclodextrine. Dies sind cyclische Oligosaccharide aus sechs, sieben oder acht α-(1,4) - glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten (α, β oder γ – Cyclodextrin). Sie werden durch enzymatischen Abbau von Stärke gewonnen. Durch Veretherung der Hydroxylgruppen wird aus β - Cyclodextrin das substituierte Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin erhalten. Das substituierte Produkt hat gegenüber der Ausgangssubstanz eine verbesserte Wasserlöslichkeit. Hydroxypropyl-β-cyclodextrin ist ein weißes Pulver. Die Löslichkeit in Wasser beträgt 45 g pro 100 mL. Es ist durchschnittlich mit 0,67 Hydroxypropylgruppen pro Glucoseeinheit substituiert. HP-β-CD ist nicht toxisch und auch zur parenteralen Applikation geeignet.

Allgemein besitzen Cyclodextrine eine hydrophile Außenseite und im Inneren einen hydrophoben Hohlraum. Aufgrund dessen können sie als Wirtsmoleküle

hydrophobe Gastmoleküle aufnehmen. Das Verhältnis dieser Wirt-Gast-Komplexe kann je nach Molekülgröße variieren. Typischerweise werden ein bis zwei Gastmoleküle von ein bis drei Cyclodextrinmolekülen eingeschlossen. Cyclodextrine dienen so zur Verbesserung der Löslichkeit hydrophober Substanzen und zur Stabilisierung oxidations-, licht- und hitzeempfindlicher Stoffe. Des Weiteren können sie Geruch und Geschmack maskieren, Substanzen vor Verdampfen oder Sublimation schützen, inkompatible Stoffe voneinander isolieren und die Freigabe von Arzneistoffen und Aromen kontrollieren [43,81,109]. Von besonderem Interesse für die Pharmazie ist neben der Löslichkeitsverbesserung die Fähigkeit der Penetrationsverbesserung von Arzneistoffen durch biologische Membranen. Die Verwendung von Cyclodextrinen in Augentropfenzubereitungen wird in den Reviews von Rajewski und Loftsson diskutiert [82,109]. Einen therapeutischen Vorteil bietet die Anwendung von Cyclodextrinen demnach durch die Solubilisierung schwer wasserlöslicher Arzneistoffe und durch die Vermeidung von Irritationen reizender Arzneistoffe am Auge. Positive Resultate wurden zum Beispiel mit cyclodextrinhaltigen Zubereitungen von Corticosteroiden und Carboanhydraseinhibitoren erzielt.

Pluronic[®] F 68, Ph.Eur. 6.8



Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- Steinheim

Chargen - Bez.: 046K0043

Synonym: Poloxamer 188

Summenformel: $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$

(Pluronic[®] F68: a = 80, b = 27)

Molekulargewicht: 7680 – 9510 g/mol

Pluronic F68, auch als Poloxamer 188 bezeichnet, gehört zur Gruppe der Polyoxyethylen – Polyoxypropylen Copolymere. Dies sind Blockpolymere aus Ethylen- und Propylenoxid. Verschiedene Zusammensetzungen der Ethylen- und Propylenoxideinheiten bestimmen die physikalischen und chemischen Eigenschaften des jeweiligen Poloxamers. Pluronic F68 besteht aus weißen, wachsartigen, freifliessenden Körnern. Das Pulver ist leicht löslich in Wasser und Ethanol. Bei der Herstellung wird zunächst aus Propylenoxid und Propylenglycol Polyoxypropylenglykol erhalten, das dann zur Bildung des Blockpolymers mit Ethylenoxid umgesetzt wird.

Das Molekül besitzt amphiphile Eigenschaften, wobei die Polyoxyethylengruppen den hydrophilen und die Polyoxypropylengruppen den hydrophoben Teil bilden. In der Pharmazie finden Poloxamere allgemein weite Verwendung als Emulgatoren, zur Solubilisierung und als Netzmittel. Aufgrund ihrer geringen Toxizität und reizfreien Verträglichkeit werden sie als Hilfsstoffe in oralen, parenteralen und topischen Formulierungen eingesetzt. Poloxamer 188 findet man zum Beispiel in oralen Zubereitungen als Netzmittel, als Gleitmittel in Laxanzien und als Benetzungsmittel in Augentropfen.

3.2 Herstellung von Sphärolyophilisaten

Im nachfolgenden Teil werden die verschiedenen Methoden zur Herstellung von Sphärolyophilisaten vorgestellt. Zum Herstellen dieser neuen Arzneiform musste sowohl eine geeignete Möglichkeit zur Tropfenerzeugung gefunden werden, als auch eine Anlage zur Gefriertrocknung der Tröpfchen entwickelt werden.

Zunächst wurden verschiedene Methoden zur Tropfenerzeugung untersucht, die im ersten Teil dieses Kapitels beschrieben werden. Zur Gefriertrocknung wurden verschiedene Konzepte entwickelt und umgesetzt. Dazu wurden drei verschiedene Prototypen für den Forschungsbetrieb angefertigt, die in den folgenden Abschnitten des Kapitels vorgestellt werden. Alle Prototypen zur Gefriertrocknung wurden aus Standardbauteilen der Vakuumtechnik (Ilmvac GmbH, D-Ilmenau) oder Sonderanfertigungen von Glas- und Metallbauteilen aufgebaut. In Tabelle 3-1 ist eine Übersicht über die verwendeten Sprüh- und Einfrierverfahren für die jeweiligen Prototypen I bis III dargestellt. Die einzelnen Düsen sowie Aufbau und Funktionsweise der verschiedenen Prototypen werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

| Bezeichnung des Prototyps | Prinzip der Tropfenerzeugung | Verwendete Düse | Einfrierverfahren | Trocknung |
|---------------------------|------------------------------|-----------------|---------------------|--|
| I | Abtropfen | 1 | vakuuminduziert | Vakuum-gefriertrocknung intern |
| | Laminarer Strahlzerfall | 2, 3 | | |
| IIa | Laminarer Strahlzerfall | 3 | in kaltem Trägergas | Konventionelle Gefriertrocknung extern |
| | Ink-Jet Technologie | 4 | | |
| IIb | Ink-Jet Technologie | 4 | in kaltem Trägergas | Konventionelle Gefriertrocknung extern |
| III ¹⁾ | Ink-Jet Technologie | 4 | in kaltem Trägergas | Gefriertrocknung im Gegenstrom intern |

Tab. 3-1 Übersicht der Sprüh- und Einfrierverfahren der Prototypen I bis III, ¹⁾ - Voruntersuchungen durchgeführt, jedoch keine Herstellung von Lyophilisaten

Düsen: 1 – Flanschbauteil mit Teflonkonus, 2 – Sprühvorrichtung mit Membranfilter, 3 – Lochflanschbauteil, 4 – DropJet Dosiersystem

3.2.1 Düsen zur Tropfenerzeugung

3.2.1.1 Tropfenerzeugung durch Abtropfen und laminaren Strahlzerfall

Zu Beginn der Versuche waren die verwendeten Teile zur Tropfenerzeugung ebenfalls als Sonderanfertigungen aus einfachen Komponenten konzipiert. In Abbildung 3-1 sind die verschiedenen Bauteile zur Generation von Tropfen zusammengefasst. Alle hier gezeigten Bauteile basieren auf dem Prinzip der Tropfenerzeugung durch Strahlzerfall. Sie sind so konstruiert, dass sie sich mit einer Flanschverbindung einfach an die verwendete Anlage anschließen lassen. Unterschiede bestehen in der Art der Flüssigkeitszufuhr und in der Größe der jeweiligen Düse.

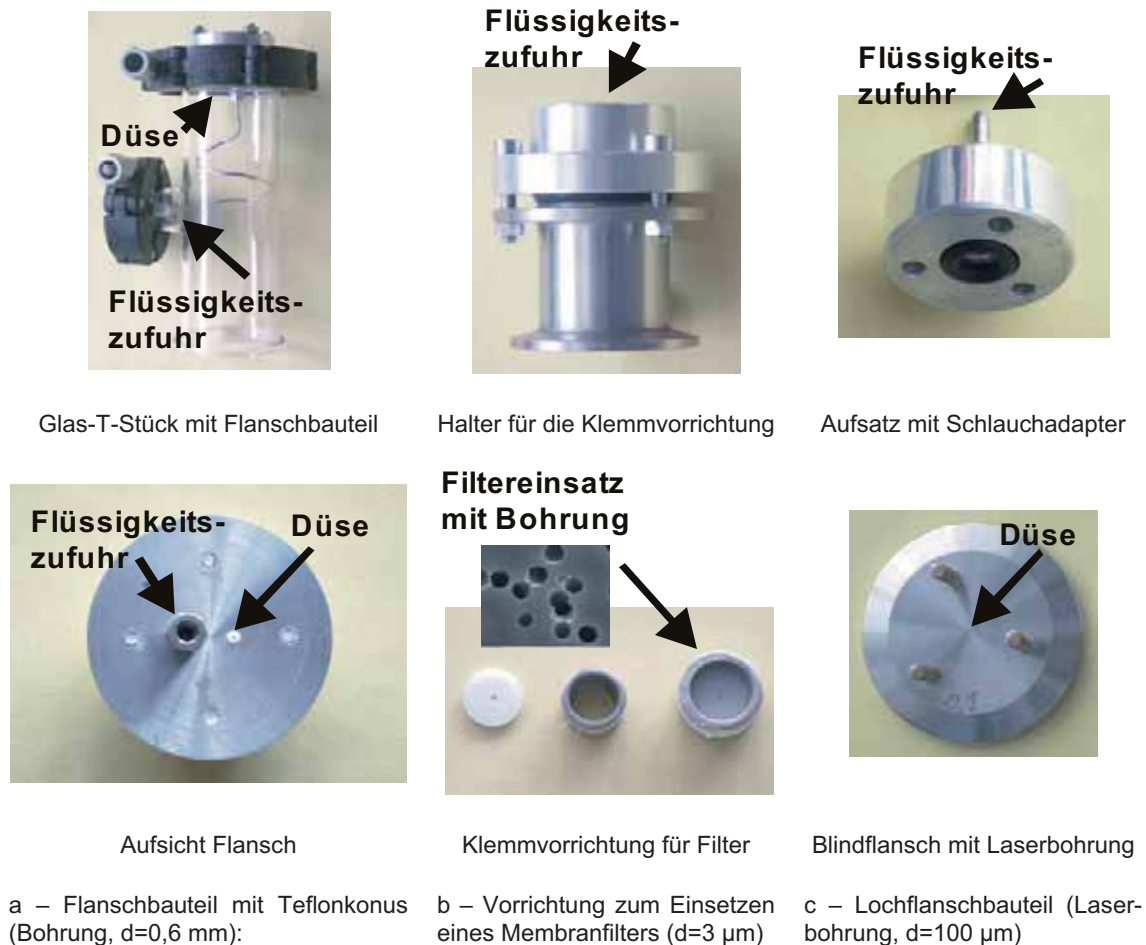


Abb. 3-1 Bauteile zum Erzeugen von Tröpfchen

Pulsierende Vakuuminjektion - Flanschbauteil mit Teflonkonus

Die zu tropfende Lösung wird mit einer HPLC-Pumpe in eine Metallkapillare gepumpt. Unterhalb des Flansches wird die Flüssigkeit zugeführt, gelangt in ein Reservoir oberhalb des Flansches und wird dann durch den angelegten Druck aus der Bohrung des Teflonkonus herausgepresst und in Tropfen zerteilt.

*Kontinuierliche druckunterstützte Vakuumansaugung -
Sprühvorrichtung mit Membranfilter*

Die Tropfen werden dadurch erhalten, dass eine Lösung durch die Öffnungen eines Membranfilters (SPI-Pore™ Polycarbonatfilter 13 mm, Porendurchmesser 3 µm, SPI Supplies/Structure Probe, Inc., US-West Chester) gepresst wird. Dazu wird der Filter in die oben gezeigte Klemmvorrichtung eingespannt. Die Flüssigkeit wird mit einer HPLC-Pumpe oder per Hand mit einer Spritze von oben zugeführt.

Kontinuierliches druckunterstütztes Versprühen mit Vakuuman- saugung oder unter Atmosphärendruck - Lochflanschbauteile

Bei diesem Bauteil wird Flüssigkeit durch Laserbohrungen (Sonderanfertigung Felastec GmbH, CH-Gümlingen) verschiedener Größen gepresst. Laserbohrungen haben den Vorteil, dass sie kleiner und präziser als die mit einer Bohrnadel gefertigten Bohrungen sind. Es wurden 3 Düsen mit 20, 50 und 100 µm Durchmesser angefertigt. Die jeweilige Lösung wird über einen Schlauch zugeführt und zum Versprühen in ein Reservoir über der Bohrung geleitet. Die Flüssigkeitszufuhr erfolgt mit Hilfe einer Spritze oder mit Druckluft, die über einer Flüssigkeitssäule angelegt wird. Die Flüssigkeit kann entweder kontinuierlich durch ein Vakuum angesaugt werden oder durch Überdruck unter Normalbedingungen versprüht werden.

3.2.1.2 Tropfenerzeugung durch Ink-Jet Technologie

DropJet Dosiersystem

Mit dem DropJet Dosiersystem werden nahezu gleichgroße Tropfen auf der Basis des Continuous-Jet Verfahrens erzeugt. Das verwendete Dosiersystem der Firma Microdrop Technologies GmbH (D-Norderstedt) besteht aus folgenden Komponenten:

- Dosierkopf: MJ-K-104-M, NanoJet Dosierkopf mit Modulatoraufsatz und Düse für wässrige Flüssigkeiten, Düseninnendurchmesser 30, 50, 100 µm
- Vorratsbehälter: MJ-V-325-GL, 250 mL Glas, Deckel/Boden PEEK
- Gehäuse: MJ-E-101-42, 42TE Gehäuse und Netzteil
- Druckregelung: MJ-E-130, mit Vorfilter
- Steuerung: MJ-E-110-M, Ansteuerelektronik für MJ-K-104-M

Hauptkomponente des Dosierkopfs ist eine Glaskapillare, die von einem röhrenförmigen Piezoaktuator umgeben ist. Die zu versprühende Flüssigkeit wird oberhalb der Kapillare über einen Schlauch zugeführt und kann zusätzlich mit einem Miniaturmagnetventil (Öffnungsdauer 0,1 ms - 1,98 s) dosiert werden.

Abbildung 3-2 zeigt den Aufbau des Dosierkopfes, der zum Betrieb mit einer Metallhülse verschlossen ist.

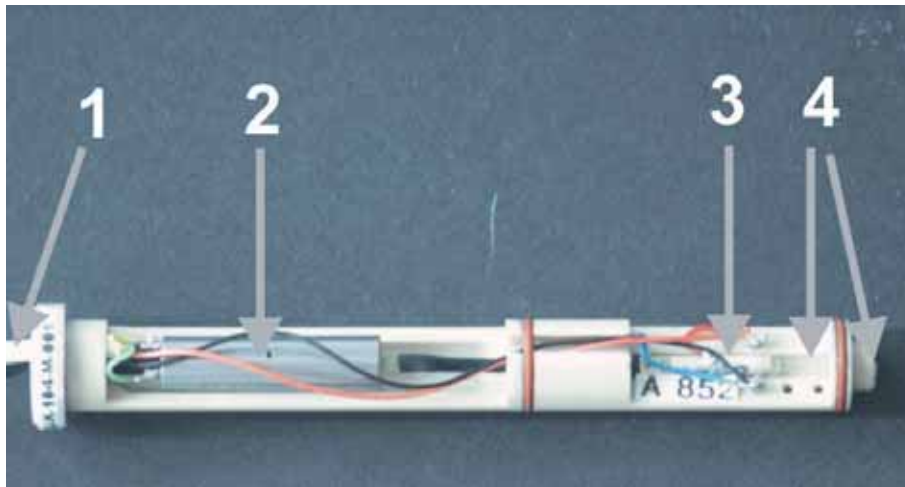


Abb. 3-2 Innenansicht DropJet Dosierkopf

1 – Flüssigkeitszufuhr und Spannungsversorgung, 2 – Miniaturmagnetventil, 3 – Piezogenerator, 4 - Glaskapillare

Über einen Schlauch wird die Flüssigkeit durch einen mit Druck beaufschlagten Vorratsbehälter in den Dosierkopf mit der Kapillare gefördert. Die Kapillare ist so geformt, dass unter Prozessbedingungen eine laminare Strömung vorliegt. Durch Anlegen einer Spannung an den Piezoaktuator beginnt dieser zu schwingen und verformt damit frequenzabhängig die Kapillare. Dadurch wird im laminar fließenden Fluid abwechselnd Über- und Unterdruck erzeugt. Nach Verlassen der Düse führt diese Druckmodulation dazu, dass der Flüssigkeitsstrahl sehr gleichmäßig in einzelne Tröpfchen zerfällt.

Der angelegte Druck am Vorratsgefäß kann maximal bis 350 mbar betragen. Die zu versprühenden Flüssigkeiten können dabei Viskositäten von 0,4 bis 50 mPas aufweisen. Je nach Sprühprozess muss die Frequenz des Piezoactuators angepasst werden, sie kann im Intervall von 25 bis 75 kHz gewählt werden. Die Tropfengröße hängt hauptsächlich vom Durchmesser der Glaskapillare ab. Zum Zeitpunkt der Beschaffung des Dosiersystems betrug der kleinste verfügbare Kapillardurchmesser 30 μm .

In vorangegangenen Versuchen wurde getestet, welcher Kapillardurchmesser für die geplanten Versuche am geeignetsten war. Dabei zeigte sich, dass die 30 μm Düse häufig verstopfte, die Tropfengeneration mit der 50 und 100 μm Düse

hingegen gut funktionierte. Zur Erzeugung kleinstmöglicher Tropfen wurde daher die 50 µm Düse für alle weiteren Versuche ausgewählt.

Vorgehensweise zum Betrieb der DropJet-Düse

Folgende Arbeitsschritte wurden zum Erzeugen von Tropfen ausgeführt:

- Filtration der verwendeten Lösung (MicronSep, Cellulosic, 0,45 µm, Micron Separations Inc., USA-Westborough (MA))
- Befüllen des Vorratsgefäßes mit der filtrierte Lösung
- Einschalten der Steuereinheit
- Einstellen von Druck, Frequenz des Piezogenerators und Öffnungsdauer des Magnetventils
- Öffnen des Magnetventils
- Anlegen von Druck auf das Vorratsgefäß und Versprühen der Lösung

Bei den durchgeführten Versuchen wurde das Magnetventil durch einen externen Trigger (5 V) an der Steuereinheit dauerhaft geöffnet.

3.2.2 Verfahren zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchen im Vakuum (Prototyp I)

Ziel dieses Verfahrens ist es, einzeln erzeugte Tröpfchen im Vakuum einzufrieren und zu trocknen. Dazu wurde der in Abbildung 3-3 dargestellte Prototyp entwickelt und aufgebaut.

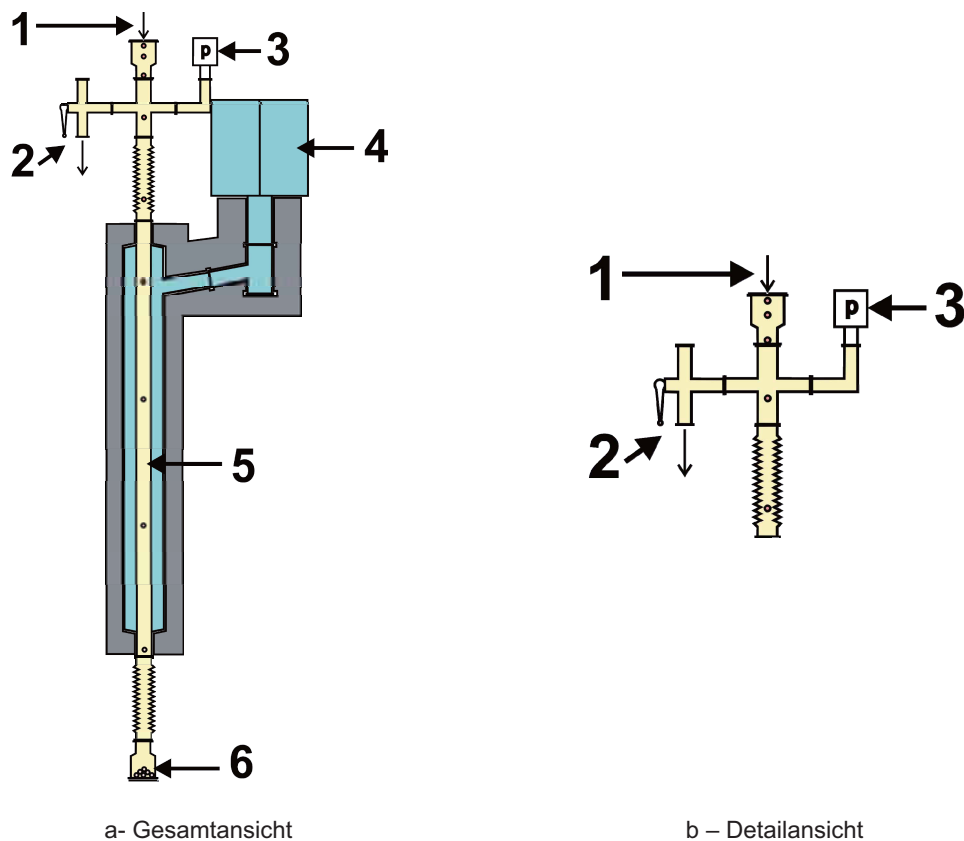


Abb. 3-3 Schematische Zeichnung der Anlage zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchen unter Vakuum

Prototyp I: 1 – Tropfenerzeugung, 2 – Vakuumschluss, 3 – kapazitives Manometer, 4 – Kühlmittelbehälter mit Isolierung, 5 – Einfrier- und Trockenkammer, Isolierung dunkelgrau, 6 - Produktentnahme

3.2.2.1 Beschreibung und Funktionsweise der Anlage

Kernstück der Anlage ist die Einfrier- und Trockenkammer (5). Sie besteht aus einem 100 cm langen VA-Stahlrohr mit 2,5 cm Durchmesser (Sonderanfertigung Institutswerkstatt). Dieses Rohr ist von einem weiteren VA-Stahlrohr ummantelt, und nach Zugabe von Kühlmittel (4) vollständig von diesem umgeben. Die gekühlten Wandflächen des Einfrier- und Trockenrohrs dienen als Kondensator für das verdampfte Lösungsmittel, der Mantel wurde mit Polystyrolschaumstoff thermisch isoliert. Über dem Einfrier- und Trockenrohr wird die jeweilige Vorrichtung zum Erzeugen von Tropfen (1) aufgesetzt. Zusätzliche Anschlüsse für die Vakuumpumpe und ein Manometer befinden sich ebenfalls dort (2,3). Die Sammeleinrichtung (6) für das Produkt ist unterhalb des Einfrier- und Trockenrohrs angebracht. An den Übergängen von kalten zu wärmeren Bauteilen an den Enden des Rohrs sind jeweils Faltenbälge aus dünnem Stahlblech zur Verminderung der Wärmeleitung eingebaut. Zur

Kontrolle der Abläufe während der Herstellung sind die Einsprüh- und die Sammelvorrichtung aus Borosilikatglas gefertigt (Sonderanfertigung Glasbläser).

Bei diesem Anlagenkonzept sind Einfrier- und Trockenschritt nicht exakt voneinander getrennt. Der Einfriervorgang wird durch Anlegen von Vakuum ausgelöst. Gleichzeitig beginnt der Trocknungsvorgang der gefrorenen Teilchen im Vakuum bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts. Die Teilchen werden im Entnahmebehälter gesammelt und können separat nachgetrocknet werden.

Geräte:

Vakuumpumpe Typ RZ6, Vacuubrand GmbH & Co. KG, D-Wertheim

Manometer Baratron[®] Capacitance Manometer 626, MKS Instruments, US-Andover

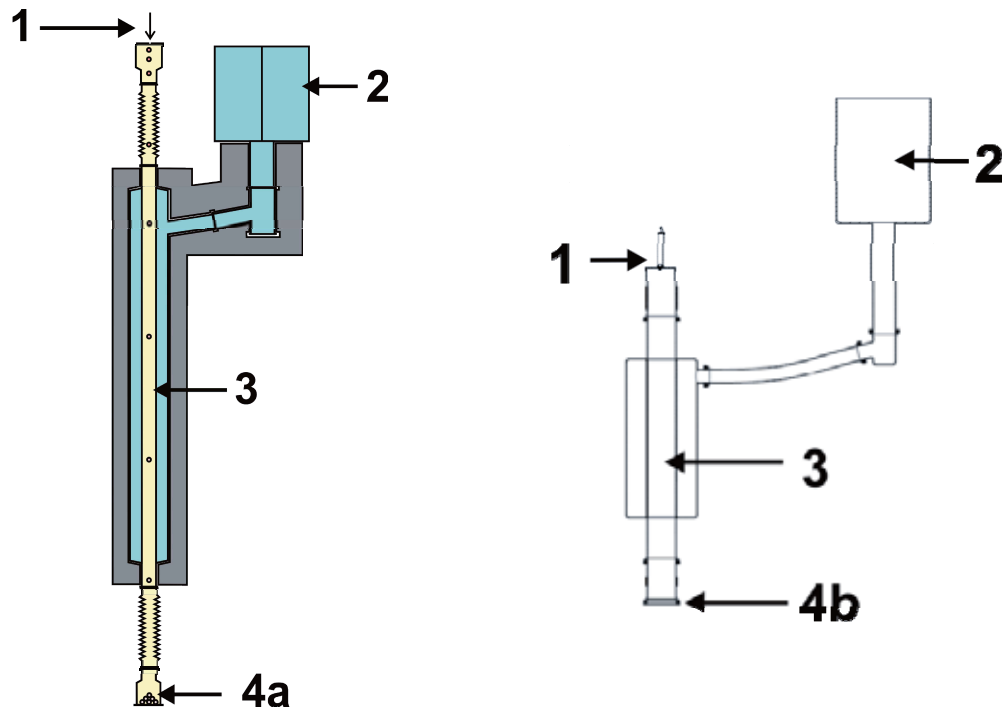
3.2.2.2 Vorgehensweise zum Betrieb der Anlage

Folgende Arbeitsschritte wurden zur Durchführung von Versuchen ausgeführt:

- Vorkühlen für ca. 30 Minuten mit flüssigem Stickstoff
- Evakuierung der Anlage
- Inbetriebnahme der Sprühvorrichtung
- Belüften zur Entnahme des Produkts nach Beenden des Sprühvorgangs

3.2.3 Verfahren zum Einfrieren von Tröpfchen unter Atmosphärendruck (Prototypen IIa und b)

Bei diesem Verfahren werden Tröpfchen erzeugt und unter Atmosphärendruck in einem kalten Gas eingefroren. Die Trocknung der Partikel findet danach separat statt. Die zur Herstellung von Lyophilisaten verwendeten Prototypen IIa und IIb sind in Abbildung 3-4 dargestellt. Der integrierte Trocknungsschritt ist in diesen Anlagentypen noch nicht realisiert und war ursprünglich mit einer separaten Trockenkammer unter dem Einfrierrohr vorgesehen.



a – Prototyp IIa

b – Prototyp IIb, ohne Isolierungen (Zeichnung H. Hesse)

Abb. 3-4 Schematische Zeichnungen der Anlagen zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchen unter Atmosphärendruck

Prototyp II: 1 – Tropfenerzeugung, 2 - Kühlmittelbehälter mit Isolierung, 3 – Einfrierrohr, Isolierung dunkelgrau, 4a/4b – Produktentnahme/ Anschluss für Produktentnahme

3.2.3.1 Beschreibung und Funktionsweise der Anlagen

Die Anlagen bestehen jeweils aus einem doppelwandigen VA-Stahlrohr (3) zum Einfrieren (Sonderanfertigungen Institutswerkstatt). Zur Kühlung wird flüssiger Stickstoff eingesetzt (2). Dadurch wird einerseits das im Rohr vorhandene Gas temperiert, andererseits dienen die kalten Wände als Kondensatorflächen für verdampfendes Lösungsmittel. Zur Isolierung sind die Mantelflächen mit Polystyrolschaumstoff verkleidet. Eine Vorrichtung zum Erzeugen von Tröpfchen (1) wird oberhalb der Einfrierkammer aufgesetzt. Unterhalb dieses Rohrs befinden sich geeignete Sammelbehälter (4a, b) zur Entnahme der Tröpfchen.

Die Prototypen IIa und IIb unterscheiden sich hinsichtlich der Dimensionen der Einfrier- und Trockenkammer:

Prototyp IIa: Länge 110 cm, Durchmesser 2,5 cm

Prototyp IIb: Länge 41 cm, Durchmesser 5,0 cm

An den Enden des Einfrier- und Trockenrohrs befinden sich bei Prototyp IIa Faltenbälge, die bei Prototyp IIb durch Übergangsstücke aus dem gut isolierenden Teflon (Sonderanfertigung Institutswerkstatt) ersetzt wurden.

Nach dem Versprühen der Lösung erfolgt das Einfrieren unter Atmosphärendruck in das tiefgekühlte Trägergas. Für die Durchführung von Prozessen, bei denen besondere Anforderungen an die Umgebungsluft herrschen, es ist auch möglich, die Luft zu filtrieren oder durch ein anderes geeignetes Gas zu ersetzen. Da die Partikel nicht vollständig durchgetrocknet sind, werden sie nach dem Einfrierschritt entnommen und in einem konventionellen Laborgefrieretrockner getrocknet. Eine vollständige Trennung von Einfrier- und Trockenschritt ist schwierig. Da die Partikel jedoch innerhalb von Sekunden das Einfrierrohr passieren, können Trocknungseffekte mit hoher Wahrscheinlichkeit vernachlässigt werden.

Geräte:

Gefrieretrockner Lyovac GT2, Steris GmbH, D-Hürth

Temperaturüberprüfung Messwiderstand Pt100 (-200 bis +850 °C), EPHY-MESS GmbH, D- Wiesbaden - Delkenheim

3.2.3.2 Vorgehensweise zum Betrieb der Anlage

Zur Herstellung von Partikeln wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Vorkühlen der Anlage für ca. 30 Minuten mit flüssigem Stickstoff
- Kühlung des Probengefäßes mit flüssigem Stickstoff in einem Kühlbehälter
- Inbetriebnahme der Sprühvorrichtung (typische Sprühdauer 60 Sekunden)
- Entnahme des Produkts mit Kühlbehälter nach Beenden des Sprühvorgangs
- Separates Nachtrocknen in konventionellem Gefrieretrockner (ca. 16 Stunden)

3.2.4 Verfahren zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefrietrocknung (Prototyp III)

Ursprünglich war vorgesehen, die in Kapitel 3.2.3 vorgestellten Prototypen mit einem zusätzlichen Trockenrohr unterhalb des Einfrierrohrs auszustatten. Die gefrorenen Partikel sollten im Trockenrohr sedimentieren und dabei trocknen. Da somit aber die vollständige Trocknung der Partikel nicht sichergestellt werden kann, wurde ein weiterführendes Konzept entwickelt, das ebenfalls eine separate Trockenkammer vorsieht. Durch die Berücksichtigung unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeiten von Tropfen verschiedener Dichte bietet es die Möglichkeit, die Tropfen bis zum Erreichen des gewünschten Trocknungszustands in der Trockenkammer zu halten.

Das neue Gesamtkonzept zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchenlyophilisaten (Atmospheric Counter-Current Lyophilization, ACD-Lyophilization) im Gegenstromprinzip mit einem kontinuierlichen Verfahren wurde bereits in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben. In diesem Teil der Arbeit wird nun eine vereinfachte Variante der Versuchsanlage vorgestellt, an der verschiedene Voruntersuchungen durchgeführt wurden. Dabei wurden die Einzelkomponenten charakterisiert und die Funktion einzelner ausgewählter Baugruppen überprüft und verbessert.

3.2.4.1 Beschreibung und Funktionsweise der Anlage

Die verwendete Versuchsanlage ist etwas einfacher gebaut als im beschriebenen Konzept zur ACD-Lyophilisation. Untersuchungen zum Einfrieren der Tröpfchen können so besser erfolgen, da diese Funktionseinheit leichter zugänglich ist. Die Anlage ist in Abbildung 3-5 schematisch dargestellt. Kernstück ist die konisch geformte Trockenkammer (2) mit dem eingesetzten Einfrierrohr (1). Das Einfrierrohr wird mit kaltem Gas aus dem Tiefkühlkondensator (8) versorgt. Im Hauptkondensator (4) wird trockenes kaltes Gas erzeugt und nach eventuellem Erwärmen (5) über ein Gebläse (6) in der Anlage verteilt. Dabei sorgt ein Strömungsteiler (7) für die gleichzeitige Versorgung von Tiefkühlkondensator und Trockenkammer. Um für die Trocknung eine laminare Strömung zu erzeugen, wurde unterhalb der Trockenkammer ein Strömungsgleichrichter eingesetzt. Zum kontinuierlichen

Entfernen des anfallenden Kondensats während des Prozesses dienen die Abstreifer (in 4, 8).

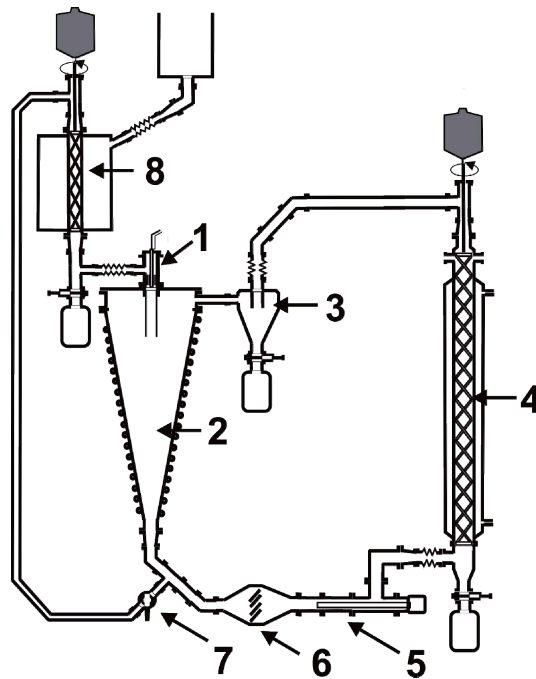


Abb. 3-5 Schematische Zeichnung der Entwicklungsanlage zur Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung

Prototyp III: 1 – Einfrierrohr mit Tropfengenerator, 2 – Trockenkammer mit Kühlschlauch, 3 – Zyklon mit Produktentnahme, 4 – Hauptkondensator mit Abstreifspirale und Kondensatentnahme, 5 – Heizung, 6 – Gebläse, 7 – Strömungsteiler, 8 – Tiefkühlkondensator mit Abstreifer und Kondensatentnahme

Übersicht über die enthaltenen Komponenten:

| | |
|------------------|--|
| Abstreifer | - Aluminium (Anfertigung R.Süverkrüp) |
| Einfrierrohr | - Glas (Sonderanfertigung Glasbläser) |
| Hauptkondensator | - Glas (Sonderanfertigung Glasbläser) |
| Gebläse | - Thermaltake Smart Case Fan II 8cm und 12 cm (Thermaltake Technology Inc. USA-City of Industry, (CA)) - Vario-Pro® 3214 JH3 (ebm-papst GmbH, D-Mulfingen) |
| Heizstab | - Typ P-1-30/E-S 300W 23V (Isa Heiztechnik, D-Falkensee) |
| Kryostaten | - Tisch-Kryomat Typ TK 30 D (Messgerätewerk Lauda, D-Lauda) |

| | |
|------------------------|---|
| | - Thermostat Haake DC5 (Thermo Electron GmbH, D-Karlsruhe) |
| Strömungsteiler | - Kugelhahn DN25 (Ilmvac GmbH, D-Ilmenau) |
| Strömungsgleichrichter | - Aluminium-Wabe, nominale Zellgröße 4,8 mm (Euro-Composites, L-Echternach) |
| Trockenkammer | - Sonderanfertigung (Behälter- und Stahlbau Hüsken, D-Bonn) |
| Tiefkühlkondensator | - VA-Stahl (Sonderanfertigung Institutswerkstatt) |
| Zyklon | - Glas (Sonderanfertigung Glasbläser) |
| Kleinbauteile | - Standardformkörper und Verbindungselemente (Ilmvac GmbH, D-Ilmenau) |

Die Charakterisierung der verwendeten Kryostaten und des Heizstabs ist im Anhang aufgeführt.

3.2.4.2 Messsysteme zur Überprüfung von Temperatur und Strömung

Temperaturmessgeräte

Geeichtes Thermometer AMA-Tiefkühlthermometer (-35 bis +20 °C), AMARELL GmbH, D-Kreuzwertheim

Messwiderstand Pt100, siehe Abschnitt 3.2.3.2

Mantel-Thermoelemente NiCr-Ni „K“ (-200 bis +1200 °C), Jumo GmbH, D-Fulda

Automatische Aufzeichnung der Temperatur:

Software „32 Kanal Monitor“, Ingenieurbüro Hucke, D-Solingen

Anschluss der Thermoelemente

Voltcraft DL-120 TH Mess-Datenlogger (-40 bis +70 °C), Conrad Electronic GmbH, D-Hirschau

Strömungsmessungen

testo 405-V1 Luftströmungs-Messstick (0 bis 5 m/s bei -20 bis 0 °C, 0 bis 10 m/s bei 0 bis +50 °C), Testo AG, D-Lenzkirch

Flügelradanemometer ANEMO 3000 (0,2 m/s bis 30 m/s), TechnoTrade
Import-Export GmbH, D-Wildau

Die Messwiderstände und Thermoelemente sowie die Kryostaten-Thermometer wurden vor der Verwendung mit dem geeichten Thermometer kalibriert. Die Daten zur Kalibrierung sind im Anhang aufgeführt. Zur Aufzeichnung von Temperaturen und Strömung in der Gefriertrocknungsanlage wurden für die Thermoelemente und das Anemometer Flansche mit gesonderten Bohrungen angefertigt.

3.3 Untersuchungen an der Tropfenstrahldüse

3.3.1 Charakterisierung des Abtropfverhaltens

Geräte:

Hochgeschwindigkeitskamera HiSIS (Auflösung 256 x 256), LOT-Oriel GmbH, D-Darmstadt

Objektiv: 90 mm Auto Macro, Panagor

Vorsatzlinse: 62 mm + 4 , Soligor, D- Leinfelden-Echterdingen

Leuchtdiode LED Blau Superhell (Durchmesser 3 mm), Stroboskopbetrieb, Conrad Electronic GmbH, D-Hirschau

Auswertungssoftware: Bildanalyseprogramm Able Image Analyser 3.1b, Mu Labs, SLO- Ljubljana

Durchführung der Messung:

Zur Untersuchung des Abtropfverhaltens wurde die Tropfenstrahldüse wie in Abbildung 3-6 gezeigt zwischen Leuchtdiode und Hochgeschwindigkeitskamera positioniert. Die Düse war an einem Stativ so befestigt, dass ihre Lage nur in vertikaler Richtung verändert werden konnte. Zusätzlich wurde in der gleichen horizontalen Position ein Objektmikrometer eingerichtet und aufgenommen. Die Erzeugung des Tropfenstrahls wurde nach Einschalten der Stroboskopdiode mit der Kamera aufgezeichnet. Die Tropfenbildung wurde sowohl ca. 5 Millimeter als auch 2 bis 6 Zentimeter unter der Düsenöffnung beobachtet.

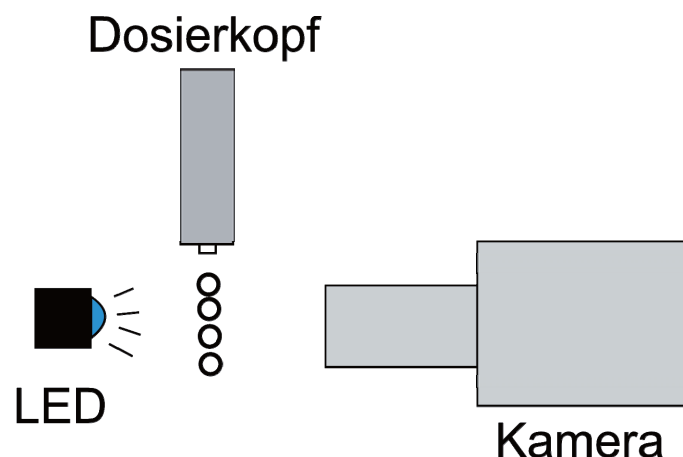


Abb. 3-6 Versuchsanordnung zur Charakterisierung des Abtropfverhaltens von Lösungen

Auswertung:

Zur Auswertung dienten die Einzelframes der aufgezeichneten Videodateien. Die Tropfengröße wurde durch Bildanalyse bestimmt, indem mit dem aufgenommenen Objektmikrometer ein Umrechnungsfaktor in die entsprechende Pixelzahl gebildet wurde. Der Tropfendurchmesser wurde damit von der Software berechnet und ausgegeben.

3.3.2 Optimierung der Frequenz des piezoelektrischen Tropfengenerators

Abhängig vom angelegten Druck variiert bei gegebener Viskosität, Oberflächenspannung und Dichte der Flüssigkeit die optimale Arbeitsfrequenz des Piezogenerators zur Erzeugung monodisperser Tropfen. Für jeden Druck muss daher die Arbeitsfrequenz des Piezoaktuators optimiert werden. Der Hersteller der Düse sieht dafür eine visuelle Beurteilung der erzeugten Tröpfchen mit einem speziell dafür erhältlichen optischen System, das aus einer Stroboskopdiode und einer Kamera (Miniature Camera System, Microdrop Technologies GmbH, D-Norderstedt) besteht. Diese Vorrichtung stand jedoch für diese Versuche nicht zur Verfügung. In vorangegangenen Versuchen wurden Aufnahmen mit der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Hochgeschwindigkeitskamera und einer Stroboskopdiode (MD-O-501, Microdrop Technologies GmbH, D-Norderstedt) gemacht, jedoch schwankte der Sprühstrahl um die Bildebene und wurde nicht immer erkennbar abgebildet. Alternativ wurde daher versucht, die Arbeitsfrequenz des Piezoaktuators für Betriebsdrücke von 50, 100, 150 und 200 mbar durch Beurteilung der durch Laserbeugung bestimmten Tropfengrößenverteilungen zu ermitteln.

Gerät:

Laserdiffraktometer HELOS, Software WINDOX 3.4, Sympatec GmbH,
D-Clausthal-Zellerfeld

Messbedingungen:

Brennweite 500 μm

Messzeit 10 s

Auswertemethode LD (beruhend auf Fraunhofer-Berechnung)

Durchführung der Messung:

Die Düse wurde so eingerichtet, daß der entstehende Sprühstrahl den Messbereich des Laserstrahls in vertikaler Richtung passiert. Da der Sprühstrahl ca. 0,5 cm unterhalb der Düse in Einzeltropfen zerfällt, wurde die Düsenöffnung etwa 2,5 cm über dem Mittelpunkt des aufgeweiteten Laserstrahls fixiert. Zur Untersuchung wurde eine 5 %-ige Mannitollösung versprüht. Die Messung erfolgte vollautomatisch. Für jede Einstellung an der Tropfenstrahldüse wurden die Messungen dreimal durchgeführt.

Auswertung:

Für jeden Versuch wurde die Tropfengrößenverteilung grafisch dargestellt und die Dichteverteilungskurven hinsichtlich der erhaltenen Maxima überprüft. Nahezu monodisperse Verteilungen sind durch einen schmalen symmetrischen Peak gekennzeichnet. Als weitere Auswahlkriterien für die optimale Arbeitsfrequenz wurden der mittlere volumenbezogene Partikeldurchmesser (x_{50}), die Durchmesser unter denen 10 und 90 % der Verteilung liegen (x_{10} , x_{90}) sowie der Span-Faktor (b) ermittelt. Der Span-Faktor wird wie folgt berechnet:

$$b = \frac{x_{90} - x_{10}}{x_{50}} \quad \text{Gl. 3-1}$$

b – Span-Faktor, x_n – volumenbezogener Durchmesser bei dem n % der Verteilung unter diesem Durchmesser liegen ($n=10, 50, 90$) [μm]

Er ist ein Maß für die Breite der Verteilung und sollte möglichst gering sein (vergleiche Kapitel 2.2.1.1).

3.3.3 Durchsatz

Gerät:

Analysenwaage AG 204, Mettler Toledo GmbH, D- Gießen

Durchführung der Messung:

In ein tariertes Becherglas wurde destilliertes Wasser je 5 Minuten lang bei verschiedenen Betriebsbedingungen mit der Tropfenstrahldüse versprüht.

Auswertung:

Das versprühte Wasservolumen pro Zeit wurde bestimmt.

3.3.4 Charakterisierung des Sprühstrahls

Bei den Versuchen mit der Tropfenstrahldüse zeigte sich das Phänomen, dass der Sprühstrahl mit zunehmender Entfernung von der Austrittsöffnung breiter wurde und die erzeugten Tröpfchen beim Einfrieren an den Wänden des Einfrierrohrs hafteten. Deshalb wurde der Durchmesser des Sprühstrahls in Abhängigkeit vom angelegten Druck und in verschiedenen Abständen von der Austrittsöffnung untersucht.

Geräte:

Programmierbarer Zahnriemenantrieb:

Steuerungssoftware: „32 Kanal Monitor“, Ingenieurbüro Hucke, D-Solingen

Digital-Analog-Wandler: NI PCI-6024, National Instruments, D-München

Verstärker: Typ DCP/560/60 B, Servowatt, D- Gerlingen,
Ausgangsspannung -10 bis 10 V

Zahnriemen-Linearantrieb: LZR 2025-25-16, Maschinenbau Kitz, D-Troisdorf, Nutzlänge 0,45 m, max. Beschleunigung 79 m/s², max. Geschwindigkeit 10 m/s

Motor: Typ 55NM81-120-2, Honeywell, USA-Morristown (NJ), Leistung 280 W, Drehmoment 3 Nm, max. Winkelbeschleunigung 143000 rad/s²

Kamera: Fujifilm FinePix S6500fd (Auflösung 2848 x 2136 Pixel), FUJIFILM Electronic Imaging Europe GmbH, D- Düsseldorf

Auswertungssoftware: siehe Abschnitt 3.3.1

Diese Apparatur wurde ursprünglich zur Simulation menschlicher Schüttelprofile konzipiert und wird daher in anderen Zusammenhängen auch als „Schüttler“ bezeichnet.

Versuchsaufbau:

Zur Sichtbarmachung des Sprühstrahls wurde Methylenblaulösung auf ein DIN A4 – Blatt Inkjetpapier gesprüht. Dieses Papier besitzt einen speziellen Aufbau und sorgt für eine scharfe Abbildung von Tintentropfen ohne Verlaufen. Für die Versuche wurde der Dosierkopf wie in Abbildung 3-7 dargestellt oberhalb des Blattes fixiert. Das Blatt wurde auf eine Unterlage, die an einen fahrbaren Wagen montiert war, geklemmt. Der Sprühstrahl wurde erst aufgesprüht, wenn sich der Wagen mit dem Papier darunter hinweg bewegte. Dadurch sollte

sichergestellt werden, dass Anfangs- und Endeffekte bei der Tropfenbildung vor der Abbildung der Tröpfchen ausgeschaltet werden.

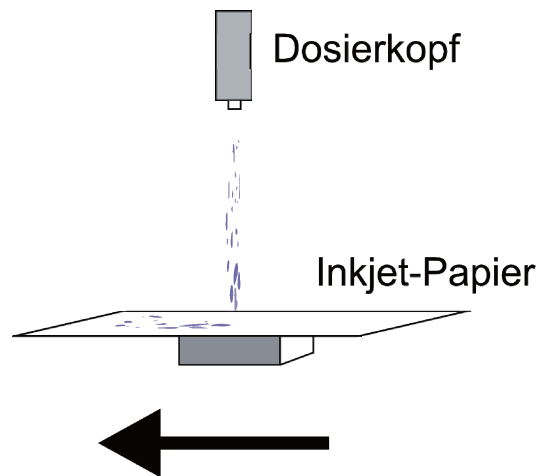


Abb. 3-7 Versuchsaufbau zur Charakterisierung des Sprühstrahls

Durchführung der Messung:

Für die Untersuchung des Sprühstrahls wurde eine 0,01 %-ige Methylenblau-Lösung versprüht. Das Papier wurde vor der Düse positioniert. Zu Beginn der Messung wurde die Düse eingeschaltet. Nach ca. 15 Sekunden wurde der Wagen mit dem Papier gestartet, bewegte sich mit einer konstanten Geschwindigkeit von 15 cm/s unter dem Sprühstrahl hindurch und die einzelnen Tröpfchen wurden auf das Papier aufgetragen. Dabei wurden die Abstände vom Dosierkopf zum Papier wie folgt variiert: von 25 bis 50 cm in 5 cm Abstand, von 50 bis 100 cm in 10 cm Abstand. Bei geringeren Abständen des Dosierkopfs zum Papier waren einzelne Tropfen nicht erkennbar. Zum Vergleich wurde die Breite des Strahls nach 5 cm ermittelt.

Auswertung:

Zur Beurteilung der gesamten Breite des Sprühstrahls wurden die erhaltenen Sprühbahnen mit einem Lineal vermessen. Zusätzlich wurde jede erhaltene Bahn zusammen mit einem Stück Millimeterpapier als Maßstab für die Tropfengröße fotografiert. Anhand der Fotos wurden mit der Bildanalysesoftware die Lagekoordinaten der einzelnen Tropfen bestimmt. Für jeden Tropfen wird dabei ausgegeben auf welchem Pixel des Bildes sich sein Mittelpunkt in Bewegungsrichtung (x-Achse) und senkrecht zur Bewegungsrichtung (y-Achse) befindet, siehe Abbildung 3-8. Zur Bestimmung der Streuung des Sprühstrahls senkrecht zur Bewegungsrichtung wurde für

jedes Bild ein Umrechnungsfaktor mit dem aufgenommenen Millimeterpapier ermittelt und die erhaltenen Koordinaten für die y-Achse in Millimeter umgerechnet. Von den errechneten Streuungskoordinaten wurde die Standardabweichung bestimmt.

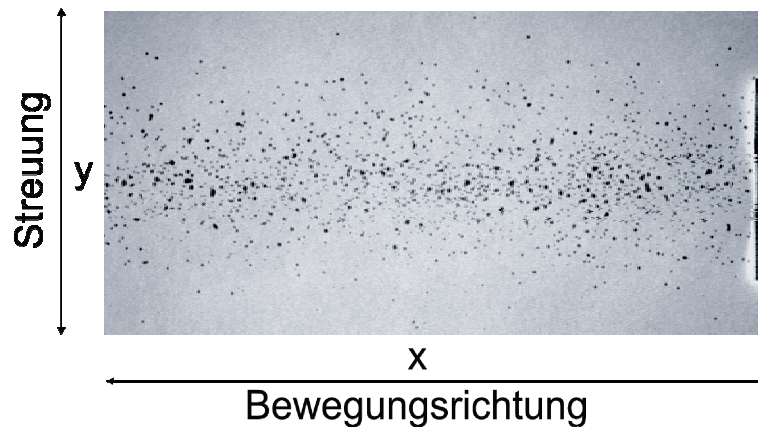


Abb. 3-8 Streuung der Einzeltropfen des Sprühstrahls senkrecht zur Bewegungsrichtung des InkJet-Papiers (Abstand zur Düsenöffnung 60 cm, Sprühdruk 200 mbar)

3.4 Charakterisierung von Sphärolyophilisaten

3.4.1 Charakterisierung der Ausgangslösungen

Die Eigenschaften der verwendeten Lösungen beeinflussen die Herstellung von Sphärolyophilisaten. So haben Oberflächenspannung und Viskosität Einflüsse auf den Tropfenbildungsprozess, siehe auch Abschnitt 2.2.1. Die Glasübergangstemperatur ist ein wichtiger Parameter für die Durchführung des Einfrier- und Primärtrocknungsschritts im Gefriertrocknungsprozess.

3.4.1.1 Viskosität

Gerät:

Rotationsviskosimeter Haake RheoStress 1, Software Haake RheoWin,
Thermo Fisher Scientific, D-Karlsruhe

Messeinrichtung:

Doppelspalt Zylinder- Becher- Einrichtung
Rotor DG 43 DIN 53544 Ti, Messbecher DG 42 RO (Doppelspalt), Thermo
Fisher Scientific, D-Karlsruhe

Messprogramm:

Temperieren der Lösung im Messbecher auf $20 \pm 1,0$ °C
stufenweise Änderung der Schergeschwindigkeit von $0,01 \text{ s}^{-1}$ bis 100 s^{-1}
Messung bei konstanter Schergeschwindigkeit von 100 s^{-1} für 60 s
stufenweise Änderung der Schergeschwindigkeit von 100 s^{-1} bis $0,01 \text{ s}^{-1}$

Durchführung:

Zuerst wurde die Nullpunktposition der Messeinrichtung am Gerät eingestellt. Danach wurden 11,5 ml der Prüflösung in den Becher eingefüllt. Die Temperierung und Messung erfolgte vollautomatisch.

Auswertung:

Die Mittelwerte der gemessenen Viskositätswerte bei einer Scherrate von 100 s^{-1} wurden ermittelt. Alle Proben wurden dreimal gemessen.

3.4.1.2 Oberflächenspannung

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

Gerät:

Krüss Prozessor-Tensiometer K100, Software LabDesk™, Krüss GmbH, D-Hamburg

Messeinrichtung:

Platinplatte PL21, Krüss, D-Hamburg

Probegefäß SV10 Glas Vessel

Messbedingungen:

Messtemperatur $20 \pm 0,3$ °C

Detektionsgeschwindigkeit 10 mm/min

Detektionsempfindlichkeit 0,005 g

Eintauchtiefe 3,00 mm

Anzahl der Werte zur Mittelwertbildung 10

Standardabweichung 0,2 mN/m

Durchführung der Messung:

Das Probengefäß und die Platinplatte wurden vor jeder Messung gereinigt und ausgeglüht. Das Probengefäß wurde mit 10 bis 20 ml Prüflösung vorgespült und zu 2/3 mit Prüflösung befüllt. Anschließend wurde die Lösung 10 Minuten temperiert.

Die Messung erfolgte vollautomatisch.

Auswertung:

Der Mittelwert aus den letzten 10 Werten mit einer Standardabweichung $\leq 0,2$ mN/m wurde berechnet.

3.4.1.3 Glasübergangstemperatur

Die Glasübergangstemperatur ausgewählter Lösungen wurde mittels dynamischer Differenzkalorimetrie untersucht.

Gerät:

DSC Pyris 1, Software Pyris Thermal Analysis System Version 3.72, Perkin Elmer, D- Überlingen

Messmethode: dynamische Leistungsdifferenzkalorimetrie

Probentiegel: 50 μ L, geschlitzt, Typ BO14-3019

Messprogramme

Kühlen von 20°C auf -70 °C, Kühlrate von 10 K/min

Temperatur 1 min bei -70 °C halten

Heizen von -70 bis 40 °C, Heizrate: 10 K/min

Durchführung:

Mit einer Insulinspritze wurden ca. 10 bis 25 mg der Lösung in das Unterteil des Tiegels gegeben. Der Tiegel wurde anschließend mit einem Deckel versehen und mit einer Verschlusspresse verschweißt. Die Probe wurde 30 Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dann wurde der Tiegel in die Probenkammer des Geräts eingebracht, die Probenkammer geschlossen und die Messung gestartet. Alle Proben wurden dreimal gemessen.

Auswertung:

Zur Auswertung wurde das aufgezeichnete Wärmestrom-Zeit-Diagramm herangezogen, in dem ein Glasübergang als Stufe sichtbar ist. Zur Kontrolle diente die erste Ableitung dieses Diagramms, hier ist der Glasübergang als Peak erkennbar. Mit Hilfe der Software wurde aus der Differenz des Wärmestroms, der Probenmasse und der Temperaturdifferenz vor und nach dem Glasübergang die spezifische Wärmekapazität c_p berechnet. Als Glasübergangstemperatur wurde die Temperatur gewertet, bei der die Änderung der spezifischen Wärmekapazität zur Hälfte erfolgt war.

3.4.2 Charakterisierung der Lyophilisate

Die in dieser Arbeit untersuchten Sphärolyophilisate wurden in sehr kleinen Mengen hergestellt. Dabei enthielt eine Herstellungsladung nur wenige Milligramm Lyophilisat. Zur Charakterisierung der Sphärolyophilisate wurden daher Methoden eingesetzt, die zur Untersuchung kleiner Feststoffmengen

geeignet sind. Prüfmethode des Arzneibuchs wurden entsprechend modifiziert.

3.4.2.1 Partikelgrößenverteilung

Geräte:

Mikroskop: Stereo Mikroskop SM 6F, Hund GmbH, D-Wetzlar

Kamera: JVC TK-C1380E Color Video Camera (Auflösung 752 x 582 Pixel),
JVC Deutschland GmbH, D- Friedberg

Aufnahmesoftware: WinTV 2002, Hauppauge Computer Works Inc., USA-
Hauppauge (NY)

Auswertungssoftware: Bildanalyseprogramm Able Image Analyser 3.1b, Mu
Labs, SLO- Ljubljana

Durchführung:

Probenvorbereitung

Es wurde ca. 0,1 mL Probe entnommen und die Partikel in einer Schicht gleichmäßig verteilt auf einen Objektträger aufgetragen. Zum Dispergieren wurde das Pulver auf eine oszillierende Abrutschrinne gegeben. Unter der schwingenden Rinne wurde der Objektträger entlanggeführt, der mit doppelseitigem Klebeband bestückt war. Die Partikel ließen sich gleichmäßig verteilen und hafteten auf dem Klebeband.

Partikelgrößenverteilung

Die Partikelgrößenverteilung wurde durch Bildanalyse bestimmt. Dazu wurden die Partikel auf einem Objektträger präpariert und unter dem Mikroskop vor einem schwarzen Hintergrund aufgenommen. Die Bilder wurden digital gespeichert und mit dem Bildanalyseprogramm ausgewertet. Pro Lyophilisatprobe wurden ca. 300 bis 500 Partikel analysiert, das entspricht je nach Präparat etwa 7 bis 13 Aufnahmen.

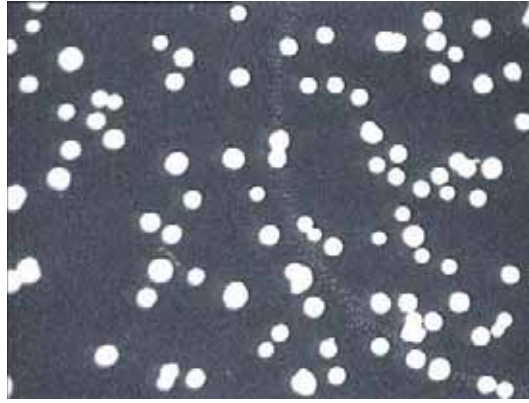


Abb. 3-9 Beispielaufnahme eines Lyophilisats (Zusammensetzung: Mannitol 10 %, Sprühbedingungen: $p=100$ mbar, $f=73$ kHz)

Auswertung:

Von den Präparaten wurden mehrere Einzelbilder mit der Kamera aufgenommen. Zusätzlich wurde ein Bild eines Objektmikrometers mit derselben Vergrößerung aufgezeichnet.

Mit dem Bildanalyseprogramm wurde zunächst mit einem Objektmikrometer ein Umrechnungsfaktor für den Größenmaßstab in die entsprechende Pixelzahl bestimmt. Die jeweilige Bilddatei wurde geöffnet und vor der Berechnung invertiert. Dann wurde ein Schwellenwert eingestellt bei dem die nun schwarzen Partikel optisch getrennt vor dem nun weißen Hintergrund erscheinen. Für die Berechnung wurde die Pixelzahl eingeschränkt um fehlerhafte Ergebnisse durch Artefakte auszuschließen. Die Software berechnet anhand der Pixelzahl die Flächen der Einzelpartikel. Aus den kreisförmigen Projektionsflächen der Lyophilisate wurde der Partikeldurchmesser ermittelt. Daraus können die x_{10} , x_{50} und x_{90} -Werte der Verteilung sowie der Span-Faktor (siehe Gleichung 2-12) berechnet werden.

3.4.2.2 Restfeuchte

Gerät:

Thermogravimetric Analyzer TGA 7, Software Pyris Thermal Analysis System
Version 3.72, Perkin Elmer, D- Überlingen

Messprogramm 1 (Prüfen auf Zersetzung)

Temperatur für 1 min bei 60 °C halten

Heizen von 60 °C auf 300 °C, Heizrate 5 °C/ min

Temperatur für 20 min auf 300 °C halten

Messprogramm 2 (Restwassergehalt):

Temperatur für 1 min bei 60 °C halten

Heizen von 60 °C auf 130 °C, Heizrate 10 °C/ min

Temperatur für 30 min bei 130 °C halten

Durchführung:

Vor Beginn der Messung wurde der Platintiegel ausgeglüht, nach dem Abkühlen wurde der Tiegel in die Waagenhalterung eingehängt und tariert. Anschließend wurde er vollständig mit 1 bis 4 mg Sphärolyophilisatpulver befüllt, die Masse registriert und das jeweilige Messprogramm gestartet. Die Messung erfolgte vollautomatisch.

Auswertung:

Aufgenommen wurde die Massenänderung pro Zeit und Temperatur. Als Zersetzungstemperatur wurde der Wendepunkt vor dem maximalen Masseabfall im Masse-Temperatur-Diagramm berechnet.

Für die Bestimmung der Restfeuchte wurde die Differenz von Anfangs- und Endmasse errechnet.

3.4.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Geräte:

Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-2460 N, Hitachi Ltd., J-Tokyo

Sputter Polaron SC 7640 Sputter Coater, Quorum Technologies Ltd., UK-East Grinstead

Probenvorbereitung:

Fragmentierung der Lyophilisate

Zur Untersuchung des Partikelinneren wurde eine Spatelspitze des Sphärolyophilisatpulvers in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff eingefroren und vorsichtig mit einem Pistill zerstoßen. Die Fragmente wurden wie unten fixiert.

Probenfixierung

Die Lyophilisate wurden auf mit doppelseitigen Klebeetiketten (Zweckform GmbH, D- Holzkirchen) versehene Aluminiumnieten aufgebracht.

Anschließend wurde ein Tropfen Leitsilber zwischen Klebeetikett und Niete aufgetragen.

Aufbringen einer leitfähigen Goldbeschichtung

Sputtern: Stromstärke 25 mA, Dauer 3 x 2 Minuten

Arbeitsvakuum: $5 \cdot 10^{-5}$ mbar

REM- Messbedingungen:

Beschleunigungsspannung je nach Vergrößerung 5, 7 und 10 kV

Durchführung:

Die mit Gold bedampften Proben wurden in einen Probenhalter eingespannt und im Rasterelektronenmikroskop untersucht.

3.4.2.4 Spezifische Oberfläche

Die spezifische Oberfläche wurde mit der BET-Methode bestimmt.

Gerät:

Quantasorb Sorption System, Software Quant2PC, Version 1.1,
Quantachrome Corporation, US-Syosset

Probenzelle: Capillary Cell

Durchführung:

Zunächst wurden etwa 15 bis 20 mg der Probe für 2 Stunden bei 50 °C ausgegast. Anschließend wurde sie in die Messstation eingesetzt. Die Messung erfolgte halbautomatisch.

Die Adsorption und Desorption von Stickstoff an die Probe wurden manuell gestartet. Anschließend erfolgte eine Kalibrierung des Gasvolumens mit Hilfe von Präzisionsprobenspritzen. Diese Prozedur wurde jeweils für 3 Gasmischungen (10 %, 20 %, 30 % eines Stickstoff-Helium-Gemischs) durchgeführt.

Nach der Messung wurde die Probe gewogen und das Probengewicht in ein vorgefertigtes Datenblatt der Software eingetragen. Die spezifische Oberfläche wurde von der Software berechnet und ausgegeben.

3.4.2.5 Rekonstitutionszeit

Durchführung:

Es wurde die Zeitdauer bestimmt, in der sich das Lyophilisat, ohne einen deutlich sichtbaren Rückstand zu hinterlassen, aufgelöst hat. Dafür wurden je 50 mm³ der Lyophilisate mit einer Dosiervorrichtung abgemessen und in ein 20 mL Becherglas mit 2 mL destilliertem Wasser bei Raumtemperatur gegeben. Da die Probenmenge sehr gering war und sich die Partikel teilweise sehr schnell auflösten, erfolgte die Zeitmessung entweder mit einer Stoppuhr oder durch Aufnahme mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (HiSIS 2002, LOT-Oriel GmbH, D-Darmstadt) mit integrierter Zeitaufzeichnung.

3.4.2.6 Wasserdampfaufnahme

Gerät:

Dynamic Vapour Sorption DVS-1, Software DVS Win 2.18 und DVS Standard Analysis Suite 4.3, Surface Measurement Systems Ltd., UK-Alperton

Messbedingungen:

Temperatur 25 °C

Stickstofffluss 200 mL/ min

Messprogramm

Einstellen auf relative Feuchte 0 %

stufenweise Steigerung der relativen Feuchte um 10 % bis zu 98 %

Beginn der Folgestufe wenn Massenänderung (dm/dt) kleiner 0,002 (%/min)

Durchführung:

Vor jeder Messung wurde das Glaspfännchen gereinigt. Nach Trieren der Waage wurden die Lyophilisate in das Glaspfännchen gegeben, die Probe gewogen und die Messung gestartet. Für die Bestimmung von Sphärolyophilisaten wurden je 5 bis 10 mg Pulver für eine Messung verwendet.

Auswertung:

Für jede Stufe wurde die Massenänderung pro Zeit bestimmt.

3.4.2.7 Schütt- und Stampfdichte

Geräte:

Analysenwaage AG 204, Mettler Toledo GmbH, D- Gießen

Stampfvolumeter SVM 22, Erweka GmbH, D- Heusenstamm

Durchführung:

Schüttdichte

Zur Bestimmung der Schüttdichte wurde das Pulver lose in ein graduiertes Standardreaktionsgefäß mit konischem Boden (Kapazität 1,5 mL) gefüllt. Die Füllhöhe wurde notiert. Anschließend wurde das gefüllte Vial gewogen, vollständig entleert und das Gefäß mit Wasser bis zum markierten Füllvolumen aufgefüllt. Die Masse von Wasser bei einer Temperatur von 20 °C wurde ebenfalls bestimmt und in das entsprechende Volumen umgerechnet. Die Schüttdichte ergibt sich aus der Pulvermasse pro Volumen.

Stampfdichte

Zur Bestimmung der Stampfdichte wurde das Pulver in ein zylindrisches Glasmikrovial (Höhe 30 mm, Durchmesser 10 mm) gefüllt und die Füllhöhe wurde gekennzeichnet. Danach wurde das Gefäß am Zylinder des Stampfvolumeters befestigt. In Anlehnung an die Bestimmung zur Stampfdichte nach dem Europäischen Arzneibuch wurde nach 500 Stampfungen des Zylinders erneut die Füllhöhe des Pulvers bestimmt. Aus der Füllhöhe wird wiederum das Volumen ermittelt und aus der Massendifferenz des befüllten und des leeren Gefäßes die Pulvermasse ermittelt. Die Stampfdichte ergibt sich aus der Pulvermasse pro Volumen.

Hausner-Faktor

Der Hausner-Faktor ist eine dimensionslose Kennzahl und dient zur Bewertung der Fließfähigkeit von Haufwerken. Zur Berechnung wird der Quotient aus Stampf- und Schüttdichte gebildet (Gleichung 3-2).

$$HF = \frac{\rho_{tapped}}{\rho_{bulk}} \quad \text{Gl. 3-2}$$

HF – Hausner-Faktor, ρ_{tapped} – Stampfdichte [g/cm³], ρ_{bulk} - Schüttdichte [g/cm³]

Die Versuche wurden je dreimal durchgeführt.

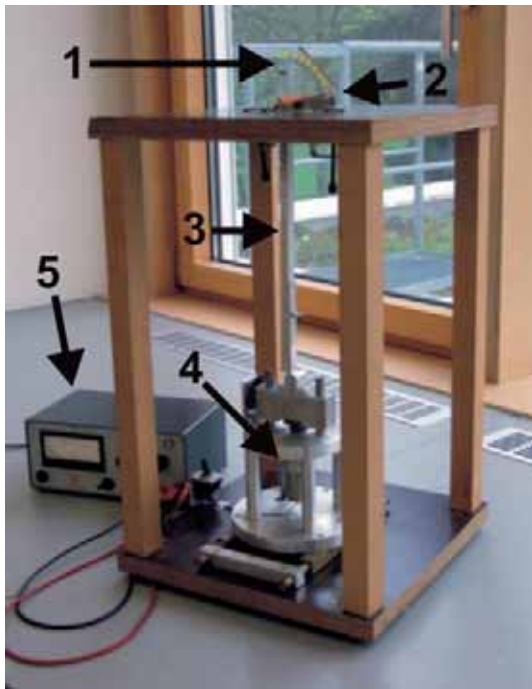
3.4.2.8 Fließeigenschaften

Das Fließverhalten von Pulvern kann auf verschiedene Weise charakterisiert werden. Im Europäischen Arzneibuch werden die Bestimmung des Schüttwinkels, die Bestimmung des Kompressibilitätsindex, die Durchflussrate durch eine Düse und die Verwendung einer Scherzelle als die am häufigsten zitierten Methoden zur Ermittlung des Fließ- und Verdichtungsverhaltens von Schüttgütern beschrieben [20]. Daneben existiert eine Vielzahl weiterer Methoden, zu denen auch die Bestimmung des Abrutschwinkels zählt. Alle Methoden liefern unterschiedliche Ergebnisse, deshalb sind nur unter gleichen Bedingungen erhaltene Werte miteinander vergleichbar.

Für die Bestimmung des Fließverhaltens sehr kleiner Pulvermengen wurde die bereits vorhandene Apparatur zur Bestimmung der Haftfestigkeit von Trägerlyophilisaten (siehe Kapitel 3.6.2.6) modifiziert und mit einer gesonderten Messvorrichtung versehen. Das Messprinzip beruht auf der Bestimmung des Abrutschwinkels des Pulvers.

Gerät:

Das Gerät ist in Abbildung 3-10 dargestellt. Die eigentliche Messvorrichtung besteht aus einem beweglichen Probenstisch (2), auf den die Pulverprobe aufgebracht wird. Um ein Rutschen der unteren Pulverlage zu verhindern, ist dieser mit Sandpapier (Körnung 160) beschichtet. Der Probenstisch ist über ein Gestänge (3) an einen Gleichstrommotor (4) gekoppelt, sodass er sich bei der Messung mit gleich bleibender Geschwindigkeit bewegt. Der Motor wird mit einer regelbaren Spannungsversorgung angetrieben. Dabei kann die Drehrichtung des Motors durch Umkehrung der Polarität verändert werden. Der Abrutschwinkel wird direkt an der Winkelskala (1) hinter dem Probenstisch abgelesen.



Gesamtansicht



Detail: Vorrichtung zum Auftragen des Pulvers mit Winkelskala

Abb. 3-10 Gerät zur Bestimmung der Fließfähigkeit kleiner Pulvermengen

1 – Winkelskala, 2 – Proben­­tisch, bewegliche Rampe, 3 – Gestänge, 4 – Gleichstrommotor, 5 - Spannungsversorgung

Durchführung:

Das Pulver wurde mit Hilfe einer Schablone (Einfüllvolumen 40 mm^3) auf die Messposition der Rampe aufgetragen. Um Einflüsse durch die Luftfeuchtigkeit auszuschließen, wurde neben der Messvorrichtung eine Schale mit Silicagel aufgestellt und eine Glasglocke über die gesamte Messeinrichtung gestülpt. Zum Beginn der Messung wurde der Motor (Geschwindigkeit: $0,892 \text{ mm/min}$) aus der unteren Position gestartet. Der Motor wurde gestoppt wenn das Pulver anfang zu fließen. Anschließend wurde die Glasglocke entfernt und der Abrutschwinkel durch Ablesen der Position des Proben­­tischs vor der Winkelskala ermittelt.

3.4.2.9 Sedimentationsgeschwindigkeit

Mit dieser Methode wird untersucht, mit welcher Geschwindigkeit sich die Einzelpartikel eines ausgewählten Partikelkollektivs in ruhender Luft bei Raumtemperatur bewegen. Die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit dient auch zur experimentellen Bestimmung des aerodynamischen Durchmessers.

Versuchsaufbau:

Der experimentelle Aufbau zur Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit ist schematisch in Abbildung 3-11 gezeigt. Hauptbestandteil ist ein Fallrohr aus Glas, dessen Boden stabil auf einem kleinen Tisch montiert ist (Ansicht a). Das Rohr hat eine Länge von 150 cm und einen Durchmesser von 10 cm. Am oberen Ende des Fallrohrs befindet sich im Zentrum eine Vorrichtung zur Aufgabe des Pulvers. Sie besteht aus einer Probenkammer, unter der ein Schieber mit einer zentralen Bohrung beweglich eingebaut ist (Ansicht b). Der Schieber kann durch Auslösen eines seitlich angebrachten pneumatisch betriebenen Zylinders in horizontaler Richtung verschoben werden. Befindet sich die Öffnung des Schiebers unter der Probenkammer, fällt die entsprechende Probe in das Fallrohr hinein (Ansicht c).

Zum Auffangen der Einzelpartikel dient am unteren Ende des Fallrohrs ein fahrbares, schwarz lackiertes Aluminiumblech (100 x 8 cm) als Auffangband (Ansicht d). Damit die Partikel haften, wird es mit einem transparenten Klebeband präpariert. Vor Versuchsbeginn wird das Auffangband unter dem Fallrohr in einem Schlitz des Fußes positioniert und mit einer programmierbaren Schubvorrichtung verbunden. Als Antrieb diente eine programmgesteuerte Anlage, die ursprünglich für die Simulation von menschlichen Schüttelprofilen zur Prüfung der Redispergierbarkeit von Suspensionsarzneimitteln entwickelt wurde. Die Anlage besteht aus einem 12-bit-Digital-Analog-Wandler, der Werte vom digitalen Ausgang des Computers in eine Spannung umsetzt, die nach Verstärkung zur Ansteuerung eines Gleichstrommotors verwendet wird. Dessen Drehrichtung hängt von der Polarität der Eingangsspannung ab, seine Drehzahl ist dem Betrag der Spannung proportional. Über einen Zahnriemen-Linearantrieb wird die Rotation in eine lineare Bewegung umgewandelt, die auf das Auffangband übertragen wird. Die Bewegung des Auffangbandes wird mit einer Software gesteuert und synchron zur Bewegung des Schiebers ausgelöst. Die Vorschubgeschwindigkeit des Bandes wird durch konstante numerische Werte bestimmt, die im Computer aus einer Datei mit wählbarer Geschwindigkeit eingelesen werden. Der Beginn des Vorschubs kann dadurch verzögert werden, dass die entsprechenden Werte für die Geschwindigkeit in der Datei gleich Null gesetzt werden. Das Band bewegt sich, bei Bedarf nach

einer Verzögerungszeit, mit gleich bleibender Geschwindigkeit in horizontaler Richtung unter dem Fallrohr hinweg. Die effektive Messstrecke beträgt 40 cm. Die Bedingungen (Verzögerungszeit, Geschwindigkeit) für die Bewegung des Auffangbandes sind abhängig von der Fallgeschwindigkeit des Partikelkollektivs und wurden für den jeweiligen Versuch experimentell ermittelt.

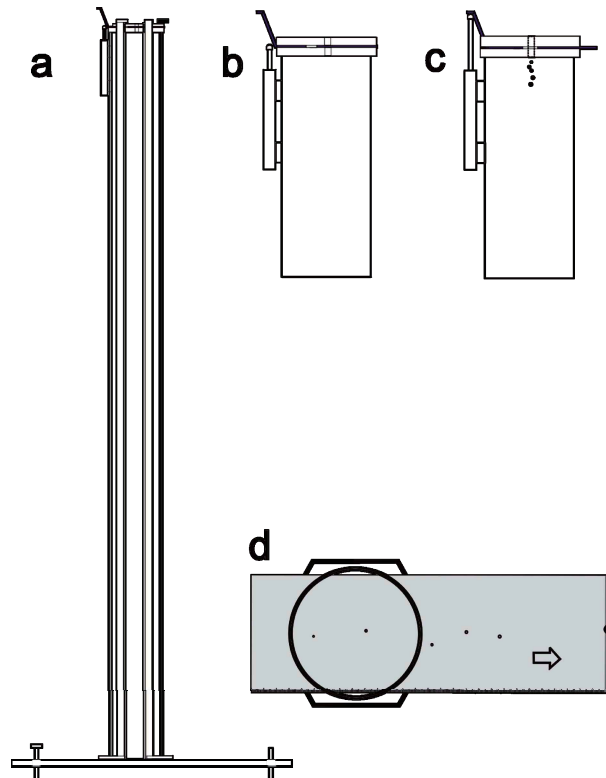


Abb. 3-11 Fallrohr zur Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit a – Gesamtansicht des Fallrohrs, b – geschlossene Probenkammer (Ausschnitt aus a, oberer Teil), c – geöffnete Probenkammer (Ausschnitt aus a, oberer Teil), d – Aufsicht Auffangband

Geräte:

Programmierbarer Schüttler: siehe Abschnitt 3.3.4

Durchführung:

Geschwindigkeitseinstellung des Auffangbands

Vor der eigentlichen Durchführung der Messung wurden zunächst die Einstellungen für die Bewegung des Auffangbandes experimentell ermittelt. Dazu wurde zunächst die Falldauer für die schnellsten und die langsamsten Partikel des Pulverkollektivs ermittelt. Die Verzögerungszeit, bei der die Geschwindigkeit des Bandes null beträgt (v_0), ergibt sich aus der Differenz zwischen Start und Falldauer des schnellsten Partikels:

$$t_l = |t_0 - t_{\min}| \quad \text{Gl. 3-3}$$

t_l – Verzögerungszeit [s], t_0 – Beginn der Messung [s], t_{\min} – Fallzeit des schnellsten Partikels[s]

Die benötigte Vorschubgeschwindigkeit des Bandes (v_c) wird aus der Differenz der Fallzeiten des schnellsten und des langsamsten Partikels und der Länge des Auffangbandes berechnet:

$$v_c = \frac{l_c}{|t_{\min} - t_{\max}|} \quad \text{Gl. 3-4}$$

v_c – Geschwindigkeit des Transportbands [m/s], l_c – Länge des Transportbandes [m], t_{\min} – Fallzeit des schnellsten Partikels [s], t_{\max} – Fallzeit des langsamsten Partikels [s]

Die den Geschwindigkeiten v_0 und v_c entsprechenden Werte wurden für die jeweiligen Zeitabschnitte in die Steuerdatei eingetragen.

