

Innovative Online Messverfahren zur Optimierung von Gefriertrocknungsprozessen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ingo Presser
aus Eberbach am Neckar

München 2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. G Winter betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 30. Mai 2003

.....

(Ingo Presser)

Dissertation eingereicht am:	3. Juni 2003
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Winter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Frieß

Tag der mündlichen Prüfung:	24. Juni 2003
-----------------------------	---------------

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G Winter am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität, München, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Winter danke ich herzlich für die Auswahl des Themas, seiner wissenschaftlichen Anleitung sowie den wertvollen Tipps und der anregenden Kritik bei der Durchführung der Arbeit.

Der Fa. Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, danke ich für die Bereitstellung der für die Versuche benötigten Geräte sowie der finanziellen Unterstützung. An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Frau Nicole Denking für die stets gewährte kompetente und hilfreiche Unterstützung und für das Engagement, mit dem sie meine Arbeit begleitet hat, bedanken. Mein besonderer Dank gilt auch Ortrud Betz, Andreas Langer und Hans Hörmann auf deren Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte.

Allen Kollegen am Lehrstuhl, deren Wesen zu einem sehr angenehmen und humorvollen Arbeitsklima beigetragen hat, danke ich für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und Anregungen sowie die sehr gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung. Besonders möchte ich meiner Laborkollegin Anke Stabenau für die angenehme Zeit in ‚unserem‘ Labor danken.

Frau Dr. Sabine Landerer und Frau Silke Mohl danke ich für die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit.

**Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Zielsetzung der Arbeit.....	4
2. Die Gefriertrocknung.....	6
2.1. Thermodynamische Grundlagen.....	8
2.2. Energietransfer	11
2.2.1. Wärmeleitung	12
2.2.2. Konvektion	13
2.2.3. Wärmestrahlung.....	14
2.3. Einfrieren.....	15
2.3.1. Einfriergeschwindigkeit	19
2.3.2. Thermal Treatment (Tempern).....	22
2.4. Primärtrocknung.....	23
2.4.1. Wasserdampftransport.....	25
2.5. Sekundärtrocknung.....	27
3. Aufbau einer Gefriertrocknungsanlage	28
3.1. Labormaßstab.....	29
3.2. Pilotmaßstab	29
3.3. Produktionsmaßstab.....	30
4. Messung der Prozessparameter	31
4.1. Druck.....	31
4.1.1. Kapazitive Druckmessung	31
4.1.2. Wärmeleitfähigkeitsmanometer	32
4.2. Temperatur	33
4.2.1. Widerstandsthermometer	33
4.2.2. Thermoelemente	34
4.2.3. Spektroskopische Temperaturmessung	35
4.2.4. Barometrische Temperaturmessung.....	35

4.3.	Endpunkterkennung	36
4.3.1.	Temperaturfühler	36
4.3.2.	Druckanstiegstest	37
4.3.3.	Komparative Druckmessung	38
4.3.4.	Feuchtesensoren	39
4.3.5.	Windmill Device	39
4.3.6.	Wägesystem	39
4.3.7.	Massenspektrometrie	40
4.3.8.	Nah-Infrarotspektroskopie	41
4.3.9.	Einzelplatten verschließen.....	41
4.3.10.	Manipulator/Ausschleusvorrichtung	42
II.	Material und Methoden	43
1.	Materialien	43
1.1.	Gerüstbildner, Hilfsstoffe und Reagenzien.....	43
2.	Behältnisse zur Gefriertrocknung	44
2.1.	Vials und GT-Stopfen	44
3.	Geräte.....	45
3.1.	Wägesystem	45
3.2.	Massenspektrometer	46
3.3.	Nah Infrarot Spektrometer	46
3.4.	Gefriertrocknungsanlagen.....	47
4.	Methoden.....	49
4.1.	Herstellung und Abfüllen der Lösungen.....	49
4.2.	Restfeuchte nach Karl-Fischer	49
4.3.	Druck- und Temperaturführung	50
4.4.	Auswertung der Messdaten	51

III. Ergebnisse	52
1. Wägesystem	52
1.1. Interpretation des Messsignals.....	53
1.1.1. Softwareentwicklung zur Datenauswertung	55
1.2. Versuchsaufbau des Wägesystems.....	58
1.3. Einfluss des Wägesystems auf die Trocknung.....	62
1.3.1. „Kontaktlose“ Gefriertrocknung	62
1.3.2. Energieeinfluss des Wägesystems.....	66
1.3.3. Einfluss der Position des Messfühlers auf das Temperatursignal.....	73
1.3.4. Einfluss verschieden großer Messfühler auf das Temperatursignal	75
1.3.5. Beurteilung der Temperaturfühler	77
1.4. Anwendungsmöglichkeiten	78
1.4.1. Vergleich von Trocknungsprozessen und Gerüstbildnern.....	78
1.4.2. Untersuchung alternativer Packmittel.....	80
1.5. Beurteilung des Wägesystems.....	84
2. Anwendung der Massenspektrometrie in der Gefriertrocknung	85
2.1. Versuchsaufbau des Massenspektrometers	86
2.2. Interpretation des Messsignals.....	87
2.3. Auswertung des Messsignals.....	90
2.3.1. Endpunkt: Primärtrocknung	90
2.3.2. Endpunkt: Sekundärtrocknung	92
2.3.3. Korrelation zwischen Massensignal und Restfeuchte.....	93
2.3.4. Reproduzierbarkeit.....	94
2.3.5. Einfluss der Beladung	95
2.3.6. Ansprechzeit	96
2.3.7. Softwareentwicklung zur Datenauswertung	96
2.4. Einsatz des Massenspektrometers in aseptischen Prozessen.....	99
2.5. Optimierung von Trocknungsprozessen	100
2.6. Massenspektrometrie in Transfer und Scale-Up	101
2.7. Beurteilung des Massenspektrometers.....	103

3. Nah Infrarot Spektroskopie in der Gefriertrocknung	105
3.1. Versuchsaufbau des Nah Infrarot Spektrometers	106
3.1.1. Design der Messsonde.....	106
3.2. Interpretation der NIR-Spektren.....	108
3.3. Kalibration der Methode und Auswertung der NIR Spektren.....	109
3.3.1. Temperaturabhängigkeit der Spektren	113
3.3.2. Interpretation des Messsignals.....	114
3.3.3. Reproduzierbarkeit.....	116
3.4. Vergleich mit Standardmessmethoden	116
3.5. Gezielte Einstellung der Restfeuchte.....	120
3.6. Auswertung anderer Formulierungen.....	123
3.7. Beurteilung des Nah Infrarot Spektrometers.....	125
IV. Zusammenfassung der Ergebnisse	127
V. Literaturverzeichnis	131

I. EINLEITUNG

Die Gefriertrocknung ist ein Verfahren, bei dem hauptsächlich wässrigen Zubereitungen unterhalb des Gefrierpunktes bei vermindertem Druck das Wasser entzogen wird. Dieser für das Produkt sehr schonende Prozess ermöglicht es, thermolabile und hydrolyseempfindliche Stoffe sowie Materialien biologischen Ursprungs unter Strukturhaltung zu trocknen und damit zu stabilisieren. Es entsteht ein stabiler, trockener Kuchen. Ein charakteristisches Merkmal ist seine hohe Porosität und die damit verbundene sehr gute Rekonstituierbarkeit.^{32,80}

Die Definition der Gefriertrocknung nach T. Jennings lautet entsprechend: "Lyophilisierung ist definiert als ein stabilisierender Prozess, in dem das Material erst gefroren wird – d.h. eine Trennung des Lösungsmittels und der gelösten Komponenten erfolgt und auch die Mobilität des Wassers in der interstitiellen Region der Matrix geht gegen Null – und anschließend die Konzentration des Lösungsmittels Wasser bis zu dem Grad verringert wird, und zwar durch Sublimation (Primärtrocknung), dann durch Desorption (Sekundärtrocknung), so dass biologisches Wachstum oder chemische Reaktionen nicht mehr ablaufen können."⁵⁷

Das Phänomen der Sublimation, der direkte Übergang eines festen Stoffes in den gasförmigen Zustand, und damit die Grundlage der Gefriertrocknung ist seit Anfang des 18. Jahrhunderts bekannt. Der erste Gefriertrocknungsversuch wurde mit Gewebeproben von Richard Altman in Leipzig 1890 durchgeführt⁴⁴, jedoch wurde bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts die Technologie der Gefriertrocknung nur vereinzelt in Laborversuchsreihen verwendet.

Großtechnische Bedeutung erlangte die Gefriertrocknung während des 2. Weltkrieges in den USA, zur Herstellung von Penicillinen und Blutplasma. Seither hat die Gefriertrocknung ein breites Anwendungsspektrum vor allem in der Pharmazie und der Lebensmitteltechnologie gefunden.⁸⁴ Die Lyophilisation ist heute für biologisch aktive Substanzen, Blutprodukte, Aromen und Lebensmittelzubereitungen wegen ihrer schonenden Trocknung Standard.^{9,40}

Mit den riesigen Fortschritten in der Gentechnik (Tabelle I-1) und der dadurch ermöglichten Entwicklung und Bereitstellung einer zunehmenden Anzahl von Protein- und Peptidarzneistoffen wurde ein neues Kapitel in der Bedeutung der Gefriertrocknung aufgeschlagen.¹⁰⁸

Seit der Entwicklung des ersten rekombinant hergestellten Arzneimittels (Humulin, Eli Lilly, 1982) stieg die Anzahl der biopharmazeutischen Präparate sehr stark an. Bis heute wurden schließlich 88 biopharmazeutische Produkte in Europa zugelassen. Dies entspricht 37% bezogen auf die Gesamtzahl der Neuzulassungen seit Gründung der EMEA.¹²⁹

Bei diesen oft besonders kostbaren und empfindlichen Arzneistoffen stehen der Aufwand und die Kosten eines Gefriertrocknungsprozesses in gutem Verhältnis zum wirtschaftlichen Nutzen.

Meilensteine in der Biotechnologie	
1977	Gründung des ersten Biotech-Unternehmens in den USA (Genentech) mit dem Ziel neuartige Medikamente gentechnisch herzustellen.
1978	Expression des ersten menschlichen Proteins (Somatostatin)
1980	Bau der ersten gentechnischen Produktionsanlage in USA (Humaninsulin)
1982	Humaninsulin als erstes biotechnologisch hergestelltes Produkt bei der FDA zugelassen (Humalin)
1986	Erster rekombinanter Impfstoff: Hepatitis B Erstes biotechnologisches Krebsmittel: Interferon
1999	Erster Antikörper: Trastuzumab
2000	Entschlüsselung des menschlichen Genoms

Tabelle I-1 Biotechnologie in der Pharmazeutischen Entwicklung [Vortrag GBF BioProfil Symposium Dez 2002]

Dieser sehr schonenden Trocknungsmethode stehen hohe Investitionen und hohe Betriebskosten gegenüber. Allein der Energieverbrauch durch das Einfrieren auf sehr niedrige Temperaturen, die Sublimation und Desorption des Wassers, sowie die Aufrechterhaltung des Vakuums ist enorm. Um nur 1 Kg Wasser auf -40 °C abzukühlen und anschließend zu sublimieren wird eine Energiemenge von über 3000 KJ benötigt.

Der Konkurrenzdruck und die wirtschaftliche Lage zwingen die Hersteller immer wieder die Effizienz ihrer Herstellungsmethoden zu überdenken und zu verbessern.

Der entscheidende Ansatzpunkt, um die Wirtschaftlichkeit der Gefriertrocknung zu verbessern, liegt in der Optimierung der Prozesszeit, logischerweise unter Beibehaltung der Produktqualität.¹¹¹

Kürzere Prozesszeiten führen neben der Reduktion der Energiekosten auch zu einer Erhöhung des Chargendurchsatzes² und damit zu einer besseren Auslastung und Reduktion der Herstellungskosten je Charge.^{68,125}

Die Gefriertrocknung ist in ihren physikalisch-chemischen Zusammenhängen ein sehr komplexes Verfahren. Eine Vielzahl an Parametern, die sich gegenseitig stark beeinflussen, bestimmen die Qualität des Produktes.

Die wichtigsten Einflussfaktoren sind die Zusammensetzung der Formulierung, sowie die Wahl und die Steuerung der Prozessparameter.

Bei der Entwicklung eines Lyophilisates steht die Produktstabilität im Vordergrund.^{87,130} Die Auswahl der Hilfsstoffe und Primärpackmittel in Hinsicht auf gute Gefriertrocknungseigenschaften ist zweitrangig. Wichtig ist es daher durch die Wahl optimaler Prozessparameter eine schonende und schnelle Trocknung des Produktes zu erreichen.¹⁵ Um möglichst effektiv, d.h. ohne große Anzahl an Trial & Error Experimenten die optimalen Prozessparameter zu finden, sind besondere Messmethoden nötig.

Bei der Messung, Überwachung und Einstellung dieser Prozessparameter kommen die verschiedensten Messmethoden zum Einsatz.⁶ Neben der Produkttemperaturmessung und der Druckmessung als Standardmethoden sind noch weitere wie z.B. Feuchtesensoren, Wägesysteme oder Massenspektrometrie zur Online-Messung im Einsatz. Gerade innovative Systeme, die Daten zur direkten Anpassung des Gefriertrocknungsprozesses liefern, können die Entwicklungszeit verringern.³² Nach der Gefriertrocknung erfolgt in der Regel die Restfeuchtebestimmung nach Karl-Fischer sowie optische Beurteilungen, um die Qualität des Lyophilisates zu untersuchen.⁹⁰ Ziel ist es, möglichst viele Daten über den Verlauf des Gefriertrocknungsprozesses aufzunehmen, um schnell ein stabiles Gefriertrocknungsprogramm mit kurzen Prozesszeiten und einem daraus resultierenden Produkt mit gleich bleibend hoher Qualität zu entwickeln.⁴¹

Zwei besonders kritische Größen, die sich direkt und indirekt bestimmen lassen, sind die Produkttemperatur und der Restwassergehalt.⁴⁹ Eine Überschreitung der Grenzwerte dieser Parameter spiegelt sich negativ in der Produktqualität wider.⁵³ Die Kenntnis dieser Parameter zu jedem Zeitpunkt während des Gefriertrocknungsprozesses, ermöglicht es nah an den Prozessgrenzen zu trocknen und so einen optimierten Gefriertrocknungslauf zu entwickeln.⁴⁷ Online-Messmethoden, durch die der Gefriertrocknungsprozess während der Trocknung direkt gesteuert und angepasst werden kann, ermöglichen daher die Entwicklungszeiten und den damit verbundenen Produktverbrauch einzuschränken.

Eine gute Online-Messmethode und eine damit verbundene ‚intelligente‘ Steuerung ist somit der Schlüssel zu einer schnellen und optimalen Gefriertrocknungsprozessentwicklung.⁸⁹

1. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, Online-Messmethoden zur Optimierung von Gefriertrocknungsprozessen zu finden und auf ihre Aussagekraft und ihren praktischen Nutzen für die Entwicklung sowie für aseptische Produktionsprozesse hin zu überprüfen.

In diesem Zusammenhang standen zwei Online-Messsysteme, ein Wägesystem und ein Massenspektrometer, für die Arbeit zur Verfügung. Ein drittes Online Messsystem, basierend auf der Nah-Infrarotspektroskopie, sollte im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden.

Die Untersuchungen des Wägesystems wurden auf Grundlage einer vorangegangenen Arbeit fortgeführt.¹⁰⁹ Untersucht werden sollte die Eignung und Etablierung des Wägesystems als automatisches Steuerungsgerät für die Gefriertrocknung. Der Focus sollte dabei auf möglichen Einflüssen des Wägesystems auf die Trocknung und die Präzision des Messergebnisses unter Gefriertrocknungsbedingungen liegen.

Als weitere mögliche Online-Messmethode zur Überwachung der Gefriertrocknung sollte das Potential der Massenspektroskopie untersucht werden. Die von Connelly et al. erstmals beschriebene Online-Messmethode bei der Gefriertrocknung sollte für den Einsatz in der Primärtrocknung optimiert und die Eignung zur Überwachung der Sekundärtrocknung untersucht werden.²⁴ Neben der Detektion der Endpunkte von Primär- und Sekundärtrocknung sollten die Möglichkeiten der Überwachung aseptischer Gefriertrocknungsprozesse und Vereinfachung von Transfers zwischen verschiedenen Gefriertrocknungsanlagen im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen.

Auf Basis der Nah-Infrarotspektroskopie sollte eine völlig neue Online-Messmethode entwickelt und untersucht werden. Die Nah-Infrarotspektroskopie wird bereits offline zur Bestimmung der Restfeuchte von Lyophilisaten genutzt.^{58,75} Der große Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit einer direkten, zerstörungsfreien Messung durch das Glasvial ohne vorherige Probenaufbereitung. Aufgrund dieser Eigenschaften sollte eine Online-Messmethode entwickelt werden, die eine direkte Messung der Restfeuchte während des ganzen Gefriertrocknungsprozesses ermöglicht. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Nah-Infrarotspektroskopie gegenüber Wasser, sollte zusätzlich in der Sekundärtrocknung eine genaue Detektion der Restfeuchte zu erreichen sein, wodurch eine genaue Einstellung der Restfeuchte des Produktes direkt möglich sein sollte.

In einem weiteren Schritt sollte die Effizienz der neuen Online-Messmethoden zur einfachen und schnellen Optimierung eines bestehenden Gefriertrocknungsprozesses gezeigt werden.

Ebenso sollte überprüft werden, in wieweit die Entwicklungszeiten eines schnellen und effektiven Trocknungszyklus einer unbekanntem Formulierung reduziert werden können. Hier sollte besonders die Beschleunigung in der Prozessentwicklung und die damit verbundene Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Entwicklungsprozesses gezeigt werden.

Abschließendes Ziel war es, diese neuen Online Messmethoden den herkömmlichen Standardmethoden gegenüber zu stellen. Der Informationsgehalt der Daten, das Einsatzspektrum unter Berücksichtigung aseptischer Prozessführung sowie die Bedienbarkeit und das Kosten-Nutzen Verhältnis sollten verglichen werden.

2. Die Gefriertrocknung

Die Herstellung von Lyophilisaten kann im pharmazeutischen Bereich auf unterschiedliche Arten erfolgen. Lyophilisate, die als Injektabilia oder Diagnostika eingesetzt werden, werden häufig im Endbehältnis getrocknet. Die Injektionsflaschen werden dann zeitnah vor der Applikation mit einem Rekonstitutionsmedium befüllt. Der Trend in der Verpackung der Lyophilisate geht in Richtung Doppelkammerspritzen. Der Vorteil liegt in einem deutlich einfacheren Handling, da sowohl das Lyophilisat als auch das Rekonstitutionsmedium getrennt, jedoch in der selben Spritze verpackt werden, und bei der Rekonstitution aufwendiges Hin- und Herfüllen mit einem Überleitungsstück vermieden wird.

Auch ist eine Gefriertrocknung in Tablettenblistern, zur Herstellung von so genannten Expidets für akute Indikationen, oder als Bulk möglich.³² Bei der Bulk-Trocknung wird die Gefriertrocknung in Schalen oder seit kurzem auch in einem mit einer wasserdampfdurchlässigen und keimundurchlässigen Membran abgedichteten Tablett durchgeführt.¹²⁸

Neben der diskontinuierlichen Gefriertrocknung ist auch eine Gefriertrocknung in kontinuierlich arbeitenden Trocknungstunneln möglich. Dieses Verfahren findet bevorzugt in der Lebensmitteltechnologie Anwendung, da sehr große Mengen getrocknet werden und keine Sterilität gewährleistet werden muss. Die Hauptanwendung in der Lebensmitteltechnologie ist die Trocknung von Kaffee mit einem Volumen von ca. 140.000 t pro Jahr allein in Deutschland.¹³ Auch Kräuter und Früchte werden häufig mit diesem Verfahren konserviert. Gefriergetrocknete Früchte entfalten im Vergleich zu frischen Früchten in der Regel einen viel intensiveren Geschmack. Dies macht sich die Lebensmittelindustrie zu nutze, da zur Aromatisierung eines Fruchtjoghurts deutlich weniger Früchte benötigt werden.

Weitere Anwendungsgebiete der Gefriertrocknung aufgrund ihrer Eigenschaft, die Struktur während des Trocknungsprozesses zu erhalten, findet man in der Archäologie zur Konservierung von Präparaten wie z.B. historischen Schiffsplanken oder auch zur Restauration von wertvollen Dokumenten und Büchern nach einem Wasserschaden.

Ein exotischer Aufgabenbereich der Gefriertrocknung ist die Präparation von besonderen Fischen.⁴

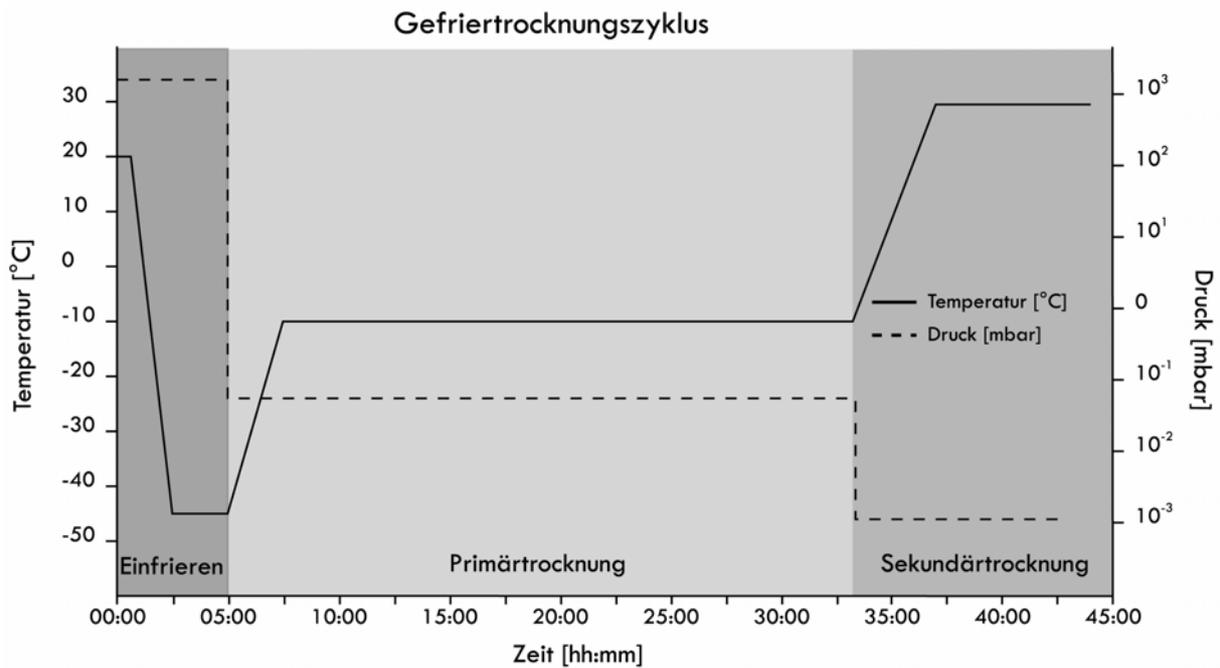


Abbildung I-1 Gefriertrocknungszyklus (schematisch)

Der Lyophilisationsprozess selbst lässt sich in drei aufeinander folgende Teilschritte gliedern: Dem Einfrieren der Lösung, der Primärtrocknung und der Sekundärtrocknung (Abbildung I-1).

Durch das Einfrieren wird die Zubereitung in ihrer Form fixiert und durch die Wahl der Einfrierparameter wird die spätere Mikrostruktur des Lyophilisates entscheidend geprägt. Im zweiten Schritt wird durch Sublimation das Eis unter Erhaltung dieser vorgegebenen Struktur entfernt. In der Nach Trocknung wird das „non-frozen“ Wasser entfernt und das Produkt auf die gewünschte Restfeuchte eingestellt.³⁶

Einen schematischen Ablauf der Prozessschritte zur Herstellung von Lyophilisaten in der pharmazeutischen Industrie zeigt Abbildung I-2.

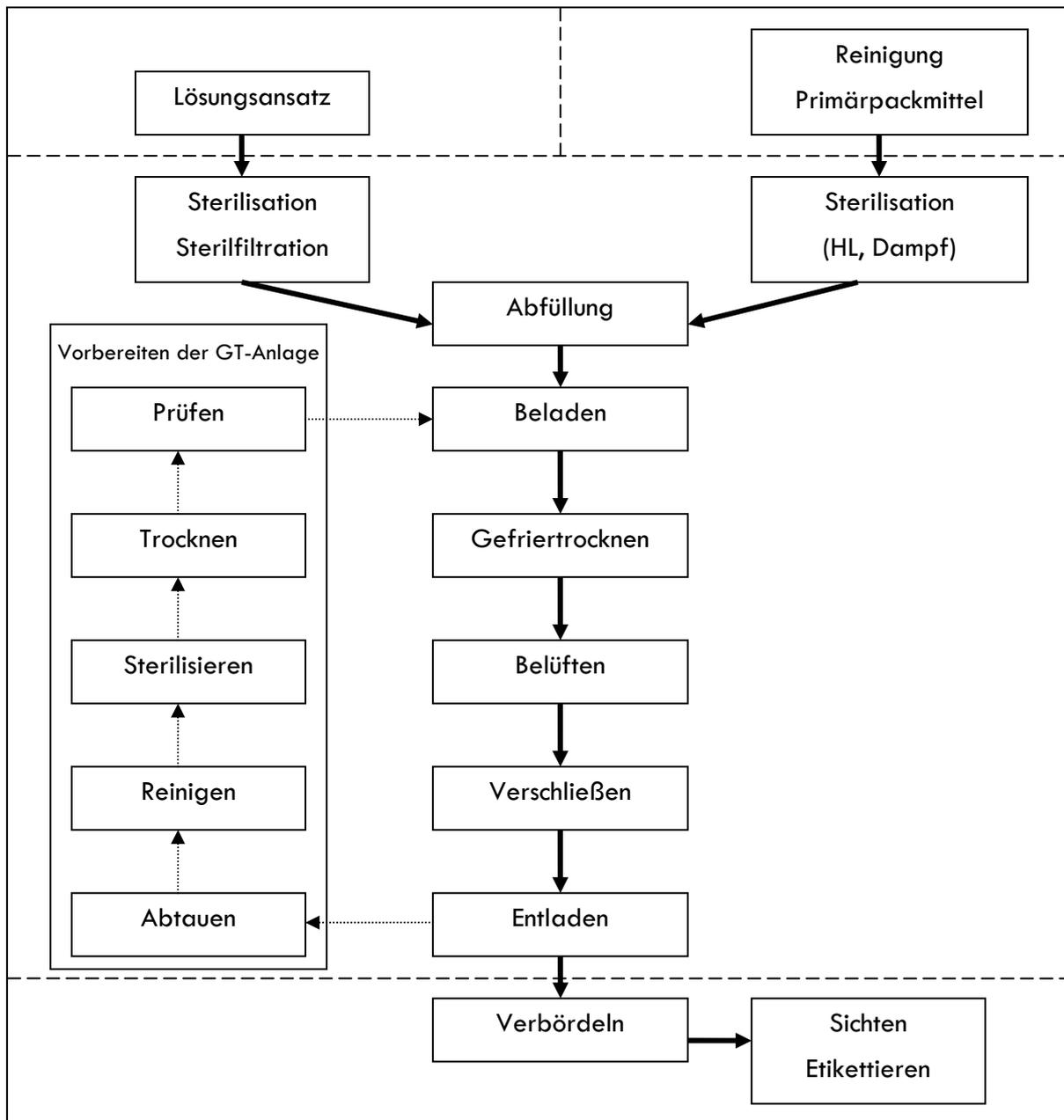


Abbildung I-2 Schematischer Ablauf zur Herstellung von Lyophilisaten³²

2.1. Thermodynamische Grundlagen

Die Aggregatzustände von Wasser, fest, flüssig und gasförmig, sind direkt ineinander überführbar. Aus dem Zustandsdiagramm in Abbildung I-3 ist ersichtlich, welcher Aggregatzustand bei einem bestimmten Druck und einer bestimmten Temperatur vorliegt, beziehungsweise welche Aggregatzustände unter bestimmten Bedingungen ineinander überführbar sind. Unterhalb des Tripelpunktes ist Sublimation möglich, d.h. der direkte Übergang von Eis zu Wasserdampf unter Umgehung des flüssigen Zustandes. Die Sublimationsfähigkeit von Eis bildet die Grundlage der Lyophilisation.

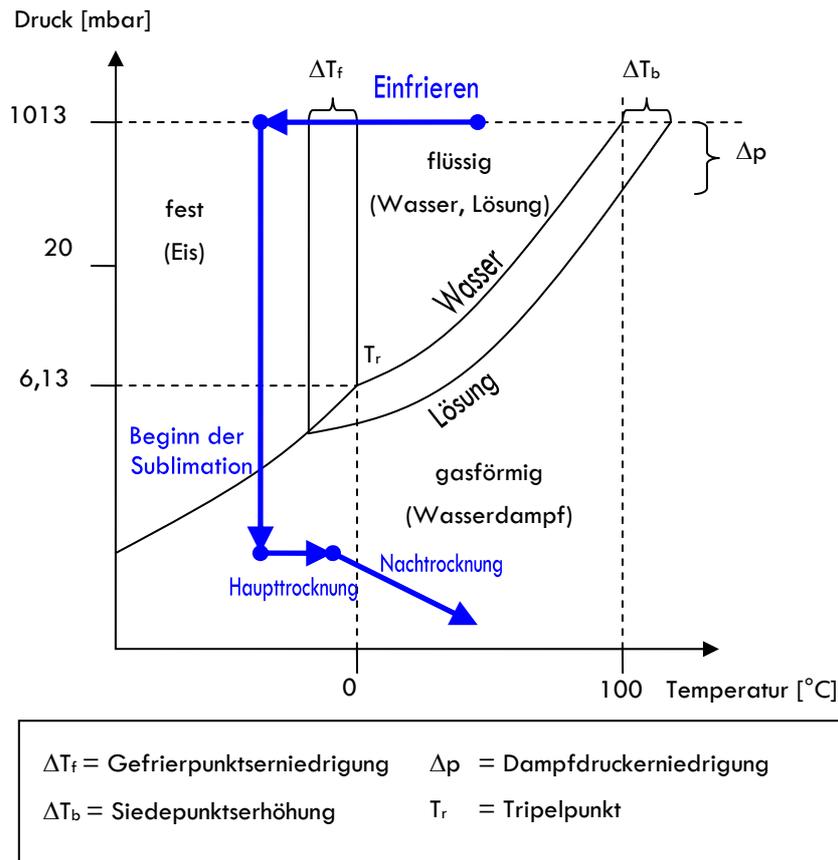


Abbildung I-3 Dreiphasendiagramm des Wassers¹²¹

Der Tripelpunkt von reinem Wasser, an dem Eis, Wasser und Wasserdampf koexistieren, liegt bei 6,13mbar und 273,16K.¹²¹ Durch gelöste Stoffe verschiebt sich die Phasengrenze, wobei der Gefrierpunkt um ΔT_f und der Dampfdruck über der Lösung um Δp sinkt, der Siedepunkt aber um ΔT_b steigt (Abbildung I-3).

Eis besitzt bei niedrigen Temperaturen, die während der Primärtrocknung vorherrschen, nur einen geringen Dampfdruck. In einem offenen System ist es trotzdem möglich das Eis schnell und vollständig zu sublimieren, wenn der Wasserdampf ständig entzogen wird. Ein reines Abpumpen des Wasserdampfes ist völlig unökonomisch, da unter vermindertem Druck das Gasvolumen von nur 1g bei $0,10^{-3}$ mbar auf ca. 10 000l ansteigt.⁸ In der Gefriertrocknungsanlage wird der Wasserdampf durch Resublimation am Kondensator wieder als Eis gebunden und so dem System entzogen.

Das Dampfdruckgefälle bzw. das Temperaturgefälle zwischen dem Produkt p_0 und dem kälteren Kondensator p_t ist die treibende Kraft für die Sublimation und damit für den Trocknungsprozess wie in Abbildung I-4 dargestellt.

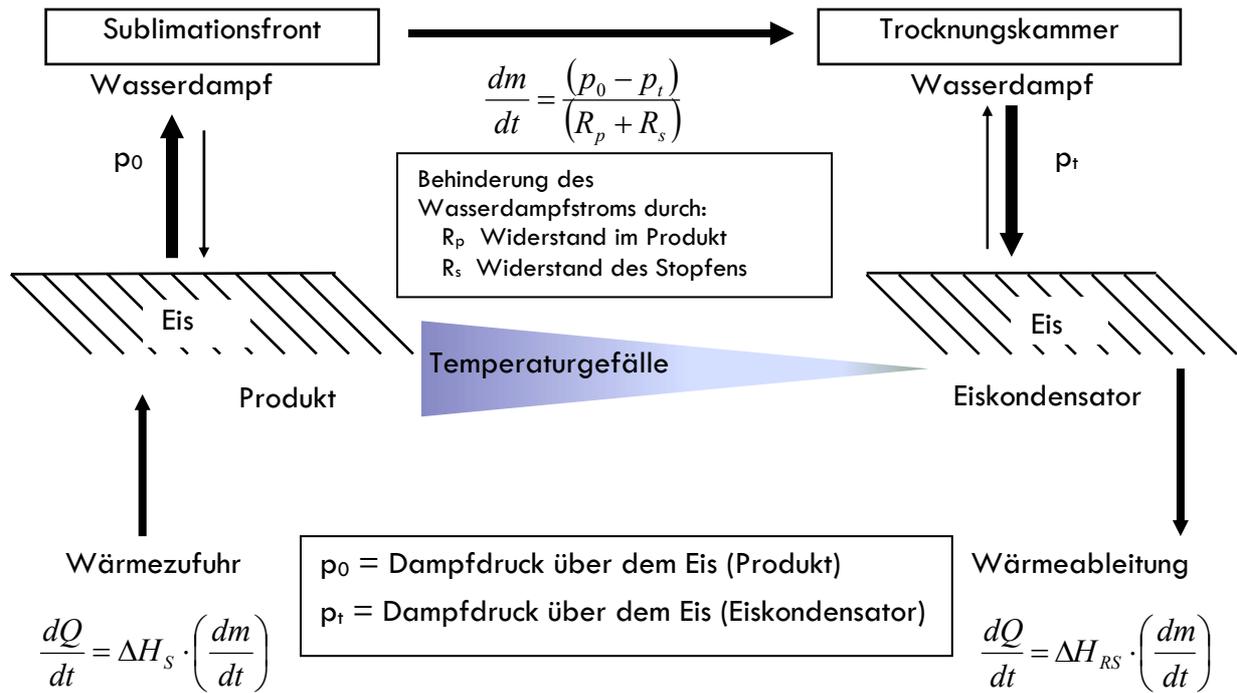


Abbildung I-4 Triebkraft der Sublimation

Somit ist die Sublimationsgeschwindigkeit von der zugeführten Energie und dem Abtransport des Wasserdampfes abhängig. Durch Erhöhung des Trocknungsdruckes und damit der Trocknungstemperatur kann die Trocknung beschleunigt werden. In der Clausius-Clapeyronschen Gleichung (Gleichung I-1) wird dieser Zusammenhang beschrieben.

$$\int_{p_1}^{p_2} \frac{dp}{p} = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\Delta H}{R \cdot T^2} dT$$

Gleichung I-1 Clausius-Clapeyronsche Gleichung

Gleichzeitig muss der ständige Energieverbrauch ausgeglichen werden. Je schneller Energie in Form von Wärme Q zugeführt wird, desto schneller kann auch die Sublimation ablaufen.¹³⁶ Der Zusammenhang ist in Gleichung I-2 beschrieben.

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \cdot \left(\frac{dm}{dt} \right)$$

Gleichung I-2 Zusammenhang zwischen Wärmezufuhr und Sublimationsgeschwindigkeit

Dies gilt jedoch nur bei ungehindertem Abtransport des Wasserdampfes.⁷⁹ Wenn das Dampfdruckgefälle geringer wird, verlangsamt sich der Wasserdampftransport und die Sublimationsgeschwindigkeit nimmt ab. Der Einfluss auf den Wasserdampfstrom ist in Gleichung I-3 beschrieben.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{(p_0 - p_t)}{(R_p + R_s)}$$

Gleichung I-3 Zusammenhang zwischen Druckgefälle, Widerstand und der Sublimationsgeschwindigkeit

Die zugeführte Energie kann dann zu einer unerwünschten Erwärmung des Produktes führen.^{76,86} Idealerweise sollte sich ein Gleichgewicht zwischen der zugeführten und der durch die Sublimation verbrauchten Energie einstellen.

Diese Zusammenhänge lassen erkennen, wie wichtig eine exakte Steuerung des Energieflusses für einen optimalen Trocknungsprozess ist.

2.2. Energietransfer

Der Energietransfer zwischen dem zu trocknenden Produkt und der Umgebung ist während der ganzen Gefriertrocknung von großer Bedeutung. Während des Einfrierschrittes gilt es Wärme zu entziehen. In den anschließenden Trocknungsschritten wird wieder Energie in Form von Wärme zugeführt. Dieser Energietransfer muss sehr gut kontrolliert sein, damit immer ein Trocknungsprozess von gleich bleibender Qualität gewährleistet ist.

Der Energietransfer erfolgt über drei verschiedene Wege auf das Lyophilisat: Wärmeleitung, Konvektion und Wärmestrahlung.

Der Einfluss dieser einzelnen Energietransferarten ist sehr stark von den jeweiligen Parametern des Trocknungsprogrammes, der Beladung und der Bauform der Gefriertrocknungsanlage abhängig.

Zusätzliche Bedeutung erhält das Verhältnis der Energietransferarten zueinander, wenn im Rahmen des „Upscalings“ von kleineren Gefriertrocknern auf größere Produktionsanlagen umgestellt wird. Insbesondere wenn sich zusätzlich Unterschiede in der Bauform und Steuerung der Gefriertrocknungsanlagen ergeben, ist ein zuvor entwickeltes Trocknungsprogramm oftmals an die veränderte Form des Energietransfers anzupassen. Beispielsweise sind Gefriertrockner im Entwicklungsbereich im Gegensatz zum Produktionsbereich häufig mit Plexiglastüren ausgestattet, um den Trocknungsprozess beobachten zu können. Die durch die Plexiglastür dringende Strahlung kann aufgrund des Eintrages zusätzlicher Energie den Trocknungsprozess beeinflussen.

Aus diesem Grund wird versucht, die am einfachsten kontrollierbare Energieübertragungsart, die Wärmeleitung, zu maximieren und unkontrollierbare Strahlungseinflüsse von nicht temperierten Anlagenteilen auszuschließen. Die unter Punkt 2.2.2 beschriebene, stark druckabhängige Konvektion spielt hier eine untergeordnete Rolle.

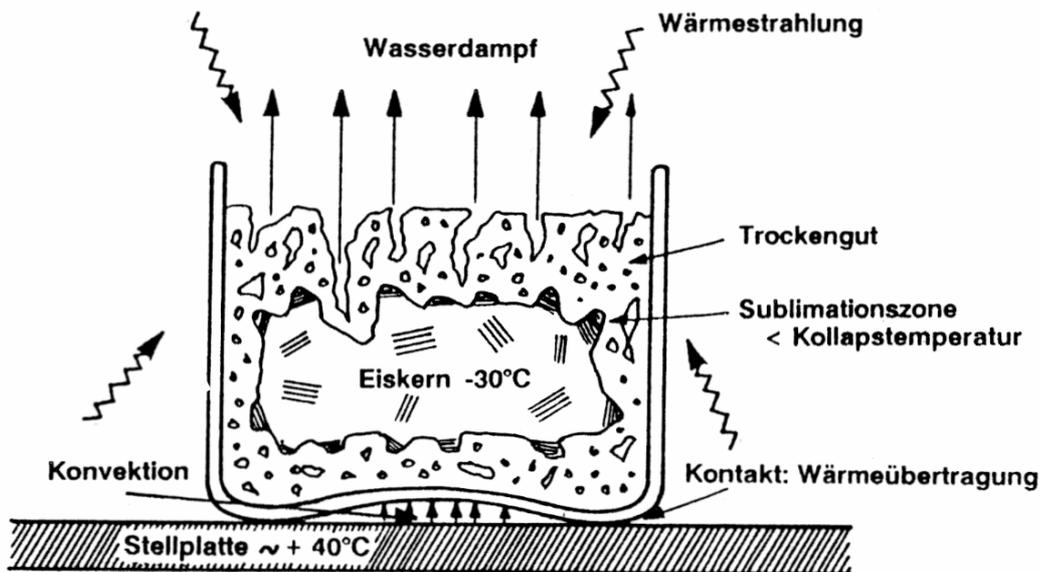


Abbildung I-5 Energieübertragungsarten auf das Produkt³²

2.2.1. Wärmeleitung

Unter Wärmeübertragung durch Kontakt versteht man den direkten Energieaustausch zwischen zwei festen Körpern. Bei der Gefriertrocknung erfolgt der Wärmetransfer über den Kontakt von Stellfläche und Vial und dann von der Gefäßwand auf das Produkt (Abbildung I-5).

Die Übertragung der Energiemenge von der Stellfläche auf das Produkt pro Zeit (dQ/dt) ist von der Differenz zwischen der Stellfläche T_s und der Produkttemperatur T_p , von der Kontaktfläche Vialboden/Stellfläche A_v und dem Wärmeleitkoeffizienten K_v abhängig (Gleichung I-4). Die Wärmeübertragung durch die umgebende Atmosphäre wird im Abschnitt Konvektion unter Punkt 2.2.2 diskutiert.

$$\frac{dQ}{dt} = A_v \cdot K_v \cdot (T_s - T_p)$$

Gleichung I-4 Wärmeübertragung zwischen zwei Körpern

Die Bodenfläche der Vials ist je nach Herstellprozess mehr oder weniger stark nach innen gewölbt (Abbildung I-5). Durch die kleine Auflagefläche ist der Energieeintrag über Wärmeleitung eine begrenzte, aber gut bestimmbare Größe.¹¹ Trotz dieser Begrenzung der Wärmeleitung hat sie in der Regel den größten Anteil (55-75%) am gesamten Energieeintrag, da durch das Vakuum die Konvektion und durch die Konstruktion der Trocknungskammer bei Pilot- und Produktionsanlagen die Strahlung in der Regel unterdrückt werden.⁹⁹

Ein weiterer Aspekt soll im Zusammenhang mit der Wärmeleitung diskutiert werden. Je nach Gefriertrocknungsanlage gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Beladung mit Vials. Moderne Gefriertrockner für den Produktionsbereich sind mit automatischen

Beladungseinrichtungen ausgestattet. Die Vials werden durch eine schmale Tür direkt auf die Stellflächen geschoben. Die andere Variante, die hauptsächlich in der Entwicklung und bei älteren Anlagen angewandt wird, ist die Beladung mit Hilfe von Blechen oder Trays. Die Trocknung auf den Blechen verlangsamt den Wärmetransport und damit auch den Gefriertrocknungsprozess (siehe auch Kapitel III.1.3). Durch die Temperaturbelastung oder unsachgemäße Handhabung verziehen sich die Bleche leicht, bzw. bekommen Beulen. Jede Veränderung des Bleches, die ein planes Aufliegen auf der Stellfläche verhindert, blockiert den Wärmetransport zusätzlich.

Um diese Fehlerquellen auszuschließen und eine Trocknung auf der Stellfläche zu erreichen ohne ein Transport- und Beladungsproblem zu bekommen, gibt es ‚bottomless trays‘. Es handelt sich hierbei um Bleche bestehend aus einem Rahmen, indem die Vials gehalten werden und einem separaten Boden, der nach dem Beladen der Stellfläche herausgezogen wird. Zum Entladen kann der Boden wieder unter die Vials geschoben werden.

2.2.2. Konvektion

Bei der Konvektion wird Wärme durch die Bewegung einer Flüssigkeit oder eines Gases transportiert, d.h. sie setzt eine makroskopische Bewegung voraus. Innerhalb und zwischen den Medien erfolgt jedoch zusätzlich auch eine Energieübertragung durch Wärmeleitung.

Entscheidend hierfür sind die Zusammensetzung der Gasatmosphäre und der Druck. Je höher der Trocknungsdruck ist, desto mehr Energie kann durch die Gasmoleküle übertragen werden. Darüber hinaus ist entscheidend, ob eine freie Konvektion oder die erzwungene Konvektion vorliegt.¹¹³ Die erzwungene Konvektion tritt in Erscheinung, wenn die Strömung durch einen äußeren Zwang, also z.B. Stickstoffinjektion oder Wasserdampfströmung in Folge der Sublimation, zustande kommt. Bei der freien Konvektion stellt sich die schwächere Strömung nur dadurch ein, dass infolge der Wärmeübertragung ein antreibender Temperatur- und damit verbundener Dichteunterschied vorhanden ist. Bei der Gefriertrocknung tritt während der Einfrierphase freie Konvektion auf. Zum Teil gibt es auch Gefriertrocknungsanlagen mit eingebauten Ventilatoren, die dann eine erzwungene Konvektion zum Zweck der Beschleunigung des Einfriervorgangs erzeugen. In der Primärtrocknung überwiegt hingegen, durch die starke Wasserdampfströmung aus dem Vial zum Eiskondensator, die erzwungene Konvektion. Insgesamt spielt jedoch die Konvektion aufgrund des konstant niedrigen Dampfdruckniveaus eine unbedeutende Rolle.⁹⁸

2.2.3. Wärmestrahlung

Die dritte Art der Energieübertragung erfolgt durch elektromagnetische Strahlung, die im Gegensatz zur Wärmeleitung kein Trägermedium erfordert. Die relevanten physikalischen Größen werden durch die Gesetze von *Planck*, *Stefan-Boltzmann*, *Wien* und *Kirchhoff* beschrieben.¹²¹

Jeder Körper strahlt Energie ab. Bei einem Temperaturgleichgewicht entspricht die Menge der abgestrahlten Energie, der aufgenommenen Energie. Die Differenz zwischen Emission und Absorption führt zur Abkühlung oder Erwärmung eines Körpers.