Anschließend wurde das Auffangband mit Klebeband versehen und in die Apparatur eingesetzt.

Versuchsdurchführung

Mit Hilfe einer Dosiervorrichtung wurden ca. 50 mm³ Pulver in die Probenkammer eingefüllt. Die Auslöser zum Öffnen der Probenkammer und für den Start des Auffangbandes wurden zeitgleich betätigt. Die Partikel sedimentierten durch das Fallrohr und wurden auf dem Band aufgefangen. Anschließend wurde das beladene Band entnommen.

Auswertung:

Kamera: siehe Abschnitt 3.3.4

Bildanalysesoftware: siehe Abschnitt 3.3.1

Zunächst wurde das Band in einzelne Abschnitte unterteilt. Die jeweiligen Abschnitte entsprechen dann den Zeitabschnitten, die alle Partikel in diesen Abschnitten zum Sedimentieren benötigt haben. Die Zeit, die ein Teilchen x zur Sedimentation braucht errechnet sich wie folgt:

$$t_x = t_l + \frac{l_x}{v_c} \quad \text{Gl. 3-5}$$

t_x – Sedimentationszeit für Teilchen x [s], t_l – Verzögerungszeit [s], l_x – Position auf dem Transportband [m], v_c – Geschwindigkeit des Transportbands [m/s]

Die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit eines Teilchens ergibt sich nun aus der zurückgelegten Strecke, also der Länge des Fallrohrs und der dazu benötigten Zeit:

$$v_x = \frac{l_p}{t_x} \quad \text{Gl. 3-6}$$

v_x – Sedimentationsgeschwindigkeit für Teilchen x [m/s], l_p – Länge des Fallrohrs [m], t_x – Sedimentationszeit für Teilchen x [s]

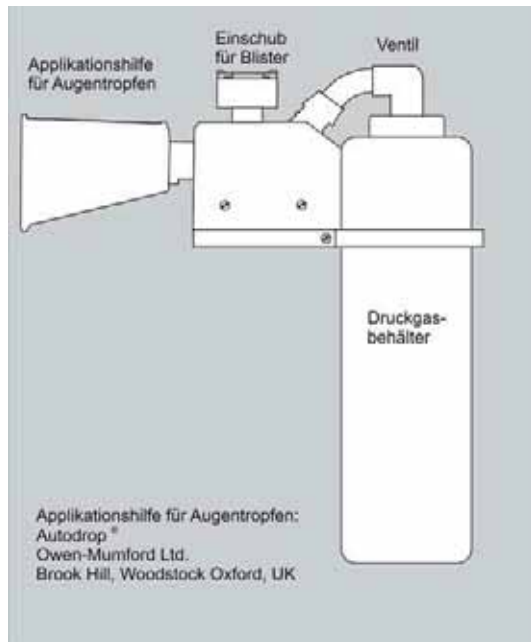
Dabei ist die Anfangsgeschwindigkeit der Partikel gleich Null. Nach dem Öffnen der Probenkammer beschleunigen sie, bis sich eine Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeit einstellt, bei der Gravitations- und Reibungskräfte annähernd gleich groß sind. Da sich die Partikel gegenseitig aerodynamisch beeinflussen, kommt es nicht zu einer vollständigen Trennung nach der Partikelgröße.

Die Abschnitte des Bands, die verschiedenen Geschwindigkeitsbereichen entsprechen, wurden fotografiert. Für die jeweiligen Geschwindigkeitsbereiche wurden mittels Bildanalyse Anzahl und Durchmesser der enthaltenen Partikel ermittelt. Die genaue Vorgehensweise wurde bereits im Abschnitt 3.4.2 beschrieben. Unter Einbeziehung der Partikeldichte wurde nach Gleichung 2-14 der aerodynamische Durchmesser errechnet.

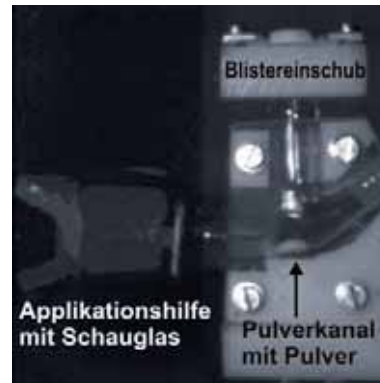
3.4.3 Applikation von Sphärolyophilisaten

Augenapplikator:

Der Applikator besteht aus einem Druckbehälter, einer manuellen Pumpvorrichtung, einer Vorrichtung zum Einführen eines Blisters und einer Applikationshilfe für Augentropfen, aus der das Pulver herausgeblasen wird. Durch Betätigen des Ventils wird das im Applikator befindliche Pulver durch einen Pulverkanal geleitet und ausgestoßen. Die Applikationshilfe für Augentropfen dient zur richtigen Positionierung der Sprühvorrichtung am Auge.



a – Applikator schematisch



b – Innenansicht



c – Flugbahnen der Pulverpartikel

Abb. 3-12 Applikation von Sphärolyophilisate zur Anwendung am Auge

Geräte:

Hochgeschwindigkeitskamera: siehe Abschnitt 3.3.1

Analysenwaage: siehe Abschnitt 3.3.3

Digitalkamera: siehe Abschnitt 3.3.4

Bildanalyseprogramm: siehe Abschnitt 3.3.1

Durchführung:

Zur Untersuchung des Sprühverhaltens bei verschiedenen Einstellungen des Applikators wurden Sphärolyophilisate verschiedener Dichte unter Variation von Sprühdruck (1,3 oder 1,9 bar) und Öffnungsdurchmesser des Pulverkanals (3 oder 7 mm) an Testobjekten appliziert. Als Testobjekte dienten Objektträger bzw. eine augenähnliche Kugel ($d=4$ cm, Kunststoff, glatte Oberfläche), die zur Verbesserung des Anhaftens der Lyophilisate mit Silikonöl oder hydrophobem Basisgel bestrichen wurden. Die beiden Testobjekte wurden zum Testen der

Applikation wirklichkeitsgetreu direkt vor der Applikationshilfe für Augentropfen positioniert. Die Partikel auf dem Objektträger wurden anschließend mit der Digitalkamera fotografiert. Durch ein Schauglas in der Applikationshilfe für Augentropfen konnte das Flugverhalten der Partikel mit der Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet werden.

Mit den als optimal ermittelten Einstellungen des Applikators wurden zusätzlich die Anzahl und die abgeschiedene Masse der applizierten Partikel bestimmt. Dazu wurden die Partikel auf einen mit hydrophobem Basisgel bestrichenen Objektträger aufgefangen.

Auswertung:

Zur Untersuchung des Abscheideverhaltens bei verschiedenen Versuchsbedingungen wurde zunächst mittels Bildanalyse (siehe Abschnitt 3.4.2.1) die Partikelzahl bestimmt, die sich außerhalb eines Trefferkreises mit dem Durchmesser 15 mm befand. Zur weiteren Beurteilung wurden die Aufnahmen der Flugbahn und des Flugverhaltens während der Applikation mit der Hochgeschwindigkeitskamera herangezogen.

Zur Bestimmung der abgeschiedenen Pulvermenge wurde die Masse des Objektträgers vor und nach der Applikation des Pulvers bestimmt und der prozentuale Anteil der abgeschiedenen Pulvermenge bezogen auf die gesamte applizierte Pulvermenge ermittelt.

3.5 Herstellung von Trägerlyophilisaten

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Herstellung von Trägerlyophilisaten beschrieben. Dazu wurde im Gegensatz zur Herstellungsmethode von Krasichkova (siehe auch Abschnitt 2.2.3) ein vereinfachtes Verfahren mit höherer Produktionskapazität eingesetzt [74]. Grundsätzlich lässt sich der Herstellungsprozess in folgende Teilprozesse gliedern:

- Herstellung der Applikatoren
- Herstellung der Lösung
- Einfrieren und Trocknung
- Verpackung und Etikettierung

3.5.1 Applikatoren

Geräte:

Folienschweißgerät Polystar[®] 244, Rische + Herfurth GmbH, D- Hamburg

Autoklav VST 40/6, Biotron Labortechnik GmbH, D- Hilden

Trockenschrank Modell 400, Memmert GmbH & Co. KG, D- Schwabach

Material:

Ungesinterte PTFE-Folie (Dicke 100 µm, Dichte 1,6 g/cm³), 3P GmbH
Performance Plastic Products, D- Karben (Dichtungsmaterial in der
Elektrotechnik)

Autoclave Tape, 3M Medical Products Division, USA- St. Paul (MN)

Von der PTFE-Folie wurden mit einem feinen Messer Streifen abgeschnitten. Auf die Längskante der Streifen wurden beidseitig je 2 Lagen Autoklavierband untereinander geklebt, so dass ein ca. 2 cm langes Griffband entstand. Von diesem Streifen wurden ungefähr zwanzig 1 cm breite Trägerstücke abgeschnitten. Applikatoren für Tierversuche wurden an den Oberkanten abgerundet, um eine reizlose Applikation zu gewährleisten. Die Stücke wurden von beiden Seiten mit Isopropanol 70 % (V/V) gereinigt. Um die Haftfestigkeit zu kontrollieren, erfolgte die Verarbeitung der PTFE-Folie mit desinfizierten Vinyl- Einmalhandschuhen und alle verwendeten Träger wurden autoklaviert, selbst wenn es aus mikrobiologischen Gründen nicht erforderlich war. Ablagerungen auf der Folie sowie das Autoklavieren können die Haftfestigkeit

der Lyophilisate auf der PTFE-Trägerfolie beeinflussen [88,151].

Je 10 Träger wurden anschließend in korrosionsbeständige Metallkästchen mit perforiertem Boden gelegt. Die Behälter wurden in Autoklavierfolie eingeschweißt und 15 Minuten bei 121 °C und 2 bar im Autoklaven sterilisiert. Eine Verfärbung der Streifen auf dem Griffband von weiß nach braun zeigte, dass die Sterilisationstemperatur erreicht wurde. Die autoklavierten Träger in den Metallkästchen wurden über Nacht im Trockenschrank bei 50 bis 60 °C getrocknet und bis zur Herstellung der Lyophilisate in der Autoklavierfolie belassen.

3.5.2 Lösungen

3.5.2.1 Herstellen von wirkstofffreien Lösungen

Zur Herstellung der wirkstofffreien Lyophilisate wurden die jeweiligen Hilfsstoffe in Wasser für Injektionszwecke unter Schütteln gelöst. Lösungen, die als Zusatz Hyaluronsäure-Natrium enthielten, waren nach 1- bis 2- stündigem Quellen gebrauchsfertig.

In Tabelle 3-2 sind die Zusammensetzungen der hergestellten Lösungen zur Untersuchung wirkstofffreier Lyophilisate aufgeführt.

| Gerüstbildner | Konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] |
|---------------|-----------------|----------|-----------------|
| Mannitol | 5 | kein | - |
| | | HA | 0,1 |
| | | Pluronic | 0,1 |
| | | HP-β-CD | 0,25 |
| | 10 | kein | - |
| | | HA | 0,1 |
| | | Pluronic | 0,1 |
| | | HP-β-CD | 0,25 |

Tab. 3-2 Zusammensetzungen der Lösungen zur Herstellung wirkstofffreier Lyophilisate (HA – Hyaluronsäure-Natrium)

3.5.2.2 Herstellung von Lösungen mit Latanoprost

Geräte:

Vortex Labormischer Typ VF 2, Janke & Kunkel GmbH, IKA-Labortechnik,
D-Staufen

Durchführung

1.) Herstellen der wässrigen Hilfsstofflösungen

2.) Aufteilen von Latanoprost

Der Wirkstoff Latanoprost wird in Mikrovials als Lösung zu je 1 mg in 100 µL Methylacetat geliefert. Zur Herstellung der Lösungen wurde 1 mg Latanoprost in einem 10 ml Messkolben mit 10 mL Methylacetat aufgenommen. Dazu wurde Methylacetat mit einer Pasteurpipette in das Mikrovial mit Latanoprost gegeben, für eine Minute mit dem Labormischer homogenisiert und bei 6000 rpm 30 Sekunden zentrifugiert, um eventuell anhaftendes Material aus dem Vial zu entfernen. Die Lösung wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und in den Kolben überführt. Der Vorgang wurde fünfmal wiederholt, der Kolben mit Methylacetat aufgefüllt und mit dem Labormischer durchmischt. Die Lösung wurde in vier Teile aufgeteilt, indem jeweils 2 mL mit einer Vollpipette aufgenommen und jeweils in einen 10 mL Kolben überführt wurden.

3.) Aufnehmen von Latanoprost in wässriger Lösung

Das Methylacetat wurde bei Raumtemperatur unter einem leichten Stickstoffstrom abgedampft. Anschließend wurde der visuell nicht erkennbare Rückstand mit der erforderlichen Menge wässriger Hilfsstofflösung versetzt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde festgestellt, dass der Latanoprostgehalt niedriger war als erwartet, deshalb wurden auch Lösungen mit Ethanol und tert-Butanol als Cosolventien untersucht. Bei der Herstellung dieser Lösungen wurde der eingedampfte Rückstand zunächst mit dem organischen Lösungsmittel aufgenommen und dann die Hilfsstofflösung dazugegeben.

Die einzelnen Trägerlyophilisate enthielten normalerweise 0,75 µg, in einigen Fällen auch 1,50 µg Latanoprost. Dies entspricht Konzentrationen von 0,0025 % bzw. 0,005 %, entsprechend 25 und 50 µg/mL. Damit liegt der

Wirkstoffgehalt relativ nah an der Sättigungskonzentration, die in wässrigen Lösungen bei etwa 50 µg/mL liegt. Zur Löslichkeitsverbesserung wurden auch wässrige Lösungen, denen Pluronic oder HP-β-CD zugesetzt wurde, hergestellt.

Die Herstellung erfolgte nach dem Vier-Augen-Prinzip.

3.5.3 Einfrieren und Trocknung

Geräte:

Pipette Acura® manual, 10-100 µl, Socorex, CH-Ecublens

Gefriertrockner Lyovac GT2, Steris, D- Hürth

Die Metallkästchen mit den vorbereiteten Applikatoren wurden aus der Autoklavierfolie entnommen. Auf jeden Träger wurden 30 µL der jeweiligen Lösung pipettiert, bzw. 38 µL für die Lyophilisate mit organischen Lösungsmitteln. Bei der Herstellung latanoprosthaltiger Lyophilisate wurde die Pipettenspitze vor dem Auftropfen mit der Lösung äquilibriert. Dazu wurde sie dreimal gefüllt und das aufgezogene Volumen verworfen. Anschließend wurden die Tröpfchen auf den Trägerfolien über flüssigem Stickstoff in abgedeckten Isolierbehältern 5 Minuten lang eingefroren. Die Kästchen mit den gefrorenen Tropfen wurden danach sofort auf die vorgekühlten Stellflächen des Gefriertrockners gestellt und die Trocknung gestartet. Die Gefriertrocknung wurde über Nacht (16 Stunden) bei ca. 5×10^{-2} mbar durchgeführt.

3.5.4 Verpackung und Etikettierung

Polyethylenröhrchen, Greiner Bio One GmbH, D-Solingen

Nach Beendigung der Gefriertrocknung wurde die Trocknungskammer belüftet und die Metallbehälter herausgenommen. Die Trägerlyophilisate wurden einzeln mit einer Pinzette aus den Behältern entnommen und in sterile Polyethylenröhrchen verpackt. Der Applikatorgriff und die PE-Röhrchen wurden jeweils mit Etiketten versehen.

3.6 Charakterisierung von Trägerlyophilisaten

3.6.1 Charakterisierung der Ausgangslösungen

Die Untersuchung der verwendeten Lösungen ist zum einen wichtig, um Kenntnisse für die Herstellung zu gewinnen, zum anderen beeinflussen sie die Eigenschaften der fertigen Lyophilisate.

3.6.1.1 Viskosität

Die Viskosität der Lösungen wurde wie in Abschnitt 3.4.1.1 mit dem Rotationsviskosimeter bestimmt.

3.6.1.2 Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung der Lösungen wurde wie in Abschnitt 3.4.1.2 mit einem Tensiometer mit der Plattenmethode nach Wilhelmy gemessen.

3.6.1.3 Kontaktwinkelmessungen

Gerät:

Kontaktwinkel- Messsystem G40, Krüss GmbH, D- Hamburg

Messeinrichtung:

Bürettenhalter mit Spritze und Kanüle, Krüss GmbH, D- Hamburg

Durchführung:

Die zu prüfende Folie wurde nach dem Autoklavieren und Trocknen mit Klebeband plan auf einem Objektträger fixiert. Spritze und Kanüle wurden je dreimal mit der Prüflösung vorgespült und die Spritze anschließend in die Halterung mit einer Feinstellschraube zur Flüssigkeitsdosierung eingespannt. Für eine Messung wurden ca. 3 µl (entsprechend 20 Einheiten auf der Skala der Feinstellschraube) der Prüflüssigkeit mit der Applikationskanüle auf die Folie aufgebracht. Der Tropfen wurde durch ein Okular beobachtet. Zur Bestimmung des Kontaktwinkels wurde der Tropfen an den Hilfslinien im Okular ausgerichtet und mit dem Feintrieb am Dreiphasenpunkt eine Tangente angelegt. Der Kontaktwinkel wurde nach ca. 1 Minute an der Skala des Geräts abgelesen.

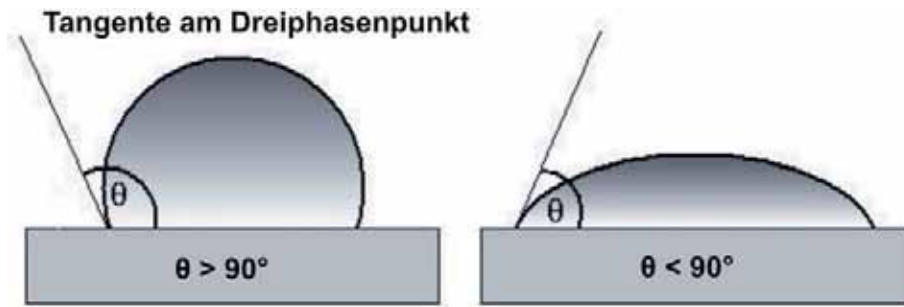


Abb. 3-13 Schematische Darstellung des Kontaktwinkels gut ($\theta < 90^\circ$) und schlecht ($\theta > 90^\circ$) benetzende Tropfen [14 Beschriftung ergänzt]

3.6.1.4 Einfrier- und Schmelzverhalten

Das Einfrierverhalten ausgewählter Lösungen wurde mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie untersucht.

Gerät und Durchführung:

Siehe Abschnitt 3.4.1.3

Messprogramme

Temperatur für 1 min bei 20 °C halten

Kühlen von 20 °C bis -60 °C, Kühlrate 20 K/min

Temperatur für 10 min bei -60 °C halten

Heizen von -60 °C bis 10 °C, Heizrate 20 K/min

Auswertung:

Die Glasübergangstemperatur wurde wie in Abschnitt 3.4.1.3 beschrieben bestimmt. Zusätzlich wurden Peaks, aus denen die spezifische Wärme bei Phasenumwandlungen errechnet wird, im Wärmestrom-Zeit-Diagramm erfasst und die zugehörigen Temperaturen aufgezeichnet.

3.6.2 Charakterisierung von Lyophilisaten

Zum Einschätzen der Eigenschaften von wirkstoffhaltigen Lyophilisaten wurde im Vorfeld eine Reihe von Untersuchungen an wirkstofffreien OLCS durchgeführt. Für die Herstellung von Lyophilisaten mit Latanoprost wurden die Zusammensetzungen ausgewählt, die sich aufgrund ihrer Eigenschaften am geeignetsten für eine Applikation am Auge erwiesen.

3.6.2.1 Restfeuchte

Gerät, Messprogramme und Auswertung:

Siehe Abschnitt 3.4.2.2

Durchführung:

Vor Beginn der Messung wurde der Platintiegel ausgeglüht. Nach dem Abkühlen wurde der Tiegel in die Waagenhalterung eingehängt und tariert. Anschließend wurde ein OLCS in den Tiegel gegeben, die Masse registriert und das jeweilige Messprogramm gestartet. Die Messung erfolgte vollautomatisch.

3.6.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Geräte, Probenfixierung, Messbedingungen und Durchführung:

Siehe Abschnitt 3.4.2.3

Anfertigen von Vertikalschnitten

Zur Untersuchung der inneren Struktur von Trägerlyophilisaten wurden diese in einer Petrischale in flüssigem Stickstoff eingefroren. Kurz bevor der Stickstoff vollständig verdampft war, wurden die Lyophilisate mit einer Rasierklinge ungefähr mittig zerteilt. Zum Anbringen auf dem Probenträger wurden sie auf die Oberseite gedreht und mit einer gebogenen Pinzette vorsichtig so auf das Klebeetikett gehoben, dass die Bruchkante nach oben zeigte.

3.6.2.3 Rekonstitutionszeit

Durchführung:

Siehe Abschnitt 3.4.2.5

Die Rekonstitutionszeit wurde an einzelnen OLCS nach dem Ablösen von der Trägerfolie bestimmt.

3.6.2.4 Wasserdampfaufnahme

Gerät, Messbedingungen, Messprogramm und Auswertung:

Siehe Abschnitt 3.4.2.6

Durchführung:

Nach Trieren der Waage wurden wegen der geringen Masse von 1 bis 3 mg jeweils 3 Lyophilisate in das gereinigte Glaspfännchen gegeben, die Probe gewogen und die Messung gestartet.

3.6.2.5 Dichte

Gerät:

Cahn Balance D200 (angeschlossen an DVS-1, siehe Abschnitt 3.4.2.6)

Durchführung:

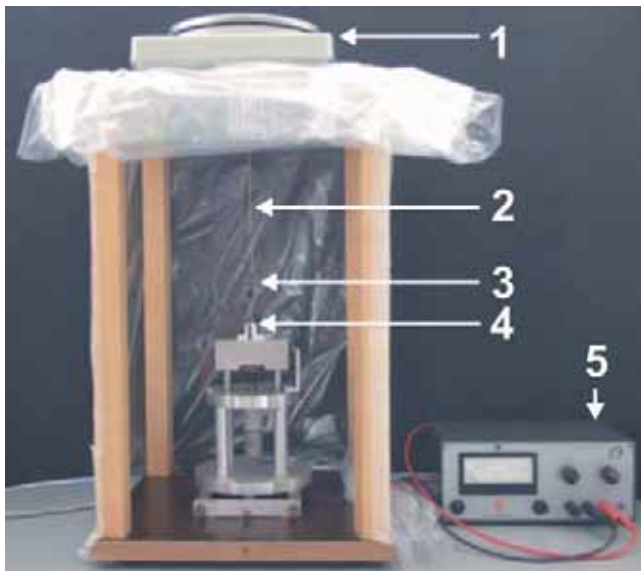
Vor der Durchführung der Bestimmung der Wasseraufnahme von OLCS wurde das Gewicht von 3 OLCS bestimmt.

Auswertung:

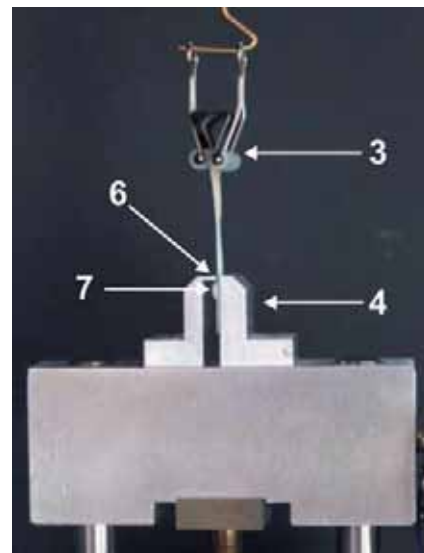
Die Durchschnittsmasse eines Lyophilisats wurde aus dem Mittelwert der Masse von 3 Lyophilisaten bestimmt. Aus Masse und Volumen der einzelnen Lyophilisate wurde die Dichte errechnet. Dabei wurde das zur Herstellung eingesetzte Volumen der Lösung (30 μL) näherungsweise mit dem Lyophilisatvolumen gleichgesetzt.

3.6.2.6 Haftfestigkeit

Für die Bestimmung der Haftfestigkeit der Lyophilisate auf der Trägerfolie wurde die 2001 mit dem Institut für Strahlen und Kernphysik der Universität Bonn hergestellte Messapparatur genutzt (siehe Abbildung 3-14) [88].



a – Gesamtansicht



b – Detail Abreißvorrichtung

Abb. 3-14 Apparatur zur Bestimmung der Haftfestigkeit

1 – Waage, 2 – Verbindungsdraht, 3 – Klemmvorrichtung für Lyophilisate, 4 – Abreißblock, 5 – Spannungsversorgung, 6 – Abreißkante, 7 – Lyophilisat

Gerät:

Die Messapparatur besteht aus einer Vorrichtung zum Abreißen der Lyophilisate und einer Waage. Während die Waage auf einem Tisch fixiert ist, wird die Abreißvorrichtung mit gleich bleibender Geschwindigkeit nach unten bewegt.

Messeinrichtung:

Feinwaage PB 3002-S Fact Delta Range, Datenerfassungs-Software Mettler-Toledo, Mettler Toledo GmbH, D- Gießen

Gleichstrommotor mit regelbarer Spannungsversorgung

Messbedingungen:

Spaltbreite Einspannvorrichtung 200 μm

Geschwindigkeit des Motors 0,892 mm/min (Spannung 10 V)

Messwertaufzeichnung 8 s^{-1}

Durchführung:

Das Lyophilisat wurde am Haltegriff mit einer Klammer fixiert und mit einem Draht an der unterschaligen Wägeeinrichtung befestigt. Anschließend wurde es so in die Abreißvorrichtung geschoben, dass sich die gewölbte Seite des Lyophilisats kurz unterhalb der Abreißkante befand. Nach dem Trieren der Waage wurden die Messwertaufzeichnung und der Motor manuell gestartet. Die von der Waage angezeigte Masse wurde dabei kontinuierlich aufgezeichnet. Endpunkt der Messung war das Abreißen des Lyophilisats von der Trägerfolie. Nach der Messung wurde der Motor durch Umkehr der Polarität wieder in die Ausgangsposition zurückgefahren.

Auswertung:

Die Kraft wurde aus dem absoluten Wert der Masse berechnet. Für jede Messung wurde die maximale Kraft des aufgenommenen Kraft- Zeit- Verlaufs ermittelt.

3.6.2.7 Strukturfestigkeit

Gerät:

Texture Analyzer TA.HDi, Software Texture Expert Exceed Version 2.52,
Stable Micro Systems Ltd., UK-Godalming

Messeinrichtung:

Messzelle 50N (5 kg), Auflösung $\pm 0,001$ N (0,1 g), entsprechend ± 1 mN
(100 mg)

Messprogramm:

Start der Messung bei Weg 10 mm

Messen des Wegs in Druckrichtung, Testgeschwindigkeit 0,50 mm/s

Endpunkt der Messung bei Erreichen einer Maximalkraft von 20 N

Durchführung:

Ein Lyophilisat wurde vom Träger abgelöst und exakt mittig unter der Messzelle des Texture Analyzers positioniert. Die Messung erfolgte automatisch.

Auswertung:

Zur Bestimmung der Strukturfestigkeit wurde die Energie ermittelt, die benötigt wurde, um ein Lyophilisat auf 0,10 mm Höhe zu komprimieren. Die Fläche unter der Kraft-Weg-Kurve bis zu einem Weg von 0,10 mm wurde berechnet. Die Messzelle besitzt eine Auflösung von ± 1 mN, dies entspricht 100 mg, und ist damit so empfindlich wie die von Maier und Krasichkova verwendete Waage [74,88]. Für orientierende Messungen ist dies ausreichend.

3.6.3 Gehalt von Latanoprost und Latanoprost-Säure

3.6.3.1 Gleichförmigkeit der Masse

Gerät:

Waage Autobalance Model AD-4 (d=2 mg bis 0,1 μ g), Perkin Elmer Inc., US-Norwalk

Probentiegel (Aluminiumpfännchen) 50 μ L, Typ BO14-3017, Perkin Elmer, D-Überlingen

Durchführung:

20 OLCS wurden vom Träger abgelöst und einzeln mit einer Pinzette auf ein Aluminiumpfännchen gelegt. Ein gleiches Aluminiumpfännchen diente als Gegengewicht. Nach Trieren der Waage wurde die Masse jedes OLCS bestimmt.

3.6.3.2 Enzymimmunoassay

Der Latanoprost Enzymimmunoassay ist eine empfindliche Methode zur Gehaltsbestimmung von Latanoprostsäure (latanoprost free acid, Lat-FA) und Latanoprost (Lat). Der Messbereich reicht von wenigen Piko- bis zu Nanogramm pro Milliliter. Für Lat-FA ist die Methode empfindlicher als für Lat. Mischungen der beiden Substanzen müssten vor der Untersuchung voneinander getrennt werden [12].

Die Gehaltsbestimmung wurde für OLCS mit Latanoprost selbst durchgeführt und zusätzlich durch ein externes Labor (Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor, MI) überprüft.

Verwendeter Immunoassay:

Latanoprost EIA Kit, Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor (MI)

Prinzip:

Die Methode beruht auf der Konkurrenz zwischen Lat oder Lat-FA und einem Konjugat von Lat und Acetylcholinesterase (Latanoprost-Tracer) um Lat-spezifische Kaninchen-Antiserum-Bindungsstellen. Die Mikrotiterplatte des EIA-Kits ist mit monoklonalen Maus-Antikörpern besetzt, an die das Kaninchen-Antiserum bindet. Der Gehalt von Lat wird indirekt über die Absorption des gebundenen Latanoprost-Tracers mit Ellmanns Reagenz ermittelt, wobei sich ein intensiv gelb gefärbtes Produkt mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm bildet.

$$\text{Absorption} \propto [\text{Latanoprost-Tracer gebunden}] \propto 1/[\text{Latanoprost}]$$

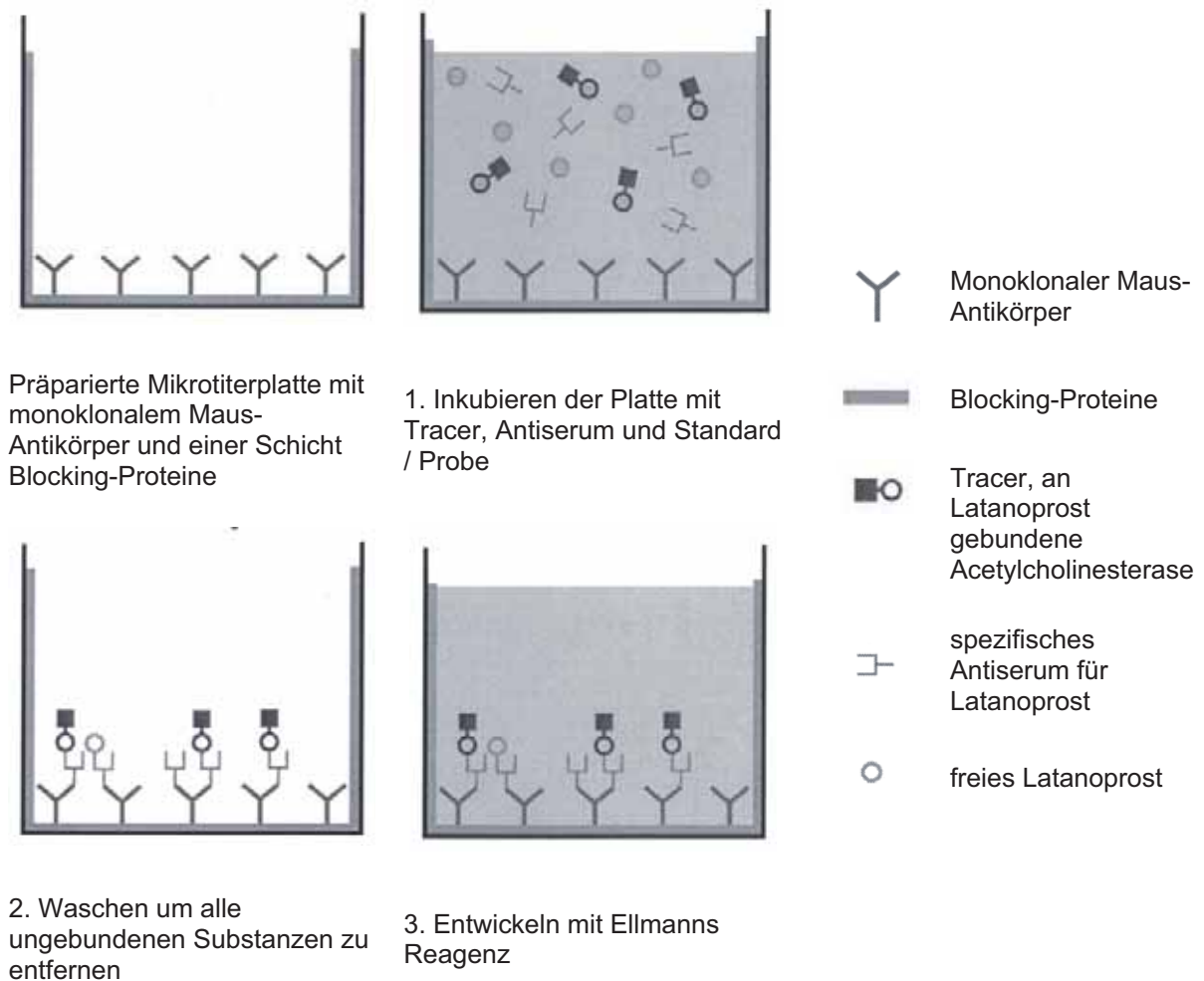


Abb. 3-15 Schematische Durchführung des EIA [12]

Farbreaktion des Tracers:

Die Farbreaktion zur Quantifizierung des Anteils von gebundenem Tracer beruht auf der Aktivitätsbestimmung der an Latanoprost gebundenen Acetylcholinesterase (Tracer) mit Ellmanns Reagenz. Dieses Reagenz besteht aus Acetylthiocholin und 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure. Bei Anwesenheit von Acetylcholinesterase wird das Acetylcholin hydrolytisch zu Thiocholin gespalten, welches dann mit der Nitrobenzoesäure zur intensiv gelb gefärbten 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure umgesetzt wird.

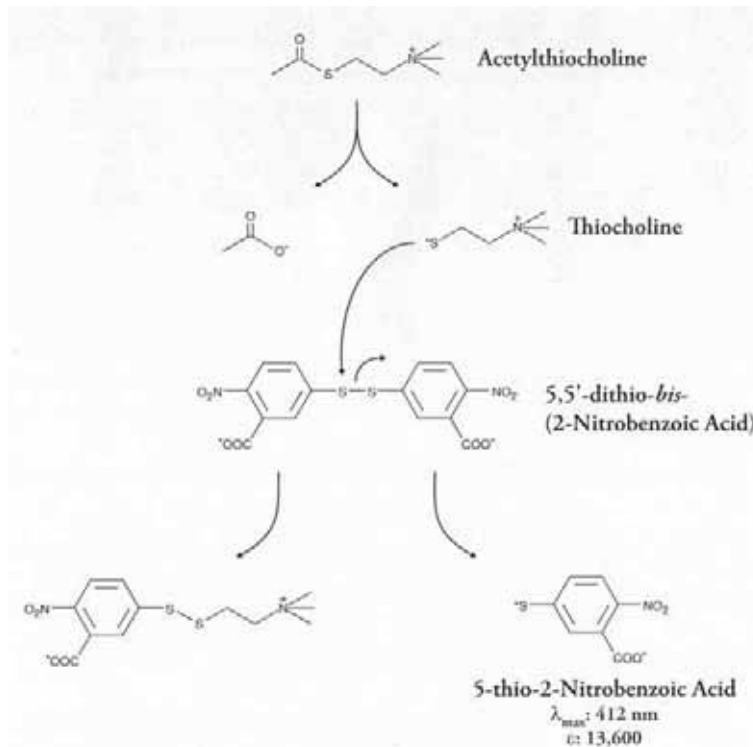


Abb. 3-16 Acetylcholinesterase - katalysierte Farbreaktion [12]

Leistungscharakteristik:

In der nachfolgenden Tabelle sind die Nachweisgrenze und die Empfindlichkeit für die beiden untersuchten Analyten aufgeführt.

| Charakteristische Größe | | Latanoprost-FA | Latanoprost |
|-------------------------|----------|----------------|-------------|
| Empfindlichkeit | 50% B/B0 | 58,4 pg/mL | 200 pg/mL |
| Nachweisgrenze | 80% B/B0 | 15,5 pg/mL | 43 pg/mL |

Tab. 3-3 Leistungscharakteristik Latanoprost EIA Kit (B0 – maximale Menge Tracer die an Antiserum gebunden werden kann, %B/B0 prozentuales Verhältnis der Absorption von Probe oder Standard zur maximal gebundenen Menge Tracer)

Bestimmung von Latanoprost in wässrigen Lösungen und Trägerlyophilisaten

Im Folgenden wird die Durchführung von Enzymimmunoassays beschrieben, die für diese Arbeit selbst durchgeführt wurden. Die Untersuchungen zusätzlicher Kontrollproben durch ein externes Analysenlabor werden im darauf folgenden Teil beschrieben.

Geräte:

Wasseraufbereitung Purelab Plus UF, Type PL 5/2302, Fa. USF, D-Ransbach-Baumbach

Schüttler Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-Schwabach

Plate reader Multiscan Ex λ - 405 nm, Thermo Labsystems, FIN-Oy

Durchführung:

Zur Kalibrierung wurden Latanoprost-Standards im Konzentrationsbereich von 2000 bis 15,6 pg/mL in EIA-Puffer hergestellt (siehe Tabelle 3-4).

| | Stamm- lösung | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 |
|--------------------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Verdünnung | - | 1:10 | 1:2 | 1:2 | 1:2 | 1:2 | 1:2 | 1:2 | 1:2 |
| Konzentration [pg/mL] | 20000 | 2000 | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,63 |

Tab. 3-4 Verdünnungsschema der Standards (S1 bis S8) zur Kalibrierung des EIA

Nach Herstellung der benötigten Reagenzien wurden die jeweiligen Wells der Mikrotiterplatte mit den Verdünnungen der Standardlösungen und den jeweiligen Probelösungen versetzt.

Die Probelösungen zur Bestimmung von Xalatan[®] Augentropfen wurden in 4 Konzentrationen von 500 bis 2000 ng/mL hergestellt. Das Verdünnungsschema ist in Tabelle 3-5 angegeben.

| Lösung-Nr. | Verdünnungsschritt | Konz. [ng/mL] | Konz. [pg/mL] |
|------------|--|----------------------|----------------------|
| - | Xalatan® Augentropfen | 50 x 10 ³ | 50 x 10 ⁶ |
| 1 | 10 µL Xalatan® in 1000 µL Wasser, davon 10 µL in 1000 µL Wasser | 0,5 | 500 |
| 2 | 20 µL Xalatan® in 1000 µL Wasser, davon 10 µL in 1000 µL Wasser | 1,0 | 1000 |
| 3 | 30 µL Xalatan® in 1000 µL Wasser, davon 10 µL in 1000 µL Wasser | 1,5 | 1500 |
| 4 | 40 µL Xalatan® in 1000 µL Wasser, davon 10 µL in 1000 µL Wasser | 2,0 | 2000 |

Tab. 3-5 Verdünnungsschema zur Herstellung der Probelösungen aus Xalatan®

Aus den Trägerlyophilisaten wurden Verdünnungen mit einer Konzentration von 375 pg/mL hergestellt. Das Verdünnungsschema zur Herstellung der Probelösungen der Trägerlyophilisate ist in Tabelle 3-6 aufgeführt. Nach dem gleichen Schema wurden Lösungen mit Xalatan® und die zur Herstellung von Trägerlyophilisaten verwendeten Ausgangslösungen hergestellt.

| Lösung-Nr. | Verdünnungsschritt | Konzentration [ng/mL] | Konzentration [pg/mL] |
|------------|---|-----------------------|-----------------------|
| - | Lyophilisat <u>oder</u> 30 µL der Ausgangslösung | 750 | 750 x 10 ³ |
| 1 | Lyophilisat in 100 mL Wasser | 7,5 | 7500 |
| 2 | 50 µL Lösung 1 in 950 mL Wasser | 0,375 | 375 |

Tab. 3-6 Verdünnungsschema zur Herstellung der Probelösungen aus Trägerlyophilisaten und Ausgangslösung

Abbildung 3-17 zeigt ein Beispiellayout einer Mikrotiterplatte für eine Bestimmung. Anschließend wurden die Wells mit Tracer und Antiserum versetzt. Die Platte wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Ellmanns Reagenz versetzt. Dann wurden die Wells mit Folie

abgedeckt und für 60 bis 90 Minuten unter leichten Schüttelbewegungen entwickelt.

Zusätzlich zu Standard- und Probelösungen wurden die unspezifische Bindung (Non Specific Binding, NSB), die Absorption von Ellmanns Reagenz (Blank), die maximale Bindung des Tracers (B0) und die Gesamtaktivität des Assays (TA) ermittelt.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | Blk | S1 | S1 | M1 | M1 | M1 | M2 | M2 | M2 | M3 | M3 | M3 |
| B | Blk | S2 | S2 | M4 | M4 | M4 | M5 | M5 | M5 | M6 | M6 | M6 |
| C | NSB | S3 | S3 | M7 | M7 | M7 | M8 | M8 | M8 | M9 | M9 | M9 |
| D | NSB | S4 | S4 | M10 | M10 | M10 | M11 | M11 | M11 | M11 | M11 | M11 |
| E | B0 | S5 | S5 | P1 | P1 | P1 | P2 | P2 | P2 | P3 | P3 | P3 |
| F | B0 | S6 | S6 | P4 | P4 | P4 | P5 | P5 | P5 | P6 | P6 | P6 |
| G | B0 | S7 | S7 | P7 | P7 | P7 | P8 | P8 | P8 | P9 | P9 | P9 |
| H | TA | S8 | S8 | P10 | P10 | P10 | P11 | P11 | P11 | P11 | P11 | P11 |

Abb. 3-17 Beispiel für das Pipettierschema einer Mikrotiterplatte

Abkürzungen: Blk – Blank, TA – Total Activity, , NSB – Non Specific Binding, B0 – Maximum Binding, S1-S8 – Standards 1-8, M1-M10 – mannitolhaltige OLCS, P1-P10 – mannitolhaltige OLCS mit Pluronic, M11/P11 – mannitolhaltige Ausgangslösungen für OLCS/ mannitolhaltige Ausgangslösungen mit Pluronic

Anmerkung: Alle verwendeten Glasgeräte wurden vor den Versuchen gründlich mit hochreinem Wasser gespült.

Auswertung:

Zur Auswertung wurde die Absorption bei 405 nm bestimmt. Der NSB - Wert wurde von allen Absorptionswerten subtrahiert.

Anschließend wurde der % B/B0 – Wert der Standards gegen die Konzentration der Standards aufgetragen. Der Wert % B/B0 gibt das prozentuale Verhältnis der Absorption des Standards zur maximal gebundenen Menge Tracer an. Daraus ergibt sich wie in Abbildung 3-18 dargestellt eine sigmoidale Kurve mit zwei asymptotisch verlaufenden Kurvenästen.

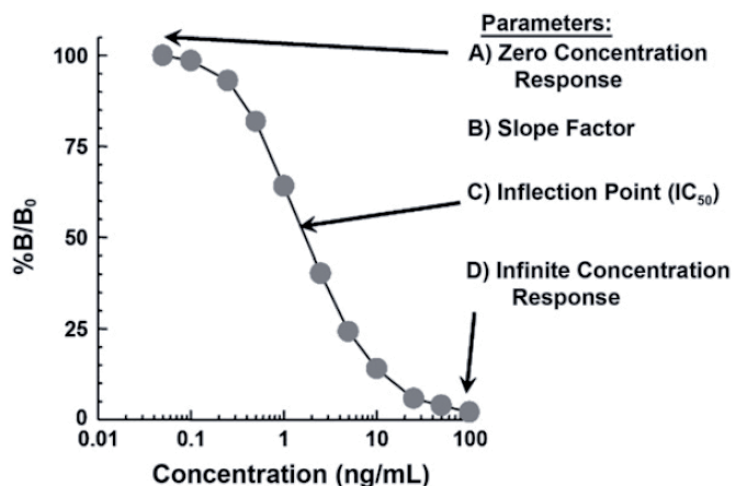


Abb. 3-18 Logistische Kurve mit 4 Parametern (4-Parameter Logistic Curve) [51]

Bei Null Prozent B/B₀ wird die maximale Konzentration und bei 100 Prozent B/B₀ die minimale Konzentration erhalten. Die Kalibrierkurve zur Errechnung der Probenkonzentrationen wurde daher durch nichtlineare Kurvenanpassung an die Funktion der allgemeinen Form erhalten:

$$y = A2 + \frac{(A1 - A2)}{\left(1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p\right)} \quad \text{Gl. 3-7}$$

y – Antwortvariable B/B₀, A₁ – Kurvenplateau bei Konzentration gegen Unendlich, A₂ – Kurvenplateau bei Konzentration gegen Null, x – Konzentration des Analyten, x₀ – Wendepunkt der Kurve (IC₅₀), p – Steigung der Kurve

Bestimmung von Latanoprost-Kontrollproben und Latanoprost-Säure in Kammerwasserproben

In diesem Abschnitt wird die Analytik durch ein externes zertifiziertes Analysenlabor (Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor (MI)) beschrieben.

Durchführung:

Kalibrierung

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden Standards mit Latanoprost-Ester im Konzentrationsbereich von 2000 bis 1,56 pg/mL oder Latanoprost-Säure im Konzentrationsbereich von 500 bis 3,9 pg/mL in EIA-Puffer hergestellt.

Probenvorbereitung

Die Proben wurden genau nach Anweisung des Analysenkits vorbereitet. Zur Analyse wurden sie mit EIA-Puffer in den entsprechenden Konzentrationsbereich verdünnt. In einem Vorversuch wurde zum Ausschließen von Wechselwirkungen mit dem Kammerwasser für die Latanoprost-Säure-Bestimmung zusätzlich eine Blindprobe ohne Latanoprost-Säure getestet.

Auswertung:

Die Probenkonzentrationen wurden aus der Gleichung der angepassten 4-Parameter logistischen Funktion der Standardkonzentrationen gegen den Quotienten aus gebundenem zu maximal gebundenem Anteil (% B/B₀-Verhältnis) berechnet.

3.6.3.3 Ergänzende Verfahren zur Gehaltsbestimmung

Mit der immunochemischen Methode wurden am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn für die Gehaltsbestimmung von Trägerlyophilisaten zwar bei jedem Versuch gleichförmige Ergebnisse erhalten, die aber nicht hinreichend reproduzierbar waren und von den erwarteten Werten abwichen. Auch bei einem zusätzlichen Test durch ein zertifiziertes Analysenlabor wurden vom Sollwert abweichende Ergebnisse für die ermittelten Latanoprost-Konzentrationen erhalten. Daher wurden zur Bestimmung des Gehalts von Latanoprost in Trägerlyophilisaten zusätzliche Methoden verwendet.

In Kooperation mit Prof. Dr. M. Kassack und D. Eßer (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Düsseldorf) wurde ein HPLC-Analysenverfahren zur Bestimmung von Latanoprost entwickelt. Dieses Verfahren besitzt grundsätzlich hohes Potential, jedoch konnte es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr validiert werden. Als Referenzmethode zur Überprüfung des Gehalts der Trägerlyophilisate diente daher die LC-MS-Methode, die von einem externen Analysenlabor durchgeführt wurde.

HPLC-Analytik

Geräte und Versuchsbedingungen:

Hitachi LaChrom Elite HPLC, Hitachi High Technologies America, Inc., USA-Schaumburg (IL)

Säule LiChroCART 125-4 LiChrospher 60 RP-select B (5 µm) (mit Vorsäulenkartusche LiChroCART 4-4 LiChrospher 60-select B)

Flussrate 1.5 mL/min

Detektion bei 210 nm (zusätzlich 190 nm)

Eluenten: KH₂PO₄-Puffer 5 mM, 10 % MeOH (pH = 3)/ACN

Gradient (v/v): 0 min: 70/30, 7 min: 20/80, 9 min: 70/30, 12 min: 70/30

Durchführung:

Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurden Latanoprost - Stammlösungen in Methylacetat, die zur Herstellung von OLCS genutzt wurden, verwendet. Es wurden je 5 unterschiedliche Konzentrationen von 1,9 bis 5,65 µg/mL hergestellt und vermessen.

Probenvorbereitung

- Abstreifen des Lyophilisats von der Trägerfolie in 500 µL-Reaktionsgefäß
- Zugabe von 200 µL Methylacetat (erhaltene Konzentration 3,75 µg/mL)
- 5 min in Ultraschallbad behandelt, anschließend 30 s dispergiert
- 2 x bei 8000 rpm für 20 s abzentrifugiert
- für Messung 120 µL in Mikrovial umpipettiert und unmittelbar vermessen

LC-MS Analytik

Analytik:

Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor (MI)

Prinzip:

Bei diesem Analysenverfahren wird das Verfahren der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, LC) mit der Massenspektrometrie (MS) gekoppelt. Damit ist die Trennung und Bestimmung einzelner Komponenten in komplexen Systemen möglich. Nach der

chromatographischen Trennung entsteht im Einlasssystem des Massenspektrometers durch Elektrosprayionisation ein feines Aerosol aus freien elektrisch geladenen Molekülen, die anschließend einen Quadrupol-Massenfilter passieren. Dabei ist der Massenfilter so eingestellt, dass nur Ionen mit einer bestimmten Masse durch das elektrische Feld hindurchbewegt werden. Die Trennung der Ionen beruht auf ihrem unterschiedlichen Masse-Ladungs-Verhältnis. Anschließend werden die Ionen mit einem Detektor, meist Photomultiplier oder Sekundärelektronenvervielfacher, nachgewiesen.

Geräte und Versuchsbedingungen:

HPLC

Agilent 1100 HPLC-DAD, Agilent Inc., USA-Santa Clara (CA)

Fließmittel MeOH/H₂O/AcOH (70:30:0.1)

Säule 4.6 x 250 mm, 5 µm Gemini C18 column

Flussrate 1 mL/min

MS

Agilent Single Quadrupole MSD in ESI¹⁾ mode,

Agilent Inc., USA-Santa Clara (CA)

4 einfach geladene Molekülionen wurden registriert, je eines für Latanoprost und Latanoprost-Säure sowie für die entsprechenden vierfach deuterierten Standards

Channel 1: + 455 amu (Latanoprost + Na⁺)

Channel 2: + 459 amu (Latanoprost-d₄ + Na⁺)

Channel 3: - 389 amu (Latanoprost FA – H⁺)

Channel 4: - 393 amu (Latanoprost FA-d₄ – H⁺)

¹⁾ ESI: Electro Spray Ionisation, Elektrosprayionisation

amu: atomic mass unit, atomare Masseneinheit

Durchführung:

Kalibrierung

5 Standards mit verschiedenen Latanoprost- und Latanoprost-Säure-Konzentrationen wurden in einem 1:1 Methanol-Wasser-Gemisch hergestellt und mit gleichen Konzentrationen der internen Standards Latanoprost-d₄ und

Latanoprost-Säure-d4 versetzt. In der folgenden Tabelle sind die Konzentrationen der Analyten und der internen Standards in der jeweiligen Verdünnung aufgelistet.

| Konzentration [µg/mL] | Standard 1 | Standard 2 | Standard 3 | Standard 4 | Standard 5 |
|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Latanoprost | 3,52 | 5,53 | 7,55 | 10,06 | 12,07 |
| Latanoprost FA | 0,74 | 1,59 | 2,65 | 4,23 | 5,29 |
| Latanoprost-d4 | 7,50 | 7,50 | 7,50 | 7,50 | 7,50 |
| Latanoprost FA-d4 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |

Tab. 3-7 Konzentrationen der Analyten und internen Standards für die LC-MS - Gehaltsbestimmung

Die Standards wurden dreifach analysiert und das Verhältnis der Latanoprost/Latanoprost-d4-Flächen für die jeweilige Konzentration aufgetragen. Um die Einflüsse der durch analysenbedingte Schwankungen hervorgerufenen Abweichungen der Probenmesswerte voneinander zu minimieren, wurde dazu eine Regressionsgerade berechnet.

Probenvorbereitung

Zu jeder Probe wurden 100 µL einer Methanol/Wasser-Mischung zugesetzt und bis zum vollständigen Auflösen der Probe dispergiert. Zu jeder Probe wurden die internen Standards (Latanoprost-d4, Latanoprost-Säure-d4) hinzugegeben. Diese Proben wurden bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert. Vor der Analyse wurden die Proben, bei denen während der Lagerung ein Präzipitat ausgefallen war, noch einmal für 3 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur redispergiert. Die Analyse wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, um Ausfällungen zu vermeiden. Der Gehalt jeder Probe wurde dreifach bestimmt.

Weitere Tests

Zur Bestimmung des Detektionslimits für Latanoprost-Säure wurde das Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt. Diese Messungen erfolgten für jede Injektion der Standards automatisch und wurden mit der Chemstation[®] Software (Agilent Inc., USA-Santa Clara (CA)) ausgewertet. Zur Auswertung wurde das Signal-Rausch-Verhältnis für jede Konzentration aufgetragen. Das Detektionslimit von Latanoprost-Säure beträgt 0,02 µg bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1.

Auswertung:

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Latanoprost wurden die durchschnittlichen Flächenverhältnisse von Latanoprost/Latanoprost-d4 ermittelt und aus der Kalibriergerade die zugehörige Konzentration berechnet.

3.6.4 Untersuchung zur okularen Bioverfügbarkeit

3.6.4.1 Tierversuch

Versuchstiere:

2 Gruppen zu je 6 weiblichen pigmentierten Chinchillakaninchen

Alter 3 bzw. 9 Monate

Gewicht 2-3 bzw. 4-5 kg

Durchführung:

Je einem Kaninchen wurde in randomisierter Reihenfolge in ein Auge jeweils ein OLCS und in das andere Auge ein Tropfen Xalatan[®]-Lösung appliziert. Die Randomisierung erfolgte in 4 Versuchsblöcken zu je 3 Tieren.

Die Präparate wurden den Kaninchen in fünfminütigen Abständen bei vollem Bewusstsein appliziert. 20 Minuten vor der Entnahme des Kammerwassers wurde den Tieren zur Anästhesie und Muskelrelaxierung eine Kombination aus Ketamin, Xylazin und Diazepam (Ketanest[®], Rompun[®] und Valium[®]) verabreicht. Nach 100 Minuten wurden 100 bis 150 µL Kammerwasser mit einer Insulinspritze entnommen. Die Spritze wurde unverzüglich in ein Braunglasvial entleert und das Kammerwasser in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden anschließend in Trockeneis verpackt zur Gehaltsbestimmung in das externe Analysenlabor verschickt.



a – Verabreichung von Xalatan® Augentropfen



b – Entnahme von Kammerwasser

Abb. 3-19 Versuchstier bei Verabreichung und Probenahme

3.6.4.2 Gehaltsbestimmung – Enzymimmunoassay

Analytik:

Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor (MI)

Durchführung:

Alle Proben wurden mit dem Latanoprost Enzymimmunoassay nach der Anleitung zur Durchführung des Kits analysiert. Die Gehaltsbestimmung von Latanoprost-Säure mit dem Immunoassay wurde bereits in Abschnitt 3.6.3.2 beschrieben. Jede Probe wurde in den Verdünnungen 1:1000, 1:500 und 1:100 dreimal analysiert. Die Analytik der Proben erfolgte typischerweise innerhalb einer Woche.

Auswertung:

Die statistische Bewertung der Versuchsergebnisse wird in Abschnitt 3.7.2 beschrieben.

3.7 Statistische Auswertung

3.7.1 Faktorenversuchsplanung

Auswertesoftware: JMP-IN 5.1, SAS Institute Inc, USA-Cary (NC)

Die Faktorenversuchsplanung, auch als Design of Experiments (DoE) bezeichnet, ist ein Instrument der statistischen Versuchsplanung, bei dem der Einfluss eines oder mehrerer Faktoren auf eine Zielgröße untersucht wird. Die Faktoren können dabei auf zwei oder mehr Niveaus variieren. Bei vollfaktoriellem Versuchsdesign werden die Faktoren auf allen Niveaus variiert. Dabei werden alle Haupteffekte sowie alle Wechselwirkungen zwischen den Faktoren analysiert und quantifiziert. Die Zahl der benötigten Teilversuche steigt mit der Anzahl der Faktoren nach der allgemeinen Gleichung 3-8 exponentiell an:

$$n = N^F \quad \text{Gl. 3-8}$$

n – Anzahl der Versuche, N – Anzahl der Niveaus, F – Anzahl der Faktoren

Dieser Versuchsansatz erfordert einen hohen experimentellen Aufwand, wenn mehrere Einflussfaktoren und Niveaus untersucht werden. Beispielsweise erfordern vier Faktoren, die auf vier Niveaus variiert werden, 256 Versuche. Daher werden in diesen Fällen häufig teilfaktorielle Versuchspläne angewendet, bei denen die Faktoren nicht auf allen Niveaus variiert werden, um den experimentellen Aufwand zu reduzieren. Der teilfaktorielle Ansatz hat jedoch den Nachteil, dass die statistische Aussage über die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren eingeschränkt ist. In dieser Arbeit wurden einige Experimente mittels vollfaktorieller Versuchsplanung geplant. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels Varianzanalyse überprüft.

3.7.1.1 Varianzanalyse (ANOVA)

Die Varianzanalyse ist ein statistisches Instrument zur Untersuchung des Einflusses ein oder mehrerer qualitativer Merkmale, so genannter Faktoren, auf ein quantitatives oder messbares Merkmal [118]. Sie dient zum Vergleich mehrerer Mittelwerte aus verschiedenen Datengruppen, wobei der Anteil der

durch die einzelnen Faktoren hervorgerufenen Variabilität an der Gesamtvariabilität der Versuchsergebnisse ermittelt wird.

Das Kernelement bei der Varianzanalyse ist der F-Test. Mit seiner Hilfe wird überprüft, ob die Mittelwerte von zwei oder mehreren normalverteilten Datengruppen gleich sind. Die Nullhypothese ist daher:

H_0 : Die Mittelwerte der verglichenen Datengruppen unterscheiden sich nicht voneinander. Die Daten stammen demnach alle aus derselben Grundgesamtheit.

Die Alternativhypothese lautet:

H_A : Die Mittelwerte der verglichenen Datengruppen unterscheiden sich voneinander. Die Daten stammen nicht aus derselben Grundgesamtheit.

Wird die Nullhypothese angenommen, stammen die Datengruppen aus derselben Grundgesamtheit. Dies bedeutet, dass der Faktor keinen Einfluss auf das untersuchte Merkmal besitzt. Wird die Nullhypothese abgelehnt, wird davon ausgegangen, dass der Faktor A einen Einfluss auf das untersuchte Merkmal ausübt, da die Datengruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen.

Das mathematische Modell beschreibt die Annahme, dass sich jeder Messwert in verschiedene Summanden zerlegen lässt:

$$x = \mu + \alpha + \varepsilon \quad \text{Gl. 3-9}$$

x – Messwert, μ – allgemeines Mittel, α – fester Effekt des Faktors A (Differenz aus Messwert und allgemeinem Mittel), ε – Versuchsfehler

Wird der Einfluss mehrerer Faktoren auf ein Merkmal untersucht, wird das mathematische Modell um den Effekt der anderen Faktoren ergänzt. Da zwischen den einzelnen Faktoren auch Wechselwirkungen auftreten können, werden diese ebenfalls in der Modellgleichung berücksichtigt. In Gleichung 3-10 ist beispielhaft das mathematische Modell für 2 Faktoren A und B und deren Wechselwirkung AB dargestellt:

$$x = \mu + \alpha + \beta + \alpha \cdot \beta + \varepsilon \quad \text{Gl. 3-10}$$

x – Messwert, μ – allgemeines Mittel, α – fester Effekt des Faktors A (Differenz aus Messwert und allgemeinem Mittel), β – fester Effekt des Faktors B (Differenz aus Messwert und allgemeinem Mittel), $\alpha \cdot \beta$ fester Effekt der Wechselwirkung der Faktoren A und B, ε – Versuchsfehler

Summen der Abweichungsquadrate

Zur Berechnung werden die Summen der Abweichungsquadrate herangezogen, die sich nach Gleichung 3-11 wiederum aus der Differenz zwischen dem Mittelwert und dem jeweiligen Einzelwert ergeben:

$$SQ_T = \sum (x - MW_T)^2 \quad \text{Gl. 3-11}$$

SQ_T – Summe der Abweichungsquadrate insgesamt, x – Einzelwerte, MW_T - Gesamtmittel

Die Summe der Abweichungsquadrate insgesamt setzt sich additiv aus der Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen und der Summe der Abweichungsquadrate zwischen den Gruppen zusammen:

$$SQ_T = SQ_I + SQ_Z \quad \text{Gl. 3-12}$$

SQ_T – Summe der Abweichungsquadrate insgesamt, SQ_I – Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen, SQ_Z – Summe der Abweichungsquadrate zwischen den Gruppen

Die Summen der Abweichungsquadrate innerhalb sowie zwischen den Gruppen errechnen sich wie folgt:

$$SQ_I = \sum (x - MW_I)^2 \quad \text{Gl. 3-13}$$

SQ_I – Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen, x – Einzelwerte, MW_I – jeweiliges Gruppenmittel

$$SQ_Z = \sum (MW_I - MW_T)^2 \quad \text{Gl. 3-14}$$

SQ_Z – Summe der Abweichungsquadrate zwischen den Gruppen, MW_I – jeweiliges Gruppenmittel, MW_T - Gesamtmittel

Zur Bewertung des Modells werden die entsprechenden mittleren Quadrate aus dem Quotienten der Summenabweichungsquadrate und des Freiheitsgrads

berechnet. Durch Einsetzen der einzelnen Summen der Abweichungsquadrate, also SQ_T , SQ_I bzw. SQ_Z , erhält man die jeweiligen mittleren Quadrate insgesamt (MQ_T), innerhalb der Gruppen (MQ_I) bzw. zwischen den Gruppen (MQ_Z), Gleichungen 3-15 bis 3-17.

$$MQ_T = s^2 = \frac{SQ_T}{n-1} = \frac{SQ_T}{FG} \quad \text{Gl. 3-15}$$

MQ_T – Mittlere Quadrate insgesamt, SQ_T – Summe der Abweichungsquadrate insgesamt, n – Anzahl der Datenpunkte, FG – Freiheitsgrad

$$MQ_I = \frac{SQ_I}{n-1} = \frac{SQ_I}{FG} \quad \text{Gl. 3-16}$$

MQ_I – Mittlere Quadrate (Varianz) innerhalb der Gruppen, SQ_I – Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen, n – Anzahl der Datenpunkte, FG – Freiheitsgrad

$$MQ_Z = \frac{SQ_Z}{n-1} = \frac{SQ_Z}{FG} \quad \text{Gl. 3-17}$$

MQ_Z – Mittlere Quadrate (Varianz) zwischen den Gruppen, SQ_Z – Summe der Abweichungsquadrate zwischen den Gruppen, n – Anzahl der Datenpunkte, FG – Freiheitsgrad

Werden bei der Berechnung mehrere Faktoren berücksichtigt, errechnen sich die Werte für die mittleren Quadrate innerhalb und zwischen den Gruppen für die jeweiligen Faktoren einzeln. Die Summe der Abweichungsquadrate wird dazu wie folgt in einzelne Summanden zerlegt:

$$SQ_T = SQ_A + SQ_B + SQ_{AB} + SQ_R \quad \text{Gl. 3-18}$$

SQ_T – Summe der Abweichungsquadrate insgesamt, SQ_A / SQ_B – Summe der Abweichungsquadrate zwischen der Gruppe A/ B, SQ_{AB} – Summe der Abweichungsquadrate der Wechselwirkungen zwischen Faktor A und B, SQ_R – Summe der Abweichungsquadrate von ihren Unterklassenmitteln (Rest)

Für jeden Faktor, jede Wechselwirkung zwischen den Faktoren sowie den nicht weiter zu analysierenden Rest wird dann die Summe der Abweichungsquadrate für die jeweilige Größe eingesetzt. Dies ist in Gleichung 3-19 beispielhaft für den Faktor A aufgeführt:

$$MQ_A = \frac{SQ_A}{n-1} = \frac{SQ_A}{FG} \quad \text{Gl. 3-19}$$

MQ_A – Mittlere Quadrate (Varianz) des Faktors A, SQ_A – Summe der Abweichungsquadrate des Faktors A, n – Anzahl der Datenpunkte, FG – Freiheitsgrad

Die mittleren Quadrate (MQ_B) des Faktors B werden durch Einsetzen der Summenabweichungsquadrate der Wechselwirkungen (SQ_B) ermittelt. Analog dazu werden die mittleren Quadrate (MQ_{AB} , MQ_R) durch Einsetzen der Summenabweichungsquadrate und der Freiheitsgrade der Wechselwirkung zwischen den Faktoren A und B (SQ_{AB}) sowie des nicht weiter zu analysierenden Restes (SQ_R) berechnet.

F-Test

Zur Prüfung der in der Einführung zu Abschnitt 3.7.1 aufgestellten Hypothesen dient der F-Test, bei dem die Prüfgröße F durch Division der mittleren Quadrate bzw. der Varianz zwischen und innerhalb der Gruppen berechnet wird. Die mittleren Quadrate zwischen bzw. innerhalb der Gruppen bezeichnen zwei voneinander unabhängige Streuungen, wobei MQ_Z auch als Varianz des Modells MQ_M und MQ_I auch als Varianz des Versuchsfehlers MQ_E ausgedrückt werden kann:

$$F = \frac{MQ_Z}{MQ_I} = \frac{MQ_M}{MQ_E} \quad \text{Gl. 3-20}$$

F – F-Wert, MQ_Z – Mittlere Quadrate/ Varianz zwischen den Gruppen, MQ_I – Mittlere Quadrate/ Varianz innerhalb der Gruppen, MQ_M - Mittlere Quadrate/ Varianz des Modells, MQ_E - Mittlere Quadrate/ Varianz des Versuchsfehlers

Weichen die beiden Varianzen zwischen bzw. innerhalb der Gruppen nur zufällig voneinander ab, unterscheiden sich die Mittelwerte der verglichenen Daten also nicht und die Nullhypothese wird angenommen. Demzufolge hat der Faktor keinen Einfluss auf das untersuchte Merkmal. Sind die beiden Streuungen voneinander verschieden, wird die Streuung zwischen den Gruppen einen größeren Wert annehmen und die Alternativhypothese angenommen. Der Faktor besitzt dann einen Einfluss auf das untersuchte Merkmal. Werden mehrere Faktoren untersucht, wird für jeden Faktor der F-Wert mit der Varianz der jeweiligen Gruppe ermittelt. Dies ist in der folgenden Gleichung exemplarisch für den Faktor A dargestellt:

$$F_A = \frac{MQ_A}{MQ_R}$$

Gl. 3-21

F – F-Wert des Faktors A, MQ_A – Mittlere Quadrate/ Varianz der Gruppe A, MQ_R – Mittlere Quadrate/ Varianz des Restes

Die F-Werte für weitere Faktoren sowie für die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren errechnen sich analog dazu durch Einsetzen der jeweiligen mittleren Quadrate MQ_B und MQ_{AB} .

Wenn das Signifikanzniveau p des F-Werts einen bestimmten Wert unterschreitet, sind die Daten durch das Modell besser angepasst als durch den Mittelwert aller Daten. Die Bewertung erfolgt durch Errechnen des Wahrscheinlichkeitswerts p :

H_0 wird angenommen für p -Werte $> 0,05$

H_A wird angenommen für p -Werte $\leq 0,05$

Ein p -Wert kleiner als 0,001 wird als hochsignifikant, ein p -Wert kleiner als 0,01 als sehr signifikant und ein p -Wert kleiner als 0,05 als signifikant bezeichnet.

3.7.2 Bewertung der okularen Bioverfügbarkeit

Zum Vergleich der okularen Bioverfügbarkeit der hergestellten Latanoprost-Trägerlyophilisate mit dem Handelspräparat Xalatan® nach Verabreichung und Resorption durch die Cornea wurden, wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben, Kaninchen mit beiden Zubereitungen behandelt und Kammerwasserproben entnommen. Die Bioverfügbarkeit gibt an, wie schnell und in welchem Ausmaß ein Arzneistoff oder wirksamer Bestandteil aus einer Darreichungsform resorbiert wird und am Wirkort (in diesem Fall dem Kaninchenauge) zur Verfügung steht. Um eine statistische eindeutige Aussage über die Bioverfügbarkeit oder die Bioäquivalenz eines Präparats zu erhalten, empfiehlt die European Agency for the Evaluation of Medicinal Products eine Doppelcrossover-Studie bei der ein Referenz- und ein Testpräparat an mindestens zwölf Testpersonen miteinander verglichen werden [11]. Stehen weniger Testpersonen zur Verfügung ist die Aussage der Untersuchung eingeschränkt. Zur Bewertung der Bioäquivalenz wurden die Konzentrationen c_{Test} und c_{Ref} von Latanoprost-Säure im Kammerwasser nach 100 Minuten bestimmt. Untersuchungen von Sjöquist et al. am Kaninchen- und am humanen

Auge zeigten, dass der Wirkstoff nach etwa 1 bis 2 Stunden in maximaler Konzentration im Kammerwasser vorliegt [123,125]. Die Grundlage für die Bewertung der Bioäquivalenz ist der Vergleich der Konzentrationen der Test- und Referenzzubereitung im maximalen Konzentrationsbereich. Unterschiede in Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption der beiden Präparate können durch die Messung zu einem Zeitpunkt nicht berücksichtigt werden. Da die beiden Präparate in unterschiedlicher Dosierung verabreicht wurden, wurde nach den Gleichungen 3-22 und 3-23 das Konzentrations-Dosis-Verhältnis Q berechnet:

$$Q_{Test} = \frac{c_{Test}}{D_{Test}} \quad \text{Gl. 3-22}$$

Q – Konzentrations-Dosis-Verhältnis [ml^{-1}], c_{Test} – Konzentration des Testpräparats [$\mu\text{g}/\text{mL}$], D_{Test} – Dosis des Testpräparats [μg]

$$Q_{Ref} = \frac{c_{Ref}}{D_{Ref}} \quad \text{Gl. 3-23}$$

Q – Konzentrations-Dosis-Verhältnis [ml^{-1}], c_{Ref} – Konzentration des Referenzpräparats [$\mu\text{g}/\text{mL}$], D_{Ref} – Dosis des Referenzpräparats [μg]

Zunächst wurden die relative Bioverfügbarkeit F aus den Konzentrations-Dosis-Quotienten der Zubereitungen nach Gleichung 3-24 berechnet. Definitionsgemäß werden zur Berechnung der relativen Bioverfügbarkeit die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven von Test- und Referenzpräparat herangezogen. Üblicherweise werden dazu die Wirkstoffkonzentrationen im Plasma bestimmt, da die meisten Arzneistoffe systemisch wirksam sind. Zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit am Auge wurde die Konzentration von Latanoprost-Säure im Kammerwasser bestimmt. Eine Mehrfachentnahme von Kammerwasser aus demselben Auge ist jedoch nicht möglich, da das Auge bei der Entnahme verletzt wird und das Volumen des Kammerwassers begrenzt ist. Deshalb wurden nur die Konzentrationen zum gleichen Entnahmezeitpunkt für die Bewertung herangezogen:

$$F = \frac{c_{Test} \cdot D_{Ref}}{c_{Ref} \cdot D_{Test}} \quad \text{Gl. 3-24}$$

F – relative Bioverfügbarkeit, c_{Test}/c_{Ref} – Konzentration des Test-/ Referenzpräparats, D_{Test}/D_{Ref} – Dosis des Test-/ Referenzpräparats

3.7.2.1 Mittelwertsvergleich (t-Test)

Beim t-Test wird geprüft, ob die Mittelwertsunterschiede zweier normalverteilter Stichprobenreihen statistisch signifikant sind. Für die statistische Auswertung von Bioäquivalenzuntersuchungen werden im Allgemeinen die logarithmierten Werte von AUC oder c_{\max} eingesetzt, da so für die angewendeten statistischen Verfahren die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllt werden kann [90]. Dazu werden folgende Hypothesen aufgestellt:

H_0 : Der Mittelwert der Logarithmen der Konzentrations-Dosis-Quotienten F ist gleich null.

H_A : Der Mittelwert der Logarithmen der Konzentrations-Dosis-Quotienten F ist verschieden von null.

Abhängig vom Ergebnis des Tests wird die Nullhypothese entweder verworfen oder akzeptiert. Wird die Nullhypothese verworfen, wird die Alternativhypothese angenommen und umgekehrt wird, wenn die Nullhypothese akzeptiert wird die alternative Hypothese verworfen. Dazu wird die Testgröße t_{obs} berechnet und mit dem tabellierten Wert t_{Tab} für das Signifikanzniveau α verglichen. Die Testgröße t_{obs} wird aus dem Quotienten des Mittelwerts der Logarithmen der Bioverfügbarkeit F aus Gleichung 3-24 und deren Standardabweichung ermittelt:

$$t_{\text{obs}} = \frac{MW_{\log F}}{\sqrt{\frac{s_{\log F}^2}{n}}} \quad \text{Gl. 3-25}$$

t_{obs} – Testgröße, $MW_{\log F}$ – Mittelwert der logarithmierten Bioverfügbarkeit, $s_{\log F}^2$ – Varianz der logarithmierten Bioverfügbarkeiten, n - Probenanzahl

Die Nullhypothese H_0 wird angenommen, wenn der errechnete Wert t_{obs} kleiner ist als der Tabellenwert t_{Tab} .

3.7.2.2 Berechnung des Konfidenzintervalls

Zur Bewertung der Bioäquivalenz wird das 90 % Konfidenzintervall der Mittelwerte der logarithmierten Zielgröße herangezogen und mittels Varianzanalyse das Konfidenzintervall der Differenzen der logarithmierten Mittelwerte des untersuchten Parameters berechnet [8]. In diesem Fall ist die maximale Konzentration des Wirkstoffs im Kammerwasser die Zielgröße. Das

Konfidenzintervall wird durch die Untergrenze x_u und die Obergrenze x_o beschränkt und wurde aus dem logarithmierten Mittelwert des Quotienten F, seiner Standardabweichung und dem tabellierten t-Wert mit n-1 Freiheitsgraden und der Irrtumswahrscheinlichkeit α 10 % berechnet.

$$x_u = MW_{\log F} - t_{n-1, (1-\alpha)/2} \cdot \sqrt{\frac{s_{\log F}^2}{n}} \quad \text{GI. 3-26}$$

$$x_o = MW_{\log F} + t_{n-1, (1-\alpha)/2} \cdot \sqrt{\frac{s_{\log F}^2}{n}} \quad \text{GI. 3-27}$$

x_u / x_o – untere/ obere Grenze, $MW_{\log F}$ – Mittelwert des Logarithmus von F, t – t-Wert, n – Anzahl der Einzelwerte, n-1 - Freiheitsgrade, α – Irrtumswahrscheinlichkeit, $s_{\log F}^2$ – Varianz des logarithmierten F-Werts

Die erhaltenen Grenzen wurden in den linearen Bereich zurück transformiert und durch Multiplikation mit 100 in Prozentwerte umgerechnet.

Bioäquivalenz liegt nach EMA Richtlinien dann vor, wenn das 90 % Konfidenzintervall der Zielgröße innerhalb des Bereichs von 80 bis 125 % liegt. Die Akzeptanzkriterien hängen jedoch auch von den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften des Arzneistoffs ab und können für Wirkstoffe mit enger therapeutischer Breite enger oder für Wirkstoffe mit hoher intraindividuellem Variabilität weiter gefasst sein [8].

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von Sphärolyophilisaten

4.1.1 Zielsetzung

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten Verfahrens zum Einfrieren und Gefriertrocknen von nahezu monodispersen Tröpfchen aus einer versprühten Lösung oder Dispersion.

Dabei sollten die Tröpfchen schnell eingefroren und getrocknet werden, wobei die Trocknung möglichst kontinuierlich erfolgen sollte. Die Tropfen sollten mit einem Verfahren erzeugt werden, bei dem möglichst monodisperse Tropfen entstehen.

Im Folgenden werden die Entwicklung der verschiedenen Prototypen und die damit erzielten Ergebnisse im Hinblick auf die Herstellung von Sphärolyophilisaten beschrieben. Dazu zählen folgende Untersuchungen:

- Einfrieren von Tröpfchen
- Aufnahme von Temperaturprofilen
- Messung von Strömungsgeschwindigkeiten

4.1.2 Verfahren zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchen im Vakuum (Prototyp I)

Mit Prototyp I, siehe Abschnitt 3.2.2, sollte die von Maier und Krasichkova verwendete Methode des vakuuminduzierten Einfrierens für einzeln erzeugte Tröpfchen umgesetzt werden [74,88] (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.2.3). Dazu wurden verschiedene Düsen verwendet, die nach dem Prinzip des Abtropfens und laminaren Strahlzerfalls arbeiten. Die erzielten Ergebnisse für die einzelnen Düsen werden im Folgenden in kurzer Form zusammengefasst:

1. *Pulsierende Vakuuminjektion - Flanschbauteil mit Teflonkonus*: In vorangegangenen Versuchen wurde destilliertes Wasser ohne zusätzliche Kühlung der Anlage versprüht. Die erzeugten Tropfen waren bei visueller Betrachtung mit 1 bis 2 mm sehr groß. Beim Abtropfen ins Vakuum führte dies zu einem schnellen Druckanstieg von 0,01 mbar auf

1 mbar, da die Wand des Trockenrohrs als Kondensatorfläche nicht ausreichte. Unter Anwendung von Stickstoff als Kühlmedium wurden gefrorene Tropfen erhalten. Dabei zerplatzten die Tropfen jedoch beim Eintritt ins Vakuum. Bereits nach kurzer Zeit kam es zum Zufrieren der Düse.

2. *Kontinuierliche druckunterstützte Vakuumanasugung - Sprühvorrichtung mit Membranfilter:* Mit dieser Sprüheinheit konnten unter Verwendung von destilliertem Wasser keine gefrorenen Tropfen erhalten werden. Die Düse vereiste immer sofort nach Inbetriebnahme.
3. *Kontinuierliche druckunterstützte Vakuumanasugung – Lochflanschbauteile:* In vorangegangenen Versuchen mit destilliertem Wasser konnten mit allen Bauteilen ($d=20, 50, 100 \mu\text{m}$) gefrorene Tropfen erhalten werden. Wurde über mehrere Minuten versprüht, kam es dabei ebenfalls zum Einfrieren der Düse oder zum Gefrieren des gesamten Sprühstrahls. Beim Test der Düse mit 1 %-iger HPMC und 5 %-iger Mannitol-Lösung verklebte die $100 \mu\text{m}$ Düse beim Versprühen beider Lösungen ins Vakuum.



Flanschbauteil mit Teflonkonus:
Eisbildung am Teflonstück



Sprühvorrichtung mit
Membranfilter: Düse vereist



Lochflanschbauteil $100 \mu\text{m}$:
gefrorener Strahl

Abb. 4-1 Versuchsergebnisse beim vakuuminduzierten Einfrieren

Das vakuuminduzierte Einfrieren von Tröpfchen ist prinzipiell durchführbar, jedoch kam es bei längerer Betriebsdauer immer wieder zum Einfrieren der Düsenöffnung oder zur Bildung eines gefrorenen Eisstrangs. Ein weiteres Problem stellte der Druckanstieg in der Vakuumanapparatur beim Versprühen großer Flüssigkeitsmengen dar, da das zum Einfrieren und Trocknen benötigte

Vakuum dann nicht mehr aufrechterhalten werden konnte. Die Entwicklung dieser Gefriertrocknungstechnik wurde daher nicht weiter verfolgt.

Von den verwendeten Düsen erwiesen sich die Lochflanschbauteile für das Erzeugen von Tröpfchen als praktikabel und wurden zur Weiterentwicklung eingesetzt.

4.1.3 Verfahren zum Einfrieren von Tröpfchen unter Atmosphärendruck (Prototypen IIa und b)

Die Prototypen IIa und IIb wurden zum Einfrieren von Tröpfchen benutzt. Sie sind ähnlich wie Prototyp I aufgebaut, es wird jedoch beim Einfrieren kein Vakuum angelegt.

Mit Prototyp IIa ($d=2,5$ cm, $l=110$ cm) wurden die ersten gefrorenen Tröpfchen erhalten und Einfrierversuche mit unterschiedlichen Hilfsstofflösungen durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Die gefrorenen Tropfen wurden anschließend in einem konventionellen Gefriertrockner getrocknet.

Bei den Versuchen mit der DropJet Düse stellte sich heraus, dass sich der erhaltene Sprühstrahl unter bestimmten Versuchsbedingungen recht stark in horizontaler Richtung aufweitete, sodass sich Tröpfchen an den Innenwänden des Einfrierrohrs abschieden und einfroren (siehe auch Abschnitt 4.2.4). Daher wurde für Prototyp IIb ein kürzeres und doppelt so weites Stahlrohr ($d=5,0$ cm, $l=41$ cm) als Einfrierrohr verwendet.

4.1.3.1 Ermittlung der benötigten Strecke zum Durchfrieren von Tröpfchen

Um die tatsächlich benötigte Länge für das Einfrierrohr zum Bau von Prototyp IIb zu bestimmen, wurde in der Anlage (Prototyp IIa) die Strecke ermittelt, die die Tröpfchen zum Durchfrieren zurücklegen müssen. Zur Beurteilung des Aggregatzustandes der Tröpfchen wurde mit der DropJet-Düse eine 0,01 %-ige wässrige Methylenblaulösung versprüht. Die Tröpfchen wurden in Abständen von 10 bis 100 cm von der Düsenöffnung im Einfrierrohr auf einem weißen Filterpapier aufgefangen und zur Kontrolle fotografiert. Die durchgefrorenen Partikel konnten von den flüssigen Tröpfchen sehr einfach unterschieden werden, da das Filterpapier die flüssigen Tröpfchen gut sichtbar aufsaugte. Die gefrorenen Tropfen lagen als hellviolette Partikel auf dem Filter, die flüssigen

waren hingegen als dunkelblaue Flecken auf dem Filter erkennbar. Nach einer Fallstrecke von 36 cm waren alle versprühten Tröpfchen im Einfrierrohr durchgefroren. Das Einfrierrohr des Prototyps IIb wurde daher mit einer Länge von 41 cm gefertigt.

4.1.3.2 Temperaturverlauf im geschlossenen Einfrierrohr

Zur Ermittlung des Temperaturprofils des Einfrierrohrs ($d=5,0$ cm, $l=41$ cm) wurden die Temperaturen beim Kühlen mit flüssigem Stickstoff aufgezeichnet. Das Führungsrohr mit dem Pt 100-Thermofühler wurde in der Mitte des Einfrierrohrs auf halber Höhe positioniert. Das Einfrierrohr wurde dabei wie zum Einfrieren von Partikeln an der Unterseite verschlossen. Die Messungen ergaben nach ca. 35 Minuten eine konstante minimale Temperatur von -153 °C in der Mitte des Einfrierrohrs.

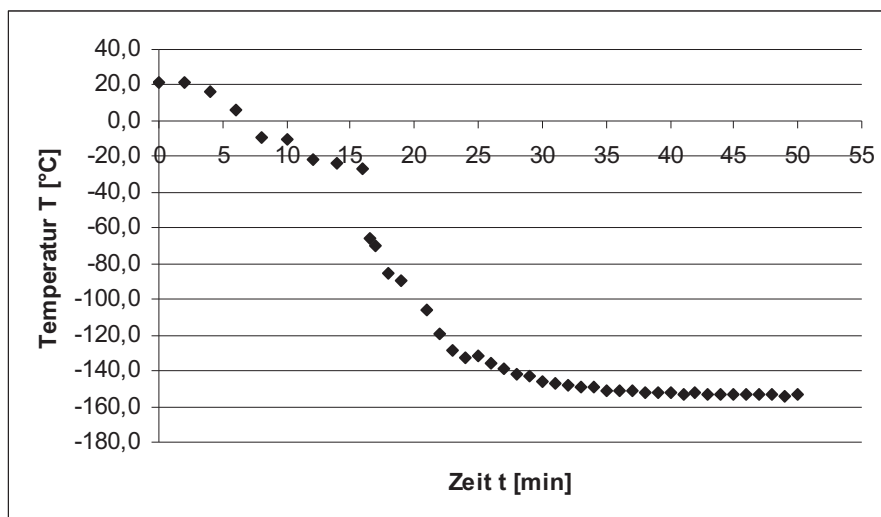


Abb. 4-2 Temperaturverlauf im Einfrierrohr beim Kühlen mit flüssigem Stickstoff (Prototyp IIb)

Zur Überprüfung des Durchfrierens wurde wie in Abschnitt 4.1.3.1 wässrige Methylenblaulösung auf ein weißes Filterpapier versprüht. Für die Sprühdrukke 50, 100, 150 und 200 mbar wurden stets gefrorene Partikel erhalten, die anschließend in einem konventionellen Gefriertrockner getrocknet werden können.

4.1.4 Verfahren zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung (Prototyp III)

Das Konzept zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung wurde bereits in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben. Zur Umsetzung des Konzepts

wurde eine vereinfachte Version der im Konzept beschriebenen Anlage konstruiert. Der Aufbau und die Funktionsweise der Versuchsanlage sind in Abschnitt 3.2.4.1 dargestellt.

In den nachfolgenden Abschnitten sind die Messergebnisse der Temperatur- und Strömungsmessungen aufgezeigt. Die theoretischen Vorgaben in Bezug auf Temperatur und Strömung in den einzelnen Funktionseinheiten der Versuchsanlage ergeben sich aus dem Konzept zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung. Demnach ergibt sich für Partikel mit einem Durchmesser von 200 μm und einer Dichte von 1 g/cm^3 in Luft bei 20 °C eine Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeit von 0,7 m/s. Um die Partikel in Schwebelage zu halten sollte daher im unteren Drittel der Trockenkammer (Durchmesser 10 cm) ein Volumenstrom von 5 L/s eingestellt werden. Bei niedrigerer Temperatur, die für die Trocknung erforderlich ist, sinkt die Viskosität der Luft (vergleiche Tabelle 2-1). Dadurch steigt nach Gleichung 2-17 die Sedimentationsgeschwindigkeit und ein etwas größerer Volumenstrom ist erforderlich. In Tabelle 4-1 sind die theoretischen Vorgaben zur besseren Übersicht noch einmal zusammengefasst.

| Funktionseinheit | Temperatur [°C] | Strömungsgeschwindigkeit [m/s] |
|---------------------|-----------------|--------------------------------|
| Tiefkühlkondensator | -150 | - |
| Einfrierrohr | -80 bis -100 | - |
| Hauptkondensator | -40 bis -60 | - |
| Lüfter | - | 4 ¹⁾ |
| Trockenkammer | -20 bis -40 | 0,70 ¹⁾ |

Tab. 4-1 Theoretische Voraussetzungen zur Temperatur und Strömungsgeschwindigkeit in den verschiedenen Funktionseinheiten der ACD-Anlage, ¹⁾ entspricht Volumenstrom von 5 L/s

4.1.4.1 Temperaturverteilung in der ACD-Gefriertrocknungsanlage

Zur Untersuchung der Temperaturverteilung im Gleichgewichtszustand in der gesamten Anlage wurden Temperaturmessungen bei maximal möglicher Kühlung durchgeführt. Dazu wurden zunächst die beiden Kryostaten zur Kühlung der Trockenkammer und des Hauptkondensators ca. 20 Stunden bei eingeschaltetem Gebläse vorgekühlt. Der Kryostat an der Trockenkammer

wurde auf -30 °C und der Kryostat am Hauptkondensator auf -50 °C eingestellt. Anschließend wurde kontinuierlich Stickstoff in den Tiefkühlkondensator gegeben, sodass der Vorratsbehälter stets zu mindestens $1/3$ befüllt war. Nach ca. 2 Stunden stellte sich in der Anlage ein Temperaturgleichgewicht ein. Zur Übersicht sind alle Messstellen für die Temperaturmessungen in Abbildung 4-3 eingezeichnet.

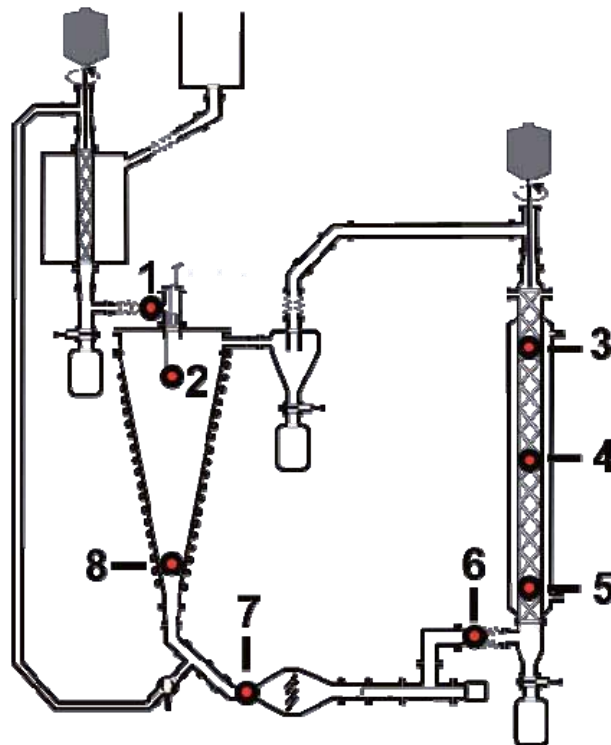


Abb. 4-3 Messstellen für die Bestimmung der Gleichgewichtstemperaturen (verwendete Messinstrumente: 1, 6, 7 – Thermoelemente, 2, 3, 4, 8, - Pt 100, 5 – Datenlogger, Messungen jeweils in der Rohrmitte)

Ursprünglich war ein längerer Tiefkühlkondensator auf gleicher Höhe neben der Trockenkammer eingebaut. Dabei war das untere Ende des Tiefkühlkondensators an den Strömungsteiler angeschlossen und das obere Ende mit dem Einfrierrohr verbunden. Die Luft sollte durch den Tiefkühlkondensator aufsteigen, dabei abkühlen und dann ins Einfrierrohr gelangen. Dabei zeigte sich, dass sich die Luft im Einfrierrohr nicht wesentlich abkühlte, obwohl im Kondensator tiefkalte Temperaturen herrschten. Temperaturmessungen zeigten dann, dass die kalte Luft nach unten fiel und in den unteren Teil der Trockenkammer gelangte. Die Luft sank also aufgrund ihrer höheren Dichte ab und ließ sich nicht wie angenommen in aufsteigende Richtung befördern. Deshalb wurde ein kurzer Tiefkühlkondensator eingebaut und so angeschlossen, dass die aus dem Strömungsteiler zugeführte Luft den

Kondensator zum Kühlen von oben nach unten passiert und anschließend ins Einfrierrohr strömt.

| Funktion | Einfrieren | | Regeneration des Trockengases | | | | Trocknung | |
|-----------------|------------|-----|-------------------------------|---|-----|-----|-----------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Messstelle | | | | | | | | |
| Temperatur [°C] | -90 | -65 | 5 | 0 | -20 | -10 | 0 | -15 |

Tab. 4-2 Gleichgewichtstemperaturen in der ACD-Gefriertrocknungsanlage bei maximaler Kühlung

Die Temperaturmessungen zeigen, dass die Temperaturen in den verschiedenen Abschnitten der Anlage annähernd den angestrebten Werten entsprechen.

Im Einfrierbereich der Anlage sind die Temperaturen jedoch etwas höher als erwartet. Auffällig ist der Temperaturunterschied von ca. 25 °C zwischen der Zuführung zum Einfrierrohr (Messstelle 1) und dem Einfrierrohr (Messstelle 2). Im Gegensatz zu den vorherigen Prototypen herrscht nun im Einfrierrohr eine dem Sprühstrahl gleichgerichtete Strömung.

Im Hauptkondensator nimmt die Temperatur von oben nach unten ab (Messstellen 3, 4, 5). Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass die kalte Luft aufgrund ihrer höheren Dichte absinkt und sich deshalb in tiefer gelegenen Teilen der Anlage sammelt. Insgesamt sind die Temperaturen im Hauptkondensator höher als erwartet, wenn man bedenkt, dass die Temperatur der Kühlflüssigkeit -50 °C beträgt. Ursache dafür ist vermutlich eine unzureichende Isolierung des Hauptkondensators.

Im Zulauf vom Hauptkondensator zur Trockenkammer wurden an den Messstellen 6 und 7 wieder steigende Temperaturen beobachtet. Eine mögliche Ursache kann Wärmeerzeugung durch den Motor des eingebauten Lüfters sein (Kenndaten Lüfter siehe Abschnitt 7.2.3). In der Trockenkammer wird die Temperatur insgesamt durch die vom Hauptkondensator zugeführte wärmere Luft und die einströmende kältere Luft aus dem Einfrierrohr bestimmt. Die Temperatur im unteren Teil der Trockenkammer (Messstelle 8) entspricht dabei ungefähr dem für den Betrieb angestrebten Wert von -20 °C.

Die im Einfrierteil gemessene Temperatur wird vermutlich nicht ausreichen, um Tröpfchen einzufrieren. Gesicherte Aussagen über die Temperaturverteilung waren mit diesen Messungen nicht möglich. Daher wurden ergänzende Temperaturmessungen im Einfrierteil durchgeführt. Die Ergebnisse zu den Messungen im Einfrierteil werden im Folgeabschnitt 4.1.4.2 beschrieben. Die Temperaturen im Hauptkondensator sind wahrscheinlich aufgrund unzureichender Isolierung höher als erwartet. Im untersten Teil der Trockenkammer liegt die Temperatur im erwarteten Bereich. Tiefere Temperaturen in der Trockenkammer können auch durch Verwendung eines Kryostaten, der eine tiefere Minimaltemperatur erreicht, erhalten werden.

4.1.4.2 Temperaturverlauf im Einfrierteil

Im Einfrierteil der ACD-Gefriertrocknungsanlage wird bedingt durch die Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit Temperaturen von etwa -150 °C gearbeitet. In den nachfolgenden Versuchen wurden Temperaturen am Ende des Tiefkühlkondensators, vertikale Temperaturprofile im Zulauf zum Einfrierrohr, sowie horizontale und vertikale Temperaturprofile im Einfrierrohr gemessen. Aus diesen Versuchen sind Rückschlüsse auf Strömungsmuster möglich. Zusätzlich wurde der Einfluss von Stautrichtern als Strömungshindernis untersucht. Die Strömungsverhältnisse im Einfrierteil der Anlage sind kompliziert, weil Dichte und Viskosität der Luft stark temperaturabhängig sind. Besonders deutlich zeigte sich dies an den Temperaturprofilen im Zulauf- und Einfrierrohr. Die ACD-Anlage befand sich bei allen Temperaturmessungen im thermischen Gleichgewicht.

Temperaturen im Einfrierbereich

Die Temperaturen wurden, wie in Abbildung 4-4 gezeigt, an 3 unterschiedlichen Stellen im Einfrierbereich gemessen: unter dem Tiefkühlkondensator, im Zulaufrohr und im Einfrierrohr. Die Strömungsgeschwindigkeit wurde dabei nicht verändert und betrug vor dem Tiefkühlkondensator bei einem Querschnitt von 5 cm^2 etwa 1 m/s , einem Volumenstrom von $0,5\text{ L/s}$ entsprechend.

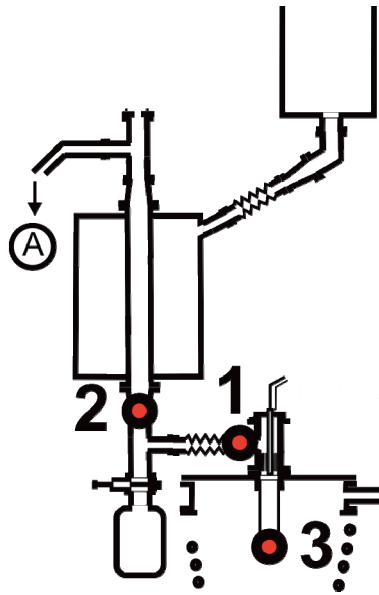


Abb. 4-4 Versuchsanordnung zu Temperaturmessungen im Einfrierteil: 1, 2 – Thermoelemente, 3 – Pt 100, A - Anemometer

| Bauteil | Tiefkühlkondensator | Zulaufrohr | Einfrierrohr |
|-----------------|---------------------|-------------|--------------|
| Messstelle | 2 | 1 | 3 |
| Temperatur [°C] | -150 bis -55 | -50 bis -55 | -40 bis -50 |

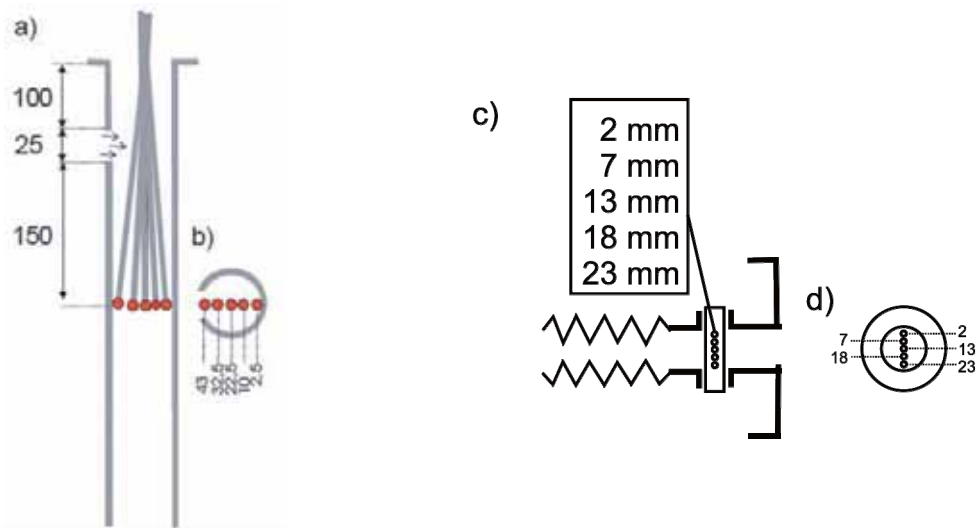
Tab. 4-3 Gleichgewichtstemperaturen im Einfrierteil

Die Messergebnisse zeigen, dass die Temperaturverteilung im Einfrierbereich sehr unterschiedlich ist. Wie erwartet wurden direkt unter dem Tiefkühlkondensator Temperaturen von ca. -150 °C gemessen. Im Zulaufrohr und im Einfrierrohr sind die Temperaturen jedoch ca. 100 °C höher. Die Entfernung zum Tiefkühlkondensator beträgt nur wenige Zentimeter. Daher wurde vermutet, dass die warme aufsteigende Luft aus der Trockenkammer zur Temperaturerhöhung beiträgt und dass die Temperatur nicht über den gesamten Rohrquerschnitt gleich verteilt ist. Deshalb wurden die Temperaturprofile in den Querschnitten von Zulauf- und Einfrierrohr bestimmt.

Temperaturen in den Querschnitten des Zulauf- und Einfrierrohrs

Die Temperaturmessungen erfolgten wie in Abbildung 4-4 dargestellt, jedoch wurden in den Querschnitten von Zulauf- und Einfrierrohr zusätzlich die Positionen der Messinstrumente verändert. In Abbildung 4-5 sind die Abstände für horizontale und vertikale Messpositionen im Einfrier- und Zulaufrohr

aufgezeigt. Die Messposition des Thermoelements unterhalb des Tiefkühlkondensators wurde nicht verändert, da dort keine wesentlichen Unterschiede der Temperaturverteilung über den Rohrquerschnitt erwartet wurden.



a – Horizontale Messpositionen im Einfrierrohr: Messinstrument Pt100; Messpositionen aus b - 43, 33, 23, 10, 3 mm, Eintauchtiefe 150 mm

c – Vertikale Messpositionen im Zulaufrohr: Messinstrument Thermoelement, Messpositionen 2, 7, 13, 18, 23 mm; d – frontale Aufsicht auf Flansch mit Messpositionen

Abb. 4-5 Anordnung der Messinstrumente in den Rohrquerschnitten

Zur Kontrolle der horizontalen Messposition wurde der an einem Messingstab befestigte Pt 100-Sensor in zentraler Position in einem Blindflansch so fixiert, dass er nur in seitlicher Richtung beweglich war. Der Abstand zum Einfrierrohr wurde über verschiedene Winkel, die auf einer auf dem Blindflansch angebrachten Kunststoffscheibe markiert wurden, eingestellt. Es wurden Abstände von 43, 33, 23, 10 und 3 mm eingestellt, wobei der Abstand von 43 mm die nächste und der Abstand von 3 mm die entfernteste Position von der Zulaufseite ist.

Für die Einstellung der vertikalen Messpositionen wurde, wie in Abbildung 4-5 gezeigt, das Thermoelement durch eine Bohrung im Zentrierring in das Verbindungsstück geführt. Das Thermoelement ist ca. 1 mm dick und 100 mm lang. Zur Einstellung der vertikalen Position wurden dem Thermoelement verschieden lange Kunststoffhülsen aufgesteckt, die breiter waren als die Bohrung im Zentrierring, weshalb sich das Thermoelement nur bis zur gewünschten Position einführen ließ. Die Messpositionen befanden sich 2, 7,

13, 18 und 23 mm unterhalb der Bohrung im Zentrierring zwischen Zulauf- und Einfrierrohr.

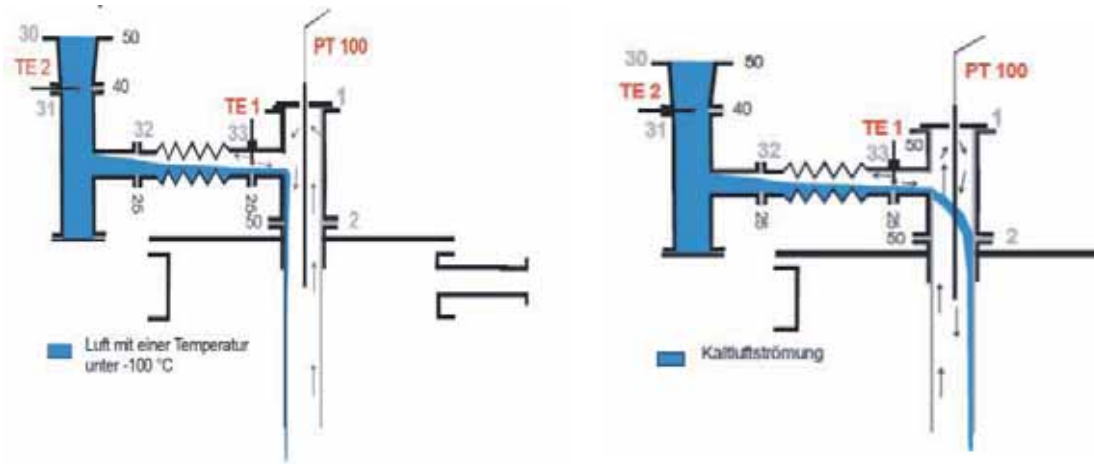
Die Strömungsgeschwindigkeit wurde durch Veränderung der Stellung des Kugelhahns variiert, der sich in der Zuführung des Teilstroms zum Tiefkühlkondensator befindet, siehe auch Abbildung 2-13. Die Messungen wurden jeweils bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten von 2 bis 3 m/s, bei einer Querschnittsfläche von etwa 5 cm², einem Volumenstrom von 1,0 bis 1,5 L/s entsprechend, und bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten von 0,3 bis 0,4 m/s, einem Volumenstrom von 0,1 bis 0,2 L/s entsprechend, vor dem Tiefkühlkondensator durchgeführt.

In Tabelle 4-4 sind die Ergebnisse der Temperaturmessungen für den Einfrierbereich in Abhängigkeit von der Messposition und der Strömung dargestellt.

| | Volumenstrom [L/s] | |
|---|--------------------|-------------|
| | 0,1 bis 0,2 | 1,0 bis 1,5 |
| Messstellen: <i>Position</i> | Temperaturen [°C] | |
| Tiefkühlkondensator: <i>Zentrierring im Flansch zum Zulaufrohr, Mitte</i> | -115 bis -150 | -30 bis -50 |
| Zulaufrohr: <i>vertikale Positionen [mm]</i> | | |
| 2 | -39 | -35 |
| 7 | -54 | -43 |
| 13 | -75 | -48 |
| 18 | -86 | -49 |
| 23 | -90 | -49 |
| Einfrierrohr: <i>horizontale Positionen [mm]</i> | | |
| 3 | -59 | -41 |
| 10 | -60 | -41 |
| 23 | -60 | -41 |
| 33 | -48 | -40 |
| 43 | -48 | -39 |

Tab. 4-4 Gleichgewichtstemperaturen im Einfriereteil, ortsabhängig: Temperaturverlauf im Zulauf- und Einfrierrohr (Volumenstrom im Teilstrom des Tiefkühlkondensators gemessen)

Wie nach den Temperaturmessungen im Einfrierbereich vermutet, ist die Temperaturverteilung über den Rohrquerschnitt unterschiedlich. Außerdem ist die erreichte Temperatur abhängig von der Strömung, dabei hatten niedrige Strömungsgeschwindigkeiten einen stärkeren Temperaturabfall zur Folge. Dies wurde besonders bei den Temperaturmessungen unterhalb des Tiefkühlkondensators deutlich. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Kaltluft nicht wie erwartet an der zulaufseitigen Wand des Einfrierrohrs entlang strömte, sondern an der gegenüberliegenden Wand. Die Verteilung der Kaltluft im Einfrierbereich ist in der folgenden Abbildung vereinfacht dargestellt.



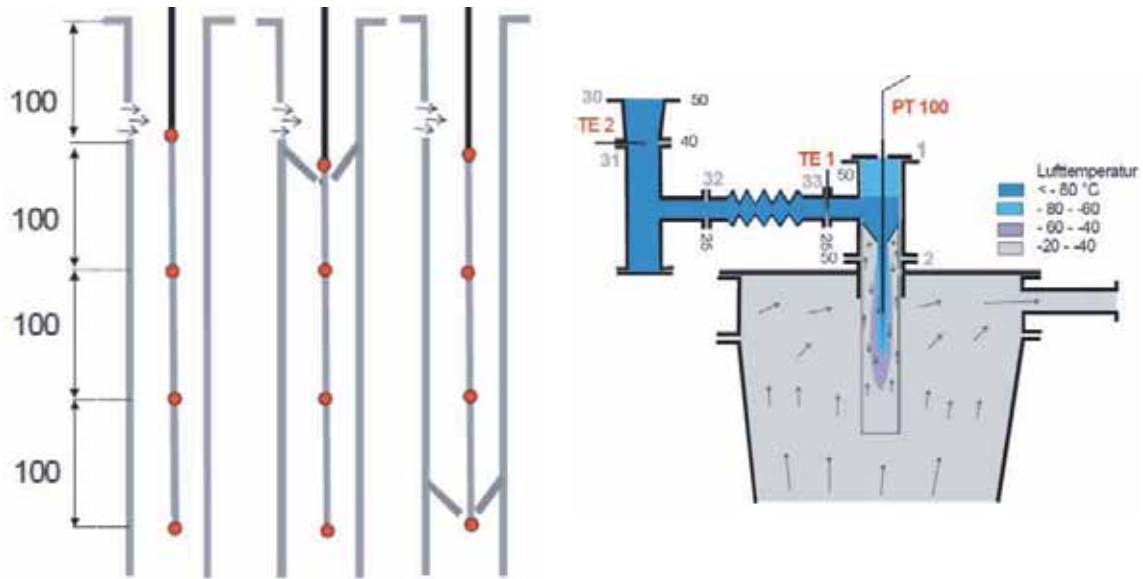
a – Erwartete Temperaturverteilung

b – Gefundene Temperaturverteilung

Abb. 4-6 Temperaturprofile bei niedriger Strömungsgeschwindigkeit (TE 1, 2 – Thermoelemente, PT 100 – Pt 100 Messfühler an Führungsrohr, graue Zahlen bezeichnen Systemnummern und schwarze Zahlen Durchmesser der Flansche)

Einfluss von Stautrichtern

Mit diesem Versuchsaufbau wurde geprüft, wie sich die Temperaturverteilung im Einfrierteil durch den Einbau von Strömungshindernissen steuern lässt. Als Strömungsbarrieren dienen Stautrichter, die einerseits die kalte Luft, die aus dem Tiefkühlkondensator zugeführt wird, sammeln und andererseits die aus der Trockenkammer von unten zuströmende Warmluft abschirmen. Ein Stautrichter (Öffnungsdurchmesser 13 mm) wurde in hoher und tiefer Position im Einfrierrohr eingebaut (10 cm bzw. 45 cm unterhalb der oberen Öffnung des Einfrierrohrs). Zur Überprüfung wurden im Einfrierrohr Messungen entlang der Längsachse in Abständen von 10 cm vorgenommen. Das vertikale Temperaturprofil im Zulaufrohr, siehe Abbildung 4-5, wurde wieder in 5 mm Schritten aufgenommen. Da aus den vorhergegangenen Versuchen bekannt war, dass die Temperaturen bei niedriger Strömungsgeschwindigkeit tiefer sind als bei hoher, wurden die Messungen bei niedriger Strömungsgeschwindigkeit von 0,8 bis 1,2 m/s, bei einem Querschnitt von etwa 5 cm² einem Volumenstrom von 0,4 bis 0,6 L/s entsprechend, durchgeführt. In Abbildung 4-7 sind die Positionierung des Trichters und die erwartete Temperaturverteilung vereinfacht dargestellt.



a – Positionierung des Temperatursensors Pt100 und des Stautrichters (Abstände 100 mm)

b – Erwartete Temperaturverteilung, Beispiel für hohe Position des Trichters

Abb. 4-7 Erwartete Temperaturverteilung mit eingebauter Strömungsbarriere (TE 1, 2 – Thermoelemente, PT 100 – Pt 100 Messfühler an Führungsrohr, graue Zahlen bezeichnen Systemnummern und schwarze Zahlen Durchmesser der Flansche)

Erste Versuche, bei denen ein Stautrichter (Öffnungsdurchmesser 13 mm) in hoher und tiefer Position eingebaut wurde, zeigten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Temperaturverteilung, jedoch schwankten Temperatur und Strömungsgeschwindigkeit bei hoher Trichterpositionierung stärker.

Weitere Temperaturmessungen erfolgten daher bei tiefer Position (45 cm unterhalb der oberen Öffnung des Einfrierrohrs). Um den Einfluss des Öffnungsdurchmessers zu bewerten, wurden verschiedene Stautrichter mit Öffnungsdurchmessern von 2,2 , 3,0 , 6,5 und 9,0 mm eingesetzt. Die Messergebnisse für das Zulauf- und Einfrierrohr sind in den Abbildungen 4-8 und 4-9 dargestellt.

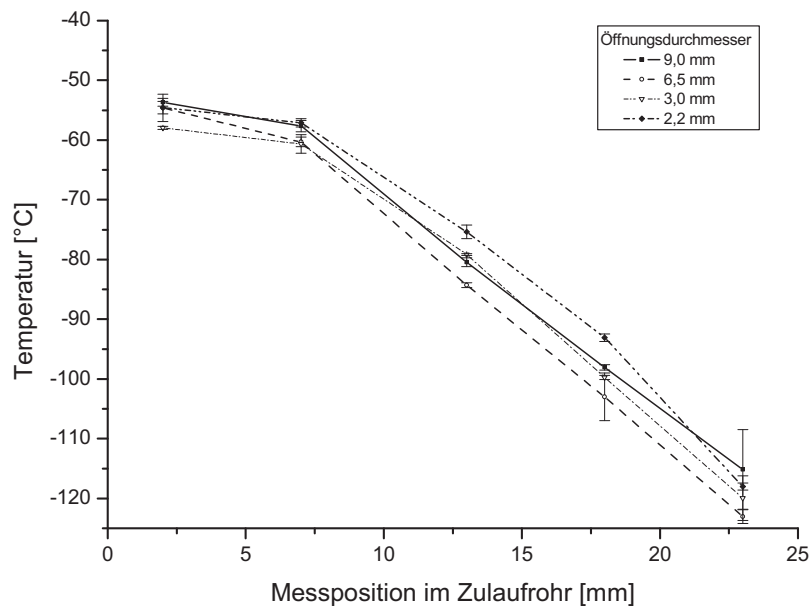


Abb. 4-8 Temperaturprofil im Zulaufrohr für Trichter mit verschiedenen Öffnungsdurchmessern, Position des Stautrichters 45 cm unterhalb der oberen Öffnung des Einfrierrohrs (n=2)

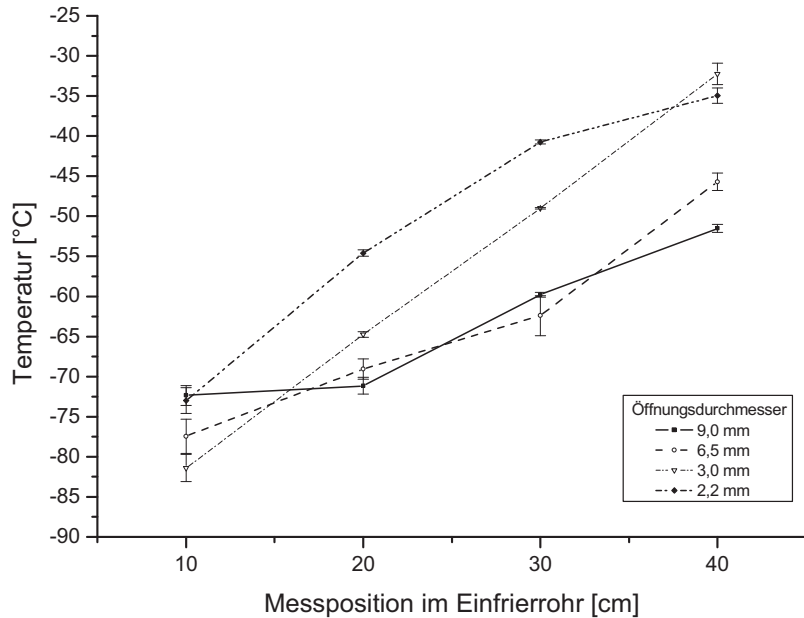


Abb. 4-9 Temperaturprofil im Einfrierrohr für Trichter mit verschiedenen Öffnungsdurchmessern, Position des Stautrichters 45 cm unterhalb der oberen Öffnung des Einfrierrohrs (n=2)

Mit den eingesetzten Trichtern wurden im Vergleich zu den Messungen ohne Trichter tiefere Temperaturen im Einfrier- und Zulaufrohr erzielt. Die Temperaturverteilung im Zulaufrohr ist für alle Trichteröffnungen ungefähr

gleich. Die Temperaturen reichen von -50 bis -60 °C bis zu -115 bis -125 °C. Der Temperaturgradient über den Rohrquerschnitt ist annähernd linear, er beträgt zwischen dem oberen und unteren Teil der Wand des Zulaufrohrs 3,1 °C pro Millimeter. Über die Längsachse des Einfrierrohrs ist die Temperaturverteilung ebenfalls heterogen. Die tiefsten Temperaturen werden im oberen Teil des Rohrs gemessen, sie reichen von -70 bis -85 °C. Zum unteren Ende des Einfrierrohrs hin erwärmt sich das Gas, die Temperaturen reichen im unteren Teil von -35 bis -55 °C. Ein eindeutiger Einfluss des Öffnungsdurchmessers des Trichters auf die Temperaturverteilung ist nicht erkennbar.

Die Kaltluft aus dem Tiefkühlkondensator kann zwar durch Strömungsbarrieren gestaut werden, vermutlich hat die Wärmezufuhr über die verhältnismäßig warme Luft in der Trockenkammer jedoch einen größeren Einfluss auf die Temperatur im Einfrierrohr als erwartet. Versuche, bei denen das Einfrierrohr mit einer dünnen Isolierschicht aus Filterpapier und Teflonfolie versehen wurde, führten nicht zu einer deutlichen Temperatursenkung. Daher wird vermutet, dass einströmende wärmere Luft aus der Trockenkammer trotz der geringen Öffnungsdurchmesser der eingesetzten Stautrichter zur Temperaturerhöhung beiträgt.

Fazit

Besonders bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten wurden im Einfrierbereich große Temperaturdifferenzen zwischen Tiefkühlkondensator und Einfrierrohr sowie variable Temperaturprofile im Längs- und Querschnitt des Einfrierrohrs festgestellt. Durch den Einsatz von Strömungshindernissen konnten insgesamt tiefere Temperaturen erreicht werden, die vermutlich nicht zum Einfrieren von mit der DropJet Düse erzeugten Tröpfchen ausreichen. Die experimentelle Bestimmung der Temperatur- und Strömungsprofile im Einfrierrohr ist sehr aufwändig und zeitraubend. Sehr viel effizienter ist dies auf der Grundlage mathematischer Modelle möglich, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr zur Verfügung standen und in einem Folgeprojekt entwickelt werden.

4.1.4.3 Beeinflussung der Strömungsgeschwindigkeit in der Trockenkammer

Die einzustellende Gleichgewichtsströmungsgeschwindigkeit in der Anlage ist sowohl vom Durchmesser der versprühten Tropfen als auch vom Durchmesser des Teils der Trockenkammer, in dem sie getrocknet werden, abhängig. Um einen groben Überblick zu erhalten, in welchem Rahmen die Strömungsgeschwindigkeit reguliert werden muss um die Tröpfchen in der Schwebelage zu halten und die trockenen Partikel aus dem Gasstrom abzutrennen, wurden vereinfacht Gleichgewichtsvolumenströme berechnet. Dabei wurde stark vereinfacht angenommen, dass in der Trockenkammer eine laminare Strömung herrscht und dass für jede vertikale Position in der Trockenkammer in Abhängigkeit des Querschnitts ein bestimmter Volumenstrom zum Betrieb eingestellt werden muss. In Abbildung 4-10 ist der einzustellende Volumenstrom für Tröpfchen mit der Dichte 1 g/cm^3 von 10 bis $400 \text{ }\mu\text{m}$ für verschiedene Positionen in der Trockenkammer mit 5, 10 oder 15 cm Durchmesser dargestellt. Zur Berechnung wurden die entsprechenden Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeiten in Luft bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ aus Abbildung 2-14 zugrunde gelegt. Dabei ist zu bedenken, dass die Viskosität der Luft bei geringeren Temperaturen abnimmt und sich für den Betrieb der Anlage nach Gleichung 2-17 höhere Sedimentationsgeschwindigkeiten ergeben.

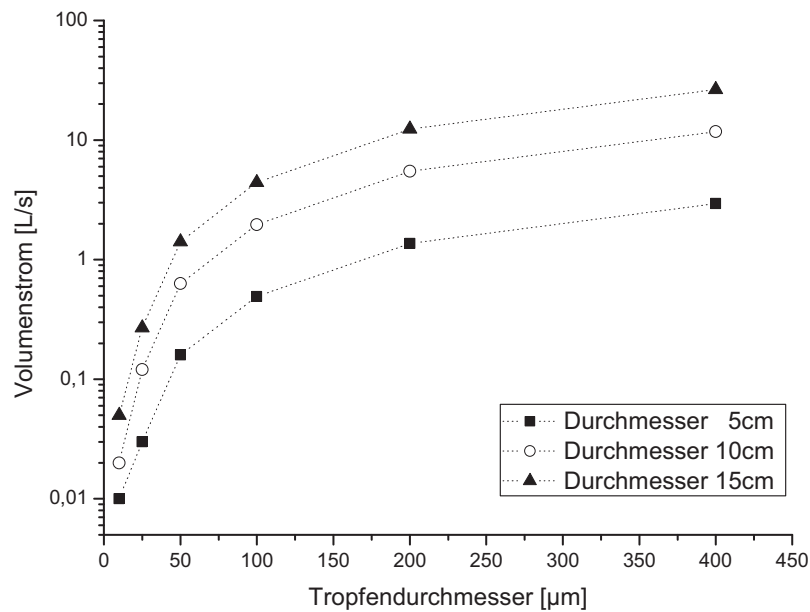


Abb. 4-10 Hypothetische Gleichgewichtsvolumenströme für Tropfen (Dichte=1 g/cm³) an verschiedenen vertikalen Positionen in der Trockenkammer bei laminarer Strömung

Zur Einstellung der Strömungsgeschwindigkeiten bzw. Volumenströme wurden 3 verschiedene regelbare Lüfter (Typen: Thermaltake Smart Case Fan II 8 cm und 12 cm, Vario-Pro[®] 3214 JH3, siehe auch Abschnitt 3.2.4.1) eingesetzt. Die erzeugten Volumenströme bei unterschiedlicher Regulierung der 3 Typen sind im Anhang, Abschnitt 7.2.3, aufgeführt. Ziel war es, einen möglichst breiten Strömungsbereich abzudecken, um in der Anlage Tröpfchen verschiedenen Durchmessers trocknen zu können. Die Modelle des Typs Smart Case waren zwar eine sinnvolle Erweiterung des niedrigen Strömungsbereichs, erwiesen sich jedoch im Verlauf der Versuche als sehr kurzlebig. Daher wurde nur mit dem Lüfter des Typs Vario-Pro[®] mit einer spannungsabhängigen Regulierung von 15 bis 26 Volt weitergearbeitet. Da der Lüfter den niedrigen Strömungsbereich nicht abdeckte, wurden Lochblenden als Strömungsbarrieren in den Hauptstrom vor dem Abzweig zum Tiefkühlkondensator eingebaut um den Regelbereich nach unten zu erweitern.

Die ACD-Anlage ist so aufgebaut, dass durch den Lüfter ein Gesamtstrom erzeugt wird, aus dem dann am Strömungsteiler zwei Teilströme zum Tiefkühlkondensator und zur Trockenkammer entstehen, die später wieder zusammengeführt werden. Bei den nachfolgend ausgeführten Versuchen wurde daher zunächst das Teilungsverhältnis des Gesamtstroms bestimmt,

anschließend untersucht wie sich das Teilungsverhältnis bei verschiedenen Stellungen des Kugelhahns verändert und wie sich der Gesamtstrom durch Lochblenden verringern lässt. Zur Übersicht sind in Abbildung 4-11 die Messstellen zur Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeiten in der ACD-Anlage eingezeichnet.

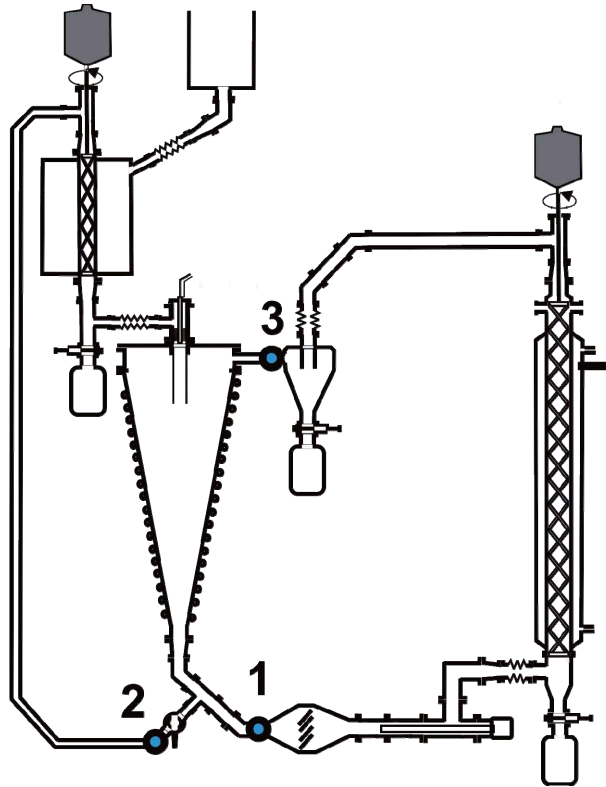


Abb. 4-11 Messstellen für die Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeiten:
1 – Gesamtstrom vor eingesetzter Lochblende und Teilung (Luftströmungs-Messstick);
2 – Teilstrom Tiefkühlkondensator hinter Kugelhahn (Luftströmungs-Messstick);
3 – Gesamtstrom nach Teilung (Flügelradanemometer), Kontrolle

Teilungsverhältnis des Gesamtstroms

Aus baulichen Gründen konnte die Strömungsgeschwindigkeit nicht direkt in oder am Einlass der Trockenkammer gemessen werden, sondern wurde vor der Abtrennung des Teilstroms zum Tiefkühlkondensator bestimmt. Daher wurden zunächst der Gesamtvolumenstrom und der Teilstrom zum Tiefkühlkondensator gemessen und aus der Differenz der beiden Teilströme der Teilstrom zur Trockenkammer ermittelt. Der Gesamtvolumenstrom wurde vor dem Zyklon zusätzlich kontrolliert. Erwartungsgemäß war dieser genauso groß wie vor dem Strömungsteiler. Die Volumenströme bei verschiedenen Lüfterspannungen sind in Abbildung 4-12 aufgezeigt. Der Anteil des Teilstroms zum

Tiefkühlkondensator beträgt 22 % des Gesamtstroms, das entspricht einem ungefähren Teilungsverhältnis von 8:2.

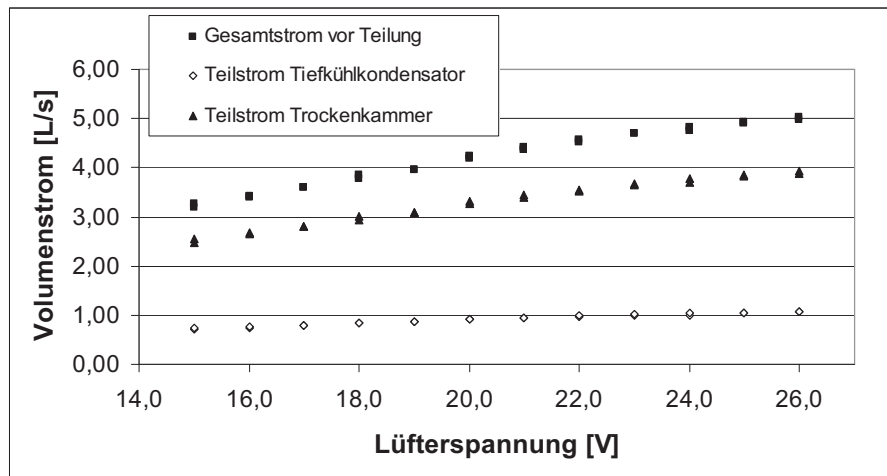


Abb. 4-12 Volumenströme in Abhängigkeit der Lüfterspannung (n=2, MW aus minimalen und maximalen Werten im Messzeitraum von 30 s)

Veränderung des Teilungsverhältnisses des Gesamtstroms

Durch Verkleinerung des Teilstroms zum Tiefkühlkondensator kann der Teilstrom zur Trockenkammer erhöht werden. Zur Verringerung des Teilstroms ist nach der Teilung im Tiefkühlkondensatorstrom ein Kugelhahn eingebaut. Die Öffnung wurde jeweils in 4 markierten Stellungen variiert, wobei Stellung 1 die größte und Stellung 4 die kleinste mögliche Öffnung bezeichnet. Die Volumenströme bei verschiedenen Stellungen des Kugelhahns sind für die minimale und die maximale Lüfterspannung (15 bis 26 Volt) in Abbildung 4-13 aufgetragen. Der Teilstrom zur Trockenkammer wurde aus dem ermittelten Teilungsverhältnis berechnet.

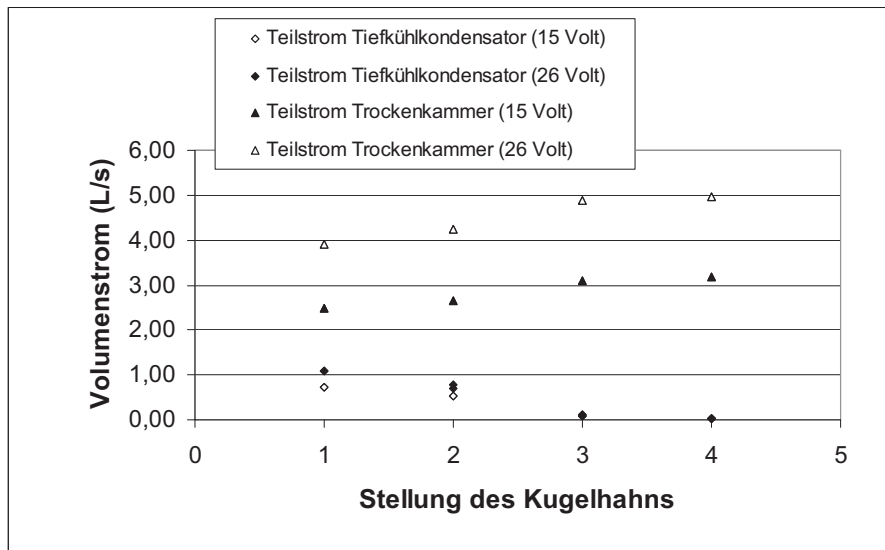


Abb. 4-13 Volumenströme bei verschiedenen Stellungen des Kugelhahns (n=2, MW aus minimalen und maximalen Werten im Messzeitraum von 30 s)

Einstellung Kugelhahn – 1: ca. 80 %, 2: ca. 60 %, 3: ca. 40 %, 4: ca. 20 % geöffnet
 Teilungsverhältnis - Stellung 1: 8:2; Stellung 2: 1,5:7,5; Stellung 3: 0,3:9,7; Stellung 4: 0,1:9,9

Verringerung des Gesamtstroms durch Lochblenden

Zur Trocknung kleinerer Teilchen muss die Gleichgewichtsedimentationsgeschwindigkeit in der Trockenkammer kleinere Werte annehmen als bisher mit dem Lüfter des Typs Vario Pro erzielt wurden. Daher wurden zur Verringerung des Gesamtstroms verschiedene Lochblenden mit verschiedenen Öffnungen von 191 bis 314 mm² (191, 236, 254, 314 mm²) als Strömungshindernisse eingesetzt. In Abbildung 4-14 sind die resultierenden Gesamtvolumenströme bei Durchströmung verschiedener Querschnitte in Abhängigkeit der Lüfterspannung dargestellt.

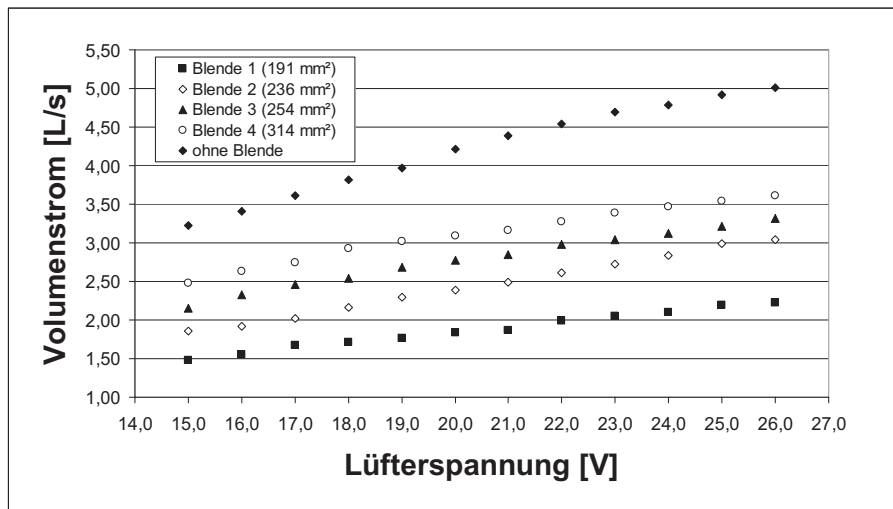


Abb. 4-14 Gesamtvolumenstrom in Abhängigkeit der Lüfterspannung für verschiedene Lochblenden (n=2, MW aus minimalen und maximalen Werten im Messzeitraum von 30 s)

Fazit

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass der gesamte Volumenstrom in Abhängigkeit der Lüfterspannung und durch den Einsatz verschiedener Lochblenden im Bereich von 1,5 bis 5,0 L/s gut reguliert werden kann. Dies ist mit einer Genauigkeit von 0,1 L/s möglich. Dabei liegt ein Teilungsverhältnis von 8:2 für die Teilströme zur Trockenkammer und zum Einfrierrohr vor. Der Teilstrom zur Trockenkammer kann jedoch durch die Regulierung des Kugelhahns zu Lasten des Teilstroms zum Einfrierrohr erhöht werden.

Anhand der in Abbildung 4-10 dargestellten hypothetischen Gleichgewichtsvolumenströme für Partikel mit der Dichte von 1 g/cm^3 können die möglichen Partikelgrößen abgelesen werden, die zur Gefriertrocknung in der Anlage geeignet sind. Somit können bei Volumenströmen von 1,5 bis 5,0 L/s, je nach Gleichgewichtsposition in der Trockenkammer, Partikel mit Durchmessern von etwa 100 bis 400 μm in der Anlage getrocknet werden.

4.1.4.4 Abschlussbemerkung

Die Versuche zur Herstellung von Tröpfchenlyophilisaten durch atmosphärische Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung wurden beendet, als absehbar war, dass sie mit den verfügbaren Ressourcen nicht zu Ende gebracht werden konnten. Die durchgeführten Temperaturmessungen zeigen, dass die Temperaturverteilung im Einfrierteil inhomogen ist. Die Strömungsverhältnisse im Einfrierteil verändern sich abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit und

den eingesetzten Stautrichtern. Die Überprüfung der Strömungsgeschwindigkeit in der Trockenkammer ist aufgrund der Apparategeometrie mit den derzeit verfügbaren Mitteln nicht möglich. Die durchgeführten Versuche zur Bestimmung der Gleichgewichtstemperaturen und des Temperaturverlaufs bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten dienen somit als Grundlage für die mathematische Simulation des zeitlichen Verlaufs von Temperatur und Strömung in der ACD-Anlage. Diese Arbeiten werden im Rahmen eines Anschlussprojektes in Zusammenarbeit mit strömungsmechanisch erfahrenen Verfahrenstechnikern fortgeführt. Weitere Versuche zur Sedimentationsgeschwindigkeit von gefriergetrockneten Partikeln sind in Abschnitt 4.3.3.9 beschrieben. Mit Hilfe von CFD-Simulationen können die Effizienz und die Geometrie der Gefriertrocknungsanlage verbessert werden. Bei bekanntem zeitlichem Verlauf von Temperatur und Strömung ist später auch die Analyse der Trocknungskinetik an einzelnen Tropfen möglich.

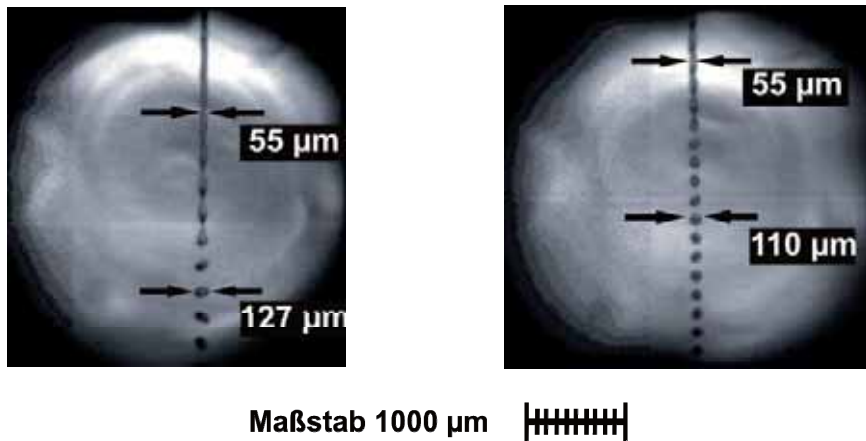
4.2 Untersuchungen zur Tropfenbildung an der DropJet Düse

Im folgenden Kapitel werden die Untersuchungen zur Bildung von Tropfen mit der DropJet Düse Typ MJ-K-104-M (Microdrop Technologies, D-Norderstedt) dargestellt. Die DropJet Düse ist ein Teil des DropJet Dosiersystems, das ausführlich in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben wurde.

4.2.1 Charakterisierung des Abtropfverhaltens

Zur Charakterisierung des Abtropfverhaltens wurden vom Tropfenstrahl Aufnahmen mit einer Hochgeschwindigkeitskamera gemacht, die es erlauben Vorgänge bei der Tropfenbildung in Sekundenbruchteilen sichtbar zu machen. Der genaue Versuchsaufbau ist in Abschnitt 3.3.1 erläutert. Durch die Beleuchtung mit der Stroboskopdiode, die mit derselben Frequenz wie der Tropfengenerator betrieben wird, erscheint für den Betrachter bei der Wiedergabe der aufgezeichneten Filmsequenz ein Bild mit einer stehenden Tropfenkette, das aus überlagerten Einzeltropfen zusammengesetzt ist, die sich immer an derselben Position befinden. Der Strahl bzw. die Tropfen waren in Abständen von ca. 5 mm bis 2 cm unterhalb der Austrittsöffnung gut zu erkennen. Bei größeren Entfernungen unterhalb der Düse konnten jedoch keine scharfen Bilder mehr eingestellt werden, da der Tropfenstrahl zu stark in der Fokussierebene des Objektivs schwankte. Zur Bestimmung der Tropfengröße wurde ein Objektmikrometer verwendet. Da es schwierig war, das Objektmikrometer exakt in dieselbe Position des Tropfenstrahls zu bringen, sind Abweichungen von ca. 10 % bei der Größenbestimmung möglich. Zum Vergleich wurden hochreines Wasser (Milli-Q[®]), eine 20 %-ige Trehaloselösung und eine 1 %-ige HPMC-Lösung versprüht.

In Abbildung 4-15 sind Aufnahmen des Tropfenstrahls beim Versprühen von Wasser und von 20 %-iger Trehaloselösung zu sehen. Die Tropfenbildung wird unter anderem von der Dichte, der Oberflächenspannung und Viskosität der versprühten Flüssigkeiten beeinflusst. Obwohl sich die beiden Flüssigkeiten nur geringfügig in diesen Eigenschaften unterscheiden, siehe dazu auch Abschnitt 4.3.1.1, sind Unterschiede in der Tropfenbildung zu erkennen.



a – Hochreines Wasser (Milli-Q®)

b –20 %-ige Trehaloselösung

Abb. 4-15 Aufnahmen des Tropfenstrahls ca. 5 mm unterhalb der Düsenöffnung
(Sprühbedingungen: Öffnungsdurchmesser 50 µm, Druck 100 mBar, Frequenz 37 kHz)

Auf beiden Aufnahmen ist die Flüssigkeit unterhalb der Düse noch deutlich als zusammenhängender Strahl zu erkennen, aus dem einige Millimeter nach dem Austritt aus der Düse einzelne Tropfen abgeschnürt werden. Der Durchmesser des Strahls ist etwa so groß wie der Düsendurchmesser. Beim Versprühen von Trehaloselösung zerfällt der Strahl schon nach einer kürzeren Distanz als bei Wasser. Direkt nach dem Strahlzerfall sind die Tropfen zunächst gestaucht oder gestreckt. Dies kann man deutlich bei der Aufnahme von Wasser in Abbildung 4-15a sehen. Nach weiterer Entfernung von der Düsenöffnung nehmen die Tropfen eine annähernd kugelförmige Gestalt an, wie in Abbildung 4-15b zu erkennen ist. Der Durchmesser eines Einzeltropfens beträgt dann ungefähr das Doppelte des Düsendurchmessers, entsprechend der Theorie des Strahlzerfalls nach Rayleigh.

Beim Versprühen der 1 %-igen HPMC-Lösung wurde ein anderer Mechanismus zur Tropfenbildung beobachtet. Dies ist in der Bilderserie in Abbildung 4-16 zu sehen.

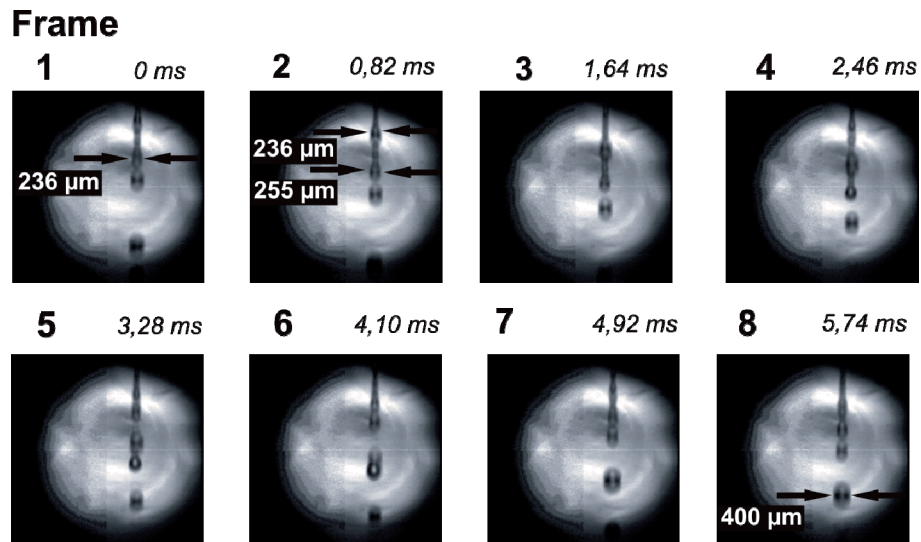


Abb. 4-16 Einzelframes eines Tropfenstrahls 1 %-iger HPMC-Lösung ca. 5 mm unterhalb der Düsenöffnung (Sprühbedingungen: Öffnungsdurchmesser 50 μm, Druck 100 mbar, Frequenz 37 kHz)

Im Gegensatz zu Wasser und Trehaloselösung kann man den schmalen Flüssigkeitsstrahl nicht mehr deutlich erkennen. Stattdessen sieht man eine Kette relativ großer, nicht exakt voneinander abgetrennter Tropfen. Der Durchmesser dieser Tropfen beträgt ungefähr das Fünffache des Düsendurchmessers. Diese Einzeltropfen können wiederum zu noch größeren Tropfen zusammenfließen. Deutlich wird dies in den Frames 1 und 2, wo zwei einzelne Tropfen von 255 und 236 μm Größe zu sehen sind, die sich in den Frames 5 und 6 zu einem Einzeltropfen von 400 μm Durchmesser formieren. Bei dem beobachteten Phänomen handelt es sich vermutlich um den bei Clasen et al. beschriebenen „Gobbling Effekt“ [37,38]. Sie beobachteten, dass beim Abtropfen verdünnter makromolekularer Lösungen durch Strahlzerfall größere Tropfen als beim Abtropfen des reinen Lösungsmittels entstehen. Die Ursache dafür ist, dass zunächst wie beim Rayleighschen Strahlzerfall ein Einzeltropfen aus dem Tropfenstrahl erzeugt wird, der dann jedoch über einen dünnen Flüssigkeitsfaden mit dem Strahl in Verbindung bleibt und somit mehr Flüssigkeit aufnehmen kann als wenn er sofort abtropfen würde. Erst beim Überschreiten einer kritischen Größe reißt der Einzeltropfen vollständig ab.

4.2.2 Optimierung der Frequenz des Piezogenerators

Zur Erzeugung monodisperser Tropfen müssen am Tropfengenerator bestimmte Betriebsparameter wie Druck und Frequenz eingestellt werden. Der durch piezoelektrische Schwingungen angeregte Zerfall des generierten Strahls führt nur bei geeigneten Frequenzwerten zu monodispersen Tropfen. Die dazu benötigte Frequenz ist dabei geräteseitig abhängig vom Druck, mit dem die Flüssigkeit aus dem Tropfengenerator versprüht wird. Theoretisch sollte bei optimaler Einstellung der DropJet-Düse die mittlere Tropfengröße dem Rayleighschen Strahlzerfall nach ungefähr das Doppelte des Düsendurchmessers betragen und nur über einen sehr engen Bereich verteilt sein.

Zur Bestimmung der optimalen Frequenz zur Erzeugung monodisperser Tropfen wurde eine wässrige Mannitollösung 5 % (m/V) versprüht und die Tropfengrößenverteilung mittels Laserdiffraktometrie beurteilt. Dazu wurde der Tropfengenerator mit einem Düsendurchmesser von 50 μm verwendet. Die Düse wurde so eingerichtet, dass die Tropfen kurz nach dem Zerfall des Tropfenstrahls, nach einer Fallstrecke von ca. 1 cm, aufgenommen wurden. Der Sprühdruk wurde jeweils mit 50, 100, 150, und 200 mbar vorgegeben. Da der verfügbare Frequenzbereich sehr groß ist, wurde die Frequenzeinstellung in zwei Teilversuchen vorgenommen.

Im ersten Teilversuch wurden zur orientierenden Bestimmung die Frequenzen 30, 40, 50 und 70 kHz eingestellt. Die erhaltenen Tropfengrößenverteilungen wurden hinsichtlich der erhaltenen Dichtefunktionen und des x_{50} -Werts beurteilt. Für die Dichteverteilungen wurden die Kriterien „gut“, „mäßig“ und „schlecht“ vergeben. Als „gut“ wurden monomodale Kurven mit symmetrischem Peak bezeichnet, als „mäßig“ monomodale Kurven mit asymmetrischem Peak (Peak mit Schulter) und als „schlecht“ bi- oder mehrmodale Kurven. In Abbildung 4-17 sind Beispiele für die jeweiligen Dichteverteilungen aufgezeigt.

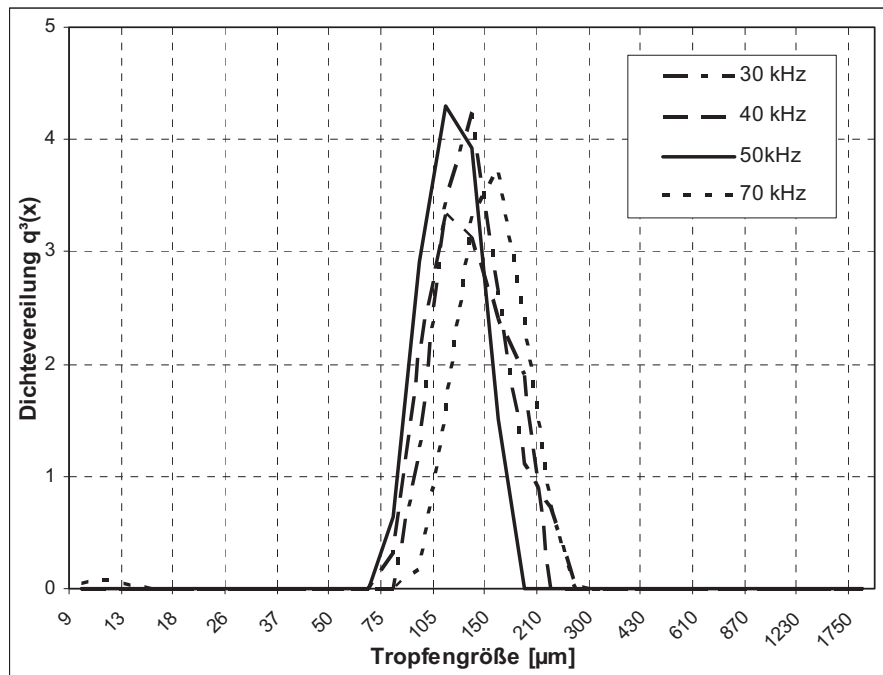


Abb. 4-17 Beispiele für Dichteverteilungen (Sprühbedingungen: Düsendurchmesser 50 µm, Sprühdruck 100 mbar)

Als gut wurde der Peak bei 50 kHz bezeichnet, da er eine symmetrische Form aufweist. Als mäßig wurden die Dichteverteilungen bei den Frequenzen 30 und 40 kHz bezeichnet, da die Peakform unsymmetrisch ist. Eine als schlecht bewertete Dichtefunktion wurde bei einer Frequenz von 70 kHz aufgenommen. Die Dichteverteilung ist bimodal, denn im Bereich von 9 bis 13 µm ist ein zweiter Peak zu erkennen. Die Entstehung solcher kleinen Satellitentröpfchen ist ein bekanntes Problem bei nicht optimal eingestellten Tropfenstrahldüsen.

Die Bewertung des ersten Versuchsteils zur orientierenden Bestimmung des Frequenzbereichs ist in Abbildung 4-18 aufgezeichnet. Mit weißen, grauen und schwarzen Feldern wurde die Beurteilung der Dichteverteilungen mit „gut“, „mäßig“ oder „schlecht“ dargestellt, die x_{50} -Werte sind für die als „gut“ bewerteten Verteilungen als Zahl in das jeweilige Feld eingetragen.

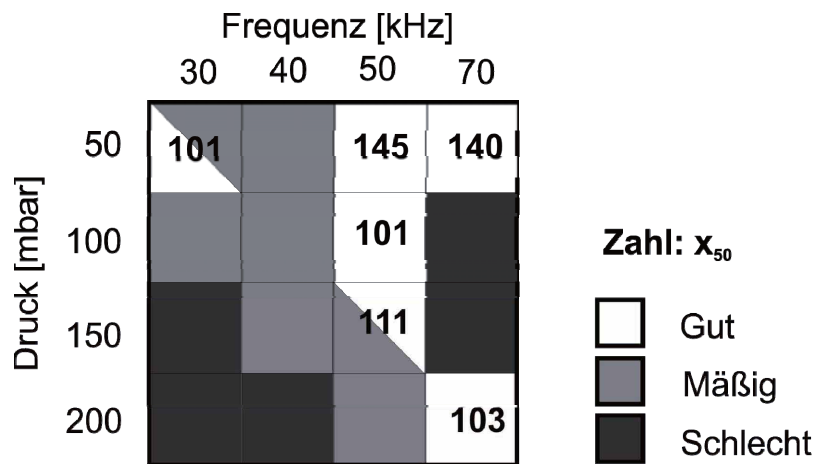


Abb. 4-18 Beurteilung der Tropfengrößenverteilungen hinsichtlich der Dichtefunktion und des x_{50} -Werts

Beurteilungskriterien der Dichteverteilungen: gut - monomodal, symmetrischer Peak; Mäßig - monomodal, Peak mit Schulter; Schlecht - bi- oder mehrmodal

Für einige Frequenzen wurden monomodale Verteilungen gefunden, die einen x_{50} -Wert im erwarteten Bereich von etwa 100 μm aufwiesen. Diese Frequenzen wurden im zweiten Versuchsteil in kleineren Abständen näher untersucht. Dabei wurden die Abstände bei 50, 100 und 200 mbar in 1 kHz Schritten und bei 150 mbar in 2 kHz Schritten variiert, da hier der zu untersuchende Bereich größer war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-19 dargestellt.

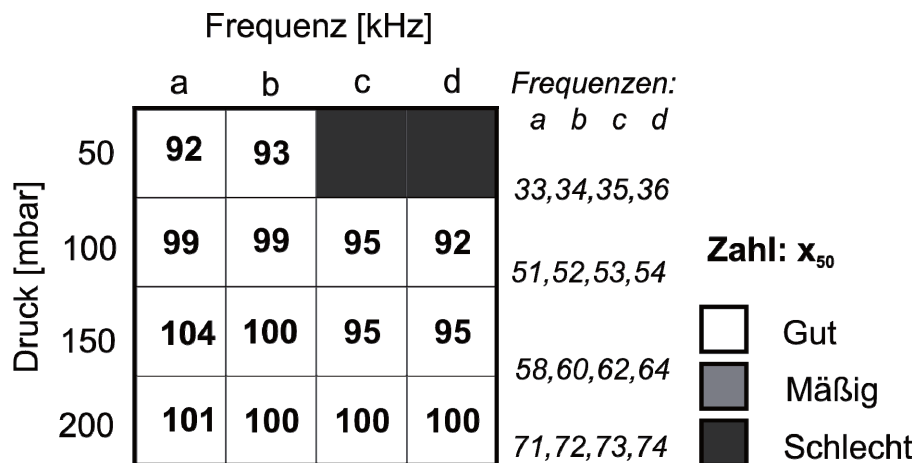


Abb. 4-19 Beurteilung der Tropfengrößenverteilungen hinsichtlich der Dichtefunktion und des x_{50} -Werts

Beurteilungskriterien der Dichteverteilungen: gut - monomodal, symmetrischer Peak; Mäßig - monomodal, Peak mit Schulter; Schlecht - bi- oder mehrmodal

Für nahezu alle untersuchten Frequenzen wurden monomodale Dichteverteilungen erhalten. Auch die x_{50} -Werte liegen im erwarteten Bereich. Daher wurde der Span-Faktor als weiteres Kriterium zur Beurteilung der Breite der Tropfengrößenverteilungen benutzt. Der Span-Faktor ist ein Maß für die

Breite der Verteilung, zur Definition siehe Abschnitt 2.2.1.1. Die erhaltenen Span-Faktoren für die als gut bewerteten Dichtefunktionen sind in Abbildung 4-20 aufgeführt.

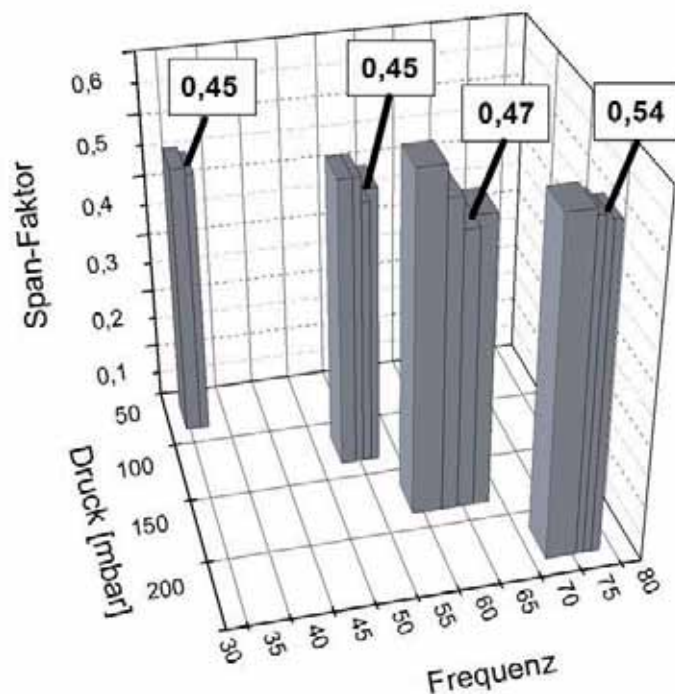


Abb. 4-20 Span-Faktoren für die optimalen Frequenzbereiche (Werte für 50 mbar bei 35 und 36 kHz nicht berücksichtigt)

Als optimal wurden monomodale Verteilungen mit kleinem mittleren Tropfendurchmesser und dem niedrigsten Span-Faktor bewertet. Daher wurden für einen Sprühdruk von 50 mbar eine Frequenz von 34 kHz, für 100 mbar 52 kHz, für 150 mbar 62 kHz und für 200 mbar 73 kHz als optimale Frequenz ausgewählt. Die erhaltenen Arbeitsfrequenzen sowie die zugehörigen x_{50} -Werte und Span-Faktoren sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

| Druck [mbar] | 50 | 100 | 150 | 200 |
|-----------------------------------|------|------|------|------|
| Frequenz [kHz] | 34 | 52 | 62 | 73 |
| x_{50} – Wert [μm] | 93 | 99 | 95 | 100 |
| Span-Faktor | 0,45 | 0,45 | 0,47 | 0,54 |

Tab. 4-5 Optimale Frequenzen zum Betrieb des Piezogenerators sowie x_{50} -Werte und Span-Faktoren bei ausgewählten Sprühdrukken

Mit zunehmendem Druck wird die optimale Arbeitsfrequenz größer und die Breite der Verteilung für die als gut bewerteten Dichtefunktionen nimmt ebenfalls zu.