Energie durch Wärmestrahlung erreicht das Produkt von unten durch die Stellflächen oder von oben durch eine Strahlungsplatte (Abbildung I-13). Die radiale Wärmestrahlung ist sehr stark vom Beschickungsmuster und dem Standort der Vials (Rand oder Mitte auf der Stellfläche) in der Anlage abhängig. Besonders bei Gefriertrocknungsanlagen ohne Kammerwandtemperierung bzw. mit Plexiglashauben oder mit großen Plexiglastüren zeigen die randständigen Vials einen höheren Energieeintrag.

Die Problematik der Wärmestrahlung und ihr Einfluss auf den Trocknungsprozess unter Berücksichtigung des Beschickungsmusters wird am Beispiel des Wägesystems in Kapitel III.1.3 ausführlich erörtert.

2.3. Einfrieren

Beim Einfrieren wird das flüssige Produkt in einen festen Aggregatzustand überführt. Um das Einfrierverhalten beschreiben zu können, muss grundsätzlich zwischen reinem Lösungsmittel, Lösungen oder Dispersionen unterschieden werden.

Bei der Eisbildung in reinem, partikelfreiem Wasser lagern sich die Moleküle zu Clustern zusammen. Mit sinkender Temperatur nehmen die Lebensdauer und die Größe der Cluster zu, bis es zur spontanen Kristallbildung kommt. Man spricht von einer homogenen Nukleation.^{80,107} Es ist möglich, reines Wasser auf unter minus 40°C zu unterkühlen.⁹⁰

In der Praxis wird die Kristallisation meist durch Oberflächenwechselwirkungen gestartet. Je ähnlicher die Oberflächenstruktur des Gefäßes oder eines Partikels einem Eiskristall ist, desto früher kann die Kristallisation beginnen.³⁵ In einer kolloidalen Lösung oder Dispersion befinden sich Partikel, die als Kristallisationskeime fungieren und die Kristallisation erleichtern. Es handelt sich um eine heterogene Nukleation.¹⁰⁷

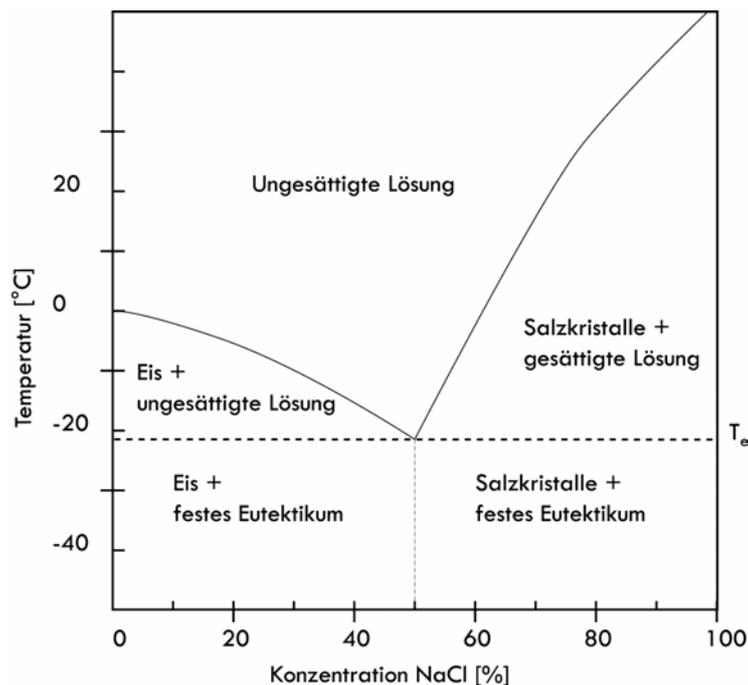


Abbildung I-6 „state“-Diagramm eines NaCl/Wasser-Systems - Einfrierverhalten einer Natriumchlorid-Lösung

Während des Einfriervorganges beginnt das Wasser auszukristallisieren. Es entstehen so bei langsamen Abkühlgeschwindigkeiten Eiskristalle und eine Zone mit Lösung, die sich immer weiter, bis zum Erreichen des eutektischen Punktes, aufkonzentrieren kann. Der Eutektische Punkt stellt die tiefste Temperatur dar, bei der noch ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen fest und flüssig herrscht (Abbildung I-6). Dieser Punkt auf der Temperaturskala ist durch das

Mischungsverhältnis der Komponenten charakterisiert. Unterhalb des Eutektischen Punktes kristallisieren Wasser und die gelöste Substanz nebeneinander aus.⁸

Bei gleichmäßigem Wärmeentzug, wenn durch Kristallisationskeime die Unterkühlung verhindert wird, bilden sich glatte Eisschichten. Beim Erstarren aus unterkühltem Wasser oder Lösungen wird die lokal freiwerdende Erstarrungswärme rasch auf die umgebende Flüssigkeit übertragen. Dadurch entsteht ein inhomogenes System, in dem verzweigte Kristalle und Dendriten wachsen.³⁵ Die schematische Darstellung eines solchen inhomogenen Systems mit seinen unterschiedlichen Strukturen zeigt die Abbildung I-7. Der gefrorene Produktkuchen zeigt säulenartige nach oben gerichtete Strukturen teilweise mit einem aufgelagerten Häutchen⁵² (siehe auch unter Punkt 2.3.1). Die vertikale Ausrichtung der Strukturen ist eine Folge des Temperaturgradienten beim Einfrieren. Durch diese Säulenstrukturen entstehen später während der Haupttrocknung Kanäle, die einen einfachen Stofftransport erlauben. Begrenzt wird dieser Wasserdampftransport durch das Häutchen.

Bei sehr ausgeprägten Temperaturgradienten z.B. in Kältebädern, die dann von der Gefäßwand zur Mitte gerichtet sind, entstehen sehr hohe Abkühl- und Kristallisationsgeschwindigkeiten. Hier entstehen radial ausgerichtete Strukturen, da das Produkt von außen und unten nach innen einfriert. Eis nimmt ein größeres Volumen als die flüssige Lösung ein und schiebt die verbleibende Restlösung zuerst nach innen und dann in der Mitte nach oben. So entsteht das typische Erscheinungsbild dieser Produktkuchen mit einer spitzen Erhebung in der Mitte.⁹⁰

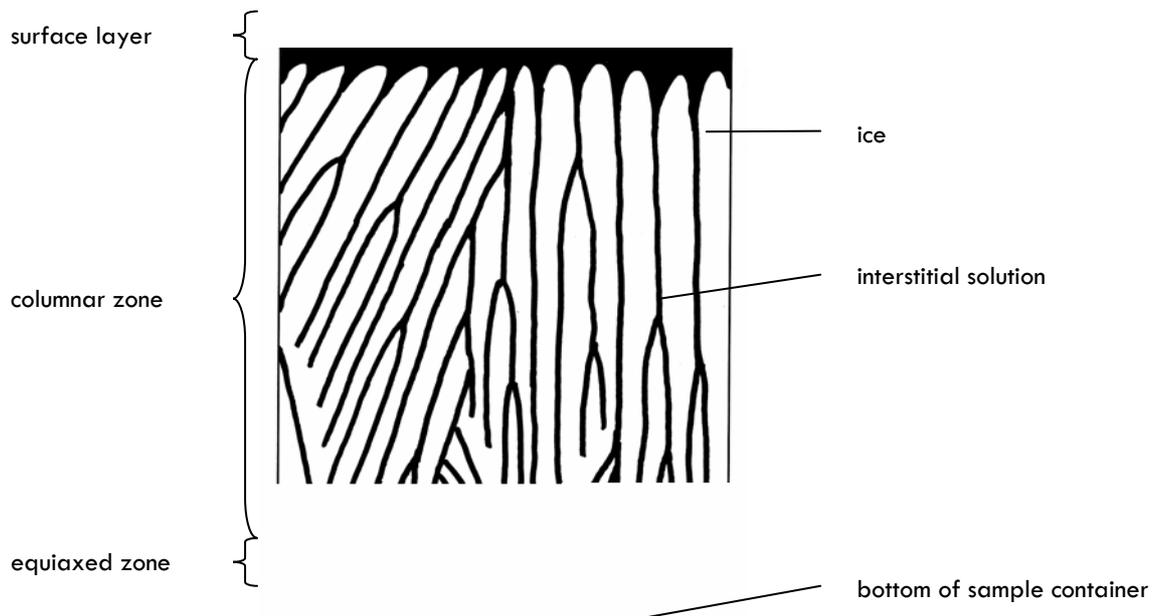


Abbildung I-7 Gefrorener Produktkuchen mit Säulenstruktur und Häutchen⁶⁶

Durch die Kristallisationseffekte kommt es unweigerlich zu einer Aufkonzentrierung der Lösungen. Diese Gefrierkonzentration kann eine deutliche pH-Verschiebung, Flockung und Koagulation verursachen, die dann zu einer Zerstörung empfindlicher Strukturen, z.B. von Proteinen, führt.³² Gerade in mehrprotonigen Puffersystemen mit unterschiedlichen Löslichkeiten der einzelnen Pufferkomponenten ist eine deutliche pH-Verschiebung zu beobachten. Klassisches Beispiel ist der Natriumphosphatpuffer, da Dinatriumhydrogenphosphat bei tieferen Temperaturen eine geringere Löslichkeit besitzt als Natriumdihydrogenphosphat.³³ Auch können chemische Reaktionen schneller ablaufen, wenn die Erhöhung der Eduktkonzentration die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei Temperatursenkung überkompensiert.^{39,119} Die Gefrierkonzentration ist daher meist qualitätsmindernd und ist zu vermeiden.⁴⁶

In Gegenwart insbesondere von Zuckerhydraten, Proteinen und anderen Polymeren wie z.B. Polysacchariden findet vielfach auch unterhalb des eutektischen Punktes keine vollständige Kristallisation statt (Abbildung I-8).

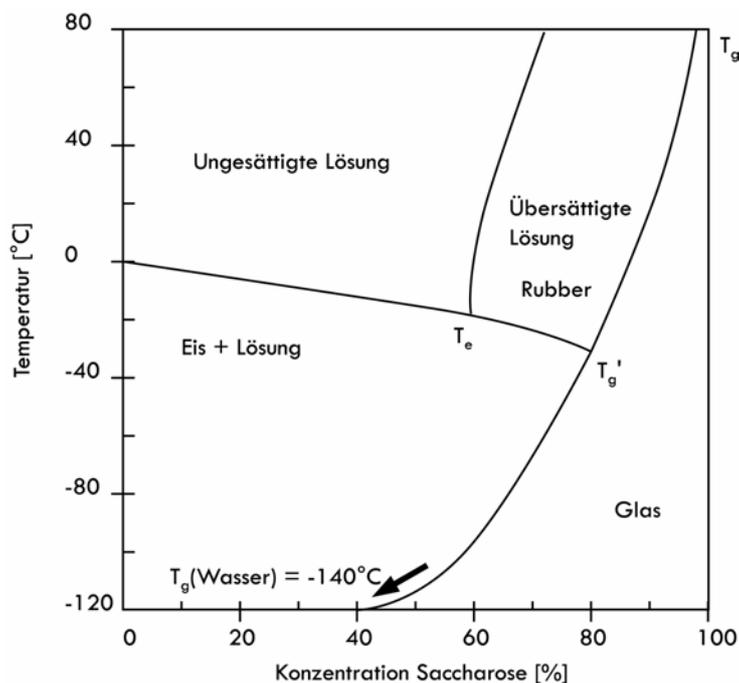


Abbildung I-8 „state“-Diagramm eines Saccharose/Wasser-Systems - Einfrierverhalten einer Saccharose-Lösung³⁶

Der gesamte Rest der aufkonzentrierten Flüssigkeit erstarrt kinetisch als unterkühlte Flüssigkeit ohne vollständige Phasentrennung.^{80,108} Es bildet sich ein isotropes Glas.^{37,123}

Die Temperatur, unterhalb der es zur vollständigen Erstarrung kommt, wird als Glasübergangstemperatur bezeichnet.^{1,2} Unterschieden wird zwischen der Glasübergangstemperatur T_g und T_g' . Mit T_g wird der Übergang von einer Schmelze in den

amorphen Festkörper durch Abkühlung gekennzeichnet. Der Übergang einer Lösung in einen amorphen Festkörper durch Gefrieren wird mit T_g' abgekürzt (Abbildung I-8).³⁶

Im diesem Glas sind die Moleküle nahezu kinetisch immobilisiert, die Diffusion ist stark vermindert und die Viskosität steigt auf über 10^{12} Pas an. Zu einer nicht mehr messbaren Diffusion kommt es aber erst bei deutlich tieferen Temperaturen⁴². Das Glas stellt einen Festkörper mit der Struktur einer Flüssigkeit und dem Energiegehalt einer Lösung dar.³² Dadurch, dass keine thermodynamische Stabilisierung der Molekülanordnung stattfindet, wie sie vom Kristall bekannt ist, ergeben sich sehr kleine Energieübergänge beim Erweichen eines Glases. So ist die Bestimmung von Glasübergängen mittels DSC nicht trivial und bedarf einer besonderen Auswertung.^{18,27,83,106}

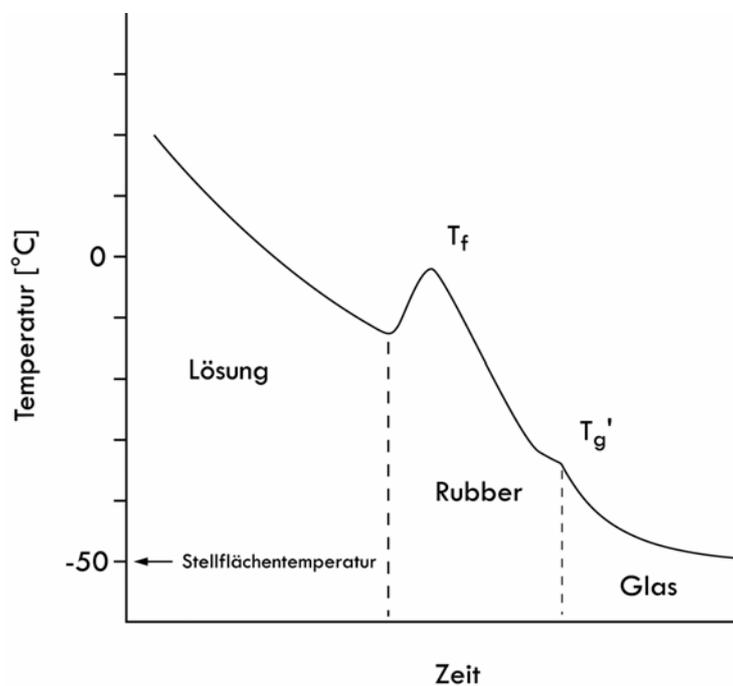


Abbildung I-9 Temperaturverlauf einer wässrigen Saccharoselösung beim Einfrieren.⁸⁷

Ziel ist es, durch diese Immobilisierung die Lösung vollständig zu fixieren, damit während des anschließenden Trocknungsprozesses eine fortschreitende Aufkonzentrierung und Kristallisation verhindert wird.⁵¹

Beim Einfrieren muss daher auf eine Temperatur unterhalb der Glasübergangstemperatur T_g' geachtet werden (Abbildung I-9). Im Allgemeinen reicht hierzu eine Einfriertemperatur kleiner -40°C aus.⁹⁰

2.3.1. Einfriergeschwindigkeit

Die Einfriergeschwindigkeit ist für die Eigenschaften des Lyophilisates, besonders hinsichtlich Porosität definiert durch die Kristallgröße und Kristallform des Eises, entscheidend. Durch die Einfriergeschwindigkeit lässt sich das Kristallwachstum direkt steuern.²⁹ Parallel zum Eiskristallwachstum muss immer die Gefrierkonzentration im Produkt beachtet werden.

Bei langsamen Einfriergeschwindigkeiten bleibt den Wassermolekülen ausreichend Zeit ihren Platz im Kristallgitter einzunehmen, wodurch die Bildung großer Eiskristalle möglich ist. Gleichzeitig schieben die langsam wachsenden Eiskristalle eine sich immer stärker aufkonzentrierende Lösung vor sich her, die schließlich unterhalb des eutektischen Punktes bzw. der Glasübergangstemperatur als Spiegel oder Häutchen erstarrt (Abbildung I-7). Je langsamer der Einfrierprozess abläuft, desto stärker ist der Spiegel ausgeprägt. Neben dieser makroskopischen Aufkonzentrierung kommt es gleichzeitig zu einer mikroskopischen Aufkonzentrierung.¹⁶ Hier handelt es sich um Einschlüsse zwischen den Eiskristallen, die bei schnelleren Einfriergeschwindigkeiten überwiegen. Wie stark diese Aufkonzentrierungen ausgeprägt sind, hängt von der Einfriergeschwindigkeit und dem Volumen des zu trocknenden Produktes ab. Besonders großvolumige Produkte sind problematisch, da durch Wärmeleitung über längere Wege die Energie, besonders die schlagartig freiwerdende Kristallisationsenergie, abgeführt werden muss. Die längeren Wege der Wärmeleitung und die großen Energiemengen beeinflussen daher die Einfriergeschwindigkeit und damit den Einfriervorgang massiv. Einen nicht unerheblichen Einfluss auf den Einfriervorgang hat daher auch die Leistungsfähigkeit der Gefriertrocknungsanlage. Dies gilt wieder im Besonderen für großvolumige Produkte.

Zur Charakterisierung des Einfriervorgangs wird zwischen langsamem, moderatem und schnellem Einfrieren unterschieden. Der Verlauf der verschiedenen Einfrierarten ist in Abbildung I-10 schematisch dargestellt. An den Plateauphasen nach den Minima in der Temperaturkurve wird Kristallisationswärme frei.¹²²

Beim schnellen Einfrieren erfolgt eine schnelle Kristallisation, die zu einer heterogenen Eisstruktur mit kleinen Kristallen und damit zu kleinen Poren führt (Abbildung I-10).⁹⁰ Die Gefrierkonzentrationseffekte sind folglich geringer. Durch die geringere Gefrierkonzentration ist die Temperatur des vollständigen Gefrierens zu höheren Werten verschoben, wodurch eine Trocknung bei höheren Temperaturen und somit auch eine schnellere Trocknung möglich ist. Das Wasser kann am Anfang, aufgrund der hohen Oberfläche der vielen kleinen Eiskristalle, mit einer sehr hohen Geschwindigkeit sublimieren. Im Verlauf der Trocknung nimmt die Geschwindigkeit stetig ab, da durch die feinporöse Struktur der Widerstand für den Wasserdampf immer höher wird. Durch die beim schnellen Einfrieren ausgeprägteren

amorphen Strukturen hat das Produkt am Ende der Haupttrocknung auch eine deutlich höhere Restfeuchte, da das Wasser erst in der Nachtrocknung wegen der höheren Bindungsenergien entfernt werden kann.⁹⁰

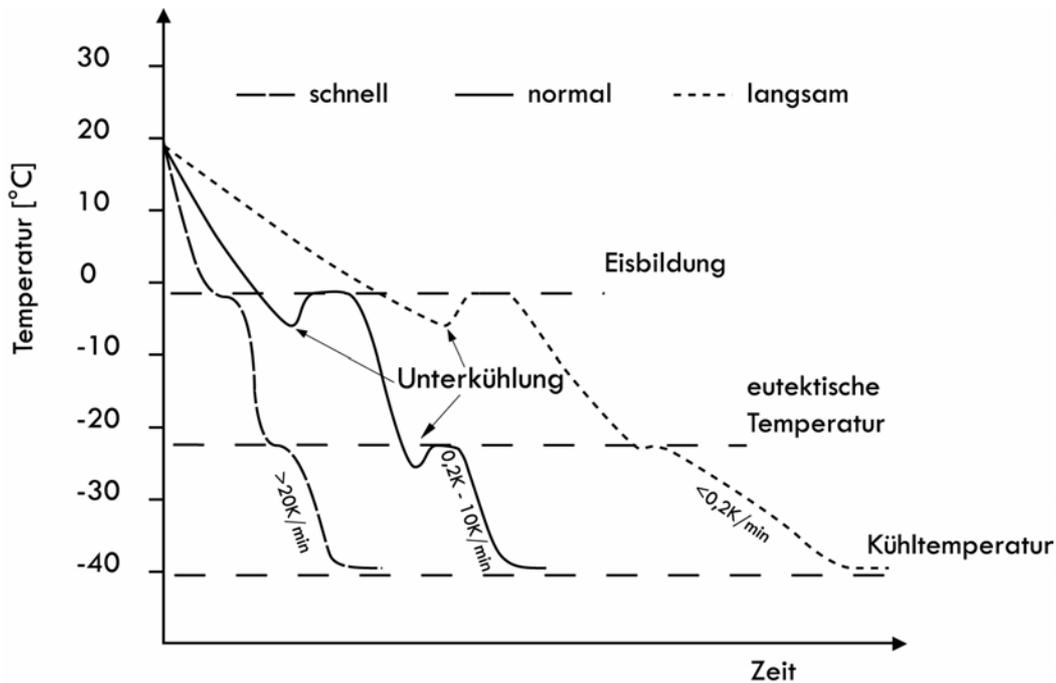


Abbildung I-10 Einfluss der Einfriereschwindigkeit auf die Unterkühlung

Das andere Extrem, langsames Einfrieren, führt zu einer Unterkühlung der Lösung, die je nach Reinheit der Lösung und Beschaffenheit der Oberfläche der Vials verschieden stark ausgeprägt ist. Der einsetzende Kristallisationsprozess verläuft anfangs sehr rasch und führt zu unregelmäßigen Kristallen, die im Anschluss langsam weiter wachsen können. Es entsteht tendenziell eine kristalline, säulenartige Struktur, die sich in einer höheren mechanischen Stabilität äußert.⁹⁰ Durch dieses langsame Kristallwachstum kommt es aber auch zu einer starken Gefrierkonzentration. Aufgrund dieser vergleichsweise großen Zonen mit hoher Produktkonzentration, in denen das Produkt als Glas vorliegen kann, muss bei tieferen Temperaturen getrocknet werden, um ein mögliches Antauen zu vermeiden. Bei starker Unterkühlung ist es auch möglich, dass trotz der freiwerdenden Kristallisationswärme die Lösung wie beim schnellen Einfrieren auf einen Schlag komplett durchfriert.

Das moderate Einfrieren stellt einen Mittelweg zwischen den beiden Extremen dar. Hier bilden sich weitgehend homogene Eisstrukturen mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser aus, die für eine gute Sublimationsfähigkeit in der Haupttrocknung sorgt.

Neben dem Problem der extremen Unterkühlung und damit schlagartigem Einfrieren, kann im selben Einfrierprozess gleichzeitig auch das langsame Einfrieren auftreten. Die gleichzeitige und schnelle Kristallisation größerer Produktmengen kann in ungünstigen Ausnahmefällen genügend Energie freisetzen, um den Gefriervorgang direkt benachbarter Regionen deutlich

zu verlangsamen. Im Extremfall kann das dazu führen, dass vereinzelte Vials sogar nach dem Prinzip des langsamen Einfrierens erstarren. In diesem Fall entsteht eine inhomogene Charge. Einzelne Vials, die statistisch über den Gefriertrockner verteilt sind, zeigen eine andere Struktur und weichen zum Teil auch in ihrer Restfeuchte vom Rest der Charge ab.

Unterkühlung sollte daher nach Möglichkeit vermieden werden. Eine Möglichkeit wäre durch Vibration unterhalb des Gefrierpunktes. Die technischen Voraussetzungen dafür sind nur vereinzelt in Spezialanfertigungen realisiert worden. Die Vermeidung der Unterkühlung durch vakuuminduziertes Einfrieren wäre ebenfalls eine Möglichkeit.⁷⁰ In der Regel wird durch ausreichende Leistungsreserven der Gefriertrocknungsanlage der Effekt kompensiert, damit für die gesamte Charge ein möglichst homogener Einfriervorgang und dadurch eine homogene Produktstruktur gewährleistet werden kann.

Der Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichen Porendurchmesser und der Einfriergeschwindigkeit ist in Abbildung I-11 dargestellt.¹¹⁴

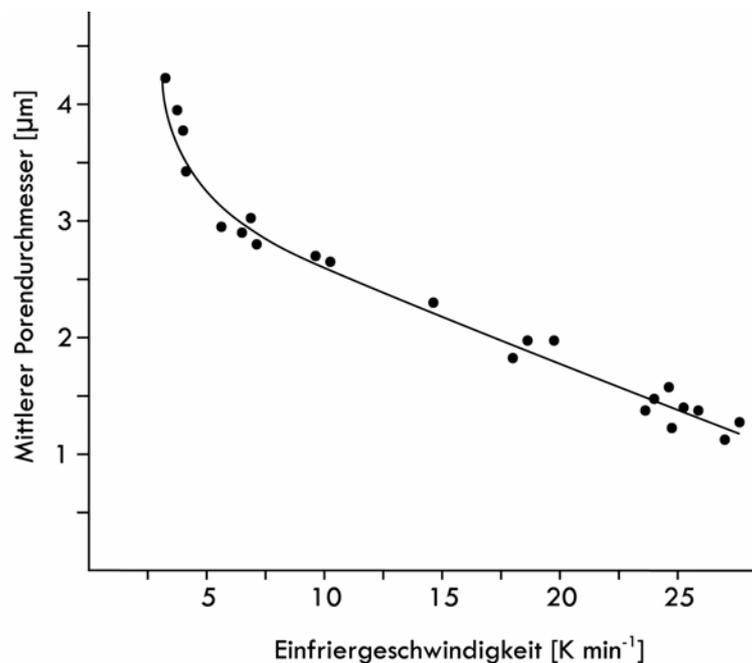


Abbildung I-11 Abhängigkeit der mittleren Porendurchmesser gefriergetrockneter Dextrin-Lösungen von der Einfriergeschwindigkeit⁹⁰

Der Einfriervorgang ist daher ein entscheidender Faktor um gleichbleibende Qualität in der mechanischen Stabilität, dem Auflösverhalten und der Restfeuchte des Produktes und damit letztlich der Stabilität des Wirkstoffes zu gewährleisten.

Welcher Temperatur- Zeitverlauf beim Einfrieren optimal für die Lyophilisation ist, ist produktspezifisch und muss individuell für jede Applikation angepasst werden.^{81,119}

2.3.2. Thermal Treatment (Tempern)

Das Thermal Treatment, Annealing oder im Deutschen auch Tempern genannt, stellt eine Sonderbehandlung des Produktes während des Einfriervorganges dar. In Abbildung I-12 ist ein Gefriertrocknungsprogramm mit einem Tempersschritt dargestellt. Hier wird nach dem Einfrieren das Produkt wieder auf eine Temperatur knapp oberhalb der Glasübergangstemperatur aber unterhalb des Schmelzpunktes erwärmt. Durch diese Temperaturerhöhung werden die Diffusions- und Kristallisationsvorgänge wieder aktiviert. Durch die Diffusion der Wassermoleküle wird ein weiteres Wachstum der Eiskristalle begünstigt und es entstehen große Kristalle mit der daraus resultierenden, hohen Sublimationsgeschwindigkeit, ohne eine übermäßige Gefrierkonzentration zu riskieren.^{63,69,117}

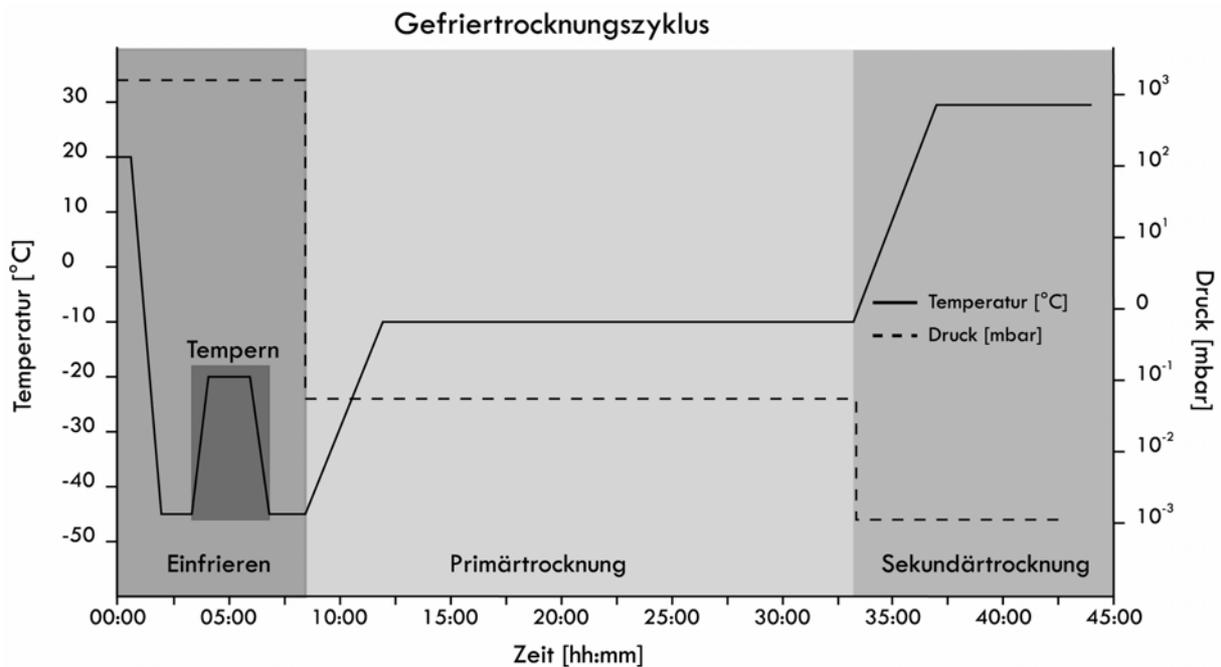


Abbildung I-12 Gefriertrocknungsprozess mit einem Tempersschritt beim Einfrieren

Ein zweiter Ansatzpunkt ist die gezielte Kristallisation von teilmorphen Strukturen. Ungewollte, metastabile, amorphe Strukturen können durch eine spätere, vor allem während der Lagerung auf Grund der höheren Temperatur auftretende Kristallisation, die Stabilität des Produktes deutlich beeinflussen. Durch die höhere Temperatur können in der Formulierung vorhandene Salze oder Gerüstbildner wie z.B. Glycin oder Mannitol in die deutlich stabilere Kristallform umgewandelt werden.^{3,19,60,103}

2.4. Primärtrocknung

Die Primär- oder auch Haupttrocknung ist der erste Schritt im Trocknungsprozess. In der Primärtrocknung wird das Eis mittels Sublimation direkt vom festen in den gasförmigen Aggregatzustand überführt. Zu diesem Zweck werden durch Anlegen eines Vakuums an die Trocknungskammer Sublimationsbedingungen hergestellt (siehe Punkt 2.1).

Der Sublimationsvorgang benötigt große Mengen an Energie. Über eine Temperaturregelung der Stellflächen wird dem Produkt diese Energie in Form von Wärme kontrolliert zugeführt. Der Wärmeeintrag erfolgt, wie in Abbildung I-13 dargestellt, durch direkten Kontakt¹³⁵ mit der Stellfläche, durch Konvektion und durch Wärmestrahlung⁴⁸(siehe auch Punkt 2.2).

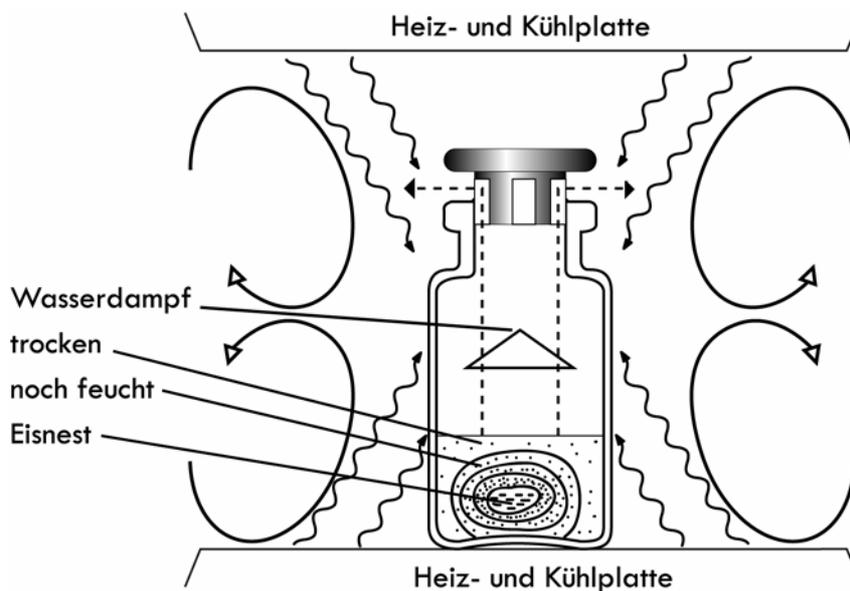


Abbildung I-13 Trocknung und Wasserdampftransport

Zur klaren Abgrenzung muss zwischen der Stellflächentemperatur und der Produkttemperatur unterschieden werden. Gerade während der Primärtrocknung sind Differenzen dieser Temperaturen von 30°C und mehr durch den Energieverbrauch zur Sublimation durchaus üblich.

T [°C]	p _s [mbar]	T [°C]	p _s [mbar]	T [°C]	p _s [mbar]
-85	23,53 x 10 ⁻⁵	-55	20,92 x 10 ⁻³	-25	0,6323
-80	0,5473 x 10 ⁻³	-50	39,35 x 10 ⁻³	-20	1,032
-75	1,220 x 10 ⁻³	-45	71,98 x 10 ⁻³	-15	1,652
-70	2,615 x 10 ⁻³	-40	0,1283	-10	2,597
-65	5,406 x 10 ⁻³	-35	0,2233	-5	4,015
-60	10,80 x 10 ⁻³	-30	0,3798	-1	5,623

Tabelle I-2 Gleichgewichtsdruck des Wasserdampfes über Eis⁹⁰

Die Produkttemperatur wird durch den Kammerdruck definiert, da über den Kammerdruck der maximale Wasserdampfdruck über dem Eis festgelegt wird. Diesem Wasserdampfdruck ist eine entsprechende Temperatur zugeordnet, die der Temperatur an der Sublimationsfront entspricht (Tabelle I-2).

Die Temperatur der Stellflächen wird soweit erhöht, bis sich das Maximum zwischen Energieverbrauch zur Sublimation und der Energiezufuhr einstellt, ohne dass die Glasübergangstemperatur im Produkt überschritten wird (Punkt 2.2). Ziel ist, eine schnelle Trocknung bei konstanter Produkttemperatur zu erreichen.

Entscheidend geprägt ist die Wahl der Trocknungsparameter, Druck und Stellflächentemperatur, durch die Formulierung und die während des Einfriervorganges festgelegte Struktur. In der Primärtrocknung gilt es unter Erhaltung dieser Struktur zu trocknen, was nur durch Trocknung unterhalb der Glasübergangstemperatur bzw. der Kollapstemperatur erfolgen kann. Deshalb muss auch hier, genau wie beim Einfrieren, zwischen Produkten mit amorphen Strukturen und rein kristallinen Produkten unterschieden werden.

Die Kollapstemperatur ist durch den Übergang von gefrorenen Glasstrukturen zum viskosen Rubber definiert. Als Kollaps selbst werden erste sichtbare Anzeichen eines Anschmelzens der Produktstrukturen bezeichnet. Neben der optisch deutlich sichtbaren Veränderung, bis hin zu einem Totalverlust der Produktstruktur, ist die Stabilität der Wirkstoffe im Besonderen von Proteinen deutlich beeinflusst.⁵¹ Dieser Zusammenhang zwischen Kollaps und dem Verlust der Aktivität wurde an vielen Proteinen gezeigt und gilt daher als Qualitätsmakel.^{2,78} Die Kollapstemperatur kann präzise mit Hilfe eines Kryomikroskops oder durch Beobachtung während der Gefriertrocknung experimentell ermittelt werden und liegt in der Regel wenig oberhalb der Glasübergangstemperatur.^{2,78,93}

Um den Primärtrocknungsprozess effektiv zu gestalten, muss mit der höchstmöglichen Temperatur und damit nahe an der Kollapstemperatur getrocknet werden. Je höher die Produkttemperatur ist, desto ausgeprägter ist auch das Temperaturgefälle zum Eiskondensator und damit der Wasserdampfstrom (Punkt 2.1).

Außer der Produkttemperatur beeinflusst der Druck ebenso die Sublimationsgeschwindigkeit. Die Wahl des Trocknungsdruckes ist auch hier ein Kompromiss zwischen Sicherheit und schneller Trocknung. Je höher der Trocknungsdruck, desto schneller die Trocknung, aber auch desto höher die Produkttemperatur.^{56,66,93} Im Laufe der Primärtrocknung wandert die Sublimationsfront im Produktial von oben nach unten und von außen nach innen (Abbildung I-13).¹¹⁸ Mit voranschreitender Trocknungszeit wird damit der Widerstand für den Wasserdampf durch eine von der Formulierung und dem Einfrierprozess abhängigen, mit Kanälen durchzogenen, porösen Struktur deutlich erhöht. Dieser ebenfalls unter Punkt 2.1 erwähnte Produktwiderstand beeinflusst den Wasserdampfstrom und damit die Sublimationsgeschwindigkeit und die

Produkttemperatur im Laufe der Trocknung erheblich. Die Behinderung des Wasserdampftransports und die Bedeutung des Produktwiderstandes wird unter Punkt 2.4.1 genauer diskutiert.

Zusätzlich wird die Steuerung der Energiezufuhr durch gleichzeitige Veränderungen in der Wärmeübertragung erschwert. Zu Beginn der Primärtrocknung wird der größte Anteil der Energie durch den direkten Kontakt von der Stellfläche über das Glas auf das Produkt übertragen. Im Laufe der Primärtrocknung wird die als Isolator wirkende Schicht, von porösem trockenem Produkt dicker und die Bedeutung der Wärmestrahlung innerhalb des Produktes nimmt zu.¹¹¹

Aufgrund dieser Vielzahl, sich untereinander stark beeinflussenden Faktoren, gilt es für jede Rezeptur ein optimales Druck- Temperatur-Profil zu erstellen, dass eine Trocknung mit maximaler Sublimationsrate ermöglicht, ohne die Kollapstemperatur des Produktes zu überschreiten.

Die Primärtrocknung gilt als abgeschlossen, wenn kein sublimierfähiges Eis im Produkt mehr vorhanden ist. Die Messmethoden zur Abgrenzung zwischen Primär- und Sekundärtrocknung werden unter Punkt 4.3 ausführlich erläutert.

2.4.1. Wasserdampftransport

Von der Sublimationsfront bis zur Resublimation am Eiskondensator liegt vor dem Wasserdampf ein weiter Weg mit Engstellen, die einen mehr oder minder starken Widerstand für den Wasserdampftransport darstellen. In Abbildung I-14 sind die drei Einflussarten, Kondensator- oder Kammerwiderstand, der Stopfenwiderstand und der Produktwiderstand in der Gewichtung zueinander dargestellt.^{67,93}

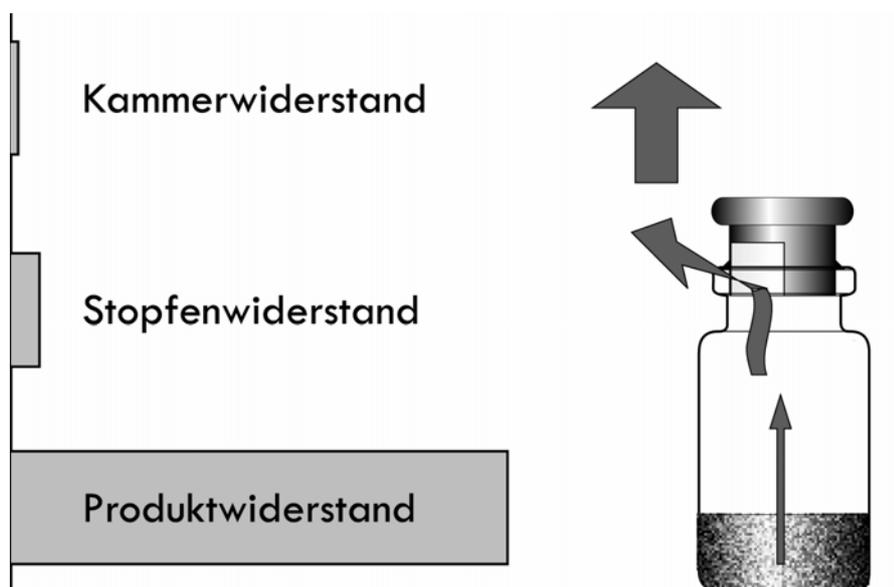


Abbildung I-14 Widerstände für den Wasserdampf während der Gefriertrocknung⁵⁷

Der Kammerwiderstand ist durch die Bauform und die Anordnung der Trocknungskammer und des Eiskondensators definiert. In der Regel wird auf einen großen Querschnitt und einem kurzen Weg zwischen Trocknungskammer und Eiskondensator geachtet. Nur bei einem Transfer zwischen extrem unterschiedlichen Bauformen sollte dieser Faktor näher betrachtet werden. Der Stopfenwiderstand kann bei der Auswahl ungeeigneter oder falsch gesetzter Stopfen den Trocknungsprozess merklich beeinflussen. Je nach Stopfentyp sind ein oder mehrere Öffnungen mit verschiedenen großen Querschnitten für den Wasserdampfstrom vorhanden. Gerade auch Vials mit versehentlich beim Setzen der Temperaturfühler eingedrückte Stopfen, zeigen nach der Gefriertrocknung durch die verlangsamte Trocknungszeit teilkollabierte Strukturen oder eine erhöhte Restfeuchte.¹³²

Der mit Abstand größte Einflussfaktor ist der Produktwiderstand. Er ist nicht nur ein entscheidender, sondern auch ein schwer abschätzbarer Einflussfaktor auf den Trocknungsverlauf.⁶⁷ Der Produktwiderstand ist direkt von der Schichtdicke, der Struktur der Produktmatrix und dem Einfriervorgang abhängig.⁹³

Wie schon unter Punkt 2.3.1 erläutert, wird mit der Einfriergeschwindigkeit die Größe der Eiskristalle festgelegt. Bei der Sublimation großer Kristalle entstehen lange Kanäle, über die große Mengen Wasserdampf sehr leicht entweichen können. Je kleiner die Eiskristalle im Produkt sind, desto schwieriger wird der Wasserdampftransport, da die Kanäle auch entsprechend kleiner ausfallen oder sich erst durch verschiedene Mechanismen ausbilden müssen (Abbildung I-15). Anfangs können dafür deutlich höhere Sublimationsraten aufgrund der größeren Oberfläche der Eiskristalle erreicht werden.

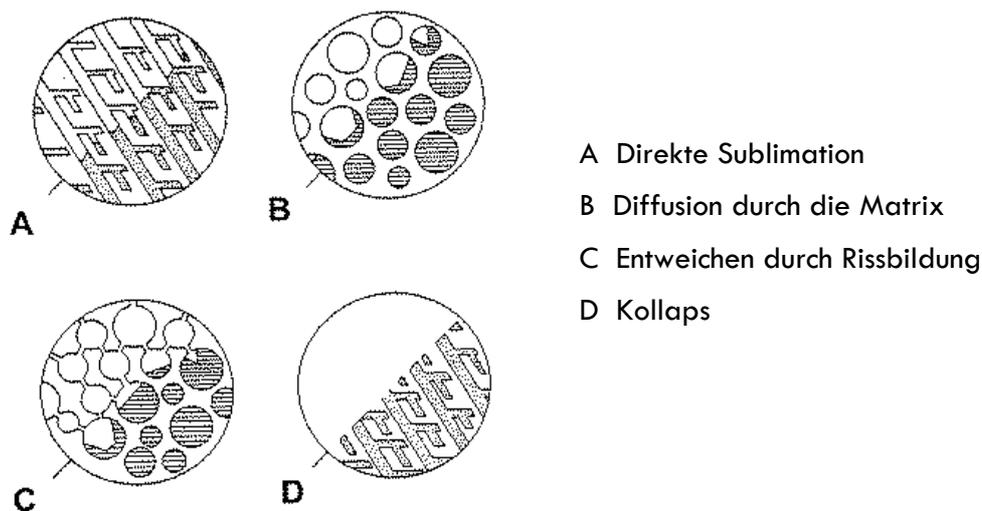


Abbildung I-15 Verschiedene Sublimationsmechanismen bei der Gefriertrocknung⁷⁹

In den amorphen Anteilen des Produktes ist das Wasser molekular eingeschlossen und wird nur langsam durch Diffusionsvorgänge hauptsächlich in der Nachrocknung abgegeben. Diese amorphen Strukturen wirken wie Barrieren, durch die sich der Wasserdampf einen Weg

bahnen muss. Gerade bei diesen inhomogenen Strukturen kann es punktuell zu einem Wasserdampfstau kommen, der dann auch zu einem partiellen Kollaps führen kann. Oft wird auch ein Häutchen (Abbildung I-7), das sich durch den Effekt der Gefrierkonzentration an der Oberfläche bilden kann, beobachtet. Solche Strukturen behindern den Wasserdampftransport erheblich und sind bei der Dosierung der Wärmezufuhr und der Wahl des Trocknungsdruckes zu beachten.³⁰ Teilweise kommt es sogar zum charakteristischen Kollaps der Strukturen durch Wasserdampfstau direkt unterhalb des Häutchens.