Abschließend muss bemerkt werden, dass diese Methode zur Bestimmung der optimalen Arbeitsfrequenz sehr aufwendig ist. Einfacher wäre es, die Tropfenerzeugung mit einer Stroboskopdiode und einer Kamera, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, visuell zu überprüfen. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche stand dazu nur die Stroboskopdiode des Herstellers (Microdrop Technologies, D- Norderstedt) zur Verfügung. Mit dieser Diode und der in Abschnitt 3.3.1 verwendeten Hochgeschwindigkeitskamera wurden entsprechende Versuche durchgeführt. Die Einzeltropfen waren jedoch wegen der geringen Lichtintensität der Diode und der niedrigen Auflösung der Kamera kaum zu erkennen, sodass die visuelle Bestimmung der optimalen Frequenz mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich war.

4.2.3 Durchsatz

Für den kontinuierlichen Betrieb der Tropfenstrahldüse ist es wichtig, die pro Zeiteinheit durchgesetzte Flüssigkeitsmenge zu kennen. So können zum Beispiel die Produktionsraten und die zu trocknenden Wassermengen für die jeweiligen Betriebsbedingungen besser abgeschätzt werden. Die bei der Trocknung zu entfernende Wassermenge wird außerdem vom Feststoffanteil der Sprühlösung oder -suspension bestimmt.

Der Durchsatz ist abhängig vom eingestellten Sprühdruk und wurde deshalb für 4 verschiedene Sprühdrukke bei der jeweiligen Arbeitsfrequenz mit hochreinem Wasser (Milli-Q®) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 4-6 aufgeführt.

| Druck [mbar] | Frequenz [kHz] | Durchsatz [mL/min] | Durchsatz [mL/h] |
|--------------|----------------|--------------------|------------------|
| 50 | 34 | 0,9 | 54 |
| 100 | 52 | 1,3 | 78 |
| 150 | 62 | 1,6 | 96 |
| 200 | 73 | 1,9 | 114 |

Tab. 4-6 Durchsätze der Tropfenstrahldüse in Abhängigkeit vom Sprühdruk, verwendete Flüssigkeit hochreines Wasser (Milli-Q®)

Abhängig vom Sprühdruk können mit der DropJet-Düse Flüssigkeitsmengen von 1 bis 2 mL pro Minute, bzw. 50 bis 110 mL pro Stunde versprüht werden. Dabei nimmt der Durchsatz unterproportional zum angelegten Druck zu.

Mit Hilfe des Durchsatzes kann bei bekannter Querschnittsfläche der Düse auch die Anfangsgeschwindigkeit der Tropfen nach Gleichung 4-1 errechnet werden.

$$v_0 = \frac{D}{A} \quad \text{Gl. 4-1}$$

v_0 – Anfangsgeschwindigkeit [cm/s], D – Durchsatz [cm³/s], A – Querschnittsfläche [cm²]

Die so erhaltenen Anfangsgeschwindigkeiten sind in Tabelle 4-7 gezeigt. Abhängig vom angelegten Sprühdruk beträgt die Geschwindigkeit der Tropfen unmittelbar nach dem Versprühen etwa 7,6 bis 16,1 m/s. Die Anfangsgeschwindigkeit ist damit bei hohen Sprühdrukken größer als die Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeit von Tropfen, die bei einem Durchmesser von 200 µm etwa 0,7 m/s beträgt, siehe Abbildung 2-14.

| Druck [mbar] | Durchsatz [mL/s] | Geschwindigkeit [cm/s] | Geschwindigkeit [m/s] |
|--------------|------------------|------------------------|-----------------------|
| 50 | 0,015 | 764 | 7,6 |
| 100 | 0,022 | 1103 | 11,0 |
| 150 | 0,027 | 1358 | 13,6 |
| 200 | 0,032 | 1613 | 16,1 |

Tab. 4-7 Anfangsgeschwindigkeit der Tröpfchen bei verschiedenen Sprühdrukken

4.2.4 Charakterisierung des Sprühstrahls

Tests der Düse vor dem Einbau in die Gefriertrocknungsanlage zeigten, dass sich der entstehende Sprühstrahl beim Versprühen in Luft ungefähr 30 cm unter der Düsenöffnung kegelförmig aufweitete. Außerdem wurde beim Gebrauch der Düse in der Gefriertrocknungsanlage (Prototyp IIa) beobachtet, dass sich beim Einfrieren Tröpfchen an den Kondensatorflächen abschieden. Daher wurde im folgenden Versuch über eine Strecke von 100 cm, das entspricht der Länge des Einfrierrohrs des Prototyps IIa, die Standardabweichung bezogen auf die seitliche Abweichung der versprühten Tröpfchen sowie die Gesamtbreite des Sprühstrahls bei niedrigem und hohem Sprühdruck ermittelt. Dabei wurde die Länge der Fallstrecke von 25 bis zu 50 cm in 5 cm Schritten und von 50 bis 100 cm in 10 cm Schritten variiert. Zur Detektion der einzelnen Tröpfchen wurde eine Farblösung auf Inkjetpapier gesprüht. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Bildanalyse. Die Daten wurden ab einer Fallstrecke von 40 cm ausgewertet, da sich erst dann einzelne Tropfen auf dem Papier erkennen ließen.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich der Sprühstrahl mit steigendem Druck und zunehmender Entfernung von der Austrittsöffnung stärker aufweitete. In den Abbildungen 4-21 und 4-22 sind die Standardabweichung der versprühten Tröpfchen sowie die Gesamtbreite des Sprühstrahls in Abhängigkeit der Entfernung von der Düsenöffnung für die Sprühdrücke 50 und 200 mbar dargestellt.. Dabei wurde die unterschiedliche Größe der Tröpfchen nicht berücksichtigt.

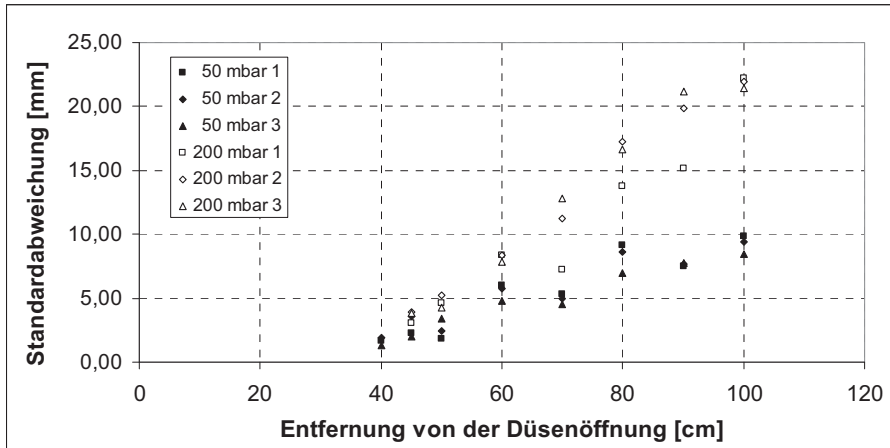


Abb. 4-21 Standardabweichung der versprühten Tröpfchen in Abhängigkeit der Entfernung zur Düsenöffnung bei niedrigem und hohem Betriebsdruck (1, 2, 3 – Nummerierung der Einzelversuche)

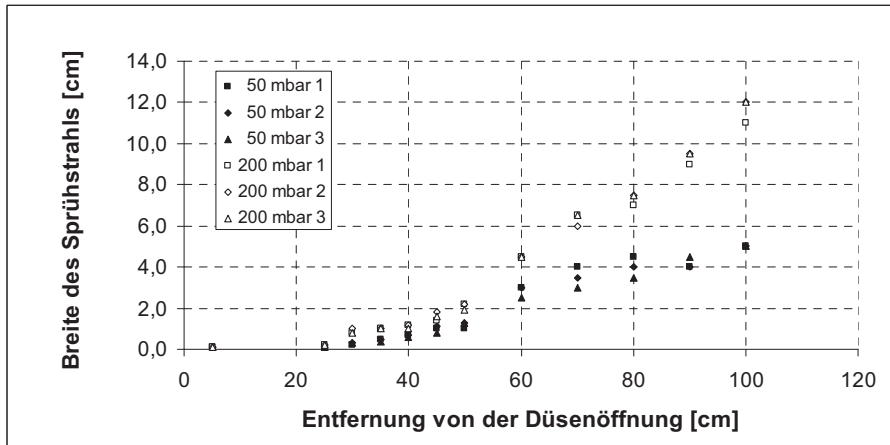


Abb. 4-22 Gesamtbreite des Sprühstrahls in Abhängigkeit der Entfernung zur Düsenöffnung bei niedrigem und hohem Betriebsdruck (1, 2, 3 – Nummerierung der Einzelversuche)

Betrachtet man die Gesamtbreite des Sprühstrahls nach der maximalen Entfernung von 100 cm, so wird der Strahl bei niedrigem Druck bis zu ca. 5 cm und bei hohem Druck bis zu ca. 12 cm verbreitert. Die Daten für die Standardabweichung zeigen jedoch, dass der Großteil der Partikel in einem viel engeren Bereich gestreut wird. Nach maximaler Entfernung von 100 cm beträgt die Standardabweichung, bezogen auf die seitliche Abweichung der Tröpfchen, bei niedrigem Druck ungefähr 10 mm und bei hohem Druck ca. 20 mm.

Die erhaltenen Daten aus Abbildung 4-22 wurden zum Abschätzen der Dimensionen des Einfrierrohrs (Prototyp II b) verwendet. Es sollte sichergestellt sein, dass sich die Tröpfchen während des Sprühgefriervorgangs nicht an der Wand des Einfrierrohrs abscheiden. Der Durchmesser des Rohrs wurde bei einer Länge von 41 cm, die sich aus den in Abschnitt 4.1.3.1 gezeigten

Einfrierversuchen ergab, auf 5 cm verbreitert. Das Einfrierrohr wurde so dimensioniert, dass sich auch bei nicht exakter Ausrichtung der Düse im Rohr keine Tröpfchen an den Wandflächen abscheiden können.

Als Ursache für die beobachtete Streuung des Sprühstrahls werden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen. Eine Möglichkeit ist, dass die einzelnen Tröpfchen beim Zerfall des Strahls deformiert werden und als quer- oder längsgestreckte ellipsoide Körper schwingen. Dass die Tröpfchen wenige Millimeter nach dem Austreten aus der Düse deformiert sind, wurde bereits in Abschnitt 4.2.1 gezeigt. Die Massenverteilung innerhalb dieser ellipsoiden Körper ist ungleichmäßig, daher können sie von der idealen Flugbahn abweichen. Treffen sich Tropfen im Flug und vereinigen sich, wie im folgenden Teil dieses Abschnitts beschrieben, besteht die Möglichkeit, dass diese größeren Gebilde zerfallen und dabei kleinere Tropfen entstehen, die in unterschiedliche Richtungen fliegen, und somit den Sprühstrahl verbreitern. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die frei fallenden Tröpfchen durch Unregelmäßigkeiten in der Luftströmung von ihrer idealen Flugbahn abgelenkt werden. Auch Eigenschwingungen der Kapillare könnten zu einer Veränderung der Flugbahn der versprühten Tröpfchen führen.

Die in Abbildung 4-23 beispielhaft gezeigte Aufnahme der Einzeltropfen des Sprühstrahls zeigt, dass die Größe der Tropfen variiert. Dieses Phänomen konnte bei Fallstrecken von mehr als 25 cm beobachtet werden, bei geringerem Abstand war der Sprühstrahl nur als Linie zu erkennen. Vergleicht man die Tropfengröße mit der beigelegten Millimeterskala und berechnet die Größe der abgebildeten Tropfen mittels Bildanalyse erhält man für die größeren Tropfen Werte von etwa 300 bis 600 μm . Eine quantitative Aussage über die Tropfengröße ist anhand dieser Bilder nicht möglich, da die Beziehung zwischen dem Durchmesser der Farbflecken und der Tropfengröße nicht bekannt ist.

Die Untersuchungen der Tropfengröße zur Optimierung der Frequenz des Piezogenerators zeigen zwar ebenfalls, dass die Größe der Tropfen streut, jedoch ist der Bereich wesentlich enger als auf den Aufnahmen des Sprühstrahls erkennbar. Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis ist, dass mehrere Einzeltropfen zusammenfließen, wobei sich das

Tropfenvolumen vergrößert und ein größerer Fleck auf dem Fotopapier entsteht. Das Zusammenfließen durch zufälliges Auftreffen am selben Ort auf dem Fotopapier wäre aber nur möglich, wenn zwei Tropfen unmittelbar hintereinander auf dem Papier auftreffen. Dies wird durch die schnelle Bewegung des Papiers weitgehend vermieden. Wahrscheinlicher ist, dass die Tropfen im freien Fall während des Fluges zusammengeflossen sind. Ein Vergleich mit den in Abschnitt 4.3.3.1 aufgeführten Daten zur Partikelgröße zeigt, dass auch die Partikel einen größeren Durchmesser als die Tröpfchen nach dem Austreten aus der Düse aufweisen. Zur Diskussion dieser Ergebnisse wird auf die Abschnitte 5.1.2 und 5.1.3 verwiesen.

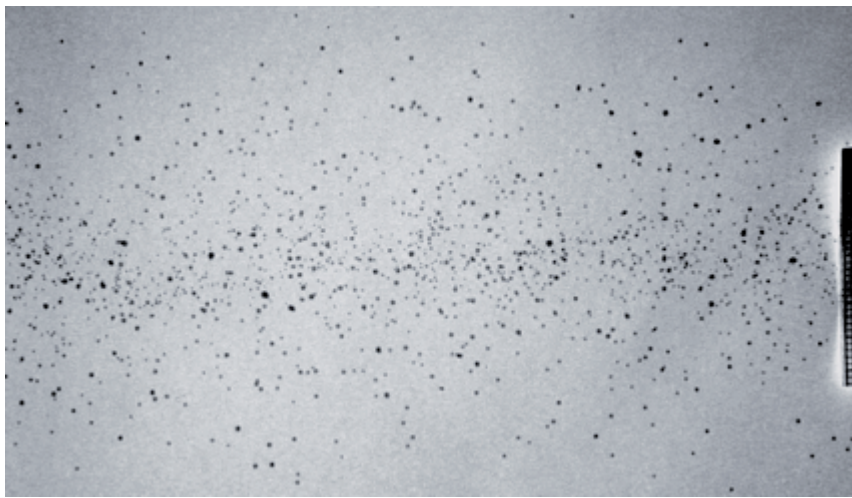


Abb. 4-23 Streuung der Einzeltropfen des Sprühstrahls (Sprühdruck 200 mbar, Frequenz 73 kHz, Abstand zur Düse 80 cm, Maßstab Millimeterpapier: Kantenlänge eines Kästchens 1 mm)

4.3 Charakterisierung von Sphärolyophilisaten

4.3.1 Charakterisierung der Ausgangslösungen

4.3.1.1 Viskosität und Oberflächenspannung

Die Viskosität der zur Gefriertrocknung eingesetzten Lösungen wurde bestimmt, da sie einen Einfluss auf die Größe von Tröpfchen beim Versprühen haben kann. Lösungen mit einer Viskosität von mehr als 50 mPas können mit der Tropfenstrahldüse nicht versprüht werden. Der Einfluss der Flüssigkeitsviskosität auf den Tropfenzerfall wird durch die dimensionslose Ohnesorge-Zahl beschrieben, die das Verhältnis aus Zähigkeitskräften und Oberflächenkräften beschreibt. Das Verhältnis von Reynolds-Zahl und Ohnesorge-Zahl dient, wie in Abbildung 2-7 gezeigt, zur Charakterisierung der Vorgänge bei der Fluidzerstäubung.

In diesem Versuch wurden die Viskosität und das Fließverhalten der Ausgangslösungen zur Herstellung von Sphärolyophilisaten mit einem Rotationsviskosimeter bestimmt. Dabei wiesen die Lösungen mit den Gerüstbildnern Mannitol und Trehalose sowie die Lösung mit Mannitol und Pluronic nahezu idealviskoses Fließverhalten auf. Ausgangslösungen, die das Polymer Natriumhyaluronat enthielten, zeigten strukturviskoses Fließverhalten. Dabei nimmt die Viskosität mit steigender Schergeschwindigkeit ab. Zum Vergleich wurden für alle Lösungen die Viskositätswerte bei einer Schergeschwindigkeit von 100 s^{-1} bestimmt, da hier die Viskositätsabnahme nur noch gering ausgeprägt ist. Die Änderung des Fließverhaltens ist beispielhaft in Abbildung 4-24 für Lösungen mit Trehalose in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Zusatz von Natriumhyaluronat sowie für Wasser als Lösungsmittel aufgezeigt.

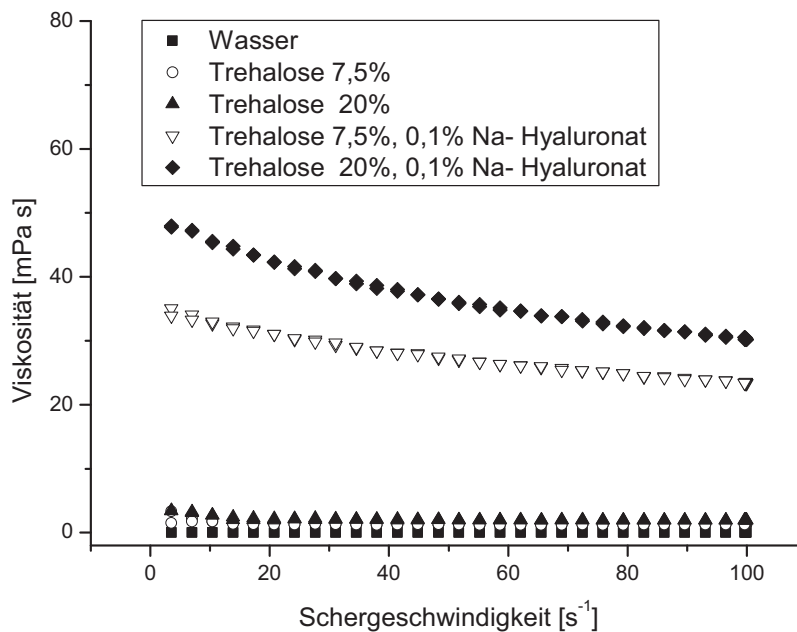


Abb. 4-24 Fließverhalten von Wasser und Ausgangslösungen mit Trehalose

Die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten kann ebenfalls einen Einfluss auf den Tropfenbildungsprozess beim Versprühen einer Lösung haben. Durch Variation der Oberflächenspannung ist die Ausbildung unterschiedlich großer Tropfen möglich. Als Kennzahl für die Tropfenverformung dient die Weber-Zahl, die das Verhältnis der deformierenden Trägheitskraft der Strömung zur stabilisierenden Oberflächenkraft des Tropfens beschreibt. Der Einfluss der Oberflächenspannung auf den Tropfenzerfall bei verschiedenen Ausströmgeschwindigkeiten ist in Abbildung 2-7 dargestellt. Im Versuch wurde sie mit der Plattenmethode nach Wilhelmy bestimmt.

In Tabelle 4-8 sind die Viskositäten und Oberflächenspannungen für die Ausgangslösungen zur Herstellung von Lyophilisaten aufgeführt.

| Gerüstbildner | Konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] | Viskosität [mPa s] | Oberflächenspannung [mN/m] |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|--------------------|----------------------------|
| Mannitol | 5,0 | kein | - | 1,18 ± 0,01 | 73,1 ± 0,0 |
| | 10,0 | | - | 1,46 ± 0,02 | 73,6 ± 0,1 |
| | 20,0 | | - | 1,93 ± 0,01 | 74,2 ± 0,0 |
| | 5,0 | HA | 0,10 | 21,70 ± 0,05 | 73,1 ± 0,1 |
| | 10,0 | | 0,10 | 24,97 ± 0,04 | 72,4 ± 0,4 |
| | 20,0 | | 0,10 | 24,96 ± 0,21 | 74,2 ± 0,2 |
| | 10,0 | Pluronic | 0,10 | 1,51 ± 0,02 | 49,0 ± 0,8 |
| | 10,0 | HA Pluronic | 0,10 0,10 | 24,68 ± 0,05 | 48,18 ± 0,4 |
| Trehalose | 7,5 | kein | - | 1,31 ± 0,01 | 71,9 ± 0,0 |
| | 20,0 | | - | 1,90 ± 0,01 | 69,1 ± 0,9 |
| | 7,5 | HA | 0,10 | 23,06 ± 0,02 | 72,1 ± 0,6 |
| | 20,0 | | 0,10 | 30,20 ± 0,03 | 67,9 ± 0,6 |

Tab. 4-8 Viskosität und Oberflächenspannung der Ausgangslösungen zur Herstellung von Sphärolyophilisaten (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=3)

Gemessene Vergleichswerte für das verwendete Wasser: Viskosität 1,08 mPas, Oberflächenspannung 72,7 mN/m

Die Viskosität wird gegenüber dem Lösungsmittel Wasser durch die Gerüstbildner Mannitol und Trehalose nur geringfügig erhöht. Der Zusatz von Pluronic hat ebenfalls keinen wesentlichen Einfluss auf die Viskosität der hergestellten Lösung. Der Zusatz von Natriumhyaluronat erhöht dagegen die Viskosität deutlich. Viskositätserhöhende Zusätze in Lyophilisaten zur Anwendung am Auge können sinnvoll sein, um die Kontaktzeit zu verlängern und die Bioverfügbarkeit enthaltener Wirkstoffe zu verbessern werden, wie schon in Abschnitt 2.3.1 ausgeführt wurde.

Die Oberflächenspannung wird durch Mannitol und Trehalose als Gerüstbildner in geringem Maße beeinflusst. Höhere Konzentrationen Mannitol erhöhen die Oberflächenspannung gegenüber Wasser leicht, höhere Anteile Trehalose

bewirken dagegen eine geringfügige Abnahme. Der Zusatz von Hyaluronsäure-Natrium beeinflusst die Oberflächenspannung kaum, eine deutliche Senkung wird hingegen durch Zusatz von Pluronic erreicht. Pluronic kann wässrigen Lösungen zugesetzt werden, um schlecht wasserlösliche Arzneistoffe zu solubilisieren.

4.3.1.2 Glasübergangstemperatur

Die dynamische Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry, DSC) liefert Informationen über die physikalischen Eigenschaften der gefrorenen Lösungen und dient zum Abschätzen der maximal zulässigen Temperatur für die Primärtrocknung. Als höchste tolerierbare Temperatur wird die Glasübergangstemperatur T_g' der gefrorenen Lösung angesehen. Diese steht in enger Beziehung zur Kollapstemperatur, die während des gesamten Primärtrocknungsvorgangs nicht überschritten werden darf, damit das gefrorene Produkt nicht aufschäumt oder kollabiert, siehe auch Abschnitt 2.1.2.2. Die Bestimmung der Glasübergangstemperatur soll insbesondere zur Festlegung der maximal zulässigen Temperaturen in der Trockenkammer der ACD-Gefriertrocknungsanlage dienen, da in diesem Teil die Primärtrocknung der Partikel stattfindet.

Bei diesen Versuchen wurden exemplarisch die Glasübergangstemperaturen beim Aufheizen von gefrorenen Lösungen mit den Gerüstbildnern Mannitol und Trehalose in unterschiedlicher Konzentration mittels DSC ermittelt. Die Untersuchung von Einfriertemperaturen ist mit dieser Methode nicht möglich, da die extrem schnellen Abkühlraten, die bei der Sprühgefriertrocknung erreicht werden, mit dem Gerät nicht erzielt werden können.

Abbildung 4-25 zeigt ein Beispielthermogramm für eine 7,5 %-ige Trehaloselösung. Der Glasübergang ist deutlich als Stufe im Diagramm erkennbar. Zur Auswertung wurden am Beginn und Ende der Stufe Tangenten angelegt, anhand derer die spezifische Wärmekapazität (c_p -Wert) vor und nach dem Glasübergangsbereich sowie die zugehörige Temperatur, bei der die Hälfte der Änderung des c_p -Wertes erreicht war, errechnet wurden.

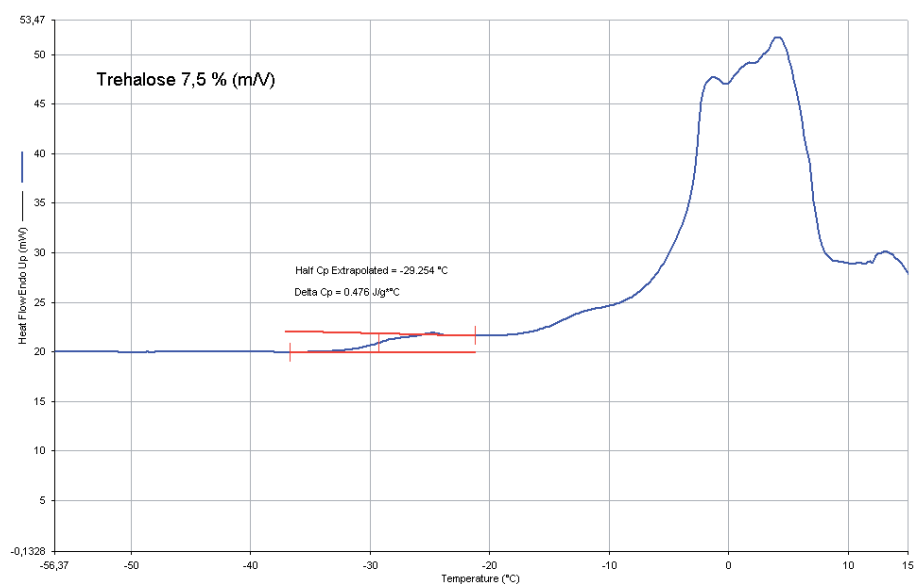


Abb. 4-25 Thermogramm einer wässrigen Trehaloselösung 7,5% (m/V) (Probengewicht 23,9 mg)

Die erhaltenen Glasübergangstemperaturen für die untersuchten Lösungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Gerüstbildner | Konz. (m/V) [%] | Glasübergangstemperatur [°C] |
|---------------|-----------------|------------------------------|
| Mannitol | 5,0 | -27,9 ± 0,9 |
| | 10,0 | -27,5 ± 0,5 |
| | 20,0 | -28,2 ± 0,1 |
| Trehalose | 7,5 | -29,8 ± 0,7 |
| | 10,0 | -29,0 ± 0,5 |
| | 20,0 | -28,7 ± 1,4 |

Tab. 4-9 Glasübergangstemperaturen der Ausgangslösungen (n=3)

Die Glasübergangstemperaturen betragen für die mannitolhaltigen Ausgangslösungen -28 °C und für die Trehaloselösungen -29 °C. Die Veränderung des Feststoffanteils hat darauf keinen merklichen Einfluss. Hier fand bei differenzkalorimetrischen Untersuchungen von Lösungen typischer Gerüstbildner für die Gefriertrocknung, darunter auch Trehalose und Sorbitol, ebenfalls konzentrationsunabhängige Glasübergangstemperaturen, da eine veränderte Ausgangskonzentration der Lösung nur das Verhältnis der gefrierkonzentrierten Phase zu Eis beeinflusst [61].

Für die Primärtrocknung sollten für beide Lösungen Temperaturen von -30 °C nicht überschritten werden.

4.3.2 Versuche zur Herstellung der Lyophilisate

4.3.2.1 Herstellung von Sphärolyophilisaten mit typischen Rezepturen für Trägerlyophilisate

Nachdem das Einfrieren von Tröpfchen unter Atmosphärendruck gelungen war (Prototyp IIa), wurden erste Versuche mit Lösungen durchgeführt, die verschiedene Gerüstbildner enthielten. Zur Formulierung von Trägerlyophilisaten lagen bereits lange Erfahrungen vor, deshalb wurden für Sphärolyophilisate zuerst ähnliche Zusammensetzungen geprüft. Weichselbaum untersuchte Trägerlyophilisate mit polymeren Gerüstbildnern wie den Cellusoderivaten HPMC, HEMC, HEC sowie PVP und Gemischen aus Natriumhyaluronat und Mannitol [151]. Auch Krasichkova setzte Polymere als Gerüstbildner ein. Sie arbeitete ebenfalls mit HPMC und Mischungen aus Dextran und Hyaluronsäure [74].

Für die Untersuchungen wurden Lösungen mit HPMC, Dextran/Hyaluronsäure und PVP als polymere Gerüstbildner sowie Mannitol verwendet. Die Lösungen wurden unter Verwendung des Lochflanschbauteils ($d=100\ \mu\text{m}$) durch kontinuierliches druckunterstütztes Versprühen unter Atmosphärendruck mit der Lochflanschdüse im Einfrierrohr (Prototyp IIa) eingefroren und konventionell gefriergetrocknet. Das erhaltene Produkt wurde im Hinblick auf seine Verwendbarkeit als Sphärolyophilisat bewertet. Die Ergebnisse dazu sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Gerüstbildner | Konz. (m/V) [%] | Ergebnis |
|-----------------------------|-----------------|---|
| Mannitol | 10,0 | definierte Partikel, mechanisch stabil |
| HPMC | 1,0 | definierte Partikel, die mechanisch instabil sind |
| Dextran Na-Hyaluronsäure | 1,0 0,1 | keine Einzelpartikel |
| PVP | 10,0 | definierte Partikel, die mechanisch instabil sind |

Tab. 4-10 Herstellung von Sphärolyophilisaten mit typischen Rezepturen für Trägerlyophilisate (Sprühbedingungen: Lochflanschbauteil, Düsendurchmesser $100\ \mu\text{m}$, 3 bar)

Bei diesem Vorversuch wurden nur mit Mannitollösung stabile einzelne Sphärolyophilisate erhalten. Die anderen Zusammensetzungen mit denen intakte und applizierbare Trägerlyophilisate hergestellt wurden, ergaben zwar teilweise einzelne Partikel, aber keine mechanisch stabilen Sphärolyophilisate. Die Lyophilisate wurden bereits unter leichtem Druck, zum Beispiel beim Aufnehmen mit einem Spatel, deformiert. Mechanisch instabile Produkte können entweder durch den Aufbau eines zu weichen Feststoffgerüsts oder durch unzureichende Einfrier- oder Trocknungsbedingungen bei der Gefriertrocknung resultieren, bei denen das Produkt kollabiert.

Auf die sonst übliche Verwendung von Polymeren als Gerüstbildner wurde daher bei der Herstellung von Trägerlyophilisaten verzichtet.

4.3.2.2 Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Partikelgrößenverteilung

Beim Versprühen von Flüssigkeiten haben sowohl die Eigenschaften der verwendeten Düse als auch die Eigenschaften des versprühten Fluids einen Einfluss auf die Tropfenbildung und die Tropfengrößenverteilung. Bei der Düse spielen der Düsentyp sowie düsenabhängige Parameter wie Vordruck, Durchmesser und Volumenstrom eine wichtige Rolle. Die wichtigsten Einflussgrößen der verwendeten Flüssigkeit sind die Viskosität, Oberflächenspannung und Temperatur.

Im folgenden Versuch wurden Partikelgrößenverteilungen sprühgefriergetrockneter Tröpfchen in Abhängigkeit von Druck und Frequenz der Düse sowie Viskosität und Oberflächenspannung der Lösung untersucht. Die Tröpfchen wurden mit der DropJet-Düse (Typ MJ-K-104-M, $d=50\ \mu\text{m}$) versprüht, im Einfrierrohr (Prototyp IIb) durchgefroren und mittels konventioneller Gefriertrocknung getrocknet. Die Frequenz wurde als zusätzlicher Faktor gewählt, da sie bei der Tropfenstrahldüse einen Einfluss auf die Tropfenerzeugung ausübt. Um den Einfluss der genannten Faktoren zu untersuchen, wurde wie in Tabelle 4-11 gezeigt ein $4 \times 4 \times 2 \times 2$ Faktorenversuchsplan aufgestellt. Die Faktoren Druck und Frequenz wurden jeweils auf 4 Niveaus variiert, die Faktoren Viskosität und Oberflächenspannung wurden auf je 2 Niveaus verändert.

| Faktoren | | Niveaus | Werte | | | |
|--------------------------|-------|---------|------------|----------|------------|----------|
| | | | | | | |
| Druck | x_1 | 4 | 50 mbar | 100 mbar | 150 mbar | 200 mbar |
| Frequenz | x_2 | 4 | 34 kHz | 52 kHz | 62 kHz | 73 kHz |
| Viskosität | x_3 | 2 | 1,5 mPas | | 25 mPas | |
| Oberflächen- spannung | x_4 | 2 | 48-49 mN/m | | 72-74 mN/m | |

Tab. 4-11 4x4x2x2 Faktorenversuchsplan zur Bestimmung der Einflussfaktoren auf die Partikelgrößenverteilung

Die Zielgrößen sind der mittlere Partikeldurchmesser x_{50} und der Span-Faktor b als Maß für die Breite der Verteilung.

Mit Hilfe des Faktorenversuchsplans wurden alle Haupteffekte und alle Wechselwirkungen zwischen 2 Faktoren des Modells nach der allgemeinen Gleichung untersucht:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + \dots \quad \text{Gl. 4-2}$$

$$\dots + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{14}x_1x_4 + a_{24}x_2x_4 + a_{34}x_3x_4 + \varepsilon$$

Y – Zielgröße (mittlere Partikelgröße, Span-Faktor), a_0 – Mittelwert, x_1 – Faktor 1 (Druck), x_2 – Faktor 2 (Frequenz), x_3 – Faktor 3 (Viskosität), x_4 – Faktor 4 (Oberflächenspannung), a_1, a_2, a_3, a_4 – Haupteffekte des linearen Teils, $a_{12}, a_{13}, a_{23}, a_{14}, a_{24}, a_{34}$ – Wechselwirkungen, ε – Reststreuung des Modells

Die Faktoren haben nur dann einen Einfluss auf die Zielgröße, wenn die jeweiligen Effekte und Wechselwirkungen von Null verschieden sind.

Es wurde ein vollständiger Faktorenversuchsplan mit 64 Versuchen durchgeführt. Zur Erhöhung der Viskosität wurde Natriumhyaluronat und zur Senkung der Oberflächenspannung wurde Pluronic eingesetzt. Eine Übersicht der verwendeten Rezepturen findet sich in Tabelle 4-12.

| Viskosität [mPas] | Oberflächen- spannung [mN/m] | Gerüstbildner | Konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] |
|-------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 1,5 | 72-74 | Mannitol | 10,0 | kein | - |
| 25 | 72-74 | | | HA | 0,1 |
| 1,5 | 48-49 | | | Pluronic | 0,1 |
| 25 | 48-49 | | | HA Pluronic | 0,1 0,1 |

Tab. 4-12 Übersicht über die verwendeten Rezepturen für den Faktorenversuchsplan

Die Auswertung des Faktorenversuchsplans erfolgte durch Varianzanalyse. Die zur Berechnung zugrunde gelegten Ergebnisse der mittels Bildanalyse erhaltenen Partikelgrößenverteilungen finden sich im Anhang in Abschnitt 7.3.1.

Einflüsse auf die mittlere Partikelgröße

Zunächst wird die Varianz des Modells mit der Varianz des Versuchsfehlers verglichen. Die statistische Berechnung zeigt, dass das Modell hoch signifikant ist, da der p-Wert kleiner als 0,0001 ist. Dies bedeutet, dass die Ergebnisse durch das Modell besser angepasst sind als nur durch den Mittelwert aller Daten.

| | FG | SQ | MQ | F-Wert | p |
|--------|----|------------|----------|---------|----------|
| Modell | 10 | 212 577,34 | 21 257,7 | 12,1225 | < 0,0001 |
| Fehler | 53 | 92 939,52 | 1 753,6 | | |
| Gesamt | 63 | 305 516,86 | | | |

Tab. 4-13 Varianzanalyse: Bewertung des Modells für den x_{50} -Wert

Mittelwert des Durchmessers gesamt: 318 μm , Range: 221 – 502 μm

Anschließend werden die einzelnen Faktoren sowie die Kombinationen der Faktoren bewertet. Dabei wird geprüft, ob die Einflussgrößen und deren Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Zielgröße haben. Der Wahrscheinlichkeitswert p gibt an, ob der Unterschied signifikant ist. Demnach haben die Faktoren Druck und Viskosität auf die Partikelgröße einen

hochsignifikanten Einfluss. Zusätzlich besitzt die Kombination aus Druck und Oberflächenspannung einen signifikanten Einfluss auf den x_{50} -Wert.

| Faktor | FG | SQ | F-Wert | p |
|-------------------------------------|----|------------|---------|----------|
| Druck | 1 | 104 871,40 | 59,8043 | < 0,0001 |
| Frequenz | 1 | 2 510,93 | 1,4319 | 0,2368 |
| Viskosität | 1 | 76 383,14 | 43,5585 | < 0,0001 |
| Oberflächenspannung | 1 | 5 130,14 | 2,9255 | 0,0930 |
| Druck * Frequenz | 1 | 3 540,84 | 2,0192 | 0,1612 |
| Druck * Viskosität | 1 | 50,40 | 0,0287 | 0,8660 |
| Frequenz * Viskosität | 1 | 15,74 | 0,0090 | 0,9249 |
| Druck * Oberflächenspannung | 1 | 10 136,25 | 5,7803 | 0,0197 |
| Frequenz * Oberflächenspannung | 1 | 2 945,34 | 1,6796 | 0,2006 |
| Viskosität * Oberflächenspannung | 1 | 6 993,14 | 3,9879 | 0,0510 |

Tab. 4-14 Varianzanalyse: Bewertung der Einflussfaktoren für den x_{50} -Wert

Einflüsse auf den Span-Faktor

Der Vergleich der Varianzen des Modells und des Versuchsfehlers zeigt, dass das Modell sehr aussagekräftig ist, weil es einen großen Teil der Abweichungen der Ergebnisse vom Gesamtmittel erklärt.

| | FG | SQ | MQ | F-Wert | p |
|--------|----|--------|--------|--------|--------|
| Modell | 10 | 0,2243 | 0,0224 | 2,7668 | 0,0080 |
| Fehler | 53 | 0,4298 | 0,0081 | | |
| Gesamt | 63 | 0,6542 | | | |

Tab. 4-15 Varianzanalyse: Bewertung des Modells für den Span-Faktor

Mittelwert des Span-Faktors gesamt: 0,62 , Range: 0,37 – 0,86

Die Bewertung der Faktoren zeigt, dass die Viskosität und die Oberflächenspannung einen signifikanten Einfluss auf die Breite der Verteilung besitzen.

| Faktor | FG | SQ | F- Wert | p |
|-------------------------------------|----|--------|---------|--------|
| Druck | 1 | 0,0066 | 0,8214 | 0,3689 |
| Frequenz | 1 | 0,0263 | 3,2546 | 0,0769 |
| Viskosität | 1 | 0,0506 | 6,2424 | 0,0156 |
| Oberflächenspannung | 1 | 0,0484 | 5,9681 | 0,0179 |
| Druck * Frequenz | 1 | 0,0004 | 0,0584 | 0,8099 |
| Druck * Viskosität | 1 | 0,0277 | 3,4219 | 0,0699 |
| Frequenz * Viskosität | 1 | 0,0240 | 2,9645 | 0,0909 |
| Druck * Oberflächenspannung | 1 | 0,0059 | 0,7338 | 0,3955 |
| Frequenz * Oberflächenspannung | 1 | 0,0068 | 0,8454 | 0,3620 |
| Viskosität * Oberflächenspannung | 1 | 0,0272 | 3,3570 | 0,0725 |

Tab. 4-16 Varianzanalyse: Bewertung der Einzelfaktoren auf den Span-Faktor

Im Unterschied zur statistischen Bewertung der Einflüsse auf die mittlere Partikelgröße, dargestellt in Tabelle 4-13, wo nur etwa ein Drittel der Gesamtstreuung auf den Fehler entfallen, sind es bei der Bewertung des Span-Faktors, gezeigt in Tabelle 4-15, etwa zwei Drittel. Dies hat zur Folge, dass hier nur zwei Effekte mit $p < 0,05$ signifikant sind.

Fazit

Nur die Viskosität der Sprühlösung hat sowohl einen Einfluss auf die mittlere Partikelgröße als auch auf die Breite der Verteilung. Je höher die Viskosität der Sprühlösung ist, desto größer werden die Partikel. Die Breite der Verteilung wird mit zunehmender Viskosität ebenfalls geringer, der Einfluss ist jedoch nicht sehr stark ausgeprägt. Eine Änderung des Drucks wirkt sich nur auf die Größe der Partikel aus, aber nicht auf die Verteilungsbreite. Mit zunehmendem Druck werden kleinere Partikel erzeugt. Die kleinsten Partikel wurden bei hohem Sprühdruk und geringer Viskosität der Ausgangslösung erhalten.

Die Oberflächenspannung hat als einzelner Faktor einen Einfluss auf die Breite der Verteilung, in Kombination mit dem Sprühdruk hat sie auch Auswirkungen

auf die Partikelgröße. Bei hoher Oberflächenspannung wurden geringere Werte für den Span-Faktor erhalten, dieser Effekt hat einen signifikanten Einfluss. Wie bereits beschrieben, wurde erwartet, dass die Oberflächenspannung ebenfalls einen Einfluss auf die Partikelgröße besitzt und Lösungen mit geringerer Oberflächenspannung auch geringere Partikelgrößen ergeben. Möglicherweise ist der Effekt der Oberflächenspannung nicht sehr ausgeprägt, weil die oberflächenaktiven Moleküle nicht in ausreichender Geschwindigkeit an die Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Luft gelangen.

Allgemein ist die Schwäche statistischer Modelle, dass sie nichts über Ursache und Wirkung aussagen. Es kann lediglich festgestellt werden, welcher der Faktoren einen Einfluss auf die betrachtete Zielgröße hat.

Bemerkenswert ist, dass der mittlere Durchmesser der Partikel im Vergleich zu den in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 gemessenen Tropfendurchmessern etwa um das 2 bis 5-fache gestiegen ist. Da eine visuelle Überprüfung mit dem Mikroskop einfach durchführbar ist, können mögliche Messfehler als Ursache ausgeschlossen werden. Beim Sprühvorgang können durch die Verlangsamung der Fallgeschwindigkeit einzelne Tropfen vor dem Einfrieren aufeinander treffen und zusammenfließen, wie bereits in Abschnitt 4.2.4 gezeigt. Eventuelle Einflüsse durch den Gefriertrocknungsprozess oder die Lagerung sind auch nicht vollständig auszuschließen. Zur ausführlichen Diskussion dieses Phänomens sei auf die Abschnitte 5.1.2 und 5.1.3 verwiesen.

4.3.3 Charakterisierung der Lyophilisate

Im Folgenden wurden ausgewählte Sphärolyophilisate hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften untersucht. Dabei wurden Zusammensetzungen für wässrige Lösungen mit verschiedenen Hilfsstoffen untersucht, die abhängig vom eingesetzten Arzneistoff nicht nur zur lokalen Anwendung am Auge, sondern auch zur pulmonalen, parenteralen oder oralen Anwendung denkbar sind.

Eine Übersicht der verwendeten Zusammensetzungen ist in Tabelle 4-17 gegeben. Als Gerüstbildner wurden Mannitol und Trehalose eingesetzt. Mannitol ist einer der meist eingesetzten Hilfsstoffe in der Gefriertrocknung und ist bekannt für die Ausbildung gut aussehender, mechanisch stabiler Kuchen

[66]. Trehalose wurde ausgewählt, da es speziell als stabilisierender Gerüstbildner für Proteinarzneistoffe eingesetzt werden kann [41,130]. Die beiden Gerüstbildner wurden dabei in niedriger und hoher Konzentration eingesetzt. Für Trehalose wurden ebenfalls 5 %-ige Lösungen sprühgefriergetrocknet. Dabei wurden leichte, flockige Lyophilisate ohne ausreichende mechanische Festigkeit erhalten, weshalb eine 7,5 %-ige Lösung als niedrigste Konzentration gewählt wurde.

Als Zusatz wurde Natriumhyaluronat verwendet, da es die Viskosität der gelösten Lyophilisate erhöht und so die Verweildauer der Zubereitung auf biologischen Membranen verlängert werden kann.

| Gerüstbildner | Konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] |
|---------------|-----------------|--------|-----------------|
| Mannitol | 5,0 | kein | - |
| | 20,0 | | - |
| | 5,0 | HA | 0,1 |
| | 20,0 | | 0,1 |
| Trehalose | 7,5 | kein | - |
| | 20,0 | | - |
| | 7,5 | HA | 0,1 |
| | 20,0 | | 0,1 |

Tab. 4-17 Übersicht über die verwendeten Zusammensetzungen (Lösungsmittel hochreines Wasser (Milli-Q®))

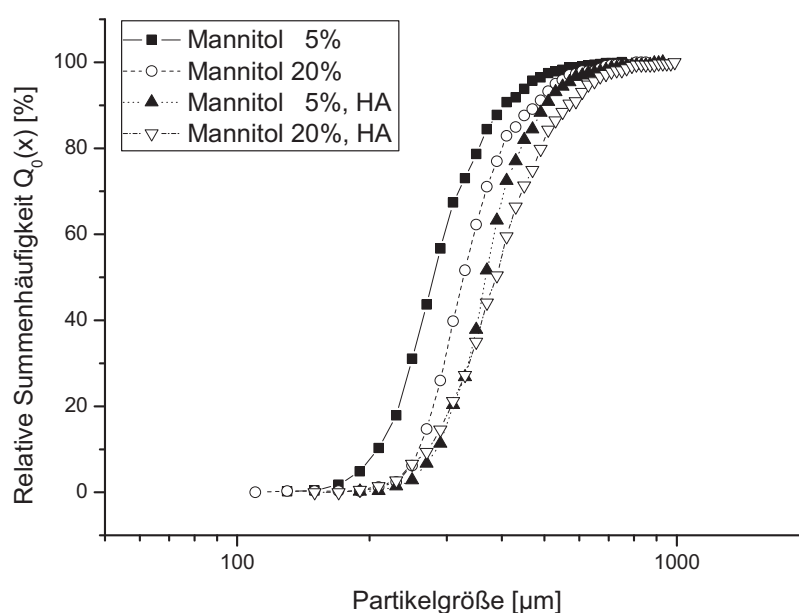
Alle Lyophilisate wurden bei 100 mbar und 52 kHz mit der DropJet-Düse versprüht, mit Prototyp IIb unter Atmosphärendruck eingefroren und anschließend konventionell gefriergetrocknet.

Im Folgenden wird die Untersuchung verschiedener qualitätsbestimmender Eigenschaften von Sphärolyophilisaten beschrieben. Dazu zählen die Partikelgrößenverteilung, der Restwassergehalt, die Porosität und spezifische Oberfläche, die Dichte, die Rekonstitutionszeit, die Fließfähigkeit und die Dispergierbarkeit in Luft.

4.3.3.1 Partikelgrößenverteilungen

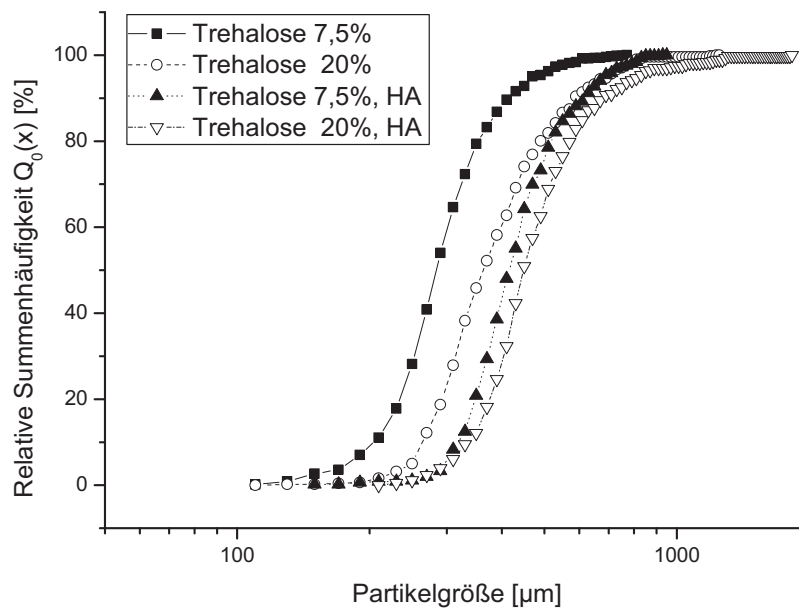
Sphärolyophilisate können, abhängig von ihrer Partikelgröße, als Arzneiform in unterschiedlichen Anwendungsgebieten eingesetzt werden. So können Sphärolyophilisate im Bereich von 10 bis 30 μm sehr gut inhaliert werden, Partikel im Bereich von 100 bis 500 μm sind hervorragend zur lokalen Anwendung, zum Beispiel am Auge, geeignet, können aber auch als parenterale oder orale Arzneiform eingesetzt werden. Die Einstellung einer bestimmten Partikelgröße gelingt durch die Auswahl einer geeigneten Düse, da die Tropfengröße hauptsächlich durch Art und Durchmesser der Düse festgelegt wird. Die in dieser Arbeit untersuchten Sphärolyophilisate wurden nur mit einer Düse hergestellt und sind somit hinsichtlich ihrer Partikelgrößenverteilung limitiert.

Die Ergebnisse der Partikelgrößenanalyse, die mittels Bildanalyse durchgeführt wurde, sind für die verschiedenen Zubereitungen in Abbildung 4-26 und 4-27 zusammengestellt.



| | x_{10} [μm] | x_{50} [μm] | x_{90} [μm] | <i>span</i> |
|-----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|
| M 5% | 217 | 289 | 416 | 0,69 |
| M 20% | 271 | 337 | 483 | 0,63 |
| M 5%/ HA | 293 | 378 | 511 | 0,58 |
| M 20%/ HA | 281 | 399 | 573 | 0,73 |

Abb. 4-26 Partikelgrößenverteilung von Sphärolyophilisaten mit Mannitol



| | x_{10} [μm] | x_{50} [μm] | x_{90} [μm] | span |
|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------|
| T 7,5% | 215 | 293 | 420 | 0,70 |
| T 20% | 272 | 372 | 598 | 0,88 |
| T 7,5%/ HA | 327 | 427 | 625 | 0,70 |
| T 20%/ HA | 349 | 459 | 573 | 0,49 |

Abb. 4-27 Partikelgrößenverteilung von Sphärolyophilisaten mit Trehalose

Hier werden anstelle der Dichteverteilungen die relativen Summenhäufigkeiten gezeigt, da die Unterschiede der einzelnen Partikelgrößenverteilungen in dieser Darstellung wesentlich besser erkennbar sind.

Für alle Zusammensetzungen wurden monomodale Partikelgrößenverteilungen erhalten. Die mittleren Durchmesser liegen für die mannitolhaltigen Lyophilisate im Bereich von 290 bis 400 μm und für Lyophilisate mit Trehalose im Bereich von 290 bis 460 μm . Wie schon in Abschnitt 4.3.2.2 gezeigt, ist der mittlere Partikeldurchmesser im Vergleich zur Größe der versprühten Tröpfchen etwa zwei bis fünfmal größer. Mit zunehmendem Feststoffgehalt und steigender Viskosität werden die x_{50} -Werte für beide Zusammensetzungen größer. Die Span-Faktoren liegen für mannitolhaltige Lyophilisate zwischen 0,58 und 0,73 und für trehalosehaltige Lyophilisate zwischen 0,49 und 0,88. Ein Zusammenhang zwischen der Breite der Partikelgrößenverteilung und dem Feststoffgehalt oder der Viskosität war bei den Ergebnissen dieser Versuche nicht erkennbar.

Beim Betrachten der Einzelbilder fiel auf, dass sich in einigen Fällen Mehrlinge aus Einzelpartikeln gebildet hatten. Auf manchen Bildern waren benachbarte Einzelpartikel nicht deutlich voneinander getrennt, sodass in einigen Fällen der gemeinsame Durchmesser bestimmt wurde. Agglomerate aus mehreren Einzelpartikeln traten dagegen selten auf. Abbildung 4-28 zeigt beispielhaft ein Präparat mit besonders vielen Mehrlingen und agglomerierten Partikeln. Im Vorfeld wurden jedoch alle Vorkehrungen getroffen, um ein Agglomerieren der Partikel zu verhindern. Die Partikel wurden im Exsikkator gelagert und mit einer besonderen Dispergiertechnik auf den Objektträger aufgebracht.



Abb. 4-28 Beispielpräparat mit Mehrlingen und Agglomeraten, Zusammensetzung der Ausgangslösung: Trehalose 7,5 %, Na-Hyaluronat 0,1 %

Prinzipiell können Mehrlinge entstehen, wenn die Einzeltröpfchen weitestgehend durchgefroren sind. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Entstehung von Mehrlingen und Partikeln, deren Größe die erwartete Partikelgröße übersteigt, wird in den Abschnitten 5.1.2 und 5.1.3 ausführlich diskutiert. Als wahrscheinlichste Möglichkeit dafür kommt das Zusammentreffen von Tröpfchen während des Fluges in Frage, ebenso möglich wäre das Zusammenschmelzen von gefrorenen Tropfen beim Gefriertrocknungsprozess sowie während der Lagerung.

4.3.3.2 Restfeuchte

Der Restwassergehalt ist ein wichtiges Qualitätskriterium für Lyophilisate. Eine geringe Restfeuchte ist erforderlich für die Aufrechterhaltung der chemischen und mikrobiellen Stabilität. Insbesondere für Sphärolyophilisate ist ein niedriger Wassergehalt wichtig, da die Einzelpartikel durch Ausbildung eines Feuchtigkeitsfilms zusammenhaften können. Die optimale Restfeuchte ist abhängig von der zu stabilisierenden Zubereitung. Allgemein sollten Lyophilisate weniger als 1 % Restfeuchte aufweisen [140], für besondere Zubereitungen, wie zum Beispiel proteinhaltige Arzneimittel, sind jedoch meist höhere Gehalte nötig [76,89].

Die Bestimmung der Restfeuchte wurden thermogravimetrische Untersuchungen durchgeführt. Zuerst wurden die Zersetzungstemperaturen der Einzelsubstanzen bestimmt, die bei der Messung nicht überschritten werden dürfen. Für Mannitol wurde eine Temperatur von mehr als 280 °C, für Trehalose 140 °C und für Na-Hyaluronat 253°C ermittelt. Alle Messungen wurden unterhalb der Zersetzungstemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse der Restwasserbestimmung für die Lyophilisate sind in Tabelle 4-18 aufgeführt.

| Gerüstbildner | Konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] | Restfeuchte [%] |
|---------------|--------------------|--------|--------------------|--------------------|
| Mannitol | 5,0 | kein | - | 0,1 ± 0,1 |
| | 20,0 | | | 0,1 ± 0,0 |
| | 5,0 | HA | 0,1 | 0,5 ± 0,3 |
| | 20,0 | | | 0,2 ± 0,0 |
| Trehalose | 5,0 | kein | - | 5,5 ± 0,4 |
| | 20,0 | | | 4,9 ± 1,6 |
| | 5,0 | HA | 0,1 | 5,7 ± 2,4 |
| | 20,0 | | | 6,0 ± 1,5 |

Tab. 4-18 Restfeuchte von Sphärolyophilisaten (n=3)

Die Ergebnisse in Tabelle 4-18 zeigen für mannitolhaltige Lyophilisate eine Restfeuchte von 0,1 bis 0,5 % und für trehalosehaltige Formulierungen Werte

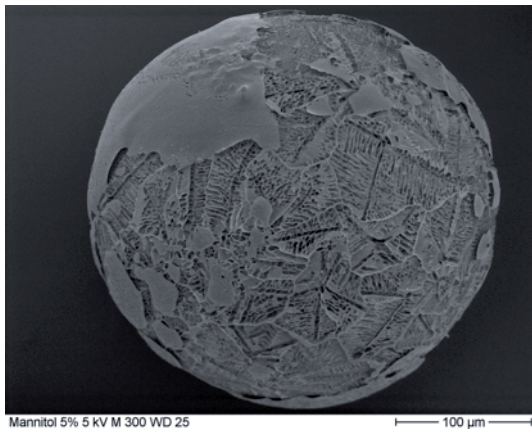
von 4,9 bis 6,0 %. Der Zusatz von Hyaluronsäure-Natrium hat dabei keinen deutlichen Einfluss auf den Restwassergehalt.

4.3.3.3 Strukturuntersuchungen durch Rasterelektronenmikroskopie

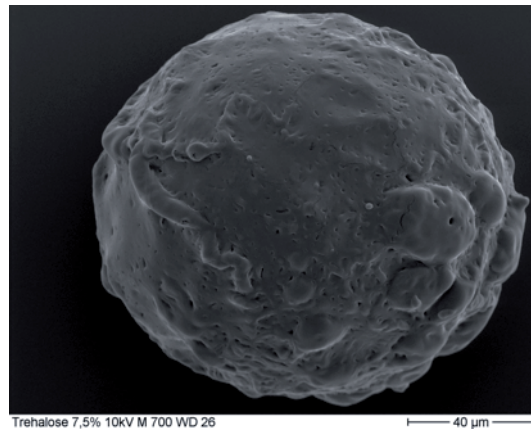
Im theoretischen Teil wurde bereits erläutert, dass die Struktur von Lyophilisaten hauptsächlich von den verwendeten Substanzen sowie von der Einfriergeschwindigkeit abhängt. Die Struktur der untersuchten Sphärolyophilisate lässt Rückschlüsse auf das Einfrierverhalten der Inhaltsstoffe und die Verteilung der Eiskristalle im gefrorenen Tröpfchen zu.

Oberflächenstruktur

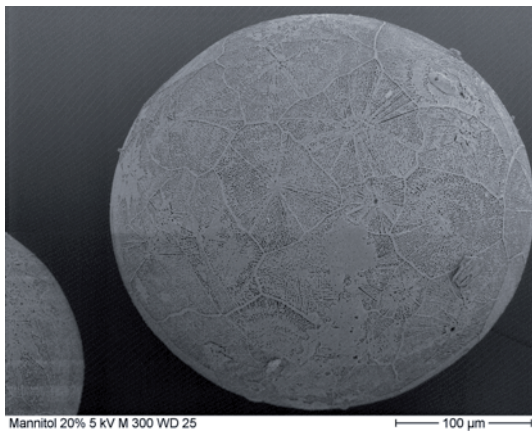
Die Struktur der mannitolhaltigen Lyophilisate unterscheidet sich deutlich von denen mit Trehalose. In der folgenden Übersicht sind beispielhaft die Aufnahmen einiger ausgewählter Sphärolyophilisate dargestellt.



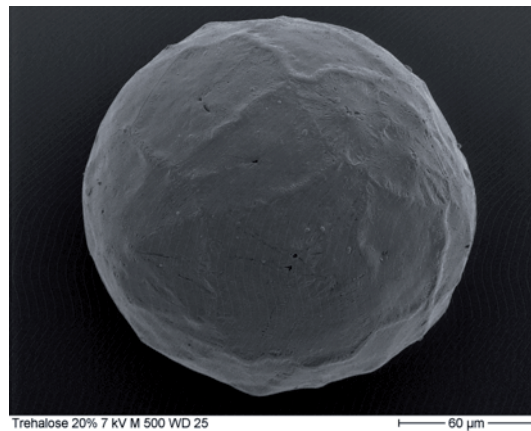
a – Mannitol 5 %



b –Trehalose 7,5 %



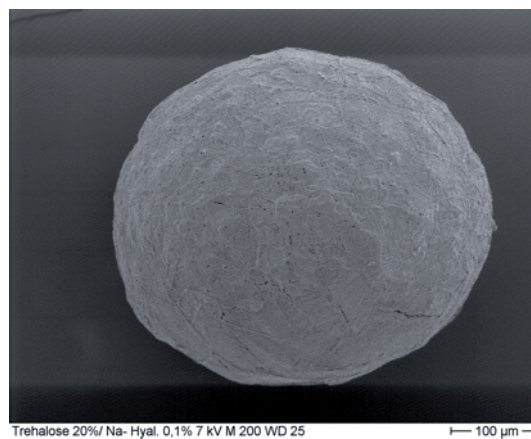
c – Mannitol 20 %



d – Trehalose 20 %



e – Mannitol 20 %, Zusatz HA



f – Trehalose 20 %, Zusatz HA

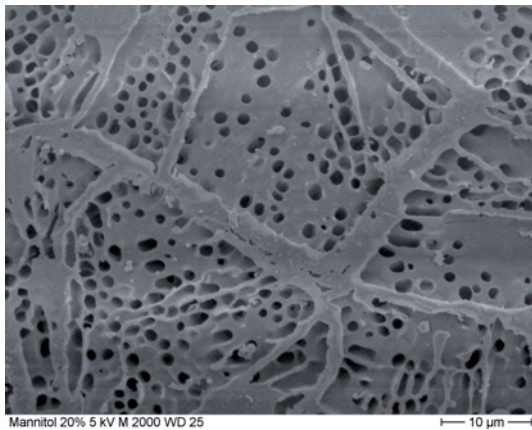
Abb. 4-29 Struktur einzelner Sphärolyophilisate mit Mannitol und Trehalose (200 bis 700-fache Vergrößerung)

Alle Mannitolpartikel weisen eine geordnete lamellare Struktur auf. Vermutlich sind diese auf auskristallisiertes Mannitol zurückzuführen. Die Lyophilisate mit geringem Feststoffanteil sind teilweise von einer dünnen Hülle überzogen, die aber nicht immer vollständig zusammenhängt (Abbildung 4-29 a).

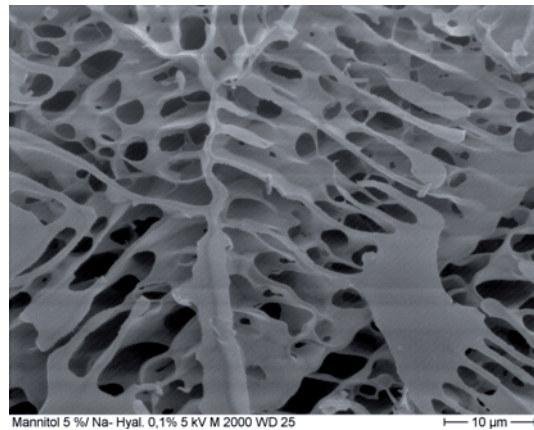
Sphärolyophilisate mit Trehalose besitzen insgesamt eine glatte, zusammenhängende Struktur, wobei die Oberfläche wellig bis faltig erscheint. Dies lässt auf ein glasartiges Erstarren beim Einfrieren der Trehaloselösungen schließen. Die Partikel mit geringem Feststoffanteil weisen eine stärker gefaltete Struktur auf als die, bei denen der Gerüstbildnergehalt hoch ist.

In der stark vergrößerten Ansicht der Oberfläche (Abbildungen 4-30 a und b) ist erkennbar, dass bei höherem Feststoffanteil die Porengröße der Mannitolpartikel bis auf etwa 1 bis 2 μm abnimmt. Der Zusatz von Hyaluronsäure hat keinen merklichen Einfluss auf die Struktur dieser Partikel.

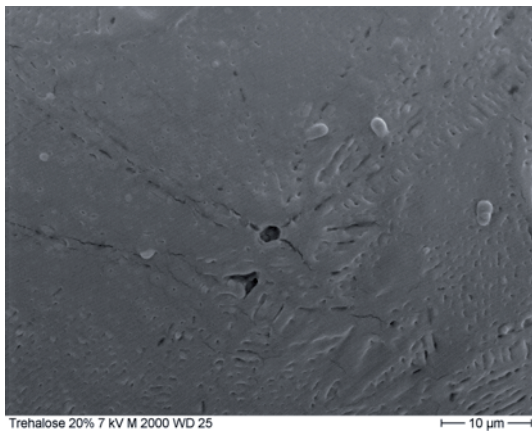
Betrachtet man Trehalosepartikel bei höherer Vergrößerung (Abbildungen 4-30 c und d) sind bei allen Zusammensetzungen feine Poren zu erkennen, die jedoch wesentlich deutlicher ausgeprägt sind, wenn Natriumhyaluronat enthalten ist. Die Oberfläche wird dann den Lyophilisaten mit Mannitol ähnlicher.



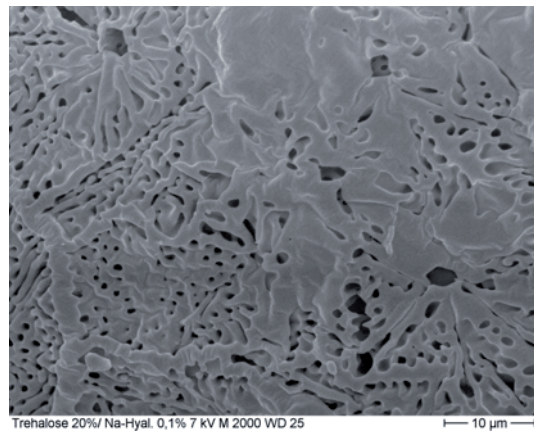
a – Mannitol 20 %



b - Mannitol 5 %, Zusatz HA



c – Trehalose 20 %

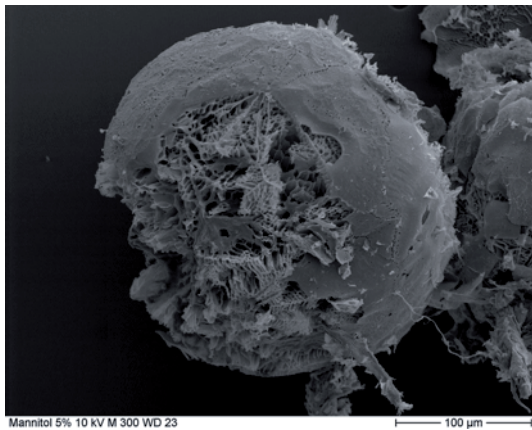


d – Trehalose 20 %, Zusatz HA

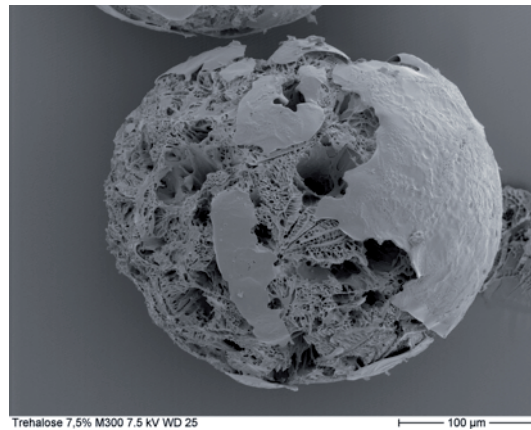
Abb. 4-30 Oberflächenstruktur ausgewählter Sphärolyophilisate mit Mannitol und Trehalose (2000-fache Vergrößerung)

Innere Struktur

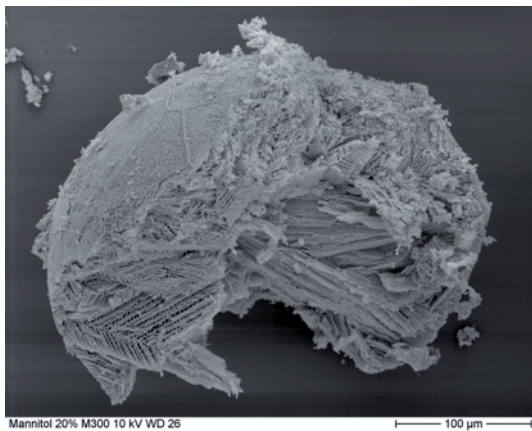
Zur Untersuchung der inneren Struktur der Sphärolyophilisate wurden diese vorsichtig in flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zerstoßen und die Bruchstücke für das Rasterelektronenmikroskop präpariert. Im Folgenden sind mehr oder weniger große Bruchstücke einiger ausgewählter Partikel mit unterschiedlicher Zusammensetzung dargestellt.



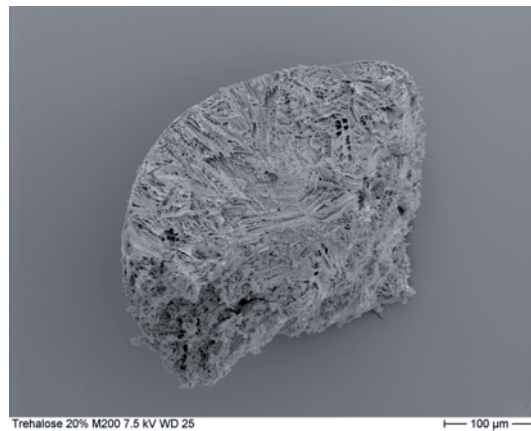
a – Mannitol 5 %



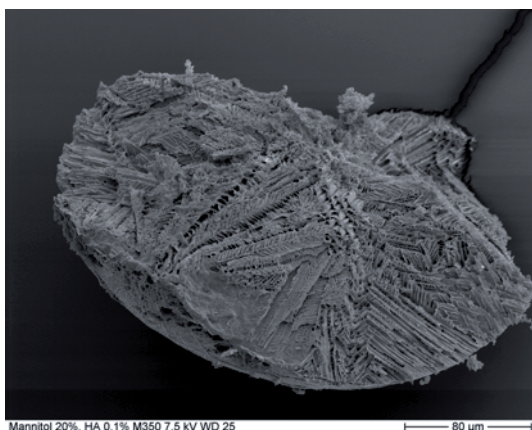
b – Trehalose 7,5 %



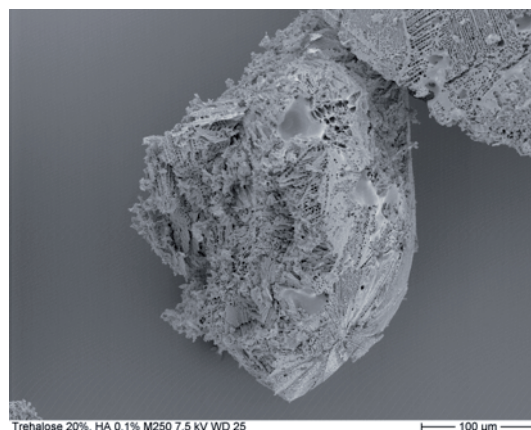
c – Mannitol 20 %



d – Trehalose 20 %



e – Mannitol 20 %, Zusatz HA



f – Trehalose 20 %, Zusatz HA

Abb. 4-31 Innere Struktur von ausgewählten Sphärolyophilisaten mit Mannitol und Trehalose (200 bis 300-fache Vergrößerung)

Die innere Struktur der mannitolhaltigen Lyophilisate besteht aus einem verzweigten Gerüst mit blockweise parallel angeordneten Blättchen. Die Partikel mit geringem Feststoffanteil weisen neben der feinen Innenstruktur zusätzlich einige größere Poren auf. Im Gegensatz dazu erscheint die Struktur des Partikels mit hohem Feststoffanteil insgesamt von feinen Blättchen

durchzogen. In Abbildung 4-31 a ist deutlich ein Lyophilisat mit äußerer Hülle zu erkennen, die aber nur wenige Mikrometer dick ist.

Trehalosepartikel besitzen im Inneren ebenfalls eine verzweigte Struktur, die im Gegensatz zu den mannitolhaltigen feiner ausgeprägt ist. Bei den gering konzentrierten Lyophilisaten (Abbildung 4-31 b) sind teilweise große Hohlräume zu erkennen. Bei Zusatz von Natriumhyaluronat ist bei beiden Präparaten kein wesentlicher Unterschied in der inneren Struktur erkennbar. Die unbehandelten Trehaloselyophilisate, die in den Abbildungen 4-29 b, d und f gezeigt wurden, zeigen eine zusammenhängende Oberfläche, die bei den in Abbildung 4-31 b, d und f dargestellten Partikeln nur noch bruchstückhaft erkennbar ist. Vermutlich sind sie wie die gering konzentrierten Mannitolteilchen von einer Hülle umgeben, die beim Präparieren der Proben zerstört wurde. In Abbildung 4-31 b sind Reste dieser Hülle gut erkennbar.

Bei den Untersuchungen zur inneren Struktur wurde auch das in der folgenden Abbildung gezeigte Zwillingpartikel gefunden.

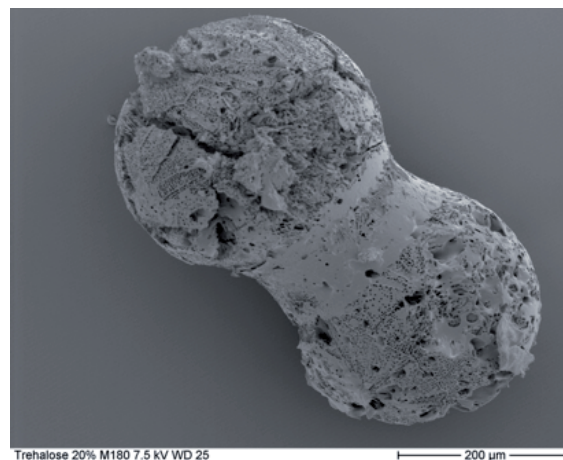


Abb. 4-32 Struktur eines Zwillingpartikels (Ausgangslösung Trehalose 20 %)

Hier ist deutlich erkennbar, dass die Verbindung zwischen den zwei etwa gleich großen Einzeltropfen aus einem dichten Feststoffgerüst besteht, das auch das Präparieren mit dem Pistill unbeschadet überstanden hat. Bei der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung von Sphärolyophilisaten, siehe auch Abschnitte 4.3.2.2 und 4.3.3.1, wurden bereits Möglichkeiten aufgeführt, die zur Entstehung von Mehrlingspartikeln führen können. Da die Partikel beide ihre ursprüngliche Form beibehalten haben und nur an einer Stelle über ein sehr

dichtes und den Partikeln in der Struktur ähnliches Feststoffgerüst verbunden sind, wird vermutet, dass zwei Tropfen bereits im freien Fall zusammengefließen und dabei eingefroren sind. Zur Diskussion sei auf Abschnitt 5.1.3 verwiesen. Auffällig ist, dass die Partikel viel poröser erscheinen als die Feststoffbrücke. Möglicherweise fehlt auch hier, wie bei den in Abbildung 4-31 gezeigten Trehalosepartikeln, die bei den unbehandelten Partikeln erkennbare Hülle.

4.3.3.4 Einflüsse der Zusammensetzung auf die spezifische Oberfläche

Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Sphärolyophilisaten dient der Erfassung der inter- und intrapartikulären Oberflächen. Die Sphärolyophilisatpulver wurden dazu mit der BET-Methode, siehe Abschnitt 3.4.2.4, untersucht. Die Größe der Oberfläche hat einen Einfluss auf die Rekonstitutionszeit und die Wasserdampfsorption während der Lagerung. Durch die Vergrößerung der Oberfläche können die Lyophilisate schneller rekonstituiert werden, sie neigen dadurch aber meist auch zu einer stärkeren Aufnahme von Feuchtigkeit aus der Umgebungsluft.

Bei diesem Versuch wurden mögliche Einflussfaktoren der Formulierung wie die Art und der Gehalt des Gerüstbildners sowie die Verwendung eines Zusatzes untersucht. Für den Versuch wurde ein 2^3 Faktorenversuchsplan erstellt. Die Faktoren und Niveaus sind in Tabelle 4-19 aufgeführt. Zur Variation der Faktoren „Gerüstbildner“ und „Feststoffgehalt“ wurden Mannitol und Trehalose in niedriger und hoher Konzentration eingesetzt. Als Zusatz diente der Viskositätserhöher Natriumhyaluronat.

| Faktoren | | Niveaus | |
|------------------------------|-------|-----------------|----------------------------|
| Feststoffkonzentration | x_1 | 5 - 7,5 % (m/V) | 20 % (m/V) |
| Gerüstbildner | x_2 | Mannitol | Trehalose |
| viskositätserhöhender Zusatz | x_3 | kein | Na- Hyaluronat 0,1 % (m/V) |

Tab. 4-19 2^3 Faktorenversuchsplan zur Bestimmung der Einzelfaktoren auf die spezifische Oberfläche

Die allgemeine Modellgleichung, die alle Haupteffekte und alle Wechselwirkungen zwischen 2 Faktoren des Modells berücksichtigt, lautet wie folgt:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + \varepsilon \quad \text{Gl. 4-3}$$

Y – Zielgröße (spezifische Oberfläche), a_0 - Mittelwert, x_1 – Faktor 1 (Feststoffkonzentration), x_2 – Faktor 2 (Gerüstbildner), x_3 – Faktor 3 (viskositätserhöhender Zusatz), a_1, a_2, a_3 – Haupteffekte des linearen Teils, a_{12}, a_{13}, a_{23} – Wechselwirkungen, ε – Reststreuung des Modells

Die Ergebnisse, die zur statistischen Bewertung verwendet wurden, finden sich im Anhang in Abschnitt 7.3.2.

Zur statistischen Beurteilung wurde der F-Wert aus den Varianzen des Modells und des Fehlers ermittelt. Der Wahrscheinlichkeitswert p zeigt, dass das Modell aussagekräftig ist, weil es einen großen Teil der Abweichungen der Ergebnisse vom Mittelwert erklärt.

| | FG | SQ | MQ | F-Wert | p |
|--------|-----------|-----------|-----------|---------------|----------|
| Modell | 6 | 378,4351 | 63,0725 | 40,6046 | < 0,0001 |
| Fehler | 17 | 26,4066 | 1,5533 | | |
| Gesamt | 23 | 404,8418 | | | |

Tab. 4-20 Varianzanalyse: Bewertung des Modells für die spezifische Oberfläche

Die Berechnungen für die Einflussgrößen zeigen, dass alle Faktoren und Faktorkombinationen einen hochsignifikanten Einfluss auf die spezifische Oberfläche besitzen.

| Faktor | FG | SQ | F- Wert | p |
|---|----|----------|---------|----------|
| Feststoffgehalt | 1 | 72,5232 | 46,6888 | < 0,0001 |
| Gerüstbildner | 1 | 66,8000 | 43,0043 | < 0,0001 |
| Zusatz Na-Hyaluronat | 1 | 75,6860 | 48,7249 | < 0,0001 |
| Feststoffgehalt * Gerüstbildner | 1 | 33,2761 | 21,4224 | 0,0002 |
| Feststoffgehalt * Zusatz Na-Hyaluronat | 1 | 27,4776 | 17,6894 | 0,0006 |
| Gerüstbildner * Zusatz Na-Hyaluronat | 1 | 102,6720 | 66,0979 | < 0,0001 |

Tab. 4-21 Varianzanalyse: Bewertung der Einzelfaktoren auf die spezifische Oberfläche

Die einzelnen Ergebnisse für die spezifische Oberfläche sind grafisch in Abbildung 4-33 dargestellt.



Abb. 4-33 Spezifische Oberflächen von Sphärolyophilisaten (HA – Hyaluronsäure-Natrium, Anteil 0,1%, n=3)

Insgesamt liegen die Messwerte für die spezifische Oberfläche für alle Sphärolyophilisate in derselben Größenordnung. Abhängig von der Zusammensetzung variierten die Werte zwischen 9 und 22 m²/g. Für alle Zubereitungen ist die spezifische Oberfläche bei niedrigem Feststoffgehalt mit

Werten um $16 \text{ m}^2/\text{g}$ etwa um die Hälfte größer als bei hohem Feststoffgehalt, wo Werte um $10 \text{ m}^2/\text{g}$ gemessen wurden. Eine Ausnahme findet sich bei den Zubereitungen mit Trehalose ohne Zusatz. Hier liegt die spezifische Oberfläche bei den Lyophilisaten mit hohem Feststoffgehalt mit $22 \text{ m}^2/\text{g}$ um etwa $3 \text{ m}^2/\text{g}$ über dem Wert für das niedrige Gehaltsniveau.

Die Messung der spezifischen Oberfläche beruht auf der Anlagerung einer monomolekularen Schicht von Stickstoffmolekülen auf den zugänglichen Oberflächen der Probe. Die im Rasterelektronenmikroskop sichtbare Struktur der Lyophilisate kann bereits Hinweise auf die spezifische Oberfläche des Materials liefern, da auf den Aufnahmen der Lyophilisate die freien Flächen, an denen sich Stickstoffmoleküle anlagern können, gut erkennbar sind. Erste Aussagen über die Oberfläche der Lyophilisate lassen sich aus solchen Bildern ableiten.

Vergleicht man die REM-Aufnahmen der Zubereitungen, könnte man vermuten, dass die Zusammensetzungen mit höherem Feststoffgehalt stets eine größere Oberfläche besitzen, da sie eine dichtere Porenstruktur mit weniger großen Hohlräumen aufweisen. Dass dies nicht der Fall ist, zeigen die dargestellten Ergebnisse. Die zur Besetzung mit Stickstoffmolekülen, deren Radius im Pikometerbereich liegt, zur Verfügung stehende Oberfläche wird durch weitere Faktoren beeinflusst, wie die Dicke der Lamellen, die Feinstruktur der einzelnen Lamellen und die Zugänglichkeit innerer Flächen für Gasmoleküle, die durch geschlossene Poren verhindert werden kann. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen zwar, dass die Lyophilisate porös sind und viele freie Oberflächen aufweisen, genaue Aussagen können jedoch nur nach Vergleichsmessung der spezifischen Oberfläche erhalten werden.

Ferner kann die spezifische Oberfläche von der Partikelgröße der Lyophilisate abhängen, da kleinere Partikel insgesamt eine größere Oberfläche als große Partikel aufweisen. In Abbildung 4-34 ist die spezifische Oberfläche gegen die Partikelgröße aufgetragen. Das Diagramm zeigt, dass die Partikelgröße bei den untersuchten Sphärolyophilisaten keinen Einfluss hat, da ein direkter Zusammenhang nicht erkennbar ist.

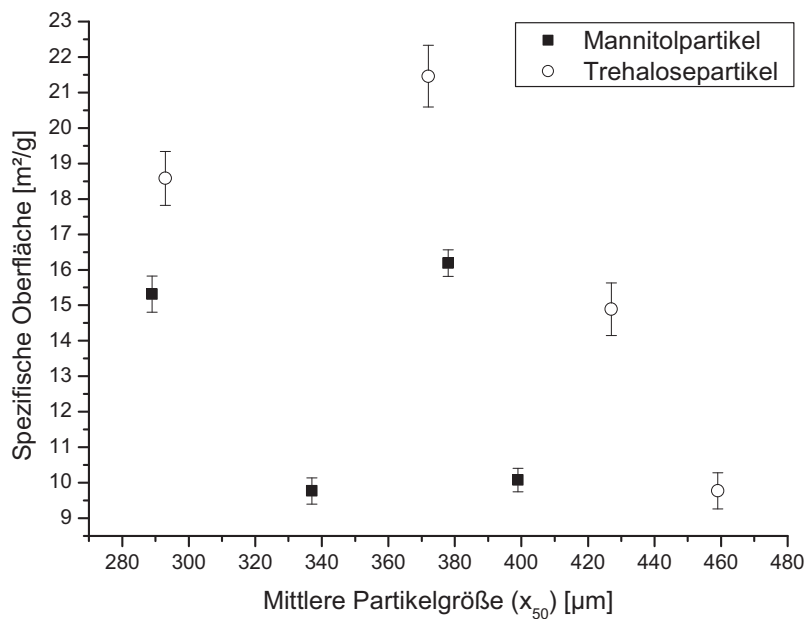


Abb. 4-34 Spezifische Oberfläche für mittlere Partikelgrößen von Sphärolyophilisaten mit Mannitol und Trehalose (Zusammensetzungen: Mannitol 5 / 20 % und Trehalose 7,5 / 20 %, mit und ohne Zusatz von Na-Hyaluronat)

4.3.3.5 Rekonstitutionszeit

Aufgrund ihrer hohen Porosität und der großen inneren Oberfläche wurde erwartet, dass sich die Lyophilisate innerhalb kurzer Zeit auflösen. Die verwendeten Gerüstbildner sowie der Zusatz Natriumhyaluronat sind hydrophil, sodass hinsichtlich der Zusammensetzung der Lyophilisate ebenfalls keine Unterschiede für die Auflösung angenommen wurden. In Tabelle 4-22 sind die Rekonstitutionszeiten für die verschiedenen Zusammensetzungen aufgeführt.

| Gerüstbildner | Konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] | Rekonstitutionszeit [s] | |
|---------------|--------------------|--------|--------------------|----------------------------|----|
| | | | | | |
| Mannitol | 5,0 | kein | - | 5 | 6 |
| | 20,0 | | | 20 | 30 |
| | 5,0 | HA | 0,1 | 10 | 3 |
| | 20,0 | | | 16 | 5 |
| Trehalose | 5,0 | kein | - | 6 | 9 |
| | 20,0 | | | 2 | 2 |
| | 5,0 | HA | 0,1 | 6 | 7 |
| | 20,0 | | | 8 | 7 |

Tab. 4-22 Rekonstitutionszeit von Sphärolyophilisaten

Die Rekonstitutionszeit beträgt für alle Sphärolyophilisate nur wenige Sekunden. Fast alle Partikel lösen sich innerhalb von 10 Sekunden auf. Ausnahmen davon sind die mannitolhaltigen Zubereitungen mit hohem Feststoffanteil, die sich innerhalb von 30 Sekunden auflösen. Weitere Unterschiede zwischen den mannitol- und trehalosehaltigen Zubereitungen sind nicht erkennbar, auch wenn einzelne Messungen für die Zubereitungen mit Mannitol und Natriumhyaluronat größere Werte ergaben.

4.3.3.6 Wasserdampfaufnahme

Die Wasserdampfaufnahme von Sphärolyophilisaten wurde bei relativen Feuchten von 0 bis 98 % mittels dynamischer Wasserdampfsorption untersucht. Die Einflüsse von Luftfeuchtigkeit während der Verpackung und der Lagerung der Lyophilisate können so besser eingeschätzt werden. Für die Sphärolyophilisate wurde auch bei geringen relativen Feuchten eine gute Wasseraufnahme angenommen, da sie eine große spezifische Oberfläche besitzen und aus gut wasserlöslichen Hilfsstoffen aufgebaut sind.

In den Abbildungen 4-35 und 4-36 ist die Wasseraufnahme in Abhängigkeit von der relativen Feuchte für Sphärolyophilisate mit Mannitol und Trehalose sowie für die pulverförmigen Ausgangssubstanzen dargestellt.

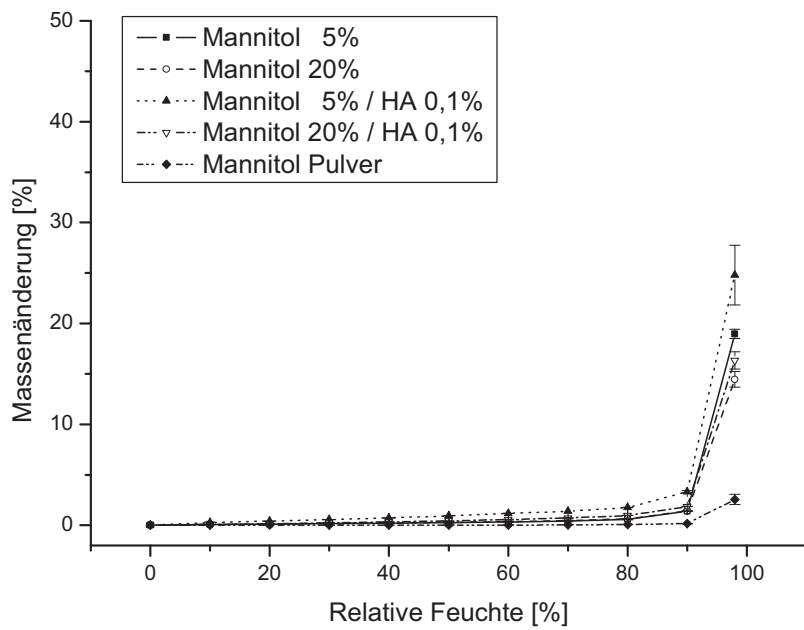


Abb. 4-35 Wasserdampfaufnahme von Sphärolyophilisaten mit Mannitol im Vergleich zu Mannitol Ausgangssubstanz (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=2, 25 °C)

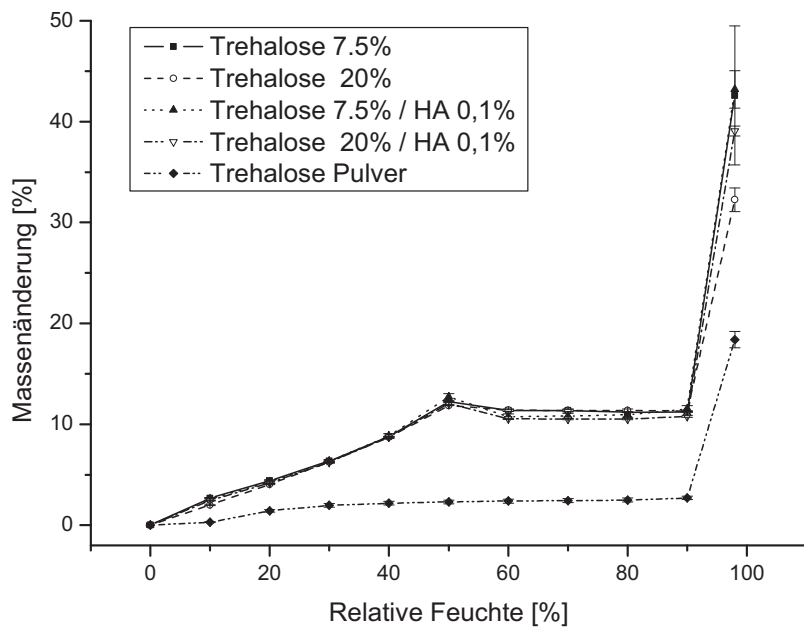


Abb. 4-36 Wasserdampfaufnahme von Sphärolyophilisaten mit Trehalose im Vergleich zu Trehalose Reinsubstanz (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=2, 25 °C)

Die Wasseraufnahme der Lyophilisate hängt von den verwendeten Substanzen und dem Feststoffgehalt ab. Im Vergleich zu den pulverförmigen Ausgangssubstanzen ist die Wasseraufnahme nach der Lyophilisation deutlich

höher, der Verlauf der Sorption ist jedoch ähnlich. Dieser Effekt wird auf die Vergrößerung der Oberfläche zurückgeführt.

Für mannitolhaltige Partikel bleibt die Wasserdampfsorption bis zu einer relativen Feuchte von 90 % unter 2 %, danach nimmt sie auf 15 bis 25 % zu. Dabei nehmen Lyophilisate mit geringem Mannitolanteil insgesamt mehr Wasser auf. Auch der Zusatz von Hyaluronsäure-Natrium bewirkt einen Anstieg der Gesamtwasseraufnahme. Trehalosehaltige Lyophilisate nehmen mit zunehmender relativer Feuchte bis zu einem Wert von 50 % kontinuierlich Wasser auf. Von 50 bis 90 % relativer Feuchte bleibt der Wassergehalt mit etwa 11 % konstant und steigt ab 90 % Feuchte sprunghaft auf 32 bis 43 % an. Vermutlich ist das bei 50 % relativer Feuchte erreichte Plateau auf die Bindung von Hydratwasser zurückzuführen. Die Wasseraufnahme ist bei niedrigem Feststoffanteil größer, der Zusatz von Hyaluronsäure-Natrium bewirkt nur bei Lyophilisaten mit hohem Feststoffanteil eine Zunahme des Wassergehalts. Insgesamt nehmen Sphärolyophilisate mit Trehalose mehr Wasser auf als die mit Mannitol.

Die Ergebnisse zeigen, dass die mannitolhaltigen Lyophilisate stabil gegenüber steigendem Feuchtigkeitsgehalt in der Luft sind. Lyophilisate mit Trehalose sind hingegen gegenüber Luftfeuchtigkeit empfindlich.

4.3.3.7 Schütt- und Stampfdichte

Die Untersuchung von Schütt- und Stampfdichte ist wichtig zur Bewertung der Fließfähigkeit des Pulvers. Die Bestimmung von Schütt- und Stampfdichte des Pulvers sind an die Methoden des Europäischen Arzneibuchs angelehnt, die auf der Bestimmung des Pulvervolumens beruhen [20]. Aufgrund der geringen Pulvermengen, die zur Verfügung standen, konnte die Volumenbestimmung nur in sehr kleinen Gefäßen (Volumen 2 mL) erfolgen. Der Fehler für die Volumenbestimmung wird auf etwa 10 % geschätzt. Die Wechselwirkung der Partikel mit den Gefäßwänden, wie Haftung und Reibung, ist bei den kleinen Gefäßen wesentlich größer als bei den großvolumigen Zylindern. Außerdem war das Gefäß zur Ermittlung der Schüttdichte nicht exakt zylindrisch geformt. Die Bestimmung kann daher nur zur groben Orientierung dienen. Die ermittelten Werte für die Schütt- und Stampfdichte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Gerüstbildner | Mannitol | | | | Trehalose | | | |
|---------------------------------------|----------|------|--------|------|-----------|------|--------|------|
| Konz. (m/V) [%] | 5,0 | 20,0 | 5,0 | 20,0 | 7,5 | 20,0 | 7,5 | 20,0 |
| Zusatz (m/V) [%] | kein | | HA 0,1 | | kein | | HA 0,1 | |
| Schüttdichte [mg/cm ³] | 40 | 141 | 41 | 117 | 45 | 112 | 46 | 108 |
| Stampfdichte [mg/cm ³] | 41 | 145 | 41 | 119 | 46 | 114 | 47 | 112 |
| Hausner- Faktor | 1,03 | 1,03 | 1,00 | 1,02 | 1,02 | 1,02 | 1,02 | 1,04 |

Tab. 4-23 Schütt- und Stampfdichte sowie Hausner-Faktor von Sphärolyophilisaten

Die Schüttdichte von Sphärolyophilisaten ist aufgrund ihres niedrigen Feststoffanteils sehr klein und liegt bei niedrigem Feststoffanteil um 40 bis 50 mg/cm³ sowie bei hohem Feststoffanteil um 110 bis 140 mg/cm³. Die Werte für die Stampfdichte der Partikel sind nur wenig niedriger als die ermittelten Werte für die Schüttdichte. Das Gewicht ist damit im Verhältnis zum Volumen der Partikel sehr gering und sie können bei der Verarbeitung leicht durch Luftströmungen erfasst und mitgerissen werden.

Wenn man von der dichtesten Kugelpackung ausgeht, deren Raumfüllungsgrad 74 % beträgt, erhält man für die Partikel mit niedrigem Feststoffanteil eine Dichte von etwa 55 bis 70 mg/cm³ und für die Partikel mit hohem Feststoffanteil eine Dichte von etwa 150 bis 190 mg/cm³.

Zur Beurteilung des Fließverhaltens wurde nach dem Europäischen Arzneibuch der Quotient aus Stampf- und Schüttdichte, der Hausner-Faktor (siehe Gleichung 3-2), ermittelt [20]. Dem Europäischen Arzneibuch nach wird die Fließfähigkeit als ausgezeichnet bewertet, da der Hausner-Faktor unter dem Grenzwert von 1,11 liegt.

4.3.3.8 Fließeigenschaften

Zur Bestimmung des Fließverhaltens von Sphärolyophilisaten wurde der Abrutschwinkel des Pulvers mit einer Apparatur bestimmt, die besonders für kleine Pulvermengen geeignet ist. Der Abrutschwinkel beschreibt den Übergang vom ruhenden zum fließenden Pulver und wird von der interpartikulären Haftreibung der einzelnen Pulverpartikel bestimmt. Allgemein wirken sich viele Faktoren auf die Fließfähigkeit eines Pulvers aus. Neben der Partikelgröße und Größenverteilung spielen die Partikelform und Oberflächenbeschaffenheit sowie der Wassergehalt und die elektrostatische Aufladung eine Rolle. Materialien mit Teilchengrößen von mehr als 300 μm sind meist frei fließend, während bei Größen zwischen 50 und 300 μm mehr oder weniger ausgeprägte Fließstörungen auftreten [13].

In Abbildung 4-37 sind die Abrutschwinkel für Sphärolyophilisate mit Mannitol und Trehalose grafisch dargestellt.

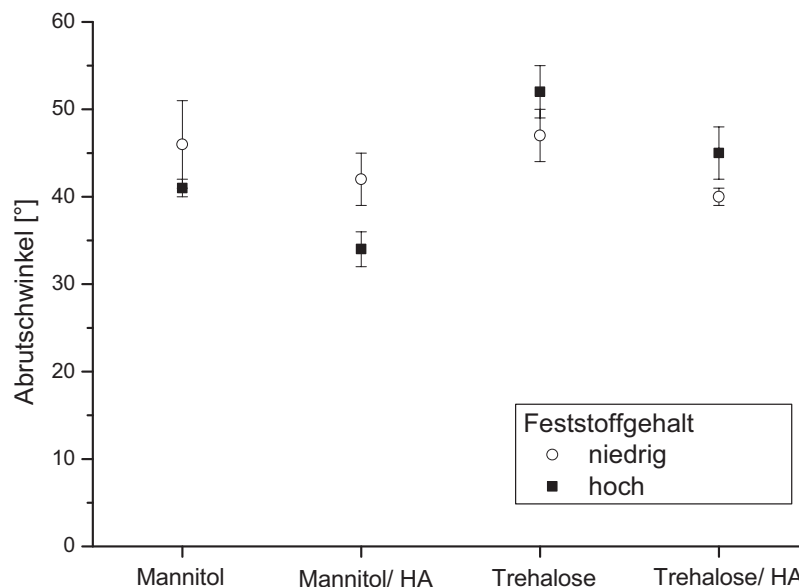


Abb. 4-37 Abrutschwinkel von Sphärolyophilisaten (n=3)

Die Abrutschwinkel für das mannitolhaltige Pulver liegen im Bereich von 34 bis 46 °. Bei Lyophilisaten mit höherem Feststoffgehalt sind die Werte etwas niedriger als bei niedrigem Gehalt. Für das Trehalosepulver wurden Abrutschwinkel von 41 bis 52 ° gemessen. Hier steigen die Werte bei Erhöhung des Feststoffgehalts. Der Zusatz von Hyaluronsäure-Natrium bewirkte für alle

untersuchten Sphärolyophilisate eine leichte Verringerung des Abrutschwinkels. Um insbesondere für die Zusammensetzungen mit Trehalose eine Veränderung der Fließfähigkeit durch die im Labor stark schwankende Luftfeuchtigkeit auszuschließen, wurden alle Lyophilisate in einer trockenen Umgebung vermessen.

Die Bestimmung der Fließfähigkeit ist mit anderen Methoden nicht direkt vergleichbar. Daher wurden zum Vergleich die Abrutschwinkel eines gut und eines schlecht fließenden Pulvers mit der Methode bestimmt. Als gut fließendes Pulver wurde FlowLac[®] 100 (alpha-Lactose Monohydrat sprühgetrocknet, Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG) und als schlecht fließendes Pulver Methocel[®] A4C (Methylcellulose, The Dow Chemical Company) ausgewählt. Flowlac[®] 100 besitzt runde Partikel, die aufgrund ihrer Form gut fließen. Der Hersteller gibt einen Hausner-Faktor von 1,13 an, was dem Europäischen Arzneibuch nach einer guten Fließfähigkeit entspricht, da der Wert innerhalb der Grenzen von 1,12 und 1,18 liegt. Methocel[®] A4C besteht dagegen aus nadelförmigen Partikeln, deren Fließverhalten aufgrund der Form als schlecht eingestuft wird. Eine Beurteilung der Fließfähigkeit seitens des Herstellers ist nicht angegeben. Im Versuch wurde für das gut fließende FlowLac[®] ein Abrutschwinkel von $50 \pm 2^\circ$ und für Methocel[®] A4C ein Abrutschwinkel von $60 \pm 2^\circ$ bestimmt. Die Fließfähigkeit der Sphärolyophilisate wird daher im Vergleich zu Flowlac[®] als sehr gut beurteilt. Eine Ausnahme stellen Lyophilisate aus 20 %-iger Trehaloselösung dar, deren Fließfähigkeit zwischen den für Flowlac[®] und Methocel[®] ermittelten Werten liegt. Die erhaltenen Daten für Flowlac[®] und Methocel[®] zeigen aber auch, dass die Methode zur Bestimmung der Fließfähigkeit nicht besonders selektiv ist und daher eher eine grobe Einschätzung liefert. Zur genauen Bestimmung der Fließfähigkeit könnten weitere Methoden, wie zum Beispiel die Ermittlung der Durchflusszeit durch eine definierte Öffnung oder die Bestimmung mit einer Scherzelle herangezogen werden, für die allerdings große Materialmengen erforderlich sind.

4.3.3.9 Sedimentationsgeschwindigkeit

Die Bewegung kugelförmiger Teilchen in Gasen und Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ist ein klassisches Problem der Fluidodynamik und wurde vorwiegend mit optischen Methoden vielfach untersucht. Das Sedimentationsverhalten von Sphärolyophilisaten ist ein Sonderfall dieses allgemeinen Problems, der für pharmazeutische Anwendungen wichtig ist. Die Lyophilisate zeichnen sich im Gegensatz zu anderen Feststoffpartikeln durch ihre besonders niedrige Dichte aus. Dadurch unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer aerodynamischen Eigenschaften von anderen Wirkstoffträgern.

Diese besonderen Eigenschaften der Partikel sind zum einen eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung mittels Gefriertrocknung im Gegenstrom. Das Konzept sieht dazu vor, dass die gefrorenen Partikel in einem entgegengerichteten Luftstrom getrocknet werden. Dabei werden sie so lange in der Schwebe gehalten bis ihre Masse durch die Trocknung so stark abgenommen hat, dass sie im Gegenstrom nach oben ausgetragen werden. Um die getrockneten Partikel aus der Trockenkammer zu entfernen, muss ihre Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeit kleiner sein, als die Strömungsgeschwindigkeit, die am größten Querschnitt am oberen Ende der Trockenkammer herrscht. Näheres zu dem Konzept der ACD-Anlage siehe Abschnitt 2.2.3.1.

Die im Versuch ermittelte Sedimentationsgeschwindigkeit ist die Größe, die beim Betreiben der ACD-Anlage am maximalen Durchmesser der Trockenkammer mindestens herrschen muss. Sie ist abhängig vom Durchmesser und Feststoffgehalt der Partikel, denn mit abnehmender Dichte verlangsamt sich auch die Sedimentation der Partikel. Des Weiteren spielen die Eigenschaften des Umgebungsgases eine Rolle, da sich die Viskosität und Dichte von Gasen temperaturabhängig verändert.

Zum anderen ist das Sedimentationsverhalten der Sphärolyophilisate interessant für spätere pharmazeutische Anwendungen, zum Beispiel für die pulmonale Darreichung. Die Ergebnisse der Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit zeigen auch, dass der mit Hilfe der Sedimentationsgeschwindigkeit errechnete aerodynamische Partikel-

durchmesser um ein Vielfaches kleiner ist als der mikroskopisch ermittelte Durchmesser.

Die Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeit der Partikel wurde mit einem 150 cm langen Fallrohr mit einem Innendurchmesser von 10 cm in Luft bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) bestimmt. Am oberen Ende des Fallrohrs wurden die Sphärolyophilisatproben mit Hilfe eines pneumatisch betriebenen Schiebers in der Mitte des Fallrohrs freigegeben. Die Partikel wurden nach dem Passieren des Fallrohrs auf einem mit transparentem Klebeband versehenen Band aufgefangen, das mit einer konstanten, vorprogrammierten Geschwindigkeit am unteren Ende des Fallrohrs vorbeibewegt wurde. So konnte neben der Sedimentationsgeschwindigkeit auch der Durchmesser einzelner Partikel nach dem Ende des Sedimentationsversuchs mikroskopisch ermittelt werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass aerodynamische Wechselwirkungen der Partikel im Schwarm eine vollständige Trennung nach Durchmesser und Dichte verhindern.

Die Verzögerungszeit, mit der das Band anfährt, und die Geschwindigkeit, mit der es bewegt wird, wurden vor dem Versuch experimentell ermittelt. Die Bestimmung der Verzögerungszeit ist wichtig, damit auch bei verlängerter Sedimentationsdauer des Pulvers alle Partikel auf dem Band voneinander getrennt aufgefangen werden können. Exemplarisch wurden die Sedimentationsgeschwindigkeiten für mannitolhaltige Lyophilisate mit niedrigem und hohem Feststoffgehalt, entsprechend niedriger und hoher Dichte, ermittelt.

| Zusammensetzung des Lyophilisats | Schüttdichte [g/cm ³] | Dosiertes Volumen [mm ³] | Verzögerung [s] | Geschwindigkeit Auffangband [cm/s] |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| Mannitol 5,0 % | 0,04 | 50 | 5 | 5 |
| Mannitol 20,0 % | 0,14 | 50 | 2 | 20 |

Tab. 4-24 Versuchsbedingungen für die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit

In Abbildung 4-38 sind die ermittelten mittleren Fallgeschwindigkeiten für zwei mannitolhaltige Lyophilisate hoher und niedriger Schüttdichte aufgetragen.

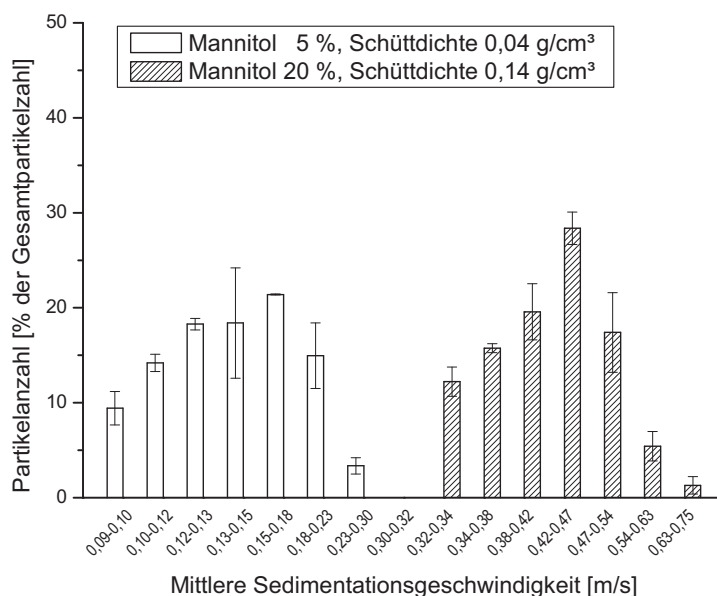


Abb. 4-38 Mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit von Sphärolyophilisaten in Luft bei 20 °C (Anzahl der ausgezählten Partikel etwa 1000 bis 1500, n=2)

Das Pulver mit dem geringen Feststoffanteil sedimentiert wie erwartet deutlich langsamer als das Pulver mit hohem Feststoffanteil. Da die Partikel der Probe nicht gleich groß sind, ergeben sich für die einzelnen Fraktionen unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten. Die Fallgeschwindigkeiten betragen für das Pulver aus 5 %-iger Mannitollösung 0,09 bis 0,30 m/s und für das Pulver mit 20 % Mannitol 0,32 bis 0,75 m/s.

Im Anschluss an die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde das Auffangband in einzelne Abschnitte unterteilt, denen je nach Entfernung der einzelnen Abschnitte von der Ausgangslage des Bandes Geschwindigkeitsbereiche zugeordnet werden können. Für jeden dieser Abschnitte wurden zusätzlich mikroskopisch die Partikelgrößen ermittelt. In Abbildung 4-39 sind die charakteristischen Werte x_{10} , x_{50} und x_{90} der Partikelgrößenverteilungen vereinfacht für den jeweiligen Bereich der Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetragen.

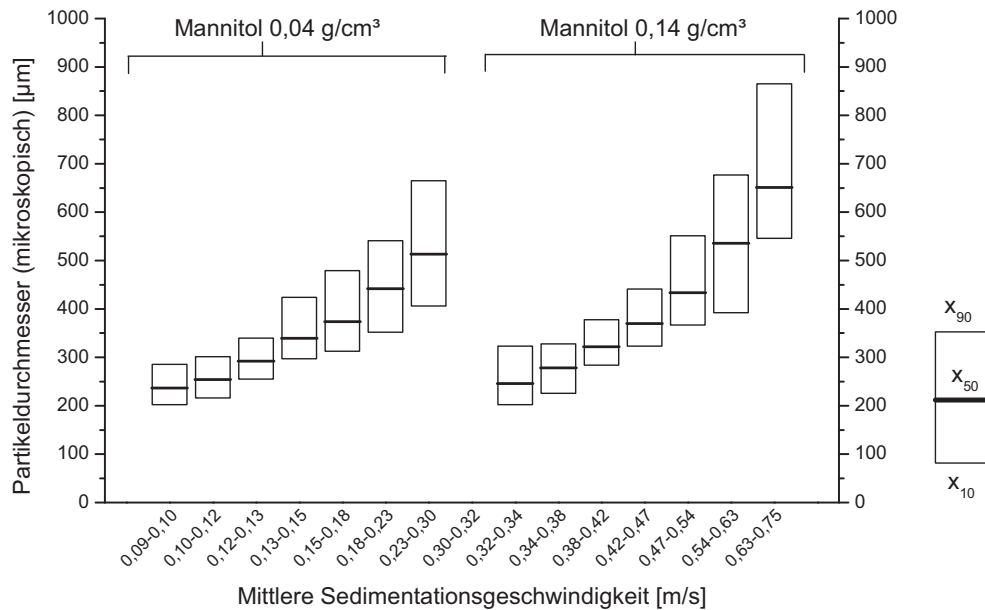


Abb. 4-39 Partikelgrößen für verschiedene mittlere Sedimentationsgeschwindigkeiten

Die mittleren Partikelgrößen für Mannitolpartikel mit geringer Dichte reichen von 240 bis 510 µm. Die mittleren Partikelgrößen für die Lyophilisate mit hohem Feststoffanteil liegen wie erwartet mit 250 bis 650 µm in einem vergleichbaren Größenbereich. Die Partikelgröße sollte vergleichbar sein, da sich die versprühten Lösungen nur im Feststoffanteil unterscheiden und unter gleichen Bedingungen gefriergetrocknet wurden.

Wenn monodisperse Partikel vorliegen, kann das erhaltene Diagramm zur Bestimmung der einzustellenden Strömungsgeschwindigkeit in der Trockenkammer der ACD-Gefriertrocknungsanlage verwendet werden. Die erforderliche Geschwindigkeit wird für den Durchmesser und die Dichte der Partikel auf der Abszisse abgelesen. Zu bemerken ist, dass die Messung aus technischen Gründen bei Raumtemperatur durchgeführt werden musste. Für die Praxis sind die erhaltenen Werte für die Sedimentationsgeschwindigkeit geringfügig höher, da die Viskosität der Luft durch die tieferen Temperaturen in der Trockenkammer etwas geringer ist.

Legt man die ermittelten Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeiten für die Berechnung des aerodynamischen Durchmessers nach Gleichung 2-17 in Abschnitt 2.2.3.1 zugrunde, ergibt sich das in Abbildung 4-40 gezeigte

Diagramm. Der aerodynamische Durchmesser ist der Durchmesser eines Partikels mit der Dichte von 1 g/cm^3 , der dieselbe Sedimentationsgeschwindigkeit wie der betrachtete Partikel besitzt. Die untere und obere Grenze des aerodynamischen Durchmessers wurden durch Einsetzen der niedrigsten und höchsten Sedimentationsgeschwindigkeit für die erhaltenen Geschwindigkeitsbereiche berechnet.

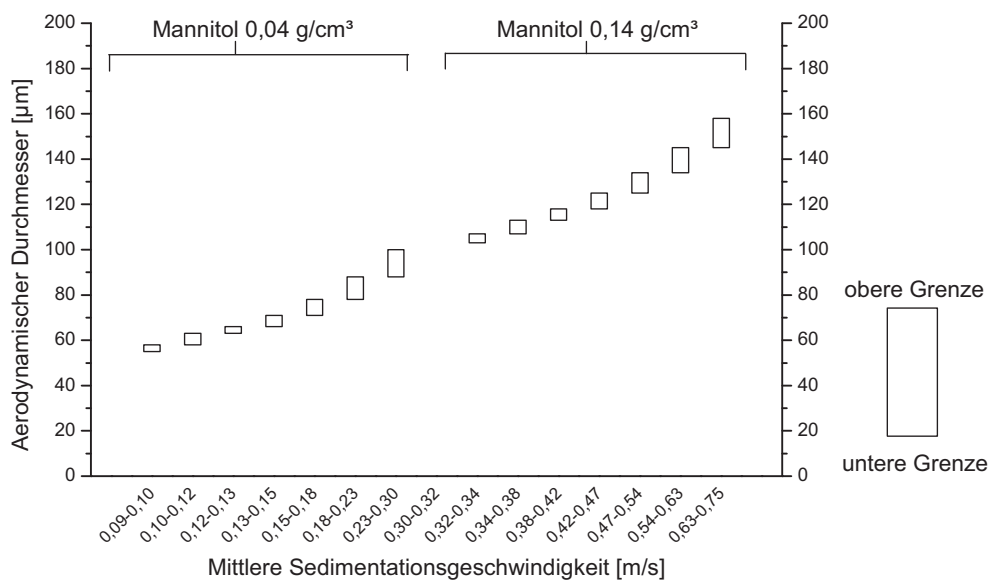


Abb. 4-40 Aerodynamische Durchmesser für verschiedene Partikelgrößen

Wie erwartet sind die aerodynamischen Partikeldurchmesser im Vergleich zu Abbildung 4-39 deutlich kleiner als die mikroskopisch ermittelten. Für Mannitolpartikel mit geringer Dichte betragen die aerodynamischen Durchmesser für die kleinsten Teilchen etwa $55 \mu\text{m}$ und für die größten etwa $100 \mu\text{m}$. Aufgrund der höheren Sedimentationsgeschwindigkeit sind die aerodynamischen Durchmesser für die Lyophilisate mit hohem Mannitolanteil größer. Hier liegen sie für die kleinsten Teilchen bei ca. $105 \mu\text{m}$ und für die größten bei ca. $160 \mu\text{m}$. Bezogen auf den aerodynamischen Durchmesser ist die Partikelgröße damit um ein Vielfaches kleiner als der geometrische Durchmesser.

Ist die Partikeldichte bekannt, kann die Berechnung des aerodynamischen Durchmessers auch unter Anwendung von Gleichung 2-19 erfolgen.

Näherungsweise kann diese aus der experimentell einfach bestimmbaren Stampfdichte der Partikel unter Berücksichtigung einer Volumenreduktion auf etwa 74 % des Ausgangsvolumens, wie in Abschnitt 4.3.3.7 bereits beschrieben, erhalten werden.

4.3.4 Applikation von Sphärolyophilisaten

Im folgenden Teil wurde untersucht, wie sich Sphärolyophilisate am Auge applizieren lassen. Die Versuche wurden mit Hilfe des in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Augenapplikators durchgeführt. Dazu wurden ausgewählte Sphärolyophilisate versprüht, um wichtige geräte- und pulverabhängige Parameter für eine vollständige und reproduzierbare Applikation zu ermitteln.

Zur Beurteilung der Applikation von Sphärolyophilisaten am Auge wurden der Öffnungsdurchmesser des Pulverkanals und der Sprühdruk des verwendeten Applikators variiert. Dazu wurden die Flugbahnen des Pulvers mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet und die Abscheidemuster ausgewertet. Da bei annähernd gleicher Form und Größe der Partikel die Flugeigenschaften hauptsächlich von der Dichte des Pulvers abhängen, wurden die Versuche mit Lyophilisaten aus 5 und 20 %-iger Mannitollösung durchgeführt. Zusätzlich wurde die zu applizierende Menge des Pulvers variiert. Zur Prüfung des Applikators wurden zunächst der Durchmesser der Ausstoßöffnung und der Sprühdruk verändert. Beurteilt wurde die Anzahl der Partikel, die außerhalb eines Trefferkreises ($d=15$ mm) entsprechend der Trefferfläche am Auge, gefunden wurden. In Abbildung 4-41 ist beispielhaft eine Aufnahme einer versprühten Lyophilisatprobe mit eingezeichnetem Trefferkreis dargestellt.

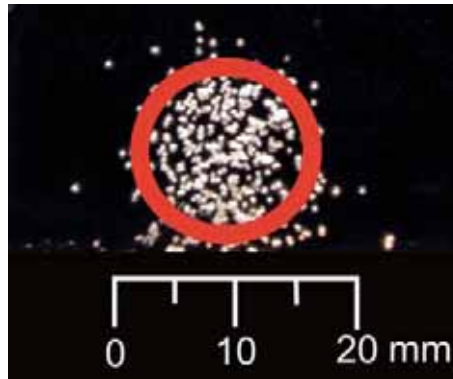


Abb. 4-41 Aufnahme nach Applikation von Sphärolyophilisaten aus 20 %-iger Mannitollösung mit eingezeichnetem Trefferkreis, $d=15$ mm (Sprühbedingungen: Öffnungsdurchmesser des Applikators 7 mm, Sprühdruck 1,3 bar)

Die Beurteilung der Partikelzahl, die sich außerhalb des Trefferkreises befanden, ergab, dass ein großer Öffnungsdurchmesser am Ende des Pulverkanals das vollständige Austragen des Pulvers aus dem Applikator begünstigt. Dies gilt auch für einen hohen Sprühdruck, wobei der Einfluss des Sprühdrucks bei den Partikeln mit großem Feststoffanteil nur gering ist. Aufnahmen des Flugverhaltens bestätigten die Ergebnisse. Dabei zeigte sich auch, dass sich beide Pulver trotz unterschiedlicher Dichte gut mit dem Applikator zerstäuben lassen. Wichtig ist dabei die Ausgangsmenge, da sich beim Dispergieren größerer Pulvermengen Mehrschichten auf der augenähnlichen Kugel ausbildeten, die nicht mehr hafteten.

In anschließenden Versuchen wurde die abgeschiedene Pulvermenge mit Sphärolyophilisaten aus 20 %-iger Mannitollösung mit den besten Einstellungen am Applikator quantitativ beurteilt. Dabei wurde die eingewogene Pulvermenge variiert. Der Öffnungsdurchmesser des Applikators betrug 7 mm und der Sprühdruck 1,9 bar. In Abbildung 4-42 sind für die Einwaagen von 3 und 5 mg die prozentualen Anteile der dispergierten Pulvermenge dargestellt, die sich nach der Applikation auf einem Objektträger abgeschieden haben.

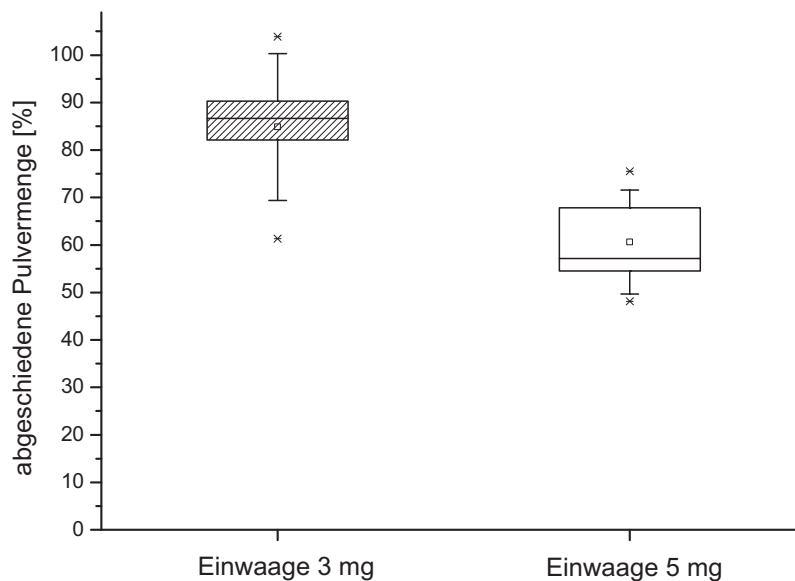


Abb. 4-42 Prozentualer Anteil der abgeschiedenen Pulvermenge von Sphärolyophilisaten nach Applikation auf einem Objektträger (Zusammensetzung der Ausgangslösung: Mannitol 20%, Sprühbedingungen: Druck 1,9 bar, Öffnungsdurchmesser 7 mm; n=5, Box: 25 bis 75 Perzentil, Whisker: Std.Abw., x - Spannweite)

Unter optimalen Sprühbedingungen schieden sich bei einer Einwaage von 3 mg etwa 85 % des Pulvers ab. Werden 5 mg eingewogen, sank der Anteil der abgeschiedenen Pulvermenge auf etwa 60 %. Beide Versuche zeigen eine breite Streuung der Ergebnisse. Ein möglicher Grund für die unvollständige Adhäsion wäre, dass nicht jedes Pulverpartikel auf dem Objektträger haftet, weil sein Auftreffort bereits von einem anderen Partikel besetzt ist. Die aerodynamischen Verhältnisse sind jedoch so kompliziert, dass weitere Ursachen wie Kollision und Ablenkung der Partikel bevor sie die haftende Oberfläche erreicht haben, ebenfalls dazu beitragen können.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die Applikation von Sphärolyophilisaten am Auge mit einem einfach aufgebauten Applikator möglich ist. Das Abscheideverhalten wird dabei hauptsächlich von der Größe des Öffnungsdurchmessers des Pulverkanals sowie vom Sprühdruck bestimmt. Die Menge des versprühten Pulvers sollte möglichst gering sein, um eine vollständige Applikation der gesamten Pulvermenge zu gewährleisten. Zur Anwendung am humanen Auge sollte der Applikator hinsichtlich der Gleichförmigkeit der Dosierung weiter optimiert werden.

4.4 Charakterisierung von Trägerlyophilisaten

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war es, latanoprosthaltige Trägerlyophilisate mit einem Gehalt von 0,75 bis 1,5 µg pro Einzeldosis zur Anwendung am Auge herzustellen und die okulare Bioverfügbarkeit im Tierversuch mit der des Handelspräparats Xalatan® zu untersuchen. Für die Rezepturen wurde Mannitol als Gerüstbildner ausgewählt, da bei der Herstellung von Sphärolyophilisaten gute Erfahrungen damit vorlagen. Die Kenntnisse, die bei der Entwicklung latanoprosthaltiger Trägerlyophilisate erhalten wurden, wie zum Beispiel Besonderheiten bei der Herstellung sowie der Wirkstoffanalytik, können später auch zur Produktion von Sphärolyophilisaten mit Latanoprost genutzt werden.

Da Trägerlyophilisate mit Mannitol bisher nicht untersucht worden sind, wurden zunächst die physikochemischen Eigenschaften der wirkstofffreien Lyophilisate und ihrer Ausgangslösungen ermittelt. Dabei sollten Zusammensetzungen für OLCS gefunden werden, die zur Anwendung am Auge geeignet sind. Die Zusätze für die Ausgangslösungen der Lyophilisate wurden dabei so ausgewählt, dass verschiedene Möglichkeiten zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit und der Löslichkeit zur Verfügung stehen. Eine Übersicht der untersuchten Zusammensetzungen ist in Tabelle 4-25 dargestellt.

| Mannitolkonz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] |
|-------------------------|----------|-----------------|
| 5,0 % | kein | - |
| | HA | 0,1 |
| | Pluronic | 0,1 |
| | HP-β-CD | 0,25 |
| 10,0 % | kein | - |
| | HA | 0,1 |
| | Pluronic | 0,1 |
| | HP-β-CD | 0,25 |

Tab. 4-25 Übersicht über die verwendeten Zusammensetzungen, Gerüstbildner Mannitol (Lösungsmittel Milli-Q® Wasser, HA – Hyaluronsäure-Natrium)

Natriumhyaluronat wird in wässrigen Augentropfen zur Verlängerung der Verweildauer der Arzneizubereitung am Auge eingesetzt, was zu einer

verbesserten Bioverfügbarkeit führen kann, siehe auch Abschnitte 2.3.1 und 3.1.3. Pluronic und HP- β -Cyclodextrin können, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, durch Solubilisation bzw. Komplexbildung die Löslichkeit lipophiler Arzneistoffen verbessern. Eine weitere Strategie zur Verbesserung der Löslichkeit ist die Verwendung von mit Wasser unbegrenzt mischbaren, unpolaren Lösungsmitteln, die sich durch Sublimation während der Gefriertrocknung entfernen lassen. Die dazu verwendeten Zubereitungen sind gesondert in Abschnitt 4.4.2.1 aufgeführt.

4.4.1 Charakterisierung der Ausgangslösungen

4.4.1.1 Viskosität und Oberflächenspannung

Die Viskosität der Ausgangslösung kann die Form des Tropfens auf der Trägerfolie beeinflussen. Niedrigviskose Lösungen spreiten schneller, dadurch entstehen flachere Tropfen, vor allem wenn der Träger vor dem Einfrieren bewegt wird. Ferner ist es möglich, dass Lyophilisate aus höherviskosen Lösungen die Kontaktzeit der Zubereitung am Auge verlängern und die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen verbessern. Die Lyophilisate bilden nach Rehydratation im Bindehautsack wieder eine höherviskose Lösung, die langsamer als eine niedrigviskose über die Tränenkanäle abgeführt wird und daher länger im Auge verbleibt (siehe auch Abschnitt 2.3.1). Weichselbaum zeigte für Trägerlyophilisate mit 1 % Mannitol und 0,5 % Na-Hyaluronat, die aus einer höherviskosen Lösung hergestellt wurden und sich innerhalb von 1 bis 2 Sekunden auflösten, eine Verweildauer von 17 Minuten im Bindehautsack des Auges [151].

Die Viskosität und das Fließverhalten der in Tabelle 4-25 aufgeführten Ausgangslösungen wurden bestimmt. Lösungen ohne Zusatz sowie Lösungen mit den Zusätzen Pluronic und HP- β -CD wiesen idealviskoses Fließverhalten auf. Die Lösungen, die Natriumhyaluronat als Zusatz enthielten, zeigten wie schon in Abschnitt 4.3.1.1 beschrieben strukturviskoses Fließverhalten. Zum Vergleich wurden die Viskositätswerte bei einer Schergeschwindigkeit von 100 s^{-1} herangezogen. Bei dieser Scherrate ist die Abnahme der Viskosität nur noch gering.

Die Oberflächenspannung der Ausgangslösungen wurde ermittelt, weil sie einen Einfluss auf die Tropfenform und die Benetzbarkeit der Trägerfolie besitzt. Ist die Trägerfolie besser benetzbar, erhöht sich auch die Kontaktfläche des Tropfens zum Trägermaterial.

Die Ergebnisse der Messungen der Viskosität und Oberflächenspannung sind in Tabelle 4-26 zusammengestellt.

| Mannitol-konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] | Viskosität [mPas] | Oberflächenspannung [mN/m] |
|--------------------------|----------|-----------------|-------------------|----------------------------|
| 5,0 | kein | - | 1,18 ± 0,01 | 73,2 ± 0,0 |
| | HA | 0,10 | 21,70 ± 0,05 | 73,1 ± 0,1 |
| | Pluronic | 0,10 | 1,15 ± 0,01 | 49,7 ± 0,2 |
| | HP-β-CD | 0,25 | 1,17 ± 0,05 | 59,6 ± 0,4 |
| 10,0 | kein | - | 1,46 ± 0,02 | 73,4 ± 0,1 |
| | HA | 0,10 | 24,97 ± 0,04 | 73,3 ± 0,1 |
| | Pluronic | 0,10 | 1,51 ± 0,02 | 48,9 ± 0,1 |
| | HP-β-CD | 0,25 | 1,34 ± 0,01 | 59,1 ± 0,4 |

Tab. 4-26 Viskosität und Oberflächenspannung der Ausgangslösungen (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=3)

Gemessener Vergleichswert für das verwendete Wasser: Viskosität 1,08 mPas, Oberflächenspannung 72,7 mN/m

Die Viskosität gegenüber reinem Wasser wurde durch den Zusatz von Mannitol konzentrationsabhängig geringfügig erhöht. Natriumhyaluronat erhöht auch in geringer Menge die Viskosität wässriger Lösungen stark. Die Zusätze Pluronic und HP-β-CD haben keine deutlichen Auswirkungen auf die Viskosität.

Die Oberflächenspannung erhöht sich bei Zugabe von Mannitol gegenüber reinem Wasser geringfügig. Na-Hyaluronat besitzt keinen deutlichen Einfluß auf die Oberflächenspannung. Durch Pluronic und HP-β-CD wird sie deutlich gesenkt. Lösungen mit Pluronic weisen dabei mit Oberflächenspannungen von 49 bis 50 mN/m niedrigere Werte auf als Lösungen mit HP-β-CD. Bei diesen Lösungen wurden Messwerte von 59 bis 60 mN/m ermittelt.

4.4.1.2 Kontaktwinkelmessungen

Der Kontaktwinkel beschreibt die Wechselwirkungen zwischen der Grenzfläche der Lösung und der PTFE-Trägerfolie. Je geringer die Wechselwirkung ist, desto größer wird der Kontaktwinkel. In der Youngschen Gleichung wird die Abhängigkeit des Kontaktwinkels von der Oberflächenenergie des Festkörpers, der Grenzflächenspannung an der Phasengrenze zwischen Festkörper und Flüssigkeit sowie der Oberflächenspannung der Flüssigkeit beschrieben:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_s - \gamma_{SL}}{\gamma_L} \quad \text{Gl. 4-4}$$

θ – Kontaktwinkel, γ_s – Grenzflächenspannung des Feststoffs mit dem gesättigten Dampf der Flüssigkeit, γ_{SL} – Grenzflächenspannung zwischen Feststoff und Flüssigkeit, γ_L – Oberflächenspannung der Flüssigkeit

Mit Hilfe des Kontaktwinkels können Aussagen über das Benetzungsverhalten gemacht werden. Je kleiner der Kontaktwinkel ist, desto besser ist die Benetzbarkeit. Allgemein werden Lösungen mit Kontaktwinkeln kleiner 90° als gut und größer 90° als schlecht benetzbar bezeichnet. Unterschiede im Benetzungsverhalten haben Auswirkungen auf die Form der Lyophilisate, denn gut benetzende Lösungen spreiten besser auf der Folie und geben flache Tropfen. Das Benetzungsverhalten beeinflusst auch die Haftfestigkeit von Lyophilisaten auf der Trägerfolie, da die Haftkräfte bei einer größeren Fläche vermehrt wirksam sind.

In den Abbildungen 4-43 und 4-44 sind die Kontaktwinkel der Ausgangslösungen für die jeweilige Zusammensetzung aufgetragen.

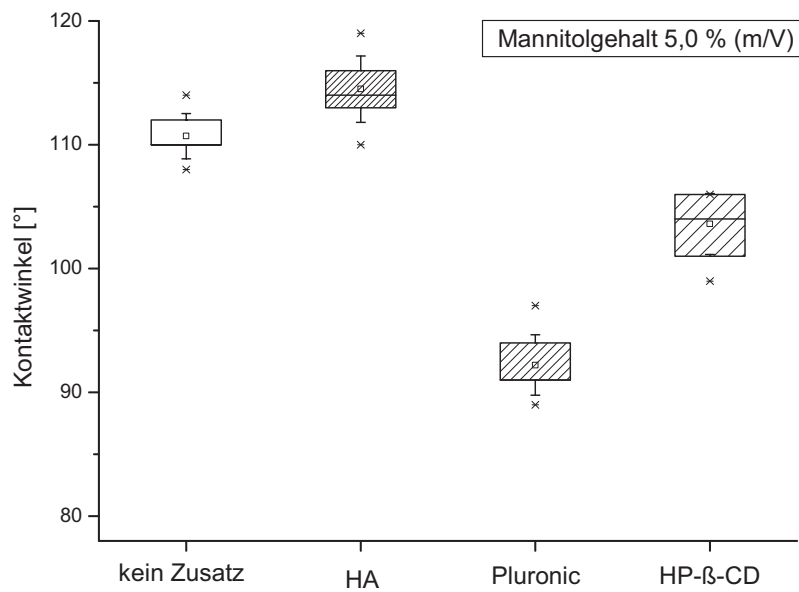


Abb. 4-43 Kontaktwinkel der Ausgangslösungen mit 5 %-igem Mannitolanteil (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=10, Box: 25 bis 75 Perzentil, Whisker: Std.Abw., x - Spannweite)

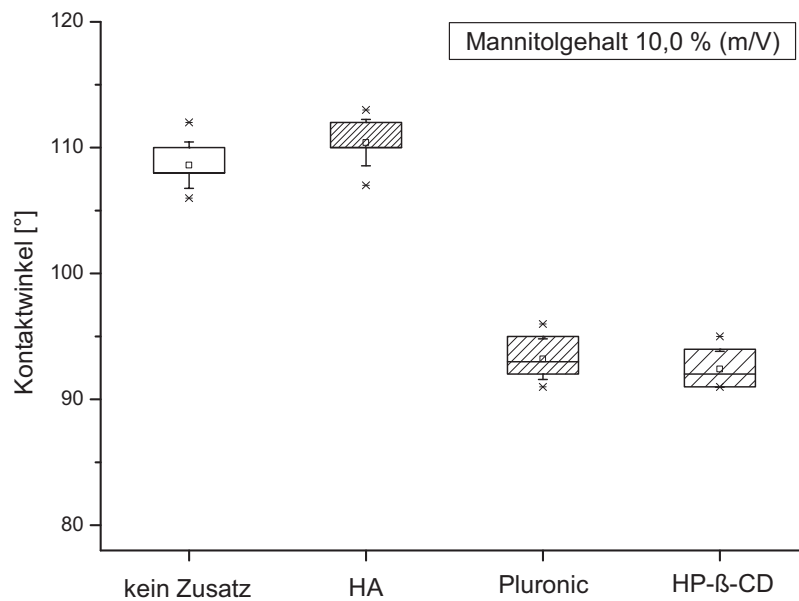


Abb. 4-44 Kontaktwinkel der Ausgangslösungen mit 10 %-igem Mannitolanteil (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=10, Box: 25 bis 75 Perzentil, Whisker: Std.Abw., x - Spannweite)

Die hydrophobe Trägerfolie ist durch die wässrigen Lösungen erwartungsgemäß schlecht benetzbar, denn alle Kontaktwinkel sind größer als 90°. Der Vergleichswert für das verwendete Wasser beträgt $113 \pm 2^\circ$ (n=10). Für die 5 und 10 %-igen Mannitollösungen werden Kontaktwinkel von etwa 110°

gemessen. Der Zusatz von Na-Hyaluronat sorgt bei beiden Lösungen für einen geringen Anstieg des Kontaktwinkels.

Werden Pluronic oder HP- β - Cyclodextrin zugesetzt, nimmt der Kontaktwinkel ab, die Folie wird durch diese Lösungen besser benetzt. Die Benetzung durch Lösungen mit Pluronic bleibt bei unterschiedlichem Mannitolanteil mit Werten um 93° gleich. Für Lösungen mit HP- β -CD liegt der Kontaktwinkel bei den Proben mit niedrigem Mannitolanteil um etwa 10° höher als für Proben mit Pluronic, die Werte für 10 %-ige Lösungen mit Mannitol liegen jedoch für beide Zusätze im gleichen Bereich. Vergleicht man dies mit den Werten für die Oberflächenspannung der Lösungen, siehe Tabelle 4-26, war dies nicht zu erwarten, da die Oberflächenspannung von Lösungen mit Pluronic geringer als die von Lösungen mit HP- β -CD ist.

4.4.2 Versuche zur Herstellung von Lyophilisaten mit Ethanol und tert-Butanol

Aufgrund der geringen Löslichkeit von Latanoprost im wässrigen Milieu wurden Lyophilisate aus wässrigen Lösungen, die Ethanol und tert-Butylalkohol enthielten, hergestellt. Die Alkohole dienen als Cosolventien indem sie die Polarität des Lösungsmittels herabsetzen und so die Löslichkeit unpolarer Substanzen verbessern. In Alkoholen wie Ethanol und Isopropanol ist Latanoprost gut löslich [7]. Zur Herstellung solcher Lösungen wird Latanoprost zuerst mit dem organischen Lösungsmittel aufgenommen, gelöst und anschließend die hilfsstoffhaltige wässrige Lösung zugesetzt.

Für die Gefriertrocknung sind nur wenige organische Lösungsmittel geeignet. Voraussetzung für organische Lösungsmittel, die als Cosolventien in wässriger Lösung bei der Gefriertrocknung eingesetzt werden, sind die unbegrenzte Mischbarkeit in Wasser, eine Erstarrungstemperatur, die oberhalb der mit der vorhandenen Ausstattung erreichbaren Einfriertemperaturen liegt (bei konventionellen Gefriertrocknern etwa -50 °C), und ein ausreichend hoher Dampfdruck im erforderlichen Temperaturbereich für die Primärtrocknung [142]. Ethanol und tert-Butanol besitzen einen etwas höheren Dampfdruck als Wasser. Bei -30 °C beträgt der Dampfdruck von Ethanol 1,5 mbar, und der von tert-Butanol 0,6 mbar. Der Dampfdruck von Wasser beträgt bei dieser Temperatur etwa 0,4 mbar. Weitere in wässrigen Systemen als Cosolventien

geeignete organische Lösungsmittel sind zum Beispiel Isopropanol, Essigsäure und DMSO. Eine wichtige Rolle für die Anwendung als Arzneimittel am Menschen spielt die Toxizität der eingesetzten Lösungsmittel. Ethanol gehört zu den Lösungsmitteln, die nach ICH Guideline als weniger giftig und mit niedrigem Gesundheitsrisiko für den Menschen eingestuft sind [17]. Tert-Butanol ist dort nicht aufgeführt, besitzt aber ebenfalls eine geringe Toxizität. Für die Gefriertrocknung wässriger Lösungen mit tert-Butanol gibt es bereits zugelassene Arzneimittel. Als Beispiel sei Caverject® angeführt, dabei handelt es sich um eine lyophilisierte prostaglandinhaltige Trockensubstanz zur Behandlung der erektilen Dysfunktion [119,142]. Bei der Herstellung von Lyophilisaten mit tert-Butanol ist jedoch zu beachten, dass die Verarbeitung dieses Lösungsmittels nur bei Temperaturen über 24 °C möglich ist, da reines tert-Butanol bei Raumtemperatur bereits gefriert. Wässrige Lösungen können jedoch gut verarbeitet werden, da der Gefrierpunkt durch den Zusatz von Wasser erniedrigt wird.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden das Einfrier- und Schmelzverhalten der Ausgangslösungen sowie die Haft- und Strukturfestigkeit von Trägerlyophilisaten mit Ethanol und tert-Butanol untersucht. Aus Kostengründen wurden dazu wirkstofffreie Lösungen verwendet, da die zugesetzte Menge Latanoprost einen sehr geringen Einfluss auf die untersuchten Eigenschaften besitzt.

4.4.2.1 Einfrier- und Schmelzverhalten

Das Verhalten beim Einfrieren und Auftauen von wirkstofffreien Lösungen mit verschiedenen Anteilen der organischen Lösungsmittel wurde mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie untersucht. Dabei sollte ermittelt werden, ob die Zusammensetzungen unter den vorgegebenen Bedingungen eingefroren und gefriergetrocknet werden können. Durch die Zugabe organischer Lösungsmittel kann die Einfriertemperatur im Vergleich zur wässrigen Lösung verändert werden. Bei den ethanolhaltigen Lösungen wurde eine Herabsetzung der Einfriertemperatur erwartet, da der Gefrierpunkt von Ethanol bei -114 °C liegt. Tert-Butanol hingegen besitzt einen Gefrierpunkt von 24,0 °C und ist bereits bei Raumtemperatur fest. Um während der Primärtrocknung einen Kollaps oder Frothing (Aufschäumen) zu vermeiden, ist es wichtig, dass die

Glasübergangstemperatur der gefrorenen Lösung nicht überschritten wird, siehe dazu Abschnitt 2.1.2.2.

In Tabelle 4-27 sind die charakteristischen Vorgänge für die Zusammensetzungen zusammengefasst, wobei die Lösungen zunächst eingefroren und in einem anschließenden Heizschritt wieder aufgetaut wurden. Einigen Lösungen wurde Natriumhyaluronat zugesetzt, um die Hafffestigkeit der Lyophilisate auf dem Träger zu erhöhen, siehe auch Abschnitt 4.4.3.6, da dies zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche bereits bekannt war.

| Gerüstbildner und Zusatz | Konz. (m/V) [%] | | | | | | | |
|---|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 10 | 20 | 20 | 10 | 10 | 10 | 10 | 20 |
| Mannitol | 10 | 20 | 20 | 10 | 10 | 10 | 10 | 20 |
| HA | - | - | - | 0,1 | - | 0,1 | - | - |
| Lösungsmittel | Anteile (V/V) [%] | | | | | | | |
| | 5 | 5 | 10 | 5 | - | - | - | - |
| Ethanol | 5 | 5 | 10 | 5 | - | - | - | - |
| tert-Butanol | - | - | - | - | 10 | 10 | 5 | 10 |
| Einfrierpeak 1 [°C] | -21,5 | -23,4 | -24,2 | -21,1 | -23,2 | -21,4 | -19,6 | -23,9 |
| | -21,1 | -23,8 | -27,1 | -21,5 | -24,0 | -22,6 | -21,8 | -26,2 |
| Einfrierpeak 2 [°C] | -49,2 | -48,7 | -49,4 | -49,4 | | | | |
| | -49,4 | -47,7 | -49,6 | -49,2 | | | | |
| Glasübergang Heizschritt [°C] | -43,0 | -39,6 | -43,3 | -45,0 | -32,0 | -32,0 | -32,6 | -32,3 |
| | -44,5 | -39,9 | -43,0 | -43,0 | -31,6 | -32,6 | -32,0 | -30,9 |
| Endothermer Peak 1 Heizschritt [°C] | -30,1 | -27,3 | -30,1 | -30,1 | -23,1 | -23,1 | -23,0 | -23,3 |
| | -30,2 | -27,8 | -30,4 | -30,3 | -23,3 | -23,3 | -22,6 | -28,4 |
| Endothermer Peak 2 Heizschritt [°C] | | | | | -9,2 | -8,8 | -11,2 | -11,8 |
| | | | | | -8,3 | -8,5 | -11,3 | -11,5 |

Tab. 4-27 Ergebnisse der Dynamischen Differenzkalorimetrie für Ausgangslösungen mit Ethanol und tert-Butanol

Das Einfrier- und Schmelzverhalten für Alkohol-Wasser-Systeme wurde bereits von Takaizumi, Wakabayashi und van der Schoot et al. beschrieben [137,138,145]. Demnach wird beim Einfrieren von Ethanol-Wasser-Systemen die Lösung zunächst unter den Gefrierpunkt unterkühlt. Anschließend bildet sich zunächst Eis, im DSC-Thermogramm als exothermer Einfrierpeak erkennbar. Bei weiterem Kühlen kommt es zur Bildung von Ethanol-Hydraten unterschiedlicher Zusammensetzung, die im Thermogramm ebenfalls durch einen exothermen Peak gekennzeichnet ist. Beim Auftauen werden die Schmelzpunkte der Ethanol-Hydrate und des Eises in umgekehrter Reihenfolge zum Einfrieren als endotherme Peaks detektiert. Takaizumi und Wakabayashi fanden, dass Ethanol-Hydrate bei Temperaturen unter -50°C auftreten [138]. Für tert-Butanol-Wasser-Systeme werden beim Einfrieren, ähnlich wie bei den Ethanol-Wasser-Systemen, zuerst Unterkühlung, gefolgt von Eisbildung und der Ausbildung von tert-Butanol-Hydraten beschrieben. Beim Auftauen treten die entsprechenden Schmelzpeaks der tert-Butanol-Hydrate und von Eis auf. Die tert-Butanol-Hydrate werden bereits bei Temperaturen im Bereich von 0 bis -10°C detektiert [137]. Auch bei van der Schoot et al. wird zwischen -3 und -14°C das Schmelzen des Eutektikums, des reinen tert-Butanols und des tert-Butanol-Hydrats beschrieben [145]. Die Ergebnisse der in der Literatur beschriebenen Experimente sind nicht vollständig auf die durchgeführten Versuche dieser Arbeit übertragbar, da die Detektion einiger Feststoffphasen nur mit speziellen Temperaturprogrammen möglich ist, die aber für diese Arbeit nicht zur Verfügung standen. Außerdem enthalten die hier verwendeten Lösungen weitere gelöste Stoffe wie Mannitol und Na-Hyaluronat, daher ist die Ausbildung anderer komplex zusammengesetzter Systeme möglich.

Alle ethanolhaltigen Lösungen zeigten beim Einfrieren zwei exotherme Peaks. Die Temperatur des ersten Peaks liegt ungefähr bei -21 bis -27°C , die des zweiten Peaks bei -48 bis -50°C . Wahrscheinlich ist dies auf ein eutektisches Einfrierverhalten des Lösungsmittelgemischs zurückzuführen. Beim Auftauen gibt es bei -45 bis -40°C einen Glasübergang, der auf amorph eingefrorenem Mannitol beruhen könnte. Ein weiterer endothermer Peak wurde im Bereich von -30 bis -27°C gefunden. Hierbei könnte es sich um ein Nachschmelzen von zuvor noch im Glas fixierter fester Phase handeln. Die Zusammensetzung der

festen Phase ist unbekannt, möglich wäre das Nachschmelzen eines Alkohol-Hydrats.

Die Lösungen mit tert-Butanol zeigen nur einen Einfrierpeak bei -20 bis -26 °C. Beim Auftauen ist bei Temperaturen von -33 bis -31 °C ein Glasübergang erkennbar. Dieser ist vermutlich auf das Erweichen glasartig erstarrten, amorphen Mannitols zurückzuführen. Zwei zusätzliche endotherme Peaks wurden bei -28 bis -23 °C und -12 bis -8 °C detektiert. Wahrscheinlich sind diese auf Schmelzvorgänge zurückzuführen, wobei die Feststoffphasen wieder aus Alkohol-Hydraten bestehen könnten.

Die zum Einfrieren benötigten Temperaturen werden für alle Lösungen mit dem in Abschnitt 3.5.3 beschriebenen Herstellungsverfahren erreicht. Für einen Tropfen einer 5 %-igen Mannitollösung auf einer Trägerfolie wurde beim Einfrieren mit demselben Verfahren nach 5 Minuten eine Temperatur von etwa -90 °C im Tropfen bestimmt. Die Glasübergangstemperaturen der Lösungen mit tert-Butanol sind vergleichbar mit denen mannitolhaltiger wässriger Lösungen, aus denen bereits erfolgreich Trägerlyophilisate hergestellt wurden (siehe auch Abschnitt 4.3.1.2). Die Glasübergangstemperaturen der Lösungen mit Ethanol liegen unter -40 °C. Die Primärtrocknung findet unterhalb dieser Temperaturen bei etwa -45 bis -50 °C statt. Die beiden alkoholhaltigen Lösungen können somit gefriergetrocknet werden.

4.4.2.2 Haft- und Strukturfestigkeit von Lyophilisaten mit Ethanol und tert-Butanol

Die Haftfestigkeit auf der Trägerfolie sowie die Strukturfestigkeit der Lyophilisate wurden aufgrund der geringen hergestellten Menge sensorisch beurteilt. Die in den Abschnitten 3.6.2.6 und 3.6.2.7 beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Haft- und Strukturfestigkeit sind nicht zerstörungsfrei. Zur Prüfung wurden die Lyophilisate zur Beurteilung der Haftfestigkeit mit der Fingerkuppe des Zeigefingers vom Träger abgestreift und zur Einschätzung der Strukturfestigkeit anschließend zwischen Daumen und Zeigefinger zusammengedrückt. Die unten aufgeführten Zusammensetzungen wurden mit OLCS aus 10 %-iger Mannitollösung verglichen und hinsichtlich ihrer Eignung als Trägerlyophilisate zur Anwendung am Auge beurteilt. Dabei sollte eine Zusammensetzung gefunden werden, die später zur Herstellung

latanoprosthaltiger OLCS geeignet ist. Die Kriterien für die sensorische Beurteilung der Haft- und Strukturfestigkeit wurden unterschieden in „sehr gut“, „gut“ und „schlecht“. Trägerlyophilisate, die sich genauso gut abstreifen oder zusammendrücken ließen wie die aus 10 %-iger Mannitollösung wurden dabei als sehr gut bewertet.

| Gerüstbildner und Zusatz | Konz. (m/V) [%] | Lösungsmittel | Anteil (V/V) [%] | Haftfestigkeit | Strukturfestigkeit |
|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| Mannitol | 10,0 | Ethanol | 5,0 | - | - |
| | 20,0 | | 5,0 | + | + |
| | 20,0 | | 10,0 | + / ++, | + |
| Mannitol HA | 10,0 0,1 | | 5,0 | + ¹⁾ | + |
| Mannitol | 10,0 | tert- Butanol | 5,0 | + | + |
| | 10,0 | | 10,0 | + | + |
| | 20,0 | | 10,0 | + ¹⁾ | + |
| Mannitol HA | 20,0 | | 10,0 | + ¹⁾ | + |

Tab. 4-28 Haft- und Strukturfestigkeit von Trägerlyophilisaten mit organischen Lösungsmitteln (n=4)

Bewertungskriterien: sensorisch schlecht – „-“, gut – „+“, sehr gut – „++“ im Vergleich zu OLCS aus 10%-iger Mannitollösung

Bemerkung ¹⁾ „viel Rückstand“ bezieht sich auf den Rückstand auf der Trägerfolie nach dem Abstreifen

Alle Lyophilisate, die aus ethanol- und tert-butanolhaltigen Lösungen hergestellt wurden, waren weniger fest als vergleichbar zusammengesetzte Lyophilisate aus rein wässrigen Lösungen. Eine gute Haftfestigkeit wurde für alle OLCS bis auf die aus 10 %-iger Mannitollösung mit 5 % Ethanolanteil ermittelt. Einige, in der Tabelle mit ¹⁾ gekennzeichnete, Lyophilisate wiesen jedoch nach dem Abstreifen eine große Menge Rückstand auf der Trägerfolie auf. Die Strukturfestigkeit war für alle Lyophilisate gut, außer für die Zusammensetzung mit Mannitol 10 % und Ethanol 5%.

Zur Herstellung latanoprosthaltiger OLCS wurden daher die Lyophilisate mit 20 % Mannitolanteil und einem 10 %-igen Zusatz von Ethanol als Cosolvens ausgewählt. Für die Entscheidung wurde berücksichtigt, dass sich Ethanol

einfacher als tert-Butanol verarbeiten lässt, da tert-Butanol unterhalb von 24 °C erstarrt.

4.4.3 Charakterisierung von wirkstofffreien Lyophilisaten

4.4.3.1 Restfeuchte

Der Restwassergehalt ist für Lyophilisate ein wichtiges Qualitätsmerkmal. Um die Stabilität während der Lagerung zu gewährleisten, sollen die Vermehrung von Mikroorganismen und chemische Reaktionen während der Lagerung durch einen geringen Wasseranteil verhindert werden. Der Anteil des Restwassers wird hauptsächlich durch die Dauer der Sekundärtrocknung bestimmt. Mit dem verwendeten Gefriertrockner (siehe Abschnitt 3.5.3) war eine genaue Bestimmung dieser Dauer nicht möglich, sie wird auf 10 bis 12 Stunden geschätzt.

Die Restfeuchte der Trägerlyophilisate wurde thermogravimetrisch bestimmt. Um eine Zersetzung der Substanzen während der Messung auszuschließen, wurde zunächst die Zersetzungstemperatur der Einzelsubstanzen bestimmt. Bis auf Na-Hyaluronat (253°C) zersetzten sich alle Ausgangssubstanzen oberhalb von 280°C. Die ermittelten Restwassergehalte der Trägerlyophilisate sind in Tabelle 4-29 zusammengefasst.

| Mannitol-konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] | Restfeuchte [%] |
|--------------------------|----------|-----------------|-----------------|
| 5,0 | kein | - | 0,8 ± 0,1 |
| | HA | 0,10 | 1,1 ± 0,2 |
| | Pluronic | 0,10 | 0,5 ± 0,2 |
| | HP-β-CD | 0,25 | 0,9 ± 0,1 |
| 10,0 | kein | - | 0,3 ± 0,1 |
| | HA | 0,10 | 1,3 ± 0,1 |
| | Pluronic | 0,10 | 0,3 ± 0,1 |
| | HP-β-CD | 0,25 | 0,6 ± 0,1 |

Tab. 4-29 Restwassergehalt für Trägerlyophilisate (n=3)

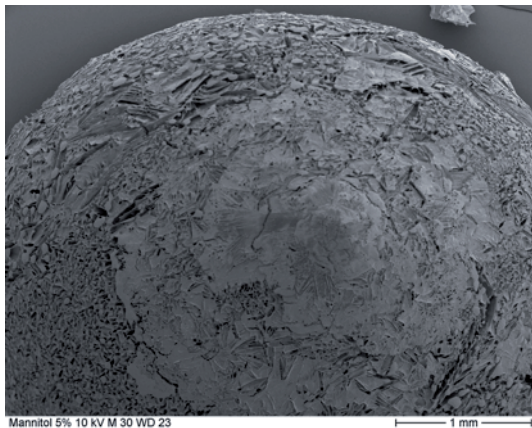
Der Restwassergehalt ist für alle Lyophilisate sehr gering. Für OLCS mit Mannitol und den Zusätzen Pluronic und HP- β -CD betragen die Restfeuchten unter 1%. Die Restfeuchten für hyaluronsäurehaltige Lyophilisate sind mit 1,1 und 1,3% geringfügig höher.

4.4.3.2 Strukturuntersuchungen durch Rasterelektronenmikroskopie

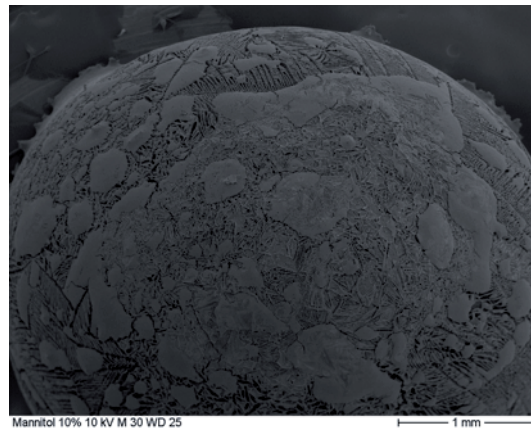
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen geben Aufschluss über die Struktur der Trägerlyophilisate, die von der Art und Menge der eingesetzten Substanzen abhängt. Sie wird auch stark von der Einfriergeschwindigkeit beeinflusst, die jedoch bei der Herstellung aller Lyophilisate gleich war. Eigenschaften wie Strukturfestigkeit, Rekonstitutionszeit oder Wasserdampfaufnahme lassen sich unter anderem auf die Struktur der Lyophilisate zurückführen.

Oberfläche der Lyophilisate

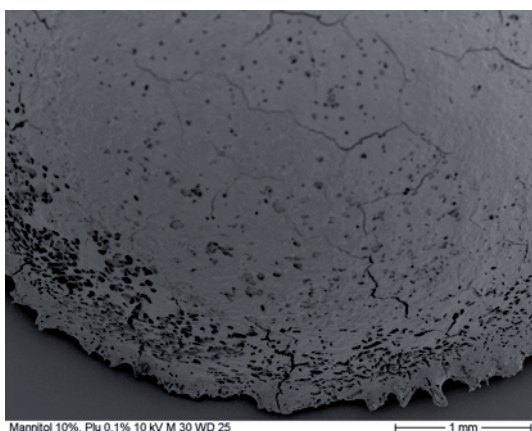
In Abbildung 4-45 sind beispielhaft die Bilder der Oberflächen von vier Lyophilisaten dargestellt.