2.5. Sekundärtrocknung

Mit der vollständigen Sublimation gilt die Primärtrocknung als abgeschlossen. Trotzdem verbleiben noch zwischen 5–30% des ursprünglich vorhandenen Wassers im Produkt.⁴³ Dieses Wasser ist in Form von Hydrat-/Quellungswasser oder Konstitutionswasser adsorbiert bzw. eingeschlossen und steht über Wasserstoffbrücken oder Ionen-Dipolwechselwirkungen mit hydrophilen Strukturen in Kontakt.¹¹⁸

Bei kristallinen Strukturen ist das Wasser an den Oberflächen gebunden und durch Desorption und Verdampfung relativ schnell zu entfernen. In amorphen Strukturen ist die Diffusion aus dem Inneren der amorphen Masse geschwindigkeitsbestimmend.⁹⁶

Zur Entfernung dieses ‚non-frozen‘ Wassers, das der Sublimation nicht zugänglich ist, sind deutlich höhere Energien notwendig.¹³⁸ Die Stellflächen können je nach Temperaturempfindlichkeit des Wirkstoffes auf Temperaturen von über 50°C erhitzt werden und der Druck in der Regel auf 10^{-2} – 10^{-3} mbar verringert.

Bei amorphen Strukturen wird durch Entzug des Wassers auch dessen Weichmachereffekt vermindert, so dass die Glasübergangstemperatur entsprechend ansteigt und die Kollapsgefahr sinkt.¹⁵ Die Temperatur der Stellflächen ist an diesen Effekt anzupassen und wird in der Regel in Stufen oder langsamen Rampen erhöht.

Durch Wahl der Stellflächentemperatur und die Dauer der Sekundärtrocknung wird der Wassergehalt des Produktes auf den gewünschten Wert eingestellt.

Die Desorptionsvorgänge der Sekundärtrocknung finden schon während der Primärtrocknung in den bereits getrockneten Bereichen statt. Mit dem Ende der Sublimation entfällt die Selbstkühlung des Produktes und die Temperatur nähert sich der Stellflächentemperatur an. In dieser Phase nimmt die Restfeuchte deutlich ab, bis ein ‚Restfeuchteplateau‘ entsprechend der Stellflächentemperatur erreicht wird. Um die Restfeuchte weiter abzusenken, muss dann die Stellflächentemperatur erhöht werden. Im Gegensatz zur Primärtrocknung ist hier die Schichtdicke des Kuchens nicht relevant. Entscheidend für schnelle Desorptionsvorgänge ist eine möglichst große innere Oberfläche.

Bei komplexem Material wie Proteinen und Zellstrukturen wird ein Restfeuchteoptimum im Bereich weniger Prozent zur Stabilisierung der Struktur diskutiert. Ein Übertrocknen führt hier zur Entfernung für die Stabilität essentiellen Wassers, was bei nicht optimal stabilisierenden Rezepturen die Produkte irreversibel zerstören kann.⁴⁹

3. Aufbau einer Gefriertrocknungsanlage

Eine Gefriertrocknungsanlage besteht aus drei Baugruppen: Der Trocknungskammer, in der sich das Produkt befindet, dem Eiskondensator, an dem das sublimierte Wasser wieder als Eis kondensiert und einer Vakuumpumpe, die für den zur Sublimation nötigen Unterdruck sorgt. Abbildung I-16 zeigt den schematischen Aufbau einer Produktionsgefriertrocknungsanlage.

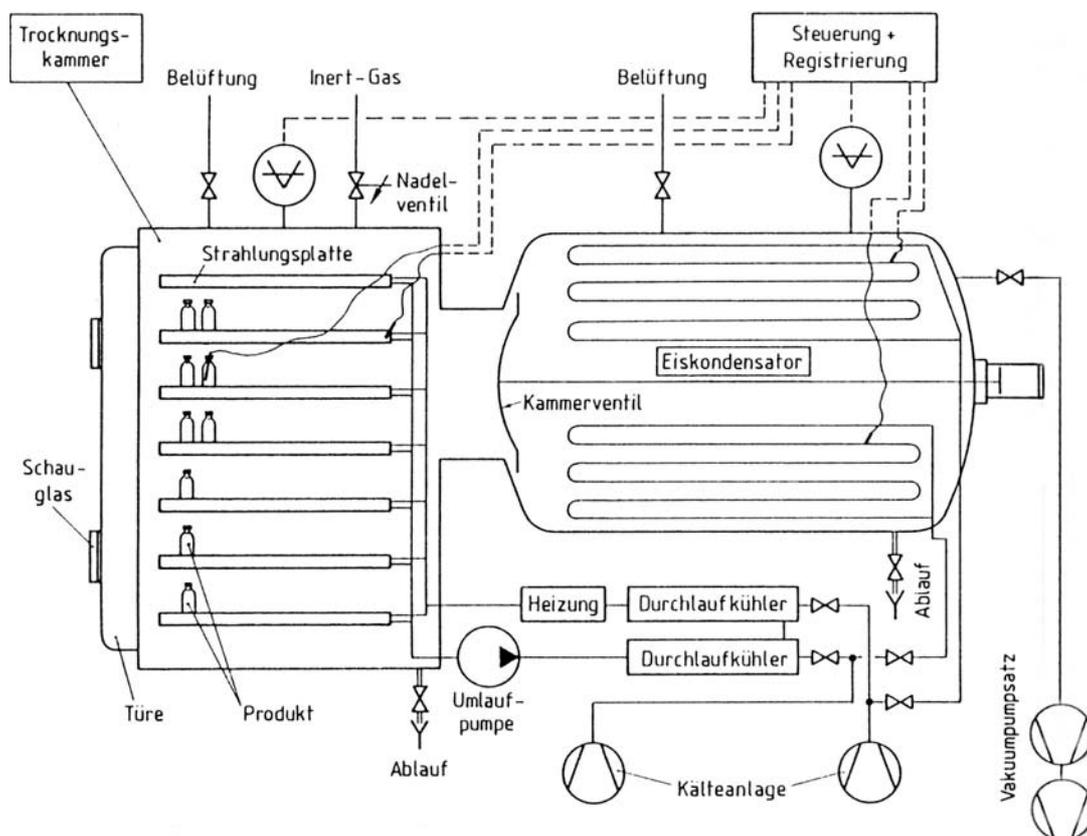


Abbildung I-16 Schematischer Aufbau einer Gefriertrocknungsanlage¹⁰¹

Das Produkt steht in der Trocknungskammer auf temperierbaren Stellflächen. Über diese Stellflächen wird die Energie zum Einfrieren ab- bzw. während der Sublimation wieder zugeführt.

Der Unterdruck wird durch Vakuumpumpen verschiedenen Typs geregelt. Häufig werden Drehschieberpumpen oder Kombinationen aus Drehschieber- und Rootspumpen verwendet, um eine ausreichende Saugleistung über den gesamten Druckbereich von 1 bar bis 10^{-3} mbar zu gewährleisten.

Die Steuerung der Anlage erfolgt oft durch eine Steuereinheit (SPS), die direkt oder über einen Computer programmiert werden kann. Die Aufzeichnung der Daten erfolgt mittels Mehrkanalschreibern und meist auch elektronisch durch einen Computer.^{54,89}

Die Größe, die in der Regel mit der Eiskondensatorkapazität angegeben wird, variieren die Gefriertrockner im Bereich der Pharmazie von kleinen Tischgeräten mit 2 kg bis hin zur Produktionsanlage mit mehr als 500 kg Eiskapazität. Oft werden die Produktionsanlagen den Produkten individuell angepasst und speziell angefertigt.

Da es sich bei der Lyophilisation in der pharmazeutischen Industrie meist um einen aseptischen Herstellungsprozess handelt, sind größere Anlagen mit einem CIP/SIP-System zur Reinigung und Sterilisation ausgestattet. Ebenso sind vollautomatische Be- und Entlade-Roboter für den Schichtbetrieb üblich.

Die Gefriertrockner in der Pharmaindustrie können entsprechend ihrer Größe und Ausstattung grob in die folgenden drei Gruppen eingeteilt werden.

3.1. Labormaßstab

Ausgestattet sind typische Laborgefrierdrying-Anlagen mit einer Vakuumpumpe, zum Teil mit elektrisch beheizbaren Stellflächen und einem Eiskondensator mit einer Eiskondensatorkapazität im Bereich bis zu zwei Kilogramm. Die Möglichkeiten der Prozessregelungen sind zu Gunsten des Preises auf ein Minimum beschränkt. Besonders die Kontrolle des Energieeintrages in die Proben und damit die Möglichkeit Gefrierdrying-Programme zu fahren, ist stark eingeschränkt. GT-Anlagen dieser Bauart sind zur Prozessentwicklung ungeeignet, da kein reproduzierbares Gefrierdrying-Programm gefahren werden kann und sind in der Forschung für die Trocknung bzw. Aufreinigung von Wirkstoffen zur weiteren Verarbeitung zu finden.

3.2. Pilotmaßstab

Pilot- oder Small-Scale-Gefrierdrying unterscheidet sich von den Laborgefrierdrying hauptsächlich durch die Steuerungsmöglichkeiten des Gefrierdryingprozesses. Die Stellflächen werden von einem Wärmeträger durchströmt der temperierbar ist. Dadurch ist es möglich, den Gefrierdryingprozess mit definierten Temperaturprofilen durch die Steuerung der Stellflächentemperatur zu fahren. Auch ist ein Einfrieren mit verschiedenen Geschwindigkeiten innerhalb der Trocknungskammer möglich. Diese Gefrierdrying haben die Dimensionen eines Wandschranks und finden ihren Haupteinsatz in Prozessentwicklungs-, Transfer- oder Upscalelabors sowie in einer sterilisierbaren Variante auch zur Klinikmusterherstellung (Abbildung I-17).



Abbildung I-17 Foto eines Pilotgefrieretrockners, Eiskondensatorkapazität 10-12Kg⁸²

3.3. Produktionsmaßstab

Die Produktionsgefrieretrockner sind von der Ausstattung und Steuerung baugleich mit den Pilotgefrieretrocknern. Aufgrund der Größe und der damit verbundenen Notwendigkeit deutlich größerer Kälteaggregate und Vakuumpumpen wird die Technik in der Regel separat in einem eigenen Raum untergebracht. Auch sind Gefrieretrocknungsanlagen üblich, bei denen die Trocknungskammer und der Eiskondensator durch ihre Anordnung auf zwei Stockwerken verteilt sind.

In Abbildung I-18 ist ein ‚kleineres‘ Exemplar mit 50 Kg Eiskondensatorkapazität abgebildet.



Abbildung I-18 Foto eines Produktionsgefrieretrockners; Eiskondensatorkapazität 50Kg⁸²

4. Messung der Prozessparameter

Ein kontrollierter Gefriertrocknungsprozess ist für die Herstellung von Pharmazeutika zwingend erforderlich, um eine reproduzierbare Qualität zu gewährleisten⁸⁹.

Zur exakten Steuerung werden schnelle und zuverlässige Messinstrumente für einen möglichst schnellen Regelkreis benötigt. Bei der Gefriertrocknung sind die zwei Parameter Druck und Temperatur die entscheidenden Mess- und Regelgrößen, nach denen der Gefriertrocknungsprozess gesteuert wird.

4.1. Druck

Der Gefriertrocknungsprozess bewegt sich in einem weiten Druckbereich vom Atmosphärendruck (10^3 mbar) bis in den Bereich des Feinvakuums (10^{-3} mbar).

Das Einfrieren erfolgt bei Atmosphärendruck. Während der Primärtrocknung werden in der Regel Drücke unterhalb 10^{-1} mbar verwendet und in der Sekundärtrocknung wird der Druck weiter bis auf 10^{-3} mbar abgesenkt.³²

Technisch werden zur Druckmessung bei der Gefriertrocknung zwei unterschiedliche Messprinzipien, die kapazitive Druckmessung und das Wärmeleitfähigkeitsmanometer, eingesetzt.

4.1.1. Kapazitive Druckmessung

Das kapazitive Manometer besteht aus zwei Kammern, die durch eine flexible Membran getrennt sind (Abbildung I-19).

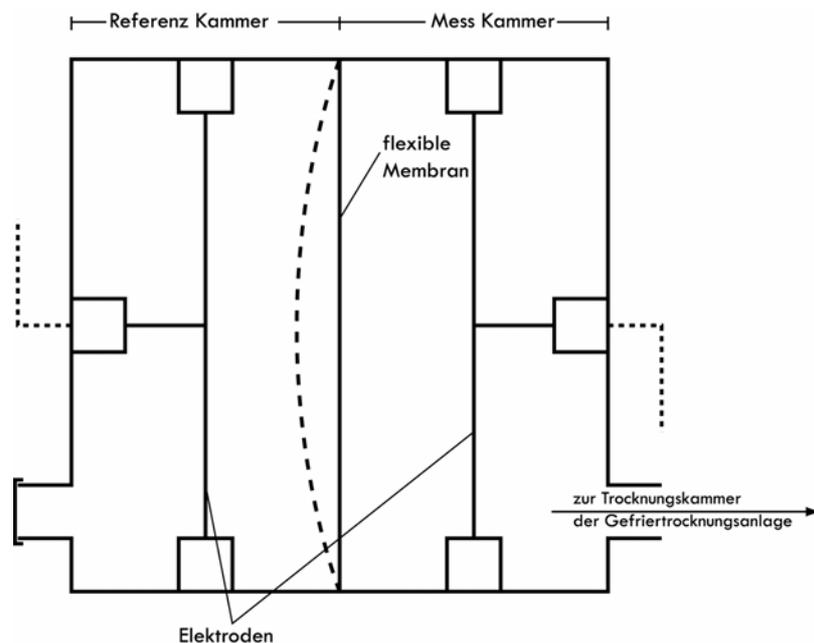


Abbildung I-19 Schematische Darstellung eines kapazitiven Manometers

Eine Kammer ist mit einem Gas definierten Druckes gefüllt. Die andere Kammer ist mit dem Messraum verbunden. Je nach Druckdifferenz wölbt sich die Membran, die Teil eines Kondensators ist. Diese Änderung wird durch eine Änderung der Kondensatorkapazität gemessen und kann in Druckwerte umgerechnet werden. Vorteil dieser Methode ist die gute Auflösung und Reproduzierbarkeit. Um den gesamten Druckbereich von 1 bar bis 10^{-3} mbar mit hinreichender Genauigkeit abdecken zu können, werden in der Regel zwei Messsonden, eine für den oberen und eine für den unteren Druckbereich, eingebaut.¹¹⁵

4.1.2. Wärmeleitfähigkeitsmanometer

Im Gegensatz zur kapazitiven Druckmessung ist die Druckmessung durch ein Wärmeleitfähigkeitsmanometer nach Pirani gasartabhängig.

Das Wärmeleitfähigkeitsmanometer ist ein auf eine exakte Temperatur beheizter, glühender Draht, der Energie an die Umgebung abgibt²⁰ (Abbildung I-20). Je nach umgebender Gasmenge und auch Gasart variiert die abgegebene Energie. Über diesen Zusammenhang lässt sich der Druck berechnen. Dieser Manometertyp wird auf eine bestimmte Gasart, meistens Stickstoff oder Luft, kalibriert. Dadurch kann bei wechselnder Zusammensetzung der Atmosphäre nur eine Druckänderung und kein absoluter Druck gemessen werden.

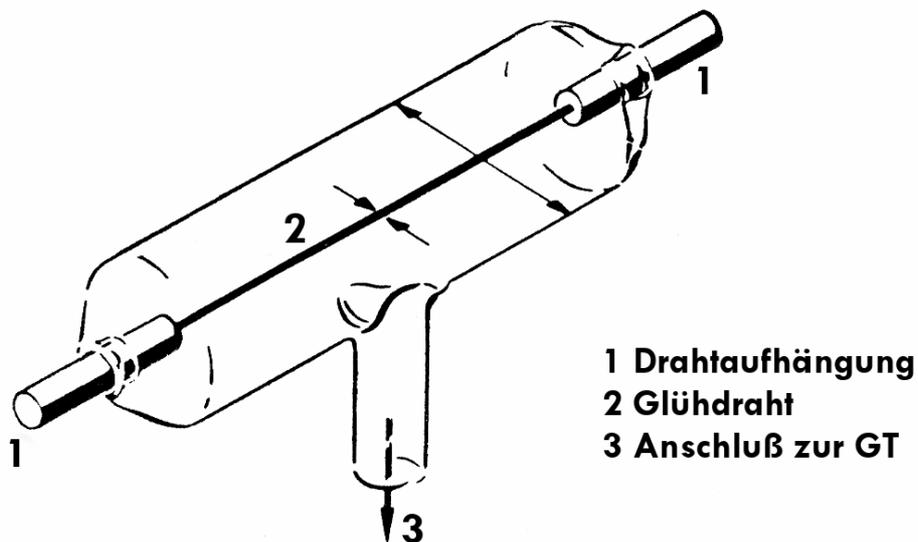


Abbildung I-20 Schematische Darstellung eines Wärmeleitfähigkeitsmanometers

In der Gefriertrocknung führt dies während der Primärtrocknung zu Fehlmessungen, da die Atmosphäre in der Trocknungskammer nahezu vollständig aus Wasserdampf besteht. Wasserdampf besitzt gegenüber Stickstoff eine doppelt so große Wärmekapazität, wodurch ein falscher, zu hoher Druckwert errechnet wird.¹²⁶ Der falsche, in Wirklichkeit niedrigere Druck verlangsamt die Trocknung durch ein Absenken der Produkttemperatur und erfordert dadurch eine längere Primärtrocknung.

Wichtig ist daher in diesem Zusammenhang die Kenntnis des Druckmessprinzips, nachdem die Gefriertrocknungsanlage gesteuert wird. Zur Übertragung von Gefriertrocknungsprozessen mit den verschiedenen Drucksteuerungsmethoden muss auf den absoluten Druck umgerechnet werden. In einer Näherung für die Primärtrocknung gilt, dass der ‚halbierte Piranidruck‘ dem absoluten Kammerdruck entspricht.

Vorteil der Piranidrucksonden ist die schnelle Ansprechzeit und ein großer Druckmessbereich, der dem Anwendungsbereich der Gefriertrocknung entspricht.

4.2. Temperatur

Die zweite Regelgröße der Gefriertrocknung ist die Temperatur der Stellflächen und des Eiskondensators. Die Eiskondensatortemperatur ist normalerweise ungeregelt auf einem möglichst niedrigen Niveau im Bereich von -80°C . Bei nicht-wässriger Gefriertrocknung sind noch tiefere Temperaturen erforderlich, die mit flüssigem Stickstoff erreicht werden können.

Die exakte Messung der Temperatur wird durch eine homogene Struktur und eine gleichmäßige Wärmeleitfähigkeit vereinfacht. Die Stellflächen- und die Eiskondensatortemperatur ist deswegen über Temperaturfühler technisch sehr gut zu kontrollieren.

Die Messung der Produkttemperatur ist schwieriger, da neben der sich stetig ändernden Wärmeleitfähigkeit während des Trocknungsprozesses, auch die genaue Position des Fühlers im Gefäß und der Standort des Gefäßes in der Trocknungskammer den Messwert deutlich beeinflussen. Zusätzlich verändert der Temperaturfühler den Einfriervorgang und beschleunigt den Trocknungsprozess.^{88,85} Eine echte, selbstständige Regelung der Produkttemperatur ist daher schwer zu realisieren, da sehr viele Einflussfaktoren berücksichtigt werden müssen.

Trotzdem lässt sich am Temperatur- Zeitverlauf der Trocknungsprozess gut beobachten und gilt damit als Standardmethode zur Entwicklung von Gefriertrocknungsprozessen.

Einsatz finden zwei Temperatursensoren mit verschiedenen Temperaturmessprinzipen. Daneben kommt auch eine indirekte Temperaturmessung, die Barometrische Temperaturmessung, zum Einsatz.

4.2.1. Widerstandsthermometer

Das Messprinzip beruht auf der Eigenschaft aller Leiter, ihren elektrischen Widerstand in Abhängigkeit von der Temperatur zu verändern.⁵⁰ Diese Eigenschaft ist bei den verschiedenen Werkstoffen unterschiedlich stark ausgeprägt. Der temperaturempfindliche Widerstand, in der Regel Platin, wird in Form einer Messwicklung auf einen Träger aufgebracht. Diese Messwicklungen werden in Glas eingeschmolzen oder in Keramik eingebettet. Um den Anforderungen nach geringen Abmessungen zu genügen, werden dünne Platinschichten auf ein

Keramiksubstrat aufgebracht und anstelle eines Drahtes verwendet. Widerstandsthermometer können im Temperaturbereich von -220°C bis $+600^{\circ}\text{C}$ eingesetzt werden. Die Vorteile liegen in einer hohen Messgenauigkeit und Robustheit.

4.2.2. Thermoelemente

Thermoelemente bestehen aus zwei verschiedenen Metallen, die über zwei Kontaktstellen miteinander verlötet sind. Bei unterschiedlichen Temperaturen an den Lötstellen kann eine Spannungsdifferenz gemessen werden. Die Metalle, die zum Einsatz kommen, sind in der Regel Eisen-Konstantan-, Kupfer-Konstantan- oder Platin-Platinrhodium-Kombinationen. Vorteile sind eine kleine Bauform, ihr sehr großer Temperaturbereich von -200°C bis über 1000°C und ihre sehr kleine Wärmekapazität und damit kurze Ansprechzeit.⁵⁰

Beide Messsysteme, Widerstandsthermometer und Thermoelemente, sind technisch ausgereift, in ihrer Ansprechzeit und Genauigkeit ausreichend und daher für den Einsatz zur Temperaturmessung in der Gefriertrocknung gleichwertig geeignet.

In Abbildung I-21 sind drei in der Gefriertrocknung verwendete Temperaturfühler dargestellt. Links sind zwei Thermoelemente und rechts ein Widerstandsthermometer in direktem Größenvergleich zu einem Euro abgebildet.



Abbildung I-21 Verschiedene Temperaturfühler im direkten Größenvergleich.

Der Unterschied der Temperaturfühler in ihrer Größe ist im Gegensatz zum Typ von Bedeutung. Die Größe sollte in einem sinnvollen Verhältnis zum Produktvolumen stehen, um das Produkt und nicht, wenn ein Grossteil des Temperaturfühlers aus dem Produkt ragt, die Umgebungstemperatur zu messen.

Auch wenn der Temperaturfühler komplett in das Produkt eintaucht, wird die gemessene Temperatur durch die Größe und Lage des Temperaturfühlers beeinflusst.

Die Bedeutung der Größe und der Position des Temperaturfühlers im Vial für die Interpretation des Temperatursignals wird ausführlich im Kapitel III.1.3.3 dargestellt.

4.2.3. Spektroskopische Temperaturmessung

Das Hauptproblem der Temperaturmessung ist der Messsensor direkt im Produkt, der den Gefriertrocknungsvorgang beeinflusst.⁸⁸

Bei der spektroskopischen Temperaturmessung gibt es keinen Kontakt zwischen dem Produkt und dem Messsensor. Grundlage der IR-Temperaturmessung ist, dass jeder Körper Wärme in Form von Strahlung emittiert, die von einem IR-Sensor aufgefangen werden kann. Der für die IR-Temperaturmessung interessante Wellenlängenbereich liegt zwischen $0,7\mu\text{m}$ und $18\mu\text{m}$.

Hauptanwendung der IR-Temperaturmessung sind Hochtemperaturbereiche, die den Einsatz von Temperatursensoren nicht ermöglichen oder hohen Belastungen aussetzen, wie z.B. in der Glasindustrie und bei der Herstellung von Legierungen.

Durch die Entwicklung empfindlicher Messsysteme sind Temperaturmessungen in niedrigen Temperaturbereichen bis -40°C möglich geworden. Somit wäre dieses Temperaturmessprinzip für die Gefriertrocknung prinzipiell geeignet. Technische Probleme bei Temperaturrampen und mit der Hintergrundstrahlung sowie die Tatsache, dass nicht durch das Produktial gemessen werden kann, sondern immer die Temperatur des Glases bestimmt wird, schränken die Anwendung bei der Gefriertrocknung stark ein.

4.2.4. Barometrische Temperaturmessung

Bei der barometrischen Temperaturmessung wird das Zwischenventil zum Eiskondensator und zur Vakuumpumpe für kurze Zeit ($< 3\text{ s}$) geschlossen. Jetzt beginnt sich der Gleichgewichtsdampfdruck über dem Eis einzustellen. Der Gleichgewichtsdampfdruck wird mathematisch entsprechend der Beladung angepasst, um die Leckrate korrigiert und dann der entsprechenden Temperatur zugeordnet.^{45,85,91,132}

Die hierdurch errechnete Temperatur entspricht dann theoretisch genau der Temperatur an der Sublimationsfront im Produkt.

Der große Vorteil ist das Fehlen von Messsonden im Produkt, die die Trocknung beeinflussen können und auch immer beim Platzieren im Gefriertrockner ein Kontaminationsrisiko darstellen.

Die Grenzen dieser Methode liegen in einem starken Ansteigen des Kammerdruckes während der Messung, was zu einer Erhöhung der Produkttemperatur und damit zu einem Überschreiten der Kollapstemperatur führen kann. Ebenso ist eine Gefriertrocknungsanlage mit einer sehr kleinen Leckrate Voraussetzung.

1997 ist ein System auf Basis der barometrischen Temperaturmessung patentiert worden, das eine automatische Regelung der Produkttemperatur durch Anpassung des Trocknungsprozesses beschreibt.⁹²

4.3. Endpunkterkennung

Die Optimierung eines Gefriertrocknungsprozesses kann in zwei Stufen erfolgen. Zum einen kann die Sublimations- und die Desorptionsgeschwindigkeit durch ein Heranführen an die Kollapstemperatur erhöht werden. Der zweite Weg ist die Detektion des Endpunktes der Sublimation, das Ende der Primärtrocknung und das Erreichen der gewünschten Restfeuchte, dem Ende der Sekundärtrocknung.

Die Trocknungszeiten sind oft durch übermäßig hohe Sicherheitszuschläge deutlich länger als notwendig. Seit dem Beginn der kommerziellen Nutzung der Gefriertrocknung besteht allein schon aus ökonomischen Gründen ein erhöhtes Interesse an geeigneten Endpunkterkennungsmethoden, die die Grundlage der Prozessoptimierung bilden.^{73,89}

Grob lassen sich die Methoden in zwei Gruppen ordnen. Individuelle Methoden, die den Trocknungsverlauf eines einzelnen Produktvials aufzeichnen (z.B. Temperaturfühler), oder statistische Methoden, die eine Kenngröße überwachen, die vom Trocknungsverlauf aller Produktvials abhängig ist (z.B. Wasserdampfgehalt in der Trocknungskammer).

Grundsätzlich besteht, bei der Verwendung einer individuellen Methode zur Prozesssteuerung die Problematik, durch falsche Annahme des Trocknungsverlaufes eines oder weniger Vials auf die Gesamtheit zu schließen. Der Vorteil liegt in einer genauen, nicht durch statistische Mittelung unscharfen Messung, die wertvolle Daten über den Verlauf des Gefriertrocknungsprozesses oder Besonderheiten der Gefriertrocknungsanlage (z.B. Wärmeeintrag durch eine Plexiglastür) liefern kann.

Die statistische oder Gesamtkammer-Methode liefert mit der Überwachung aller Produktvials einen Mittelwert. Ein geringe Anzahl an Vials, die aus unterschiedlichsten Gründen eine deutlich verzögerte Trocknung aufweisen, verschwinden im Mittelwert der Messmethode. Dies kann durch frühzeitige Umschaltung in die Sekundärtrocknung oder Beenden des Prozesses zu erhöhten Restfeuchten oder kollabierten Strukturen bei diesen Vials führen. In der Regel handelt es sich um einen geringen Prozentsatz der Gesamtcharge, der immer an signifikant langsamer trocknenden Stellen (z.B. in der Mitte einer Stellfläche) im Gefriertrockner zu finden ist.

Im folgenden Abschnitt wird auf die wichtigsten und innovativsten Endpunkterkennungsmethoden eingegangen.

4.3.1. Temperaturfühler

Die Temperaturmessung im Produkt lässt sich auch zur Endpunktsbestimmung der Primärtrocknung verwenden. Während der Primärtrocknung ist eine deutlich geringere Produkttemperatur im Vergleich zur Stellfläche messbar. Durch die zur Sublimation verbrauchte

Energie wird das Produkt nicht erwärmt oder sogar weiter abgekühlt. Mit dem Ende der Sublimation wird auch keine Energie mehr zur Sublimation verbraucht und die weiterhin zugeführte Energie resultiert in einer Angleichung der Temperatur des Produktes an die Stellflächentemperatur.

Als Endpunkt wird das Erreichen der Stellflächentemperatur von der Produkttemperatur definiert. Teilweise ist diese Erkennungsmethode schon in die Steuerung der Gefriertrocknungsanlagen integriert und kann als automatisches Endpunktkriterium in die Programmierung einbezogen werden.

Wie schon unter Punkt 4.2 erwähnt, beeinflusst der Temperaturfühler die Kristallisation und beschleunigt in der Regel den Trocknungsprozess. Auch die Platzierung der Temperaturfühler hat einen Einfluss auf das Messsignal. Je nach Position im Vial und in der Trocknungskammer kann der angezeigte Endpunkt sehr stark variieren.

Bei Verwendung dieser Methode sollte eine möglichst große Anzahl von Temperaturfühlern verwendet werden, um statistische Schwankungen des Trocknungsprozesses innerhalb der Trocknungskammer auszugleichen. Außerdem sollten die Temperaturfühler in den Vials mit der langsamsten Trocknung in der Mitte einer Stellfläche positioniert und ein Sicherheitszuschlag eingerechnet werden.

Die Verwendung von Temperaturfühlern ist bei Beachtung der Platzierungsregeln eine zuverlässige und preisgünstige Messmethode, mit der jedoch nur das Ende der Primärtrocknung bestimmt werden kann.

Leider ist gerade die ideale Platzierung von Temperaturfühlern, möglichst in der Mitte einer Stellfläche, bei großen Produktionsanlagen und aseptischen Prozessen ein sehr hohes Kontaminationsrisiko, was die Nutzung der Temperaturfühler einschränkt.

4.3.2. Druckanstiegstest

Der Druckanstiegstest ist von der Durchführung ähnlich der unter Punkt 4.2.4 erklärten barometrischen Temperaturmessung. Gegen Ende der Primärtrocknung wird das Zwischenventil für einen Zeitraum von 10 bis 20 Sekunden geschlossen, wodurch die Trocknungskammer von der Vakuumpumpe und dem Eiskondensator abgetrennt wird. Der Druckanstieg, verursacht durch das weiterhin sublimierende Wasser, wird gemessen. Als Endpunkt wird ein Druckanstieg kleiner einem bestimmten Wert pro Zeit definiert. Die Voraussetzung für reproduzierbare Werte sind gleich bleibende Beladung und eine Gefriertrocknungsanlage mit einer kleinen Leckrate.

Die Problematik bei dieser Methode liegt im Beginn der Druckanstiegsmessungen zu einem zu frühen Zeitpunkt. Da die Verschlusszeiten des Zwischenventils deutlich länger als bei der barometrischen Temperaturmessung sind, ist die Wahl des richtigen Beginns der

Druckanstiegsmessungen von großer Bedeutung. Wenn der Druckanstieg über den Zeitraum zu stark ist, kann es durch die verringerte Sublimationsrate zur Erwärmung und damit zum Kollaps des Produktes kommen.

Die technische Voraussetzung zur Abtrennung der Trocknungskammer von Vakuumpumpe und Eiskondensator ist bei Standardgefrieretrocknungsanlagen realisiert. Teilweise ist der Druckanstiegstest auch als Option in der Steuerungssoftware hinterlegt und bietet so auch eine günstige Methode zur Erkennung der Endpunkte. Bei kleinen Leckraten und ausreichender Beladung ist es auch möglich, den Verlauf und das Ende der Nachrocknung zu detektieren.

Problematisch ist, wie oben erwähnt, gerade bei unbekanntem Gefrieretrocknungsprozessen die Wahl des Beginns der Druckanstiegsmessungen.

4.3.3. Komparative Druckmessung

Bei der Komparativen Druckmessung macht man sich die Gasartabhängigkeit des Wärmeleitfähigkeitsmanometers und die Gasartunabhängigkeit des kapazitiven Manometers zu nutze. Da Wärmeleitfähigkeitsmanometer mit reinem Stickstoff kalibriert werden, führen Messungen von abweichenden Gasen oder Gasgemischen zu falschen Werten. Ein hoher Wasserdampfanteil lässt den Druck durch das Wärmeleitfähigkeitsmanometer höher erscheinen, als er wirklich ist. Zu Beginn der Primärtrocknung besteht die Atmosphäre in der Trocknungskammer fast vollständig aus Wasserdampf. Mit dem Voranschreiten der Trocknung bleibt der Wasserdampfanteil nahezu konstant, bis er gegen Ende der Sublimation deutlich absinkt. Da der Trocknungsdruck konstant gehalten wird, nimmt der Anteil an Luft durch die Leckrate oder bei aktiver Stickstoffinjektion an Stickstoff in der Atmosphäre der Trocknungskammer zu. Die beiden Messsonden nähern sich in ihren Messwerten an. Wenn nur noch wenig Wasserdampf in der Atmosphäre der Trocknungskammer ist, geht die Druckdifferenz gegen Null und das Ende der Primärtrocknung wird durch eine Übereinstimmung der Messwerte angezeigt.¹³²

Jeder geregelte Gefrieretrockner ist mit einem Drucksensor ausgestattet. Die Nachrüstung mit einem zweiten Drucksensor des anderen Typs ist eine preisgünstige und leicht realisierbare Möglichkeit. Vorteil dieser Methode ist, dass die Trocknung durch die Messsonden nicht beeinflusst und die Trocknung aller Vials überwacht wird. Die Nachteile liegen in der Genauigkeit der Endpunktserkennung und unzureichenden Empfindlichkeit zur Detektion des Endes der Nachrocknung.

4.3.4. Feuchtesensoren

Kapazitive Feuchtesensoren können zur Messung der relativen Luftfeuchtigkeit in der Trocknungskammer verwendet werden. Beim kapazitiven Messverfahren wird die Veränderung der Kapazität eines Kunststoff-Dielektrikums als Maß für die relative Luftfeuchtigkeit genutzt.

In Abhängigkeit vom Trocknungsprozess verändert sich der Wasserdampfanteil in der Trocknungskammer. Diese Veränderung kann mit einem Feuchtesensor aufgezeichnet werden und ermöglicht eine Abgrenzung zwischen der Primär- und Sekundärtrocknung.

Die jüngste Generation der Feuchtesensoren besitzt eine deutlich verbesserte Robustheit und Messgenauigkeit und ist dadurch auch in der Lage, das Ende der Sekundärtrocknung zu erfassen.^{7,112}

4.3.5. Windmill Device

Die Idee bei diesem Messgerät ist, den Wasserdampfstrom als Messgröße heranzuziehen. Die bei der Sublimation frei werdenden Wasserdampfmengen strömen mit zum Teil beachtlichen Geschwindigkeiten zum Eiskondensator. In diesen Wasserdampfstrom werden sehr sensitive Windrädchen eingebracht. Die Stärke des Wasserdampfstromes und damit die freiwerdende Menge kann über die Drehgeschwindigkeit des Windrads ermittelt werden.

Aus einer anfangs experimentellen Idee wurde inzwischen ein kommerzielles Produkt. Im experimentellen Ansatz wurden Windräder direkt über den Vials angebracht²⁶. Kommerziell wird die Idee inzwischen von einem Gefriertrocknungshersteller als Option angeboten. Hier wird der Querschnitt zwischen Trocknungskammer und Eiskondensator verengt und in dieser Öffnung das Windrad aufgehängt.¹²⁷

Vorteil ist wieder die vollständige Überwachung des Trocknungsprozesses. Der Nachteil liegt in einer verzögerten Trocknung, da der Kammerwiderstand durch die kleine Öffnung erhöht wird. Ebenso kann es zu einer Erhöhung der Partikelzahlen durch die rotierenden Bauteile in der Trocknungskammer kommen.

4.3.6. Wägesystem

Durch Messung des Massenverlustes aufgrund der Sublimation des Eises kann die Primärtrocknung sehr gut verfolgt werden. Aus den Daten kann direkt die Sublimationsgeschwindigkeit und das Ende der Sublimation ermittelt werden.

In einer modernen Variante kann das Wägesystem mit seiner kompakten Bauweise in der Trocknungskammer der Gefriertrocknungsanlage auf jeder beliebigen Stellfläche aufgestellt werden (Abbildung I-22).



Abbildung I-22 Waage in der Trocknungskammer

Im Wägesystem wird ein Vial verankert, das ‚normal‘ auf der Stellfläche steht. Zu definierbaren Zeitpunkten wird das Vial kurz angehoben, um das Gewicht zu bestimmen.^{97,109,110}

Neben der Wägung eines einzelnen Vials wird in Fachkreisen auch die Möglichkeit der Wägung einer oder aller Stellflächen und die Wägung des Eiskondensators diskutiert.

Weitere Aspekte der Waage zur Steuerung eines Gefriertrocknungsprozesses werden im Kapitel III.1 diskutiert.

4.3.7. Massenspektrometrie

Die Methode der Massenspektrometrie (MS) wurde durch die ersten Experimente von J.J. Thomson zur selben Zeit wie die Gefriertrocknung Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt¹²⁴. Zu Beginn stand die Isotopenanalyse der Elemente im Vordergrund. Die stetig weiterentwickelten Messgeräte trugen nach dem zweiten Weltkrieg entscheidend zur Strukturaufklärung der Sexualhormone bei, was zur Entwicklung der ersten „Pille“ führte.

In den 60er Jahren wurde die schonendere Chemische Ionisation entwickelt, die besonders für die Analyse komplexer Substanzgemische geeignet war. Die Verbindung schonender Ionisierungstechniken mit Tandem-MS brachte schließlich den Durchbruch bei der qualitativen und gleichzeitig strukturellen Analyse von Proben biologischer Herkunft.^{21,22} Die Kopplung von Massenspektrometern mit verschiedenen Trennsystemen (z.B. HPLC oder GC), sowie die Kopplung mehrerer Massenspektrometer mit unterschiedlich starken Ionisationsquellen ist in der Proteinanalytik zur Strukturaufklärung heute Standard.

Die hohe Empfindlichkeit und das breite Einsatzspektrum der Massenspektroskopie zur Messung der Zusammensetzung einer Gasatmosphäre lassen diese Messmethode attraktiv für die Gefriertrocknung erscheinen.

Direkt an die Trocknungskammer angeschlossen, kann durch die Analyse der Zusammensetzung des Gasraumes die Trocknung verfolgt werden. Erwähnt wurde der Einsatz der Massenspektrometrie im Zusammenhang mit der Gefriertrocknung schon 1980 von Jennings et al. und wurde 1993 von Connelly et. al. als Messmethode für die Primärtrocknung ausführlich beschrieben.^{24,55}

Außer der Überwachung des Gefriertrocknungsprozesses wird das Massenspektrometer auch als vielseitiges Diagnosewerkzeug eingesetzt. Neben der Lecksuche ist es auch zur Detektion von zurückströmendem Vakuumpumpenöl oder ausgasenden Stopfen im Einsatz.⁷²

In der vorliegenden Arbeit werden die Möglichkeiten und Grenzen dieser Methode unter Berücksichtigung der Sekundärtrocknung mit Blick auf die Restfeuchteinstellung und der Überwachung und Steuerung von aseptischen Gefriertrocknungsprozessen im Kapitel III.2 untersucht.

4.3.8. Nah-Infrarotspektroskopie

Seit der Entwicklung leistungsstarker und preisgünstiger Rechensysteme ist die schnelle Auswertung sehr komplexer Zusammenhänge in vielen Bereichen möglich. Das Nah-Infrarotspektrum z.B. einer Proteinformulierung ist ein solches, von extrem vielen Wechselwirkungen geprägtes, System.

Wasser adsorbiert im Nah-Infrarotbereich sehr stark und erzeugt ein gut messbares Signal. Diese Eigenschaft wurde schon mehrfach zur Applikation einer zur Karl-Fischer-Methode alternativen und zerstörungsfreien Restfeuchtebestimmung von Lyophilisaten angewandt.^{31,58,59,71,75,100,120} Auch wird diese Messmethode zur Online-Bestimmung der Restfeuchte bei der Granulierung oder Trocknung im Wirbelschichtgerät schon länger erfolgreich genutzt.^{12,28,104,105}

Das Potential dieser Methode als Online-Messmethode wird ausführlich im Kapitel III.3 diskutiert.

4.3.9. Einzelplatten verschließen

Die technisch anspruchsvolle aber nahe liegende Idee, einzelne Stellflächen beim Verschließen der Vials getrennt anzusteuern, ermöglicht es zu bestimmten Zeitpunkten im Trocknungsprozess die Lyo-Stopfen in die Vials zu drücken und somit den Trocknungsprozess zu beenden.

Dieses Verfahren gestattet es ähnlich dem Manipulator (Punkt 4.3.10) Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Gefriertrocknungsverlaufs zu erhalten, ohne den

Trocknungsprozess zu stören. Der Vorteil ist hier die Möglichkeit eine komplett beladene Stellfläche im momentanen Trocknungszustand zu ‚fixieren‘. Gerade die Erstellung einer Trocknungskinetik für die Sekundärtrocknung wird durch das automatische, programmierbare Verschließen deutlich erleichtert.

Der Nachteil dieser Methode liegt in der, durch die Anzahl der Stellflächen beschränkten Probenzeitpunkte und in der oben schon erwähnten Entnahme der Proben erst am Ende des Gefriertrocknungsprozesses. Dadurch kann der Gefriertrocknungsprozess nicht dynamisch angepasst, sondern nur nachträglich verändert werden.

4.3.10. Manipulator/Ausschleusvorrichtung

Die Ausschleusvorrichtung erlaubt während dem Gefriertrocknungsprozess Vials zu entnehmen, ohne den Prozess zu stören. Mit Hilfe eines Greifarms können die Vials in eine Druckschleuse gehoben werden. Innerhalb der Schleuse wird auf Atmosphärendruck belüftet, die Vials verschlossen und dann entnommen.

Die Proben können dann gleich z.B. auf ihren Restfeuchtegehalt hin untersucht oder die Glasübergangstemperatur bestimmt werden. Diese Methode liefert genaue Daten zum Trocknungsverlauf, ist aber umständlich, erfordert einen hohen Zeiteinsatz und lässt sich sehr schwer automatisieren.⁹⁰

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1. Gerüstbildner, Hilfsstoffe und Reagenzien

Folgende Gerüstbildner in Pharmaqualität wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften³³ ausgewählt und in Pharmaqualität für die Untersuchungen herangezogen.

Saccharose

Saccharose (Fa. Merck Eurolab GmbH, D-Darmstadt) ist ein Disaccharid aus β -Fructose und α -Glucose (Molmasse M_r 342,30).

Trehalose

Trehalose (Fa. Merck Eurolab GmbH, D-Darmstadt) ist ein Disaccharid aus zwei Teilen Glucose die α,α -1,1 verknüpft sind (Molmasse M_r 342,30).

Maltose

Maltose (Fa. Merck Eurolab GmbH, D-Darmstadt) ist ein Disaccharid aus zwei Teilen α -Glucose, die 1-6 verknüpft sind (Molmasse M_r 342,30). Maltose ist ein reduzierender Zucker was zur Maillard Reaktion mit Proteinen bei hoher Restfeuchte führen kann.

Die Disaccharide bilden beim Einfrieren übersättigte Lösungen und liegen dadurch nach der Gefriertrocknung als amorphes Glas vor.³⁸

Mannitol

Mannitol (Fa. Merck Eurolab GmbH, D-Darmstadt) ist ein Zuckeralkohol abgeleitet von D-Mannose. Mannitol zeigt drei verschiedene Modifikationen: α -, β -, δ -Mannitol.^{17,102,137} Im Gegensatz zu den Disacchariden kristallisiert Mannitol bei der Gefriertrocknung.⁶⁴

Eingesetzte Hilfsstoffe und Reagenzien sind der Tabelle II-1 zu entnehmen.

Stoff	Hersteller
Hydranal Methanol dry (34741)	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH (D-Seelze)
Hydranal Coulomat AG (34836)	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH (D-Seelze)
Natriumchlorid p.a.	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)

Tabelle II-1 Eingesetzte Hilfsstoffe und Reagenzien

2. Behältnisse zur Gefriertrocknung

2.1. Vials und GT-Stopfen

Für die Gefriertrocknung wurden 10 ml Röhrenglasvials (10R DIN ISO 8362) und für eine Versuchsreihe 10 ml TopPac-Vials der Firma Schott benutzt. Die Glasqualität, Neutrales Borosilikatglas (Glasart 1), entspricht dem Europäischen Arzneibuch für Parenteralia.

Die TopPac-Vials sind aus dem Kunststoff Topas, einem Cycloolefin Copolymer hergestellt.¹¹⁶

Die Vorteile gegenüber Glas liegen im geringeren Gewicht und der hohen Bruchfestigkeit. Die Kunststoffvials entsprechen ebenfalls der DIN ISO 8362.

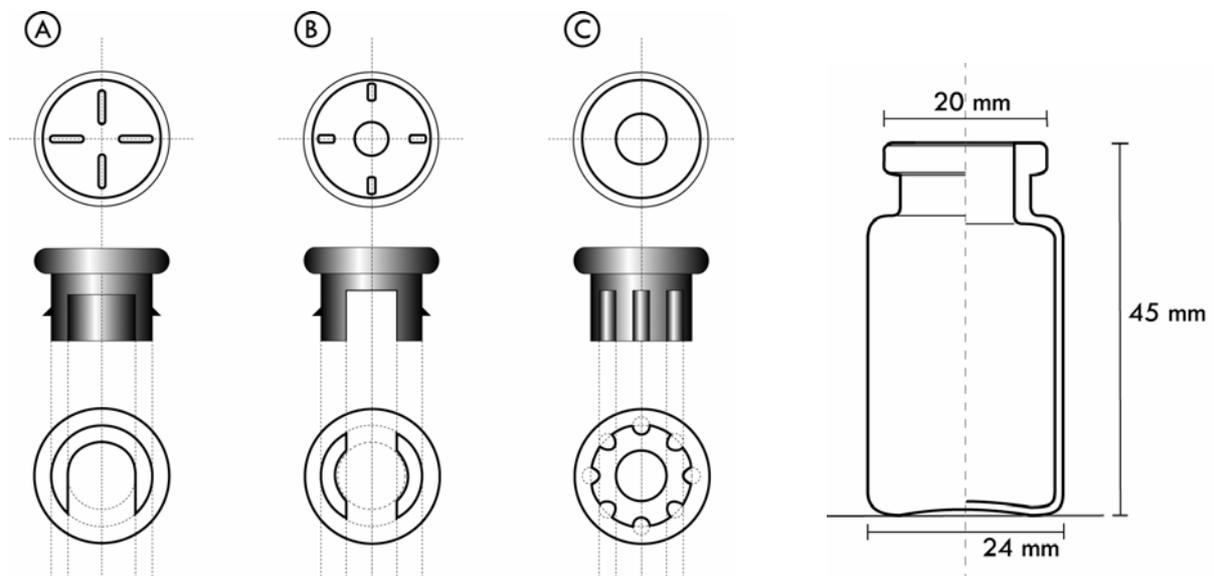


Abbildung II-1 GT-Injektionsstopfen (DIN ISO 8536): A Iglustopfen; B Splitstopfen; C Vollstopfen und ein 10R Glasvial im Querschnitt (DIN ISO 8362)

Als Stopfen wurden graue, teflonisierte Gefriertrocknungsstopfen aus Butylkautschuk (No. 4023/50/Grau; Fa. West Company) mit drei unterschiedlichen Formen eingesetzt.

Die Vials wurden in der Gefriertrocknungsanlage nach dem Trocknungsprozess durch zusammenfahren der Stellflächen verschlossen.

3. Geräte

3.1. Wägesystem

Verwendet wurde das Wägesystem der Firma Martin Christ (D-Osterode)(Abbildung II-2). Die Messung erfolgt nach Anheben des Vials von der Stellfläche. Direkt nach der Messung (ca. 30 Sekunden) wird das Vial wieder auf die Stellfläche abgesenkt. Die Wägung funktioniert nach dem Prinzip der elektromagnetischen Kraftkompensation.



Abbildung II-2 Wägesystem mit Greifarm für 10 R Vials der Fa. Christ

Das gemessene Gewicht muss mit Hilfe eines internen Temperaturfühlers korrigiert werden, da die Messung aufgrund des Messprinzips stark temperaturabhängig ist. Ebenso ist ein automatischer Driftausgleich integriert, um Temperaturschwankungen während der Messung auszugleichen.

Vor jeder Messreihe wurde die Waage mit dem entsprechenden Greifarm kalibriert.

Je nach Versuchsaufbau wurde alle 3 Minuten bzw. alle 10 Minuten ein Messpunkt, bestehend aus Zeitpunkt der Messung, Temperatur in der Waage und dem Gewicht, aufgenommen.

Technische Daten:

Größe: 135 mm x 45 mm x 55 mm

Temperaturbereich -40°C bis +30°C

Messbereich: bis zu 50g

Messgenauigkeit: 2mg

Greifarm für Vialgrößen von 2R bis 20R

Zur Aufzeichnung der Daten wurde das mitgelieferte Steuerungsprogramm (CW 40) verwendet.

Die Daten wurden anschließend über eine Exportfunktion in ein Text-File umgewandelt und durch ein eigens dafür programmiertes Makro in Microsoft Excel 2003 ausgewertet (Kapitel III.1.1.1).

3.2. Massenspektrometer

Zur Messung des Wasserdampfgehaltes in der Trocknungskammer wurde ein Massenspektrometer PT50-MS der Firma Leybold verwendet.

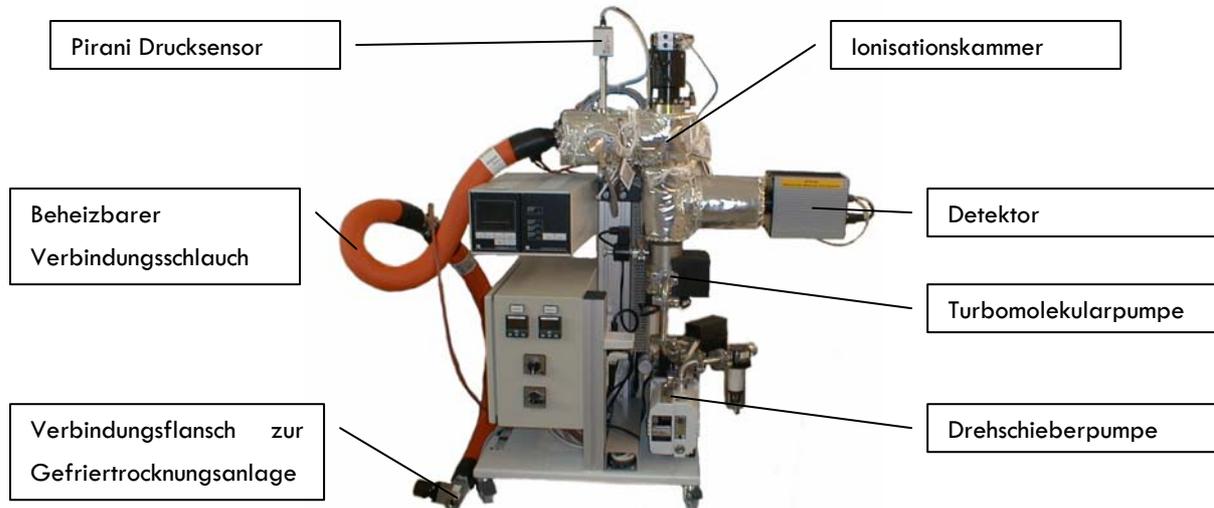


Abbildung II-3 Massenspektrometer Fa. Leybold

Das Massenspektrometer wurde über eine auf 120°C beheizte Schlauchverbindung direkt an die Trocknungskammer der Gefriertrocknungsanlage angeflanscht.

Um die Überwachung von aseptischen Prozessen mit dem Massenspektrometer zu ermöglichen, wurde zwischen Massenspektrometer und Trocknungskammer ein steriler Luftfilter (Emflon, hydrophobe PVDF Membran, 0,2µm, Fa. Pall) geschaltet. Der Einfluss des Filters auf die Messung wird in Kapitel III.2.4 diskutiert.

Die Aufzeichnung der Daten erfolgte durch eine Steuerungssoftware mit einem Messpunkt alle 30 Sekunden. Neben dem Wasserdampfsignal und Totaldruck wurden die Massensignale von Stickstoff und von Sauerstoff parallel mit aufgezeichnet.

Die Daten wurden anschließend über eine Exportfunktion in ein Text-File umgewandelt und durch ein selbst programmiertes Makro in Microsoft Excel 2003 ausgewertet (Kapitel III.2.3.7).

3.3. Nah Infrarot Spektrometer

Die Nah Infrarot Spektren wurden mit einem angepassten NIR-System NIR 6500 Online der Firma Foss aufgezeichnet. Das NIR ist mit Monochromator und einem InGaAs Detektor mit einem Messbereich von 850nm bis 2100nm ausgestattet. Bei dem Gerät handelt es sich um einen Multiplexer, der den Anschluss von bis zu zehn Messsonden ermöglicht (Abbildung II-4). Für die Versuche stand aus Kostengründen nur eine Messsonde zur Verfügung. Ein drei Meter langes Faserbündelkabel verbindet die speziell gefertigte Messsonde mit dem Detektor. Bei der Sonde handelt es sich um eine Reflexionssonde mit einem Saphirfenster und Vakuumausgleich bis 10⁻³mbar.



Abbildung II-4 Nah Infrarot Spektrometer 6500 Online der Fa. Foss

Die Messsonde wurde durch eine speziell angefertigte, vakuumdichte Durchführung in die Trocknungskammer eingebracht. Mit einer Probenhalterung, die Vials verschiedener Größe aufnehmen kann, wird die Messsonde seitlich am Vial fixiert. Zur Online-Messung erfolgte eine Aufnahme des Spektrums des Probenvials alle zehn Minuten. Die Spektraldaten wurden durch ein Computerprogramm (Vision V2.54, Fa. Foss, Hamburg) gespeichert und ausgewertet.



Abbildung II-5 NIR Messsonde mit Probenhalterung bei der Messung eines 10R Vials

Die genaue Beschreibung zum Design der Messsonde und der Funktionsweise wird in Kapitel III.3 erläutert.

3.4. Gefriertrocknungsanlagen

Zur Durchführung der Versuche wurden vier verschiedene Gefriertrockner verwendet. Die Gefriertrocknungsanlagen A bis C sind in Geometrie und Grundaufbau gleich. Der Unterschied liegt in der Anordnung der Steuerung, der Anzahl der Stellflächen, der Kompressorleistung und in der Ausstattung mit zusätzlichen Temperaturfühlern und Drucksonden.

In Abbildung II-6 ist die Gefriertrocknungsanlage A zu sehen. Hier wurde die Steuerung direkt oberhalb der Trocknungskammer in die Gefriertrocknungsanlage integriert. Bei den anderen Gefriertrocknungsanlagen ist die Steuerung in einem externen Schaltschrank untergebracht. Bei den Christ Anlagen konnte die Steuerungseinheit der Gefriertrocknungsanlage über eine RS232 Schnittstelle mit einem Computer verbunden werden. Durch Steuerungssoftware wurde die Programmierung der Anlage deutlich vereinfacht und eine elektronische Aufzeichnung der Daten möglich.



Abbildung II-6 Gefriertrocknungsanlage Epsilon 2-D12 Spezial der Firma Christ

A Pilotgefriertrocknungsanlage der Firma Christ Epsilon 2-D12 Spezial MI

Technische Daten

Gesamt Stellflächen	0,79 m ²
Plattengröße	350 x 450 mm (B x T)
Plattenanzahl	5+1
Eiskapazität	12 Kg

B Pilotgefriertrocknungsanlage der Firma Christ Epsilon 2-D12 Spezial MII

Technische Daten

Gesamt Stellflächen	0,47 m ²
Plattengröße	350 x 450 mm (B x T)
Plattenanzahl	3+1
Eiskapazität	12 Kg

C Pilotgefrier- und Trocknungsanlage der Firma Christ Epsilon 2-D12 Spezial BI

Technische Daten

Gesamt Stellflächen	0,63 m ²
Plattengröße	350 x 450 mm (B x T)
Plattenanzahl	4+1
Eiskapazität	12 Kg

Besonderheit: Es ist möglich, die Stellplatten einzeln zu bestimmten Zeitpunkten zu verschließen.

D Pilotgefrier- und Trocknungsanlage der Firma Hof Sonderanlagenbau

Technische Daten

Gesamt Stellflächen	2,5 m ²
Plattengröße	800 x 800 mm (B x T)
Plattenanzahl	4
Eiskapazität	50 Kg

Die Anlagen wurden je nach Aufgabenstellung mit einem oder mehreren Messeinrichtungen (Waage, NIR, Massenspektrometer) ausgestattet.

4. Methoden

4.1. Herstellung und Abfüllen der Lösungen

Für die Gefrier- und Trocknungsläufe wurden die unter Punkt II.1.1 genannten Gerüstbildner und Hilfsstoffe eingesetzt.

Die Lösungen wurden mit Aqua purificata hergestellt und vor dem Abfüllen über einen 0,22µm Membranfilter aus regenerierter Cellulose (Fa. Pall) schwebstofffrei filtriert.

Die filtrierten Lösungen wurden mit Hilfe einer Eppendorfpipette in 10R Vials eingefüllt und diese mit einem Lyo-Stopfen versehen. Die verwendete Standardfüllmenge betrug 3ml Lösung, was ca. 1cm Füllhöhe in 10 R Vials entspricht.

4.2. Restfeuchte nach Karl-Fischer

Die Restfeuchte der Lyophilisate wurde durch eine coulometrische Karl-Fischer-Titration bestimmt. Genutzt wurde ein halbautomatischer Titrator der Firma Mettler (737 KF Coulometer).

Für die Messung wurde in trockener Stickstoffatmosphäre ca. 2-3 ml wasserfreies Methanol in die Vials eingespritzt und diese 5 Minuten mit Ultraschall behandelt.

Nach Zentrifugation (Fa. Christ Typ Sigma 4K15) wurden je Messung ca.160-200µL des Überstandes mit einer 250µl Hamiltonspritze in den Titrator eingespritzt. Durch Rückwiegen der Spritze wurde die exakte Einspritzmenge bestimmt. Von jeder Probe wurde immer eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

4.3. Druck- und Temperaturführung

Alle Versuche zur Untersuchung der verschiedenen Online-Messmethoden wurden bei Trocknungsläufen entsprechend dem folgenden Standardprogramm durchgeführt.

Die Druckregelung erfolgte wenn nicht anderes beschrieben nach Pirani.

	Zeit [hh:mm]	Stellflächentemperatur	Druck
Adjusting	1:00	20°C	1013 mbar
Einfrieren	1:05	-45°C	1013 mbar
	2:00	-45°C	1013 mbar
Primär-trocknung	4:30	0°C	0,05 mbar
	23:00 bis 28:00	0°C	0,05 mbar
Sekundär-trocknung	3:00	30°C	0,05 mbar
	8:00	30°C	0,05 mbar

Tabelle II-2 Standard Gefriertrocknungsprogramm

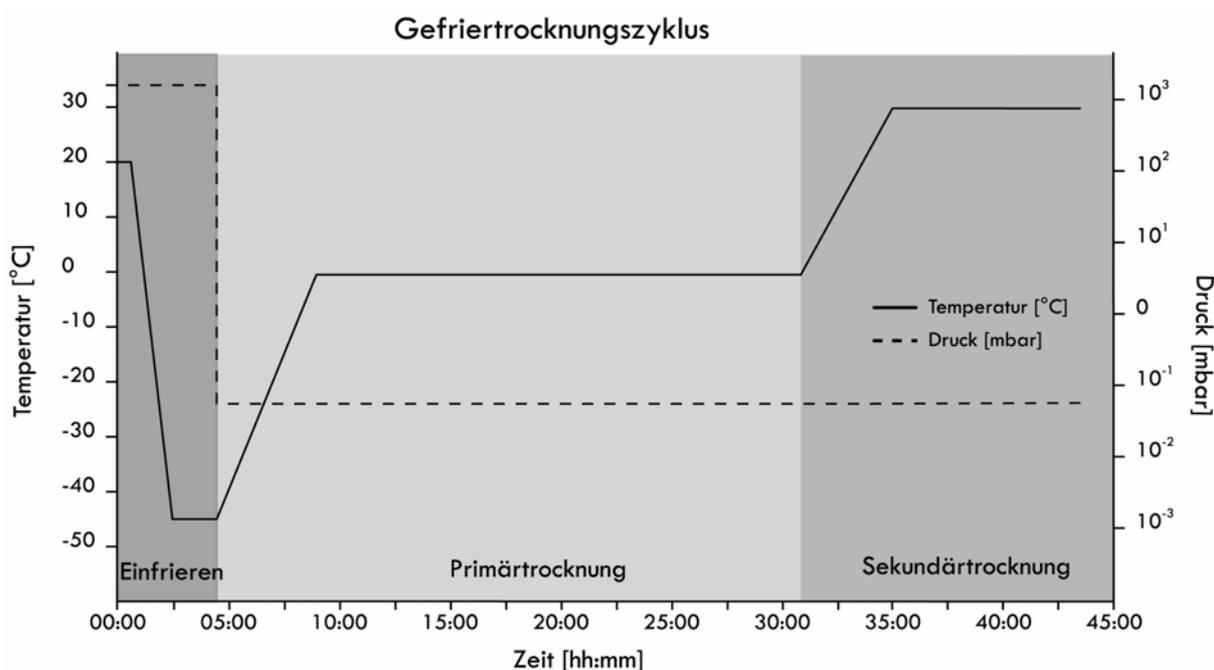


Abbildung II-7 Standard Gefriertrocknungsprogramm

4.4. Auswertung der Messdaten

Zur Auswertung und Zusammenführung der Messdaten wurden Makros, mit dem im Softwareprogramm MS-Excel 2003 integrierten Visual Basic programmiert.

Die Funktionsweise und die zugrunde liegenden Berechnungen dieser Programme werden im jeweiligen Abschnitt bei den Messmethoden in Kapitel III (Ergebnisse) erläutert.

III. ERGEBNISSE

1. Wägesystem

Die Entwicklung eines Systems zur gravimetrischen Messung des Wasserverlustes wird schon seit längerem vorangetrieben. Es wurden verschiedene Prototypen entwickelt, um eine genaue Wägung unter Gefriertrocknungsbedingungen zu etablieren. Neben den hohen Druckdifferenzen, darf auch die hohe Temperaturdifferenz von 60K bis 80K im Laufe des Trocknungsprozesses das Messergebnis nicht beeinflussen. Weiterhin wird eine Konstruktion gefordert, die einen möglichst unbeeinflussten Trocknungsprozess ermöglicht, wenig Platz auf der Stellfläche verbraucht und gleichzeitig leicht an beliebiger Position in einer Gefriertrocknungsanlage aufgebaut werden kann. Zur Nutzung im Produktionsbereich ist außerdem die Sterilisierbarkeit unbedingt erforderlich.

Der technischen Herausforderung steht ein Messsignal von hohem Interesse gegenüber. Die direkte Messung des Gewichtsverlustes im Verlauf des Trocknungsprozesses und damit die Messung der Sublimationsgeschwindigkeit bieten neue Möglichkeiten zur Optimierung und zum Vergleich von Trocknungsprozessen und Formulierungen.

Mit dem Wägesystem der Firma Christ scheint ein solches System, das den meisten Anforderungen entspricht, auf dem Markt verfügbar zu sein. Die prinzipielle Verwendbarkeit des Wägesystems wurde bereits gezeigt.¹⁰⁹

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Wägesystem als automatisches Steuerungstool in der Gefriertrocknungsanlage für die Entwicklung etabliert werden. Dazu wurde der Einfluss des Wägesystems auf die Trocknung genau untersucht und parallel ein Softwareprogramm zur automatischen Auswertung der Messdaten entwickelt.

1.1. Interpretation des Messsignals

An jedem Messpunkt werden das temperaturkorrigierte Gewicht und die Temperatur der Waage aufgezeichnet. Die grafische Darstellung der Messdaten gegen die Zeit ist in Abbildung III-1 abgebildet.

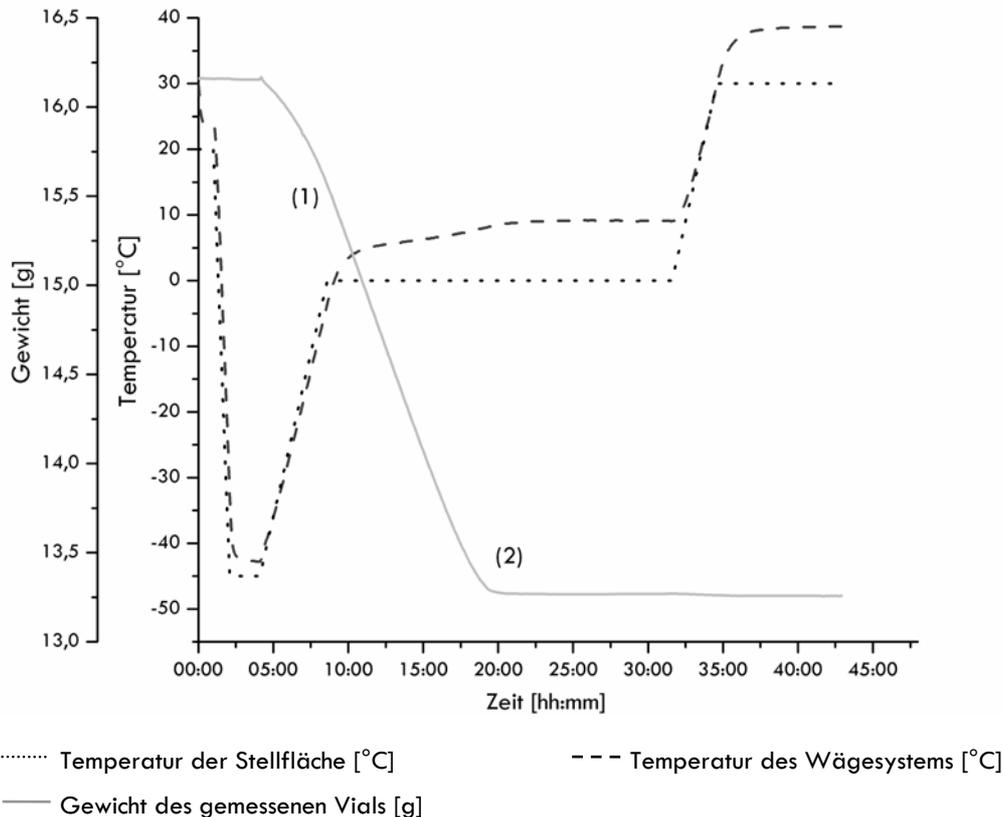


Abbildung III-1 Grafische Darstellung einer typischen Messkurve mit dem Wägesystem. 3ml 5%ige Saccharoselösung in einem 10R Vial.

Der Verlauf der Trocknung, entsprechend dem Gewichtsverlust über die Zeit, ist leicht zu verfolgen. Mit Beginn der Primärtrocknung verringert sich das Gewicht des Messvials stetig (1) bis kein sublimierbares Eis mehr vorhanden ist und ein scharfer Knick (2) in der Messkurve keinen weiteren Masseverlust und damit das Ende der Primärtrocknung anzeigt.

Zur besseren Auswertung des Trocknungsverlaufes wird die erste Ableitung des Gewichtes über die Zeit berechnet. Durch die so errechnete Gewichtsänderung über die Zeit, die Sublimationsgeschwindigkeit, wird der Endpunkt deutlicher und vom Gesamtgewicht unabhängig, was besonders wichtig für den Vergleich der Daten und die Programmierung der automatischen Auswertung ist. Ebenso können Einflüsse auf die Trocknungsgeschwindigkeit dadurch besser dargestellt werden. Anhand der errechneten Sublimationskurve (Abbildung III-2) lässt sich der Anstieg der Trocknungsgeschwindigkeit mit Zunahme der Stellflächentemperatur verfolgen (1). Mit Erreichen der Primärtrocknungstemperatur wird eine

konstante Sublimationsgeschwindigkeit (2) gemessen und das Ende der Primärtrocknung ist durch einen steilen Abfall gekennzeichnet (3).

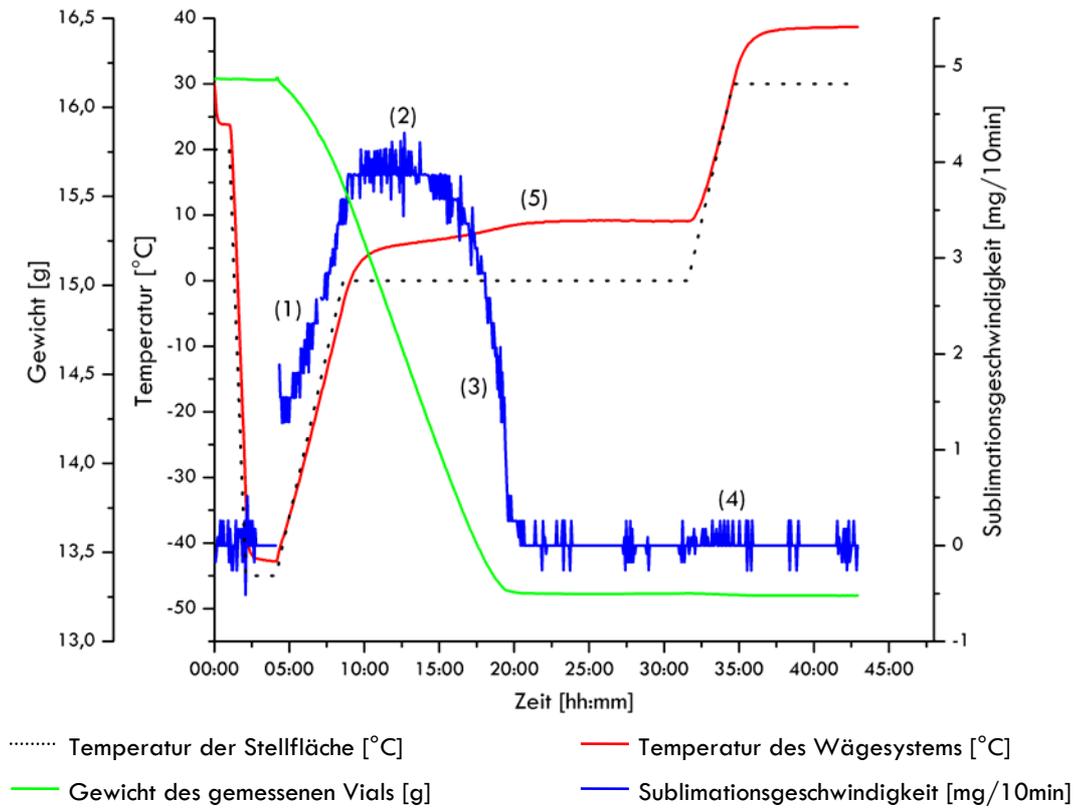


Abbildung III-2 Grafische Darstellung einer typischen Messkurve des Wägesystems mit der errechneten Sublimationsgeschwindigkeit. 3ml 5%ige Saccharoselösung in einem 10R Vial. Die Bedeutung der Ziffern wird im Text erklärt.

Eine Auswertung der Sekundärtrocknung ist mit diesem System nicht möglich. Mit Beginn der Sekundärtrocknung ist zwar eine leichte Abnahme des Gewichtes (4) zu erkennen, jedoch ist durch die zu geringe Auflösung und hohen Messschwankungen des Wägesystems das Signal nicht reproduzierbar auszuwerten. Gerade bei kleinvolumigen Proben, die in trockenem Zustand wenige Milligramm wiegen, werden in der Sekundärtrocknung Wassermengen im Bereich von nur wenigen zehntel Milligramm entfernt. Erschwerend kommt mit dem Beginn der Sekundärtrocknung noch eine Temperaturänderung durch ein weiteres Anheben der Trocknungstemperatur hinzu, die zusätzlich die Messgenauigkeit negativ beeinflusst. Der Einfluss von Temperaturschwankungen auf die Messgenauigkeit wird unter Punkt 1.2 diskutiert.

Ein Indiz für einen weiteren Einflussfaktor des Trocknungsverlaufes liefert das Messsignal des Temperaturfühlers der Waage. Zu Beginn des Gefriertrocknungsprozesses ist die Temperatur im Wägesystem im Vergleich zur Stellfläche geringfügig höher. Während des Einfriervorganges folgt die Waagentemperatur der Stellflächentemperatur mit minimaler Verzögerung. Der Temperaturverlauf zu Beginn der Primärtrocknung zeigt ebenfalls einen erwarteten Verlauf. Im Gegensatz dazu steigt die Waagentemperatur am Ende der

Primärtrocknungsrampe auf bis zu 10K über die Stellflächentemperatur an (5). Der Verlauf der Temperatur des Wägesystems wird in Zusammenhang mit dem Einfluss des Wägesystems auf die Trocknung unter Punkt 1.3 diskutiert.

1.1.1. Softwareentwicklung zur Datenauswertung

Die Daten des Wägesystems werden durch das Steuerprogramm elektronisch aufgezeichnet und können in ASCII-Code umgewandelt und als Datenfile exportiert werden (Abbildung III-3). Zur weiteren Verarbeitung der Daten wurde ein Programm auf Basis von Visual Basic in Excel entwickelt, um die Auswertung der sehr hohen Datenmengen zu automatisieren. Neben der Standardisierung der Auswertung wurde außerdem der notwendige Zeitaufwand deutlich reduziert.

32.6	88267	16649	0.030	16508	0	0.000*000,00,12
32.6	88267	16649	0.030	16508	0	0.000*000,00,14
32.6	88268	16650	0.030	16509	1	0.000*000,00,15
32.6	88268	16650	0.030	16509	0	0.000*000,00,17
32.6	88268	16650	0.030	16509	0	0.000*000,00,19
32.6	88268	16650	0.030	16509	0	0.000*000,00,20
32.6	163979	92361	16.255	92099	75590	16.199*000,00,32
32.6	163980	92362	16.255	92100	75591	16.199*000,00,33
32.6	163980	92362	16.255	92100	75591	16.199*000,00,35
32.5	88270	16652	0.031	16511	2	0.000*000,00,47
32.5	88270	16652	0.031	16511	2	0.000*000,00,48
32.5	88270	16652	0.031	16512	3	0.001*000,00,50
28.6	88302	16684	0.038	16560	51	0.011*000,06,04
28.5	88302	16684	0.038	16560	51	0.011*000,06,05
28.5	88301	16683	0.037	16559	50	0.011*000,06,07
28.5	88301	16683	0.027	16559	0	0.000*000,06,08
28.5	88300	16682	0.026	16558	-1	0.000*000,06,10
28.5	88300	16682	0.026	16558	-1	0.000*000,06,11
28.5	164001	92383	16.249	92153	75594	16.200*000,06,23
28.5	164001	92383	16.249	92153	75594	16.200*000,06,25
28.5	164001	92383	16.249	92153	75594	16.200*000,06,26

Abbildung III-3 Daten des Wägesystem in Rohfassung. Die mit der gestrichelten Linie umrandeten Datenzeilen entsprechen einem Messzeitpunkt mit Nullabgleich, Drift vor der Messung, Messwerte und Drift nach der Messung. In jeder der vier Phasen werden drei Messungen durchgeführt.

Hauptfunktion des Programms ist die automatische Berechnung des Endpunktes der Primärtrocknung (Abbildung III-4).



Abbildung III-4 Ablaufschema zur automatischen Erreichung des Endpunktes

Daneben wurden noch weitere Funktionen integriert um auch eine schnelle und komfortable Visualisierung zu ermöglichen und die Praxistauglichkeit zu verbessern. Die schematische Darstellung aller Funktionen des Auswertungsprogrammes ist in Abbildung III-5 dargestellt.

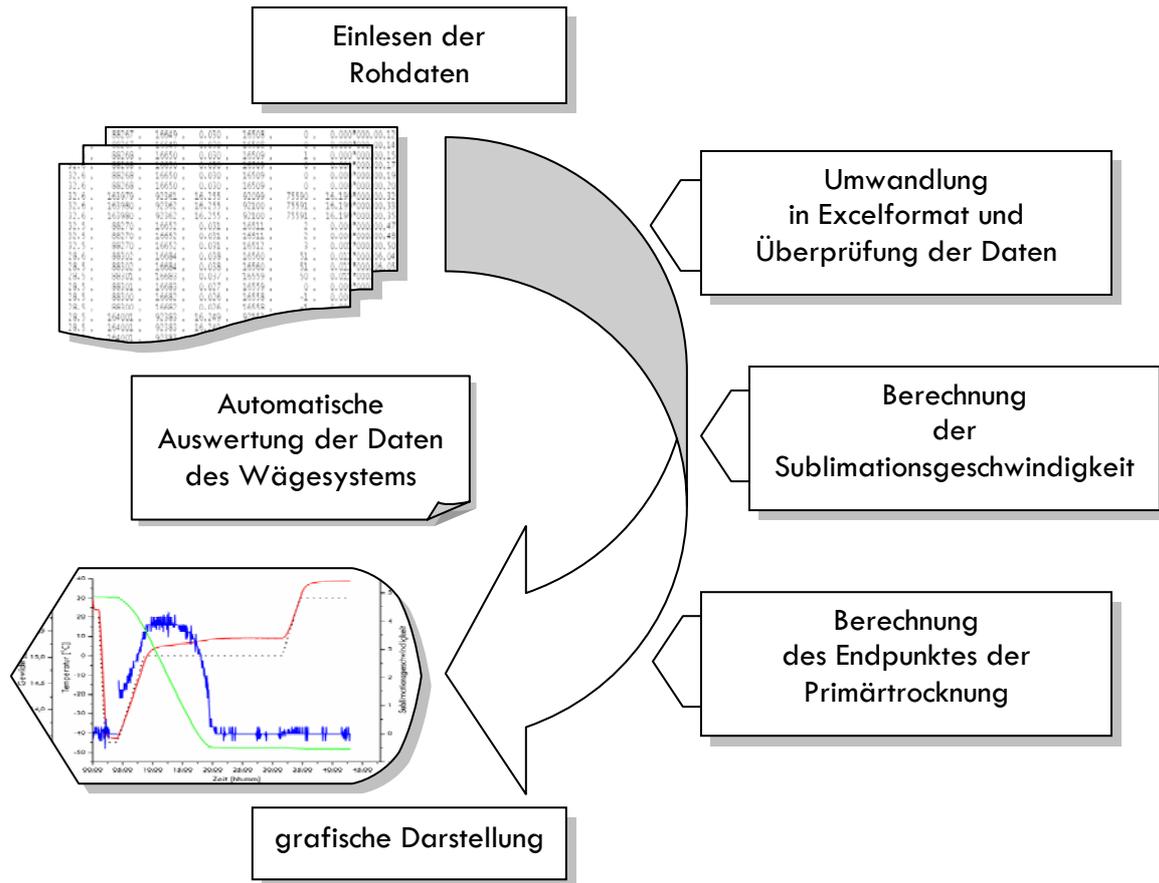


Abbildung III-5 Schematische Darstellung des Programmablaufes zur automatischen Auswertung

Im Einzelnen durchläuft das Programm die folgenden Arbeitsschritte:

Im ersten Schritt muss das Datenfile in Excel eingelesen, geordnet und in ein für Excel verwendbares Format umgewandelt werden. Die Schwierigkeit besteht darin, aus den bei einem Messpunkt aufgenommenen Daten (Nullabgleich, Drift vor der Messung, Messung, Drift nach der Messung) die Messdaten herauszurechnen (Abbildung III-3). Die drei Messdaten eines Messpunktes werden dann zu einem Mittelwert zusammengefasst und in einer neuen Datei im Excelformat gespeichert.

Nach dem Einlesen und Umwandeln der Daten ist ein Überprüfungsschritt angeschlossen, der Ausreißer entfernt. Gleichzeitig werden die Sublimationsgeschwindigkeit und das Ende der Primärtrocknung entsprechend der gewählten Vorgabe berechnet und anschließend je nach Wunsch grafisch dargestellt. Die Vorgaben zur Erkennung der Ausreißer beruhen auf Erfahrungswerten für 10R Vials mit 3ml Füllvolumen und dienen nur der optischen Bereinigung. Je nach Vialgröße und Befüllung müssen diese Daten angepasst werden. Ebenso ist es möglich diese Datenbereinigung auszuschalten. Als Standardvorgaben zur Berechnung des Endpunktes wurden die Erkenntnisse von Frau Roth zugrunde gelegt.¹⁰⁹ Um die Flexibilität und Benutzerfreundlichkeit des Makros zu erhalten, wurde die Möglichkeit zur Veränderung dieser Werte integriert.

In Abbildung III-6 sind zwei Screenshots der Auswahlmasken des Makros zu sehen. Die Masken wurden erstellt, um möglichst einfach die Grenzen und Vorgaben der Berechnung verändern zu können, und um die grafische Darstellung individuell anzupassen und so die Anwendung des Programms in der Praxis zu ermöglichen.

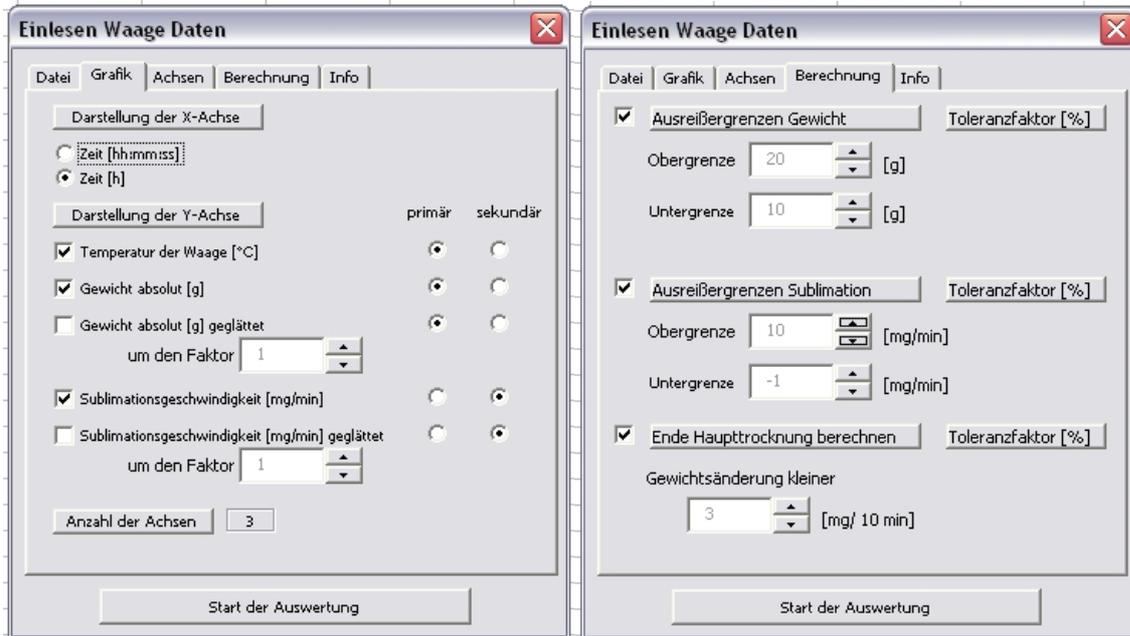


Abbildung III-6 Screenshots des entwickelten Excelmakros zur Auswertung der Daten des Wägesystems

Berechnet wird die Sublimationsgeschwindigkeit nach der allgemeinen Punktsteigungsformel (Gleichung III-1).

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

Gleichung III-1 Punktsteigungsformel

Eine Glättung der Daten zum Ausgleich von Messschwankungen wird durch Mittelwertbildung erreicht (Gleichung III-2). Die Stärke der Glättung kann durch den Faktor n über die Anzahl der in den Mittelwert einbezogenen Messwerte bestimmt werden.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Gleichung III-2 Berechnung des Mittelwertes

Besonders bei tiefen Temperaturen oder steilen Druck- bzw. Temperaturrampen kann es zu Schwankungen kommen, die durch eine Mittelung geglättet werden sollten, da diese Schwankungen bei der Sublimationsgeschwindigkeitsberechnung mathematisch deutlich verstärkt werden und zu einer sehr ‚unruhigen‘ Kurve führen.

Der Endpunkt wird durch einen Vergleich der Messwerte mit der festgelegten Grenze im Rahmen der vorgegebenen Toleranzen berechnet und im Diagramm eingezeichnet (Abbildung III-7).

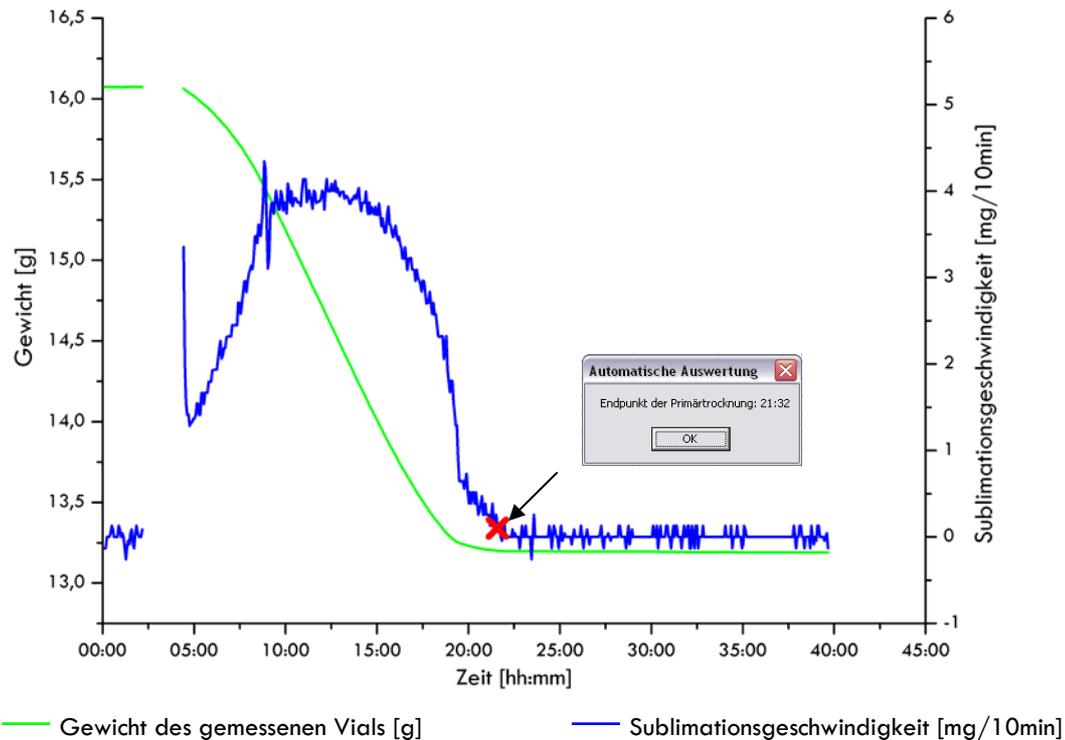


Abbildung III-7 Sublimationskurve (Saccharose Lösung 5%, 3ml in 10R Vials) mit automatischer Endpunktsermittlung berechnet durch das Excel Makro

1.2. Versuchsaufbau des Wägesystems

Zur Untersuchung des Wägesystems wurde ein festes Versuchslayout gewählt. Die Vials wurden nach dem in Abbildung III-8 dargestellten Schema um die Waage positioniert. Der relativ große Abstand zwischen dem Messvial und den umgebenden Vials ist zwingend notwendig. Durch Vibrationen der Gefriertrocknungsanlage und durch ein Luftpolster, das sich in der Wölbung unter den Vials bildet und mit Anlegen eines Vakuums wie ein Luftkissen wirkt, können die Vials auf der Stellfläche verschoben werden. Wenn diese Bewegung zu einem Kontakt mit dem Messvial des Wägesystems führt, wird die Messung durch Reibung oder ein Verhaken der Vials verfälscht bzw. verhindert.

Da es trotz Sicherheitsabstand zwar deutlich seltener, aber immer noch zu Messausfällen kam, wurde schließlich eine Absperrung um das Messvial angebracht. Ein stabiler im Halbkreis gebogener Draht, der am Gehäuse des Wägesystems angebracht wurde, schützte das Messvial vor unerwünschtem Kontakt mit umherrutschenden Vials.

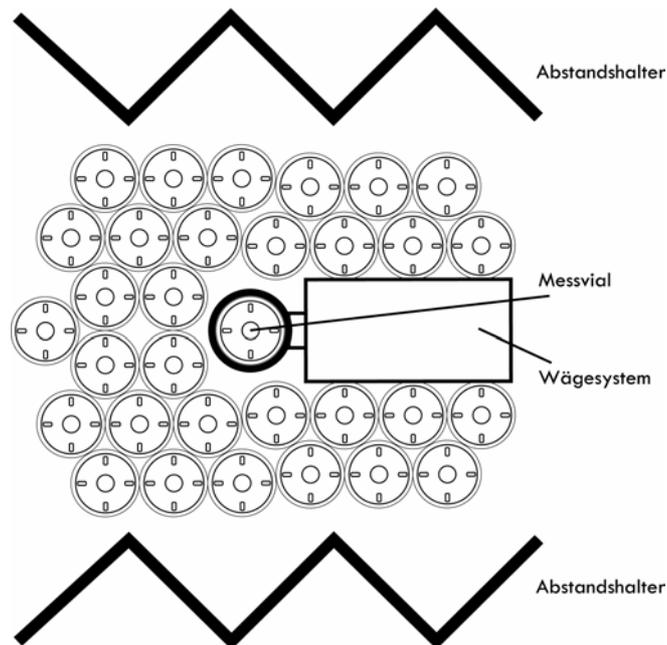


Abbildung III-8 Standardlayout für Gefriertrocknungsversuche mit dem Wägesystem

Ebenso wirkte sich trotz der kompakten Bauweise das hohe Gehäuse (55mm) des Wägesystems nachteilig auf das Versuchslayout aus (Abbildung III-9). Da die Waage Vials bis zur Größe 10R (51mm) überragt, muss zum Schutz des Wägesystems auf ein automatisches Verschließen der Vials am Ende des Trocknungsprozesses verzichtet werden.