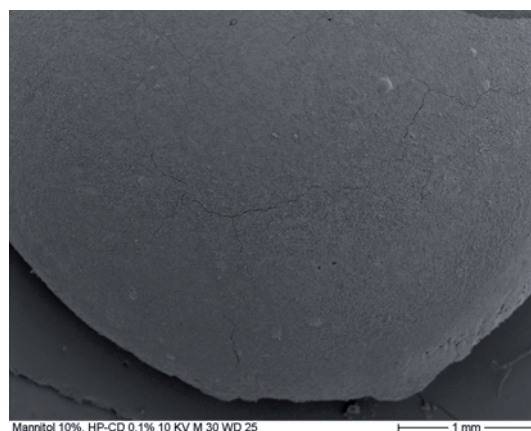
a – Mannitol 5,0 %



b – Mannitol 10,0 %



c – Mannitol 10,0 %, Pluronic 0,1 %



d – Mannitol 10,0 %, HP-β-CD 0,25 %

Abb. 4-45 Oberflächenstruktur von Trägerlyophilisaten (30-fache Vergrößerung)

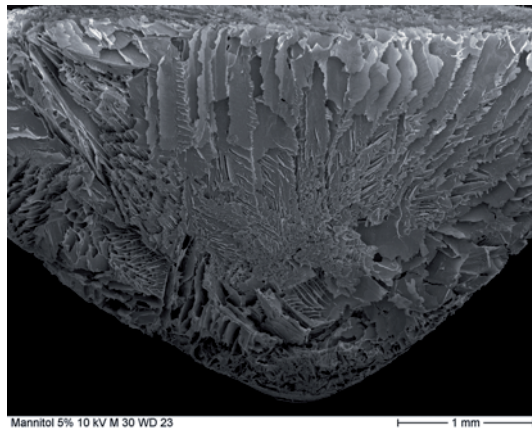
Die Oberflächenstruktur von Trägerlyophilisaten ist abhängig von der Zusammensetzung der Ausgangslösung. Die Oberfläche der OLCS mit 5 % Mannitolanteil erscheint insgesamt poröser als die mit 10 % Mannitolanteil. Die Lyophilisate aus 5 %-iger Mannitollösung erscheinen porös und schuppig. Außerdem ist bei diesen Lyophilisaten auf der Oberseite eine kleine Erhebung zu erkennen. Vermutlich kommt dies durch eine Ungleichverteilung der Temperatur im Tropfen während des Einfriervorgangs zustande, sodass sich der Feststoff in der Mitte aufkonzentriert. OLCS aus 5 %-iger Mannitollösung, denen Hilfsstoffe zugesetzt sind, zeigen diese Erhebung jedoch nicht.

Die Oberfläche der Lyophilisate mit 10,0 % Feststoffanteil besitzt ein unregelmäßiges Erscheinungsbild. Das poröse Lyophilisat ist mit vielen inselartigen Bereichen überzogen, die eine glatte Oberfläche aufweisen.

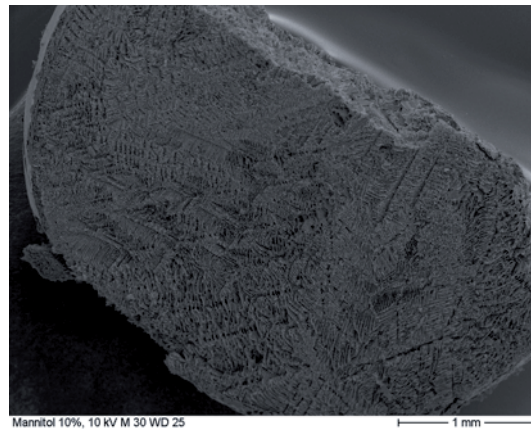
Der Zusatz von Hyaluronsäure hat keinen deutlichen Einfluss auf die äußere Struktur der untersuchten OLCS. Wie bereits erwähnt, fehlt die Erhebung bei den OLCS aus 5 %-iger Mannitollösung. Pluronic und HP- β -Cyclodextrin verursachen dagegen unabhängig vom Mannitolgehalt eine weitgehend geschlossene Oberfläche, die bei pluronichaltigen Rezepturen von vielen Rissen durchzogen ist. Möglich wäre, dass sich die beiden Zusätze beim Einfrieren der Lösung zur Oberfläche des Tropfens hin aufkonzentriert haben. Bei den OLCS mit Pluronic fällt außerdem auf, dass der Rand des Lyophilisats unregelmäßig und ausgefranst aussieht. Dies wurde zum Teil auch bei den anderen beschriebenen Lyophilisaten beobachtet und ist nicht nur auf diese Zusammensetzung beschränkt.

Innere Struktur

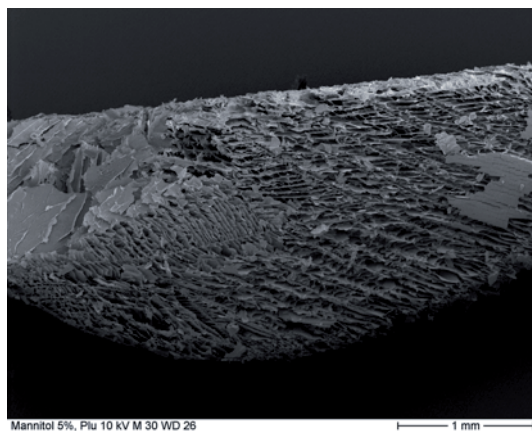
Zur Untersuchung der inneren Struktur wurden Vertikalschnitte der Lyophilisate angefertigt. Dabei kann es vorkommen, dass ein OLCS nicht in zwei gleich große Stücke geteilt wurde, weshalb die Schnitte unterschiedliche Höhen aufweisen können.



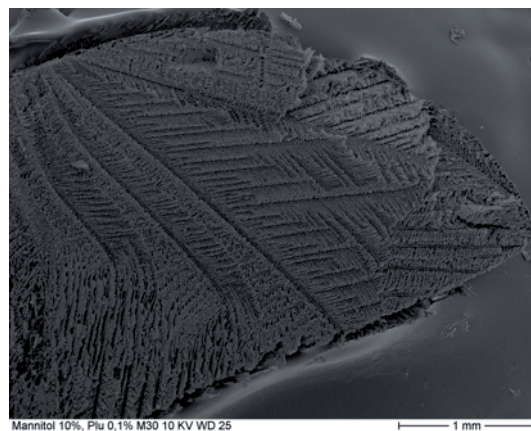
a – Mannitol 5,0 % (PTFE Seite oben)



b – Mannitol 10,0 % (PTFE Seite oben)



c – Mannitol 5,0 %, Pluronic (PTFE Seite oben)



d – Mannitol 10,0 %, Pluronic (PTFE Seite unten)

Abb. 4-46 Innere Struktur von Trägerlyophilisaten (30-fache Vergrößerung)

Die innere Struktur der OLCS hängt, wie bereits bei den Sphärolyophilisaten in Abschnitt 4.3.3.3 beschrieben, hauptsächlich vom Mannitolgehalt ab. Die Struktur besteht aus geordneten Bereichen, die über den Querschnitt in verschiedene Richtungen orientiert sind. Die einzelnen Bereiche bestehen aus dünnen Lamellen, die kanalartige Hohlräume umschließen. Lyophilisate aus 5 %-iger Mannitollösung weisen erwartungsgemäß eine lockere Struktur mit größeren Hohlräumen auf, während OLCS aus 10 %-iger Mannitollösung eine dichte Struktur mit geringeren Abständen zwischen den Feststofflamellen besitzen. Der Zusatz von Hilfsstoffen wirkt sich bei den OLCS aus 5 %-iger Mannitollösung nicht erkennbar auf die Struktur aus, beispielhaft gezeigt für OLCS ohne und mit Pluronic, Abbildung 4-46 c. Bei Lyophilisaten aus 10,0 %-iger Mannitollösung sind bei Zugabe von Hyaluronsäure, Pluronic und HP- β -CD die geordneten Bereiche etwas stärker ausgeprägt. Beispielhaft sind wieder

Lyophilisate ohne und mit dem Zusatz Pluronic, Abbildung 4-46 b und d, dargestellt.

4.4.3.3 Rekonstitutionszeit

Die Rekonstitutionszeit ist die Zeitdauer, in der sich die Lyophilisate ohne erkennbaren Rückstand aufgelöst haben. Die Rekonstitution von Lyophilisaten erfolgt im Allgemeinen aufgrund ihrer porösen Struktur sehr schnell.

| Mannitol- konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] | Rekonstitutionszeit | |
|------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----|
| | | | [s] | |
| 5,0 | kein | - | 1 | 1 |
| | HA | 0,10 | < 1 | < 1 |
| | Pluronic | 0,10 | < 1 | < 1 |
| | HP- β -CD | 0,25 | < 1 | < 1 |
| 10,0 | kein | - | 20 | 20 |
| | HA | 0,10 | 45 | 50 |
| | Pluronic | 0,10 | 3 | 3 |
| | HP- β -CD | 0,25 | 11 | 10 |

Tab. 4-30 Rekonstitutionszeit für Trägerlyophilisate

Alle Trägerlyophilisate lösen sich schnell auf. Dabei wurden für alle Lyophilisate aus 5 %-iger Mannitollösung Rekonstitutionszeiten von höchstens einer Sekunde ermittelt.

Die Zubereitungen aus 10,0 %-iger Mannitollösung benötigten etwas mehr Zeit. Am schnellsten, nach 3 Sekunden, lösten sich die Lyophilisate mit Pluronic. Auch die Lyophilisate, die HP- β -CD enthalten, lösten sich mit etwa 10 Sekunden recht schnell auf. Ein Grund dafür könnte die verbesserte Benetzbarkeit durch die enthaltenen oberflächenaktiven Substanzen sein. Eine Rekonstitutionszeit von 20 Sekunden wurde für die OLCS ohne Zusatz beobachtet. Lyophilisate mit dem Zusatz Natriumhyaluronat benötigten fast eine Minute für die Auflösung. Eventuell ist dies auf die Ausbildung eines Hyaluronsäure-Gels zurückzuführen, jedoch wurde dieser Effekt für die gering konzentrierten OLCS nicht beobachtet.

4.4.3.4 Wasserdampfaufnahme

Die Wasserdampfaufnahme der Lyophilisate wurde bei Luftfeuchten von 0 bis 98 % und isotherm bei 25 °C durch dynamische Wasserdampfsorption untersucht. So können Hinweise hinsichtlich der Verpackung und Lagerung der Lyophilisate gewonnen werden. Aufgrund der hochporösen Struktur und des hydrophilen Charakters der eingesetzten Gerüstbildner und Zusatzstoffe wurde vermutet, dass die Wasseraufnahme der gefriergetrockneten Zubereitungen schon bei geringen Feuchtigkeitsgehalten gut ausgeprägt ist.

In den Abbildungen 4-47 und 4-48 ist die Wasseraufnahme in Abhängigkeit der relativen Feuchte für die niedrig- und hochkonzentrierte OLCS dargestellt.

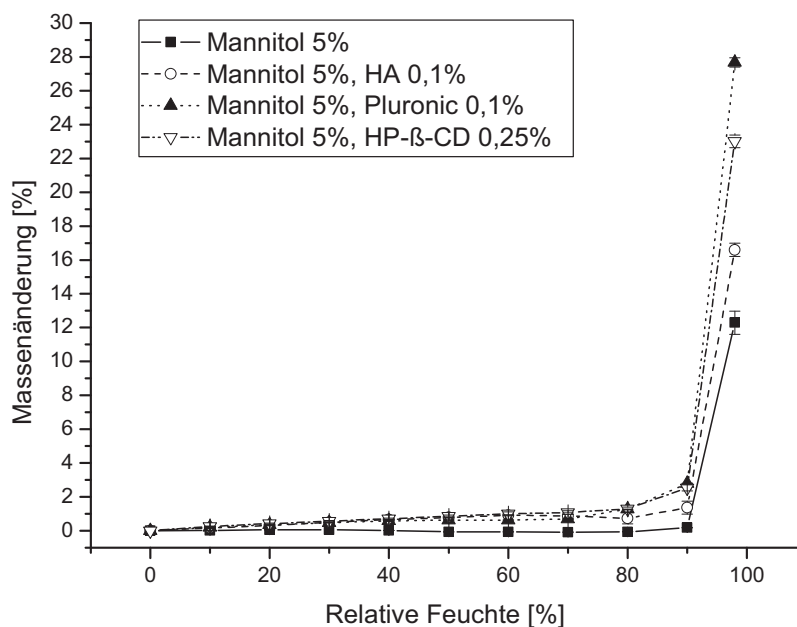


Abb. 4-47 Wasseraufnahme für Trägerlyophilisate mit 5,0 % Mannitolanteil (n=2, 25 °C)

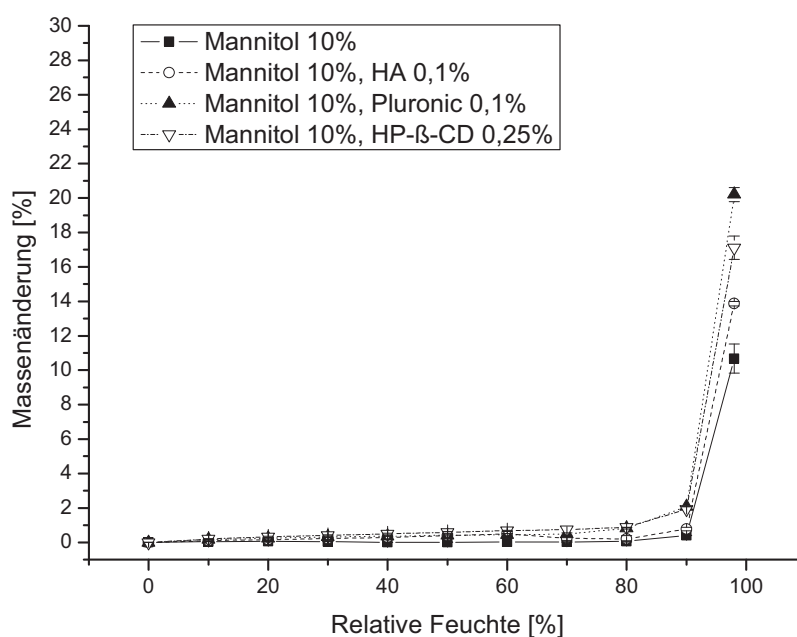


Abb. 4-48 Wasseraufnahme für Trägerlyophilisate mit 10,0 % Mannitolanteil (n=2, 25 °C)

Die prozentuale Wasseraufnahme ist abhängig von der Zusammensetzung der Lyophilisate. Der Verlauf der Wasseraufnahme ist für alle Lyophilisate ähnlich. Bis zu einer relativen Feuchte von 90 % steigt der Wassergehalt für alle Zubereitungen nicht über 3 % an. Erst ab einer relativen Feuchte von 90 % wird ein sprunghafter Anstieg des Wassergehalts verzeichnet.

Lyophilisate mit 5 % Mannitolanteil können abhängig von ihrer Zusammensetzung insgesamt mehr Wasser oberflächlich binden als die mit 10 % Mannitolanteil. Alle Zusätze begünstigen die Wasseraufnahme bei beiden Mannitolkonzentrationen in der gleichen Rangfolge. Dabei hat Pluronic den größten Einfluss auf die Gesamtwasseraufnahme, die bei Lyophilisaten aus 5 %-iger Mannitollösung auf ca. 28 % und bei Lyophilisaten aus 10 %-iger Mannitollösung auf ca. 20 % steigt. Den zweitgrößten Wassergehalt bei 98 % relativer Feuchte weisen die OLCS mit HP-β-CD auf, gefolgt von denen mit Natriumhyaluronat. Trägerlyophilisate ohne Zusatz zeigen mit Werten von 12 und 11 % die geringste Wasseraufnahme bei maximaler relativer Feuchte.

Im Vergleich dazu wird in Abbildung 4-49 die Wasseraufnahme der einzelnen Substanzen in Form der eingesetzten Pulver gezeigt.

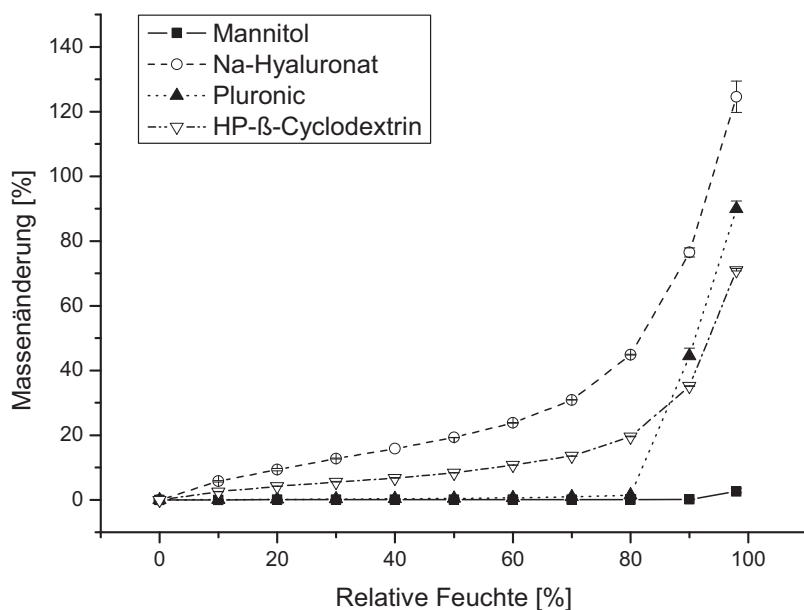


Abb. 4-49 Wasseraufnahme der verwendeten Ausgangssubstanzen (n=2, 25 °C)

Das für die Herstellung verwendete Mannitolpulver besitzt gegenüber den Lyophilisaten ein deutlich geringeres Aufnahmevermögen für Wasser, wobei der Verlauf der Aufnahme gleich ist. Insgesamt kann Mannitol nur 2 bis 3 % Wasser aufnehmen. Die Zusätze nehmen jedoch insgesamt wesentlich mehr Wasser auf. Dabei steigt die Wasseraufnahme der Ausgangssubstanzen Natriumhyaluronat und HP-β-CD von 0 bis 98 % Feuchte stetig. Erwartungsgemäß ist die Wasserdampfsorption bei Natriumhyaluronat insgesamt am stärksten. Der Wert für die Gesamtwasseraufnahme beträgt hier etwa 125 %. Für HP-β-CD beträgt dieser Wert etwa 71 %. Der Zusatzstoff Pluronic nimmt bis zu einer relativen Feuchte von 80 % kaum Wasser auf, von 80 bis 98 % steigt die Aufnahme jedoch sprunghaft auf Werte von etwa 90 % an.

4.4.3.5 Dichte

Die Dichte der Trägerlyophilisate wurde wie in Abschnitt 3.6.2.5 beschrieben aus ihrer Masse und dem Tropfenvolumen berechnet. Die ermittelte Dichte der OLCS ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

| Mannitol-konz. (m/V) [%] | Zusatz | Konz. (m/V) [%] | Dichte [mg/cm ³] |
|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| 5,0 | kein | - | 42 |
| | HA | 0,10 | 47 |
| | Pluronic | 0,10 | 49 |
| | HP- β -CD | 0,25 | 49 |
| 10,0 | kein | - | 86 |
| | HA | 0,10 | 91 |
| | Pluronic | 0,10 | 91 |
| | HP- β -CD | 0,25 | 89 |

Tab. 4-31 Dichte von Trägerlyophilisaten mit Mannitol (n=3)

Die Dichte der Lyophilisate ist aufgrund der hohen Porosität gering. Erwartungsgemäß wiesen OLCS mit 5 % Feststoffgehalt eine etwa halb so niedrige Dichte wie OLCS mit 10 % Feststoffanteil auf.

4.4.3.6 Haftfestigkeit

Unter der Haftfestigkeit von Trägerlyophilisaten versteht man die Kraft, die benötigt wird, um das Lyophilisat von der Trägerfolie abzustreifen. Bei der Bestimmung der Haftfestigkeit wird die Trägefolie in eine Klemmvorrichtung eingespannt und die Gewichtskraft ermittelt, die zum Abstreifen des Lyophilisats nötig ist, siehe Abschnitt 3.6.2.6. Die Haftfestigkeit ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal von OLCS, denn die Lyophilisate sollen sich zum einen bei der Applikation leicht von der Trägerfolie ablösen und zum anderen fest genug haften, um durch Lagerung und Transport nicht beschädigt zu werden. Untersuchungen von Weichselbaum zeigten, dass die Haftfestigkeit für OLCS zwischen 20 und 200 mN betragen sollte, da sich zu gering haftende Lyophilisate während des Transports vom Träger ablösen und zu stark haftende nicht mehr problemlos am Auge abstreifbar sind [151]. Untersuchungen von Maier zufolge muss ein geeignetes Verhältnis von Haft- und Strukturfestigkeit gefunden werden, um eine gute und vollständige Applizierbarkeit am Auge zu gewährleisten [88].

Die Ergebnisse der Haftfestigkeitsuntersuchungen sind in den Abbildungen 4-50 und 4-51 dargestellt.

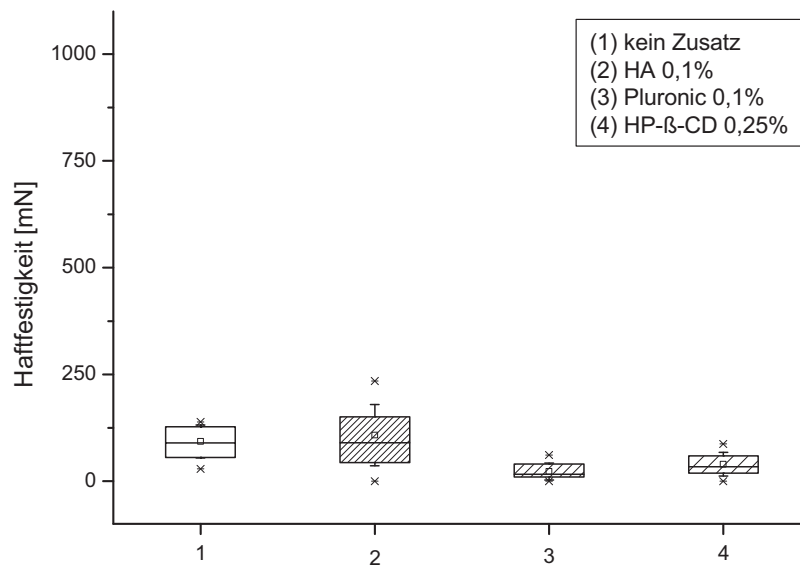


Abb. 4-50 Haftfestigkeit der Trägerlyophilisate mit 5 % Mannitolanteil (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=10, Box: 25 bis 75 Perzentil, Whisker: Std.Abw., x - Spannweite)

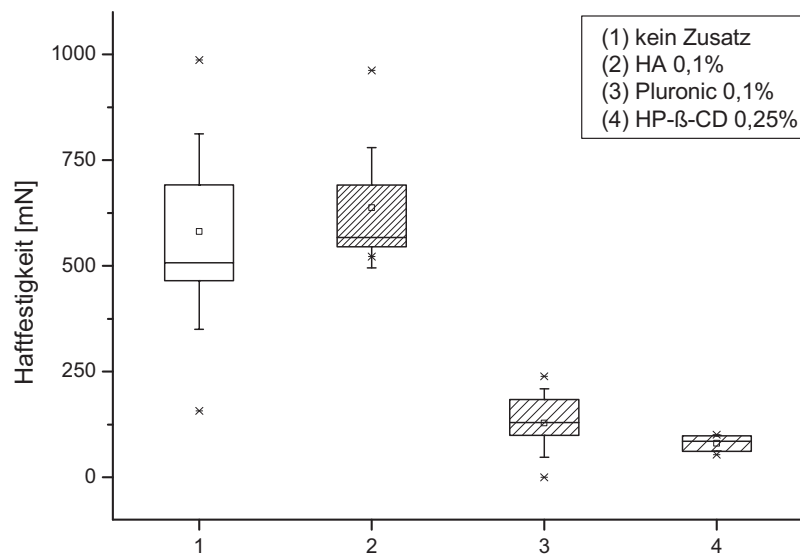


Abb. 4-51 Haftfestigkeit der Trägerlyophilisate mit 10 % Mannitolanteil (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=10, Box: 25 bis 75 Perzentil, Whisker: Std.Abw., x - Spannweite)

Die Haftfestigkeit ist hauptsächlich abhängig von der Zusammensetzung der Lyophilisate. Maier und Krasichkova haben festgestellt, dass auch die

Einfrierbedingungen und die Vorbehandlung der Trägerfolie die Haftfestigkeit beeinflussen [74,88]. Diese Bedingungen wurden hier jedoch konstant gehalten. Lyophilisate aus 5 %-iger Mannitollösung haften insgesamt weniger stark als die aus 10%-iger Mannitollösung. Dabei werden für OLCS mit 5 % Mannitolanteil ohne Zusatz und mit Natriumhyaluronat im Mittel Haftfestigkeiten von 93 bzw. 108 mN ermittelt. Im Gegensatz dazu wird die Haftfestigkeit durch Zusatz von Pluronic und HP- β -CD stärker herabgesetzt. Hier betragen die mittleren Festigkeiten jeweils 22 und 40 mN. Trägerlyophilisate aus 10 %-iger Mannitollösung ohne Zusatz weisen mittlere Haftfestigkeiten von 581 mN auf, die Einzelwerte streuen jedoch sehr stark. Für OLCS mit Natriumhyaluronat werden ebenfalls hohe Haftfestigkeiten mit einem Mittelwert von 637 mN ermittelt. Auch hier wird eine große Streuung der Messwerte verzeichnet. Die Zubereitungen mit Pluronic und HP- β -CD weisen wesentlich niedrigere Werte auf. Für Zubereitungen mit Pluronic wurde eine mittlere Haftfestigkeit von 128 mN bestimmt. Am niedrigsten sind die Werte für die Zusammensetzungen mit HP- β -CD mit einer mittleren Haftfestigkeit von 81 mN.

4.4.3.7 Strukturfestigkeit

Die Strukturfestigkeit ist ein Maß für die Stabilität der Lyophilisate gegenüber einer Krafteinwirkung in vertikaler Richtung. Dabei ist die Festigkeit gefriergetrockneter Zubereitungen abhängig von Art und Zusammensetzung des Lyophilisats [28]. Die Festigkeit nimmt mit zunehmendem Feststoffanteil zu. Das Gerüst von Trägerlyophilisaten sollte hinreichend stabil sein um einen Tropfen auszubilden, dessen Form auch während der Lagerung und des Transports beibehalten wird. Es sollte aber auch leicht verformbar sein, um eine reizfreie Applikation am Auge zu ermöglichen. Die zur Applikation benötigte Strukturfestigkeit wurde bisher nicht quantifiziert. Untersuchungen von Maier ergaben, dass bei geringer Haftfestigkeit die Strukturfestigkeit ebenfalls geringer sein kann, um das Lyophilisat am Auge zu applizieren [88].

Die Strukturfestigkeit der Lyophilisate wurde mit einem Texture Analyzer, siehe Abschnitt 3.6.2.7, bestimmt. Dabei wurden die einzelnen Lyophilisate zusammengedrückt und mit einer Kraftmesszelle die auftretende Kraft sowie der zurückgelegte Weg aufgezeichnet. Als Strukturfestigkeit wird die Energie

bezeichnet, die zum Komprimieren eines Lyophilisats bis auf eine Höhe von 1 mm benötigt wird.

In den Abbildungen 4-52 und 4-53 sind die Strukturfestigkeiten für die untersuchten Zubereitungen aufgeführt.

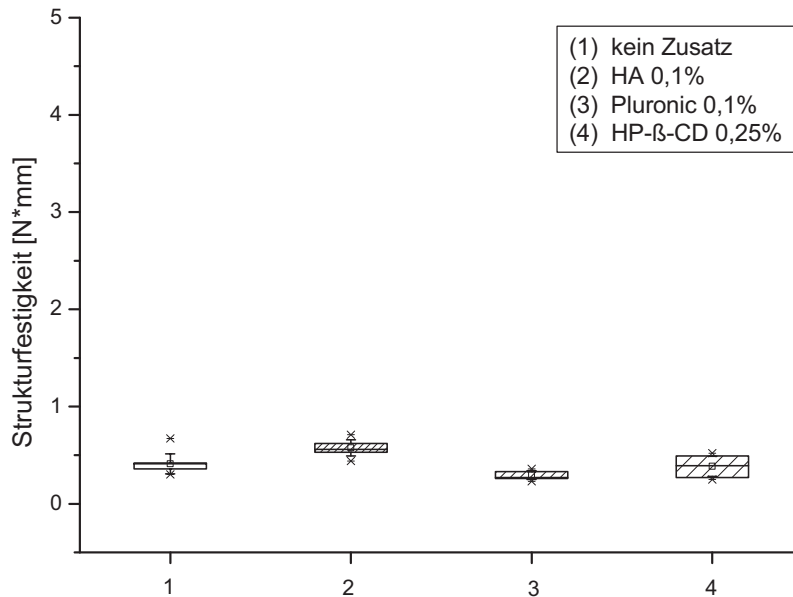


Abb. 4-52 Strukturfestigkeit der Trägerlyophilisate mit 5 % Mannitolanteil (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=10, Box: 25 bis 75 Perzentil, Whisker: Std.Abw., x - Spannweite)

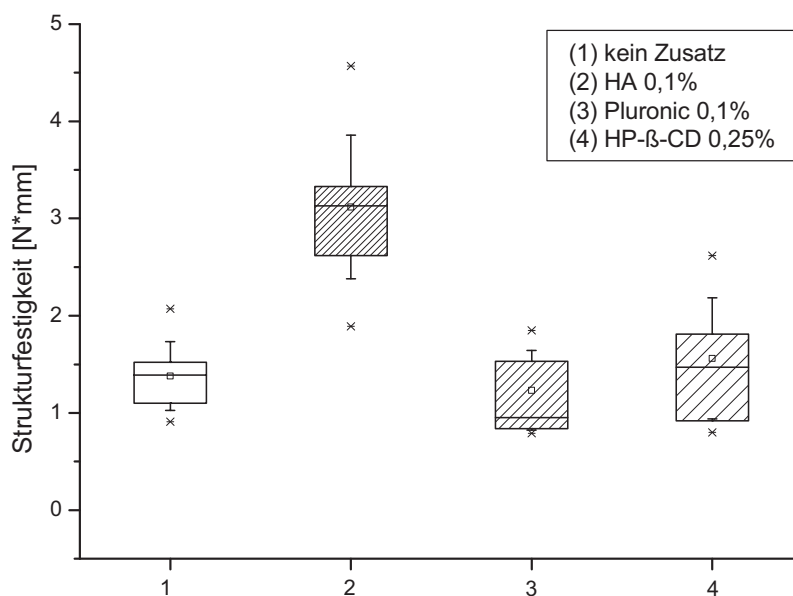


Abb. 4-53 Strukturfestigkeit der Trägerlyophilisate mit 10 % Mannitolanteil (HA – Hyaluronsäure-Natrium, n=10, Box: 25 bis 75 Perzentil, Whisker: Std.Abw., x - Spannweite)

Die Strukturfestigkeit ist hauptsächlich abhängig vom Mannitolgehalt der Lyophilisate. Für alle Lyophilisate aus 5 %-iger Mannitollösung wurden erwartungsgemäß niedrigere Strukturfestigkeiten als für Lyophilisate aus 10 %-iger Mannitollösung erhalten. Insgesamt unterscheiden sich die Festigkeiten der verschiedenen Zusammensetzungen nicht deutlich. Für Zubereitungen ohne Zusatz wurde eine mittlere Strukturfestigkeit von 0,41 Nmm, für die mit Natriumhyaluronat von 0,58 Nmm, für die mit Pluronic von 0,30 Nmm und für die mit HP- β -CD von 0,39 Nmm bestimmt. Der Zusatz von Natriumhyaluronat erhöht die Strukturfestigkeit der Lyophilisate, während der Zusatz von Pluronic die Strukturfestigkeit senkt. HP- β -CD hat keinen deutlichen Einfluss auf die Festigkeit der OLCS.

Für die Lyophilisate aus 10 %-iger Mannitollösung wurden insgesamt höhere Strukturfestigkeiten ermittelt. Die Werte betragen etwa das Drei- bis Vierfache der Strukturfestigkeit der niedrig konzentrierten Lyophilisate. Der Mittelwert für die Zusammensetzungen ohne Zusatz liegt mit 1,38 Nmm im gleichen Bereich wie für die Lyophilisate mit Pluronic und HP- β -CD, bei denen jeweils Festigkeiten von 1,23 bzw. 1,56 Nmm bestimmt wurden. Die Strukturfestigkeit für Lyophilisate mit Natriumhyaluronat ist dagegen deutlich erhöht, der Mittelwert liegt hier bei 3,12 Nmm. Insgesamt streuen die Einzelwerte stärker als bei den Zubereitungen aus 5 %-iger Mannitollösung. Dies ist besonders bei den Lyophilisaten mit Natriumhyaluronat und HP- β -CD ausgeprägt.

4.4.4 Abschlussbemerkung

Fasst man alle Ergebnisse zusammen, so ergibt sich, dass zur Anwendung am Auge entweder Trägerlyophilisate mit 5 % Mannitol ohne Zusatz oder mit Natriumhyaluronat und Lyophilisate mit 10 % Mannitol mit den Zusätzen Pluronic oder HP- β -CD am besten geeignet sind. Aufgrund der geringen Haftfestigkeitswerte von teilweise unter 20 mN sind die Zubereitungen mit 5 %-igem Mannitolanteil und den Zusätzen Pluronic und HP- β -CD nur bedingt geeignet. Ausschlaggebend für die Bewertung sind dabei die Ergebnisse zur Haft- und Strukturfestigkeit, da sich diese bei verschiedenen Zusammensetzungen deutlich unterscheiden. Die als geeignet bewerteten Zusammensetzungen sind Kandidaten für die spätere Herstellung

wirkstoffhaltiger Trägerlyophilisate, die im Tierversuch Okular verabreicht werden.

4.4.5 Charakterisierung von Lyophilisaten mit Latanoprost

Die Charakterisierung von OLCS mit Latanoprost wurde mit Trägerlyophilisaten gleicher Zusammensetzung durchgeführt.

4.4.5.1 Physikochemische Eigenschaften

Die Untersuchungen der physikochemischen Eigenschaften wirkstoffhaltiger Lyophilisate wurden exemplarisch an Trägerlyophilisaten mit einer nominalen Dosis von 0,75 µg Latanoprost und 5,0 %-iger Mannitollösung, entsprechend 1500 µg Mannitol pro OLCS, durchgeführt. Weil der Anteil des Wirkstoffs in der Ausgangslösung nur 0,0025 % beträgt, kann man davon ausgehen, dass die zuvor ermittelten Eigenschaften für wirkstofffreie Lyophilisate nahezu identisch mit den wirkstoffhaltigen OLCS sind.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Bestimmungen des Restwassergehalts, der Rekonstitutionszeit, der Dichte sowie der Haft- und Strukturfestigkeit zusammengestellt.

| Eigenschaft | n | Ergebnis |
|------------------------------|---|-------------|
| Restwassergehalt [%] | 3 | 0,3 ± 0,0 |
| Rekonstitutionszeit [s] | 2 | < 1 |
| Dichte [mg/cm ³] | 3 | 45 |
| Haftfestigkeit [mN] | 6 | 65 ± 21 |
| Strukturfestigkeit [Nmm] | 5 | 0,22 ± 0,07 |

Tab. 4-32 Physikochemische Eigenschaften von Trägerlyophilisaten mit 0,75 µg Latanoprost und 1500 µg Mannitol (Zusammensetzung der Ausgangslösung: Latanoprost 0,0025 %, Mannitol 5 %)

Die Lyophilisate weisen eine geringe Restfeuchte von 0,3 % auf, und lösen sich in Wasser in weniger als einer Sekunde auf. Sie besitzen aufgrund ihrer hohen Porosität eine geringe Dichte. Für die Haftfestigkeit wurden Werte um 65 mN bestimmt. Sie liegt damit in dem von Weichselbaum empfohlenen Bereich, siehe Abschnitt 4.4.3.6. Die Strukturfestigkeit beträgt im Mittel etwa 0,22 Nmm, die Lyophilisate fühlen sich bei sensorischer Beurteilung weich an und lassen sich leicht zwischen Daumen und Zeigefinger zusammendrücken.

Die mit dynamischer Wasserdampfsorption ermittelte Wasseraufnahme bei relativen Feuchten von 0 bis 98 % ist gesondert in Abbildung 4-54 dargestellt.

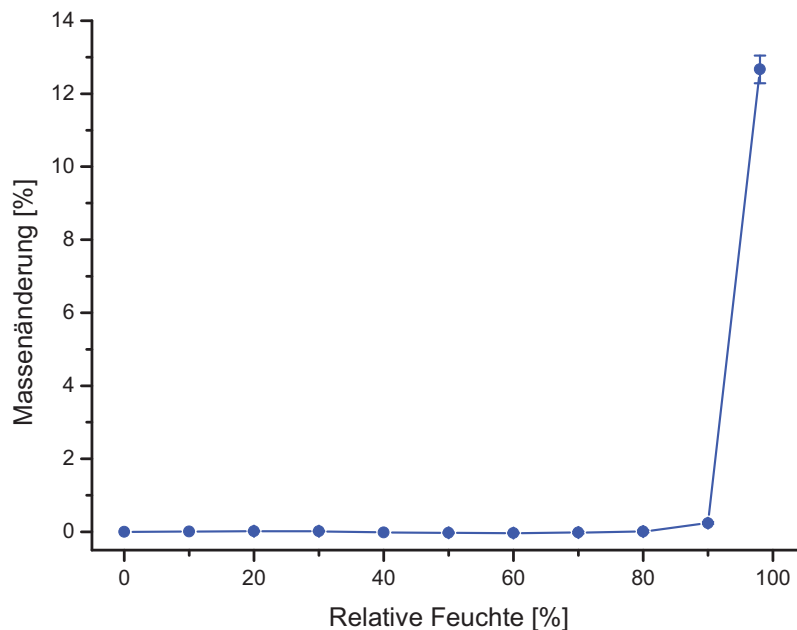


Abb. 4-54 Wasserdampfaufnahme von Trägerlyophilisaten mit 0,75 µg Latanoprost und 1500 µg Mannitol (Zusammensetzung der Ausgangslösung: Latanoprost 0,0025 %, Mannitol 5 %, n=2, 25 °C)

Bis zu einer relativen Feuchte von 90 % nehmen die Lyophilisate weniger als 1 % Wasser auf. Ab 90 % relativer Feuchte steigt die Wasseraufnahme steil bis auf etwa 12 % an.

Wie erwartet, unterscheiden sich die Lyophilisate mit Latanoprost hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht erkennbar von den wirkstofffreien OLCS. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Struktur der Lyophilisate zeigten jedoch geringe Unterschiede zwischen beiden Zusammensetzungen. In Abbildung 4-55 ist die Oberfläche eines Lyophilisats mit Latanoprost und Mannitol zu sehen.

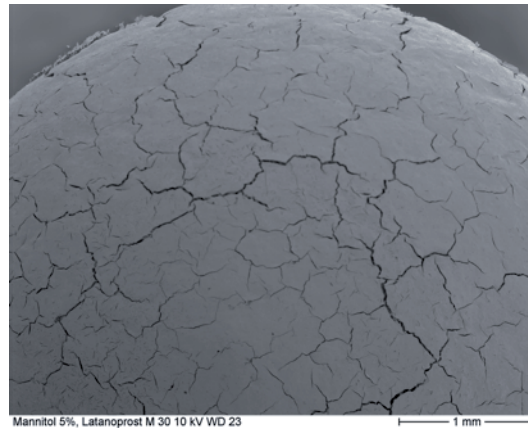
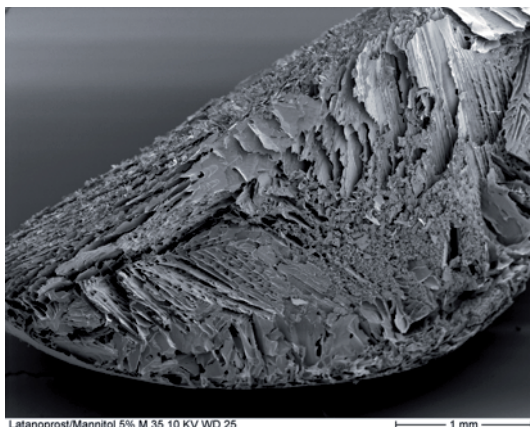


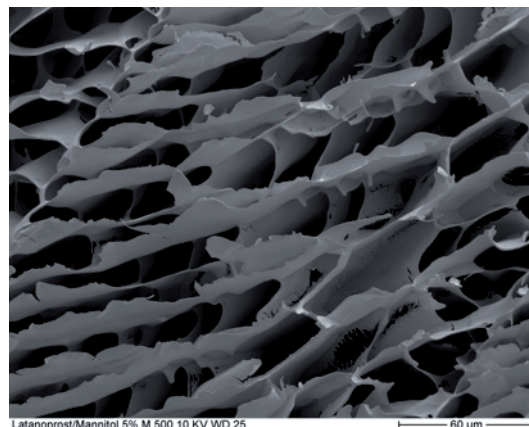
Abb. 4-55 Oberflächenstruktur von Trägerlyophilisaten mit 0,75 µg Latanoprost und 1500 µg Mannitol (Zusammensetzung der Ausgangslösung: Latanoprost 0,0025 %, Mannitol 5 %)

Die Oberseite der OLCS weist eine weitgehend geschlossene Struktur, die von vielen Rissen durchzogen ist, auf. Vergleicht man die Struktur mit den Aufnahmen des wirkstofffreien Lyophilisats, gezeigt in Abbildung 4-45 a, sind einige Unterschiede erkennbar. Die Lyophilisate ohne Latanoprost weisen eine lockere, schuppige Oberfläche mit einer kleinen Erhebung in der Mitte auf. Die Oberflächenstruktur der latanoprosthaltigen Lyophilisate ähnelt eher der Struktur von OLCS mit Pluronic oder HP-β-CD, gezeigt in den Abbildungen 4-45 c und d. Der geringe Latanoprost-Anteil hat demnach einen Einfluss auf das Einfrierverhalten der Lösung. Dieses Phänomen wurde reproduzierbar beobachtet.

In den Abbildungen 4-56 a und b ist die innere Struktur der Lyophilisate zur erkennen.



a - Vertikalschnitt



b – Unterseite

Abb. 4-56 Innere Struktur von Trägerlyophilisaten mit 0,75 µg Latanoprost und 1500 µg Mannitol (Zusammensetzung der Ausgangslösung: Latanoprost 0,0025%, Mannitol 5%)

Im Gegensatz zur Oberfläche, wo Unterschiede erkennbar sind, ist dies bei der inneren Struktur nicht der Fall. Die Lyophilisate besitzen ein poröses Gerüst aus dünnen Lamellen, die in regelmäßiger Struktur angeordnet sind. Dies ist sowohl im Schnitt als auch bei Betrachtung der Unterseite erkennbar. Sie unterscheiden sich damit nicht erkennbar von der Struktur der wirkstofffreien Lyophilisate aus 5 %-iger Mannitollösung.

4.4.5.2 Gleichförmigkeit der Masse

Die Prüfung zur Gleichförmigkeit der Masse wurde nach den Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs durchgeführt [20]. Sie dient zur Sicherstellung der Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen, wobei Lyophilisate zur Anwendung am Auge als innovative Arzneiform nicht in den Monographien des Arzneibuchs enthalten sind. Da die OLCS aus einer echten Lösung hergestellt wurden, in der eine homogene Wirkstoffverteilung vorliegt, kann bei einer gleichförmigen Verteilung der Masse auch auf eine Gleichförmigkeit des Gehalts geschlossen werden.

Die Bestimmung wurde an Lyophilisaten mit nominell 0,75 µg Latanoprost und 1500 µg Mannitol ohne weitere Zusätze durchgeführt. In Abbildung 4-57 sind die Ergebnisse einer Prüfung als Rangfolge der Einzelmassen sowie die prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Einzelmassen aufgetragen. Als Akzeptanzgrenzen wurden entsprechend den Grenzwerten von Pulvern für Augentropfen Abweichungen von 10 % des Mittelwerts zugrunde gelegt.

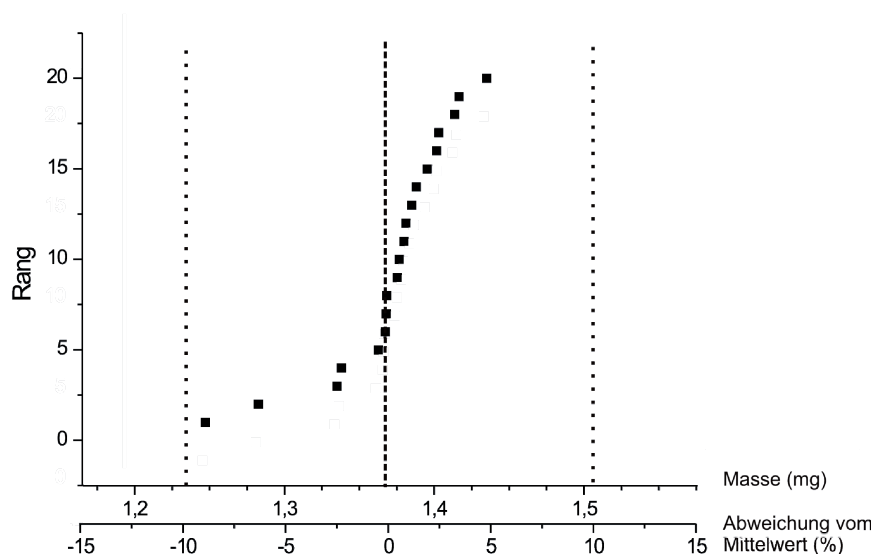


Abb. 4-57 Rangfolge der Einzelmassen der OLCS und Abweichungen vom Mittelwert
(Zusammensetzung: 0,75 µg Latanoprost, 1500 µg Mannitol, mittlere Masse $1,37 \pm 0,04$ mg, $n=20$)

Die Trägerlyophilisate entsprechen der Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse, da die ermittelten Einzelmassen alle innerhalb der Akzeptanzgrenzen liegen.

Die Gleichförmigkeit der Masse wurde an 2 weiteren Chargen bestimmt und entsprach ebenfalls den Arzneibuchanforderungen.

4.4.5.3 Latanoprostgehalt von Trägerlyophilisaten

Enzymimmunoassay

Die Gehaltsbestimmung von Latanoprost wurde mit einem für Latanoprost-Ester und Latanoprost-Säure empfindlichen Enzymimmunoassay durchgeführt, wobei der Enzymimmunoassay wesentlich empfindlicher auf Latanoprost-Säure reagiert. Nebeneinander vorliegende Säure und Ester können daher nicht gemeinsam analysiert werden. Der Enzymimmunoassay ist hochempfindlich. Dabei sind nach der Produktspezifikation für Latanoprost Standardabweichungen unter 20 % im Konzentrationsbereich von 40 bis 2000 pg/mL erreichbar. Zur Untersuchung von Xalatan[®] oder Trägerlyophilisaten wurden die Proben daher 1:2000 verdünnt, um eine Sollkonzentration von 375 pg/mL zu erreichen. Zusätzlich zur Gehaltsbestimmung mit dem Immunoassay wurde durch D. Eßer und M. Kassack (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Düsseldorf) eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Latanoprost entwickelt. Diese wurde im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht

validiert, die Ergebnisse werden aber ergänzend erwähnt, da sie wichtige Hinweise für die Analytik liefern konnten.

Die Gehaltsbestimmung mit dem Enzymimmunoassay erwies sich als schwierig, da die erhaltenen Ergebnisse für dieselben Chargen zwar gleichförmig untereinander, aber bei wiederholter Durchführung nicht reproduzierbar waren und stark von den erwarteten Ergebnissen abwichen. Die im Anschluss gezeigten Ergebnisse sollen deutlich machen, warum die analytischen Bestimmungen später durch ein zertifiziertes Analysenlabor durchgeführt wurden und neben der Untersuchung durch HPLC zusätzlich eine dritte Methode (LC-MS) zur Überprüfung des Gehalts gewählt wurde.

Gehaltsbestimmung von Xalatan[®]-Verdünnungen

Zur Überprüfung des Verfahrens wurden zunächst Proben mit bekannter Latanoprostkonzentration hergestellt und untersucht. Da bereits bei der Herstellung wässriger latanoprosthaltiger Lösungen aus der gelieferten Latanoprost-Lösung in Methylacetat Fehler durch Adsorption des lipophilen Arzneistoffs an den Analysengeräten auftreten können, wurde dazu eine Xalatan[®] - Lösung, deren Konzentration 50 µg/mL beträgt, in unterschiedlichen Verdünnungen untersucht.

| Probe # | n | Konzentration Soll [µg/mL] | MW [µg/mL] | Std.Abw. [µg/mL] | Rel. Std.Abw. [%] | Prozentualer Anteil des Sollgehalts [%] |
|---------|----|----------------------------|------------|------------------|-------------------|---|
| 1 | 6 | 500 | 584 | 61 | 10,3 | 116,8 |
| 2 | 6 | 1000 | 970 | 158 | 16,5 | 97,0 |
| 3 | 6 | 1500 | 1399 | 298 | 21,4 | 93,3 |
| 4 | 5* | 2000 | 1930 | 424 | 21,8 | 96,5 |

Tab. 4-33 Ergebnisse der EIA-Gehaltsbestimmung für Xalatan[®]-Augentropfen

* Verlust einer Probe durch Pipettierfehler

Die ermittelten Werte entsprechen den eingesetzten Xalatan[®]-Konzentrationen und weichen maximal bis zu 17 % vom Sollgehalt ab. Bei hohen Latanoprost-Konzentrationen ist die Streuung größer. Die in den Augentropfen eingesetzten

Hilfsstoffe verursachen den Ergebnissen zufolge vermutlich keine Interferenzen mit dem Immunoassay.

Gehaltsbestimmungen von Trägerlyophilisaten

An zwei Chargen von Trägerlyophilisaten unterschiedlicher Zusammensetzung sowie deren Ausgangslösungen wurden der mittlere Gehalt und die Gleichförmigkeit des Gehalts überprüft. Eine Charge wurde aus einer Lösung mit 10 % Mannitolanteil ohne Zusatz hergestellt, die andere Charge aus 10 %-iger Mannitollösung und einem 0,1 %-igen Zusatz von Pluronic zur Löslichkeitsverbesserung. Die nominelle Latanoprost-Dosis pro Lyophilisat betrug mit 0,75 µg die Hälfte einer üblichen Dosis Xalatan®.

Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung für Trägerlyophilisate und Ausgangslösung sind in Tabelle 4-34 zusammengefasst.

| Probe # | Mannitol | | Mannitol und Pluronic | |
|---|--------------------------|---|--------------------------|---|
| | Konzentration [pg/mL] | Std.Abw. der Einzelproben [pg/mL] | Konzentration [pg/mL] | Std.Abw. der Einzelproben [pg/mL] |
| 1 | 551,4 | 94,3 | 685,2 | 29,8 |
| 2 | 628,4 | 58,0 | 750,9 | 81,8 |
| 3 | 633,8 | 17,3 | 808,4 | 153,9 |
| 4 | 644,1 | 66,5 | 767,0 | 72,6 |
| 5 | 746,9 | 62,8 | 705,8 | 60,7 |
| 6 | 722,1 | 21,4 | 694,4 | 42,0 |
| 7 | 655,6 | 34,7 | 725,8 | 102,9 |
| 8 | 739,1 | 120,6 | 775,0 | 16,1 |
| 9 | 662,3 | 50,0 | 729,8 | 46,3 |
| 10 | 802,9 | 17,5 | 801,5 | 247,7 |
| MW | 678,7 | | 744,4 | |
| Std.Abw. | 73,3 | | 43,3 | |
| Rel. Std.Abw. | 10,8 | | 5,8 | |
| Anteil der Sollkonz. [%] | 181 | | 198 | |
| Ausgangs- lösung | Konzentration [pg/mL] | Std.Abw. der Einzelproben [pg/mL] | Konzentration [pg/mL] | Std.Abw. der Einzelproben [pg/mL] |
| | 828,5 | 88,5 | 706,2 | 82,9 |
| Anteil der Sollkonz. [%] | 221 | | 188 | |

Tab. 4-34 Ergebnisse der EIA-Gehaltsbestimmung, Sollkonzentration: 375 pg/mL,
(Wiederholung: Proben: n=3, Ausgangslösung: n=6)

Das Ergebnis der Gehaltsbestimmung ist fast doppelt so hoch wie erwartet. Die Streuung ist jedoch gering, die Konzentrationen der Lyophilisate liegen alle in einem engen Bereich. Für OLCS mit Zusatz von Pluronic wurden insgesamt ca. 10 % höhere Gehalte als für die Lyophilisate ohne Zusatz gemessen. Verglichen mit den Konzentrationen der Ausgangslösung liegen die ermittelten Werte in derselben Größenordnung. Im Vergleich zur Ausgangslösung ist der Wirkstoffgehalt von Lyophilisaten ohne Tensid etwas geringer. Bei den OLCS mit Pluronic ist der Wirkstoffgehalt mit dem der Ausgangslösung vergleichbar.

Es ist unwahrscheinlich, dass alle OLCS tatsächlich fast den doppelten Gehalt der nominalen Dosis aufweisen. Die Überprüfung der Ausgangslösungen durch HPLC-Analytik zeigte, dass der mittlere Gehalt der Lösungen etwa 85 bis 95 % des erwarteten Sollwerts betrug.

Beim Latanoprost-Immunoassay wird ein zu hoher Gehalt detektiert, wenn wenig gebundener Tracer für die Farbreaktion, deren Intensität gemessen wird, zur Verfügung steht. Ursachen dafür könnten andere Substanzen sein, die diese Bindungsstellen besetzen. Eine mögliche Erklärung für die zu hohen Werte war, dass ein Teil der Latanoprost-Dosis zur freien Säure hydrolysiert wurde, die diese Bindungsstellen besetzen kann und einen zu hohen Gehalt von Latanoprost vortäuscht. Die Ausgangslösungen wurden im Anschluss an den Versuch durch HPLC analysiert, Latanoprost-Säure wurde jedoch nicht detektiert. Außerdem wurden alle Schritte der Durchführung der Analysenmethode überprüft. Die Ursache der zu hohen Latanoprost-Konzentrationen konnte jedoch nicht genau geklärt werden. Vermutlich handelt es sich um einen Artefakt, bei dem der Antikörper durch eine Verunreinigung teilweise blockiert wird und so ein zu hohes Analyseergebnis vorgetäuscht wird.

Die Messung wurde daraufhin mit 10 Lyophilisaten derselben zwei Chargen wiederholt. Die Ergebnisse der Einzelmessungen sind in Tabelle 4-35 aufgelistet.

| Probe # | Mannitol | | Mannitol und Pluronic | |
|-------------------------------------|----------------------------------|---|----------------------------------|---|
| | Konzentration [pg/mL] | Std.Abw. der Einzelproben [pg/mL] | Konzentration [pg/mL] | Std.Abw. der Einzelproben [pg/mL] |
| 1 | 74,7 | 3,9 | 96,9 | 8,9 |
| 2 | 89,4 | 11,4 | 101,1 | 17,5 |
| 3 | 84,6 | 8,2 | 95,1 | 10,4 |
| 4 | 89,9 | 9,4 | 124,5 | 5,7 |
| 5 | 84,2 | 4,5 | 86,9 | 13,1 |
| 6 | 79,6 | 15,0 | 112,5 | 10,6 |
| 7 | 62,8 | 5,1 | 86,5 | 4,9 |
| 8 | 77,7 | 15,9 | 112,4 | 22,3 |
| 9 | 84,4 | 4,0 | 101,9 | 4,7 |
| 10 | 96,6 | 1,1 | 97,1 | 5,2 |
| MW | 82,4 | | 101,5 | |
| Std.Abw. | 9,4 | | 12,0 | |
| Rel. Std.Abw. | 11,4 | | 11,8 | |
| Anteil der Sollkonz. [%] | 22 | | 27 | |
| Ausgangs- lösung | Konzentration [pg/mL] | Std.Abw. [pg/mL] | Konzentration [pg/mL] | Std.Abw. [pg/mL] |
| | 91,3 | 10,1 | 104,4 | 4,1 |
| Anteil der Sollkonz. [%] | 24 | | 28 | |

Tab. 4-35 Ergebnisse der EIA-Gehaltsbestimmung, Sollkonzentration: 375 pg/mL,
(Wiederholung: Proben: n=3, Ausgangslösung: n=6)

Der mittlere Gehalt beträgt für die mannitolhaltigen OLCS 22 % und für die Lyophilisate mit Mannitol und Pluronic 27 % der Sollkonzentration. Die Einzelkonzentrationen der Lyophilisate waren gleichförmig verteilt. Die

Sollkonzentrationen der Lyophilisate entsprechen bei beiden Chargen ungefähr denen der Ausgangslösungen.

Die Ergebnisse des ersten Versuchs konnten nicht bestätigt werden. Bezogen auf den Sollgehalt wurden ca. 70 bis 80 % weniger Latanoprost als erwartet analysiert. Auch im Vergleich zu den ermittelten HPLC-Werten (etwa 85 bis 95 % des Sollwerts) ist der Gehalt nach dieser Bestimmung deutlich zu niedrig.

Fazit

Die Ergebnisse dieser Versuche scheinen zu zeigen, dass die Dosis der Lyophilisate innerhalb der untersuchten Gruppen gleichförmig verteilt ist, die mittleren Gehalte weichen aber erheblich von den erwarteten Werten ab. Mögliche Gründe dafür können durch Reinigung nicht auszuschließende Verunreinigungen von Glasgefäßen oder Verunreinigungen im Wasser sein. Ebenfalls denkbare Interferenzen mit dem oberflächenaktiven Zusatz Pluronic treten nach Information des Herstellers bei den eingesetzten Konzentrationen nicht auf.

Die Untersuchungen der Ausgangslösungen durch HPLC ergaben für die mannitolhaltige Lösung Konzentrationen von etwa 85 % und für die Lösung mit Mannitol und Pluronic von etwa 95 % der Sollkonzentration. Der Vergleich der mannitolhaltigen Zubereitung mit der, die zusätzlich Pluronic enthält, zeigt, dass Pluronic vermutlich einen positiven Effekt auf die Löslichkeit von Latanoprost hat.

In den in Abschnitt 4.4.5.3 gezeigten Versuchen mit dem Enzymimmunoassay wurde gezeigt, dass das Verfahren technisch beherrscht wird. Angesichts der Ergebnisse bestanden jedoch Zweifel daran, dass mit den am Institut verfügbaren Mitteln reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden können. Die Proben wurden daher für Untersuchungen an ein zertifiziertes Analysenlabor abgegeben.

4.4.5.4 Zusätzlich durchgeführte Gehaltsbestimmungen

Enzymimmunoassay

Mit dem Enzymimmunoassay wurde der mittlere Gehalt von Trägerlyophilisaten im Analysenlabor der Firma Cayman Chemical untersucht. Eine Übersicht der Zusammensetzungen der OLCS ist in Tabelle 4-36 aufgezeigt.

Bei den Rezepturen 1 bis 3 wurde der Einfluss von Löslichkeitsverbessernden Hilfsstoffen auf den Gesamtgehalt von Latanoprost untersucht. Interferenzen des Assays mit Pluronic oder HP- β -CD treten nach Angaben des Herstellers im angewendeten Konzentrationsbereich nicht auf. Bei den Rezepturen 4 und 5 handelt es sich um Qualitätskontrollproben der im Vorversuch zur Untersuchung der okularen Bioverfügbarkeit verwendeten Zubereitungen, siehe auch Abschnitt 4.4.6.

| Rezeptur # | Latanoprost-Dosis [μ g] | Matrix | Menge [μ g] | Lösungsmittel |
|------------|------------------------------|-----------------|------------------|------------------------------|
| 1 | 0,75 | Mannitol | 6840 | Wasser, Ethanol 5 % (V/V) |
| 2 | 0,75 | Pluronic | 30 | |
| | | Mannitol | 3000 | Wasser |
| 3 | 0,75 | HP- β -CD | 75 | |
| | | Mannitol | 3000 | Wasser |
| 4 | 1,5 | Mannitol | 3000 | Wasser |
| 5 | 1,5 pro 30 μ L | Xalatan | | |

Tab. 4-36 Zusammensetzung der Trägerlyophilisate und Xalatan[®] Augentropfen¹⁾

¹⁾ enthält 0,2 mg/mL Benzalkoniumchlorid, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat x 1 H₂O, Dinatriumhydrogenphosphat

In Tabelle 4-37 sind die mittleren Dosen der Trägerlyophilisate für die einzelnen Rezepturen dargestellt.

| Probe # | Rezepturen | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 1,00 | 1,11 | 0,54 | 1,22 | 1,54 |
| 2 | 0,78 | 1,10 | 0,55 | 1,18 | 1,53 |
| 3 | 1,01 | 1,30 | 0,53 | - | - |
| 4 | 0,69 | 1,25 | 0,73 | - | - |
| MW [µg] | 0,87 | 1,19 | 0,59 | 1,20 | 1,54 |
| Std.Abw. [µg] | 0,16 | 0,10 | 0,10 | - | - |
| Rel. Std.Abw. [%] | 18 | 8 | 17 | - | - |
| Prozentualer Anteil der Dosis [%] | 116 | 159 | 79 | 80 | 103 |

Tab. 4-37 Ergebnisse der EIA-Gehaltsbestimmung für Trägerlyophilisate und Xalatan®-Augentropfen

Bei den Rezepturen 1 bis 3 mit Löslichkeitsverbessernden Hilfsstoffen wurden für die Trägerlyophilisate mit Pluronic und für die mit Ethanol als Cosolvens die besten Ergebnisse erzielt. Für die Zubereitung mit Pluronic werden deutlich höhere Werte als der Sollgehalt bestimmt, für die ethanolhaltigen Zubereitungen ist der ermittelte Wert etwas höher als der Sollgehalt. Mögliche Störkomponenten, die den scheinbaren Gehalt heraufsetzen, können auch bei diesen Versuchen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Für die Qualitätskontrollproben der Zubereitungen für den Vorversuch zur okularen Bioverfügbarkeit wurde für die OLCS ein Gehalt von 80 % der nominellen Dosis und für die Xalatan® Proben der erwartete Gehalt nachgewiesen.

LC-MS

Die LC-MS ist eine sehr empfindliche und spezifische Gehaltsbestimmungsmethode für Latanoprost und Latanoprost-Säure, bei der alle bisher beobachteten Störungen weitgehend ausgeschaltet werden können. Aufgrund des hohen Aufwands wurde sie nur für die im Tierversuch

verwendeten Lyophilisate eingesetzt. Die LC-MS-Analytik wurde vom bioanalytischen Labor der Cayman Chemical Company durchgeführt.

Zur Gehaltsbestimmung wurden 6 Trägerlyophilisate der Charge, die zur Untersuchung der okularen Bioverfügbarkeit eingesetzt wurde, ausgewählt. Die nominelle Dosis Latanoprost für die Trägerlyophilisate betrug 0,75 µg. Sie wurden aus 10 %-iger Mannitollösung mit einem 0,1 %-igen Zusatz Pluronic hergestellt.

Der mit der Methode ermittelte Durchschnittsgehalt und der zugehörige Sollgehalt für jedes Lyophilisat sind in Tabelle 4-38 dargestellt.

| Probe # | Gehalt [µg] | Prozentualer Anteil des Sollgehalts [%] |
|----------------------|--------------|---|
| 1 | 0,65 | 86,7 |
| 2 | 0,54 | 72,0 |
| 3 | 0,58 | 77,3 |
| 4 | 0,57 | 76,0 |
| 5 | 0,56 | 74,7 |
| 6 | 0,87 | 116,0 |
| MW | 0,63 | 83,8 |
| Std.Abw. | 0,12 | |
| Rel. Std.Abw. | 19,05 | |

**Tab. 4-38 Ergebnisse der LC-MS – Gehaltsbestimmung von Trägerlyophilisaten
(Zusammensetzung: 0,75 µg Latanoprost, 3000 µg Mannitol und 30 µg Pluronic)**

Der mittlere Latanoprostgehalt für die untersuchten OLCS beträgt 0,63 µg. Dies entspricht einem Sollgehalt von etwa 84 %. Das Abbauprodukt Latanoprost-Säure wurde in keiner der Proben oberhalb der Nachweisgrenze von 0,02 µg detektiert. Zu bemerken ist, dass 5 Werte für die Gehaltsbestimmung unter dem errechneten Sollwert liegen und nur 1 Wert darüber. Dies könnte auch ein Ausreißer sein, eine Bestimmung mit einer größeren Probenanzahl würde mehr Sicherheit hinsichtlich der Bewertung der Daten liefern.

4.4.6 Untersuchung zur okularen Bioverfügbarkeit

Die hier beschriebenen Versuche sollen zeigen, ob die okulare Bioverfügbarkeit von Latanoprost-Trägerlyophilisaten vergleichbar mit der des Handelsprodukts Xalatan[®] ist. Dazu wurden ein Vorversuch mit zwei Kaninchen und ein Hauptversuch mit zwölf Kaninchen durchgeführt, wobei den Tieren jeweils in ein Auge ein Trägerlyophilisat und in das andere ein Tropfen Xalatan[®] appliziert wurde. Da die meisten Arzneistoffe eine systemische Wirkung entfalten sollen, wird zur Bewertung der Bioverfügbarkeit typischerweise die Konzentrations-Zeit-Kurve im Plasma aufgezeichnet. Die relative Bioverfügbarkeit, die zum Vergleich zweier Präparate ermittelt wird, ist der mit 100 multiplizierte Quotient der Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven von Test- und Referenzzubereitung. Latanoprost wird nach der Verabreichung am humanen sowie am Kaninchenauge durch die Cornea resorbiert und dabei zur Wirkform Latanoprost-Säure hydrolysiert. Diese erreicht nach 1 bis 2 Stunden im Kammerwasser die maximale Konzentration [123,125]. Daher wurden zur Bewertung der okularen Bioverfügbarkeit die Kammerwasserkonzentrationen von Latanoprost-Säure in diesem Zeitraum ermittelt. Die Entnahme von Kammerwasser kann bei einem Tier nur einmalig erfolgen, weshalb die Aufzeichnung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs nicht möglich ist. Verglichen wurden daher die Konzentrationen des Wirkstoffs zu einem Zeitpunkt, bei dem annähernd die maximale Wirkstoffkonzentration erwartet wurde. Dieser Zeitpunkt hängt wiederum von der individuellen Resorption des jeweiligen Präparats durch die Cornea ab.

Vorversuch zur okularen Bioverfügbarkeit

Zunächst wurde ein Vorversuch zur Überprüfung der Arbeitsabläufe und der Gehaltsbestimmung mit dem Enzymimmunoassay durchgeführt. Dabei wurde 2 weiblichen pigmentierten Chinchillakaninchen je ein Trägerlyophilisat oder 1 Tropfen Xalatan[®] verabreicht und nach 70 Minuten Kammerwasserproben entnommen. Zusätzlich wurden 2 Blank-Proben (Kammerwasser ohne Wirkstoff) von 2 weiteren Tieren entnommen.

Die OLCS wurden aus einer 10 %-igen Mannitollösung hergestellt und enthielten eine nominelle Dosis von 1,50 µg Latanoprost. Eine erste Gehaltsbestimmung mit dem Enzymimmunoassay (durch Cayman Chemical)

mit der Verdünnung eines OLCS in wässriger Lösung ergab zunächst eine Dosis von ca. 0,5 µg Latanoprost in den Lyophilisaten. HPLC-Untersuchungen zeigten dagegen einen höheren Gehalt von etwa 0,8 µg. Der Wirkstoffgehalt von weiteren OLCS-Mustern und den Proben aus den Tierversuchen wurde durch das zertifizierte Analysenlabor der Cayman Chemical Company bestimmt. Die Lyophilisate wurden jedoch nicht als verdünnte Lösung zur Analyse abgegeben, um mögliche Effekte wie die Adsorption am Probengefäß oder den Abbau des Wirkstoffs durch wässrige Hydrolyse zu vermeiden, sondern vollständig zur Bestimmung eingereicht. Die applizierte Dosis wurde mit dem Enzymimmunoassay zu einem späteren Zeitpunkt bestimmt, siehe Abschnitt 4.4.5.4, und betrug für die OLCS 1,2 µg und für Xalatan 1,5 µg.

In Tabelle 4-39 sind die gemessenen Kammerwasserkonzentrationen, die Konzentrations-Dosis-Verhältnisse und die okulare Bioverfügbarkeit dargestellt.

| Kaninchen # | C_{OLCS} [ng/mL] | $C_{Xalatan®}$ [ng/mL] | Q_{OLCS} [mL ⁻¹] | $Q_{Xalatan®}$ [mL ⁻¹] | F |
|----------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------|
| 1 | 52,0 ± 2,5 | 54,3 ± 4,5 | 43,3 | 35,3 | 1,229 |
| 2 | 30,0 ± 2,9 | 43,2 ± 2,0 | 25,0 | 28,1 | 0,891 |

Tab. 4-39 Ergebnisse des Vorversuchs zur okularen Bioverfügbarkeit

c – Konzentration, Q - Konzentrations-Dosis-Quotient, F - Bioverfügbarkeit der Kammerwasserproben

Die okulare Bioverfügbarkeit der Trägerlyophilisate ist beim ersten Kaninchen etwas höher und beim zweiten Kaninchen etwas geringer im Vergleich zu Xalatan[®]. Bei den Kammerwasser-Blankproben wurden keine Interferenzen mit dem Immunoassay beobachtet, die das Ergebnis der Gehaltsbestimmung beeinträchtigt hätten.

Hauptversuch zur okularen Bioverfügbarkeit

Im Hauptversuch zur Untersuchung der okularen Bioverfügbarkeit von Latanoprost aus Trägerlyophilisaten wurden 12 Kaninchen je ein Trägerlyophilisat sowie ein Tropfen Xalatan verabreicht und nach 100 Minuten Kammerwasserproben entnommen. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt 3.6.4.1 beschrieben. Als Referenzpräparat dienten Xalatan[®]-Augentropfen mit einer nominellen Dosis von 1,5 µg pro Tropfen (30 µL). Als Testpräparat wurden Lyophilisate aus 10 %-iger Mannitollösung mit einem 0,1 %-igen Zusatz

von Pluronic verwendet, die eine nominelle Dosis von 0,75 µg Latanoprost enthielten.

Die Dosis der Lyophilisate wurde auf 50 % der Dosis von Xalatan[®] festgelegt, weil zum Zeitpunkt der Herstellung der Lyophilisate eine verbesserte Bioverfügbarkeit angenommen wurde. Diese Annahme beruhte zum einen auf den Analysenergebnissen aus dem Vorversuch. Die vom Analysenlabor der Cayman Chemical Company durchgeführten EIA-Gehaltsbestimmungen von wässrigen Lösungen der OLCS (ermittelte Dosis 0,5 µg) und die HPLC-Bestimmungen (ermittelte Dosis 0,8 µg) ergaben für Trägerlyophilisate eine ein Drittel bis halb so große Dosis wie bei Xalatan[®] Augentropfen. Da im Vergleich zur erst später ermittelten applizierten Dosis (1,2 µg) eine niedrigere Dosis angenommen wurde, wurde zu diesem Zeitpunkt eine etwa doppelt so hohe okulare Bioverfügbarkeit angenommen, als sie den korrigierten Berechnungen im Vorversuch zufolge ist. Zum anderen schien eine höhere Verfügbarkeit des Arzneistoffs aufgrund der Untersuchungen an Trägerlyophilisaten mit Fluorescein durchaus plausibel [22]. Nach einer wiederholten Gehaltsbestimmung der verwendeten OLCS wurde diese Annahme korrigiert.

Anhand der in Abschnitt 4.4.5.4 beschriebenen Ergebnisse für die EIA-Gehaltsbestimmung wurde die Rezeptur der Trägerlyophilisate, die im Hauptversuch eingesetzt werden sollten, ausgewählt. Für OLCS mit Pluronic lag der Wirkstoffgehalt nach der Gehaltsbestimmung im Vergleich zu den anderen Rezepturen am höchsten. Bei diesen Versuchen wurde jedoch auch festgestellt, dass die Ergebnisse fragwürdig waren, da der Gehalt größer als der Sollgehalt war. Die Ergebnisse der LC-MS Gehaltsbestimmung standen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung.

Für die Berechnung der okularen Bioverfügbarkeit der OLCS wurde die durch LC-MS (Abschnitt 4.4.5.3) ermittelte mittlere Dosis von 0,63 µg eingesetzt. Die Dosis von Xalatan wurde durch Wägung von 20 Einzeltropfen und Berechnung der Dosis pro Tropfen ermittelt, wobei die vom Hersteller angegebene Konzentration von 0,005 % zugrunde gelegt wurde. Dabei ergab sich eine Tropfenmasse von $30,2 \pm 1,8$ mg, entsprechend einem Gehalt von $1,51 \pm 0,1$ µg Latanoprost pro Tropfen, weshalb für Xalatan[®] eine Dosis von 1,51 µg

eingesetzt wurde. Eine zusätzliche Gehaltsbestimmung der verwendeten Chargen wurde aus Kostengründen nicht durchgeführt.

In Abbildung 4-58 sind die Konzentrations-Dosis-Verhältnisse von Latanoprost-Säure im Kammerwasser für die einzelnen Tiere dargestellt.

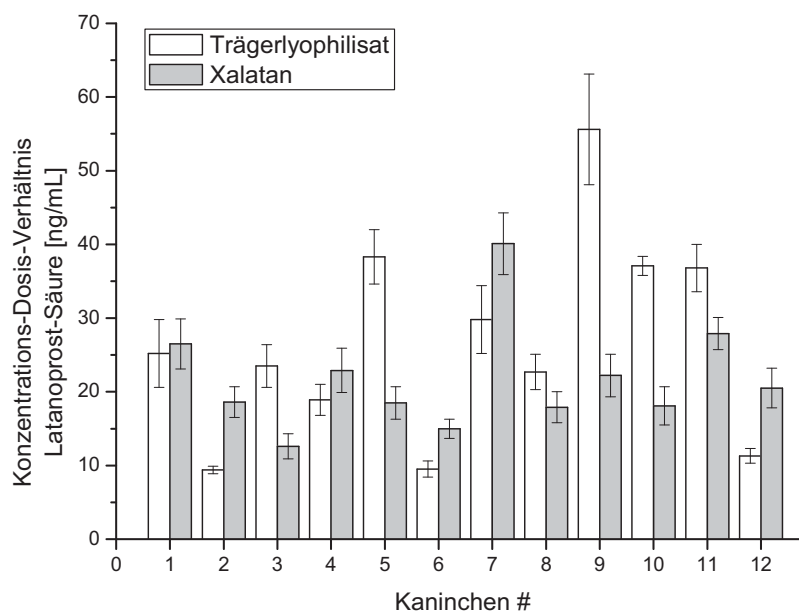


Abb. 4-58 Konzentrations-Dosis-Verhältnis von Latanoprost-Säure im Kammerwasser (n=3)

Die Konzentrations-Dosis-Verhältnisse im Kammerwasser schwanken von 9 bis 56 ng/mL. Die Anzahl der Tiere, bei denen das Testpräparat höhere Konzentrationen als das Referenzpräparat erzielt, beträgt genau die Hälfte der Gesamtzahl.

In Tabelle 4-40 sind die einzelnen Ergebnisse sowie die statistischen Bewertungskriterien für die okuläre Bioverfügbarkeit der beiden Zubereitungen mit Latanoprost dargestellt. Die statistische Auswertung wird in Abschnitt 3.7.2 beschrieben.

| Proben # | C _{OLCS} [ng/mL] | C _{Xalatan®} [ng/mL] | Q _{OLCS} [mL ⁻¹] | Q _{Xalatan®} [mL ⁻¹] | F | log F |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--|--|---------------|----------------|
| 1 | 15,9 | 39,7 | 25,238 | 26,291 | 0,960 | -0,041 |
| 2 | 5,9 | 27,9 | 9,365 | 18,477 | 0,507 | -0,680 |
| 3 | 14,8 | 18,9 | 23,492 | 12,517 | 1,877 | 0,630 |
| 4 | 11,9 | 34,3 | 18,889 | 22,715 | 0,832 | -0,184 |
| 5 | 24,1 | 27,8 | 38,254 | 18,411 | 2,078 | 0,731 |
| 6 | 6 | 22,5 | 9,524 | 14,901 | 0,639 | -0,448 |
| 7 | 18,8 | 60,2 | 29,841 | 39,868 | 0,749 | -0,290 |
| 8 | 14,3 | 26,8 | 22,698 | 17,748 | 1,279 | 0,246 |
| 9 | 35 | 33,3 | 55,556 | 22,053 | 2,519 | 0,924 |
| 10 | 23,4 | 27,1 | 37,143 | 17,947 | 2,070 | 0,727 |
| 11 | 23,2 | 41,8 | 36,825 | 27,682 | 1,330 | 0,285 |
| 12 | 7,1 | 30,7 | 11,270 | 20,331 | 0,554 | -0,590 |
| MW | 16,700 | 32,583 | 26,508 | 21,578 | 1,283 | 0,109 |
| Std.Abw. | 8,726 | 10,882 | 13,851 | 7,206 | 0,693 | 0,559 |
| Rel. Std.Abw. [%] | 52,250 | 33,396 | 52,250 | 33,396 | 53,987 | 511,882 |
| Varianz | 76,140 | 118,411 | 191,837 | 51,932 | 0,480 | 0,313 |

Tab. 4-40 Ergebnisse und statistische Kenngrößen der Untersuchung zur okularen Bioverfügbarkeit

c – Konzentration, Q - Konzentrations-Dosis-Quotient, F - Bioverfügbarkeit der Kammerwasserproben

Das Konzentrations-Dosis-Verhältnis der OLCS ist im Gegensatz zu dem der Referenzzubereitung insgesamt etwa 5 ng/mL höher. Der F-Wert ist größer als eins, dies bedeutet, dass das Testpräparat im Vergleich zum Referenzpräparat eine bessere Bioverfügbarkeit besitzt. Die relativen Standardabweichungen zwischen den einzelnen Proben sind bei beiden Zubereitungen mit Werten von 52 und 33 % sehr hoch. Dies kann auf eine hohe Variabilität der Bioverfügbarkeit zwischen den einzelnen Versuchstieren zurückgeführt werden,

zusätzlich müssen die Streuung der Analysenmethode für alle Proben und die Streuung der verabreichten Einzeldosen berücksichtigt werden.