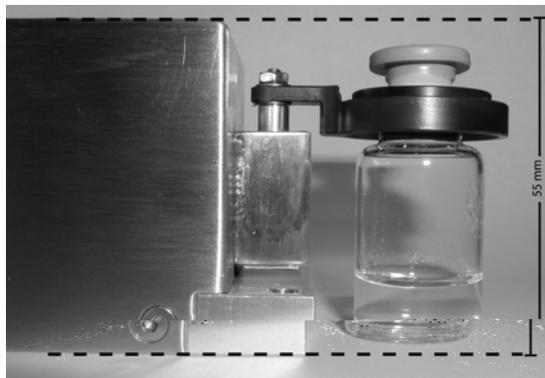


Abbildung III-9 Seitenansicht des Wägesystems mit einem 10R Vial

Alternativ kann das Wägesystem durch stabile Abstandshalter vor einer Beschädigung durch die hydraulische Verschlusseinrichtung geschützt werden.

In jedem Fall müssen die Vials auf der Stellfläche des Wägesystems manuell verschlossen werden. Bei hygroskopischen Produkten kann dies je nach Zeitdauer des Verschließens und der Feuchte der Raumluft zur einer signifikanten Änderung der Restfeuchte führen.

Bei der Durchführung von Versuchen mit dem Wägesystem sollte immer mit Abstandshaltern gearbeitet werden, um auf den anderen Stellflächen normale Bedingungen mit automatischem Verschließen der Vials zu erhalten.

Eine weitere technische Hürde ist, die mechanische Beweglichkeit auch bei sehr tiefen Temperaturen zu gewährleisten. Bei Umgebungstemperaturen kleiner -40°C kommt es zu einem reversiblen Ausfall des Wägesystems. Die Messung wird bis auf fehlende Daten in diesem Bereich aber nicht beeinträchtigt. Durch Austausch von Schmiermitteln und Bauteilen der Wägemechanik konnte im Laufe der Arbeit die Zuverlässigkeit im tiefen Temperaturbereich erhöht werden. Etwaige Lücken bei der Darstellung der Daten zu Beginn der Gefriertrocknungsprozesse sind auf dieses Phänomen zurückzuführen. (z.B. Abbildung III-2 und Abbildung III-7)

Zur Überprüfung der Messgenauigkeit unter Gefriertrocknungsbedingungen wurde das Wägesystem mit einem Vial, beschwert mit Glaskugeln auf ca. 20,0g, in einem verkürzten Gefriertrocknungsprozess verschiedenen Temperaturrampen ausgesetzt und das Messsignal aufgezeichnet.

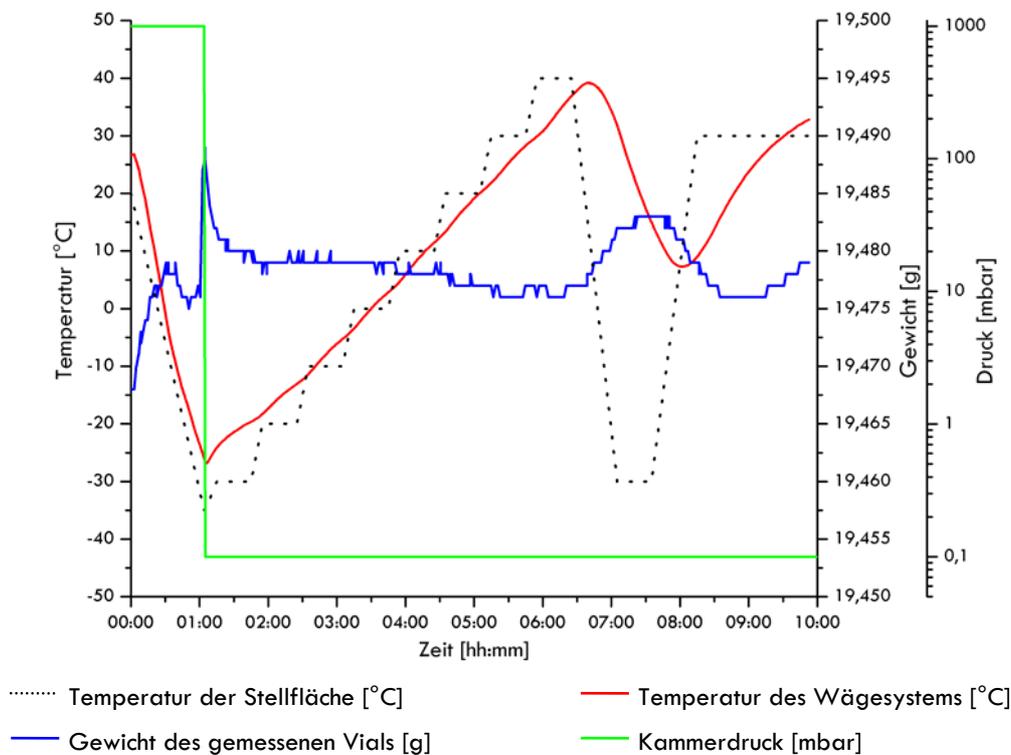


Abbildung III-10 Messsignal des Wägesystems mit einem Kalibrationsvial

In Abbildung III-10 ist das Ergebnis eines Kalibrationslaufes dargestellt. Der Einfluss steiler Temperaturrampen mit Geschwindigkeiten um 1K pro Minute auf das Messergebnis ist deutlich. Thermische Trägheit des Wägesystems spielt hier die Hauptrolle. Besonders unter Primärtrocknungsbedingungen, bei vermindertem Druck, folgt der Temperaturfühler im Wägesystem den Umgebungsbedingungen deutlich verzögert und liefert so eine falsche Grundlage zur Berechnung der Temperaturkorrektur. Langsame Temperaturrampen können aufgrund einer besseren Temperaturanpassung hingegen von der Elektronik und Software besser kompensiert werden, und das Messsignal schwankt nur im Bereich von zwei bis drei

Milligramm. Ebenso ist die Signalspitze zu Beginn der Haupttrocknung auffällig. Der sprunghafte Anstieg des Gewichtes lässt sich durch die bei der raschen Evakuierung der Trocknungskammer verursachten Luftströmungen erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Wägesystem durch Temperaturrampen beeinflusst wird und eine absolute Aussage zum Gewicht während des Gefriertrocknungsprozesses nur mit einem Fehler von mindestens $\pm 5\text{mg}$ möglich ist. Eine gravimetrische Bestimmung der Restfeuchte ist daher mit diesem System nicht möglich.

Zur Bestimmung der Sublimationsgeschwindigkeit hingegen ist die Messgenauigkeit ausreichend. Da während der Primärtrocknung je nach Trocknungsprogramm und Formulierung Sublimationsgeschwindigkeiten von $4\text{-}8\text{mg}/10\text{min}$ herrschen können, sind die im Vergleich dazu geringen Schwankungen des Messsignals vernachlässigbar. Der Einfluss ungewöhnlicher Temperaturprogramme ist aber im Einzelfall genauer zu untersuchen.

Zur Überwachung der Sekundärtrocknung ist das Wägesystem aufgrund der hohen Messschwankungen in Kombination mit den sehr geringen Gewichtsänderungen nicht geeignet.

1.3. Einfluss des Wägesystems auf die Trocknung

Die entscheidende Frage an alle Messsysteme ist die Relevanz der Messdaten. Wie stark sind die Messdaten durch das Messsystem selbst beeinflusst und wie repräsentativ sind sie für die Gesamtheit der Proben. Besonders bei Messsystemen, die nur ein Vial überwachen, ist das Wissen über den Einfluss des Systems auf den Gefriertrocknungsprozess entscheidend.

Beim Wägesystem stellte sich zunächst die Frage, wie stark wird der Gefriertrocknungsprozess des Messvials durch die Messmethode beeinflusst.

Der zweite Punkt, den es zu untersuchen galt, war der Einfluss des Gerätes selbst auf den Gefriertrocknungsprozess. Der Temperaturfühler im Wägesystem zeigt im Vergleich zur Stellfläche oft deutlich höhere Temperaturen an, was eine nähere Untersuchung erfordert.

1.3.1. „Kontaktlose“ Gefriertrocknung

Zur Messung des Gewichtes mittels Wägesystem wird das Vial kurzzeitig von der Stellfläche angehoben. Es sollte geklärt werden, ob sich diese Unterbrechung der Wärmeleitung durch den Kontaktverlust zur Stellfläche auf den Trocknungsverlauf des Messvials auswirkt.

Hierzu wurde ein ungewöhnlicher Messaufbau gewählt. Vials wurden mit Hilfe eines Drahtgestells mit einem Abstand von ca. einem Zentimeter zur Stellfläche aufgehängt und gefriergetrocknet (Abbildung III-11).



Abbildung III-11 ‚kontaktlose‘ Gefriertrocknung durch Aufhängen der Vials an einer Drahtschleife

Der erwartete Kollaps des Produktes aufgrund des fehlendes Kontaktes zur Stellfläche und der damit nicht möglichen Energieübertragung durch Wärmeleitung blieb aus. Überraschenderweise zeigten alle Vials einen optisch einwandfreien Kuchen und eine für die Saccharoseformulierung übliche Restfeuchte von ca. 0,5 %.

Bei der ‚kontaktlosen‘ Gefriertrocknung kann die für die Sublimation notwendige Energie nur durch Konvektion und Strahlung übertragen werden. Um den Einfluss beider Faktoren zu

klären, wurde zur Untersuchung der Konvektion mit drei verschiedenen Trocknungsdrücken und zur Untersuchung der Strahlung mit einem systematischen Setup auf der Stellfläche gefriergetrocknet.

Als Trocknungsdrücke wurden 0,1mbar, 0,01mbar und 0,001mbar gewählt. Auf der Stellfläche wurden die hängenden Vials einmal alleine und einmal analog des Versuchsaufbaues wie in Abbildung III-8 dargestellt von normal auf der Stellfläche stehenden Vials umstellt gefriergetrocknet. Durch geschicktes Biegen der Drahtaufhängung konnten die Vials in der Trocknungskammer trotzdem automatisch verschlossen werden (Abbildung III-12).



Abbildung III-12 Foto eines Vials mit speziell gebogener Drahtschleife angehoben

Der Gefriertrocknungsverlauf der einzelnen Vials wurde mit Temperaturfühlern aufgezeichnet und ausgewertet. In Abbildung III-13 ist der Temperatur-Zeit Verlauf der einzelnen Vials mit unterschiedlichen Trocknungsbedingungen im Vergleich zu einem normalen Vial auf einer beladenen Stellfläche dargestellt. Schon beim Einfriervorgang zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu dem normalen Vial. Die Vials in der Hängevorrichtung (Vials HV), frieren langsamer ein und erreichen hierbei nicht die Stellflächentemperatur. Mit Beginn der Primärtrocknung fällt die Produkttemperatur stark ab. Durch Anlegen des Vakuums kommt es zur schnellen Sublimation der oberen Eisschichten, die zu einer starken Abkühlung führt. Der Temperaturabfall ist mit geringeren Drücken, entsprechend der korrespondierenden Eistemperatur, stärker ausgeprägt (Tabelle I-2).

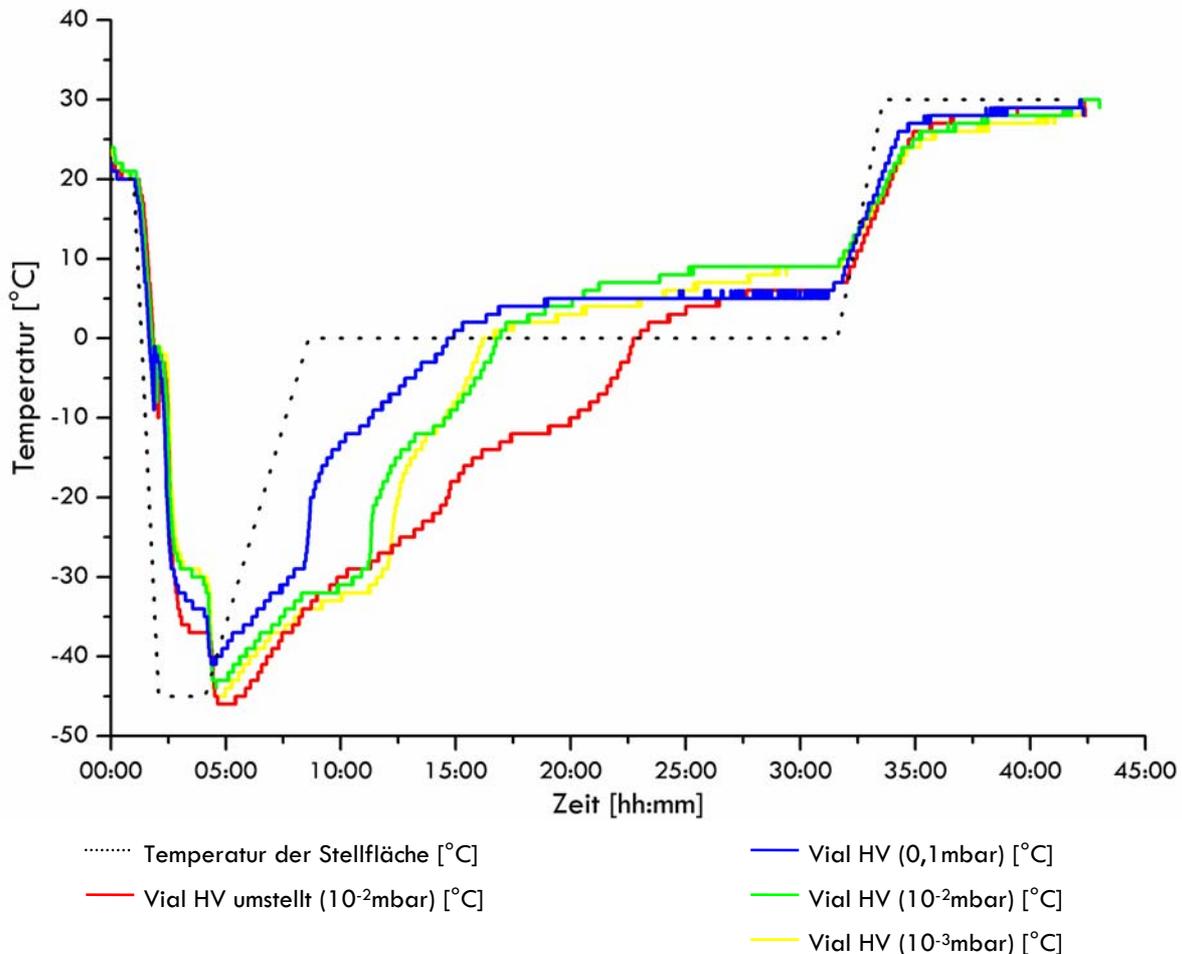


Abbildung III-13 Unterschiedliche Temperatur-Zeit Verläufe (Saccharose Lösung 5%, 3ml in 10R Vials) von Vials in der Hängevorrichtung (HV) bei verschiedenen Trocknungsdrücken im Vergleich zu einem Vial (HV) auf einer beladenen Stellfläche. Die Druckangabe in Klammern bezieht sich auf den Trocknungsdruck während der Primärtrocknung.

Im Verlauf der Primärtrocknung steigt parallel zur Stellflächen- auch die Produkttemperatur an und die Unterschiede zwischen den verschiedenen Trocknungsdrücken werden deutlicher. Bei 0,1mbar ist die Primärtrocknung nach 15h und bei 10^{-2} mbar bzw. 10^{-3} mbar nach 17h abgeschlossen.

Erklärt werden kann diese schnelle Trocknung nur durch starke Strahlungseinflüsse der fast leeren Stellflächen auf die Vials. Ebenso zeigt sich, dass bei einem Trocknungsdruck von 0,1mbar die Konvektion noch einen Einfluss als Energieüberträger auf die Trocknungsgeschwindigkeit hat. Bei den geringeren Drücken kann der Einfluss der Konvektion, wie die Trocknung bei 10^{-2} mbar und 10^{-3} mbar zeigt, vernachlässigt werden.

Erstaunlich ist die deutliche Verzögerung der Trocknung durch Umstellen des Vials in der Hängevorrichtung mit weiteren Vials und der damit verbundenen Erhöhung der Beladung der Stellfläche. Die Primärtrocknung verlängert sich um sechs Stunden auf 23h. Durch den Energieverbrauch der Vials wird die Oberfläche der Stellfläche gekühlt. Die Temperatur des

Edelstahlbleches liegt deutlich unter der Temperatur des Mediums in der Stellfläche. Dieser Temperaturunterschied reduziert auch die abgegebene Wärmestrahlung deutlich, wodurch sich die Trocknung entsprechend verlangsamt. Auf diesen Effekt in Zusammenhang mit dem Wägesystem wird im folgenden Abschnitt III.1.3.2 genauer eingegangen.

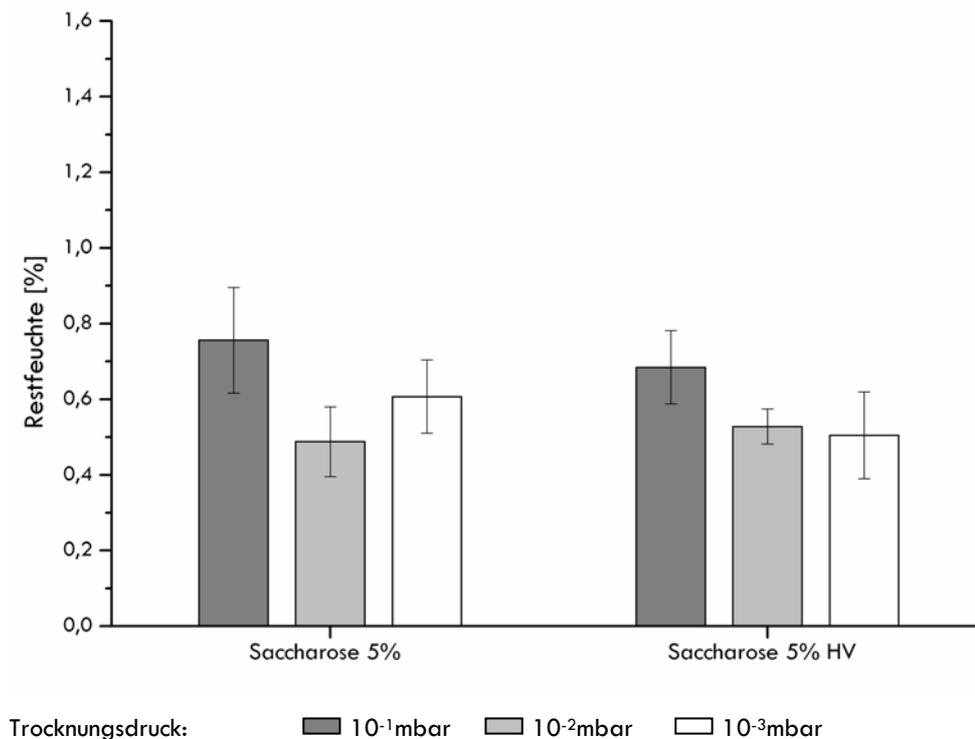


Abbildung III-14 Vergleich der Restfeuchten von Saccharose-Lyophilisaten in einer Hängevorrichtung (HV) gegenüber normal getrockneten Lyophilisaten bei verschiedenen Trocknungsdrücken. (n=5)

Bei Betrachtung der Restfeuchten lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den normalen Vials und den Vials in der Hängevorrichtung erkennen. Die Restfeuchten liegen im Bereich von 0,5% bis 0,7% (Abbildung III-14).

Das Ergebnis der ‚kontaktlosen Gefriertrocknung‘ zeigt, dass bei geringen Beladungen durch eine dauerhafte Unterbrechung der Wärmeleitung im Vergleich zu einem Vial auf der Stellfläche der Gefriertrocknungsprozess nicht verzögert wird.

Daraus lässt sich schließen, dass das Anheben des Vials zur Messung des Gewichtes keinen kritischen Einfluss auf den Ablauf des Gefriertrocknungsprozesses in diesem Vial hat.

1.3.2. Energieeinfluss des Wägesystems

Der im vorangegangenen Abschnitt III.1.3.1 gezeigte Effekt, dass durch eine Abschirmung mit Vials und damit zusätzlicher ‚Kühlung der Stellfläche‘ der Trocknungsprozess deutlich verzögert werden kann, ist für den Trocknungsprozess des Messvials beim Wägesystem ebenfalls von Bedeutung. Hier könnte sich der umgekehrte Effekt, eine Beschleunigung der Trocknung, durch mangelnde Abschirmung des Messvials zeigen, da wie in Abschnitt III.1.2 dargestellt, ein Mindestabstand zwischen Messvial und den umgebenden Vials zur fehlerfreien Messung notwendig ist.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden zwei Temperaturfühler in direkt zum Wägesystem benachbarte Vials und ein Temperaturfühler auf der Stellfläche vor dem Wägesystem angebracht (Abbildung III-15).

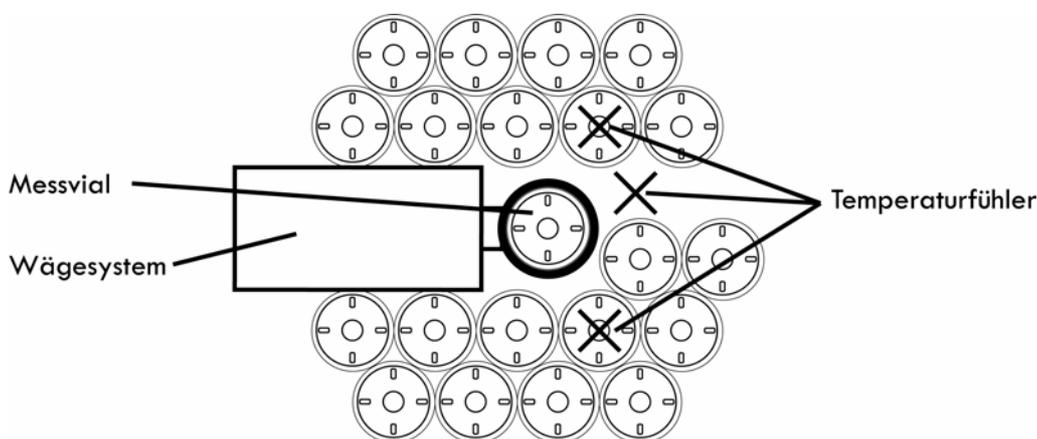


Abbildung III-15 Versuchsaufbau zur Überprüfung des Strahlungseinflusses des Wägesystems während der Gefriertrocknung auf das Messvial

Gleichzeitig wurde eine weitere Stellfläche komplett beladen und ebenfalls mit Temperaturfühlern in der Mitte der Stellfläche ausgestattet.

Die gemessenen Temperaturverläufe sind zusammen mit dem Verlauf des Temperaturfühlers der Waage und der Sublimationsgeschwindigkeit des Messvials in Abbildung III-16 graphisch dargestellt.

Das von den Temperaturfühlern der komplett beladenen Stellfläche angezeigte Ende der Primärtrocknung liegt bei ca. 30 Stunden (Abbildung III-16(1)). Die relativ großen Abweichungen der Temperaturverläufe während der Primärtrocknung und das gleichzeitige Erreichen der Stellflächentemperatur hängen mit der Position der Temperaturfühler im Vial und der genauen Position auf der Stellfläche zusammen. Diese Zusammenhänge werden im nächsten Kapitel 1.3.3 genauer diskutiert.

Primärtrocknung deutlich unter der Temperatur der Temperiersole und steigt erst mit dem Ende der Primärtrocknung auf die eigentlich erwartete Temperatur knapp oberhalb der Soletemperatur an. Offensichtlich reicht der Energietransfer von der Sole auf die Stellfläche nicht aus, um eine konstante Stellflächentemperatur zu erhalten und erweist sich somit als ein begrenzender Faktor für den Trocknungsablauf.

Zur genaueren Evaluierung dieser Phänomene, der Abschirmung und der Beladung, wurden zwei Versuchsreihen gefahren.

Ziel war es, zunächst den Einfluss der Abschirmung durch Nachbarvials auf die Trocknungsgeschwindigkeit zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden drei Stellflächen mit je 36 Vials in drei verschiedenen Setups beladen und mit Temperaturfühlern in der Mitte ausgestattet (Abbildung III-17).

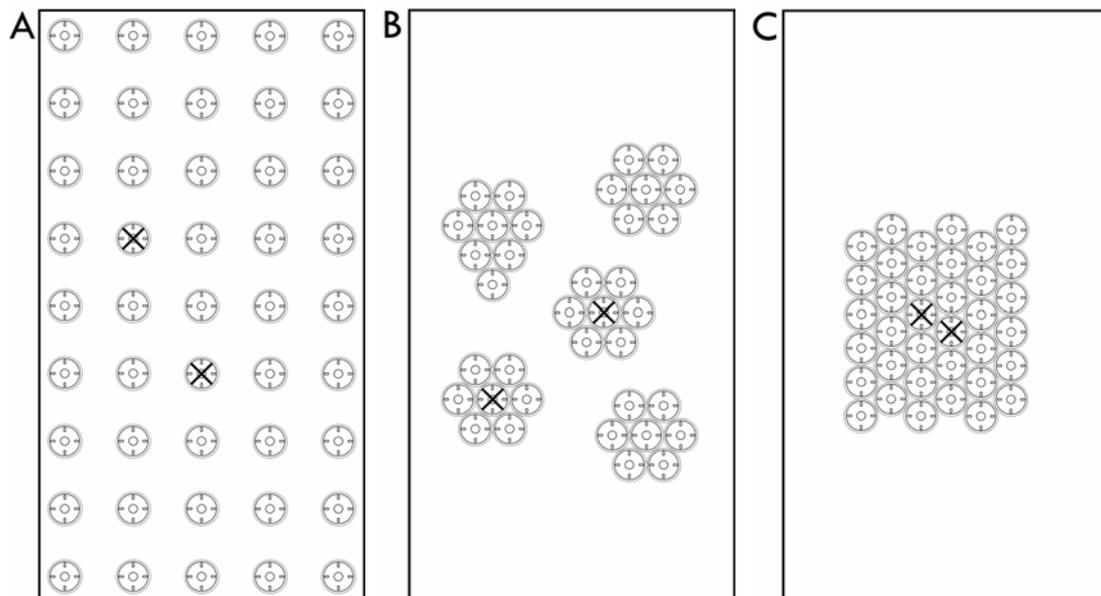


Abbildung III-17 Setup mit jeweils 36 Vials auf den Stellflächen zur Untersuchung der Abschirmung durch Nachbarvials. An den mit einem Kreuz gekennzeichneten Stellen sind Temperaturfühler platziert

ca. 14 Stunden früher, als die Temperaturfühler auf einer voll beladenen Stellfläche mit 180 Vials.

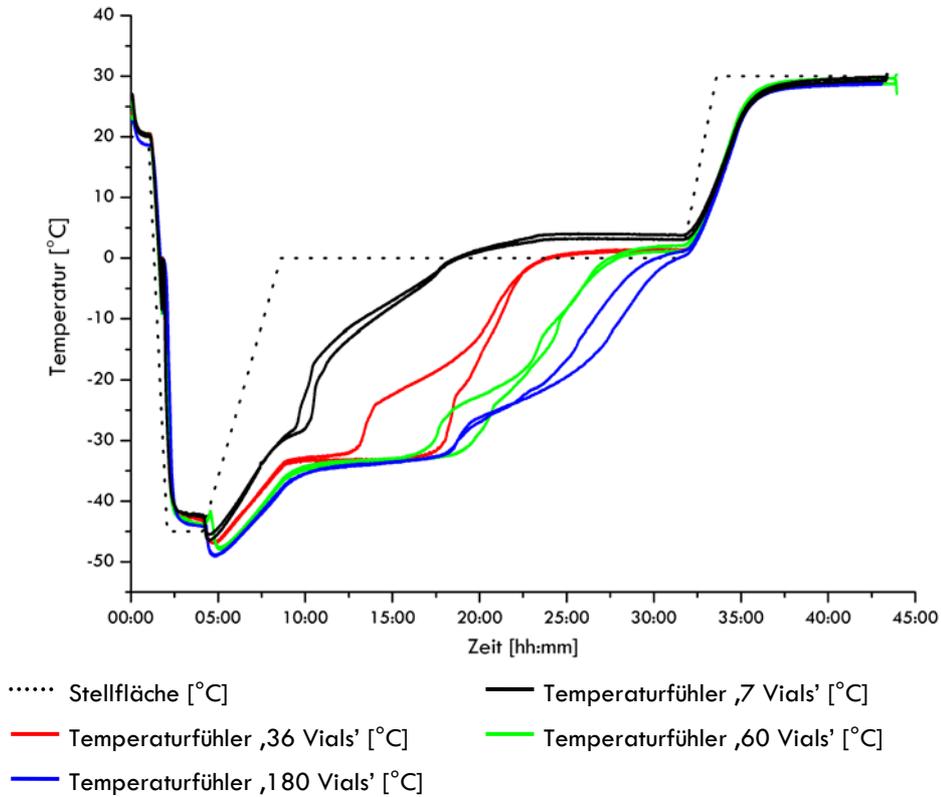


Abbildung III-19 Temperatur-Zeit Verlauf (Saccharose 5%, 3ml, 10R Vial) bei unterschiedlichen Beladungen von 7 bis 180 Vials.

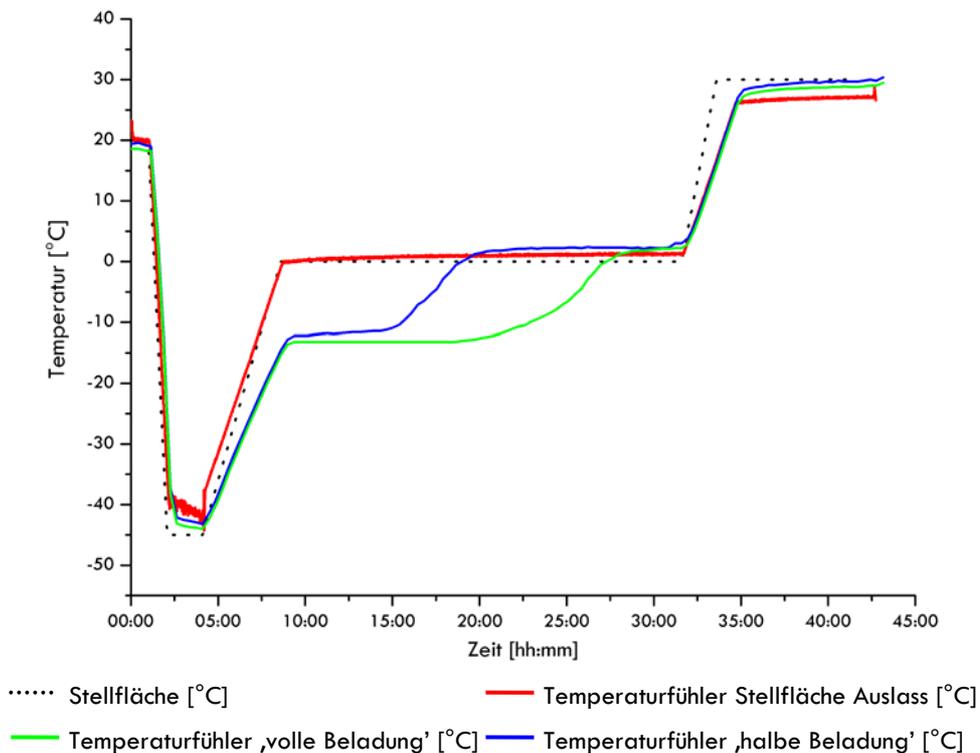


Abbildung III-20 Temperatur-Zeit Verlauf der Stellflächenoberfläche bei unterschiedlichen Beladungen

In Abbildung III-20 sind die Stellflächentemperaturen, gemessen durch einen Temperatursensor zwischen den Vials in der Mitte auf der Stellfläche, und die Auslasstemperatur der Stellfläche abgebildet. Die Temperaturfühler auf den Stellflächen zeigen deutlich die Kühlung der Stellfläche durch den Sublimationsvorgang. Die Temperatur am Auslass der Stellfläche hingegen verläuft im Gegensatz zur Oberflächentemperatur der Stellfläche parallel zur Solltemperatur. Das Diagramm unterstreicht damit ebenfalls, dass es sich, wie schon vermutet, um ein Energietransferproblem handelt. Überraschend ist die Größe des Beladungseinflusses mit sieben Stunden Unterschied im Ende der Primärtrocknung.

Damit ist gezeigt, dass das ‚Energieangebot‘ der Stellfläche begrenzt ist und auf die Vials verteilt wird. Ein limitierender Faktor bei diesem Trocknungsprogramm ist somit der Energietransfer von der Sole auf die Stellfläche und damit in Kombination mit der Beladung für die Trocknungsdauer entscheidend.

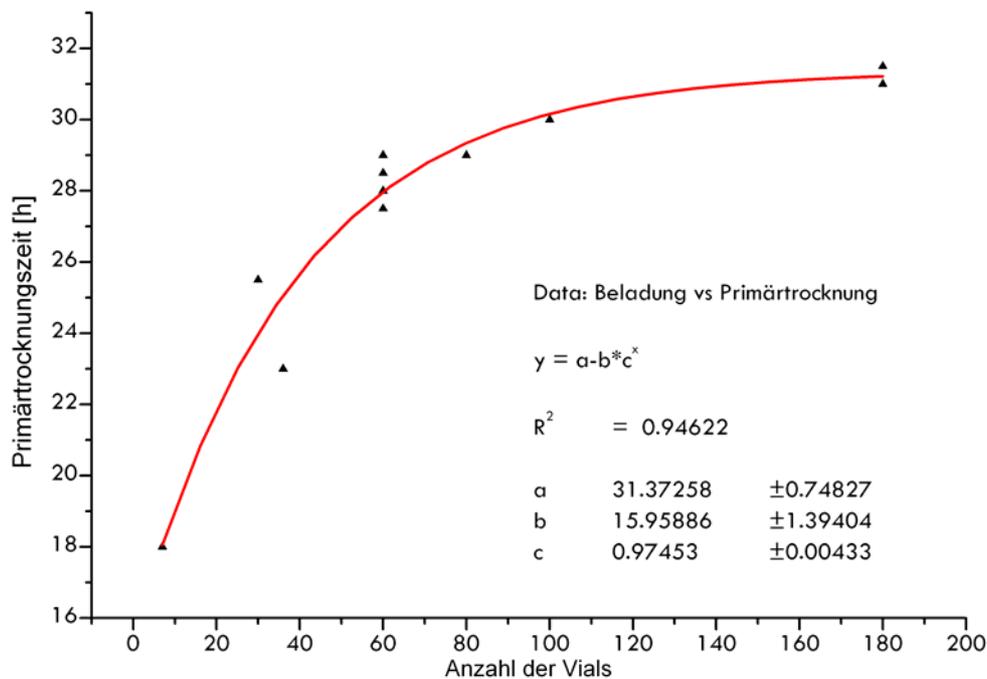


Abbildung III-21 Zusammenhang zwischen der Beladung und der Primärtrocknungsgeschwindigkeit

Dieser Zusammenhang zwischen der Beladung und der Primärtrocknungszeit der mittleren Vials auf der Stellfläche lässt sich für diese Gefriertrocknungsanlage in einer Näherung mathematisch ausdrücken (Abbildung III-21).

Anhand der Verzögerung, die durch die unterschiedlichen Beladungen sichtbar wird, lässt sich die schnellere Trocknung des Messvials und der Vials in direkter Nachbarschaft zum Wägesystem gut erklären. Das Wägesystem belegt eine Fläche von ca. 80cm² auf der Stellfläche. Eine Fläche, die nicht mit Energie verbrauchenden Vials gefüllt ist, sondern mit dem energieabstrahlenden Wägesystem belegt ist. Dieser Effekt sollte beim Vergleich der Daten

des Wägesystems mit der Trocknung, in Abhängigkeit von der Beladung der Stellflächen, noch deutlicher zu sehen sein.

In Abbildung III-22 sind aus verschiedenen Gefriertrocknungsläufen bei gleichem Trocknungsprogramm und unterschiedlichen Beladungen die Daten des Wägesystems gemeinsam dargestellt. Zusätzlich zur Sublimationsgeschwindigkeit wurde auch jeweils der Temperaturverlauf des Wägesystems eingezeichnet.

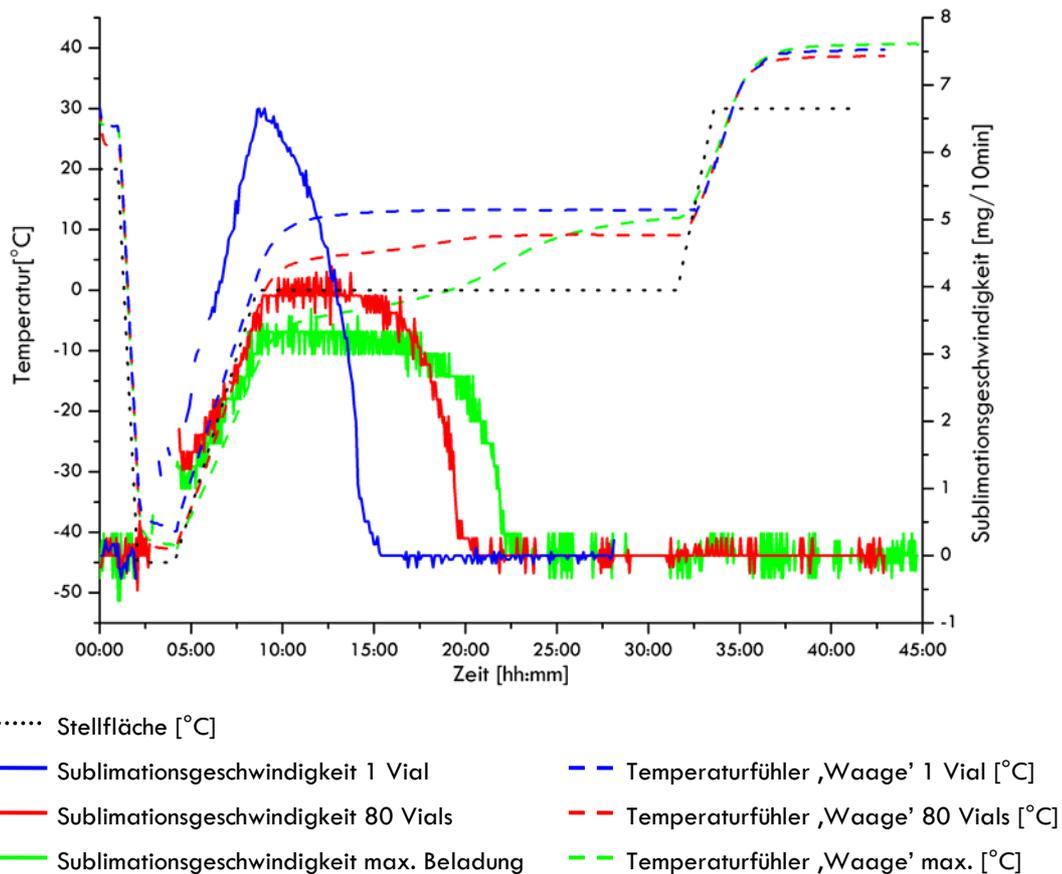


Abbildung III-22 Darstellung der Sublimationsgeschwindigkeiten (Saccharose 5%, 3ml, 10R Vial) und des Temperaturfühlers im Wägesystem bei unterschiedlicher Beladung der Stellfläche des Wägesystems.

Die Daten zeigen, dass das Ende der Sublimation eines einzelnen Vials im Vergleich zu einer halb beladenen Stellfläche schon fünf Stunden früher erreicht wird. Der Unterschied zwischen halber Beladung und Vollbeladung fällt mit 20 Stunden zu 22,5 Stunden nicht mehr so deutlich aus. Mit zunehmender Beladung relativiert sich der Einfluss des Wägesystems auf die Trocknung der umliegenden Vials. Daher sollten Versuche mit dem Wägesystem grundsätzlich mit einer möglichst vollbeladenen Stellfläche durchgeführt werden, um diesen Einfluss zu minimieren.

Von Interesse ist auch die Veränderung des Verlaufes der Sublimationskurve mit zunehmender Beladung. Während die Messkurve der Trocknung eines Vials einen peakförmigen Verlauf hat, zeigen die Sublimationskurven der beladenen Stellflächen eine deutliche Plateaubildung. Dieses Plateau in der Sublimationsgeschwindigkeit wird durch die Begrenzung der

Energiezufuhr verursacht und zeigt, dass ein kontrollierter, aber auch langsamerer Sublimationsprozess vorliegt.

1.3.3. Einfluss der Position des Messfühlers auf das Temperatursignal

Zur Untersuchung der Online Messmethoden wurde für den Vergleich mit einer Standardmessmethode in der Regel die Temperaturmessung herangezogen. Die Abhängigkeit des Messsignals vom Typ des Temperaturfühlers und von der Position im Vial ist bekannt.^{7,32}

Zur besseren Beurteilung des Messsignals, der in den verwendeten Gefriertrocknungsanlagen eingebauten Temperaturfühler, wurde der Einfluss der Position des Messfühlers im Vial und im nachfolgenden Abschnitt III.1.3.4 der Einfluss der Sensorgröße untersucht.

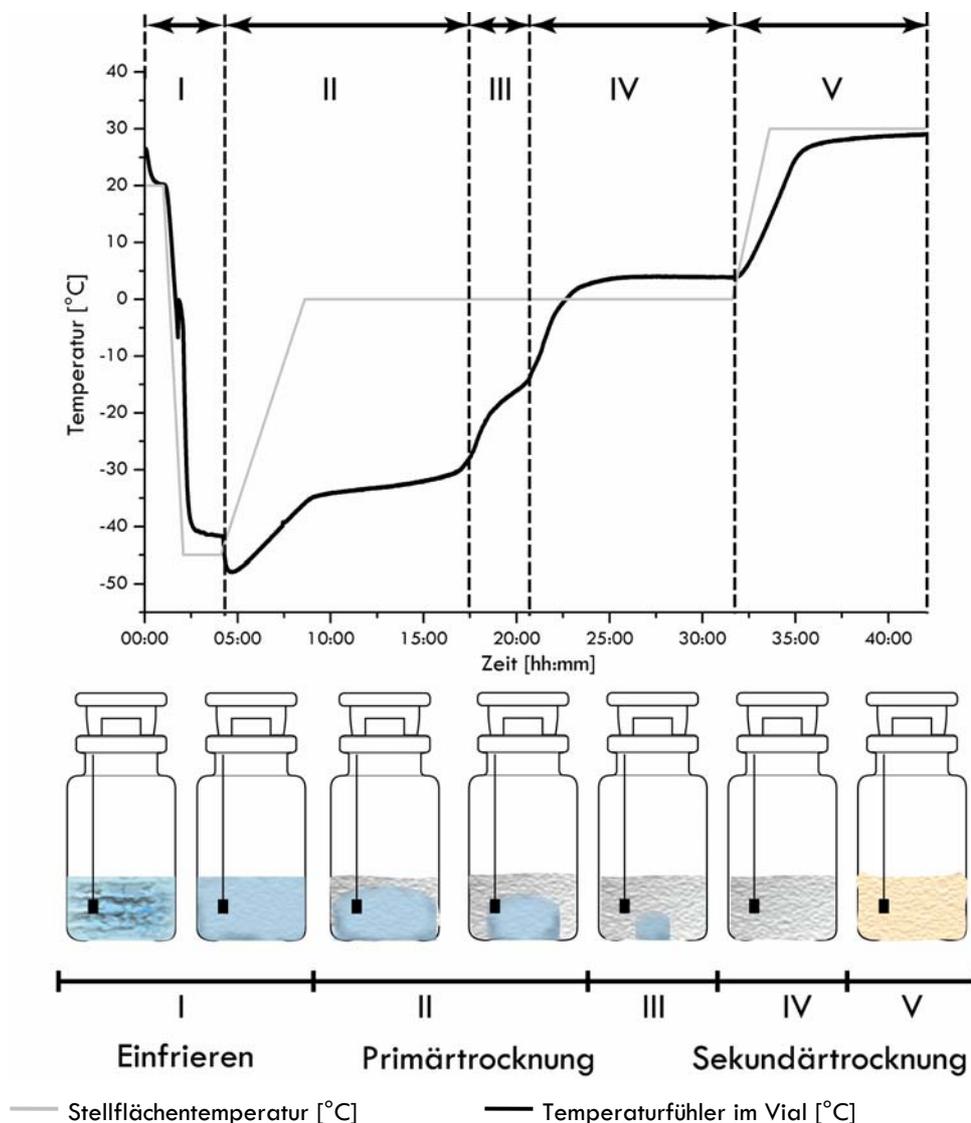


Abbildung III-23 Das Temperatursignal eines Temperaturfühlers beim Durchlaufen unterschiedlicher Phasen in Abhängigkeit von seiner Position zur Trocknungsfrot im Vial

Ein Temperaturfühler kann nur seine unmittelbare Umgebung messen. Je nach Homogenität und Wärmeleitfähigkeit des zu messenden Produktes ist dieser Umgebungsbereich unterschiedlich

dimensioniert. Die folgende Betrachtung bezieht sich auf die Gefriertrocknung im Vial und damit Volumina in der Größenordnung von 1ml bis 10ml. Bei diesen geringen Volumina und guter Wärmeleitfähigkeit, wie bei Wasser und Eis, kann ein Temperaturgradient innerhalb der flüssigen bzw. gefrorenen Struktur vernachlässigt werden. Ein Temperaturfühler in der Flüssigkeit oder im Eiskern zeigt daher repräsentativ die Temperatur für die gesamte Struktur an.

In Abbildung III-23 sind die verschiedenen Phasen eines Temperaturmesssignals der verwendeten Temperaturfühler vom Einfriervorgang bis zur Sekundärtrocknung aufgezeichnet. Phase I, der Einfriervorgang, läuft in der Regel nahe an der Stellflächentemperatur. Charakteristisch sind die Unterkühlung und der anschließende Kristallisationspeak. Unterschiede zwischen den Positionen des Temperaturfühlers im Vial wären theoretisch nur bei sehr langsamen Einfriervorgängen sichtbar.¹³²

Mit Beginn der Primärtrocknung sublimiert das Eis und hinterlässt ein poröses Gerüst mit einer schlechten Wärmeleitfähigkeit. Dadurch zeigt der Verlauf des Temperaturmesssignals im Laufe der Primärtrocknung zwei Temperatursprünge (Übergang von Phase II nach Phase III und Phase III nach Phase IV). Je weiter ein Temperaturfühler am Rand des Vials positioniert ist, desto kürzer ist die Kontaktzeit zum Eiskern. Entsprechend der Position des Temperaturfühlers verschiebt sich damit das Verhältnis der Phasen II und III. Je früher der Kontakt zum Eiskern abreißt, desto kürzer fällt die Phase II aus und die Phase III verlängert sich entsprechend.

Mit dem Ende der Sublimation wird das Vial nicht mehr gekühlt und die Produkttemperatur erreicht die Stellflächentemperatur (Phase IV). Temperaturfühler in Vials, die in unterschiedlichen Positionen innerhalb des Vials fixiert waren, zeigen daher in der Regel auch den gleichen Endpunkt bei identischem Trocknungsverlauf an.

Der Verlauf des Temperaturanstieges auf Sekundärtrocknungsniveau sollte einer Temperaturgleichungskurve (Gleichung III-3) entsprechen.

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = \alpha \cdot A \cdot (T_2 - T_1) \quad \frac{\Delta Q}{\Delta t} : \text{Wärmestrom [J / s]}$$

$$A : \text{Fläche [m}^2\text{]}$$

$$\alpha : \text{Wärmeübergangskoeffizient [J / (kg \cdot K)]}$$

Gleichung III-3 Wärmeübergang zwischen zwei Medien

Die auftretenden Desorptionseffekte sind durch die Temperaturfühler nicht messbar. Daher hat der Temperaturfühler nach dem Ende der Primärtrocknung nur noch die Funktion grobe Prozessfehler, wie z.B. eine zu kurze Primärtrocknung, aufzuzeigen. Sonst sollte der Verlauf bei Temperaturfühlern in verschiedenen Vials immer gleich aussehen.

1.3.4. Einfluss verschieden großer Messfühler auf das Temperatursignal

Im Laufe der Prozessentwicklung eines Gefriertrocknungsprogrammes, speziell in der Scale-Up Phase, wird der Prozess normalerweise zwischen verschiedenen Gefriertrocknern transferiert. Je nach Ausstattung und Hersteller sind oft unterschiedliche Temperaturfühler eingebaut.

Während der Typ der verwendeten Temperaturfühler keinen Einfluss auf das Messsignal hat, nimmt die Größe des Messkopfes, neben der im vorangegangenen Absatz beschriebenen Position im Vial, entscheidend Einfluss auf die Messkurve.

Verwendet wurden neben großen, verkapselten Temperaturfühlern (Abbildung III-24-A), die durch ihre stabile Bauform oft in Produktionsbereichen zu finden sind, auch kleine verkapselte Temperaturfühler (Abbildung III-24-B) sowie sehr kleine punktförmige Thermoelemente (Abbildung III-24-C). Die Temperaturfühler wurden nach dem in Abbildung III-24 dargestellten Schema möglichst zentral in den Vials befestigt.

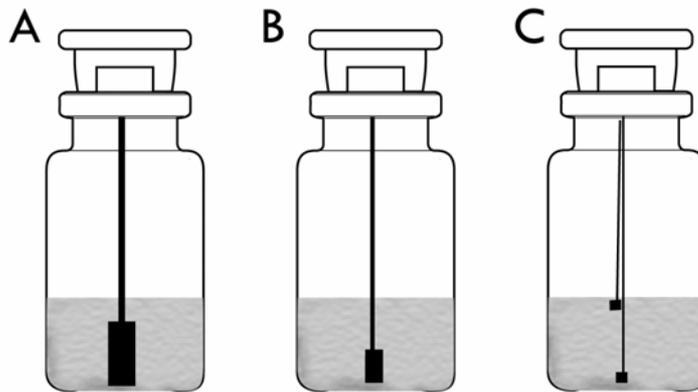


Abbildung III-24 Position der verschiedenen Temperaturfühler im Vial

Der in Abbildung III-25 dargestellte Gefriertrocknungslauf zeigt den Temperaturverlauf der unterschiedlichen Temperaturfühler. Die punktförmigen Temperaturfühler, jeweils nahe der Oberfläche bzw. des Vialbodens angebracht, zeigen die beiden extremen Verhältnisse von Phase II zu Phase III (Abbildung III-23).

Während der obere Temperaturfühler schnell den Kontakt zum Eiskern verliert und sich stetig der Stellflächentemperatur annähert, bleibt der untere Temperaturfühler auf einem konstanten Temperaturniveau bis die Sublimation beendet ist und steigt dann extrem schnell auf die Temperatur der Stellfläche an. Bei einer genauen Positionierung, besonders des unteren Temperaturfühlers, ist es so möglich, die Produkttemperatur über den ganzen Primärtrocknungsverlauf zu messen. Wenn man aus den Messwerten der beiden Temperaturfühler den Mittelwert bildet, bekommt man einen Verlauf, der dem des großen Temperaturfühlers ähnelt.

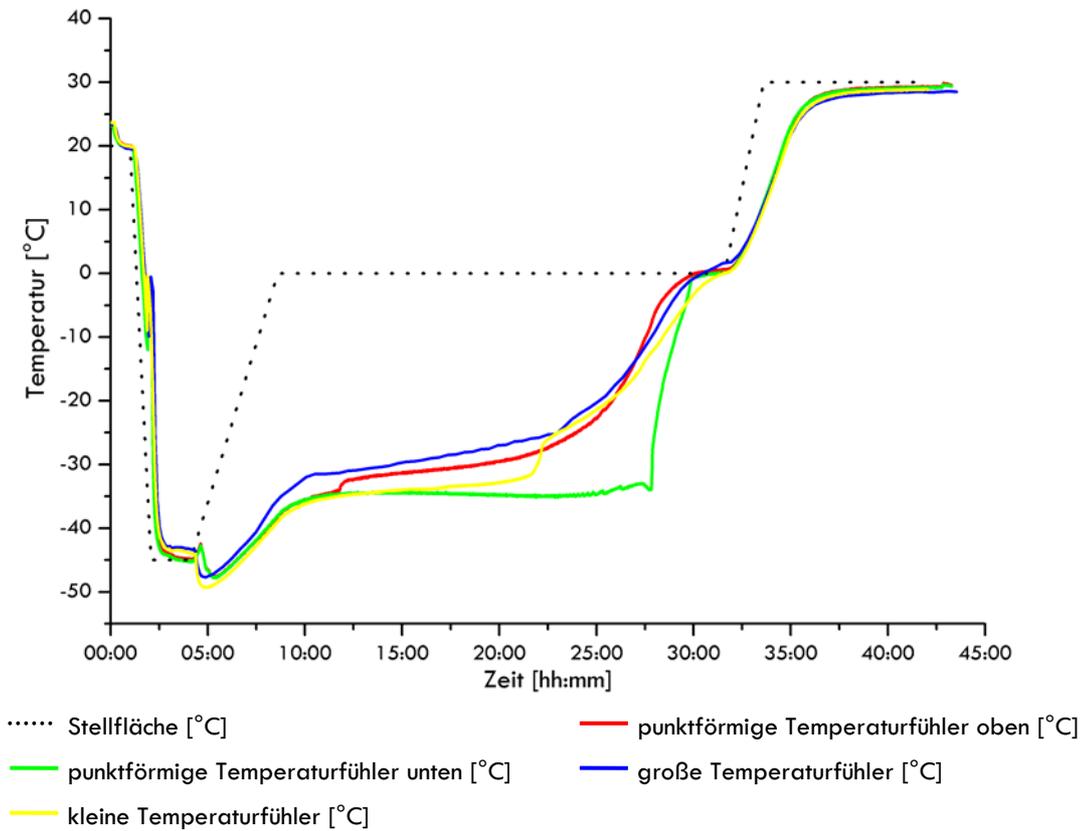


Abbildung III-25 Temperatur-Zeit Verlauf verschieden dimensionierter Temperaturfühler

Der Temperaturverlauf des großen Temperaturfühlers entspricht einem Mittelwert. Durch seine Größe reichen Teile des Temperaturfühlers gleichzeitig in den Eiskernen und in bereits trockenes Produkt. Dadurch steigt die Kurve des Temperaturfühlers erst leicht und in der zweiten Hälfte der Trocknung schneller an. Charakteristische Sprünge oder Plateauphasen werden durch diese Mittelwertbildung ausgeglichen.

Der kleine Temperaturfühler liegt nicht nur hinsichtlich seiner Größe, sondern auch vom Messsignal in der Mitte. Wie schon unter Punkt III.1.3.3 beschrieben, kommt es im Laufe der Primärtrocknung zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Sprung, der die Phase II von Phase III trennt und durch diesen Sensortyp aufgrund seiner Größe gut detektiert werden kann.

1.3.5. Beurteilung der Temperaturfühler

Zusammenfassend zeigt sich, dass alle Temperaturfühler zum gleichen Zeitpunkt die Stellflächentemperatur erreichen. Somit ist in der Erkennung des Endpunktes kein Unterschied festzustellen.

Jedoch ist mit den punktförmigen Temperaturfühlern die Trocknungstemperatur genau zu ermitteln, was aber eine gewissenhafte Positionierung im Vial erfordert. Ähnlich verhält es sich mit den kleinen Temperaturfühlern. Sie erfordern ebenfalls eine genaue Positionierung, sind aber in ihrer mechanischen Belastbarkeit stabiler und können die Trocknungstemperatur ähnlich genau messen.

In Abbildung III-26 ist ein Foto eines ideal positionierten Temperaturfühlers im Vial abgebildet. Der Messkopf sollte sich in der Mitte des Vials knapp über dem Boden befinden. Eine Durchbohrung des Stopfens erleichtert eine zentrale Positionierung und stellt gleichzeitig sicher, dass der Stopfenwiderstand nicht verändert wird (siehe auch Kapitel I.2.4.1).



Abbildung III-26 Vial mit einem kleinen Temperaturfühler in idealer Messposition

Bei großen Temperaturfühlern ist das Messsignal aufgrund ihrer Fläche gegenüber unterschiedlicher Positionierung weitgehend unbeeinflusst. In Kombination mit der höheren mechanischen Stabilität gerade bei Anlagen, die durch CIP/SIP Verfahren gereinigt und sterilisiert werden, eignet sich dieses Modell besonders für den Produktionsbereich. Ein aufwendiges, manuelles Positionieren in der Trocknungskammer würde nur das Kontaminationsrisiko deutlich erhöhen.

Nachteil ist, dass nur zu Beginn der Primärtrocknung die Trocknungstemperatur gemessen wird. Mit voranschreitender Trocknung lässt sich nur noch der Verlauf des Trocknungsprozesses ablesen, was bei etablierten Gefriertrocknungsprozessen in der Produktion ausreichen sollte.

1.4. Anwendungsmöglichkeiten

Trotz der Einflüsse des Wägesystems auf den Trocknungsprozess, sind die Messdaten direkt miteinander vergleichbar. Wichtig ist jedoch, auf den gleichen Versuchsaufbau zu achten.

Durch die direkte Messung der Sublimationsgeschwindigkeit, ist die Waage in Aussagekraft bezüglich der Primärtrocknungsgeschwindigkeit anderen Online Messsystemen überlegen. Im folgenden Abschnitt sind Beispiele unterschiedlicher Anwendungsmöglichkeiten aus einer vorangegangenen Arbeit aufgegriffen und angepasst worden, die das Potential des Wägesystems in der Formulierungsentwicklung und bei Prozessänderungen zeigen.¹⁰⁹

1.4.1. Vergleich von Trocknungsprozessen und Gerüstbildnern

Veränderungen der Formulierung wirken sich deutlich auf den Verlauf der Trocknung aus. In Abbildung III-27 ist der Sublimationsverlauf in Abhängigkeit von verschiedenen Gerüstbildnern bei gleichem Gefriertrocknungsprogramm aufgetragen. Am Verlauf der Kurven sind die Unterschiede der verschiedenen Gerüstbildner deutlich zu sehen. Das auf eine Saccharoseformulierung optimierte Programm zeigt bei dem der Saccharose ähnlichem Zucker Maltose einen ähnlichen Sublimationsverlauf. Das Messsignal von Mannitol hingegen weicht deutlich ab. Auch die Auswirkungen einer Mischung von Gerüstbildnern auf den Verlauf der Sublimationsgeschwindigkeit können durch das Wägesystem dargestellt werden.

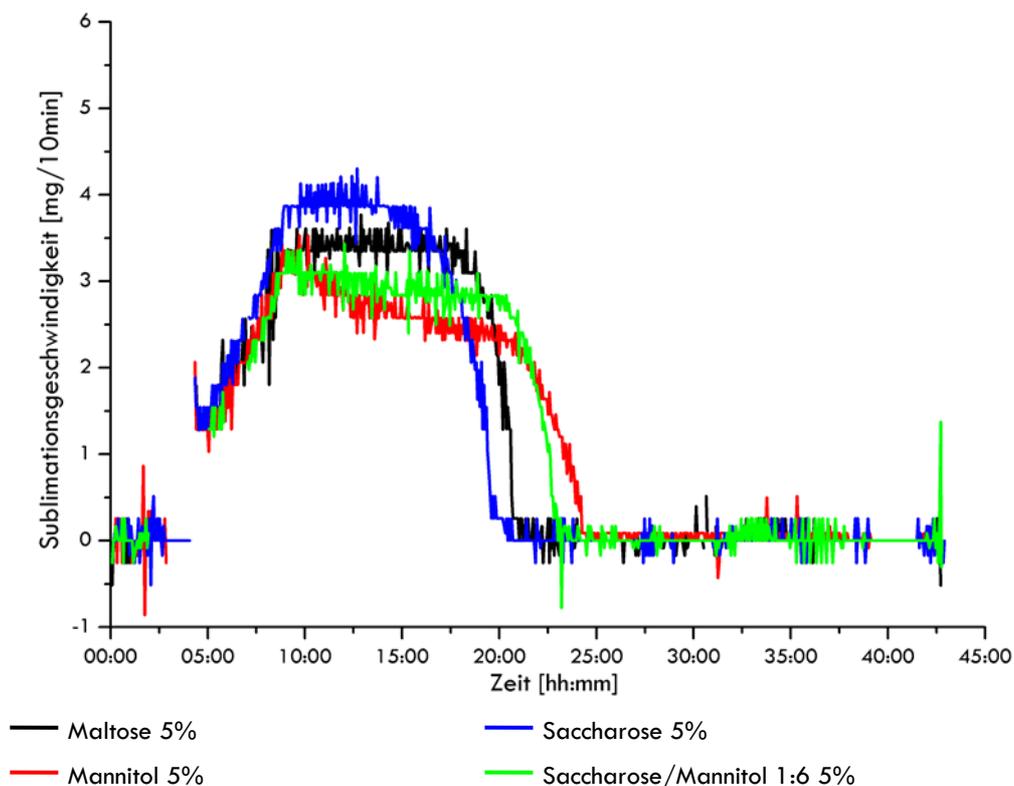


Abbildung III-27 Sublimationsverlauf in Abhängigkeit von verschiedenen Gerüstbildnern und einer Mischung aus Gerüstbildnern bei gleichem Gefriertrocknungsprogramm

Im zweiten Beispiel wurden 3ml einer 5%igen Saccharoselösung bei unterschiedlichen Primärtrocknungsbedingungen getrocknet.

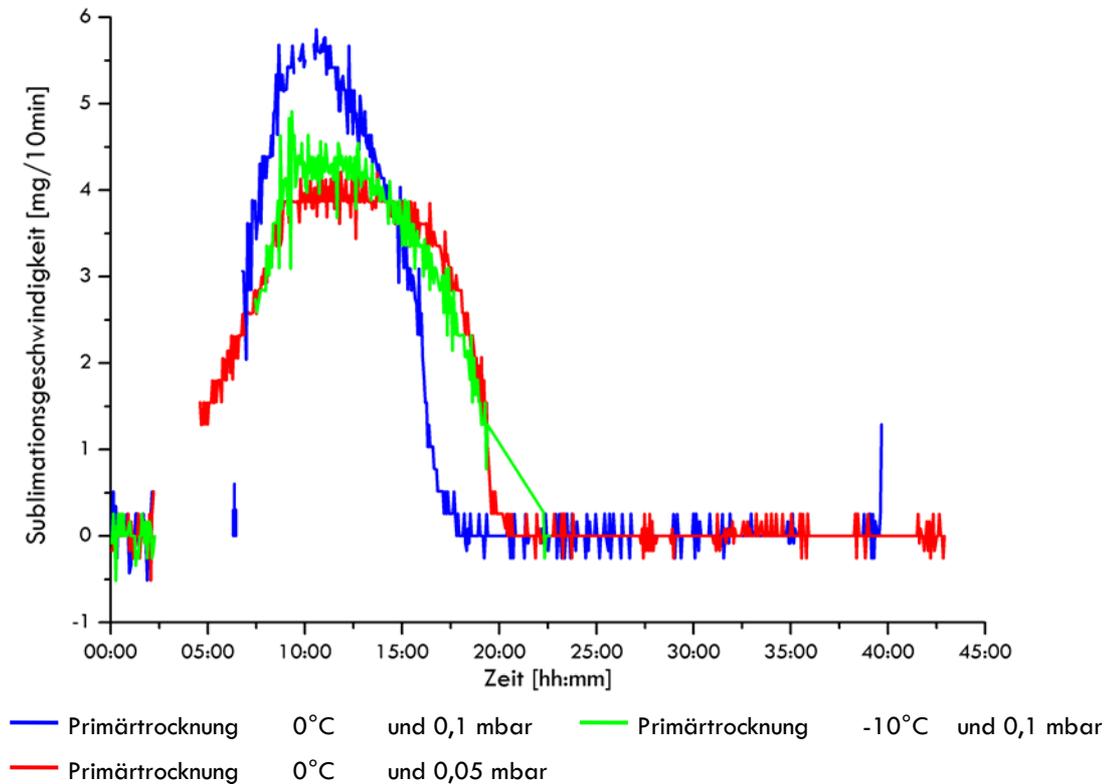


Abbildung III-28 Sublimationsverlauf einer 5%igen Saccharoselösung bei unterschiedlichen Primärtrocknungsbedingungen

Die Messdaten in Abbildung III-28 zeigen ebenfalls das Potential des Wägesystems zwischen verschiedenen Primärtrocknungsbedingungen zu unterscheiden.

Während bei Primärtrocknungstemperaturen von 0°C und einem Druck von 0,1 mbar die Messkurve einem steilen peakförmigen Verlauf folgt, ergibt sich durch Reduktion der Trocknungsenergie, mit einer Stellflächentemperatur von -10°C, eine geringere Sublimationsgeschwindigkeit und damit ein deutlich breiteres Messsignal.

Bei Gefriertrocknung mit den Primärtrocknungsparametern von 0°C und 0,05mbar zeichnet das Wägesystem im Vergleich zur Stellflächentemperatur von -10°C einen ähnlichen Sublimationsverlauf auf. Im direkten Vergleich der Messkurven ist der Unterschied zwischen dem breiten Messpeak (T=-10°C; p=0,1mbar) und einem durch den Trocknungsdruck (T=0°C; p=0,05mbar) kontrollierten Sublimationsgeschwindigkeitsplateau zu erkennen. Durch den Primärtrocknungsdruck wird die Produkttemperatur und damit die Sublimationsgeschwindigkeit festgelegt (siehe Kapitel I.2.4).

1.4.2. Untersuchung alternativer Packmittel

Neben den marktüblichen Glaspackmitteln werden auch Primärpackmittel aus anderen Werkstoffen für Lyophilisate angeboten. Die Firma Schott wirbt für TopPac-Vials, aus dem Kunststoff Topas, einem Cyclo-Olefin Polymer, als Alternative zu Glas. Topas zeichnet sich durch eine deutlich bessere Sperrwirkung für Wasserdampf im Vergleich zu anderen Kunststoffen, hoher Transparenz, guter Hitzebeständigkeit und hoher Bruchfestigkeit aus.

Gerade die hohe Bruchfestigkeit ist besonders bei bedenklichen Substanzen, wie z.B. Zytostatika von großer Bedeutung.

Zur Beurteilung einer Eignung von TopPac-Vials als Alternative zu Glas-Vials für die Gefriertrocknung wurden folgende Punkte untersucht:

- Einfluss auf die Sublimationsgeschwindigkeit von Eis
- Restfeuchte / Wasserdampfdurchlässigkeit bei Lagerung
- Bruchstabilität bei kritischen Formulierungen

1.4.2.1. Versuchsaufbau

A Sublimationsgeschwindigkeit von Eis

Um Veränderungen im Trocknungsverhalten durch das Primärpackmittel zu erkennen, wurden zwei Trocknungsläufe, einmal mit einem Glasvial, das andere mal mit einem TopPac-Vial im Wägesystem durchgeführt. Das TopPac-Vial und das Glas-Vial enthielten je 3 ml einer 5%igen Saccharoselösung.

Zur Verdeutlichung von Veränderungen in der Sublimationsgeschwindigkeit wurde die erste Ableitung aus den Daten des Wägesystems errechnet und verglichen.

B Restfeuchte / Wasserdampfdurchlässigkeit

Um Differenzen in der Restfeuchte von Lyophilisaten in TopPac-Vials und in Glas-Vials direkt sehen zu können, bzw. die Rückbefeuchtung durch die Gefäßwand zu beurteilen, wurde ein Trocknungslauf mit je 90 Vials durchgeführt. Die Vials wurden zufällig auf dem Tablett verteilt und getrocknet.

Als Gerüstbildner wurde der Zucker Saccharose gewählt, um ein möglichst hygroskopisches Lyophilisat zu erhalten. Die Vials wurden dazu mit je 3 ml einer 5%igen Saccharoselösung befüllt.

Es wurde von jedem Vialtyp der Restfeuchtegehalt mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration vor der Einlagerung als Nullwert untersucht (n=20).

Die restlichen Vials wurden zur Untersuchung der Wasserdampfdurchlässigkeit bei 40 °C und 75 % rel. Luftfeuchtigkeit für den Zeitraum von sechs Monaten eingelagert.

In einem monatlichen Rhythmus sollten die Vials auf Zunahme der Restfeuchte untersucht werden.

C Stabilität / Bruch während des Gefriertrocknungsprozesses

Bei höher konzentrierten Mannitollösungen wird während der Lyophilisation häufig Glasbruch beschrieben^{133,134}. Durch die in der Primärtrocknung stattfindende Umwandlung der Modifikation des Mannitols kommt es zu einer Expansion, die zum Glasbruch führen kann. Mit folgendem Versuch wurde die Stabilität von TopPac-Vials unter diesen Bedingungen getestet.

Die TopPac-Vials bzw. die Glas-Vials enthielten je 5ml einer 10%igen Mannitollösung.

Es wurden je 50 Vials gefüllt, zufällig auf einem Tablett verteilt und in der Lyophilisationsanlage getrocknet.

Die Anzahl der zerbrochenen Vials wurde anschließend gezählt.

1.4.2.2. Ergebnisse und Diskussion

A Sublimationsgeschwindigkeit von Eis

Die mit Hilfe des Wägesystems erhaltenen Ergebnisse zeigen in Abhängigkeit vom eingesetzten Packmittel einen deutlichen Unterschied im Trocknungsverlauf und damit auch in der Trocknungsgeschwindigkeit.

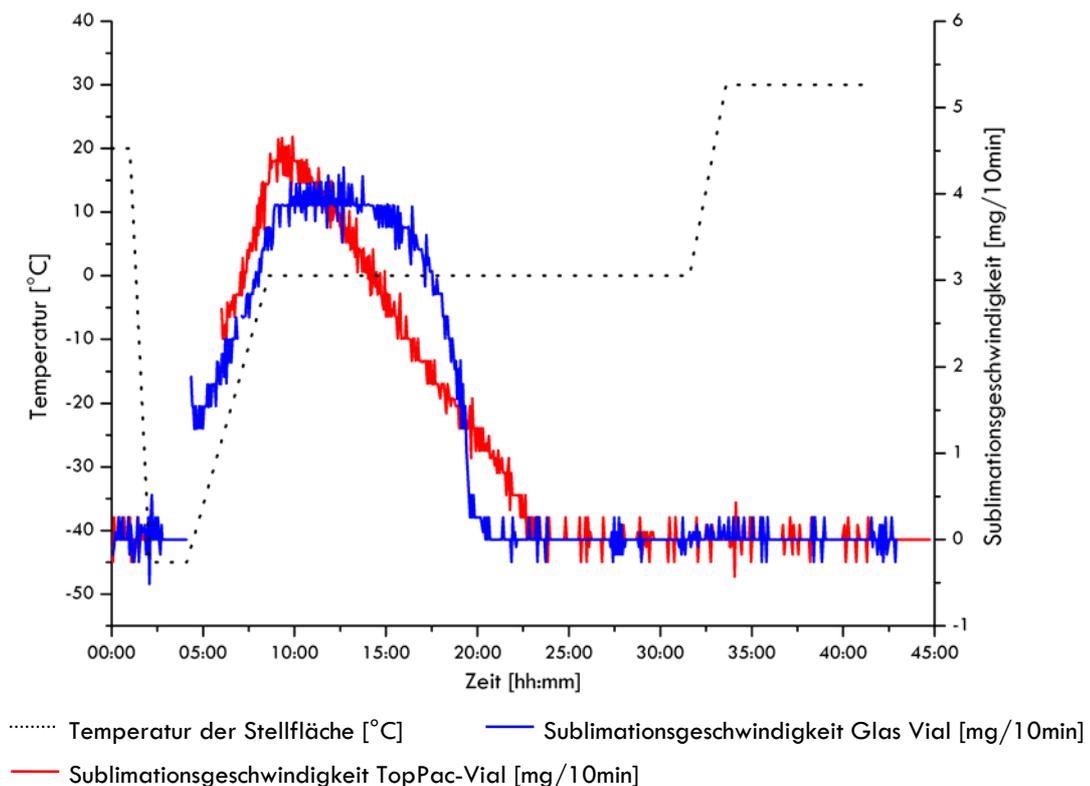


Abbildung III-29 Sublimationsgeschwindigkeit einer 5%igen Saccharoselösung in Abhängigkeit des Primärpackmittels

Bei den gewählten Versuchsbedingungen führte die Verwendung der TopPac-Vials zu einer Verlängerung der Trocknung um ca. 2h.

Diese Veränderung lässt sich gut durch den deutlich kleineren Wärmeleitfähigkeitskoeffizienten und damit durch die schlechtere Wärmeübertragung des Kunststoffes Topas erklären.

$$\text{Topas: } \lambda = 0,16 \frac{W}{m \times K} \qquad \text{(Fenster-)Glas: } \lambda = 1,16 \frac{W}{m \times K}$$

B Restfeuchte / Wasserdampfdurchlässigkeit

Die Restfeuchtebestimmung von Lyophilisaten in Glas- bzw. TopPac-Vials zeigte ebenfalls einen Unterschied auf. Die Differenz der Primärtrocknungszeiten sollte durch die Wahl eines großzügigen Gefriertrocknungsprogrammes keinen Einfluss auf die Restfeuchten haben. Wie sich nach der Analyse des ersten Probenzuges herausstellte, war der Zeitraum von zwei Wochen zwischen der Herstellung und der Restfeuchtebestimmung bei Raumtemperatur und unregelmäßiger Luftfeuchtigkeit ausreichend, um zu diesem Anstieg der Restfeuchte zu führen.

	Glas-Vials	TopPac-Vials
Mittelwert	0,54%	0,90%
Standardabweichung	0,07	0,07

Tabelle III-1 Restfeuchte der Lyophilisate vor der Einlagerung (n=20)

Überraschend war der erste Probenzug. Sämtliche der eingelagerten TopPac-Vials zeigten einen total kollabierten Kuchen. Die Glas-Vials zeigten weder eine signifikante Zunahme des Wassergehalts noch eine sichtbare Veränderung des Kuchens, wie in Abbildung III-30 zu sehen ist.

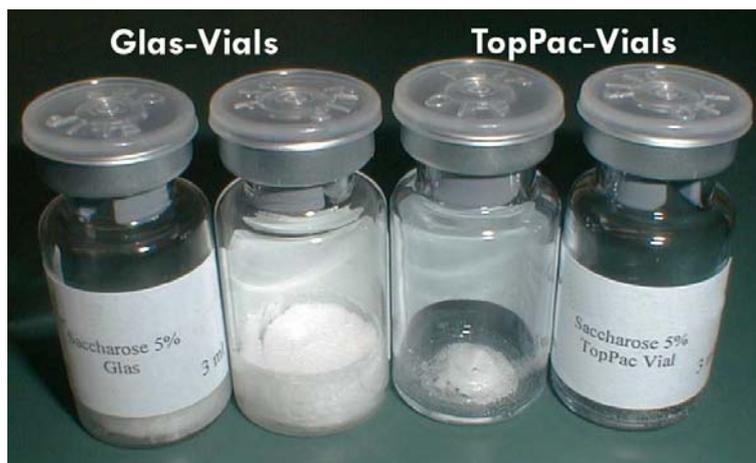


Abbildung III-30 Glas- und TopPac-Vial nach 1 Monat Lagerung bei 40°C/ 75% rel. Luftfeuchte

Gerade bei hohen Temperaturen sind amorphe Lyophilisate aus z.B. Saccharose gegenüber kleinsten Änderungen in ihrer Restfeuchte sehr empfindlich. Hauptursache ist die noch zu hohe Wasserdampfdurchlässigkeit des Kunststoffes bei diesen Bedingungen.

C Bruch von Vials während eines Lyophilisationsprozesses

Die Auswertung dieses Versuches bestätigte eindeutig die erhöhte Bruchfestigkeit der TopPac-Vials. Von 50 Glas-Vials wurden 22 Stück zerstört. Bei den meisten Vials wurde der Boden abgesprengt, oder es konnten Risse in der Gefäßwand beobachtet werden. Die TopPac-Vials blieben alle unbeschädigt.

In Abbildung III-31 ist die Verteilung der Vials auf der Stellfläche zu sehen.

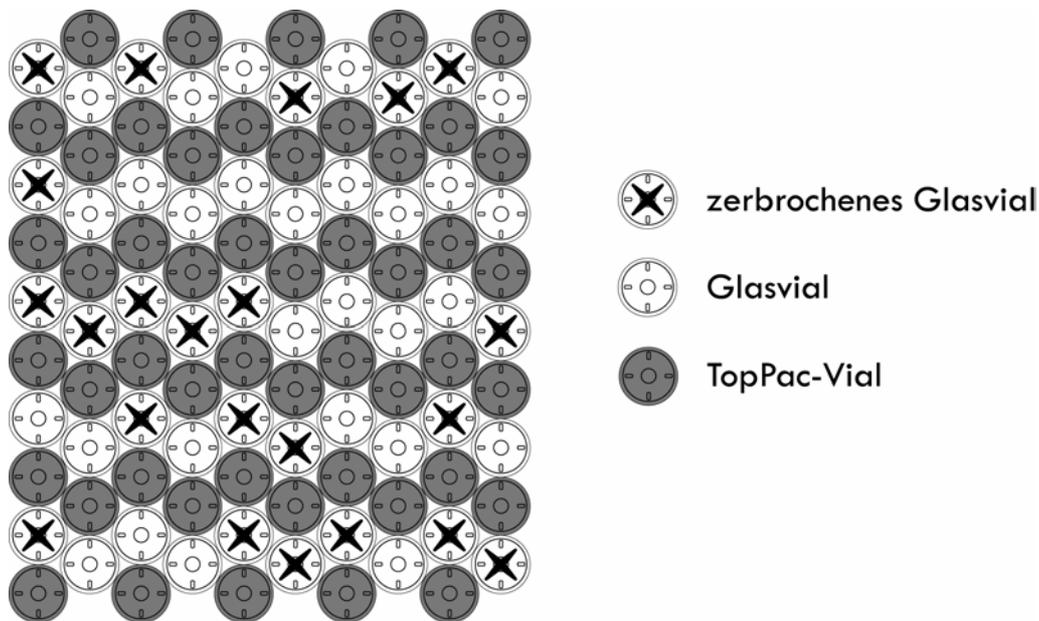


Abbildung III-31 Verteilung der Vials auf der Stellfläche

1.4.2.3. Beurteilung der TopPac-Vials

Mit dem TopPac-Vial ist eine Alternative zu den Glasvials auf dem Markt, das viel versprechende Eigenschaften bietet. Neben der hohen Bruchfestigkeit und die damit bedingte Vermeidung von Verletzungen an Scherben, bietet der Kunststoff einen Gewichtsvorteil und die notwendige Transparenz für die Sichtkontrollen auf Partikelfreiheit bei Parenteralia.

Obwohl neben diesen Gründen auch die Trocknungszeiten der TopPac-Vials durch die schlechtere Wärmeübertragung nicht wesentlich verlangsamt wurden, sind die Vials für Lyophilisate ungeeignet. Die Wasserdampfsperrewirkung des Kunststoffes ist nicht ausreichend, um das Eindringen kleinster Wasserdampfmenen zu verhindern. Dadurch erhöht sich die Restfeuchte des Lyophilisates, was zur Reduktion der Glasübergangstemperatur führt. Insbesondere wenn die Glasübergangstemperatur unter die Lagertemperatur fällt, kann die Qualität des Produktes stark beeinträchtigt werden.

Je nach Lagerbedingungen und Empfindlichkeit der Formulierung gegenüber Veränderungen der Restfeuchte kann sich dadurch die Lagerstabilität deutlich reduzieren.

1.5. Beurteilung des Wägesystems

Mit der direkten Messung der Sublimationsgeschwindigkeit über den Massenverlust des Eises ist das Wägesystem eine sehr interessante Messmethode, die wertvolle Informationen über den Verlauf der Primärtrocknung zur Beurteilung von Gefriertrocknungsprozessen liefert. Abgesehen von den Ausfallserscheinungen bei tiefen Temperaturen ($<-40^{\circ}\text{C}$) bestätigen die Experimente ein robustes und reproduzierbares Messsignal des Wägesystems, analog der Arbeit von Roth et al.¹⁰⁹

Durch das Wägesystem wird der Gefriertrocknungsprozess aufgrund von zusätzlichem Energieeintrag beeinflusst. Aus diesem Grund ist eine alleinige Steuerung einer Gefriertrocknungsanlage anhand der Daten des Wägesystems nicht empfehlenswert. Neben dem Problem der Sterilisierbarkeit ist das Wägesystem deshalb auch zur Überwachung von Produktionsprozessen nicht geeignet.

Die Nutzung des Messprinzips der Wägung zur Steuerung auch von aseptischen Prozessen ist weiterhin von großem Interesse. In Fachkreisen wird daher die Wägung kompletter Stellflächen in speziell konstruierten Gefriertrocknungsanlagen diskutiert.

Anders verhält es sich im Bereich der Entwicklung.^{97,110} Da im Bereich der Prozessentwicklung in der Regel aseptisches Arbeiten nicht erforderlich ist und über die Sublimationsrate Prozesse deutlich einfacher beurteilt und miteinander verglichen werden können, beschleunigt und vereinfacht das Wägesystem die Prozessentwicklung. Wichtig ist, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, immer auf einen gleichen Versuchsaufbau zu achten, da das Messsignal beladungsabhängig ist.

Gerade durch die Programmierung der automatischen Auswertung ist die Darstellung und Beurteilung der Messdaten deutlich schneller und einfacher geworden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Wägesystem ein Gewinn für die Prozessentwicklung ist. Durch Einbinden des durch das Wägesystem detektierten Endpunktes in die Steuerung der Gefriertrocknung wäre es somit möglich, die Primärtrocknungszeit unbekannter Prozesse automatisch zu optimieren.

2. Anwendung der Massenspektrometrie in der Gefriertrocknung

Der Einsatz der Massenspektrometrie in der Gefriertrocknung wurde erstmals von Jennings 1980 beschrieben.⁵⁵ Das System wurde zur Detektion von Vakuumpumpenöl und Lösemittelreste in der Trocknungskammer eingesetzt.

J.P.Connelly beschrieb 1993 erstmals die Verwendung des Massenspektrometers zur Überwachung der Primärtrocknung eines Gefriertrocknungsprozesses durch Messen des Wasserdampfanteiles in der Trocknungskammer.²⁴

Im Rahmen der Arbeit sollte dieses Konzept aufgegriffen, für die Primärtrocknung optimiert und möglichst auf die Sekundärtrocknung ausgeweitet werden. Der Vorteil dieser Messmethode liegt in einer Überwachung der Trocknung aller Vials in der Trocknungskammer ohne die Trocknung zu beeinflussen. Ziel war es, analog zum Wägesystem, Endpunktkriterien für die Primär- und Sekundärtrocknung festzulegen. Die Methode sollte auf ihre Eignung zur Optimierung des Gefriertrocknungsprozesses untersucht werden, um dann im nächsten Schritt die Massenspektrometrie als automatische Überwachungs- und Steuermethode für Gefriertrocknungsprozesse zu etablieren. Ebenso sollte untersucht werden, ob mit Hilfe eines zwischengeschalteten Sterilfilters ein Einsatz zur Überwachung von aseptischen Prozessen möglich war.

2.1. Versuchsaufbau des Massenspektrometers

Als Massenspektrometer wurde ein mobiles Tischgerät der Firma Leybold eingesetzt, das durch einen Standard-Vakuumflansch mit der Trocknungskammer verbunden werden kann. An der Ionisationskammer im Massenspektrometer ist ein in Reihe geschaltetes Pumpensystem aus einer Turbomolekularpumpe und einer Drehschieberpumpe angeschlossen, um das nötige Vakuum zur Messung bereitzustellen. Gleichzeitig wird über dieses Pumpensystem ein Druckgefälle zur Trocknungskammer aufrechterhalten, wodurch kontinuierlich die Atmosphärenzusammensetzung in der Kammer gemessen werden kann. Die Verbindung zwischen der Gefriertrocknungsanlage und dem Massenspektrometer erfolgt über einen auf 120°C beheizten Vakuumschlauch. Schematisch ist der Versuchsaufbau in Abbildung III-32 dargestellt.

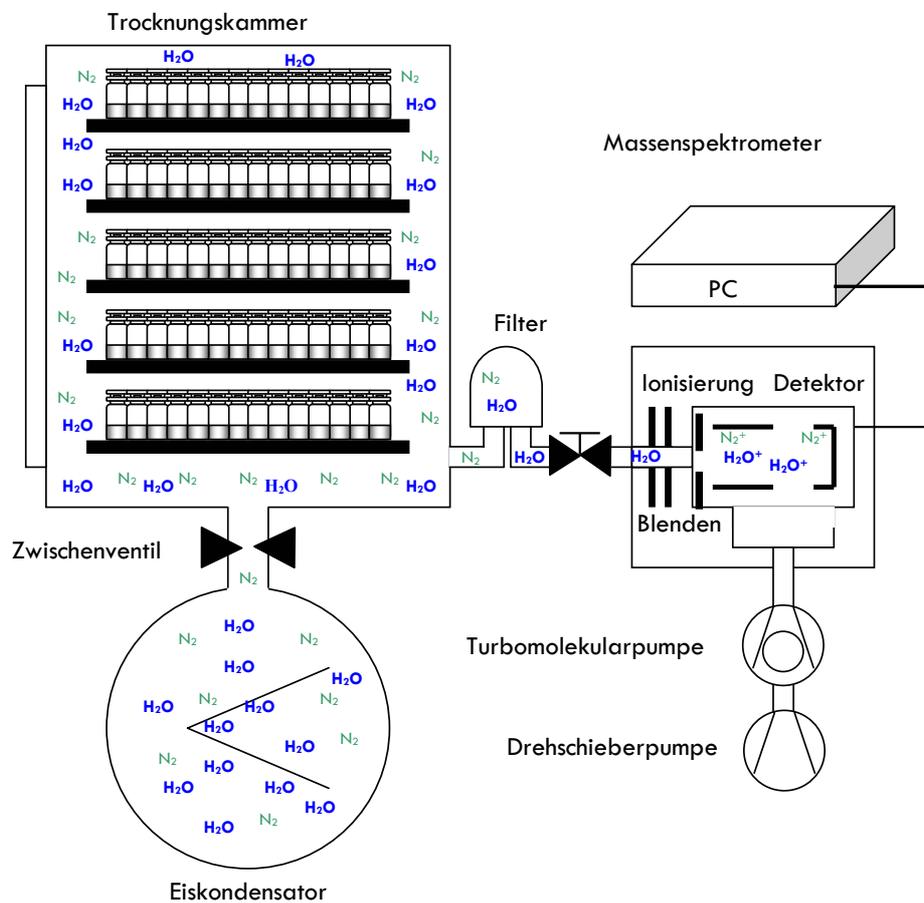


Abbildung III-32 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus einer Gefriertrocknungsanlage gekoppelt mit dem Massenspektrometer

Ein großer Vorteil dieses Tischgerätes liegt in seiner Mobilität und Anschlussmöglichkeit an die Gefriertrocknungsanlage über Standard-Flansche, wodurch der Betrieb flexibel an verschiedenen Gefriertrocknungsanlagen möglich ist.

Zur einfacheren Auswertung der Messdaten wurden das Massenspektrometer und die Gefriertrocknungsanlage zeitgleich gestartet. Der Gasstrom von der Trocknungskammer zum

Massenspektrometer wird zum Schutz vor Überlastung und zur Vermeidung von Einflüssen auf die Einfrierphase durch zwei Blenden geregelt. Mit Beginn der Primärtrocknung, wenn der Kammerdruck unterhalb eines Limits (1. Blende:10mbar/2. Blende:1mbar) liegt, werden die Blenden geöffnet und die Messung der Atmosphäre in der Trocknungskammer startet.

Eine Aufzeichnung der Massensignale von Wasserdampf und Stickstoff erfolgte in einem Zeitintervall von 30 Sekunden. Durch die Darstellung der Messdaten gegen die Zeit ergibt sich eine charakteristische Messkurve (Abbildung III-33).

2.2. Interpretation des Messsignals

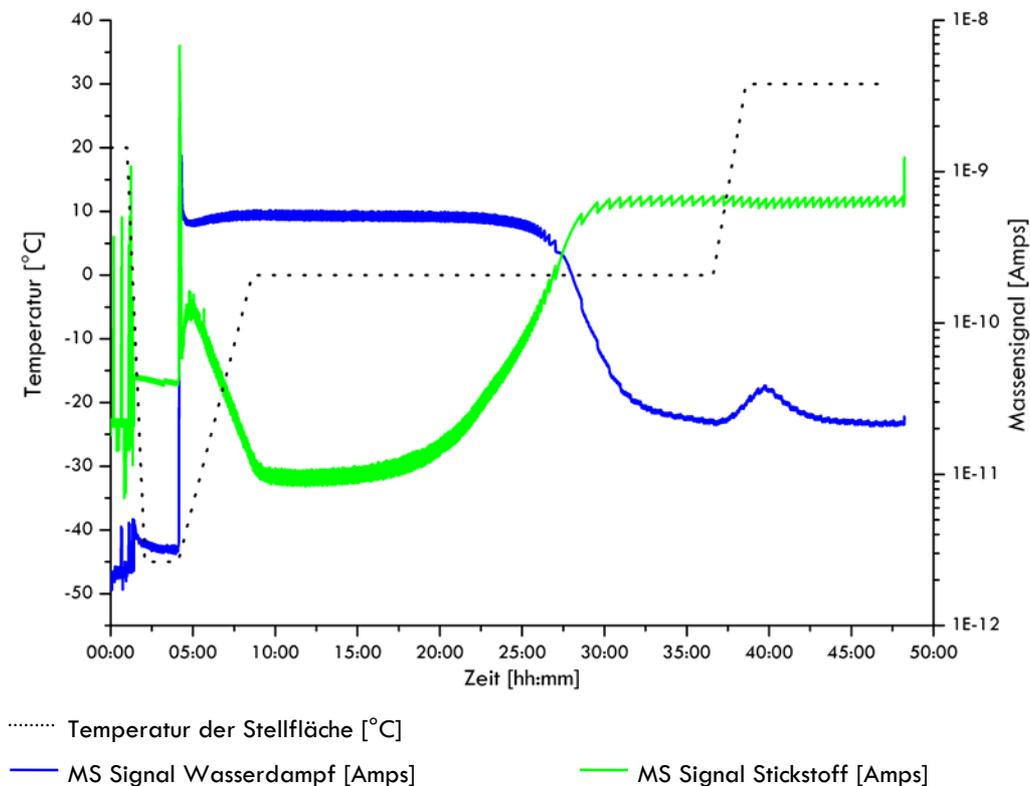


Abbildung III-33 Messsignal des Massenspektrometers gegen die Zeit

Der Beginn der Messung ist durch eine sehr steile Signalspitze des Massensignals bei Öffnung der Blenden am Anfang der Primärtrocknung gekennzeichnet.