4.4.6.1 Mittelwertsvergleich (t-Test)

Zum Vergleich der Konzentrations-Dosis-Quotienten des Test- und Referenzpräparats wurde mit den logarithmierten Bioverfügbarkeitsdaten ein t-Test durchgeführt.

| t_{obs} | FG | t_{Tab} | p |
|------------------|----|------------------|--------|
| 0,6749 | 11 | 2,201 | 0,5131 |

Tab. 4-41 Ergebnisse des t-Tests der logarithmierten Bioverfügbarkeitswerte

Für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ist der errechnete t-Wert nicht signifikant vom tabellierten t-Wert verschieden. Daher wird die Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen den beiden Zubereitungen besteht, angenommen.

Bei kleinem Stichprobenumfang und großer Streuung ist die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 2. Art, bei dem die Nullhypothese angenommen wird wenn sie nicht zutrifft, sehr hoch. Da die Werte, wie in Tabelle 4-40 gezeigt, stark streuen, und die Probenzahl gering ist, wurden zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit Konfidenzintervalle für die logarithmierten Mittelwerte von F berechnet.

4.4.6.2 Berechnung des Konfidenzintervalls

Zur Bewertung der Bioverfügbarkeit wurde geprüft, ob das 90 % Konfidenzintervall des Mittelwerts des Bioverfügbarkeitsquotienten F in den Bereich von 80 bis 125 % fällt [8].

Die Grenzen für das ermittelte 90 % Konfidenzintervall für den logarithmierten Mittelwert der Bioverfügbarkeit sind in Tabelle 4-42 dargestellt.

| Untere Grenze | | Obere Grenze | |
|---------------|-----------|--------------|-----------|
| Log x_u | x_u [%] | Log x_o | x_o [%] |
| -0,2465 | 78,2 | 0,4645 | 159,1 |

Tab. 4-42 Untere Grenze x_u und obere Grenze x_o des 90 % Konfidenzintervalls für die logarithmierten Bioverfügbarkeitswerte

Nach Rücktransformation der logarithmischen Werte ergibt sich ein Konfidenzintervall von 78 bis 159 % für die relative Bioverfügbarkeit. Da das Konfidenzintervall nicht vollständig in den Bereich von 80 bis 125 % fällt, wird für die untersuchten Proben keine Bioäquivalenz angenommen.

4.4.6.3 Abschlussbemerkung

Die Vorstudie zur okularen Bioverfügbarkeit gibt Hinweise darauf, dass Latanoprost aus Trägerlyophilisaten am Auge genauso gut oder geringfügig besser verfügbar ist als das Vergleichspräparat Xalatan[®]. Die Berechnungen ergeben für Trägerlyophilisate eine relative Bioverfügbarkeit von ca. 130 %. Der durchgeführte t-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede der beiden Präparate. Die zur Bewertung der Bioäquivalenz übliche Berechnung des 90 % Konfidenzintervalls zeigt, dass die beiden Präparate wahrscheinlich nicht bioäquivalent sind. Eine vollständige Bewertung der Bioverfügbarkeit ist mit der geringen Stichprobenanzahl nicht möglich, da die Streuung der Werte sehr groß ist und das 90 % Konfidenzintervall über den Akzeptanzbereich hinausreicht. Außerdem müssen der Verlauf und das Ausmaß der Resorption berücksichtigt werden, um sicherzustellen, dass die Resorption vollständig ist und die Messungen zum Zeitpunkt des Auftretens der maximalen Konzentration erfolgen. Für eine sichere Bewertung sollte der Versuch mit einer größeren Zahl an Tieren wiederholt werden und Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden.

5 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei verschiedene Arten von Tröpfchenlyophilisaten beschrieben, das sind zum einen Sphärolyophilisate und zum anderen Trägerlyophilisate.

Zur Herstellung von Sphärolyophilisaten wurden verschiedene Techniken entwickelt. Erste Versuche wurden mit dem Verfahren zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchen durch Injektion ins Vakuum durchgeführt. Dieser Ansatz wurde beendet als erkennbar war, dass das Entwicklungsziel beim damaligen Stand der Technik nicht erreicht werden konnte. Zum jetzigen Zeitpunkt stehen Verfahren zur Verfügung, mit denen Tröpfchen ins Vakuum injiziert werden können. Ob diese Verfahren industriell einsetzbar sind und damit Arzneimittel unter GMP-Bedingungen hergestellt werden können ist fraglich.

In weiteren Versuchen wurden Tröpfchen in Kaltluft injiziert und anschließend im Vakuum gefriergetrocknet. Mit Hilfe einer piezoelektrischen Düse wurden monodisperse Tröpfchen durch Rayleigh-Zerfall eines Flüssigkeitsstrahls erzeugt. Wegen der hohen Anfangsgeschwindigkeit werden die Tröpfchen in Luft abgebremst, kollidieren und vereinigen sich. Die entstehenden Tröpfchen besitzen eine heterodisperse Größenverteilung und ihr mittlerer Durchmesser ist größer.

Als drittes Verfahren wurde das Einfrieren von Tröpfchen im Kaltluftstrom und atmosphärische Gefrier Trocknung der gefrorenen Partikel in einem geschlossenen Gaskreislauf (Atmospheric Counter-Current Lyophilization, ACD-Lyophilization) getestet. Ein Prototyp der Anlage wurde gebaut, gezeigt in Abbildung 5-1. Im Einfrierteil und im Hauptkondensator wurden Temperaturprofile gemessen und an ausgewählten Stellen wurden ebenfalls Temperaturmessungen durchgeführt. Die Strömungsgeschwindigkeit des Arbeitsgases wurde unter verschiedenen Bedingungen ebenfalls an ausgewählten Stellen bestimmt. Die Arbeiten wurden eingestellt als erkennbar wurde, dass Zeit und Ressourcen für einen Abschluss mit rein experimentellen Mitteln nicht ausreichen. Die Entwicklung eines mathematischen gasdynamischen Modells als Grundlage für die Weiterentwicklung dieser

Technik wurde auf ein nachfolgendes Kooperationsprojekt in Zusammenarbeit mit einer Arbeitsgruppe für Verfahrenstechnik verschoben.

Auf der Grundlage der gesammelten Erfahrungen wurden Rezepturen für wirkstoffhaltige gefriergetrocknete Tröpfchen mit Latanoprost in Form von Trägerlyophilisaten für die Augenheilkunde entwickelt und hergestellt. Sie wurden hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften charakterisiert und im Tierversuch an Kaninchen im Vergleich zum Handelspräparat auf ihre Bioverfügbarkeit untersucht.



Abb. 5-1 Versuchsanlage zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung (Atmospheric Counter-Current Lyophilization, ACD-Lyophilization)

5.1 Sphärolyophilisate

5.1.1 Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von Sphärolyophilisaten

Sphärolyophilisate sollten zunächst durch das Verfahren zum Einfrieren und Trocknen von Tröpfchen im Vakuum hergestellt werden (Prototyp I). Diese Technik wurde in den Arbeiten von Maier und Krasichkova zur Herstellung von Trägerlyophilisaten entwickelt und ist grundsätzlich sehr gut zum Einfrieren kleiner Flüssigkeitsmengen geeignet [74,88]. Das Versprühen kleiner Flüssigkeitsmengen ins Vakuum ist bereits einigen Forschungsgruppen gelungen. DePonte et al. stellten eine Düse zur Injektion von Tröpfchen ins Vakuum vor, bei der der Tropfenstrahl zur Reduktion der Tropfengröße auf den Düsendurchmesser von einem gleichgerichteten Gasstrom umgeben ist [44]. Weierstall et al. gelang die Injektion von Tropfenstrahlen ins Ultrahochvakuum. Dabei wurden Tropfengrößen bis hinab zu Durchmessern um 1 μm erreicht, die für die pulmonale Applikation von Arzneistoffen interessant sind. Ziel dieser Untersuchungen war die Aufklärung der Konformation von schwer kristallisierbaren hydratisierten Proteinen durch Röntgenbeugung. Dafür wurden nur geringe Probenvolumina benötigt [152]. Ob die Methoden für die Produktion größerer Lyophilisatmengen in einem kontinuierlichen Prozess geeignet sind, erscheint zweifelhaft.

Bei der Herstellung von Sphärolyophilisaten durch Einfrieren im Vakuum gefror die Lösung bereits an der Austrittsöffnung der Sprühdüse. Auch wenn man das Problem des Einfrierens der Düse in den Griff bekommen könnte, werden weitere Probleme bei dieser Technik erwartet. Zum einen reicht die Falldauer der Tröpfchen im Vakuum nicht aus, um sie vollständig zu trocknen. Zum anderen ist die Kühlfläche des Kondensators nicht groß genug, um dauerhaft einen gleich bleibenden Unterdruck aufrecht zu erhalten. Aufgrund der großen Schwierigkeiten wurde diese Herstellungstechnik nicht weiter verfolgt.

Das darauf folgend entwickelte Verfahren zum Einfrieren von Tröpfchen unter Atmosphärendruck (Prototypen IIa und b) erwies sich als sehr gut geeignet zur Herstellung von Sphärolyophilisaten. Bei Temperaturen von etwa $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer Fallstrecke von ca. 40 cm werden innerhalb von Sekunden gefrorene Tröpfchen erhalten. Von Vorteil ist, dass bei dieser Technik verschiedene

Düsentypen flexibel eingesetzt werden können. Auch modifizierte Anlagentypen mit breiterem Durchmesser, die für Düsentypen mit breiterem Sprühkegel genutzt werden können, sind prinzipiell denkbar. Von Nachteil ist, dass die Tröpfchen nachgetrocknet werden müssen, was aber bei den bisher zur Sprühgefrierd Trocknung eingesetzten Verfahren durchaus üblich ist (siehe Abschnitt 2.1.4).

Im Verfahren zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefrierd Trocknung (Prototyp III) wurde die erfolgreiche Einfriermethode mit einem neuen Trocknungskonzept verbunden, bei dem die Partikel in einer aufwärts gerichteten Luftströmung getrocknet werden. Dem Konzept folgend wurde eine Versuchsanlage aufgebaut, an der Temperatur- und Strömungsmessungen vorgenommen wurden. Versuche zur Trocknung von Partikeln konnten nicht durchgeführt werden, da die Optimierung der Temperatur- und Strömungsverhältnisse rein experimentell nur mit unvertretbarem Aufwand lösbar ist und dazu Ressourcen und Expertenwissen aus dem Bereich der numerischen Strömungsmechanik (Computational Fluid Dynamics, CFD) herangezogen werden müssen. Dabei würden die einfachsten Modelle zunächst von monodispersen Partikeln ausgehen, könnten aber auch auf heterodisperse Tropfenverteilungen erweitert werden.

Die Temperaturmessungen im Einfrierteil zeigen, dass die Temperaturverteilung in den Quer- und Längsschnitten der kälteführenden Rohre inhomogen ist. Zum einen wurden große Temperaturdifferenzen zwischen Tiefkühlkondensator und Einfrierrohr gemessen, zum anderen gab es große Temperaturgradienten im Querschnitt des Zulaufrohrs und im Längsschnitt des Einfrierrohrs. Ein Grund liegt in den temperaturabhängigen Eigenschaften der Luft. Beim Abkühlen von Luft auf Temperaturen unter -100 °C verdoppelt sich deren Dichte, daher ähnelt das Strömungsverhalten der Luft im Einfrierteil dem von Flüssigkeiten. Des Weiteren steigt warme Luft aus der Trockenkammer in das Einfrierrohr. Um die kalte Luft zu sammeln und ein Einströmen der warmen Luft zu minimieren, wurden Stautrichter in das Einfrierrohr eingesetzt. Hierdurch ließen sich tiefere Temperaturen von etwa -70 bis -85 °C im oberen Teil und -35 bis -55 °C im unteren Teil des Einfrierrohrs erreichen. Ob diese Temperaturen ausreichen um Tröpfchen einzufrieren,

hängt unter anderem vom Tropfenvolumen ab. Bei den mit der DropJet Düse erzielten Volumina reichen die Temperaturen vermutlich nicht aus, um Tröpfchen vollständig einzufrieren. Zur Weiterentwicklung der Anlage wäre es sinnvoll, das Strömungsverhalten im Einfrierrohr zu kennen, um eventuelle Einflüsse der einströmenden Luft aus der Trockenkammer besser einschätzen zu können. Auch hier würden Simulationen durch CFD wichtige Hinweise auf das tatsächliche Strömungsverhalten geben, da mit den zur Verfügung stehenden Mitteln experimentelle Untersuchungen im Einfrierbereich und in der Trockenkammer nicht möglich sind. Möglich wäre dies zum Beispiel durch Messungen mit 3D-Laseranemometrie. Gegenüber der verhältnismäßig warmen Luft in der Trockenkammer sollte das Einfrierrohr besser isoliert oder separat gekühlt werden. Außerdem sollte das Aufsteigen der warmen Luft unterbunden werden. Dies ist jedoch technisch schwer zu realisieren, da die gefrorenen Partikel aus dem Einfrierrohr in die Trockenkammer gelangen müssen.

Die Temperaturmessungen ergaben außerdem, dass in der gesamten Anlage große Temperaturdifferenzen existierten. Diese hohen Temperaturunterschiede zwischen der Kühlflüssigkeit und den gekühlten Komponenten (Hauptkondensator, Tiefkühlkondensator, Trockenkammer) können leicht durch eine verbesserte Isolierung verringert werden.

Der Gesamtvolumenstrom sowie die Teilströme in der ACD-Anlage (Atmospheric Counter Current Lyophilization, ACD-Lyophilization) sind einstellbar durch die spannungsabhängige Regelung des Lüfters, den Einsatz von Lochblenden in der Zuführung zur Trockenkammer oder der Stellung des Kugelhahns im abzweigenden Teil zum Tiefkühlkondensator, siehe dazu Abschnitt 4.1.4.3, Abbildung 4-11. Schwierig ist die Einschätzung des Strömungsverhaltens in der Trockenkammer. Das Trocknungskonzept sieht vor, dass dort eine laminare Strömung vorliegt. Dies sollte durch den Einbau eines Strömungsgleichrichters in die Luftzufuhr zur Trockenkammer erreicht werden. Da eine experimentelle Überprüfung des Strömungsverhaltens in der Trockenkammer derzeit nicht möglich ist, sollte dies, wie beim Einfrierrohr, durch fluiddynamische Simulation untersucht werden. Eine laminare Strömung

ist Voraussetzung für die Abtrennung der getrockneten Partikel aus dem Gasstrom.

Aufgrund des besonderen Trocknungskonzepts gelten für den Einsatz der Atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung gewisse Einschränkungen. Zum Versprühen der Flüssigkeit sollte eine Düse verwendet werden, die zur Erzeugung monodisperser Tropfen geeignet ist. Weiterhin sollte sichergestellt sein, dass die erzeugten Tropfen nicht kollidieren und zusammenfließen und so eine heterodisperse Tropfengrößenverteilung entsteht. Das Trocknungskonzept sieht vor, dass die trockenen Tröpfchen erst dann aus dem Strom des Trockengases entfernt werden, wenn sie eine kritische Dichte unterschritten haben. Dazu muss am weitesten Querschnitt der Trockenkammer die aus dem aerodynamischen Verhalten der getrockneten Partikel berechnete Gleichgewichtssedimentationsgeschwindigkeit leicht überschritten werden. Dies setzt voraus, dass alle Tropfen annähernd gleich groß sein müssen, da die aerodynamischen Eigenschaften sonst zu stark voneinander abweichen. Die Untersuchungen des Tropfenstrahls, siehe auch Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2, zeigen, dass die Erzeugung annähernd monodisperser Tropfen mit der DropJet Düse möglich ist. Es ist allerdings möglich, dass sich die Tropfengröße verändert, wenn sich die Fallgeschwindigkeit der Tröpfchen während des Fluges verlangsamt und es so zu Kollisionen kommt. Welche Phänomene auftreten können und wie das Zusammenfließen von Tröpfchen verhindert werden kann, wird in Abschnitt 5.1.2 diskutiert.

Eine weitere Einschränkung des ACD-Konzepts ist, dass der Massenunterschied zwischen feuchten und trockenen Tröpfchen bei sinkender Partikelgröße immer geringer wird. Folglich nehmen auch die Unterschiede der einzustellenden Strömungsgeschwindigkeiten ab. Nach Abbildung 2-14 beträgt der Unterschied der Strömungsgeschwindigkeiten für ein 200 μm großes Partikel bei einer Reduktion der Dichte von 1 auf 0,5 g/cm^3 etwa 20 cm/s . Bei einem 10 μm großen Partikel unterscheiden sich die Strömungsgeschwindigkeiten bei gleicher Verringerung der Dichte nur noch um etwa 0,15 cm/s . Bei einem Durchmesser der Trockenkammer von 30 cm entspricht dies einem Volumenstrom von 0,1 L/s . Für sehr kleine Partikel wäre die bisherige

Anlagenkonfiguration daher nicht mehr geeignet, da der Volumenstrom erst ab 1,5 L/s mit einer Genauigkeit von 0,1 L/s eingestellt werden kann. Die Trocknung kleinerer Partikel wäre prinzipiell möglich unter der Voraussetzung, dass entweder Lochblenden mit kleinerem Öffnungsdurchmesser verwendet werden, der maximale Querschnitt der Trockenkammer erweitert wird oder ein schwächerer Lüfter mit einer präzisen Geschwindigkeitsregelung eingebaut wird.

Insgesamt gelingt die Herstellung von Sphärolyophilisaten durch Einfrieren von Tröpfchen unter Atmosphärendruck und anschließender Trocknung im Vakuum sehr gut. Ausgehend von dieser Technik gibt es zwei Möglichkeiten, das Herstellungsverfahren dieser Lyophilisate weiter zu verbessern.

Die erste Möglichkeit zur Optimierung der Herstellung von Sphärolyophilisaten ist die Fortführung und Verbesserung des ACD-Konzepts. Voraussetzung dafür ist die Analyse der Reibungskräfte und Simulation der Sublimationskinetik am Einzeltropfen und die anschließende Implementierung in ein fluiddynamisches Rechenmodell zur Simulation des Trocknungsvorgangs in der Gefriertrocknungsanlage. Dazu können die in dieser Arbeit erhaltenen Daten genutzt werden, die Umsetzung der fluiddynamischen Simulationen wird jedoch aufgrund des hohen Zeitaufwands in einem Folgeprojekt realisiert. Durch eine Optimierung der Strömungs- und Temperaturverhältnisse, gegebenenfalls auch durch Anpassung der Apparategeometrie, sollen die Trocknungsbedingungen für die Partikel ermittelt werden und die Energieeffizienz des Verfahrens verbessert werden.

Die andere Möglichkeit zur Optimierung der Herstellungstechnik ist der Anschluss eines Trockentunnels unter dem Einfrierrohr, bei dem die gefrorenen Partikel in einem quasi-kontinuierlichen Prozess im Vakuum gefriergetrocknet werden können. Beispiele für industriell eingesetzte Trockentunnel für Produkte in Trays sind die Gefriertrocknungsanlage RAYCON™ für den pharmazeutischen Bereich und die Anlage CONRAD™ für Lebensmittel (GEA Process Engineering A/S, DK-Soeborg). Diese Technik wird ebenfalls in einem Folgeprojekt umgesetzt. Eine schematische Zeichnung des Prototyps ist in Abbildung 5-2 gezeigt.

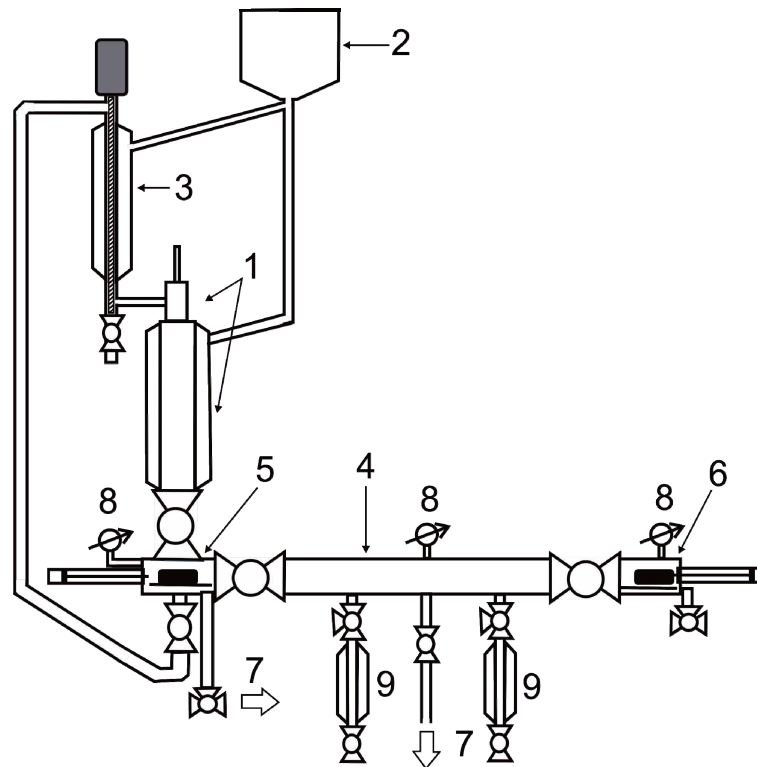


Abb. 5-2 Schematische Darstellung des Gefriertunnels

1- Einfrierrohr mit Tropfengenerator, 2 – Stickstoffvorratsbehälter, 3 – Kühlgasrückführung und Entfeuchtung, 4 – Trockentunnel, 5 – Beladestation mit Schale, 6 – Produktentnahme, 7 – Vakuumanschluss, 8 – Druckanzeige, 9 - Kondensator

Wie bei den bisherigen Prototypen werden die Tröpfchen mit einer Düse, beispielsweise mit dem Tropfengenerator, erzeugt und nach dem Einfrieren in einer Schale mit Siebböden gesammelt. Das Einfrieren erfolgt wie bei der ACD-Anlage in einem geschlossenen Kühlgaskreislauf. In kurzen Intervallen können mehrere Schalen mit den gefrorenen Tröpfchen nacheinander in den Trockentunnel eingeschleust werden. Dort werden sie unter Vakuum gefriergetrocknet. Nach Abschluss der Trocknung werden die Schalen in derselben Reihenfolge aus dem Trocknungstunnel ausgeschleust und entnommen. Zur Entfeuchtung wird das kalte Trägergas, das durch das Einfrierrohr strömt, zurückgeführt und durch einen weiteren Kondensator geleitet. Die Beladung des Gefriertunnels mit mehreren Schalen ermöglicht die quasi-kontinuierliche Herstellung von Lyophilisaten über einen längeren Zeitraum. Voraussetzung für den quasi-kontinuierlichen Betrieb sind die beiden Kondensatoren, die abwechselnd im laufenden Betrieb abgetaut werden können. Ein Vorteil bei der Verwendung des Gefriertunnels ist, dass man im

Gegensatz zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahl Gefriertrocknung beim Sprühprozess nicht auf monodisperse Tropfen beschränkt wäre und die Trockenzeiten im Vakuum im Vergleich zur atmosphärischen Gefriertrocknung kürzer sind. Als Düsen kämen auch andere Zerstäubertypen wie Einstoff-Druckdüsen oder Zweistoffdüsen in Frage.

5.1.2 Untersuchungen zur Tropfenbildung an der DropJet Düse

Die Tropfenbildung an der Tropfenstrahldüse ist abhängig von den Eigenschaften der verwendeten Flüssigkeit wie Viskosität, Oberflächenspannung und Dichte sowie von den Betriebsparametern der Düse wie Sprühdruck und Frequenz. Der Sprühstrahl kann beim Rayleigh-Strahlzerfall gut mit einem Kamerasystem visualisiert werden, da die einzelnen Tropfen ungefähr am selben Ort entstehen. Dabei wirkten sich beim Vergleich von Wasser mit 20 %-iger wässriger Trehaloselösung bereits geringe Unterschiede in Viskosität und Oberflächenspannung auf die Zerfallslänge des Sprühstrahls aus. Die Tropfengröße betrug etwa das Doppelte des Düsendurchmessers. Ein anderes Verhalten wurde bei einer 1 %-igen HPMC-Lösung beobachtet. Der Sprühstrahl zerfiel nicht mehr in einzelne Tröpfchen, sondern die Flüssigkeit sammelte sich in großen Tropfen am unteren Ende des Strahls, die in unregelmäßigen Abständen abtropften. Dieses Phänomen ist bei makromolekularen Lösungen bekannt und wird als „Gobbling“ bezeichnet [37,38]. Die in der Lösung enthaltenen Polymere verhindern das Ablösen einzelner Tropfen aus dem Sprühstrahl, sodass diese über Flüssigkeitsfäden zusammenhängen und die nachfolgenden Tropfen „verschlucken“ bis sie eine kritische Masse erreichen, bei der der Tropfen abreißt. Beim Versprühen von Lösungen, die auch nur geringe Mengen makromolekularer Hilfsstoffe enthalten, können daher Tropfen ausgebildet werden, die wesentlich größer als das Doppelte des Düsendurchmessers sind. Diese Lösungen sind dann nicht zur Erzeugung monodisperser Tropfen geeignet, obwohl sie im angegebenen Viskositätsbereich für den Betrieb der Düse liegen.

Die kegelförmige Aufweitung des Sprühstrahls mit zunehmender Entfernung von der Düse, siehe auch Abschnitt 4.2.4, ist besonders ausgeprägt bei hohem Sprühdruck. Beispielsweise beträgt der Durchmesser des Sprühkegels 60 cm

von der Düsenöffnung entfernt 4 bis 5 cm. Dies entspricht etwa der Strecke, die die Tröpfchen bisher im Einfrierteil der ACD-Gefriertrocknungsanlage zurücklegen. Die Ursachen für die Aufweitung des Sprühstrahls können vielfältig sein. Denkbar ist, dass die Tropfen aufgrund ihrer Eigen- oder auch der Kapillarschwingung Abweichungen in ihrem Bewegungsmuster zeigen. Das Zusammenfließen mehrerer Tropfen und anschließendes Zerfallen der entstehenden instabilen Tropfen in kleinere Tröpfchen kann ebenfalls eine Verbreiterung des Sprühs bewirken. Ebenfalls vorstellbar ist, dass die Tropfen durch Turbulenzen in der Gasströmung von ihrer idealen Flugbahn abweichen. Für weitere Entwicklungen muss der Durchmesser des Einfrierrohrs beim Anlagendesign daher vergrößert werden.

Der Vergleich der aus dem Durchsatz berechneten Anfangsgeschwindigkeiten der Tröpfchen von etwa 8 bis 16 m/s (siehe auch Abschnitt 4.2.3) mit ihrer terminalen Sedimentationsgeschwindigkeit von etwa 0,7 m/s (siehe Abschnitt 2.2.3.1) zeigt, dass diese etwa zehn- bis zwanzigmal so groß sind. Das bedeutet, dass die Einzeltröpfchen beim Versprühen in Luft durch Reibung abgebremst werden. Das Abbremsen der Tröpfchen in Luft durch den erhöhten Reibungswiderstand konnte man bei den Aufnahmen des Tropfenstrahls nicht beobachten, da die Tiefenschärfe der Kamera nicht ausreicht, um die Tropfen in ausreichendem Abstand von der Düse scharf abzubilden, wo sich der Strahl zu einem Kegel aufgeweitet hat.

Die Aufnahmen der einzelnen Tropfen aus dem Sprüh (siehe Abschnitt 4.2.4) zeigten bei Distanzen ab 25 cm von der Düse, dass die Größe der abgebildeten Tropfen variiert. Mit größerer Entfernung war dieser Effekt deutlich zu erkennen. Die Entstehung großer Tropfen ist möglich, wenn Einzeltropfen kollidieren und zusammenfließen können.

Theoretisch kann es, wie bei Brazier-Smith et al. beschrieben, beim Zusammentreffen zweier Tröpfchen zu folgenden Wechselwirkungen kommen, vergleiche dazu Abbildung 5-3:

- dauerhaftes Zusammenfließen (i)
- Kollision ohne Koaleszenz, auch als „bouncing“ bezeichnet (ii)

- Koaleszenz mit anschließender Zweiteilung des entstandenen Tropfens (iii)
- Koaleszenz mit anschließender Teilung des Tropfens unter Entstehung von Satellitentropfchen (iv)

Welches der Phänomene auftritt, hängt von der Tropfengeschwindigkeit, dem Drehimpuls, den elektrischen Kräften und anderen Parametern ab [33].

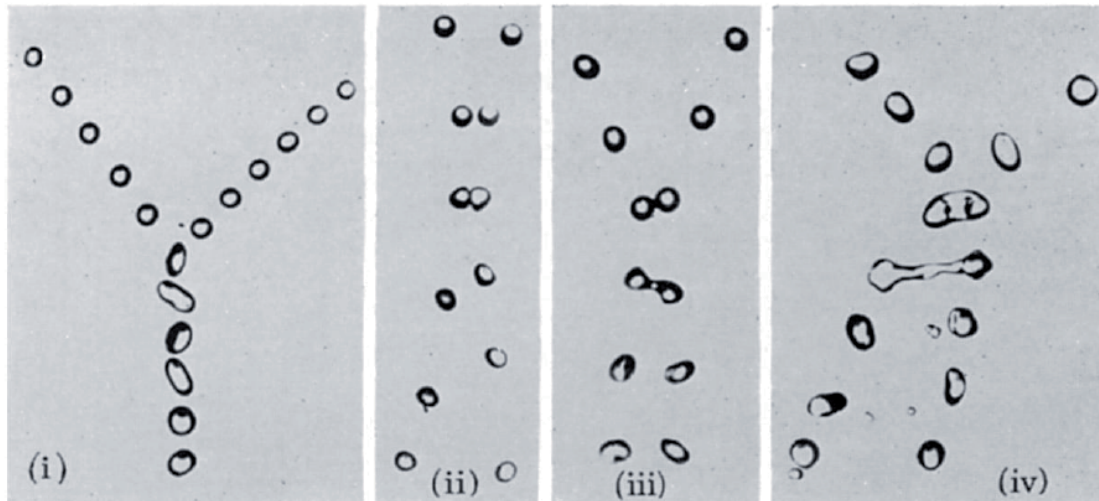


Abb. 5-3 Mögliche Phänomene bei der Tropfenkoaleszenz: i – dauerhaftes Zusammenfließen, ii – Kollision ohne Koaleszenz, iii – Tropfenteilung ohne Entstehung von Satellitentropfen, iv – Tropfenteilung mit Entstehung von Satellitentropfen [33]

Die Untersuchung der Koaleszenz von auf einer Flüssigkeitsoberfläche fixierter Tropfen mittels lasertomographischer Geschwindigkeitsmessung wurde kürzlich von Ortiz-Duenas beschrieben. Die Geschwindigkeit und Dauer der Einzelereignisse, die zur Koaleszenz von Tropfen führen, können durch diese Technik erfasst werden und die erhaltenen Daten wiederum für die Entwicklung numerischer Simulationen genutzt werden [99].

Geht man davon aus, dass es beim Sprühen mit der Tropfenstrahldüse zu einem dauerhaften Zusammenfließen der Tröpfchen kommt, würde sich das Tropfenvolumen verdoppeln und beim erneuten Zusammenfließen von Tropfen dieser zweiten Generation bereits das Vierfache des Ausgangsvolumens ausmachen. Beispielhaft ist die Zunahme des Tropfenvolumens und des Durchmessers von 10 Tropfengenerationen in Abbildung 5-4 dargestellt.

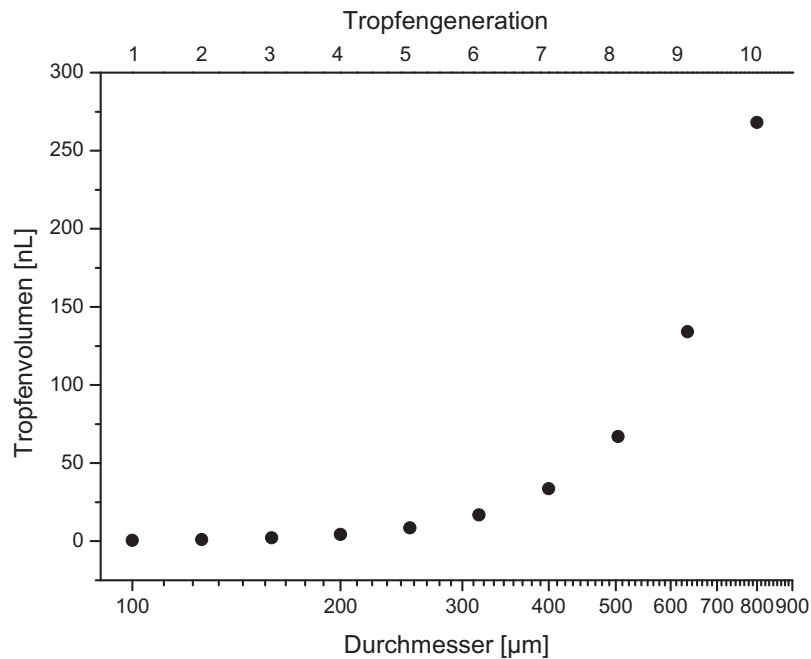


Abb. 5-4 Tropfenvolumen in Abhängigkeit des Tropfendurchmessers

Bereits in der vierten Tropfengeneration hat sich der Durchmesser verdoppelt. Dies ist lediglich ein einfaches Gedankenmodell, die Wirklichkeit ist wesentlich komplizierter, denn es können auch Tropfen verschiedener Größe zusammenfließen und bereits gebildete instabile Tropfen wieder zerfallen.

Die entfernungsabhängige Änderung der Tropfengrößenverteilung ist ein interessantes Phänomen, das im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden konnte. Untersuchungen dazu werden in einem Folgeprojekt durchgeführt. Die Bestimmungen zur Partikelgröße der gefriergetrockneten Tröpfchen, siehe Abschnitt 4.3.3.1, zeigen jedoch, dass sich die Tropfengröße nach dem Versprühen geändert hat, denn die Durchmesser der Partikel sind größer als die ursprüngliche Tropfengröße von 100 µm. Hierbei sind jedoch auch andere mögliche Einflüsse zu beachten, die in Abschnitt 5.1.3 diskutiert werden.

Betrachtet man Tropfenkollisionen als Ursache für die Änderung der Tropfengröße durch Koaleszenz, so können diese nur durch Verringerung des Abstands der Einzeltropfen zueinander auftreten, wenn man annimmt, dass die Tropfen nacheinander aus dem Sprühstrahl abgeschnürt werden. Dies geschieht, wenn sich die Geschwindigkeit der Tropfen ändert. Das Abbremsen

der Tröpfchen durch Luftreibung während des Flugs wurde bereits diskutiert. Aber auch innerhalb sehr kurzer Distanzen können Bremseffekte auftreten, die dazu führen können, dass Tropfen zusammenfließen. Anders et al. haben dieses Phänomen bei der Erzeugung monodisperser Tropfen mit Hilfe eines Ultraschallzerstäubers einige Zentimeter von der Düsenöffnung entfernt beobachtet [23]. Demnach wird die zusammenhängende Gestalt von Tropfenstrahlen, bei der alle Tropfen dieselbe Größe besitzen und denselben Abstand zueinander aufweisen, nur für einen gewissen Abstand von der Düse beibehalten. Dieser Abstand wird auch als Kohärenzlänge bezeichnet. Aufgrund interner Störungen ändern einige Tropfen des kohärenten Strahls ihre Geschwindigkeit. Verstärkt durch Turbulenzen der Umgebungsluft können Tropfen mit zunehmender Entfernung von der Düse zusammenfließen und der Tropfenstrahl wird instabil. Bei den gezeigten Beispielen für Ethanol, das mit einer 31 μm - Düse bei 135,6 kHz oder einer 60 μm - Düse bei 73,5 kHz in ruhende Umgebungsluft versprüht wurde, betrug die Kohärenzlänge des Strahls nur 40 mm beziehungsweise 120 mm.

Eine wichtige Frage, die sich aus dem beschriebenen Phänomen des Zusammentreffens der Tröpfchen ergibt, ist, welche Möglichkeiten es gibt, um den Abstand zwischen den Tröpfchen zu vergrößern und so Kollisionen zu verhindern. Die Möglichkeit, Tröpfchen im Vakuum zu erzeugen, wo das Abbremsen von Tröpfchen durch Reibungskräfte verhindert wird, ist keine sinnvolle Alternative, siehe auch Abschnitt 5.1.1. Apparativ einfach zu realisieren ist die Rotation der gegen die Vertikale geneigten Düse während des Versprühens. Da dies eine Vergrößerung des Sprühkegels zur Folge hat, müssen die Dimensionen des Einfrierrohrs entsprechend angepasst werden. Ebenfalls technisch möglich ist die Verringerung der Ausstoßfrequenz der Tropfen durch Verschließen des Mikroventils der DropJet Düse zwischen den einzelnen Tropfvorgängen, was aber zu einer Verringerung des Durchsatzes führt. Dabei wäre keine apparative Änderung nötig. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Tropfen elektrostatisch aufzuladen, sodass sie sich abstoßen. Brandenberger et al. beschreiben, wie die Flugbahnen durch laminaren Strahlzerfall erzeugter Tropfen durch Coulomb-Kräfte beeinflusst werden können, um Kollisionen zu verhindern und monodisperse Tropfen zu erhalten [32].

5.1.3 Charakterisierung von Sphärolyophilisaten

Sphärolyophilisate ausgewählter Zusammensetzungen wurden durch Einfrieren von Tröpfchen unter Atmosphärendruck und anschließende konventionelle Gefriertrocknung hergestellt und charakterisiert. Dabei wurden Mannitol (5 %, 20 % m/V) und Trehalose (7,5 %, 20 % m/V) als Gerüstbildner sowie Natriumhyaluronat (0,1 % m/V) als viskositätserhöhender Zusatz eingesetzt. Vor der Herstellung von Sphärolyophilisaten müssen die eingesetzten Hilfsstoffe auf ihre Eignung zur Ausbildung fester einzelner Lyophilisatpartikel getestet werden. Die bisher zur Herstellung von Trägerlyophilisaten eingesetzten Polymere oder Polymermischungen waren unter den experimentellen Bedingungen zum Beispiel nicht geeignet.

Die Partikelgröße von Sphärolyophilisaten ist abhängig von der Größe der Kapillare, vom Sprühdruk sowie von der Viskosität und Oberflächenspannung der Ausgangslösung. Kleine Partikel werden mit kleinen Kapillardurchmessern bei hohem Sprühdruk und niedriger Viskosität erhalten. Die kleinste vom Hersteller verfügbare Kapillare mit einem Durchmesser von 30 µm konnte für die Sprühgefriertrocknung nicht verwendet werden, da sie in vorangegangenen Versuchen häufig verstopfte. Erst mit der nächstgrößeren Düse mit 50 µm Durchmesser wurden bessere Ergebnisse erzielt. Theoretisch beträgt die Größe der Tropfen, die durch Strahlzerfall generiert werden, ungefähr das Doppelte des Düsendurchmessers [111]. Die durchgeführten Größenbestimmungen des Sprühstrahls an der Tropfenstrahldüse, siehe Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2, stimmen mit der Theorie überein. Die mittlere Partikelgröße der Sphärolyophilisate ist jedoch weitaus größer. Für die mannitolhaltige Rezeptur lag sie bei 290 bis 400 µm und bei Lyophilisaten mit Trehalose im Bereich von 290 bis 460 µm. Die Einzelbilder, die zur Auswertung mittels Bildanalyse aufgenommen wurden, zeigen, dass sowohl Einzelpartikel unterschiedlicher Größe als auch Mehrlinge aus meist 2 oder 3 Partikeln entstanden sind. Dafür gibt es drei Möglichkeiten, die im Folgenden erläutert werden.

Am wahrscheinlichsten ist, dass die Tröpfchen direkt nach dem Versprühen im flüssigen Zustand zusammentreffen und zusammenfließen. Dies geschieht,

wenn sich der Abstand der Einzeltropfen zueinander verringert und so die Möglichkeit besteht, dass sie kollidieren. Zur Kollision von Tropfen sei auf den vorigen Abschnitt 5.1.2 verwiesen. Da die Tropfen während des Flugs durchfrieren, ist es möglich, dass zwei aufeinander treffende Tropfen nicht vollständig zusammenfließen, sondern so genannte Zwillingpartikel bilden. Abbildung 4-32 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Partikelpaares, das über eine Feststoffbrücke miteinander verschmolzen ist, es könnte während des Zusammenfließens zweier gefrorener Tröpfchen im freien Fall entstanden sein. Zwei Tröpfchen würden im freien Fall miteinander einfrieren, wenn sich die Eisbildung vom Tropfeninneren nach außen fortsetzt und die teilweise gefrorenen Tropfen kollidieren.

Die zweite Möglichkeit ist, dass die gefrorenen Partikel nach dem Auftreffen oder beim Gefriertrocknen zusammenfließen. Treffen die Partikel im Sammelgefäß mit hoher kinetischer Energie aufeinander, ist es möglich, dass nicht vollständig gefrorene Partikel beim Aufprall zusammenschmelzen. Dies würde sich ebenfalls mit den beschriebenen Aufnahmen zur Durchfrierstrecke decken und würde zur Entstehung von Mehrlingspartikeln führen. Koaleszenz während der Gefriertrocknung ist möglich, wenn die Oberflächentemperatur der Partikel über die eutektische oder die Glasübergangstemperatur steigt. Die Moleküle an der Partikeloberfläche würden dadurch beweglich werden und könnten miteinander verschmelzen. Gegen diese Möglichkeit, spricht, dass nur wenige Partikel miteinander verschmolzen sind. Das Auftreten einzelner großer Partikel kann so ebenfalls nicht erklärt werden.

Die dritte Möglichkeit ist, dass die Partikel erst nach der Trocknung zusammenfließen. Dazu müsste Wasser aus der Umgebung an der Oberfläche adsorbiert werden und die Partikel adhäsiv machen. Der Effekt wäre, aufgrund der Ergebnisse der spezifischen Wasserdampfaufnahme, bei Lyophilisaten mit Trehalose deutlicher ausgeprägt als bei Lyophilisaten mit Mannitol. Dies wird jedoch weitestgehend ausgeschlossen, da die Partikel nach der Gefriertrocknung sofort im Exsikkator unter Ausschluss von Feuchtigkeit gelagert wurden.

Neben den genannten Möglichkeiten, kann das vereinzelte Auftreten von Aggregaten mehrerer Partikel, die bei der Bildanalyse als Einzelpartikel

detektiert werden, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Gesamtaussage wird dadurch jedoch nicht wesentlich verändert.

Die Struktur der Lyophilisate ist abhängig vom Kristallisations- oder Erstarrungsverhalten der Ausgangslösung beim Einfrieren der Tröpfchen. Daher werden für die beiden Gerüstbildner Mannitol und Trehalose unterschiedliche Strukturen erhalten. Die Partikel mit Mannitol besitzen eine lamellare Struktur, die mit Trehalose weisen eine glatte und zusammenhängende Struktur auf. In Abschnitt 2.2.2.1 wurden 3 Möglichkeiten zum Einfrieren eines Tropfens bei homogener Nukleation beschrieben. Sie frieren entweder zuerst von innen nach außen, oder zuerst an der Oberfläche und von dort aus nach innen oder, als dritte Möglichkeit, erst im Tropfeninneren und nach Ausbildung einer Eisschicht über die gesamte Tropfenoberfläche radial nach innen. Wie sich die Tropfen der verschiedenen Lösungen beim Einfrieren verhalten ist nicht genau nachzuvollziehen. Einige Lyophilisate mit Mannitol und Trehalose zeigen eine äußere Hülle, die auf ein schalenartiges Einfrieren der Tropfen von außen nach innen zurückgeführt werden könnte. Diese Hülle ist aber nicht bei allen Lyophilisaten vorhanden. Besonders bei den Lyophilisaten aus den gering konzentrierten Ausgangslösungen sind große Hohlräume zu erkennen. Sie könnten durch eine partielle Aufkonzentrierung der gelösten Substanzen des Tropfens entstanden sein, die beim Einfrieren um den Hohlraum, der einen ehemaligen Eiskristall repräsentiert, herum erstarrt sind. Demnach würde der Tropfen zuerst im Inneren gefrieren.

Die spezifische Oberfläche der Lyophilisate ist stark von der Formulierung abhängig. Bei den mannitolhaltigen Lyophilisaten nimmt sie mit zunehmendem Feststoffgehalt ab, bei den trehalosehaltigen Zusammensetzungen ist kein eindeutiges Muster erkennbar.

Zum Vergleich wurde die theoretische Oberfläche eines Pulvers, das aus 300 μm großen kugelförmigen Partikeln mit glatter Oberfläche besteht, berechnet. Zur Berechnung wurden für den Durchmesser und die Dichte der Partikel mittlere Werte in Anlehnung an die Messergebnisse aus den Abschnitten 4.3.3.1 und 4.3.3.7 herangezogen. Für glatte Partikel einer Dichte von $0,05 \text{ g/cm}^3$ beträgt die Oberfläche $0,4 \text{ m}^2/\text{g}$ und für Partikel einer Dichte von

0,1 g/cm³ beträgt sie 0,2 m²/g. Die spezifische Oberfläche von Sphärolyophilisaten ist im Vergleich zu Partikeln mit glatter Oberfläche etwa um den Faktor vierzig bis fünfzig größer.

Allgemein wird mit zunehmender Oberfläche die Lösungsgeschwindigkeit von Feststoffen begünstigt. Die ermittelten Rekonstitutionszeiten der Lyophilisate sind sehr kurz, sie liegen im Bereich von 10 bis 30 Sekunden. Bei mannitolhaltigen Lyophilisaten lässt sich ein Zusammenhang zwischen der verkürzten Auflösungszeit bei größerer spezifischer Oberfläche erkennen, die trehalosehaltigen Zubereitungen lösen sich unabhängig von der Oberfläche sehr schnell auf.

Wichtige Stabilitätskriterien für gefriergetrocknete Produkte sind die Restfeuchte und die Wasseraufnahme aus der Umgebung. Feuchtigkeit im Produkt kann chemische Zersetzungsreaktionen und mikrobielles Wachstum begünstigen. Nach Kruss und Tang sollte die Restfeuchte von Lyophilisaten möglichst gering, unter 1 % sein [76,140], jedoch sind einige Arzneistoffe, besonders Proteine, erst bei höherer Feuchtigkeit stabil [76,89]. Die große Oberfläche von gefriergetrockneten Produkten begünstigt auch die Wasseraufnahme aus der Umgebung. Bei den untersuchten Lyophilisaten werden die Restfeuchte und die Wasseraufnahme im Produkt durch den Gerüstbildner bestimmt. Sphärolyophilisate mit Mannitol haben Restfeuchten unter 1 % und nehmen bis zu relativen Luftfeuchten von 90 % weniger als 4 % Wasser auf. Die Trocknungsdauer betrug etwa 16 Stunden, kann aber sicher noch verkürzt werden. Trehalosehaltige Lyophilisate weisen höhere Restfeuchten von 5 bis 6 % auf und nehmen schon bei geringen relativen Luftfeuchten ab 10 % Wasser auf. Dies muss bei der Lagerung und Verpackung der Lyophilisate berücksichtigt werden. Für trehalosehaltige Zubereitungen empfiehlt sich die Verpackung und Lagerung unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit.

Die Partikeldichte von Sphärolyophilisaten ist sehr gering und kann durch Veränderung des Feststoffanteils in gewissen Grenzen eingestellt werden. Die Bestimmungsmethoden zur Fließfähigkeit durch den Vergleich von Schütt- und Stampfdichte sowie Bestimmung des Abrutschwinkels mussten an die geringen Pulvermengen angepasst werden. Alle Lyophilisate zeigten eine sehr gute Fließfähigkeit. Dabei muss berücksichtigt werden, dass trehalosehaltige

Lyophilisate anfällig für Feuchtigkeit aus der Umgebungsluft sind. Sie nehmen Feuchtigkeit auf und verkleben miteinander, sodass ein freies Fließen einzelner Partikel nicht mehr möglich ist. Eine gute Fließfähigkeit wird beispielsweise zur Weiterverarbeitung des Pulvers durch maschinelle Dosierprozesse vorausgesetzt.

Der aerodynamische Durchmesser ist eine Kenngröße zur Beurteilung des Sedimentationsverhaltens der Partikel. Aus dem geometrischen Durchmesser kann er nach Gleichung 5-1 erhalten werden:

$$d_a = \sqrt{\rho_p d_p^2} \quad \text{Gl. 5-1}$$

ρ_p - Partikeldichte [kg/m³], d_p - Partikeldurchmesser [m], d_a - aerodynamischer Durchmesser [m]
 Zum Vergleich mit dem geometrischen Durchmesser wurde der aerodynamische Durchmesser von zwei mannitolhaltigen Sphärolyophilisaten unterschiedlicher Dichte bestimmt. Der aerodynamische Durchmesser beträgt für Partikel mit einer Dichte von 0,04 g/cm³ etwa ein Viertel bis ein Sechstel und für Partikel mit einer Dichte von 0,14 g/cm³ etwa die Hälfte bis ein Viertel des geometrischen Durchmessers. Der aerodynamische Durchmesser spielt eine wichtige Rolle bei der Applikation von Partikeln in den Atemwegen. Dies ist für eine Weiterentwicklung von Sphärolyophilisaten als inhalative Arzneiform interessant. Edwards et al. zeigten, dass große poröse Partikel mit geometrischen Durchmessern von 8 µm bis 20 µm aufgrund ihres geringen aerodynamischen Durchmessers von weniger als 5 µm ein ausgezeichnetes Abscheideverhalten in der Lunge aufweisen, die Arzneistofffreigabe verlängern und die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen verbessern [50].

Sphärolyophilisate eröffnen als eigenständige Arzneiform vielfältige Möglichkeiten zur Applikation von Arzneistoffen. Die Verwendung als topische Arzneiform zur Applikation am Auge mit einem entsprechenden Applikator wurde bereits in Abschnitt 2.3.3 vorgestellt. Verkleinert man die Partikelgröße durch Anwendung von Düsen, die Tropfen geringerer Größe generieren, können Sphärolyophilisate auch als Pulver zur Inhalation eingesetzt werden. Aufgrund des geringen aerodynamischen Durchmessers bieten sie ein großes

Potential als inhalative Arzneimittel für besonders empfindliche Wirkstoffe, zum Beispiel Proteine, mit exzellenter Lungengängigkeit und Bioverfügbarkeit. Für die pulmonale Applikation werden aerodynamische Partikeldurchmesser von 3 bis 5 μm angestrebt. Bei einer Partikeldichte von 0,04 bis 0,14 g/cm^3 entspricht dies Partikeln mit einem geometrischen Durchmesser von etwa 40 bis 75 μm . Aufgrund der hohen Porosität wird in der wasserdampfgesättigten Umgebung in den Atemwegen eine Zunahme der Adhäsivität und des aerodynamischen Durchmessers erwartet. Durch die Verwendung monodisperser Partikel können bei der Inhalation optimale Depositionsmuster erreicht werden. Ebenfalls möglich ist die Abfüllung der Lyophilisate in Vials, Ampullen oder Spritzen, zur Herstellung parenteraler Arzneiformen. Denkbar ist auch die Verwendung als orale Arzneiform nach dem Einfüllen in Kapseln oder Blister.

5.2 Trägerlyophilisate

Im zweiten Teil dieser Arbeit war das Ziel, Trägerlyophilisate mit Latanoprost herzustellen, die zur Anwendung am Auge geeignet sind. Die Herstellung erfolgte mit einem vereinfachten Verfahren, bei dem die Tröpfchen in 5 Minuten über flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend etwa 16 Stunden in einem konventionellen Gefriertrockner getrocknet wurden. Die Trocknungszeit im Gefriertrockner könnte im Rahmen einer Prozessoptimierung aufgrund der geringen Wassermengen sicher deutlich verkürzt werden. Weichselbaum gibt für Trägerlyophilisate Trocknungszeiten von etwa 1,5 Stunden in einem Laborgefriertrockner ähnlicher Kapazität an [151]. Eine andere Möglichkeit zur Optimierung der Herstellung von Trägerlyophilisaten ist die Anwendung eines Gefriertrocknungstunnels, wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben. Eine weitere Variante dieses Trockentunnels, bei der auf das Einfrierrohr verzichtet werden kann, ermöglicht die Herstellung von Trägerlyophilisaten im quasi-kontinuierlichen Betrieb. Dazu müssten die Trägerfolien in die Schalen mit Siebboden eingebracht und die jeweilige Ausgangslösung aufgetropft werden. Bei einer entsprechenden Ausstattung des Gefriertunnels könnte die Beladung der Träger beispielsweise mit einem piezoelektrischen Tropfengenerator schon in der Anlage erfolgen und die Tröpfchen mit der Technik des snap freezing unter Vakuum eingefroren werden.

5.2.1 Charakterisierung von Trägerlyophilisaten

Zunächst wurden die folgenden qualitätsbestimmenden Eigenschaften wirkstofffreier Trägerlyophilisate untersucht:

- Restfeuchte
- Wasserdampfsorption
- Struktur
- Rekonstitutionszeit
- Haftfestigkeit
- Strukturfestigkeit

Der Anteil des Gerüstbildners Mannitol wurde variiert und aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und der geringen Dosierung von Latanoprost

wurden zur Verbesserung der Löslichkeit Pluronic (0,1 % m/V) und HP- β -CD (0,25 % m/V) sowie zur Erhöhung der Verweildauer am Auge Natriumhyaluronat (0,1 % m/V) zugesetzt. Zusätzlich wurden in eingeschränktem Umfang mannitolhaltige Lyophilisate getestet, die Ethanol oder tert-Butanol als Cosolventien enthielten. Lyophilisate, die sich aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften als geeignet für die Anwendung am Auge erwiesen, wurden später zu Untersuchungen der Bioverfügbarkeit im Kammerwasser eingesetzt.

In früheren Arbeiten von Grunthal, Weichselbaum, Maier und Krasichkova sind bereits Untersuchungen zu den Eigenschaften von Trägerlyophilisaten durchgeführt worden [57,74,88,151]. Bei Maier und Krasichkova standen hauptsächlich die Einflüsse von Herstellungsparametern auf die Lyophilisateigenschaften im Vordergrund [74,88]. Studien zur Verträglichkeit sowie zur Bioverfügbarkeit ausgewählter Arzneistoffe im Auge wurden von Grunthal, Weichselbaum und Maier durchgeführt [57,88,151]. In den aufgeführten Arbeiten wurden als Gerüstbildner für die Lyophilisate Polymere eingesetzt, zum Beispiel HPMC oder eine Mischung aus Dextran und Hyaluronsäure-Natrium. In dieser Arbeit wurden Lyophilisate aus 5 und 10 %-iger (m/V) Mannitollösung als Gerüstbildner und den Zusätzen Natriumhyaluronat, Pluronic und HP- β -CD in den oben angegebenen Konzentrationen hergestellt. Wegen der geringen Sorptionsneigung bei hoher Luftfeuchtigkeit und der Erfahrung bei der Herstellung von Sphärolyophilisaten wurde Mannitol als Alternative zu den bisher verwendeten Polymeren gewählt.

Die Restfeuchte der Lyophilisate beträgt etwa 1 % und entspricht damit den üblichen Werten [76,140]. In welchem Restfeuchtebereich Latanoprost in Trägerlyophilisaten tatsächlich stabil ist, müsste durch Stabilitätsuntersuchungen in Bezug auf Wirksamkeit, Reinheit und Sicherheit des Produkts für jede Rezeptur ermittelt werden. Auch die Wasseraufnahme des Lyophilisats spielt eine wichtige Rolle für die chemische und mikrobielle Stabilität des Arzneimittels. Messungen bei Luftfeuchten von 0 bis 98 % zeigten, dass für alle Zusammensetzungen die Wasseraufnahme bis zu 90 % relativer Feuchte unter 3 % bleibt. Die Zusätze haben keinen Einfluss auf den Verlauf der Wasserdampfsorption, Unterschiede für die einzelnen

Zubereitungen bestehen aber in der Gesamtwasseraufnahme. Die OLCS sind trotz ihrer porösen Struktur und des hydrophilen Charakters der eingesetzten Hilfsstoffe gegenüber Luftfeuchte unempfindlich. Hinsichtlich der Verpackung und Lagerung müssen voraussichtlich keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber den von Krasichkova untersuchten OLCS auf Hypromellose- und Dextranbasis, die bereits bei einer relativen Feuchte von 65 % eine Wasserdampfsorption von etwa 20 % aufweisen.

Die Struktur der Lyophilisate wird insgesamt hauptsächlich durch den Mannitolanteil bestimmt. Dabei sind Zubereitungen mit geringerem Feststoffanteil wie erwartet poröser. Bemerkenswert ist, dass schon sehr geringe Anteile von Zusätzen die Oberflächenstruktur von Trägerlyophilisaten beeinflussen. Auf das Einfrierverhalten lassen sich anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen keine genauen Rückschlüsse ziehen. Einen isolierenden Effekt der Trägerfolie vorausgesetzt, frieren die Tröpfchen in der kalten Umgebung vermutlich von außen nach innen ein.

Auch die Rekonstitutionszeit der Lyophilisate ist abhängig vom Mannitolgehalt. Alle Zubereitungen mit 5 %-igem Mannitolzusatz lösen sich innerhalb von einer Sekunde auf. Bei den 10 %-igen Mannitolzubereitungen hängt die Auflösungszeit vom verwendeten Zusatz ab. Die zusatzfreien Lyophilisate lösen sich innerhalb von 20 Sekunden auf, Lyophilisate mit Pluronic und HP- β -CD lösen sich bereits nach 3 bzw. 10 Sekunden. Vermutlich verbessern diese Zusätze die Benetzung des Trägerlyophilisats. Der Zusatz von Hyaluronsäure verlängert dagegen die Rekonstitutionszeit auf ca. 50 Sekunden.

Ein sehr wichtiges Qualitätskriterium für Trägerlyophilisate ist die Haftfestigkeit. Die Lyophilisate müssen einerseits so fest auf der Oberfläche der Trägerfolie sitzen, dass sie sich während des Transports nicht ablösen. Andererseits müssen sie zur Applikation vom Patienten leicht am unteren Augenlid abgestreift werden können. Weichselbaum stellte fest, dass sich Trägerlyophilisate mit einer Abstreifkraft über 200 mN, nicht mehr problemlos am Auge abstreifen lassen können. Lyophilisate mit Haftfestigkeiten unter 20 mN, sind dagegen empfindlich gegenüber Erschütterungen [151]. Beeinflusst wird die Haftfestigkeit durch die Zusammensetzung der

Ausgangslösung. Maier und Krasichkova zeigten, dass mit steigendem Feststoffgehalt die Haftfestigkeit der OLCS auf dem Träger zunimmt [74,88]. Weitere Einflussfaktoren sind die Vorbehandlung der Trägerfolie, zum Beispiel durch Autoklavieren, die Lagerungszeit und die Einfriergeschwindigkeit [74,88,151]. Die Haftfestigkeiten für OLCS mit Mannitol sind abhängig von der Zusammensetzung der Ausgangslösungen sowie vom Feststoffgehalt. Auch hier nimmt die Haftfestigkeit mit steigendem Feststoffgehalt zu, was vermutlich auf die Verdichtung der Struktur und damit auch der Kontaktpunkte zur Trägerfolie zurückzuführen ist. Die Zusätze Pluronic und HP- β -CD bewirken eine Verringerung der Haftfestigkeit. Dieser Effekt ist bei den Lyophilisaten mit 10 %-igem Mannitolanteil besonders deutlich. Obwohl die Ausgangslösungen mit Pluronic und Cyclodextrin einen kleineren Kontaktwinkel besitzen und die PTFE-Folie besser benetzen, wird die Haftfestigkeit durch die größere Kontaktfläche nicht verbessert. Alle Trägerlyophilisate mit 5 % Mannitol sowie die 10 %-igen Lyophilisate mit Pluronic und HP- β -CD liegen in dem nach Weichselbaum zur Anwendung am Auge geeigneten Wertebereich von 20 bis 200 mN.

Neben der Haftfestigkeit ist die Strukturfestigkeit ein weiteres Qualitätsmerkmal für Trägerlyophilisate. Sie dient zur Einschätzung der Applizierbarkeit am Auge, aber auch zur Bewertung der physikalischen Stabilität während des Transports. Die Strukturfestigkeit hängt von Art und Konzentration der Hilfsstoffe bei der Herstellung ab. Maier untersuchte in klinischen Studien die Applikation HPMC-haltiger Lyophilisate in Bezug auf ihre Festigkeit und zeigte, dass eine gute Applikation von OLCS sowohl von der Struktur- als auch von der Haftfestigkeit abhängt [88]. Bei höherer Haftfestigkeit muss auch die Strukturfestigkeit größer sein um die OLCS erfolgreich zu applizieren. Wie erwartet besitzen die Lyophilisate mit 10 % Mannitolanteil aufgrund der dichteren Struktur eine höhere Strukturfestigkeit als die Lyophilisate mit 5 % Mannitolanteil. Der Zusatz von Natriumhyaluronat sorgt für einen Anstieg der Strukturfestigkeit, insbesondere bei den Lyophilisaten aus 10 %-iger Mannitollösung. Die Strukturfestigkeit wurde in den Arbeiten von Maier und Krasichkova zwar quantifiziert, es gibt aber keine Angaben darüber, welche Festigkeiten bei der Anwendung am Auge toleriert werden. Hinsichtlich der Haft- und Strukturfestigkeit weisen Lyophilisate mit 5 % Mannitolanteil ohne Zusatz oder

mit Natriumhyaluronat geeignete Werte auf. Werden Pluronic oder HP- β -CD als Zusätze verwendet, liegen Lyophilisate mit 10 % Mannitolanteil im geeigneten Festigkeitsbereich.

An Trägerlyophilisaten mit einer Dosis von 0,75 μ g Latanoprost und 5 % Mannitolanteil wurde exemplarisch gezeigt, dass die physikochemischen Eigenschaften der latanoprosthaltigen Trägerlyophilisate im Wesentlichen von den gewählten Hilfsstoffen abhängen. Dies kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf andere Zusammensetzungen der Trägerlyophilisate übertragen werden, da die Konzentration des Wirkstoffs in der Ausgangslösung bei einer nominellen Dosis von 0,75 μ g nur 0,0025 % beträgt. Einzig die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine veränderte Struktur der Lyophilisatoberfläche, die auf ein modifiziertes Einfrierverhalten mit dem Wirkstoff zurückgeführt werden kann.

5.2.2 Latanoprostgehalt

Die Herstellung von Trägerlyophilisaten mit Latanoprost ist nicht trivial und wird insbesondere durch die geringe Wasserlöslichkeit und den niedrigen Wirkstoffgehalt des Endprodukts erschwert. Latanoprost ist eine ölige Substanz, die gelöst in Methylacetat bezogen wurde.

In wässrigen Lösungen wird Latanoprost, insbesondere unter dem Einfluss von Hitze und UV-Strahlung, hydrolytisch zersetzt [93]. Xalatan[®] Augentropfen müssen kühl und unter Ausschluss von Licht gelagert werden [3]. Aufgrund des lipophilen Charakters adsorbiert Latanoprost außerdem an unpolaren Oberflächen, insbesondere Kunststoffen. Zur Herstellung wässriger Lösungen muss das Methylacetat zunächst verdampft werden, bevor der Arzneistoff mit dem Lösungsmittel aufgenommen wird. Die Löslichkeit in Wasser ist sehr gering und beträgt etwa 50 μ g/mL [7]. In Xalatan[®] Augentropfen liegt Latanoprost mit einer Konzentration von 50 μ g/mL im Bereich der Sättigungskonzentration vor. Das zur Konservierung enthaltene Benzalkoniumchlorid trägt vermutlich zur Löslichkeitsverbesserung durch Solubilisierung bei. Aufgrund der schlechten Löslichkeit wurden für die Herstellung von Lyophilisaten Zusammensetzungen mit Pluronic und HP- β -Cyclodextrin sowie Ethanol als löslichkeitsverbessernde Zusätze verwendet.

Zur quantitativen Bestimmung von Latanoprost in wässrigen Lösungen für Konzentrationen im $\mu\text{g/mL}$ -Bereich wurden in der Literatur bisher hauptsächlich HPLC-Methoden mit anschließender UV-Detektion beschrieben [55,93,117]. Von Basu wurde ein Radioimmunoassay mit einer Detektionsgrenze von 30 pg/mL zur Gehaltsbestimmung von Latanoprost bei toxikokinetischen Studien an Affen entwickelt und validiert [29]. Für pharmakologische Untersuchungen, bei denen im Plasma Wirkstoffkonzentrationen im Bereich von etwa 30 bis 60 pg/mL vorliegen, wurden HPLC-Bestimmungen mit radioaktiver Detektion durchgeführt [124,126,127].

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Gehaltsbestimmung von Latanoprost-Ester in Trägerlyophilisaten eine HPLC-Methode mit UV-Detektion (Nachweisgrenze etwa 50 ng/mL), der Enzymimmunoassay von Cayman Chemical (Nachweisgrenze 43 pg/mL) und ein LC-MS-Verfahren, bei dem vierfach deuterierter Latanoprost-Ester als interner Standard verwendet wurde, eingesetzt. Aus technischen Gründen konnten die HPLC-Untersuchungen nicht selbst durchgeführt werden. Die HPLC-Methode zur Gehaltsbestimmung wurde von M. Kassack und D. Eßer an der Universität Düsseldorf (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie) entwickelt. Die Validierung der Methode ist mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden und konnte daher nicht vollständig abgeschlossen werden. Die Gehaltsbestimmungen wurden deshalb nur zum Vergleich mit anderen Messergebnissen herangezogen. Die Weiterentwicklung der HPLC-Methode für die Qualitätssicherung von Latanoprost-Trägerlyophilisaten ist wünschenswert, da die Kosten für die Durchführung vergleichsweise gering sind und eine validierte Methode sichere Analyseergebnisse liefert. Die Bestimmung mit dem Enzymimmunoassay konnte selbst durchgeführt werden. Dafür wurde ein EIA Kit benutzt, das vorwiegend zur Gehaltsbestimmung von Latanoprost-Säure in biologischen Flüssigkeiten verwendet wird. Mit einer geringeren Empfindlichkeit ist es auch für Latanoprost geeignet. Dabei ist die Bindungskonstante des Hydrolyseprodukts etwa viermal so hoch wie die der Ausgangsverbindung. Da es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren handelt, ist dieser Test sehr störanfällig gegenüber Verunreinigungen aus dem zur Herstellung von Verdünnungen verwendeten Wasser oder Hilfsstoffen.

Für zwei Versuchsreihen wurden Ergebnisse erhalten, bei denen die Verteilung der Dosis von Latanoprost innerhalb der Lyophilisate einer Zusammensetzung gleichförmig war. Eine der Versuchsreihen lieferte ein unerwartet hohes Ergebnis. Für die Lyophilisate wurden für die Zusammensetzungen mit Mannitol 10 % bzw. Mannitol 10 %/ Pluronic 0,1 % Konzentrationen von 181 bzw. 198 % sowie 221 bzw. 188 % für die Ausgangslösungen ermittelt. Für die andere Versuchsreihe wurden für dieselben Zusammensetzungen unerwartet niedrige Ergebnisse von 22 bzw. 27 % für die Lyophilisate sowie von 24 bzw. 28 % für die Ausgangslösungen erhalten. Im Vergleich zu den Ausgangslösungen wiesen die Lyophilisate bis auf eine Ausnahme Werte auf, die darauf schließen lassen, dass sich der Gehalt während der Gefriertrocknung nicht verändert. Einige Trägerlyophilisate wurden zur Kontrolle mit dem gleichen EIA Kit durch ein zertifiziertes Analysenlabor (Cayman Chemical) untersucht. Dabei ergab sich für die Xalatan[®] Referenzprobe nahezu 100 % des Sollwerts, die Proben der Trägerlyophilisate schwankten bis zu 20 % um den Sollwert, für die Lyophilisate mit Mannitol 10 %/ Pluronic 0,1 % wurde ein 60 % höherer Wert im Vergleich zum Sollgehalt ermittelt. Für eine abschließende Bewertung der eingesetzten Maßnahmen zur Löslichkeitsverbesserung sind die erhaltenen Daten nicht ausreichend. Als Tendenz zeigte sich jedoch, dass mit Ethanol und Pluronic im Vergleich zu Lyophilisaten ohne Zusatz bessere Ergebnisse erzielt wurden. Der Einsatz von HP- β -CD zeigte hier keinen deutlichen Vorteil.

Der Latanoprostgehalt wird als zu niedrig bewertet, wenn mehr Latanoprost-gebundene Acetylcholinesterase an die Antikörper des Immunoassays gebunden wird. Mögliche Ursachen für einen zu niedrigen Gehalt können Inhaltsstoffe sein, die die Bindungsaffinität von Latanoprost zugunsten von Latanoprost-Acetylcholinesterase herabsetzen. Ein zu hoher Gehalt wird detektiert, wenn weniger Latanoprost-gebundene Acetylcholinesterase an die Antikörper gebunden wird. Für einen zu hohen Gehalt kommen daher als Ursachen die Hydrolyse von Latanoprost-Ester in Frage, da die Empfindlichkeit des Immunoassays für die freie Säure etwa viermal höher ist, oder Verunreinigungen, die an den Antikörper gebunden werden und die Bindungsaffinität der an Latanoprost gebundenen Acetylcholinesterase herabsetzen. Verunreinigungen können aus Gefäßen, durch nicht validierte Reinigungsverfahren, oder aus dem verwendeten Wasser stammen. Für die bei

Cayman Chemical erhaltenen Ergebnisse wird dies jedoch für unwahrscheinlich gehalten, da es sich um ein zertifiziertes Analysenlabor, das mit validierten Methoden arbeitet, handelt.

Der Enzymimmunoassay ist aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit ein attraktives Bestimmungsverfahren für Latanoprost. Bei den am Institut durchgeführten Versuchen zeigte sich jedoch, dass keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten wurden. Um den Enzymimmunoassay als Gehaltsbestimmungsmethode sicher anwenden zu können, müssten die Reinigungsmethoden für alle Geräte validiert werden und weitere Versuche zur Kompatibilität mit allen Hilfsstofflösungen durchgeführt werden. Aus Zeit- und Kostengründen konnte dies jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr stattfinden. Da die Gehaltsbestimmung mit dem EIA teuer und störanfällig ist, wäre sie für die Routineanalytik weniger geeignet. Exemplarisch wurde der Latanoprostgehalt von den zur Untersuchung der okularen Bioverfügbarkeit verwendeten Lyophilisaten mit der LC-MS Methode untersucht. Diese Methode liefert sichere Ergebnisse, für die Routineanalytik ist die Methode wegen der hohen laufenden Kosten des stabil markierten internen Standards nicht sinnvoll. Die Dosis der Trägerlyophilisate aus 10 %-iger Mannitollösung und einem 0,1 %-igen Zusatz Pluronic betrug im Mittel 0,63 µg, dies entspricht einem prozentualen mittleren Sollgehalt von 84 %.

Dass die erwartete Menge Latanoprost nicht analytisch nachgewiesen wurde, kann verschiedene Ursachen haben. Der Latanoprostgehalt in den Lyophilisaten ist, den HPLC und EIA Untersuchungen zufolge, im Vergleich zum Gehalt der Ausgangslösung etwa gleich, daher wird eine mögliche Gehaltsabnahme während des Gefriertrocknungsvorgangs ausgeschlossen. Da es sich um einen sehr lipophilen Arzneistoff handelt, sind Adsorptionseffekte vermutlich die Hauptursache dafür, dass der ermittelte Gehalt niedriger als der Sollgehalt ist. Zum einen kann Latanoprost während der Herstellung aus dem öligen Ausgangsmaterial an den Wänden der eingesetzten Gefäße und Geräte adsorbiert werden. Zum anderen können die Wirkstoffmoleküle aus der Lösung nach dem Auftropfen am lipophilen Material der Trägerfolie durch van-der-Waals-Kräfte gebunden werden, bevor sie durch das Einfrieren immobilisiert werden. Da bei der Herstellung mehrere Trägerfolien nacheinander mit einem

Tropfen beladen wurden, kann die Zeitdauer zwischen dem Auftropfen auf die Folie und dem Einfrieren der Tropfen für die zuerst beladenen Trägerfolien einige Minuten betragen. Beim Abstreifen verbleibt immer ein Rest des Lyophilisats mit dem Wirkstoff auf der Trägerfolie. Möglicherweise enthält dieser Rest dann einen relativ hohen Anteil Latanoprost.

Zur Vermeidung einer Unterdosierung durch Adsorption von Latanoprost könnte die Ausgangslösung für die Gefriertrocknung mit einem definierten Überschuss des Arzneistoffs hergestellt werden. Zusätzlich wäre das Vorspülen aller benötigten Geräte mit wirkstoffhaltiger Lösung zur Absättigung der Oberflächen sinnvoll. Die Adsorption an der Trägerfolie könnte durch Verkürzung der Zeitdauer zwischen dem Auftropfen auf die Trägerfolie und dem Einfrieren der Tröpfchen verringert werden, zum Beispiel durch die Verwendung von Mehrfachpipetten oder durch das sofortige Einfrieren einzelner Tröpfchen nach dem Aufbringen auf die Trägerfolie und anschließender Trocknung in einem Gefriertrocknungstunnel. Eine weitere Möglichkeit wäre die Beschichtung der verwendeten Trägerfolie, zum Beispiel mit einem monomolekularen Tensidfilm oder einem wasserlöslichen Polymer.

Eine andere Möglichkeit wäre, auf die Trägerfolie ganz zu verzichten, und für die Anwendung am Auge Sphärolyophilisate herzustellen. Diese sind auch bei der Anwendung einfacher zu handhaben.

Eine weitere denkbare Ursache dafür, dass der gemessene Gehalt niedriger als der Sollgehalt ist, könnten Instabilitäten von Latanoprost während der Herstellung sein. Im Rahmen der HPLC-Gehaltsbestimmungen wurde Latanoprost-Säure als wahrscheinlichstes Abbauprodukt durch hydrolytische Zersetzung nicht detektiert. Andere bekannte Abbauprodukte sind 15-keto-Latanoprost und dessen Hydrolyseprodukte [9,25]. Um das Vorhandensein weiterer Abbauprodukte auszuschließen, könnten diese mittels Massenspektrometrie, gekoppelt mit einem chromatographischen Trennverfahren, oder mit HPLC nach Entwicklung einer hinreichend selektiven Methode in den Lyophilisaten detektiert werden.

5.2.3 Okulare Bioverfügbarkeit am Kaninchenauge

Die Bioverfügbarkeit ist definiert als Ausmaß und Geschwindigkeit, mit der ein Arzneistoff aus einer Darreichungsform resorbiert wird und am Wirkort vorliegt. Typischerweise werden dazu Konzentrations-Zeit-Kurven im Plasma aufgezeichnet, da die meisten Arzneistoffe systemisch wirksam sind. Beim Vergleich von zwei Präparaten wird die relative Bioverfügbarkeit aus den AUCs im Plasma berechnet.

Latanoprost wird lokal am Auge verabreicht und durch die Cornea resorbiert, wobei es enzymatisch zur freien Säure hydrolysiert wird. Nach 1 bis 2 Stunden wird im Kammerwasser die maximale Konzentration von Latanoprost-Säure erreicht [125]. Daher wurde zum Vergleich der okularen Bioverfügbarkeit aus Trägerlyophilisaten und Xalatan[®]-Augentropfen der Gehalt freier Latanoprost-Säure in Kammerwasser bestimmt. Da eine Mehrfachentnahme von Kammerwasser und somit eine Aufzeichnung von Konzentrations-Zeit-Kurven am selben Individuum nicht möglich ist, wurden die Konzentrationen jeweils 100 Minuten nach Verabreichung der Präparate miteinander verglichen. Die zeitlich gestaffelte Entnahme einer oder mehrerer Proben von vielen Individuen kann zur Bestimmung des mittleren Konzentrationsprofils mit Hilfe von „sparse sampling“ Auswertungsmethoden der Populationspharmakokinetik ebenfalls bestimmt werden. Ein so hoher Aufwand war aber für diese erste orientierende Untersuchung nicht zu rechtfertigen.

Unter Berücksichtigung der Dosierung beträgt der berechnete Wert der relativen Bioverfügbarkeit etwa 1,3, zur vollständigen Auswertung sei auf den Ergebnisteil, Abschnitt 4.4.6, verwiesen. Dies bedeutet, dass das Testpräparat eine etwas bessere Bioverfügbarkeit als das Referenzpräparat besitzt. Nach einem Mittelwertsvergleich mit einem zweiseitigen t-Test besteht bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zubereitungen. Wegen der geringen Stichprobenanzahl und der großen Streuung besteht jedoch eine hohe Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese, dass die Daten aus derselben Grundgesamtheit stammen, anzunehmen obwohl sie nicht zutrifft. Die Berechnung des 90 % Konfidenzintervalls zeigt, dass die erhaltenen Werte außerhalb der Akzeptanzgrenzen von 80 bis 125 % liegen. Deshalb wird entschieden, dass die beiden Präparate nicht bioäquivalent sind.

Jedoch müssten für eine statistisch verlässliche Aussage wesentlich mehr Proben berücksichtigt werden, um den Effekt der Streuung zwischen den einzelnen Individuen zu vernachlässigen.