Mit Erreichen der Primärtrocknungstemperatur verläuft das Massensignal des Wasserampfes auf hohem Niveau nahezu konstant, bis es zu einem starken Absinken des Messsignals kommt. Dieses markiert das Ende der Sublimation, da kein Wasserdampf mehr entsteht und der Anteil an Wasserdampf innerhalb der Trocknungskammer somit sehr rasch abnimmt. Die Steigung der Kurve kann als Maß für die Homogenität der Trocknung genutzt werden. Je steiler der Abfall der Kurve ist, desto exakter stimmt das Ende der Sublimation in allen Vials überein.

Danach geht die Messkurve in ein leicht abfallendes Plateau über. In dieser Phase entsteht sehr wenig Wasserdampf, da die Sublimation abgeschlossen und für hinreichende

Wasserdampfmengen, die durch Desorption entstehen könnten, die zugeführte Energie zu gering ist.

Mit dem Anheben der Temperatur, zu Beginn der Nachrocknung, ist wieder ein deutlicher Anstieg im Wasserdampfsignal zu sehen. Das Messsignal ist in diesem Bereich deutlich geringer, da nur noch geringe Wassermengen entfernt werden. Nach der Sublimationsphase sind je nach Formulierung noch Restfeuchten von 6% bis 12% bezogen auf die Produktmasse zu finden, die dann in der Sekundärtrocknung auf 1% bis 2% reduziert werden. Das Ende der Desorption ist wieder durch das Erreichen eines Plateaus gekennzeichnet.

Zur einfacheren Auswertung und besseren Vergleichbarkeit wurden die aufgezeichneten Daten umgerechnet. Da die Gase Wasserdampf und Stickstoff den Hauptanteil der Atmosphäre in der Trocknungskammer repräsentieren, erfolgte die Umrechnung der Messdaten nach Gleichung III-4.

$$MS(H_2O)_\% = \frac{MS(H_2O)}{MS(H_2O) + MS(N_2)} \cdot 100$$

Gleichung III-4 Umrechnung des Massensignals des Wasserdampfes ($MS(H_2O)$) auf den Anteil an der Atmosphäre in der Trocknungskammer in Prozent.

Gefriertrocknungsprozesse werden mit einem kontrollierten Druck gefahren. Damit entspricht die Summe der Partialdrücke aus Wasserdampf und Stickstoff immer dem Kammerdruck. Gegen Ende der Primärtrocknung werden die Schaltintervalle der Vakuumpumpe, erkennbar an den Zacken der Druckmesskurve in Abbildung III-36, deutlich kürzer und der Druck kann über die Leckrate oder durch kontrollierte Stickstoffinjektion konstant gehalten werden.

Somit ergibt sich ein spiegelbildlicher Verlauf zwischen Wasserdampf- und Stickstoffsignal des Massenspektrometers.

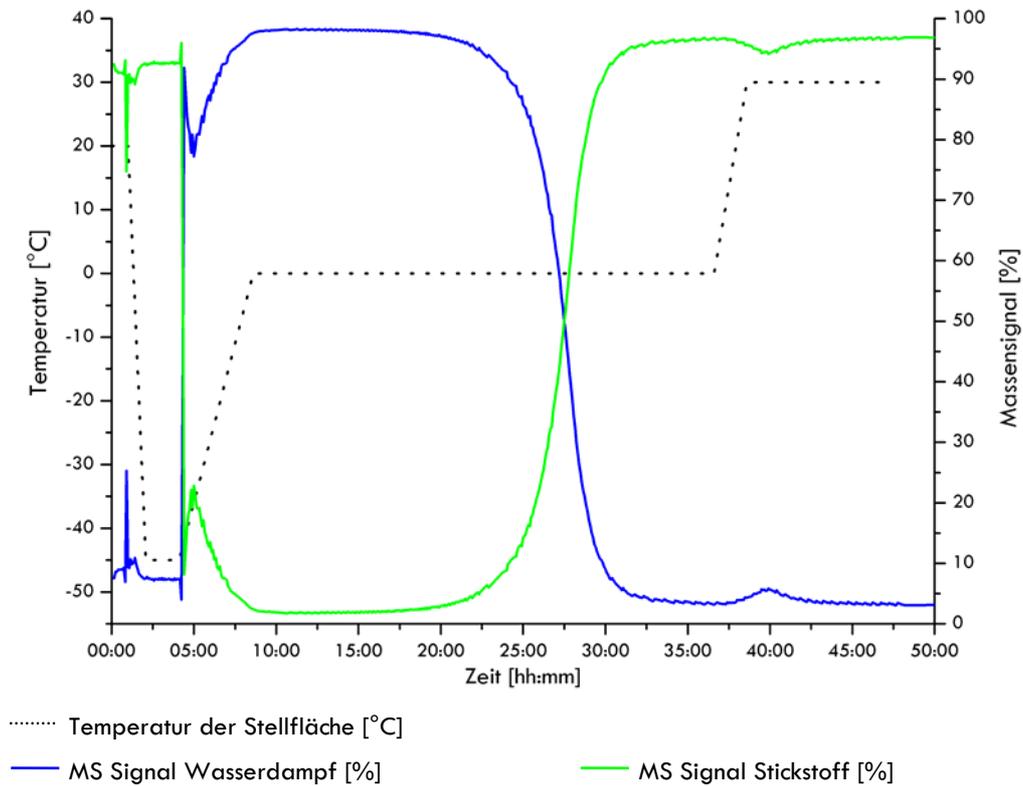


Abbildung III-34 Messsignal des Massenspektrometers in Prozent bezogen auf die Gesamtmenge (Wasserdampf + Stickstoff) gegen die Zeit

Die Darstellung der Daten nach der Umrechnung ist in Abbildung III-34 zu sehen. Im Vergleich zur logarithmischen Darstellung in Abbildung III-33 ist hier, durch die absolute Darstellung der Daten, der Unterschied in der Intensität des Wassersignals zwischen Primär- und Sekundärtrocknung deutlicher zu sehen und besser auszuwerten.

2.3. Auswertung des Messsignals

Zur Überprüfung der Aussagekraft und Genauigkeit des Massenspektrometers wurden verschiedene Versuche durchgeführt, primär Untersuchungen zur Aussagekraft des Wasserdampfsignals bezüglich des Endes der Primär- und Sekundärtrocknung. Im nächsten Schritt sollte dann die Robustheit des Messsignals analysiert werden.

Die Korrelation der Trocknungsendpunkte mit den Charakteristika in den Messkurven des Massenspektrometers wurde durch zwei Versuchsreihen überprüft.

Zu Beginn stand der direkte Vergleich mit bekannten Messmethoden (Temperaturfühler, Drucksensoren). Temperatursensoren und Komparative Druckmessung wurden für diesen Vergleich ausgewählt, um grundverschiedene Messprinzipien zu berücksichtigen. Die Komparative Druckmessung erfasst dieselbe Messgröße wie das Massenspektrometer, nämlich die Zusammensetzung der Atmosphäre in der Trocknungskammer, wohingegen der Temperaturfühler die Temperatur in einem Vial detektiert.

Zur Kontrolle dieser Ergebnisse und zur Überprüfung der Sekundärtrocknung wurde der Gefriertrocknungsprozess durch Verschließen einzelner Stellflächen gezielt unterbrochen. Die Proben wurden anschließend auf ihre Restfeuchte hin analysiert und diese Daten in Korrelation zu den Messsignalen gesetzt.

2.3.1. Endpunkt: Primärtrocknung

Zum Vergleich der Temperatur- und Druckdaten mit dem Massenspektrometersignal wurden alle Stellflächen mit je 60 Vials (Saccharoselösung 5%, 3ml) in identischer Anordnung beladen. Die Temperaturfühler wurden in Vials in der Mitte der Stellfläche positioniert.

In Abbildung III-35 und Abbildung III-36 sind die Messsignale des Massenspektrometers im Vergleich zu den gemessenen Temperaturverläufen und der Komparativen Druckmessung dargestellt. Nach ca. 30 Stunden Gefriertrocknungszeit ist mit Hilfe der Standardmessmethoden ein Ende der Sublimation zu detektieren. Dieser Zeitpunkt zeigt gute Übereinstimmung mit dem Beginn des ersten Plateaus des Massensignals.

Diese Übereinstimmungen bei der Endpunktdetektion der Primärtrocknung zwischen den Standardmessmethoden und dem Massensignal beweisen eindeutig die Eignung des Massenspektrometers. Durch das Erreichen des ersten Plateaus nach dem steilen Absinken der Messkurve ist mit diesem Knick ein deutliches Signal vorhanden, mit dessen Hilfe das Ende der Primärtrocknung über die Berechnung der maximalen Änderung in der Kurvesteigung, dem Maximum der 1. Ableitung bestimmt werden kann. Die Verifizierung des Endpunktes durch Bestimmung der Restfeuchten wird im Kapitel III.2.3.3 beschrieben.

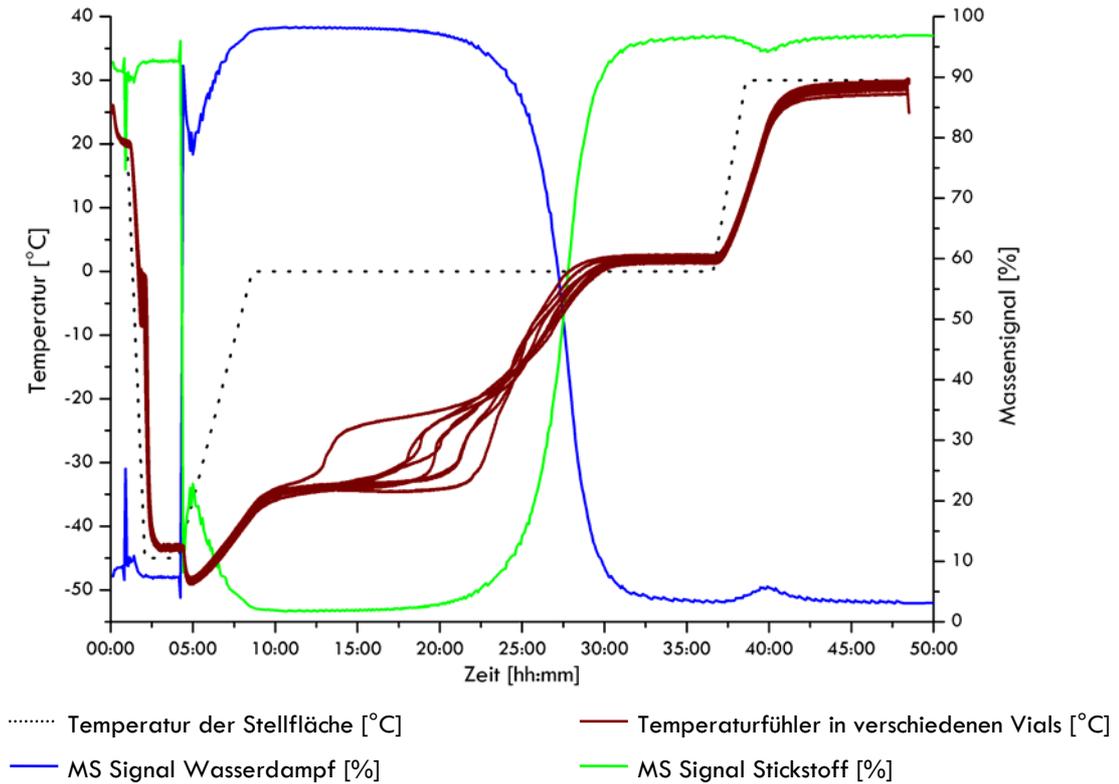


Abbildung III-35 Messsignal des Massenspektrometers in Prozent im Vergleich zum Temperatur- Zeitverlauf von Temperaturfühlern in Vials in der Mitte der Stellflächen. (Saccharose 5%, 3ml , 10R Vial)

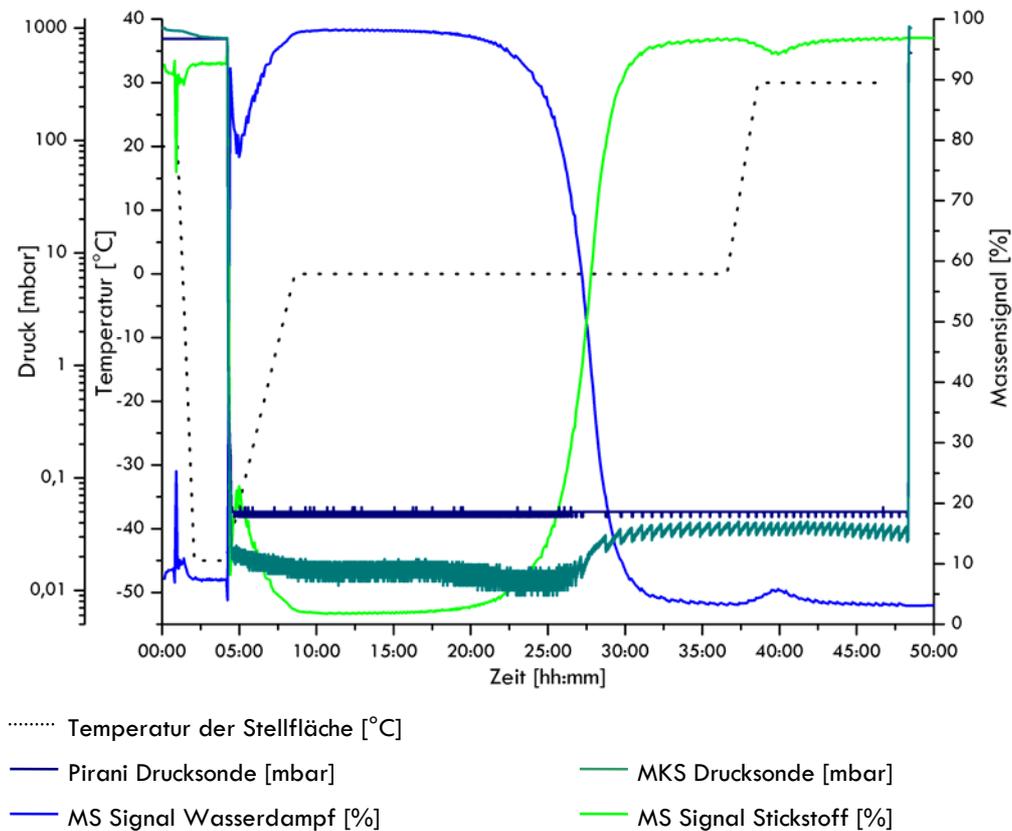


Abbildung III-36 Messsignal des Massenspektrometers in Prozent im Vergleich zur Komparativen Druckmessung. (Saccharose 5%, 3ml , 10R Vial)

2.3.2. Endpunkt: Sekundärtrocknung

Wie Abbildung III-35 und Abbildung III-36 zeigten, kann durch die Standardmessmethoden das Ende der Sekundärtrocknung nicht detektiert werden. Darum wurde zur Überprüfung des Messsignals der Sekundärtrocknung ein Versuch mit reinem Wasser durchgeführt. Ziel war es, das Messsignal des Sublimationsverhaltens ohne Überlagerungen durch Desorptionsvorgänge aufzuzeichnen und damit im Umkehrschluss zu beweisen, dass der Peak zu Beginn der Sekundärtrocknung durch desorbierendes Wasser verursacht wird. In Abbildung III-37 ist dieser Versuch grafisch dargestellt.

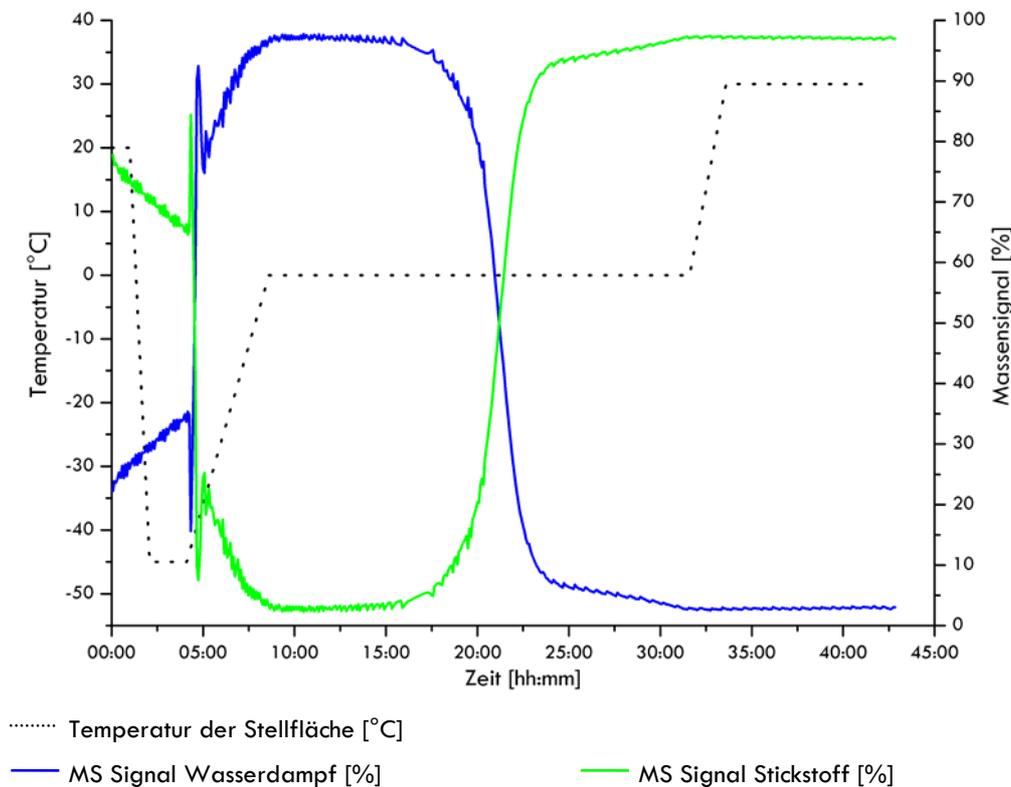


Abbildung III-37 Messsignal des Massenspektrometers in Prozent. (Wasser, 3ml , 10R Vial)

Der Verlauf der Messkurven entspricht weitgehend den Erwartungen. Mit dem Ende der Sublimation fällt auch hier die Kurve steil ab. Der Messwert erreicht nach einer deutlichen Änderung der Steigung langsam ein konstant niedriges Niveau bis zum Ende der Gefriertrocknung.

Dieser Knick in der abfallenden Kurve und das damit verzögerte Erreichen des Plateaus sollte theoretisch nicht vorhanden sein. Da es sich nur um sehr geringe Wassermengen handelt, lässt sich diese Zweiteilung vermutlich durch adsorptiv gebundenes Wasser an der Glaswand der Vials erklären. Gegen Ende der Sublimation erwärmen sich die Glasvials auf Stellflächentemperatur und begünstigen dadurch die Desorption des Wassers von der polaren Oberfläche (siehe auch Kapitel III.1.3.2).

Somit lässt sich mit der Online-Messmethode des Massenspektrometers auch für das Ende der Sekundärtrocknung ein charakteristischer Punkt in der Messkurve, das Erreichen des zweiten Plateaus, definieren.

Wie bereits gezeigt, ist dies mit den Standardmessmethoden nicht möglich.

2.3.3. Korrelation zwischen Massensignal und Restfeuchte

Zur Überprüfung der Korrelation zwischen der tatsächlichen Restfeuchte im Vial und dem Massensignal, sowie der Änderung der Restfeuchte innerhalb des Plateaus in der Sekundärtrocknung, wurde zu bestimmten Zeitpunkten Proben gezogen und mit Karl-Fischer-Titration auf ihre Restfeuchte hin untersucht. Alle Proben wurden mit demselben Gefriertrocknungsprogramm, aber in mehreren Läufen hergestellt. Die Daten wurden gesammelt und grafisch in Abbildung III-38 dargestellt.

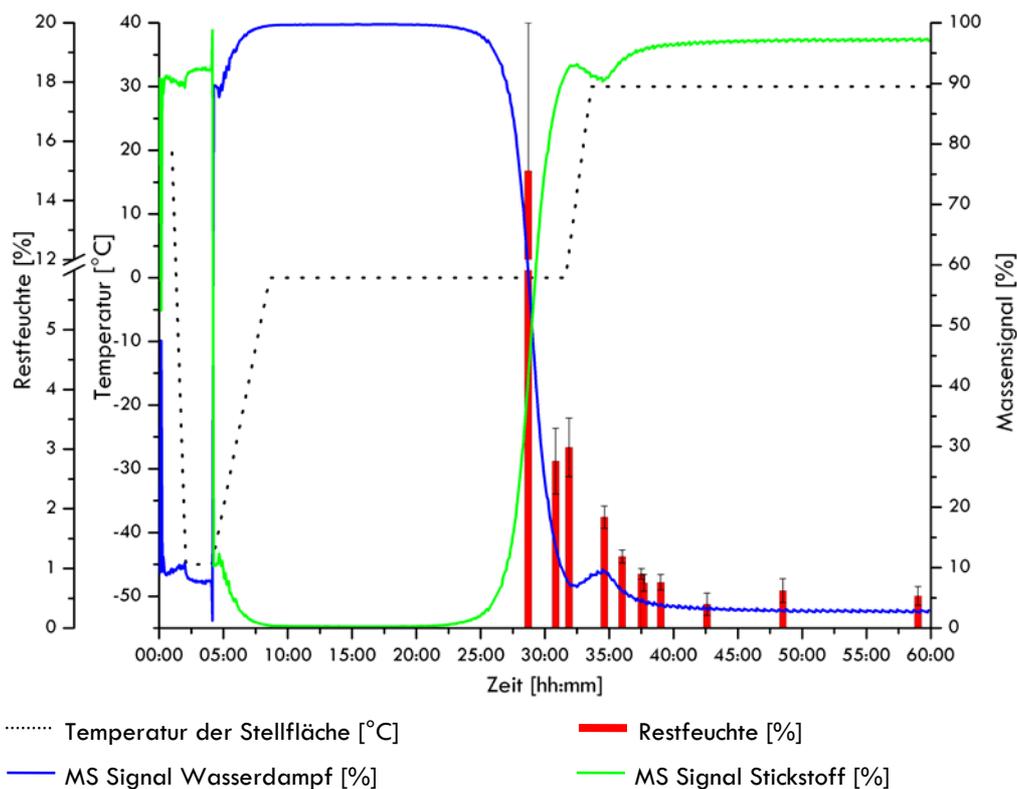


Abbildung III-38 Messsignal des Massenspektrometers in Prozent im Vergleich zu den Restfeuchtedaten der gezogenen Proben. (Saccharose 5%, 3ml , 10R Vial)

Alle Proben, die um den ersten dargestellten Analysezeitpunkt gezogen wurden, zeigten je nach Position auf der Stellfläche einen sehr unterschiedlichen Trocknungszustand. Der Zustand reichte von kollabierten Kuchen mit Restfeuchten über fünfzehn Prozent in der Mitte der Stellflächen bis hin zu geringen Restfeuchten unter vier Prozent in Eckpositionen an der Türseite. Gerade wenn gegen Ende der Sublimation die Vials verschlossen werden, können in den Vials teilweise noch sehr kleine Eiskerne vorhanden sein, die dann im Vergleich zur Wassermenge,

die durch Absorption gebunden ist, relativ groß ist. Dadurch kann die Streuung der Restfeuchtedaten gerade in diesem Bereich, trotz eines identischen Trocknungsverlaufes, sehr groß sein. Für die weitere Auswertung wurden nur Proben aus der Mitte der Stellfläche gezogen, um die langsamste Trocknung und damit relevante Werte zu erhalten. Diese Restfeuchtedaten in Kombination mit dem Vergleich mit anderen Messmethoden bestätigen die in der Theorie vermutete Korrelation zwischen den charakteristischen Punkten im Messsignal des Massenspektrometers und dem Verlauf der Trocknung in den Vials. Jeweils mit dem Erreichen eines Plateaus ist die Primär- bzw. die Sekundärtrocknung beendet.

2.3.4. Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden vier identische Gefriertrocknungsläufe durchgeführt (Abbildung III-39).

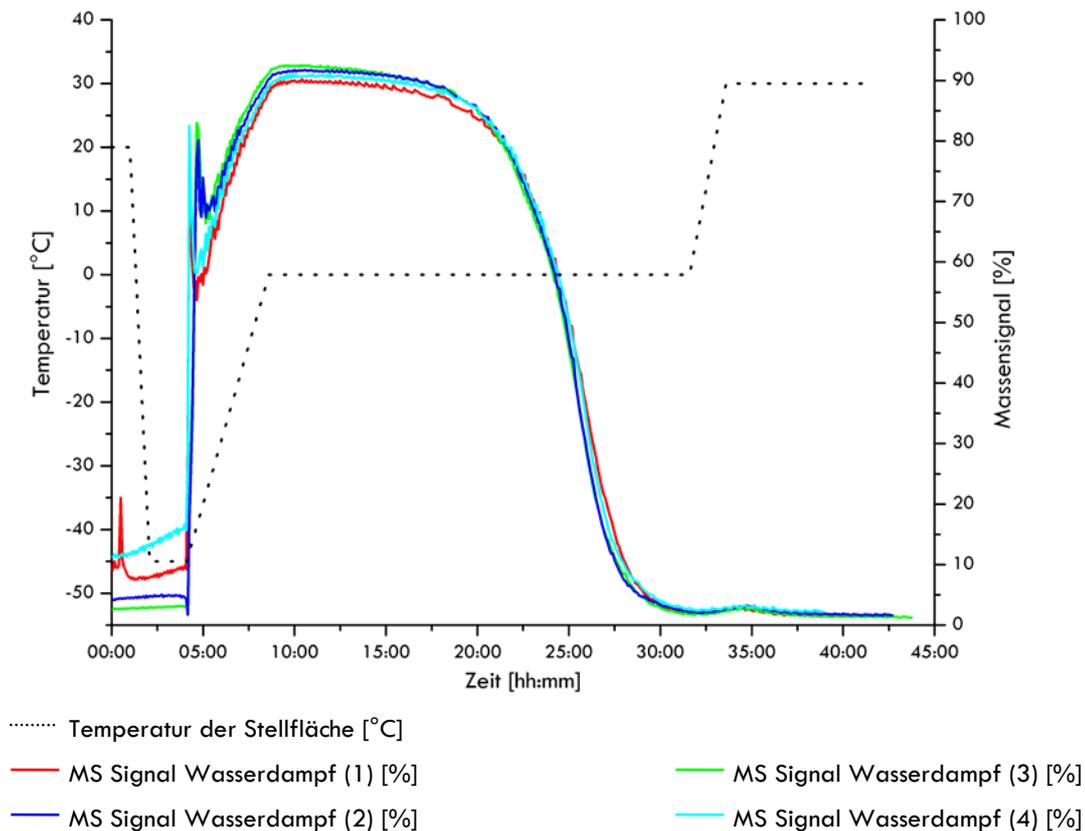


Abbildung III-39 Die Messsignale des Massenspektrometers in Prozent von vier identischen Gefriertrocknungsläufen. (Saccharose 5%, 3ml, 10R Vial)

Da das Massenspektrometer über eine sehr hohe Empfindlichkeit verfügt, sind konstante Messbedingungen von großer Bedeutung. Durch die mit Heizmänteln versehenen Vakuumschläuche von der Trocknungskammer zum Massenspektrometer und die ebenfalls mit einem Heizmantel umhüllte Detektionskammer wurde möglicherweise enthaltenes, adsorptiv gebundenes Wasser bei 120°C vor der Messung entfernt. Diese hohe Temperatur wird auch

während der Messung beibehalten, um eine Kondensation auf dem Weg zum Detektor unter allen Umständen zu verhindern.

Das Massenspektrometer wurde als ausgeheizt definiert, wenn das Massensignal des Wasserdampfes nicht weiter absinkt und in Rauschen übergeht.

Die Untersuchung der Ausheizzeiten ergab einen Richtwert von 12 bis 24 Stunden, je nach vorangegangener Ruhezeit des Massenspektrometers. Bei einer Betriebspause von mehr als einem Monat war eine Ausheizdauer von 24 Stunden notwendig, um das übliche Grundrauschen zu erreichen.

2.3.5. Einfluss der Beladung

Die in Kapitel III.1.3 bereits gezeigte Verzögerung der Trocknung aufgrund der Beladung ist auch mit dem Massenspektrometer zu detektieren. In Abbildung III-40 sind vier Gefriertrocknungsläufe mit unterschiedlichen Beladungen dargestellt.

Für die maximale Beladung wurden auf jeder der vier Stellflächen 180 Vials mit 3ml einer 5%igen Saccharoselösung gestellt. Für die anderen drei Beladungen wurde jeweils 100, 80 bzw. 60 Vials pro Stellfläche verwendet.

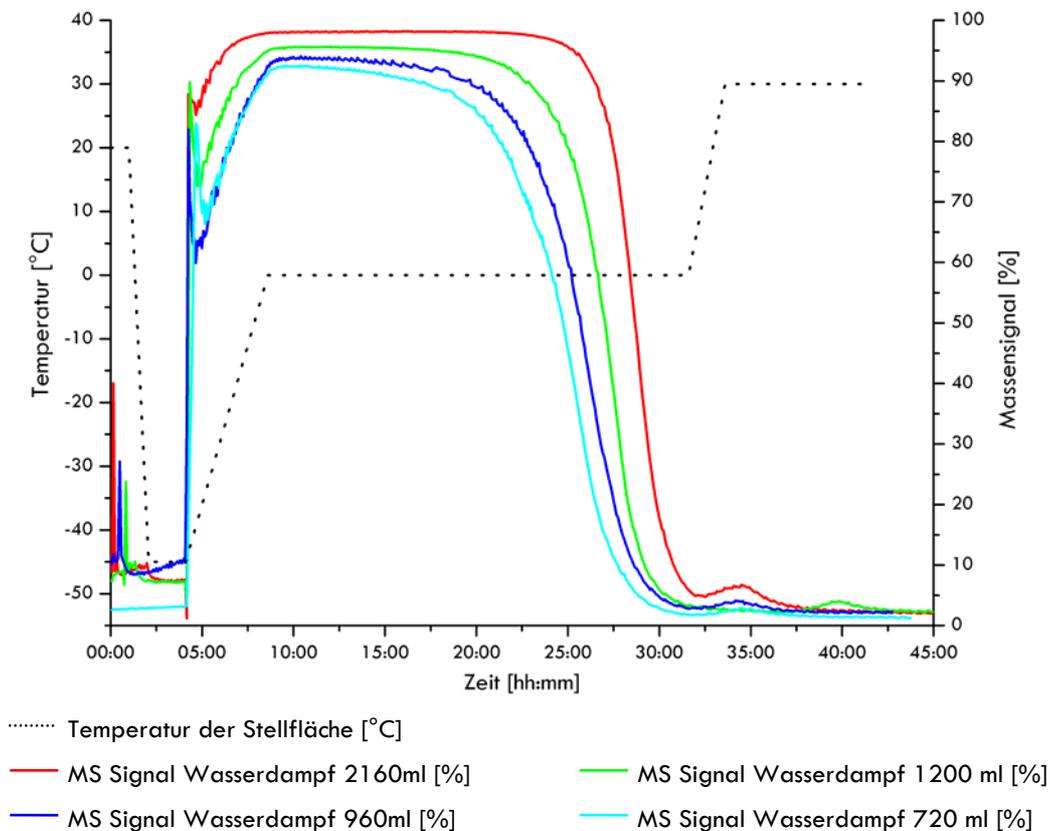


Abbildung III-40 Die Messsignale des Massenspektrometers in Prozent von vier Gefriertrocknungsläufen mit unterschiedlichen Beladungen. (Saccharose 5%, 3ml , 10R Vial)

2.3.6. Ansprechzeit

In einem Versuch wurde die Reaktionszeit des Massenspektrometers auf schnelle Änderungen im Gasraum der Trocknungskammer untersucht. Ziel war es, festzustellen, ob durch den relativ langen Weg des Wasserdampfes aus der Kammer zum Massenspektrometer nennenswerte Verzögerungen in der Detektion von Atmosphärenänderungen entstehen können.

Bei Versuchen mit Helium und einem Messintervall des Massenspektrometers von 30 Sekunden zeigte sich, dass innerhalb von zwei bis drei Messintervallen der maximale Messwert erreicht wurde.

Somit liegt die maximale Verzögerung des Massenspektrometers unter zwei Minuten und ist damit bei der Messung eines Gefriertrocknungsprozesses vernachlässigbar.

2.3.7. Softwareentwicklung zur Datenauswertung

Die Idee einer automatischen Steuerung sollte mit Hilfe des Massenspektrometers wieder aufgegriffen werden. Die Programmierung einer automatischen Endpunkterkennung erfolgte durch ein Excel Makro, das die Auswertung der Daten deutlich vereinfachen, standardisieren und grafisch darstellen sollte.

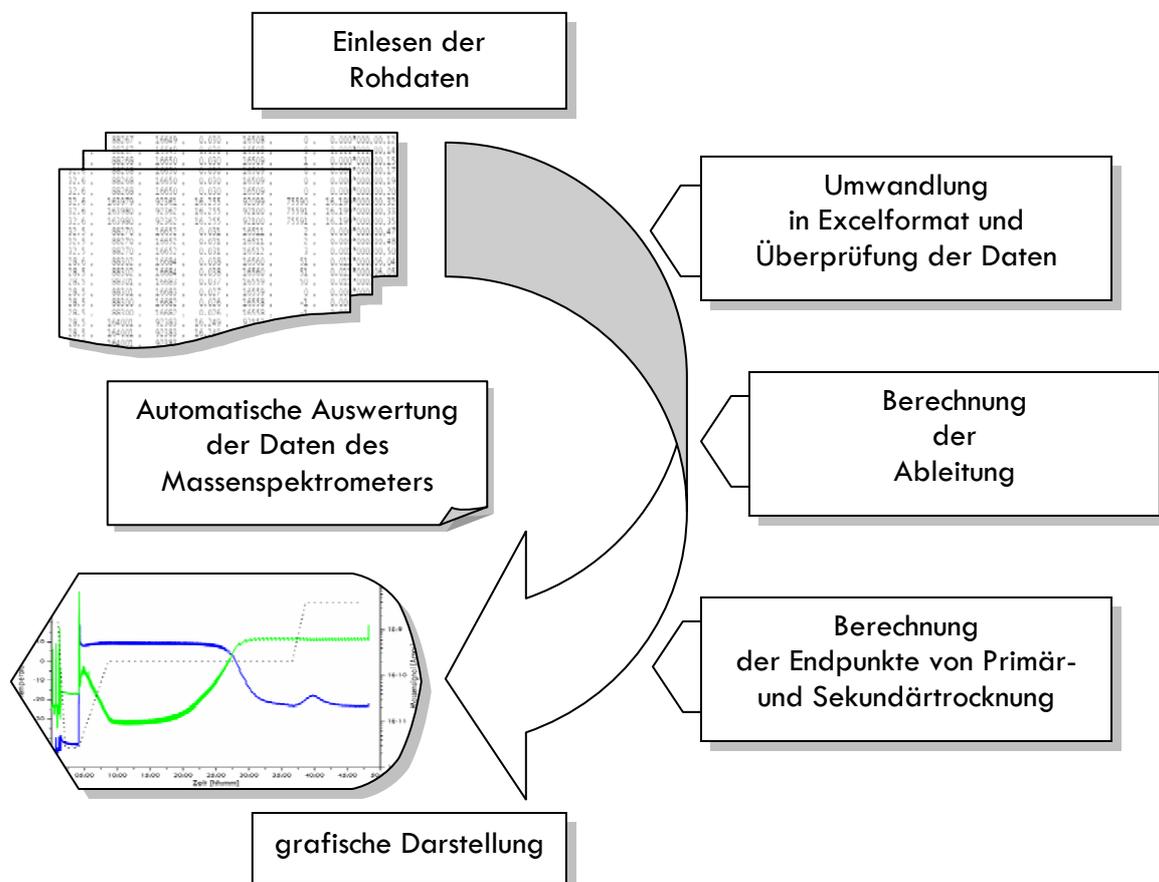


Abbildung III-41 Schematische Darstellung des Programmablaufes zur automatischen Auswertung der Daten des Massenspektrometers

Der Ablauf der Datenauswertung folgt dem schon bei der Waage festgelegten Schema. (Kapitel III.1.1.1) Nach dem Einlesen der Daten erfolgt eine Umwandlung in ein Excelformat mit anschließender Berechnung und abschließender grafischer Darstellung (Abbildung III-41). Die Schwierigkeit der Datenaufbereitung liegt bei den Daten des Massenspektrometers in der leichten, aber andauernden Schwankung des Messsignals aufgrund der Druckschwankungen, die durch die Drucksteuerung der Gefriertrocknungsanlage verursacht werden. Dieses kontinuierliche, aber nicht regelmäßige Schwanken muss durch eine Datenmittlung geglättet werden, um anschließend die Ableitung berechnen zu können. Ohne diese Glättung (Gleichung III-2) wird die Ableitung (Gleichung III-1) der Daten des Massenspektrometers durch starkes Rauschen überlagert und ist elektronisch nicht mehr auswertbar.

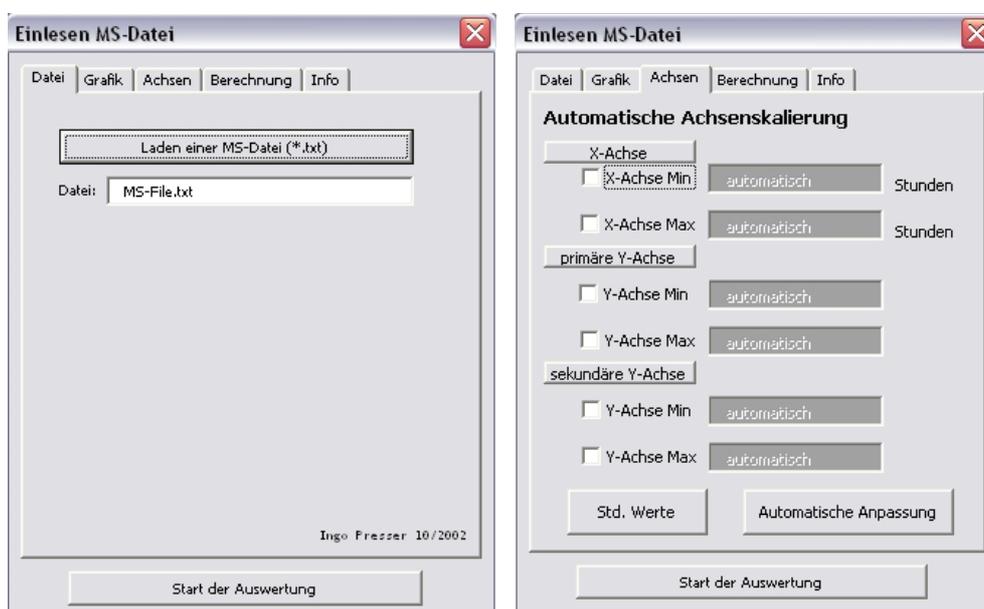


Abbildung III-42 Screenshots des entwickelten Excel Makros zur Auswertung und Darstellung der Daten des Massenspektrometers: Laden der Daten und Einrichtung der Achsen für die grafische Darstellung

Auch hier können, analog zum Wägesystem (Kapitel III.1.1.1), die Parameter zur Berechnung der Glättung und Auswertung der Endpunkte mit Hilfe von Eingabemasken des Excelmakros festgelegt werden.

In Abbildung III-42 und Abbildung III-43 sind Screenshots des Makros dargestellt.

Der Endpunkt der Primär- und der Sekundärtrocknung wird nach demselben Schema festgelegt. Die Messkurve geht jeweils in ein Plateau über, was ausgedrückt durch die erste Ableitung einer Annäherung an Null entspricht. Durch Eingabe des Beginns der Primärtrocknung wird für das Makro der Startpunkt zur Suche nach den Endpunkten gesetzt. Der erste Wert der Ableitung, der nach einem Extremwert wieder Null erreicht, wird als Endpunkt bestimmt.

Abbildung III-44 zeigt einen ausgewerteten Datensatz mit entsprechend bestimmten Endpunkten.

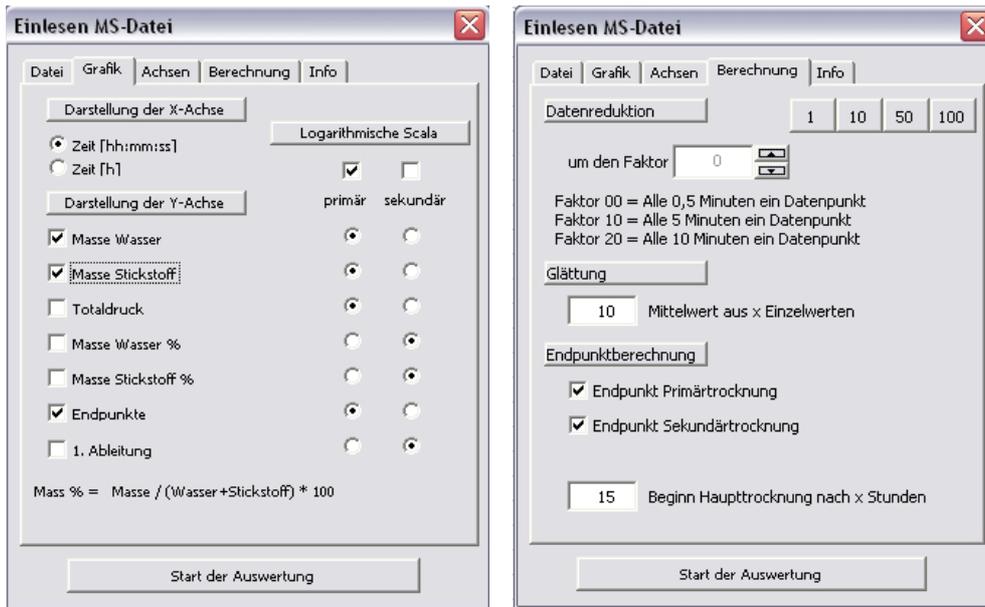


Abbildung III-43 Screenshots des entwickelten Excel Makros zur Auswertung und Darstellung der Daten des Massenspektrometers: Festlegung der grafischen Darstellung und Wahl der Parameter zur Berechnung

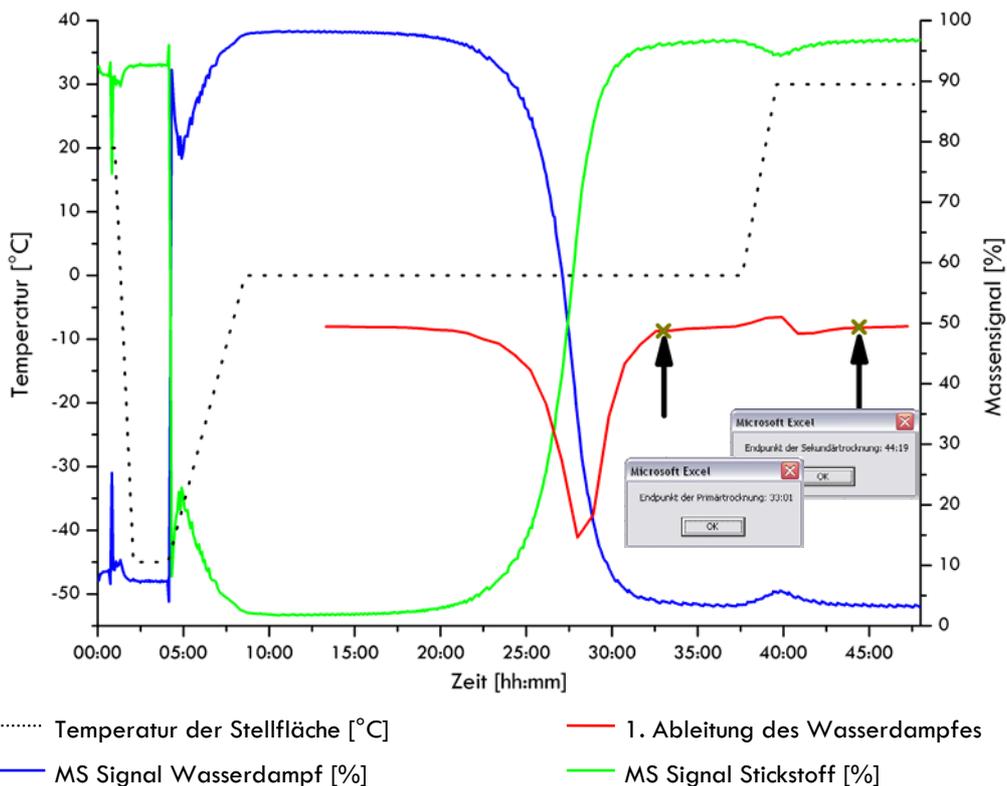


Abbildung III-44 Die Messsignale des Massenspektrometers in Prozent mit automatischer Endpunktermittlung berechnet durch das Excel Makro. (Saccharose 5%, 3ml , 10R Vial)

2.4. Einsatz des Massenspektrometers in aseptischen Prozessen

Um den Einsatz des Massenspektrometers auch auf den Produktionsbereich auszuweiten, wurde zwischen Trocknungskammer und Massenspektrometer ein Sterilfilter geschaltet (Abbildung III-45). Die Idee ist genau wie bei Belüftungsfiltren, integrierte Sterilisationsprogramme und Filterintegritätstest der Gefriertrocknungsanlage zu nutzen, um dadurch auf einfachstem Weg einen Zugang zur Trocknungskammer zu schaffen. Durch die so geschaffene Barriere ist eine sehr schwer validierbare Sterilisation des Massenspektrometers nicht mehr notwendig.