Die Bioverfügbarkeit von Trägerlyophilisaten ist abhängig von den Eigenschaften der verwendeten Hilfsstoffe und vom verwendeten Arzneistoff. Der wichtigste Transportweg für die Aufnahme von Arzneistoffen ist die passive Diffusion, daher spielen neben der Wasserlöslichkeit vor allem die Polarität, für die Verteilung zwischen wässriger Lösung und Hornhautoberfläche, und das Molekulargewicht des Arzneistoffs eine Rolle. Für den Arzneistoff Fluorescein-Natrium wurde von Abduljalil für die von Krasichkova hergestellten Trägerlyophilisate mit Hypromellose als Gerüstbildner eine drei- bis vierfach erhöhte Bioverfügbarkeit gegenüber wässrigen Augentropfen ermittelt [22]. Die okulare Bioverfügbarkeit für Latanoprost aus mannitolhaltigen Lyophilisaten ist verglichen mit Xalatan[®] Augentropfen wahrscheinlich gleichwertig oder etwas besser. Somit stellt sich die Frage, warum sich die beiden OLCS-Formulierungen hinsichtlich der Bioverfügbarkeit so stark unterscheiden. Verständlich wird dies, wenn man die chemischen Strukturen der beiden Arzneistoffe vergleicht. Wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben, sollten Arzneistoffe mit gutem Resorptionsvermögen am Auge sowohl unpolare als auch polare Eigenschaften besitzen. Unpolare Arzneistoffe penetrieren jedoch besser durch die Cornea als polare. Latanoprost besitzt aufgrund seiner Eigenschaften als unpolares Prodrug im Gegensatz zum polaren Fluorescein-Natrium ein verbessertes Penetrationsvermögen, sodass die Verweildauer der Zubereitung am Auge einen geringeren Einfluss besitzt als bei Fluorescein-Natrium.

Auch die verwendeten Hilfsstoffe können die Bioverfügbarkeit verändern. Der Einfluss des Gerüstbildners Hypromellose ist bei den fluoresceinhaltigen OLCS vermutlich geringer einzuschätzen als der Einfluss des Wirkstoffs. Hypromellose erhöht die Viskosität der Tränenflüssigkeit, bei der Anwendung wässriger Augentropfen wird so der Abfluss von überschüssiger Flüssigkeit durch die Tränen-Nasengänge verhindert. Bei der Applikation von Lyophilisaten wird jedoch keine zusätzliche Flüssigkeit ins Auge eingebracht, daher wird

dieser Effekt nicht so stark wie die Unterschiede in der Polarität der Arzneistoffe eingeschätzt.

Lyophilisate können konventionellen Augentropfen im Bezug auf die okulare Bioverfügbarkeit überlegen sein. Das Ausmaß der Verbesserung ist dabei abhängig von den physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs und der Lyophilisatmatrix.

5.3 Lyophilisate als Arzneimittel zur Anwendung am Auge

Lyophilisate bieten im Vergleich zu konventionellen Augentropfen einige Vorteile. Wässrige Augentropfen können Reizungen durch den Zusatz von Konservierungsmitteln und Puffern oder durch einen unphysiologischen pH-Wert, der bei wässrigen Lösungen unter Umständen erforderlich ist, um die chemische Stabilität des Wirkstoffs zu gewährleisten, hervorrufen. Dabei treten erhebliche Reizungen bei pH-Werten von unter 4 und pH-Werten von über 10 auf. Da Trägerlyophilisate praktisch wasserfrei sind, kann auf den Zusatz von Konservierungsmitteln zur Aufrechterhaltung der mikrobiologischen Stabilität verzichtet werden. Das Auftreten von konservierungsmittelbedingten Allergien, Reizungen oder Hornhautschäden nach der Anwendung über einen längeren Zeitraum kann so vermieden werden. Der Zusatz von Puffersalzen oder die Einstellung auf einen unphysiologischen pH-Wert ist aufgrund der Abwesenheit von Wasser in Lyophilisaten nicht notwendig. Die Lyophilisate sind daher gut verträglich. Dies zeigten auch Probandenstudien von Weichselbaum, die für pilocarpinhaltige Trägerlyophilisate eine verbesserte und für OLCS mit Tropicamid eine vergleichbare bis bessere subjektive Verträglichkeit gegenüber wässrigen Augentropfen nachweisen konnte [151].

Werden Lyophilisate mit Hilfsstoffen hergestellt, die nach dem Auflösen in der Tränenflüssigkeit einen Einfluss auf die Tonizität besitzen, sollte darauf geachtet werden, dass sie reizlos verträglich sind. Die Osmolalität der Tränenflüssigkeit beträgt etwa 300 mosmol/kg, jedoch werden Lösungen von 266 bis 640 mosmol/kg reizlos vertragen [16]. Durch Applikation und Auflösung eines OLCS in der Tränenflüssigkeit sollte daher der osmotisch aktive Anteil in

der Zubereitung so gewählt sein, dass der osmotische Druck der Tränenflüssigkeit einen Wert von 640 mosmol/kg nicht überschreitet.

Ein weiterer Vorteil ist die einfache Anwendung von Lyophilisaten. Die Applikation von Augentropfen bereitet besonders älteren Patienten Probleme. Dabei kann es zum Beispiel zur Mehrfachapplikation der Tropfen, zur Fehlapplikation, bei der der Tropfen nicht ins Auge gelangt, oder zu Verletzungen der Hornhaut durch den Tropfeinsatz kommen. Augentropfen werden ohne genaue Kenntnis des dosierten Volumens oder der Einzelmasse angewendet. Nur wenige Augentropfenflaschen sind mit einem präzisen Dosiertropfer ausgestattet, als Beispiel sei hier das Comod[®]-System (Ursapharm Arzneimittel GmbH, D-Saarbrücken) genannt. Durch die Einzeldosierung von OLCS oder einzeln verpackten Sphärolyophilisaten können Über- und Unterdosierungen durch Schwankungen in der Tropfendosierung vermieden werden.

Die Anwendung von Trägerlyophilisaten kann jedoch in Einzelfällen Probleme bereiten, da die Applikationstechnik erlernt werden muss und bei der Applikation von Feststoffen am Auge eine psychologische Hemmschwelle überwunden werden muss. Für die Zukunft ist daher die Anwendung von Sphärolyophilisaten, die Verwendung eines geeigneten Applikators mit hoher Dosierungsgenauigkeit vorausgesetzt, eine interessante Alternative. Das Versprühen der Partikel ist für die Patienten einfacher als das Abstreifen von Trägerlyophilisaten am Augenlid. Dabei werden Lyophilisatpartikel beim Versprühen in einem Luftstrom dispergiert und lösen sich schmerzfrei im Tränenfilm auf der Augenoberfläche. Diese einfache Anwendung bietet besondere Vorteile für Sehbehinderte oder Patienten mit eingeschränkten manuellen Fähigkeiten.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Tröpfchenlyophilisate zur Anwendung am Auge hergestellt und charakterisiert. Unter Tröpfchenlyophilisaten werden kleinteilige gefriergetrocknete Produkte zusammengefasst, die aus einzelnen Partikeln bestehen. Dabei werden zwei verschiedene Formen unterschieden. Zum einen gibt es Lyophilisate, die aus Haufwerken kugelförmiger Partikel bestehen und daher als Sphärolyophilisate bezeichnet werden. Zum anderen gibt es Lyophilisate, die aus einzelnen gefriergetrockneten Tröpfchen bestehen, die auf einer Trägerfolie haften. Diese Trägerlyophilisate sind für die Anwendung am Auge entwickelt worden und werden daher auch als OLCS (Ophthalmic Lyophilizate Carrier System) bezeichnet.

Der erste Teil der Arbeit umfasst die Entwicklung von Verfahrenstechniken zur Herstellung von Sphärolyophilisaten und deren Umsetzung mit geeigneten Prototypen sowie die Untersuchung ihrer physikochemischen Eigenschaften. Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet die Entwicklung von Trägerlyophilisaten mit dem in der Glaukomtherapie eingesetzten Wirkstoff Latanoprost, die Charakterisierung der dazu hergestellten Lyophilisate sowie die Untersuchung der okularen Verfügbarkeit aus Trägerlyophilisaten im Vergleich zu wässrigen Xalatan[®] - Augentropfen.

Sphärolyophilisate werden durch Versprühen wässriger Lösungen hergestellt. Die so erzeugten Tröpfchen werden im freien Fall eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

Verschiedene Verfahren zum Erzeugen von Tröpfchen wurden untersucht. Dabei erwies sich das Prinzip der Ink-Jet Technologie als geeignet zum Herstellen kleiner Tropfen mit einer engen Partikelgrößenverteilung. In einem 4x4x2x2 Faktorenversuchsplan wurde an Sphärolyophilisaten gezeigt, dass die Parameter Druck und Viskosität einen Einfluss auf die Partikelgröße haben und die Faktoren Viskosität und Oberflächenspannung die Breite der Verteilung beeinflussen. Während des freien Falls kommt es durch die Verringerung ihrer Anfangsgeschwindigkeit unmittelbar nach der Tropfenerzeugung zur Koaleszenz von Tröpfchen, was sich durch eine Veränderung der

Größenverteilung hin zu größeren Durchmessern sowohl bei Sprühbildern, die in verschiedenen Distanzen aufgenommen wurden, als auch bei den gefriergetrockneten Partikeln zeigt.

Zum Einfrieren wurden 2 Techniken an entsprechenden Prototypen getestet. Die Technik des vakuuminduzierten Einfrierens, die von Maier und Krasichkova für die Herstellung von OLCS eingesetzt wurde, war für die Herstellung von Sphärolyophilisaten nicht geeignet [74,88]. Gute Ergebnisse wurden beim Einfrieren von Tröpfchen in einem tiefkalten Trägergas bei Atmosphärendruck erzielt. Die gefrorenen Partikel wurden anschließend in einem konventionellen Gefriertrockner getrocknet. Mit diesem Verfahren können Sphärolyophilisate auf einfache Weise hergestellt werden.

Eine Weiterentwicklung dieser Technik stellt das Konzept zur atmosphärischen Gegenstrom-Tropfenstrahlgefrieretrocknung dar. Dabei werden Tröpfchen ebenfalls in einem kalten Gas eingefroren und anschließend in einem entgegengerichteten Strom trockenen Trägergases getrocknet. Während der Trocknung verringert sich ihre Dichte und sie steigen im Gasstrom auf. Aus dem Gasstrom werden sie abgetrennt, wenn sie eine kritische Dichte unterschritten haben. Durch diese Besonderheit kann ein kontinuierlicher Prozess gestaltet werden. An einem Prototyp wurden Versuche zur Temperaturverteilung und den Strömungsverhältnissen in den einzelnen Teilen der Anlage durchgeführt. Die Versuche dienen zur Bereitstellung von Daten für die Simulation des Trocknungsvorgangs mittels Computational Fluid Dynamics, die aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands in einem Folgeprojekt durchgeführt wird. Die Berechnungen sind notwendig, weil die Sedimentation und Trocknung der Tröpfchen eng miteinander zusammenhängen und daher in Einzelversuchen nicht untersucht werden können. Mit den Berechnungen sollen Aussagen zu den erforderlichen Trocknungsbedingungen der Partikel sowie der Optimierung der Apparategeometrie und Energieeffizienz erhalten werden.

Mit dem vereinfachten Verfahren wurden Sphärolyophilisate aus wässrigen Lösungen mit Mannitol (5%, 20% m/V) und Trehalose (7,5%, 20% m/V) als Gerüstbildner sowie Natriumhyaluronat (0,1% m/V) als viskositätserhöhendem

Zusatz hergestellt. Mannitol ist einer der am häufigsten eingesetzten Gerüstbildner in der Gefriertrocknung. Trehalose wird selten verwendet, ist aber als Hilfsstoff besonders interessant, da hiermit auch komplexere Arzneistoffe wie Proteine unter Erhalt ihrer Aktivität gefriergetrocknet werden können. Die physikochemischen Eigenschaften der Lyophilisate wurden untersucht, sie hängen im Wesentlichen von der Zusammensetzung und Konzentration der gewählten Hilfsstoffe ab.

Sphärolyophilisate werden im Gegensatz zu sprühgetrockneten Produkten, die durch schnelles Verdampfen des Lösungsmittels auch aufblähen oder kollabieren können, unter Erhalt ihrer Form gefriergetrocknet und bleiben daher kugelförmig. Die mittleren Durchmesser der Partikel liegen abhängig von der Zusammensetzung der Ausgangslösung im Bereich 290 von bis 460 μm . Spanfaktoren kleiner 1 zeigen, dass die Partikelgrößen eng verteilt sind. Alle hergestellten Sphärolyophilisate sind aufgrund ihrer geringen Feststoffkonzentration sehr porös. Die Mikrostruktur wird durch das Einfrierverhalten der Hilfsstoffe bestimmt. Sphärolyophilisate weisen insgesamt hohe spezifische Oberflächen mit Werten von 9 bis 22 m^2/g auf. Sie lassen sich innerhalb von Sekunden in Wasser rekonstituieren. Die Restfeuchte beträgt für mannitolhaltige Lyophilisate weniger als 1 % und für Zubereitungen mit Trehalose 5 bis 6 %. Die Lyophilisate wurden etwa 16 Stunden getrocknet, die Trocknungsdauer kann aber sicher verkürzt werden. Die Wasserdampfaufnahme bei Variation der Umgebungsfeuchte hängt von der Art des Gerüstbildners ab. Lyophilisate mit Mannitol nehmen bis zu relativen Feuchten von 90 % nahezu kein Wasser auf, während die mit Trehalose bereits ab 10 % relativer Feuchte Wasser anlagern. Lyophilisate mit Trehalose sollten daher unter Feuchtigkeitsausschluss gelagert werden.

Die Dichte von Sphärolyophilisaten kann durch Variation der Feststoffkonzentration eingestellt werden. Aufgrund der niedrigen Dichte besitzen Sphärolyophilisate einen geringen aerodynamischen Durchmesser, wie anhand des Sedimentationsverhaltens mannitolhaltiger Lyophilisate gezeigt wurde. Alle Zubereitungen weisen eine sehr gute Fließfähigkeit auf und sind daher auch für eine Weiterverarbeitung wie zum Beispiel maschinelle Abfüllprozesse geeignet.

Als eine mögliche Darreichungsform wurde die Anwendung von Sphärolyophilisaten am Auge gezeigt. Die Lyophilisate wurden als Einzeldosen in Blister abgefüllt und mit einem eigens konstruierten Applikator an Kunststoffkugeln mit befeuchteter Oberfläche und einem Durchmesser von 30 mm als Modelle des Augapfels appliziert. Sphärolyophilisate stellen damit neben Trägerlyophilisaten eine Alternative zu wässrigen Augentropfen dar.

Insgesamt können Sphärolyophilisate in der Pharmazie vielseitig angewendet werden. Vorteil der Herstellung mittels Sprühgefriertrocknung ist die mögliche Kontrolle der Eigenschaften der Sphärolyophilisate. Neben der beschriebenen Anwendung am Auge sind Pulver zur parenteralen Anwendung, die in Vials, Ampullen oder Spritzen abgefüllt werden können, weitere denkbare Arzneiformen. Nach Rekonstitution können sie sofort oder nach Verdünnung parenteral verabreicht werden. Sie eignen sich auch als perorale Arzneiformen, da die Lyophilisate gut in Kapseln oder Blister abgefüllt werden können, auch das Verpressen zu Tabletten ist möglich. Ein besonderes Potential bieten Sphärolyophilisate als Pulver zur Inhalation, denn aufgrund ihres geringen aerodynamischen Durchmessers sollten sie wie die bei Edwards beschriebenen „large porous particles“ ein ausgezeichnetes Abscheideverhalten in der Lunge aufweisen [50], vor allem, wenn es gelingt, sie monodispers herzustellen. Die Herstellung durch Sprühgefriertrocknung erhält dabei die Aktivität empfindlicher Arzneistoffe, wie zum Beispiel von Proteinen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Trägerlyophilisate mit dem Arzneistoff Latanoprost in den Einzeldosen 0,75 und 1,5 µg entwickelt. Die Entwicklung von Trägerlyophilisaten als neue gefriergetrocknete Einzeldosis-Arzneiform begann bereits vor etwa 15 Jahren. Vorteile für den Patienten sind die einfache Anwendung und die gute Verträglichkeit, da auf reizende Inhaltsstoffe wie Konservierungsmittel und Puffer verzichtet werden kann. In einem Tierversuch wurde in Zusammenarbeit mit M. Diestelhorst (Zentrum für Augenheilkunde, Universität Köln) die okulare Bioverfügbarkeit von Trägerlyophilisaten mit Latanoprost mit der des Handelspräparats Xalatan[®] im Kammerwasser von Kaninchen verglichen.

Latanoprost ist einer der am häufigsten in der Glaukomtherapie verwendeten Arzneistoffe. In wässriger Lösung ist es instabil und besonders empfindlich für hydrolytische Zersetzung. Wässrige Augentropfen mit Latanoprost müssen kühl und unter Lichtschutz gelagert werden [6,10]. Lyophilisate mit Latanoprost sind praktisch wasserfrei und besitzen damit eine erhöhte chemische und mikrobielle Stabilität im Vergleich zu wässrigen Lösungen.

Da die physikochemischen Eigenschaften der Lyophilisate von ihrer Zusammensetzung abhängen, wurden zunächst verschiedene wirkstofffreie Formulierungen von Trägerlyophilisaten geprüft. Dabei wurden hauptsächlich Hilfsstoffe zur Verbesserung der Löslichkeit eingesetzt. Als Gerüstbildner wurde Mannitol in 5 oder 10 %-iger Konzentration verwendet. Als Zusätze wurden Natriumhyaluronat (0,1 % m/V) zur Erhöhung der Viskosität sowie Pluronic (0,1 % m/V) und HP- β -CD (0,25 % m/V) zur Verbesserung der Löslichkeit gewählt. Zubereitungen, die Ethanol und tert-Butanol (5%, 10% V/V) als Cosolventien enthielten, wurden mit wässrigen Lösungen aus Mannitol (10%, 20% m/V) und Na-Hyaluronat (0,1% m/V) hergestellt.

Insgesamt weisen die Lyophilisate eine Restfeuchtigkeit um 1 % auf, lassen sich in wenigen Sekunden in Wasser rekonstituieren und nehmen erst ab einer relativen Luftfeuchte von 90 % Wasserdampf aus der Umgebung auf. Sie besitzen eine poröse Struktur, die abhängig vom Feststoffanteil ist. Die Mikrostruktur wird sowohl durch das Einfrierverhalten des Gerüstbildners als auch der Zusätze in der Rezeptur bestimmt.

Für die Anwendung von Trägerlyophilisaten am Auge sind die Haftfestigkeit auf der Trägerfolie und die Strukturfestigkeit der Lyophilisate wichtig. Diese Kriterien waren ausschlaggebend für die Wahl der Zusammensetzung zur Herstellung latanoprosthaltiger OLCS. Die Haftfestigkeit muss so hoch sein, dass sich die Lyophilisate nicht von der Trägerfolie lösen, sie darf jedoch nicht zu groß sein, da sie sich sonst bei der Applikation nicht von der Folie abstreifen lassen und sollte daher im von Weichselbaum gefundenen Bereich von 20 bis 200 mN liegen [151]. Lyophilisate aus 5 %-iger Mannitollösung ohne Zusätze sowie die Zubereitungen aus 10 %-iger Mannitollösung mit den Zusätzen Pluronic und HP- β -CD liegen im geeigneten Bereich. Die Strukturfestigkeit sollte hoch genug sein, dass eine intakte Lyophilisatstruktur ausgebildet wird,

aber nicht zu groß, damit sich die Lyophilisate beim Einbringen in den Bindehautsack schmerzfrei komprimieren lassen. Sie ist abhängig von der Art und dem Anteil der verwendeten Zusätze. Alle Lyophilisate sind hinreichend fest um ein intaktes Gerüst auszubilden. Die Strukturfestigkeit steigt mit zunehmendem Feststoffanteil. Natriumhyaluronat erhöht die Strukturfestigkeit von Lyophilisaten deutlich, daher weisen OLCS aus 10 %-iger Mannitollösung, der 0,1 % Na-Hyaluronat zugesetzt wurde, eine sehr hohe Festigkeit auf.

Als optimal für eine Anwendung am Auge wurden basierend auf den Ergebnissen zur Haft- und Strukturfestigkeit die Lyophilisate mit 5 %-igem Mannitolanteil ohne Zusätze und die Lyophilisate aus 10 %-iger Mannitollösung mit den Zusätzen Pluronic und HP- β -CD beurteilt. Von den Trägerlyophilisaten, die Ethanol und tert-Butanol als Cosolventien enthielten, wurde die Zusammensetzung aus 20 %-iger Mannitollösung und einem 10 %-igen Zusatz von Ethanol als am besten geeignet bewertet.

Die physikochemischen Eigenschaften von Lyophilisaten mit Latanoprost hängen von der Art und Konzentration der Hilfsstoffe ab, da der Wirkstoffanteil nur wenige tausendstel Prozent der Gesamtzubereitung ausmacht. Dies wurde exemplarisch an einer Zubereitung gezeigt.

Die Überprüfung des Gehalts der OLCS mit Latanoprost wurde mit verschiedenen Methoden wie Enzymimmunoassay, HPLC und LC-MS durchgeführt. Die zuverlässigste Methode zur Gehaltsbestimmung war die LC-MS. Der Gehalt der zur Untersuchung der okularen Bioverfügbarkeit eingesetzten Lyophilisate betrug mit 0,63 μ g etwa 16 % weniger als der Sollgehalt. Grund für den verringerten Gehalt ist vermutlich die Bindung des lipophilen Arzneistoffs an die Wände von Gefäßen und Geräten sowie an die Trägerfolie. Für die Zukunft wäre eine Änderung der Herstellung, zum Beispiel durch Einsetzen eines definierten Überschusses zur Absättigung der Oberflächen sinnvoll.

Die Untersuchungen zur okularen Bioverfügbarkeit aus Trägerlyophilisaten am Kaninchenauge zeigten, dass die Verfügbarkeit von Latanoprost aus Lyophilisaten äquivalent oder geringfügig besser als aus dem Referenzpräparat Xalatan[®] ist. Eine statistisch eindeutige Aussage ist aufgrund der geringen Probenanzahl noch nicht möglich.

Als Lyophilisate zur Anwendung am Auge sind sowohl Sphäro- als auch Trägerlyophilisate einsetzbar. Die Herstellung mittels Gefriertrocknung bietet die Möglichkeit, besonders hydrolyseempfindliche und thermolabile Arzneistoffe zu stabilisieren. Geeignete Zusätze wie Komplexbildner, Solubilisatoren und Cosolventien ermöglichen außerdem die Formulierung schwerlöslicher Arzneistoffe. Im Gegensatz zu wässrigen Augentropfen bieten Lyophilisate den Vorteil einer wasserfreien und damit chemisch stabilen und gegen mikrobielle Kontamination unempfindlichen Zubereitung. Auf für das Auge schädliche Zusätze wie Konservierungsmittel und Puffersalze für die pH-Wert Einstellung kann verzichtet werden. Reizungen durch unphysiologische pH-Werte, die bei wässrigen Augentropfen zur chemischen Stabilisierung des Wirkstoffs erforderlich sein können, werden vermieden. Sphärolyophilisate sind verglichen mit Trägerlyophilisaten mit einem geeigneten Applikator noch einfacher anzuwenden und daher besonders für Patienten mit eingeschränkten manuellen Fähigkeiten eine empfehlenswerte Alternative. Klinische Studien zur Verträglichkeit von OLCS zeigten, dass Lyophilisate am Auge gut toleriert werden. Aufgrund der beschriebenen Vorteile, dass Irritationen vermieden und die Compliance verbessert werden kann, stellen Tröpfchenlyophilisate eine überlegene Arzneiform zur Anwendung am Auge dar.

7 Anhang

7.1 Kalibrierkurven der Temperaturmessgeräte

Zur Korrektur der ermittelten Daten wurden für alle Temperaturmessgeräte Kalibrierkurven erstellt, die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt sind:

| Messgerät | m | n | R ² |
|------------------------------|--------|---------|----------------|
| Pt 100 | 0,9368 | 4,0544 | 0,9999 |
| Thermoelement 1 | 1,0418 | -1,2298 | 0,9998 |
| Thermoelement 2 | 1,0399 | -1,2028 | 0,9997 |
| Thermoelement 3 | 1,0477 | -1,3289 | 0,9997 |
| Thermometer Kryostat K 75 | 1,0477 | -3,2622 | 0,9998 |

Tab. 7-1 Kalibriergleichungen der verwendeten Temperaturmessgeräte $f(x)=mx+n$

7.2 Charakterisierung von Einzelkomponenten Prototyp III

7.2.1 Temperierung der Kryostaten

Zur Bestimmung der Minimaltemperatur wurden die Temperaturprofile der Kryostaten bei der kleinstmöglichen einstellbaren Temperatur aufgezeichnet. Die zum Erreichen dieser Temperatur benötigte Vorkühlzeit wurde ermittelt.

Tisch-Kryomat Typ TK 30 D

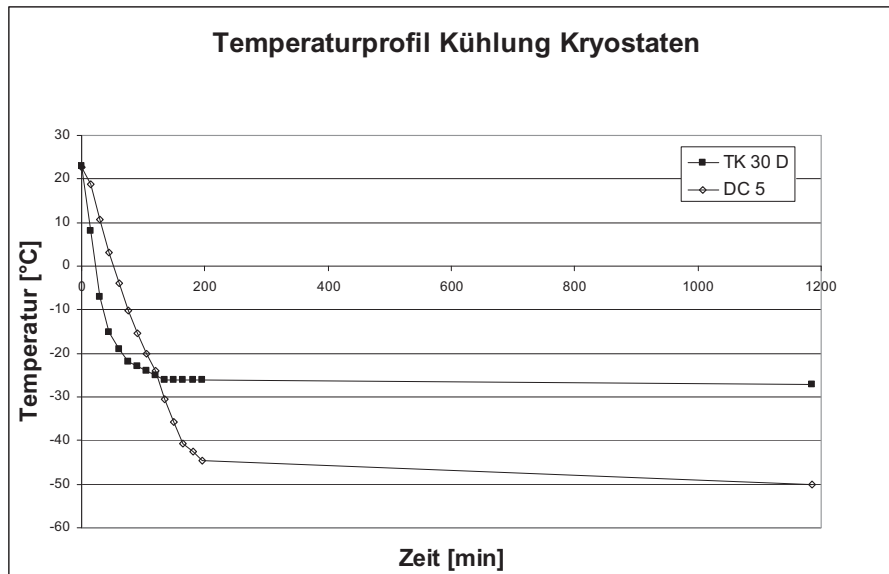
Minimaltemperatur: -27 °C

Vorkühlzeit: ca. 120 min

Thermostat Haake DC5

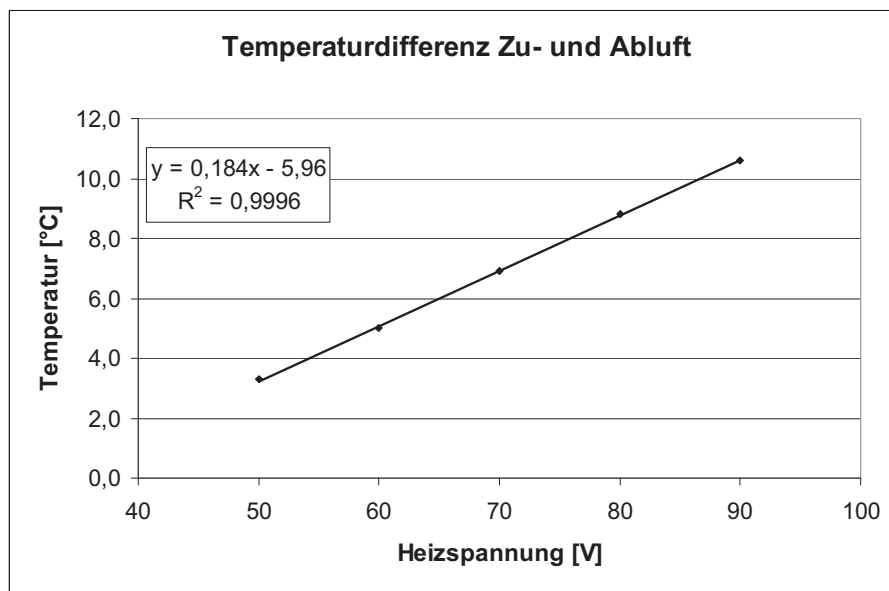
Minimaltemperatur: -50 °C

Vorkühlzeit: ca. 200 min



7.2.2 Regelung des Heizstabs

Zur Regelung der Heizung wird eine externe Spannungsversorgung benutzt. Die für die Temperaturänderung benötigte Spannung wurde durch Aufnahmen der Temperaturdifferenz zwischen Zu- und Abluft ermittelt. Mit der angegebenen Gleichung kann die einzustellende Spannung für die jeweils benötigte Temperatur berechnet werden.



7.2.3 Lüfter

Zum Betrieb des Gebläses wurden über die angelegte Spannung regelbare Computerlüfter verwendet. Für verschiedene Spannungen wurde der entsprechende Volumenstrom ermittelt. Dazu wurde die Strömungsgeschwindigkeit direkt hinter dem Gebläsebauteil gemessen und der Volumenstrom errechnet (MW aus minimalen und maximalen Werten im Zeitraum von 30 s). Zur Geometrie und Lokalisation des Gebläsebauteils in der ACD-Anlage siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Thermaltake Smart Case Fan II klein:

Maße: 80x80x25 mm

Die Leistung des Lüfters wird über einen Widerstand (angelegte Spannung) reguliert. Die Leistung nimmt ab, wenn die Steuerspannung erhöht wird.

Leistungsmaximum: 0,00 Volt

Leistungsminimum: 3,8 Volt

Leistungsaufnahme: 0,48 bis 4,80 W

Drehzahl: $1300 \pm 10 \text{ \% min}^{-1}$ (20 °C), $\sim 4800 \pm 10 \text{ \% min}^{-1}$ (55 °C)

Minimaler Volumenstrom: 1,5 L/s

Maximaler Volumenstrom: 4,5 L/s

Thermaltake Smart Case Fan II groß:

Maße: 120x120x25 mm

Die Leistung des Lüfters wird über einen Widerstand (angelegte Spannung) reguliert. Die Leistung nimmt ab, wenn die Steuerspannung erhöht wird.

Leistungsmaximum: 0,00 Volt

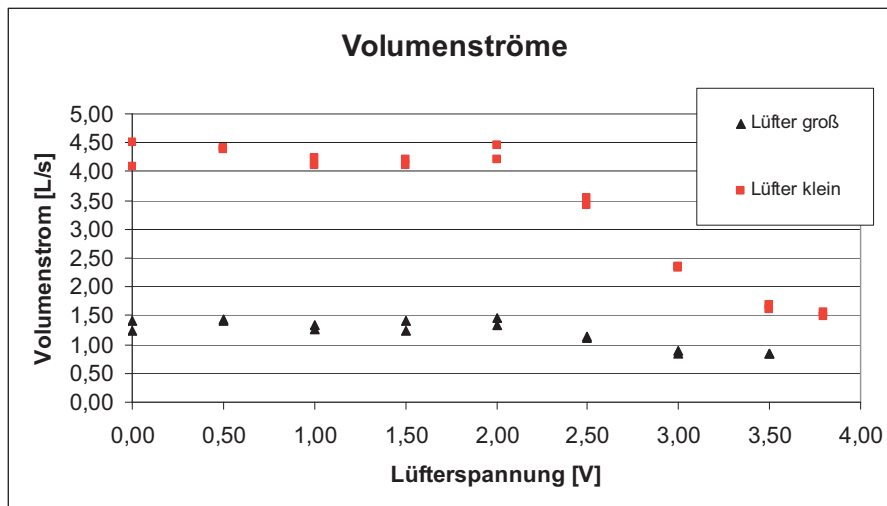
Leistungsminimum: 3,5 Volt

Leistungsaufnahme: 0,96 bis 5,76 W

Drehzahl: $800 \pm 400 \text{ min}^{-1}$ (20 °C), $\sim 2650 \pm 10 \text{ \% min}^{-1}$ (55 °C)

Minimaler Volumenstrom: 0,85 L/s

Maximaler Volumenstrom: 1,4 L/s



Im Vergleich wurden beim Betrieb des großen Lüfters geringere Volumenströme gemessen als bei dem kleinen Modell. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der große Lüfter nicht genügend Druck aufbaut, um den durch die Querschnittsverengung bedingten Widerstand zu überwinden.

Vario-Pro® 3214 JH3:

Die Leistung des Lüfters wird direkt über die angelegte Spannung reguliert. Die Leistung nimmt zu, wenn die Steuerspannung erhöht wird.

Leistungsmaximum: 26 Volt

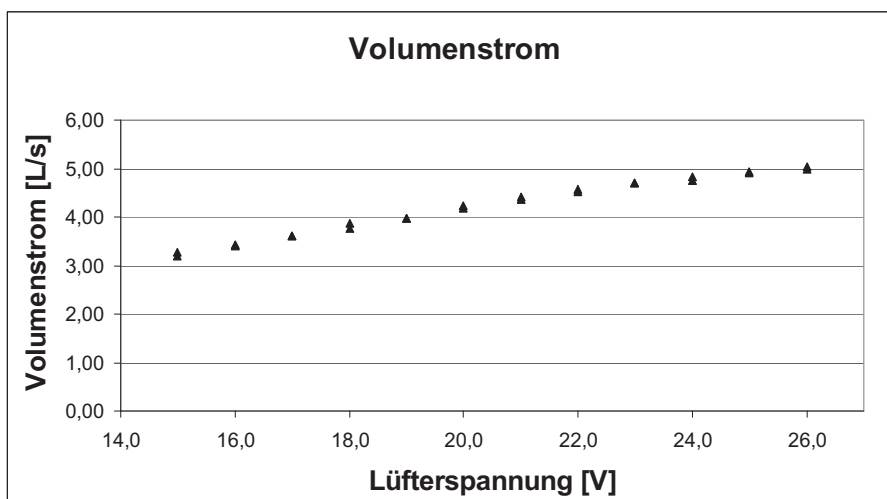
Leistungsminimum: 15 Volt

Leistungsaufnahme: 30 W (bei 24 V)

Drehzahl: 11000 min⁻¹

Minimaler Volumenstrom: 3,2 L/s

Maximaler Volumenstrom: 5,0 L/s



7.3 Ergebnisse für die statistische Auswertung der Faktorenversuchspläne

7.3.1 Partikelgrößenverteilung von Sphärolyophilisaten

In der folgenden Tabelle sind die erhaltenen Ergebnisse für den Median der Partikeldurchmesser und die Breite der Verteilung in Abhängigkeit der Betriebsparameter der Düse (Druck, Frequenz) sowie der Eigenschaften der Lösungen (Viskosität, Oberflächenspannung) aufgeführt. Die Versuche wurden nach einem 4x4x2x2 Faktorenversuchsplan durchgeführt. Dabei wurde der Partikeldurchmesser von jeweils 300 bis 500 Partikeln mittels Bildanalyse bestimmt. Die Ergebnisse wurden für die statistische Berechnung in Abschnitt 4.3.2.2 zugrunde gelegt.

| Schema | Druck [mbar] | Frequenz [kHz] | Viskosität | Oberflächen- spannung | x_{50} [μm] | Span - Faktor |
|--------|--------------|----------------|------------|--------------------------|----------------------------|------------------|
| 1111 | 50 | 34 | niedrig | niedrig | 382 | 0,61 |
| 1112 | 50 | 34 | niedrig | hoch | 264 | 0,60 |
| 1121 | 50 | 34 | hoch | niedrig | 423 | 0,61 |
| 1122 | 50 | 34 | hoch | hoch | 502 | 0,69 |
| 1211 | 50 | 52 | niedrig | niedrig | 360 | 0,61 |
| 1212 | 50 | 52 | niedrig | hoch | 360 | 0,37 |
| 1221 | 50 | 52 | hoch | niedrig | 423 | 0,74 |
| 1222 | 50 | 52 | hoch | hoch | 406 | 0,55 |
| 1311 | 50 | 62 | niedrig | niedrig | 348 | 0,57 |
| 1312 | 50 | 62 | niedrig | hoch | 386 | 0,52 |
| 1321 | 50 | 62 | hoch | niedrig | 440 | 0,66 |
| 1322 | 50 | 62 | hoch | hoch | 501 | 0,66 |
| 1411 | 50 | 73 | niedrig | niedrig | 333 | 0,59 |
| 1412 | 50 | 73 | niedrig | hoch | 374 | 0,53 |
| 1421 | 50 | 73 | hoch | niedrig | 389 | 0,73 |

| Schema | Druck [mbar] | Frequenz [kHz] | Viskosität | Oberflächen- spannung | x_{50} [μm] | Span - Faktor |
|--------|-----------------|-------------------|------------|--------------------------|----------------------------|------------------|
| 1422 | 50 | 73 | hoch | hoch | 367 | 0,81 |
| 2111 | 100 | 34 | niedrig | niedrig | 321 | 0,60 |
| 2112 | 100 | 34 | niedrig | hoch | 278 | 0,60 |
| 2121 | 100 | 34 | hoch | niedrig | 335 | 0,60 |
| 2122 | 100 | 34 | hoch | hoch | 308 | 0,57 |
| 2211 | 100 | 52 | niedrig | niedrig | 286 | 0,55 |
| 2212 | 100 | 52 | niedrig | hoch | 278 | 0,55 |
| 2221 | 100 | 52 | hoch | niedrig | 405 | 0,58 |
| 2222 | 100 | 52 | hoch | hoch | 314 | 0,60 |
| 2311 | 100 | 62 | niedrig | niedrig | 303 | 0,57 |
| 2312 | 100 | 62 | niedrig | hoch | 290 | 0,49 |
| 2321 | 100 | 62 | hoch | niedrig | 392 | 0,67 |
| 2322 | 100 | 62 | hoch | hoch | 303 | 0,53 |
| 2411 | 100 | 73 | niedrig | niedrig | 261 | 0,66 |
| 2412 | 100 | 73 | niedrig | hoch | 291 | 0,82 |
| 2421 | 100 | 73 | hoch | niedrig | 377 | 0,67 |
| 2422 | 100 | 73 | hoch | hoch | 307 | 0,81 |
| 3111 | 150 | 34 | niedrig | niedrig | 255 | 0,55 |
| 3112 | 150 | 34 | niedrig | hoch | 243 | 0,51 |
| 3121 | 150 | 34 | hoch | niedrig | 258 | 0,67 |
| 3122 | 150 | 34 | hoch | hoch | 260 | 0,57 |
| 3211 | 150 | 52 | niedrig | niedrig | 250 | 0,61 |
| 3212 | 150 | 52 | niedrig | hoch | 245 | 0,53 |
| 3221 | 150 | 52 | hoch | niedrig | 261 | 0,75 |
| 3222 | 150 | 52 | hoch | hoch | 387 | 0,46 |

| Schema | Druck [mbar] | Frequenz [kHz] | Viskosität | Oberflächen- spannung | x ₅₀ [µm] | Span - Faktor |
|--------|-----------------|-------------------|------------|--------------------------|----------------------|------------------|
| 3311 | 150 | 62 | niedrig | niedrig | 253 | 0,59 |
| 3312 | 150 | 62 | niedrig | hoch | 268 | 0,49 |
| 3321 | 150 | 62 | hoch | niedrig | 274 | 0,69 |
| 3322 | 150 | 62 | hoch | hoch | 385 | 0,70 |
| 3411 | 150 | 73 | niedrig | niedrig | 252 | 0,66 |
| 3412 | 150 | 73 | niedrig | hoch | 285 | 0,48 |
| 3421 | 150 | 73 | hoch | niedrig | 278 | 0,69 |
| 3422 | 150 | 73 | hoch | hoch | 403 | 0,55 |
| 4111 | 200 | 34 | niedrig | niedrig | 233 | 0,86 |
| 4112 | 200 | 34 | niedrig | hoch | 221 | 0,50 |
| 4121 | 200 | 34 | hoch | niedrig | 247 | 0,53 |
| 4122 | 200 | 34 | hoch | hoch | 360 | 0,61 |
| 4211 | 200 | 52 | niedrig | niedrig | 227 | 0,85 |
| 4212 | 200 | 52 | niedrig | hoch | 239 | 0,67 |
| 4221 | 200 | 52 | hoch | niedrig | 289 | 0,64 |
| 4222 | 200 | 52 | hoch | hoch | 356 | 0,57 |
| 4311 | 200 | 62 | niedrig | niedrig | 233 | 0,63 |
| 4312 | 200 | 62 | niedrig | hoch | 242 | 0,49 |
| 4321 | 200 | 62 | hoch | niedrig | 264 | 0,63 |
| 4322 | 200 | 62 | hoch | hoch | 394 | 0,74 |
| 4411 | 200 | 73 | niedrig | niedrig | 263 | 0,73 |
| 4412 | 200 | 73 | niedrig | hoch | 248 | 0,55 |
| 4421 | 200 | 73 | hoch | niedrig | 276 | 0,62 |
| 4422 | 200 | 73 | hoch | hoch | 399 | 0,84 |

Tab. 7-2 Mittlere Partikelgröße und Span-Faktor von Sphärolyophilisaten für die statistische Bewertung der Untersuchung der Einflussfaktoren Druck, Frequenz, Viskosität und Oberflächenspannung (Viskosität niedrig: 1,5 mPas hoch: 25 mPas, Oberflächenspannung niedrig: 48-49 mN/mm, hoch: 72-74 mN/mm)

7.3.2 Spezifische Oberfläche von Sphärolyophilisaten

Die für die statistische Berechnung in Abschnitt 4.3.3.4 zugrunde gelegten Werte für die spezifische Oberfläche sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Schema | Feststoffkonzentration | Gerüstbildner | Viskositäts-erhöhender Zusatz | Spezifische Oberfläche [m ² /g] |
|--------|------------------------|---------------|-------------------------------|--|
| 112 | niedrig | Mannitol | kein | 15,63 |
| 112 | niedrig | Mannitol | kein | 15,61 |
| 112 | niedrig | Mannitol | kein | 14,73 |
| 111 | niedrig | Mannitol | HA | 16,56 |
| 111 | niedrig | Mannitol | HA | 16,18 |
| 111 | niedrig | Mannitol | HA | 15,82 |
| 122 | niedrig | Trehalose | kein | 18,56 |
| 122 | niedrig | Trehalose | kein | 19,35 |
| 122 | niedrig | Trehalose | kein | 17,83 |
| 121 | niedrig | Trehalose | HA | 15,41 |
| 121 | niedrig | Trehalose | HA | 14,04 |
| 121 | niedrig | Trehalose | HA | 15,23 |
| 212 | hoch | Mannitol | kein | 9,85 |
| 212 | hoch | Mannitol | kein | 9,37 |
| 212 | hoch | Mannitol | kein | 10,09 |
| 211 | hoch | Mannitol | HA | 10,17 |
| 211 | hoch | Mannitol | HA | 10,35 |
| 211 | hoch | Mannitol | HA | 9,71 |
| 222 | hoch | Trehalose | kein | 21,95 |
| 222 | hoch | Trehalose | kein | 21,98 |
| 222 | hoch | Trehalose | kein | 20,45 |

| Schema | Feststoff- konzentration | Gerüstbildner | Viskositäts- erhöhender Zusatz | Spezifische Oberfläche [m²/g] |
|---------------|-------------------------------------|----------------------|---|---|
| 221 | hoch | Trehalose | HA | 10,12 |
| 221 | hoch | Trehalose | HA | 10,01 |
| 221 | hoch | Trehalose | HA | 9,18 |

Tab. 7-3 Spezifische Oberfläche von Sphärolyophilisaten für die statistische Bewertung der Einflussfaktoren Feststoffkonzentration, Gerüstbildner und viskositätserhöhender Zusatz

8 Literaturverzeichnis

- [1] "Guide to Inspections of Lyophilization of Parenterals", FDA, USA-Silver Spring (MD) (1993)
- [2] "Lyophilization of Biopharmaceuticals", Costantino, H. R. and Pikal, M. J. (Hrsg.), American Association of Pharmaceutical Scientists, USA-Arlington (VA) (2004)
- [3] "Product Monograph Xalatan", Pfizer Canada Inc., CDN-Kirkland (2004)
- [4] "ABDA Wirkstoffdossier Latanoprost", Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI), D-Köln (2005)
- [5] "Lyophilisation. Seminarunterlagen", APV Seminar, CH-Basel (30-11-2005)
- [6] "Fachinformation Xalatan 0,005% Augentropfen", Rote Liste® Service GmbH, D-Berlin (2009)
- [7] "Product Information Latanoprost", Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor (2009)
- [8] "Guideline on the investigation of bioequivalence", European Medicines Agency (CHMP), UK-London (2010)
- [9] "Related products of Latanoprost", Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor (MI), www.caymanchem.com (2010)
- [10] "Fachinformation Xalacom Augentropfen", Rote Liste® Service GmbH, D-Berlin (2009)
- [11] "Note for Guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence", European Medicines Agency (CPMP), UK-London (2001)

- [12] "Latanoprost EIA Kit Booklet", Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor (MI) (2008)
- [13] "Fließverhalten", in *Arzneibuch-Kommentar*, 16. Lfg., Bracher, F. *et al.* (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, D-Stuttgart (2004)
- [14] "Messung des Kontaktwinkels", Krüss GmbH, D-Hamburg, www.kruss.de (2010)
- [15] "Hilfsstoffverzeichnis", in *Rote Liste® Arzneimittelverzeichnis für Deutschland*, 50. Lfg., ROTE-LISTE®-Sekretariat (Hrsg.), Rote Liste® Service GmbH, D-Frankfurt/Main (2010)
- [16] "Ocular therapeutics and drug delivery: a multi-disziplinary approach", Reddy, I. K. (Hrsg.), Technomic Publishing Company Inc., USA-Lancaster (PA) (1996)
- [17] "Impurities: Guideline for residual solvents", ICH Secretariat, CH-Geneva (2009)
- [18] "GMP cell encapsulation", INOTECH Biotechnologies Ltd., CH-Basel, www.inotech.ch (2009)
- [19] "Air Properties", The Engineering ToolBox 2005, www.engineeringtoolbox.com (6-12-2007)
- [20] "Europäisches Arzneibuch 6.0", European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, F-Strasbourg (2008)
- [21] "Zubereitungen zur Anwendung am Auge, Ophthalmica", in *Arzneibuch-Kommentar*, 30. Lfg., Bracher, F. *et al.* (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, D-Stuttgart (2008)
- [22] Abduljalil, K. *et al.*, "Modelling ocular pharmacokinetics of fluorescein administered as lyophilisate or conventional eye drops", *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **64** (5), 521-529 (2008)

- [23] Anders, K., Roth, N. & Frohn, A., "Operation Characteristics of Vibrating-Orifice Generators - the Coherence Length", *Particle & Particle Systems Characterization* **9** (1), 40-43 (1992)
- [24] Antohe, BV & Wallace, DB, "Ink-Jet as a manufacturing method for drug delivery applications", Proceedings of the International Manufacturing Science And Engineering Conference, USA-Evanston (IL) (2008)
- [25] Bandyopadhyay, P., "Case Study: Latanoprost: Isopropylester of a Prostaglandin F2a Analog", in *Prodrugs Challenges and Rewards Part 1*, Stella, V. J. *et al.* (Hrsg.), Springer New York, USA-New York (NY) 1281-1288 (2007)
- [26] Banga, KA, "Therapeutic Peptides and Proteins", CRC Press, Taylor and Francis Group, USA-Boca Raton (FL) (2006)
- [27] Barley, J, "Technical Note: Basic principles of freeze drying", SP Scientific, USA-Stone Ridge (NY) (2009)
- [28] Bashir, J. A. & Avis, K. E., "Evaluation of Excipients in Freeze-Dried Products for Injection", *Bulletin of the Parenteral Drug Association* **27** (2), 68-83 (1978)
- [29] Basu, S. & Sjöquist, B., "Development of a radioimmunoassay for latanoprost and its application in a long-term study in monkeys", *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **55** (6), 427-432 (1996)
- [30] Baudouin, C., "Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma", *Acta Ophthalmologica* **86** (7), 716-726 (2008)
- [31] Bauer, KH, Frömring, K-H & Führer, C, "Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, D-Stuttgart (2006)

- [32] Brandenberger, H., Nussli, D., Piech, V. & Widmer, F., "Monodisperse particle production: A method to prevent drop coalescence using electrostatic forces", *Journal of Electrostatics* **45** (3), 227-238 (1999)
- [33] Brazier-Smith, P. R., Latham, J. & Jennings, S. G., "Interaction of Falling Water Drops - Coalescence", *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences* **326** (1566), 393-& (1972)
- [34] Brenn, G., Durst, F. & Tropea, C., "Monodisperse sprays for various purposes - Their production and characteristics", *Particle & Particle Systems Characterization* **13** (3), 179-185 (1996)
- [35] Brulls, M., Folestad, S., Sparen, A. & Rasmuson, A., "In-situ near-infrared spectroscopy monitoring of the lyophilization process", *Pharmaceutical Research* **20** (3), 494-499 (2003)
- [36] Chen, A. U. & Basaran, O. A., "A new method for significantly reducing drop radius without reducing nozzle radius in drop-on-demand drop production", *Physics of Fluids* **14** (1), L1-L4 (2002)
- [37] Clasen, C., Bico, J., Entov, V. M., and McKinley, G. H., "Video-rheology - Studying the Dripping, Jetting, Breaking and "Gobbling" of Polymeric Liquid Threads", Proceedings XIVth International Congress on Rheology, (2004)
- [38] Clasen, C., Bico, J., Entov, V. M. & McKinley, G. H., "'Gobbling drops': the jetting-dripping transition in flows of polymer solutions", *Journal of Fluid Mechanics* **636** , 5-40 (2009)
- [39] Claussen, I. C., Ustad, T. S., Strommen, I. & Waide, P. M., "Atmospheric freeze drying - A review", *Drying Technology* **25** (4-6), 947-957 (2007)
- [40] Clift, R, Grace, JR & Weber, ME, "Bubbles, Drops and Particles", Dover Publications, USA-Mineola (NY) (2005)

- [41] Costantino, H. R. *et al.*, "Protein spray-freeze drying. Effect of atomization conditions on particle size and stability", *Pharmaceutical Research* **17** (11), 1374-1383 (2000)
- [42] Daniels, R., "Galenische Tricks für die Anwendung am Auge", *Pharmazeutische Zeitung* (19) (2003)
- [43] Del Valle, E. M. M., "Cyclodextrins and their uses: a review", *Process Biochemistry* **39** (9), 1033-1046 (2004)
- [44] DePonte, D. P. *et al.*, "Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams", *Journal of Physics D-Applied Physics* **41** (19) (2008)
- [45] Diestelhorst, M., Grunthal, S. & Süverkrüp, R., "Dry Drops: a new preservative-free drug delivery system", *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **237** (5), 394-398 (1999)
- [46] Diestelhorst, M. *et al.*, "The microspray: A new ocular drug delivery device", *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **46** (2005)
- [47] Dinslage, S., Diestelhorst, M., Weichselbaum, A. & Süverkrüp, R., "Lyophilisates for drug delivery in ophthalmology: pharmacokinetics of fluorescein in the human anterior segment", *British Journal of Ophthalmology* **86** (10), 1114-1117 (2002)
- [48] Duft, D. & Leisner, T., "Laboratory evidence for volume-dominated nucleation of ice in supercooled water microdroplets", *Atmospheric Chemistry and Physics* **4** , 1997-2000 (2004)
- [49] Dye, J. E. & Hobbs, P. V., "Influence of Environmental Parameters on Freezing and Fragmentation of Suspended Water Drops", *Journal of the Atmospheric Sciences* **25** (1), 82-& (1968)
- [50] Edwards, D. A. *et al.*, "Large porous particles for pulmonary drug delivery", *Science* **276** (5320), 1868-1871 (1997)

- [51] Findlay, J. W. A. & Dillard, R. F., "Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays", *Aaps Journal* **9** (2), E260-E267 (2007)
- [52] Franks, F., "Freeze-Drying - from Empiricism to Predictability", *Cryo-Letters* **11** (2), 93-110 (1990)
- [53] Furrer, P. & Gurny, R., "Ophthalmika - neue Formulierungskonzepte", in *Innovative Arzneiformen*, Mäder, K. & Weidenauer, U. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, D-Stuttgart 323-344 (2010)
- [54] Gieseler, H. *et al.*, "Pharmaceutical technology - Evaluation of tunable diode laser absorption spectroscopy for in-process water vapor mass flux measurements during freeze drying", *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96** (7), 1776-1793 (2007)
- [55] Gonzalez, J. R. *et al.*, "Comparison of the stability, efficacy, and adverse effect profile of the innovator 0.005% latanoprost ophthalmic solution and a novel cyclodextrin-containing formulation", *Journal of Clinical Pharmacology* **47** (1), 121-126 (2007)
- [56] Greiff, D., "Protein Structure and Freeze-Drying - Effects of Residual Moisture and Gases", *Cryobiology* **8** (2), 145-& (1971)
- [57] Grunthal, S., "Dry Drops- Entwicklung und Prüfung eines Trockengel-Applikators zur Anwendung am Auge", Dissertation, D-Bonn (1996)
- [58] Hardarson, S. H. *et al.*, "Ocular powder: Dry topical formulations of timolol are well tolerated in rabbits", *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* **22** (5), 340-346 (2006)
- [59] Heinzl, J. & Hertz, C. H., "Ink-Jet Printing", in *Advances in Imaging and Electron Physics*, 91-171 (1985)
- [60] Heldman, D. R. & Hohner, G. A., "Analysis of Atmospheric Freeze-Drying", *Journal of Food Science* **39** (1), 147-155 (1974)

- [61] Her, L. M. & Nail, S. L., "Measurement of Glass-Transition Temperatures of Freeze-Concentrated Solutes by Differential Scanning Calorimetry", *Pharmaceutical Research* **11** (1), 54-59 (1994)
- [62] Hindmarsh, J. P. *et al.*, "Imaging droplet freezing using MRI", *Chemical Engineering Science* **59** (10), 2113-2122 (2004)
- [63] Hindmarsh, J. P., Russell, A. B. & Chen, X. D., "Experimental and numerical analysis of the temperature transition of a freezing food solution droplet", *Chemical Engineering Science* **59** (12), 2503-2515 (2004)
- [64] Hu, J. H. *et al.*, "Improvement of dissolution rates of poorly water soluble APIs using novel spray freezing into liquid technology", *Pharmaceutical Research* **19** (9), 1278-1284 (2002)
- [65] Jarvinen, K., Jarvinen, T. & Urtti, A., "Ocular Absorption Following Topical Delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews* **16** (1), 3-19 (1995)
- [66] Jennings, TA, "Lyophilization: Introduction and Basic Principles", Interpharm Press, USA-Denver (Colorado) (1999)
- [67] Jessen, C., GEA Niro GmbH, Persönliche Kommunikation (28-8-2009)
- [68] John, W., "The Characteristics of Environmental and Laboratory-Generated Aerosols", in *Aerosol Measurement*, Willecke, K. & Baron, P. (Hrsg.), Van Nostrand Reinhold, USA-New York (NY) 54-76 (1993)
- [69] Keipert, S., "Etablierte und neue Konzepte zur Optimierung von Ophthalmica", *Pharmazeutische Zeitung* **139** (8), 567-576 (1994)
- [70] Kramer, B. *et al.*, "Homogeneous nucleation rates of supercooled water measured in single levitated microdroplets", *Journal of Chemical Physics* **111** (14), 6521-6527 (1999)
- [71] Krämer, J., Siewert, M., Voith, G. & Blume, H., "Verträglichkeit von Augentropfen - ein In-vitro-Vergleich", *Pharmazeutische Zeitung* **137** (30), 2270-2274 (1992)

- [72] Kramer, M., "Innovatives Einfrierverfahren zur Minimierung der Prozesszeit von Gefriertrocknungszyklen", Dissertation, D-Erlangen-Nürnberg (1999)
- [73] Kramer, M., Sennhenn, B. & Lee, G., "Freeze-drying using vacuum-induced surface freezing", *Journal of Pharmaceutical Sciences* **91** (2), 433-443 (2002)
- [74] Krasichkova, O., "Trägerlyophilisate für die Augenheilkunde", Dissertation, D-Bonn (2006)
- [75] Krischer, O & Kröll, K, "Die wissenschaftlichen Grundlagen der Trocknungstechnik", Springer Verlag OHG, D - Berlin/ Göttingen/ Heidelberg (1963)
- [76] Kruss, B., "Prozeßparameter und ihre Auswirkungen auf die Produktqualität", in *Lyophilisation*, Essig, D. & Oschmann, R. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, D-Stuttgart 85-102 (1993)
- [77] Lachmann, B, "Validierung der aseptischen Herstellung von Trägerlyophilisaten", Diplomarbeit, D-Bonn (2006)
- [78] Le Boultais, C. *et al.*, "Ophthalmic drug delivery systems - Recent advances", *Progress in Retinal and Eye Research* **17** (1), 33-58 (1998)
- [79] Le, H. P., "Progress and trends in ink-jet printing technology", *Journal of Imaging Science and Technology* **42** (1), 49-62 (1998)
- [80] Liapis, A. I. & Bruttini, R., "A mathematical model for the spray freeze drying process: The drying of frozen particles in trays and in vials on trays", *International Journal of Heat and Mass Transfer* **52** (1-2), 100-111 (2009)
- [81] Loftsson, T. & Brewster, M. E., "Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization", *Journal of Pharmaceutical Sciences* **85** (10), 1017-1025 (1996)

- [82] Loftsson, T. & Stefansson, E., "Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye", *Acta Ophthalmologica Scandinavica* **80** (2), 144-150 (2002)
- [83] Lohse, M. J., "Arzneiverordnungsreport 2008", in *Arzneiverordnungsreport 2008*, Schwabe U. & Paffrath D. (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, D-Heidelberg (2008)
- [84] Lux, A., Maier, S., Dinslage, S., Süverkrüp, R. & Diestelhorst, M., "A comparative bioavailability study of three conventional eye drops versus a single lyophilisate", *British Journal of Ophthalmology* **87** (4), 436-440 (2003)
- [85] Maa, Y. F., Ameri, M., Shu, C., Payne, L. G. & Chen, D. X., "Influenza vaccine powder formulation development: Spray-freeze-drying and stability evaluation", *Journal of Pharmaceutical Sciences* **93** (7), 1912-1923 (2004)
- [86] Maa, Y. F. & Costantino, H. R., "Spray Freeze-drying of Biopharmaceuticals: Applications and Stability Considerations", in *Lyophilization of biopharmaceuticals*, Costantino, H. R. & Pikal, M. J. (Hrsg.), American Association of Pharmaceutical Scientists, USA-Arlington (VA) 519-562 (2004)
- [87] Maa, Y. F., Nguyen, P. A., Sweeney, T., Shire, S. J. & Hsu, C. C., "Protein inhalation powders: Spray drying vs spray freeze drying", *Pharmaceutical Research* **16** (2), 249-254 (1999)
- [88] Maier, S. A., "Entwicklung eines Mini-Gefriertrockners", Dissertation, D-Bonn (2003)
- [89] May, J. C., "Regulatory Control of Freeze-Dried Products: Importance and Evaluation of Residual Moisture", in *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, 2. Auflage, Rey, L. & May, J. C. (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., USA-New York (NY), CH- Basel 349-384 (2004)

- [90] Mehnert, W., "Therapeutische Äquivalenz", in *Lehrbuch der Klinischen Pharmazie*, Jaehde, U., Radziwill, R., Mühlebach, S. & Schunack, W. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, D-Stuttgart 49-66 (2003)
- [91] Meryman, H. T., "Sublimation Freeze-Drying Without Vacuum", *Science* **130** (3376), 628-629 (1959)
- [92] Milton, N. *et al.*, "Correspondence - Vial breakage during freeze-drying: crystallization of sodium chloride in sodium chloride-sucrose frozen aqueous solutions", *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96** (7), 1848-1853 (2007)
- [93] Morgan, P. V., Proniuk, S., Blanchard, J. & Noecker, R. J., "Effect of temperature and light on the stability of latanoprost and its clinical relevance", *Journal of Glaucoma* **10** (5), 401-405 (2001)
- [94] Mumenthaler, M. & Leuenberger, H., "Atmospheric Spray-Freeze Drying - A Suitable Alternative in Freeze-Drying Technology", *International Journal of Pharmaceutics* **72** (2), 97-110 (1991)
- [95] Murgatroyd, K., "The Freeze Drying Process", in *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice*, Cameron, P. (Hrsg.), Interpharm Press, Inc., USA-Buffalo Grove (IL) (1997)
- [96] Nail, S. L. & Gatlin, L. A., "Freeze-Drying: Principles and Practice", in *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, 2nd edition, Avis, K. E., Lieberman, H. A. & Lachman, L. (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., USA-New York (NY) 163-233 (1993)
- [97] Novack, G. D., "Ophthalmic Drug Delivery: Development and Regulatory Considerations", *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **85** (5), 539-543 (2009)
- [98] Oetjen, G-W & Haseley, P., "Freeze-Drying", WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, D-Weinheim (2004)

- [99] Ortiz-Duenas, C., Kim, J. & Longmire, E. K., "Investigation of liquid-liquid drop coalescence using tomographic PIV", *Experiments in Fluids* **49** (1), 111-129 (2010)
- [100] Patel, K. C. & Chen, X. D., "Production of spherical and uniform-sized particles using a laboratory ink-jet spray dryer", *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* **2** (5), 415-430 (2007)
- [101] Patel, K. C. & Chen, X. D., "Drying of aqueous lactose solutions in a single stream dryer", *Food and Bioproducts Processing* **86** (C3), 185-197 (2008)
- [102] Pikal, M. J., "Heat and Mass Transfer in Low Pressure Gases: Applications to Freeze Drying", in *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, Amidon, G., Lee, P. & Topp, L. (Hrsg.), Marcel Dekker Inc., USA-New York (NY) 611-686 (1999)
- [103] Pikal, M. J. & Shah, S., "The Collapse Temperature in Freeze-Drying - Dependence on Measurement Methodology and Rate of Water Removal from the Glassy Phase", *International Journal of Pharmaceutics* **62** (2-3), 165-186 (1990)
- [104] Pikal, M. J., Shah, S., Roy, M. L. & Putman, R., "The Secondary Drying Stage of Freeze-Drying - Drying Kinetics As A Function of Temperature and Chamber Pressure", *International Journal of Pharmaceutics* **60** (3), 203-217 (1990)
- [105] Pitter, R. L. & Pruppacher, H. R., "Wind-Tunnel Investigation of Freezing of Small Water Drops Falling at Terminal Velocity in Air", *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* **99** (421), 540-550 (1973)
- [106] Plitzko, M., "Gefriertrocknung in der Wirbelschicht", Dissertation, D-Freiburg (2006)

- [107] Precausta, P. M., Simatos, D., Lepemp, M., Devaux, B. & Kato, F., "Influence of Residual Moisture and Sealing Atmosphere on Viability of 2 Freeze-Dried Viral Vaccines", *Journal of Clinical Microbiology* **12** (4), 483-489 (1980)
- [108] Pruppacher, HR & Klett, JD, "Microphysics of Clouds and Precipitation", Kluwer Academic Publishers, NL-Dordrecht (1997)
- [109] Rajewski, R. A. & Stella, V. J., "Pharmaceutical applications of cyclodextrins .2. In vivo drug delivery", *Journal of Pharmaceutical Sciences* **85** (11), 1142-1169 (1996)
- [110] Rambhatla, S. & Pikal, M. J., "Heat and mass transfer scale-up issues during freeze-drying, I: Atypical Radiation and the Edge Vial Effect", *Aaps Pharmscitech* **4** (2), 1-10 (2003)
- [111] Rayleigh, F. R. S., "On the Instability of Jets", *Proceedings of the London Mathematical Society* **10** (1), 4-13 (1878)
- [112] Rensch, C, "Creation of Small Microdrops", Microfab Technologies Inc., www.microfab.com (2006)
- [113] Rochelle, C., "Spray-Freeze Dried Protein Powders for Needle-Free Injection", Dissertation, D-Erlangen (2005)
- [114] Rogers, T. L. *et al.*, "A novel particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: spray-freezing into liquid", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **54** (3), 271-280 (2002)
- [115] Rogers, T. L. *et al.*, "Enhanced aqueous dissolution of a poorly water soluble drug by novel particle engineering technology: Spray-freezing into liquid with atmospheric freeze-drying", *Pharmaceutical Research* **20** (3), 485-493 (2003)

- [116] Rupprecht, H., "Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung", in *Lyophilisation*, Essig, D. & Oschmann, R. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, D-Stuttgart (1993)
- [117] Sakai, Y., Yasueda, S. I. & Ohtori, A., "Stability of latanoprost in an ophthalmic lipid emulsion using polyvinyl alcohol", *International Journal of Pharmaceutics* **305** (1-2), 176-179 (2005)
- [118] Sall, J., Creighton, L. & Lehman, A., "JMP Start Statistics", 3, Brooks/Cole - Thomson Learning, CA-Belmont (2005)
- [119] Schwegman, J. J., Hardwick, L. M. & Akers, M. J., "Practical formulation and process development of freeze-dried products", *Pharmaceutical Development and Technology* **10** (2), 151-173 (2005)
- [120] Searles, J. A., "Freezing and Annealing Phenomena in Lyophilization", in *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, Rey, L. & May, J. C. (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., USA-New York (NY), CH-Basel 109-146 (2004)
- [121] Searles, J. A., Carpenter, J. F. & Randolph, T. W., "The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf", *Journal of Pharmaceutical Sciences* **90** (7), 860-871 (2001)
- [122] Shell, J. W., "Ophthalmic Drug Delivery Systems", *Drug Development Research* **6** (3), 245-261 (1985)
- [123] Sjöquist, B., Basu, S., Byding, P., Bergh, K. & Stjernschantz, J., "The pharmacokinetics of a new antiglaucoma drug, latanoprost, in the rabbit", *Drug Metabolism and Disposition* **26** (8), 745-754 (1998)
- [124] Sjöquist, B., Johansson, A. & Stjernschantz, J., "Pharmacokinetics of latanoprost in the cynomolgus monkey - 3rd Communication: Tissue distribution after topical administration on the eye studied by whole body autoradiography", *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* **49** (3), 240-249 (1999)

- [125] Sjöquist, B. & Stjernschantz, J., "Ocular and systemic pharmacokinetics of latanoprost in humans", *Survey of Ophthalmology* **47** , S6-S12 (2002)
- [126] Sjöquist, B., Tajallaei, S. & Stjernschantz, J., "Pharmacokinetics of latanoprost in the cynomolgus monkey - 1st Communication: Single intravenous, oral or topical administration on the eye", *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* **49** (3), 225-233 (1999)
- [127] Sjöquist, B., Uhlin, A., Byding, P. & Stjernschantz, J., "Pharmacokinetics of latanoprost in the cynomolgus monkey - 2nd Communication: Repeated topical administration on the eye", *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* **49** (3), 234-239 (1999)
- [128] Sleath, B. *et al.*, "Patient-reported behavior and problems in using glaucoma medications", *Ophthalmology* **113** (3), 431-436 (2006)
- [129] Sonner, C., "Protein-loaded powders by spray-freeze drying", Dissertation, D-Erlangen (2002)
- [130] Sonner, C., Maa, Y. F. & Lee, G., "Spray-freeze-drying for protein powder preparation: Particle characterization and a case study with trypsinogen stability", *Journal of Pharmaceutical Sciences* **91** (10), 2122-2139 (2002)
- [131] Steinfeld, A., Lux, A., Maier, S., Süverkrüp, R. & Diestelhorst, M., "Bioavailability of fluorescein from a new drug delivery system in human eyes", *British Journal of Ophthalmology* **88** (1), 48-53 (2004)
- [132] Süverkrüp, R., Offenlegungsschrift, DE 2009 019 491 B1, (11-11-2010)
- [133] Süverkrüp, R., Vorrichtung und Verfahren zur Herstellung eines pulverförmigen lyophilisierten Materials, bestehend aus annähernd gleich großen kugelförmigen Teilchen, 102008017461.0, Deutschland (3-4-2008)

- [134] Süverkrüp, R. and Diestelhorst, M., Method for production of a preparation of a pharmaceutical material as a lyophilisate and plant for the same, PCT/EP2003/010359, Germany (18-9-2003)
- [135] Sweeney, L. G. *et al.*, "Spray-freeze-dried liposomal ciprofloxacin powder for inhaled aerosol drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics* **305** (1-2), 180-185 (2005)
- [136] Tabazadeh, A., Djikaev, Y. S. & Reiss, H., "Surface crystallization of supercooled water in clouds", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (25), 15873-15878 (2002)
- [137] Takaizumi, K., "Liquid-solid phase diagrams of PrOH-water and BuOH-water systems from differential scanning calorimetry", *Journal of Solution Chemistry* **29** (4), 377-388 (2000)
- [138] Takaizumi, K. & Wakabayashi, T., "The freezing process in methanol-, ethanol-, and propanol-water systems as revealed by differential scanning calorimetry", *Journal of Solution Chemistry* **26** (10), 927-939 (1997)
- [139] Tamber, H., Johansen, P., Merkle, H. P. & Gander, B., "Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews* **57** (3), 357-376 (2005)
- [140] Tang, X. L., Nail, S. L. & Pikal, M. J., "Freeze-drying process design by manometric temperature measurement: Design of a smart freeze-dryer", *Pharmaceutical Research* **22** (4), 685-700 (2005)
- [141] Taylor, R, "Engineering a Functional Formulation", University of Cambridge: Bioscience Engineering, www.cheng.cam.ac.uk (2003)
- [142] Teagarden, D. L. & Baker, D. S., "Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems", *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **15** (2), 115-133 (2002)

- [143] Teuscher, E, "Biogene Arzneimittel", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, D-Stuttgart (1997)
- [144] Thijssen, HAC & Rulkens, WH, "Effect of freezing rate of sublimation and flavor retention in freeze-drying", *International Institute of Refrigeration*, 99-114 (1969)
- [145] van der Schoot, S. C. *et al.*, "Development of a bladder instillation of the indoloquinone anticancer agent EO-9 using tert-butyl alcohol as lyophilization vehicle", *Aaps Pharmscitech* **8** (3) (2007)
- [146] van Drooge, D. J. *et al.*, "Spray freeze drying to produce a stable Delta(9)-tetrahydrocannabinol containing inulin-based solid dispersion powder suitable for inhalation", *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **26** (2), 231-240 (2005)
- [147] Van Ooteghem, M. M. M., "Formulation of Ophthalmic Solutions and Suspensions. Problems and Advantages", in *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery*, Edman, P. (Hrsg.), CRC Press, Inc, USA-Boca Raton (FL) 27-42 (1993)
- [148] Walzel, P., "Zerstäuben von Flüssigkeiten", *Chemie Ingenieur Technik* **62** (12), 983-994 (1990)
- [149] Wang, Z. L., Finlay, W. H., Peppler, M. S. & Sweeney, L. G., "Powder formation by atmospheric spray-freeze-drying", *Powder Technology* **170** (1), 45-52 (2006)
- [150] Wehl, W, "Tintendruck: Strahlt er oder strahlt er nicht, das ist hier die Frage!", www.mm.hs-heilbronn.de/wehl/literat/tidruck.htm, (23-5-2005)
- [151] Weichselbaum, A., "Herstellung und Prüfung von Lyophilisaten auf hydrophoben Trägerfolien", Dissertation, D-Bonn (2002)
- [152] Weierstall, U. *et al.*, "Droplet streams for serial crystallography of proteins", *Experiments in Fluids* **44** (5), 675-689 (2008)

- [153] Weiner, A., "Drug delivery systems in ophthalmic applications", in *Ocular Therapeutics: Eye on New Discoveries*, Wax, M., Clark, A. & Yorio, T. (Hrsg.), Academic Press, USA-New York (NY), 2008, 7-30 (2008)
- [154] Wolff, E. & Gibert, H., "Atmospheric Freeze-Drying .1. Design, Experimental Investigation and Energy-Saving Advantages", *Drying Technology* **8** (2), 385-404 (1990)
- [155] Wolff, E. & Gibert, H., "Atmospheric Freeze-Drying .2. Modeling Drying Kinetics Using Adsorption-Isotherms", *Drying Technology* **8** (2), 405-428 (1990)
- [156] Wozniak, G., "Zerstäubungstechnik: Prinzipien, Verfahren, Geräte", Springer Verlag, D-Berlin (2002)
- [157] Wu, W. D., Patel, K. C., Rogers, S. & Chen, X. D., "Monodisperse droplet generators as potential atomizers for spray drying technology", *Drying Technology* **25** (12), 1907-1916 (2007)
- [158] Yu, Z. S., Garcia, A. S., Johnston, K. P. & Williams, R. O., "Spray freezing into liquid nitrogen for highly stable protein nanostructured microparticles", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **58** (3), 529-537 (2004)

9 Abkürzungen und Formelzeichen

9.1 Abkürzungen

| | |
|----------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ACD | atmospheric counter-current (atmosphärischer Gegenstrom) |
| AUC | area under the curve (Fläche unter der Kurve, Integral) |
| B ₀ | maximum binding (maximale Bindung) |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CFD | Computational Fluid Dynamics (numerische Strömungsmechanik) |
| Ch.- B. | Chargen- Bezeichnung |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DoD | Drop on Demand |
| DSC | Differential Scanning Calorimetry (dynamische Differenzkalorimetrie) |
| EIA | Enzyme immunoassay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) |
| EMA | European Medicines Agency |
| EMA | European Medicines Agency |
| F | F-Wert |
| FG | Freiheitsgrade |
| GMP | Good Manufacturing Practise |
| HA | Hyaluronic acid (Hyaluronsäure) |
| HEC | Hydroxyethylcellulose |
| HEMC | Hydroxyethylmethylcellulose |
| HPLC | High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| HPMC | Hydroxypropylmethylcellulose |

| | |
|---------------|---|
| ICH | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use |
| Konz. | Konzentration |
| Lat | Latanoprost |
| Lat-FA | Latanoprost-Säure |
| LC-MS | Liquid chromatography-mass spectrometry (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung) |
| LN2 | flüssiger Stickstoff |
| MG | Molekulargewicht |
| MQ | Mean square (Mittlere quadratische Abweichung) |
| MW | Mittelwert |
| NSB | non specific binding (unspezifische Bindung) |
| OLCS | Ophthalmic Lyophilizate Carrier System (Trägerlyophilisat für die Anwendung am Auge) |
| PEEK | Polyetheretherketon |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| rel. Std.Abw. | relative Standardabweichung |
| SQ | Sum of squares (Summenabweichungsquadrate) |
| Std.Abw. | Standardabweichung |
| TA | total activity (Gesamtaktivität) |
| Tab. | Tabelle |
| Tc | Kollapstemperatur |
| Te | eutektische Temperatur |
| Tg' | Glasübergangstemperatur |
| z.T. | zum Teil |

9.2 Formelzeichen

Physikalische Formelzeichen

| | |
|-------------------------|--------------------------------|
| $\partial T/\partial t$ | Temperaturänderung pro Zeit |
| A | (Querschnitts/Ober)-fläche |
| b | span-Faktor |
| Bo | Bond-Zahl |
| cp | spezifische Wärmekapazität |
| c | Konzentration |
| Cc | Cunningham Slipkorrekturfaktor |
| d | Durchmesser |
| D | Dosis |
| D | Durchsatz |
| da | aerodynamischer Durchmesser |
| dm/dt | Sublimationsrate |
| dP | Partikeldurchmesser |
| dQ/dt | Wärmefluss |
| f | Besetzungskoeffizient |
| F | Bioverfügbarkeit |
| G | Massenfluss |
| g | Fallbeschleunigung |
| k | Boltzmann-Konstante |
| K | Wärmeübergangskoeffizient |
| l | Weg |
| l | Länge |
| M | Molekulargewicht |
| m | Masse |
| P | Druck |

| | |
|-----------------|---|
| p | p-Wert |
| Q | Volumenstrom |
| Q | Konzentrations-Dosis-Verhältnis |
| Q _c | Kristallisationswärme |
| Q _n | Nukleationswärme |
| R | allgemeine Gaskonstante |
| R | (Trocknungs)-widerstand |
| Re | Reynolds-Zahl |
| t | Zeit |
| T | Temperatur |
| v | Geschwindigkeit |
| V | Volumen |
| We | Weber-Zahl |
| γ _L | Oberflächenspannung Flüssigkeit |
| γ _S | Grenzflächenspannung Feststoff/ Dampf der gesättigten Flüssigkeit |
| γ _{SL} | Grenzflächenspannung Feststoff/ Flüssigkeit |
| ΔH _s | Sublimationswärme |
| ΔP | Dampfdruckgefälle |
| ΔQ/Δt | Wärmemenge pro Zeit |
| ΔT | Temperaturredifferenz |
| ε | Porosität |
| η | dynamische Viskosität |
| θ | Kontaktwinkel |
| ρ | Dichte |
| σ | Oberflächenspannung |
| σ _x | Standardabweichung |
| τ | Gewundenheit |

Statistische Formelzeichen

| | |
|-------------------|---|
| μ | allgemeines Mittel |
| FG | Freiheitsgrade |
| MQA/ MQB/ MQAB | Mittlere Quadrate der Gruppe A/ B/ der Wechselwirkungen zwischen den Faktoren A und B |
| MQI/ MQT/ MQZ | Mittlere Quadrate innerhalb der Gruppen/ insgesamt/ zwischen den Gruppen |
| MQM/ MQE | Mittlere Quadrate des Modells/ des Versuchsfehlers |
| MQR | Mittlere Quadrate der Unterklassenmittel (Rest) |
| MW | Mittelwert |
| MWI/ MWT/ MWZ | Mittelwert innerhalb der Gruppen/ insgesamt/ zwischen den Gruppen |
| n | Anzahl |
| p | Signifikanzniveau |
| s^2 | Varianz |
| SQA/ SQB/ SQAB | Summe der Abweichungsquadrate zwischen der Gruppe A/ B/ der Wechselwirkungen zwischen den Faktoren A und B |
| SQI/ SQT / SQZ | Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen/ insgesamt/ zwischen den Gruppen |
| SQR | Summe der Abweichungsquadrate von ihren Unterklassenmitteln (Rest) |
| tobs | berechneter Wert des t-Tests |
| tTab | tabellierter Wert des t-Tests |
| x | Einzelwert |
| xu/ xo | untere/ obere Grenze des Konfidenzintervalls |
| α | Effekt des Faktors a oder Irrtumswahrscheinlichkeit |
| β | Effekt des Faktors b |
| ε | Versuchsfehler |