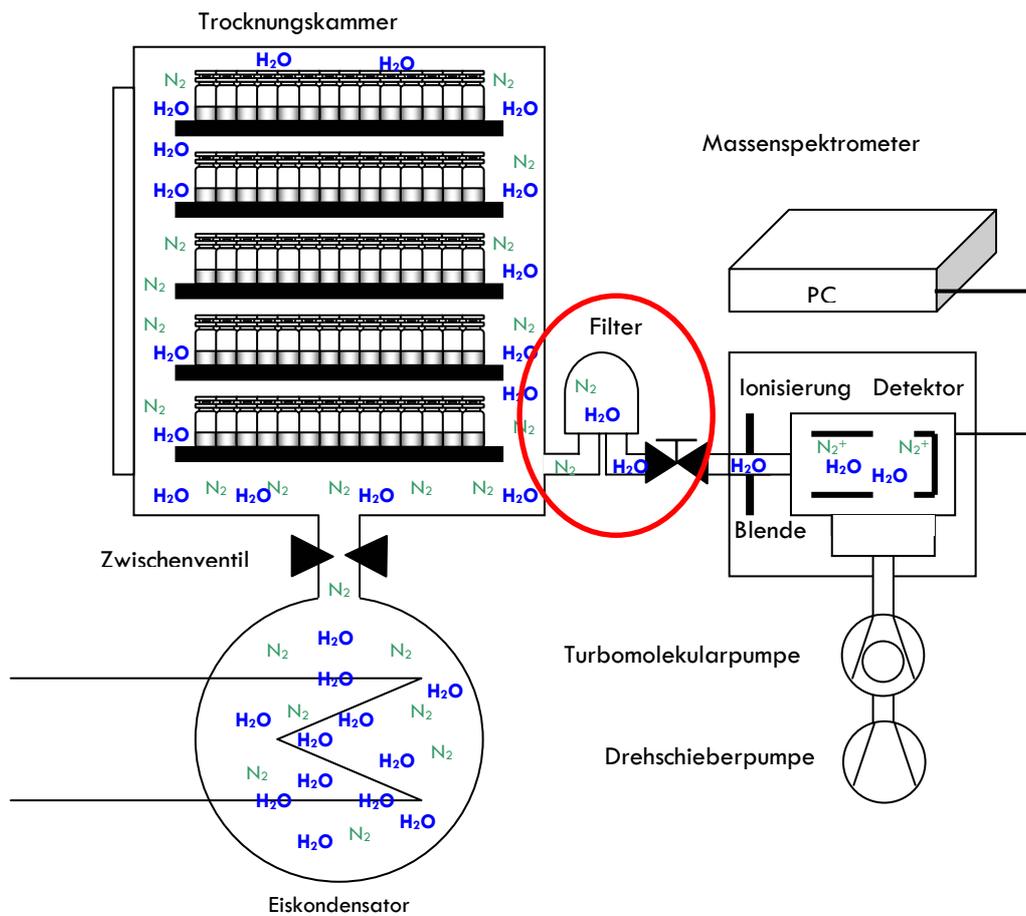


Abbildung III-45 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues einer Gefriertrocknungsanlage gekoppelt mit dem Massenspektrometer über einen sterilen Luftfilter

Durch Versuche mit und ohne diesen Luftfilter und dem direkten Vergleich der Massensignale sollte nach Auswirkungen auf das Massensignal, wie z.B. einer Verzögerung des Messsignals, gesucht werden. In Abbildung III-46 sind exemplarisch zwei Gefriertrocknungsläufe mit und ohne Filter dargestellt. Wie die Messkurven zeigen, liegen alle Daten innerhalb des normalen Schwankungsbereiches des Massenspektrometers.

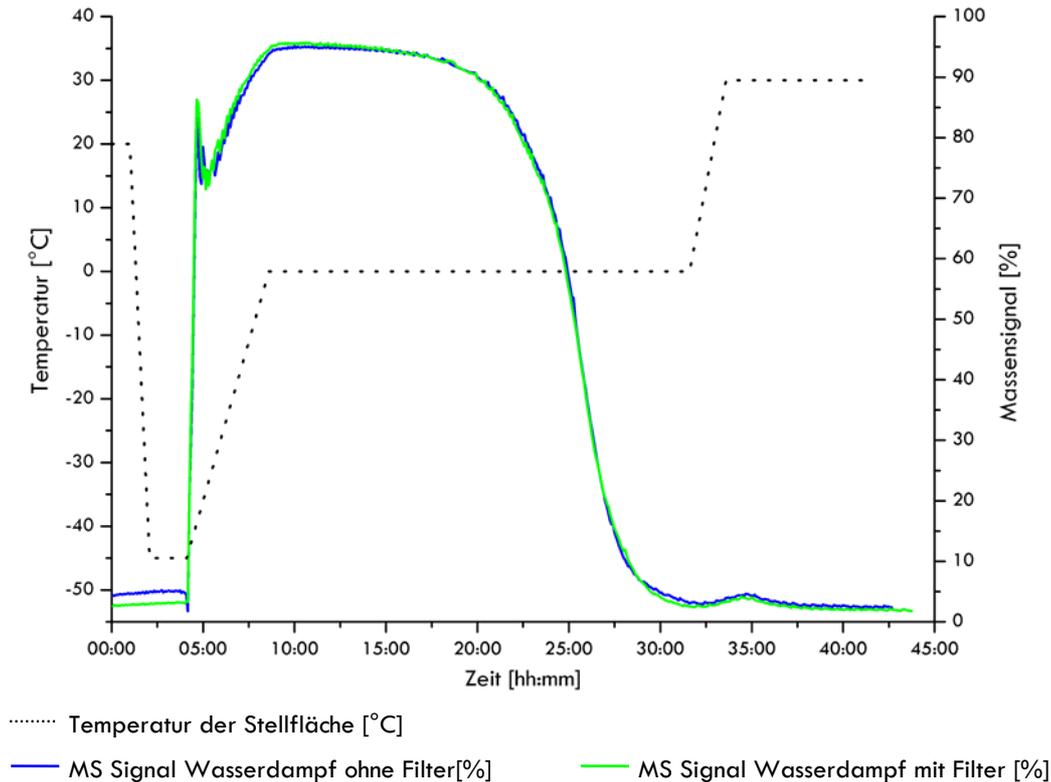


Abbildung III-46 Die Messsignale des Massenspektrometers in Prozent mit und ohne Filter. (Saccharose 5%, 3ml , 10R Vial)

Es ist möglich, das Massenspektrometer über einen Sterilfilter zu betreiben und aseptische Prozesse ohne ein zusätzliches Kontaminationsrisiko zu überwachen. Damit wird die bislang experimentelle Online Messmethode auch zur Überwachung von Produktionsanlagen einsetzbar.

2.5. Optimierung von Trocknungsprozessen

Mit Hilfe der Daten des Massenspektrometers und des Auswertungsprogramms wurde in einem Versuch die Möglichkeit einer Prozessoptimierung überprüft. Ziel war es, die durch das Excel Makro errechneten Endpunkte anhand des Restfeuchtegehaltes (Zielgröße <1%) zu überprüfen.

Der errechnete Endpunkt der Primärtrocknung eines Versuchslaufes lag bei 31 Stunden und 30 Minuten nach Beginn der Trocknung. Die Primärtrocknung wurde dadurch um sieben Stunden verkürzt. Die Auswertung der Sekundärtrocknung erwies sich durch das sehr kleine Signal als schwieriger und wurde nur um eine Stunde verkürzt.

Mit dem angepassten Programm wurde erneut ein Gefriertrocknungslauf gestartet und mit dem Massenspektrometer aufgezeichnet.

Die Messdaten des Massenspektrometers aus dem normalen und dem optimierten Versuch sind in Abbildung III-47 dargestellt.

Deutlich ist die Verschiebung des Sekundärtrocknungspeaks entsprechend der Verkürzung des Trocknungsprogramms zu sehen.

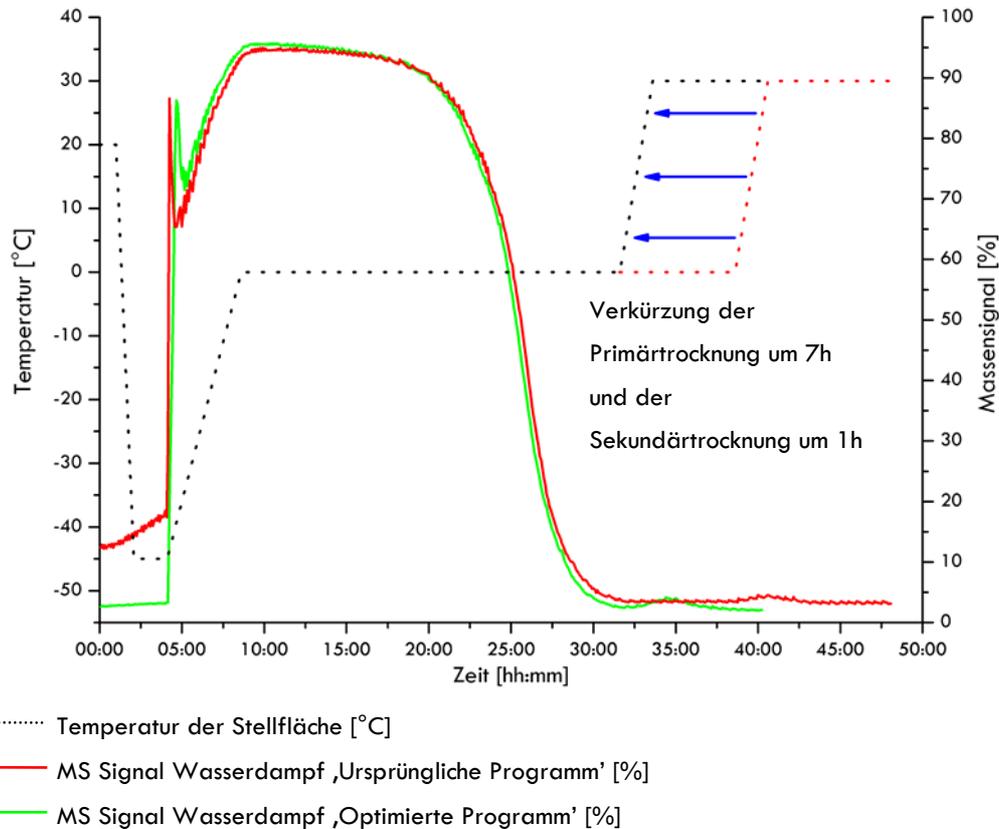


Abbildung III-47 Die Messsignale des Massenspektrometers in Prozent eines Gefriertrocknungslaufes im Vergleich zu einem optimierten Gefriertrocknungslauf. (Saccharose 5%, 3ml , 10R Vial)

Bei Betrachtung der Restfeuchtedaten wurde auch mit dem optimierten Trocknungsprogramm eine Restfeuchte unter einem Prozent erreicht (Tabelle III-2). Im direkten Vergleich der beiden Versuche zeigte sich, dass mit längerer Trocknung zwar eine geringere Restfeuchte zu erreichen ist, aber die Trocknungszeit dazu extrem verlängert werden muss.

	Standard Gefriertrocknungslauf	Optimierter Gefriertrocknungslauf
Mittelwert	0,61%	0,83%
Standardabweichung	0,08	0,06

Tabelle III-2 Restfeuchte der Lyophilisate (n=10)

Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung des Massenspektrometers Gefriertrocknungsprozesse hinsichtlich der Trocknungsgeschwindigkeit optimiert werden können.

2.6. Massenspektrometrie in Transfer und Scale-Up

In einer Versuchsreihe sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Gefriertrocknungsanlage auf das Messsignal des Massenspektrometers hat. Zu diesem Zweck wurde das Massenspektrometer an eine Pilotgefriertrocknungsanlage der Fa. Hof (Kondensatorkapazität

50 Kg) angeschlossen. Der Gefriertrockner wurde mit 4000 10R Vials mit je 3ml einer 5%igen Saccharoselösung voll beladen.

Derselbe Versuch wurde am Small Scale Gefriertrockner der Fa. Christ (Kondensatorkapazität 12 Kg) ebenfalls mit voller Beladung durchgeführt (720 10R Vials, 3ml, 5% Saccharose).

In Abbildung III-48 sind die Messdaten des Massenspektrometers dargestellt. Die Messkurven aus beiden Versuchen zeigen den gleichen Verlauf, aber es ist zu erkennen, dass die Messkurve der Pilot-Gefriertrocknungsanlage aufgrund der höheren Beladung ein intensiveres Messsignal zeigt.

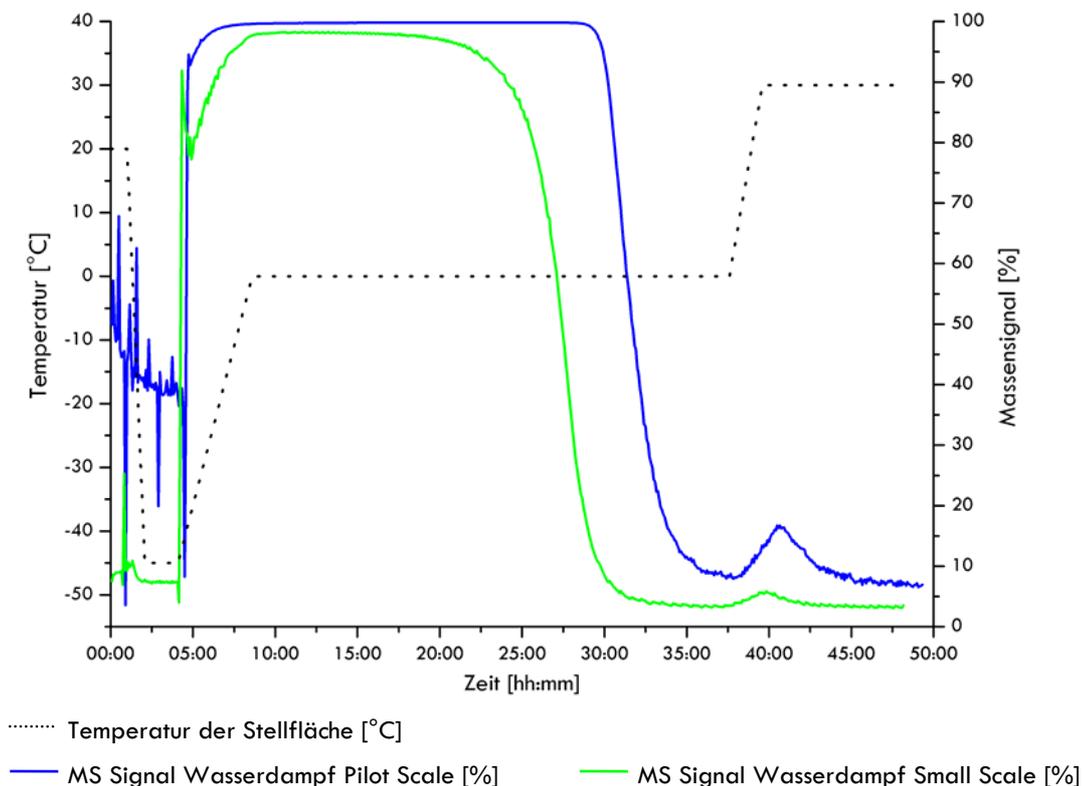


Abbildung III-48 Die Messsignale des Massenspektrometers in Prozent von zwei verschiedenen Gefriertrocknungsanlagen. (Saccharose 5%, 3ml , 10R Vial)

Die zweite Auffälligkeit, die die Kurven zeigen, ist das Ende der Primärtrocknung. Während das Trocknungsprogramm für die Pilotanlage im Umschaltzeitpunkt nach dem Ende der Sublimation fast optimal gewählt wurde, weist dasselbe Programm in der Small Scale Anlage eine unnötig lange Primärtrocknung auf.

Dies zeigt, dass sich Gefriertrocknungsanlagen in ihrer Trocknungsleistung deutlich unterscheiden und wie sich dies auf die Trocknung auswirken kann. Bei einer direkten Übertragung eines optimierten Trocknungsprogramms vom Small Scale Gefriertrockner auf die Pilotanlage, könnte sich die Trocknung am Umschaltzeitpunkt noch in einer kritischen Phase befinden und im Extremfall ein Kollaps auftreten. Da zuvor gezeigt wurde, dass mit Hilfe des Massenspektrometers eine Onlinemessung unter aseptischen Bedingungen durchführbar ist,

besteht die Möglichkeit auch bei Transfer- und Scale-Up-Versuchen direkt das Trocknungsprogramm dem Trocknungsverlauf anzupassen. Der große Vorteil liegt in der Zeit- und Materialersparnis, da die Trocknung noch während des Versuches beurteilt und angepasst werden kann.

2.7. Beurteilung des Massenspektrometers

Es ist nicht nur, wie von Connelly und Welch²⁴ gezeigt möglich, die Primärtrocknung durch Messung des Wasserdampfes zu detektieren, sondern auch während der Sekundärtrocknung kann der Anteil des Wasserdampfes in der Trocknungskammer detektiert und dieses Signal ausgewertet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Detektion der Endpunkte mittels Massenspektrometrie es ermöglicht, Gefriertrocknungsprozesse in ihrer Primär- und Sekundärtrocknungszeit zu optimieren. Besonders die Detektion des Endpunktes der Sekundärtrocknung war bisher nur durch aufwändiges Erstellen einer Desorptionskurve aus mehreren Versuchen mit Probenzügen und Karl-Fischer-Titration möglich. Dies erlaubt es, die Entwicklungszeiten bei der Prozessfindung deutlich zu verkürzen.

Durch den Einbau eines sterilen Luftfilters zwischen die Trocknungskammer und dem Massenspektrometer konnte der Einsatz auch auf aseptische Prozesse problemlos ausgeweitet werden. Durch das Anschließen von außen über den Filter an die Trocknungskammer ist die Massenspektrometrie eine sehr einfach zu handelnde und für aseptische Prozesse risikolose Online-Messmethode.

Damit ist es möglich, das Massenspektrometer nicht nur in der Entwicklung sondern auch zur Überwachung von Transfer- und Up-Scale-Läufen in der unter aseptischen Bedingungen laufenden Produktion einzusetzen.

Im Vergleich zu den Standard-Messmethoden zeigt die Massenspektrometrie in der Primärtrocknung sehr ähnliche Ergebnisse. Besonders im Vergleich zur Komparativen Druckmessung, die auch durch Überwachung der Atmosphäre der Trocknungskammer nicht die Trocknung beeinflusst und ebenfalls bei aseptischen Prozessen eingesetzt werden kann, ist das Massenspektrometer aufgrund seiner Größe und seines Preises für die Primärtrocknungsüberwachung nur zweite Wahl.¹³¹ Die Detektion der Sekundärtrocknung hingegen ist nur mit dem Massenspektrometer möglich.

Ein zweiter Vorteil, den das Massenspektrometer bietet, ist seine Vielseitigkeit. Neben dem Einsatz bei Gefriertrocknung aus nichtwässrigen Lösungsmitteln, ist die Lecksuche oder die Untersuchung von zurückströmendem Vakuumpumpenöl zu nennen.

Der hohe Anschaffungspreis lässt sich durch die Mobilität des Gerätes relativieren. Durch die Möglichkeit problemlos angeschlossen zu werden, ist eine fixe Anbringung an jede

Gefriertrocknungsanlage nicht notwendig, sondern ein Gerät kann beliebig viele Anlagen versorgen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den Einsatz des Massenspektrometers die Online-Messmethoden auf die Bewertung der Sekundärtrocknung hin erweitert werden konnte. Durch Kombination der automatischen Endpunkterkennung mit der Steuerung der Gefriertrocknung ist eine Automatisierung der Gefriertrocknung in einer Weise möglich, dass während des Prozesses selbstständig die Primär- und Sekundärtrocknungszeiten optimiert werden.

3. Nah Infrarot Spektroskopie in der Gefriertrocknung

Nach der Entdeckung der Infrarotstrahlung durch W. Herschel im Jahr 1800 dauerte es noch über 150 Jahre, bis das Potential des Nah Infrarot Spektrums zur quantitativen Analyse entdeckt wurde. In zwei Artikeln beschrieben Kaye et al. die Möglichkeit, CH-, NH- und OH-Streckschwingungen zur quantitativen Auswertung zu verwenden.^{61,62}

Die Lebensmittelindustrie nutzt schon seit dreißig Jahren die Nah Infrarot Spektroskopie (NIRS) intensiv zur Bestimmung der Identität und der Restfeuchte in Schüttgütern.^{5,14} Mit der Entwicklung neuer mathematischer Auswertungsmethoden sowie schnellerer und besserer Computer wurde die Analysentechnik immer genauer und schneller, und damit für die Pharmazeutische Industrie als Analysenmethode immer attraktiver.²³

Die großen Vorteile der NIRS sind eine sehr schnelle und zerstörungsfreie Messung, und es ist keine Probenaufbereitung notwendig. Dies ermöglichte die Entwicklung verschiedener NIR Online Messsysteme, die Mischvorgänge oder Tablettenüberzugsprozesse überwachen.⁶⁵ Durch die gute Absorption von Wassermolekülen in diesem Spektralbereich sind seit längerem auch Online Systeme zur Überwachung von Granulationsprozessen erfolgreich im Einsatz.³⁴

Im Bereich der Lyophilisation wurde durch eine Reihe von Arbeiten die Eignung der NIR Spektroskopie zur Untersuchung der Restfeuchte von Lyophilisaten als Alternative zur Karl-Fischer Titration gezeigt. Die Messung der Restfeuchte durch den Glasboden von Vials zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen Nah Infrarot Spektroskopie und Karl-Fischer Titration.^{31,58,59,71,75}

Daher wurde die NIR Technologie zur Entwicklung einer Online-Messmethode zur Bestimmung der Restfeuchte in Lyophilisaten während des Trocknungsprozesses ausgewählt.

In Zusammenarbeit mit der Firma Foss (Hamburg), einem Hersteller für NIR Systeme, sollte eine Messsonde entwickelt werden, die flexibel in beliebige Gefriertrockner über Standard-Flansche eingebaut werden kann, und die den extremen Temperatur und Unterdruckbedingungen standhält, sowie sterilisierbar ist. Die Besonderheit an diesem Messsystem ist die Messung durch die Seitenwand des Vials, um einen Einfluss ähnlich dem der Temperaturfühler zu vermeiden.

Ziel ist, mit Hilfe der Nah Infrarot Spektroskopie eine Online Messmethode zu etablieren, die sowohl die Primärtrocknung, als auch die Sekundärtrocknung überwachen kann, und die durch Messung des Wassergehaltes auch die Ansteuerung einer definierten Restfeuchte am Ende des Trocknungsprozesses ermöglicht.

3.1. Versuchsaufbau des Nah Infrarot Spektrometers

Zur Bestimmung der NIR Spektren wurde das NIR 6500 Online (Fa. Foss, D-Hamburg) gewählt. Es handelt sich um ein robustes Messsystem, das auf Online Dauermessung ausgelegt ist. Ein weiterer Vorteil dieses Gerätetyps ist die Möglichkeit, mehrere Messsonden anzuschließen und diese getrennt über die Software anzusteuern. Der detektierte Messbereich liegt zwischen 850nm und 2100nm, und schließt damit drei zur Bestimmung des Wassers relevante Bereiche ein (1. Oberton 1900nm-1950nm, 2. Oberton 1400nm-1450nm, 3. Oberton 960nm-980nm).

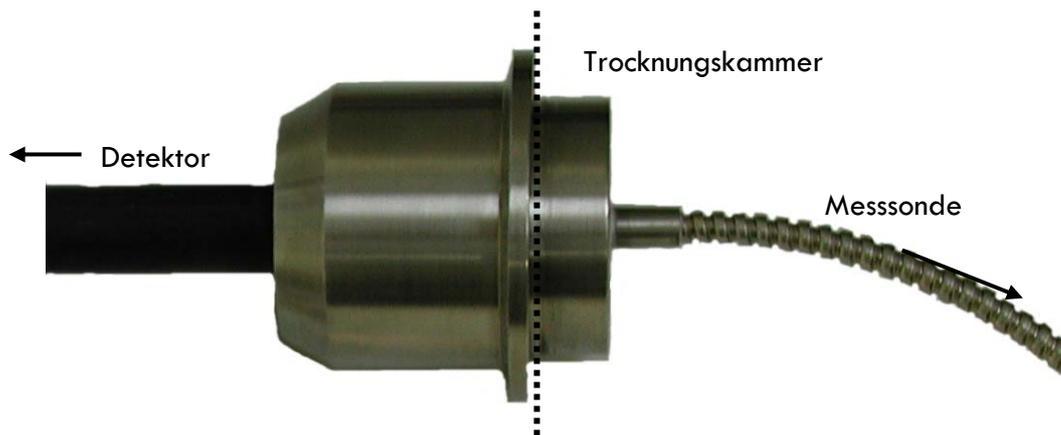


Abbildung III-49 Vakuumdichte Durchführung für den Lichtleiter

Die Messsonde kann mit Hilfe eines flexiblen Lichtleiters und einer vakuumdichten Durchführung (Abbildung III-49) in die Trocknungskammer eingebracht werden, und lässt sich dort an beliebiger Position auf einer Stellfläche fixieren. Um die Probleme mit Wärmestrahlung und dadurch beschleunigter Trocknung, wie sie bei dem Wägesystem auftraten, (Kapitel III.1.3) zu vermeiden, wurde auf das Design der Messsonde besonderen Wert gelegt. Die Entwicklung dieser Einheit war ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit.

3.1.1. Design der Messsonde

Durch den Platzverbrauch und die Wärmestrahlung des Wägesystems wurde die Trocknung des Messvials deutlich beschleunigt (Kapitel III.1.3). Diese Erkenntnisse flossen in die Gestaltung der Messsonde ein. Damit galt es zunächst, eine möglichst kleine Messsonde zu schaffen. Außerdem sollte sichergestellt werden, dass die Sonde am Messvial befestigt werden kann, um Einflüsse durch Bewegungen auszuschließen. Weiterhin sollte die Messung mit verschiedenen Vialgrößen möglich sein.

In Abbildung III-50 ist eine Skizze der Sondenhalterung dargestellt. Die Sonde wird durch einen Kanal in der Halterung geführt und mit der hinteren Schraube fixiert. Somit befindet sich der Messkopf ca. 2mm oberhalb des Vialbodens direkt an der Glaswand, wodurch auch die Messung von Vials mit geringer Befüllung ermöglicht wird.

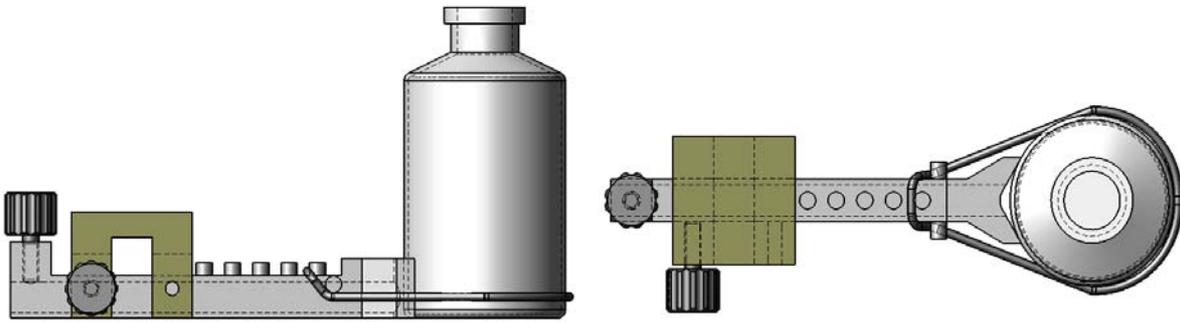


Abbildung III-50 Skizze der NIR-Sondenhalterung mit einem 20R Vial

Das Vial wird durch ein Gummiband an die Sondenhalterung, und damit gleichzeitig an den Kopf der Sonde gedrückt. Durch die kompakte Bauweise der Sonde kann das Messvial in direktem Kontakt mit anderen Vials stehen (Abbildung III-51).

Um auch das automatische Verschließen selbst bei niedrigen 2R Vials problemlos möglich zu machen, wurde an die Dimensionen der Sonde mit Sondenhalterung eine weitere Anforderung bezüglich der Höhe gestellt. Die entwickelte Sondenhalterung hatte nur eine Höhe von zwei Zentimetern.

Aufgrund der Dimensionen der Messsonde und den Erfahrungen mit dem Wägesystem, wurde das Versuchsaufbau, wie in Abbildung III-51 dargestellt, festgelegt und für sämtliche Versuche verwendet.

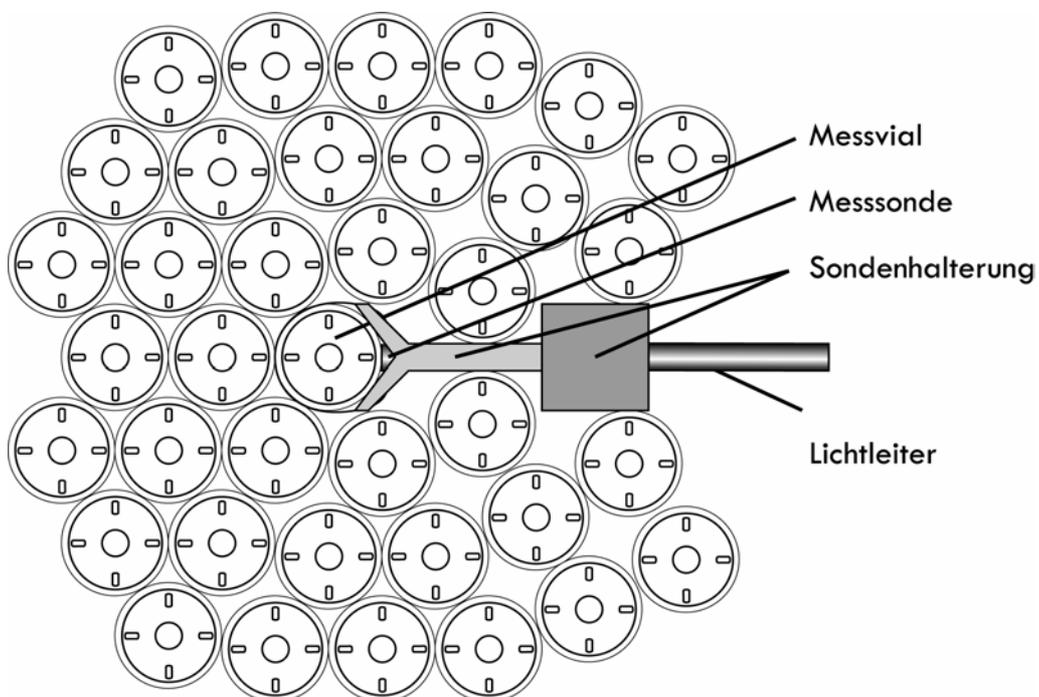


Abbildung III-51 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues mit der NIR Sonde

3.2. Interpretation der NIR-Spektren

Zur Entwicklung der NIR Messmethode wurden zunächst über den gesamten Gefriertrocknungsprozess Spektren aufgezeichnet, um Veränderungen des Spektrums in Abhängigkeit von den verschiedenen Aggregatzuständen zu erkennen.

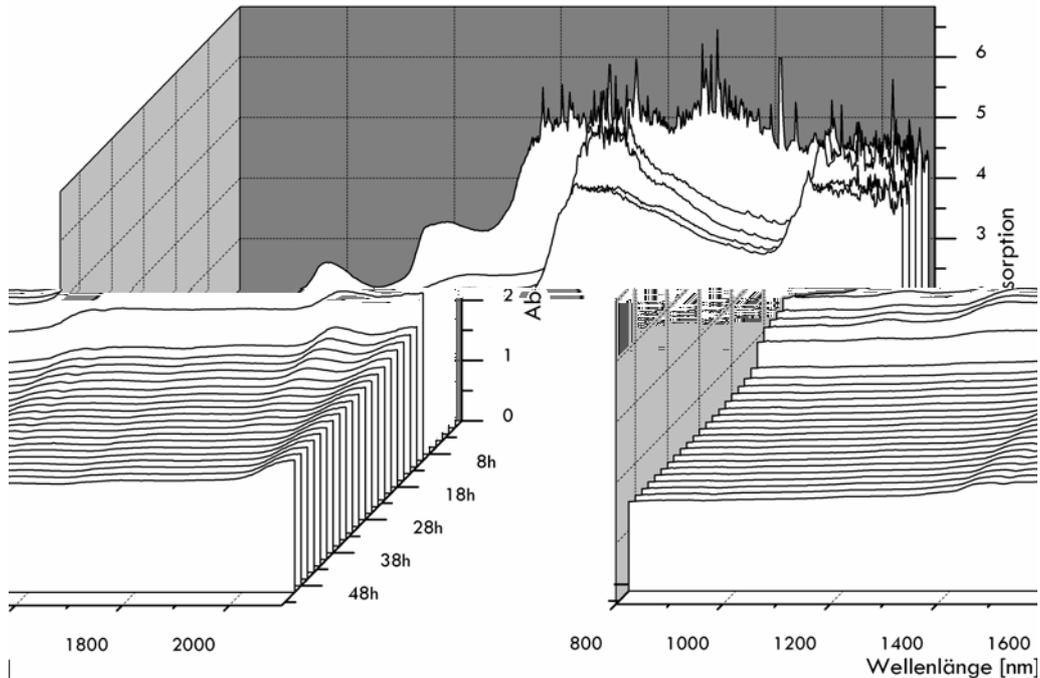


Abbildung III-52 Veränderung der Spektren einer 5%igen Saccharoselösung im Laufe des Gefriertrocknungsprozesses.

In Abbildung III-52 sind derartige Spektren, aufgenommen im Abstand von 2 Stunden, aufgetragen. Die ersten Spektren zeigen im Vergleich zu den späteren Spektren einen völlig anderen Verlauf und eine deutlich stärkere Absorption, da in der Anfangsphase der Gefriertrocknung direkt Wasser bzw. Eis gemessen wird. Mit dem Voranschreiten der Trocknung sublimiert das Eis, und der zurückbleibende Kuchen zeigt ein anderes Spektrum mit geringeren Absorptionswerten. Diese Veränderung des Spektrums (Abbildung III-52) nach acht Stunden kann aber nicht mit dem Ende der Primärtrocknung gleichgesetzt werden, da die NIR Strahlung in Lyophilisaten je nach Porosität Eindringtiefen bis zu 5mm aufweist.⁷⁷ Ab diesem Zeitpunkt befindet sich kein Eis mehr im Messbereich, und das Spektrum verändert sich im weiteren Verlauf qualitativ nicht mehr wesentlich, allerdings verliert die Wasserbande stetig an Intensität, und zeigt dadurch die fortschreitende Trocknung an. In Abbildung III-53 ist dieser Bereich vergrößert dargestellt. Am deutlichsten ist die Abnahme der Intensität bei 1950nm, dem ersten Oberton des Wassermoleküls zu sehen. Durch Kalibration der Spektren, speziell der Wasserbanden, mit Restfeuchtedaten aus der Karl-Fischer Titration sollte die Restfeuchte im Lyophilisat im Verlauf der Trocknung errechnet werden können.

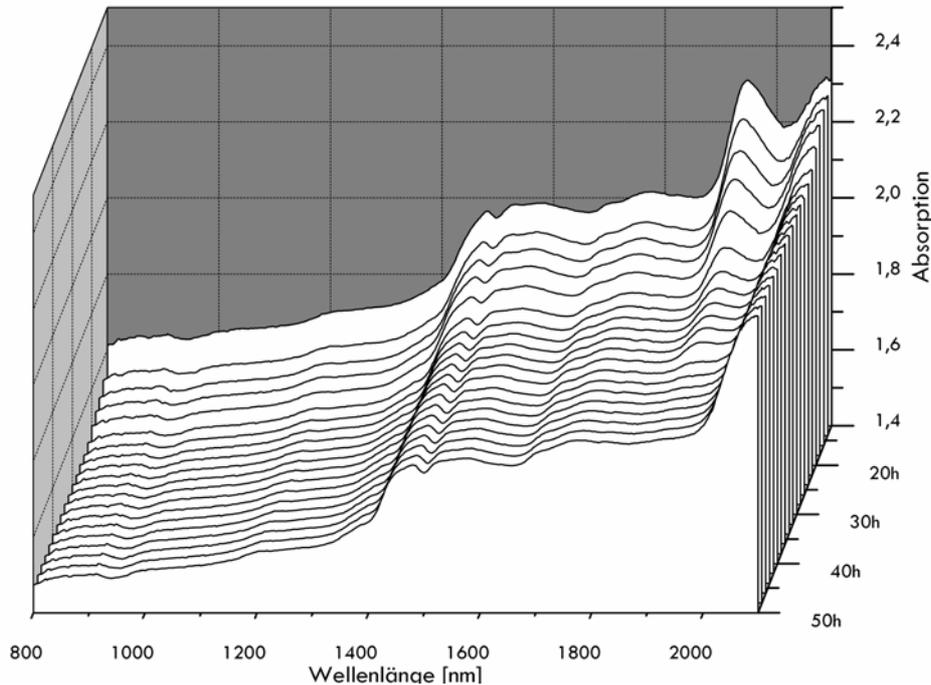


Abbildung III-53 Spektren einer 5%igen Saccharoselösung im Laufe des Gefrier-trocknungsprozesses.

3.3. Kalibration der Methode und Auswertung der NIR Spektren

Ein sehr zeitaufwendiger Schritt ist die Kalibration des NIR Spektrometers. Zunächst wurden Lyophilisate mit unterschiedlichen Restfeuchten hergestellt. Gerade bei Saccharoseformulierungen mit hohen Restfeuchten (größer vier Prozent) ist die geringe Stabilität der Lyophilisate ein Problem. Daher lag der Restfeuchtebereich, mit dem kalibriert werden konnte, zwischen 0,3% und 4%.

Von jedem Lyophilisat wurden zweimal drei Spektren von zwei unterschiedlichen Stellen aus durch die Seitenwand aufgezeichnet, und anschließend eine Karl-Fischer Titration zur Bestimmung der Restfeuchte durchgeführt. Aus dem erhaltenen Datensatz wurde dann mit Hilfe der Software Vision der Firma Foss eine Korrelation zwischen der Restfeuchte und den Spektraldaten berechnet.

Um Korngrößeneffekte auszuschließen, wurde die erste Ableitung der Spektren (Abbildung III-55) aus den Rohdaten (Abbildung III-54) berechnet.⁷⁷ Dadurch werden nur noch Änderungen in der Absorption betrachtet und Unterschiede durch Porosität und Kuchenstruktur, die für den Offset der Absorption verantwortlich sind, eliminiert.

Durch Bildung der ersten Ableitung werden die Unterschiede in den Spektren aufgrund der unterschiedlichen Restfeuchten deutlich sichtbar. Nicht nur der erste Oberton bei 1950nm, sondern auch der zweite Oberton bei 1450nm und dritte Oberton bei 920nm sind optisch in Abbildung III-55 gut zu erkennen.

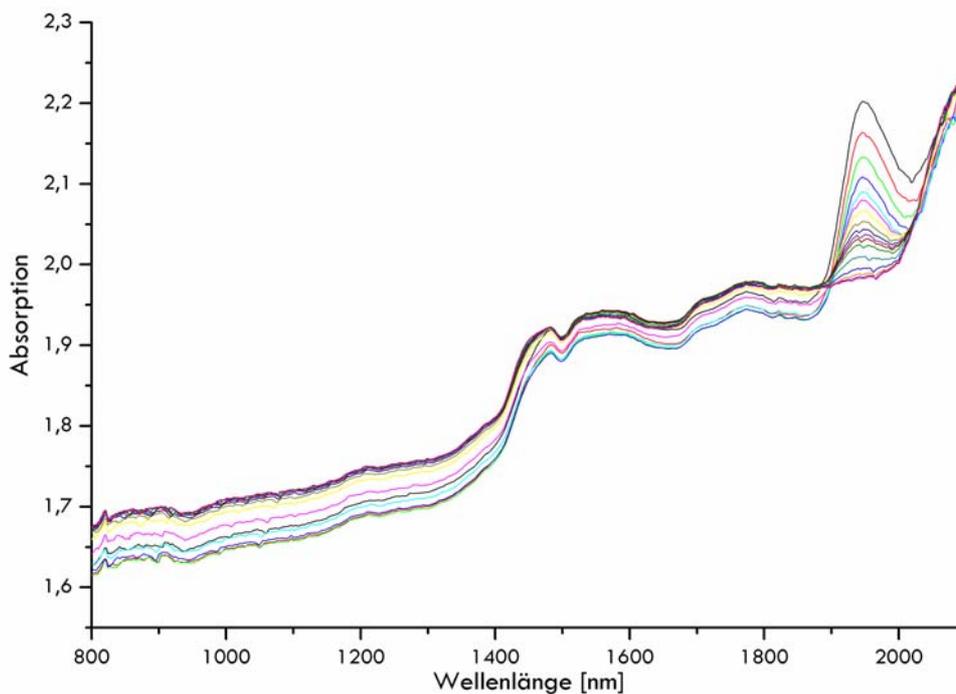


Abbildung III-54 NIR Spektren von Saccharoselyophilisaten mit unterschiedlichen Restfeuchten

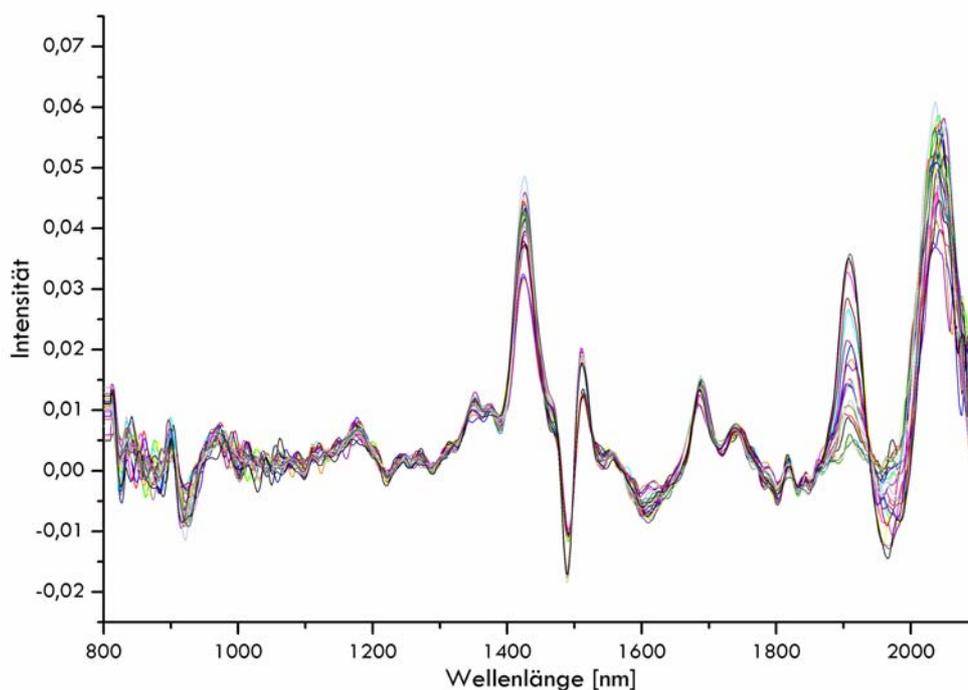


Abbildung III-55 Erste Ableitung der NIR Spektren von Saccharoselyophilisaten mit unterschiedlichen Restfeuchten

Die Kalibration wurde anhand der Partial Least Square Regression (PLS), einem faktoranalytischen Verfahren kombiniert mit multilinearer Regression mit fünf Faktoren, auf Basis der Spektren in der ersten Ableitung über den gesamten Wellenlängenbereich berechnet.

Die Loadings stellen die einzelnen Faktoren der Berechnung dar.¹⁴ Nach Berechnung der Wellenlänge mit der höchsten Varianz, erfolgt die Berechnung der zweithöchsten Varianz usw., bis nur noch das Basisrauschen erfasst wird (Abbildung III-56).

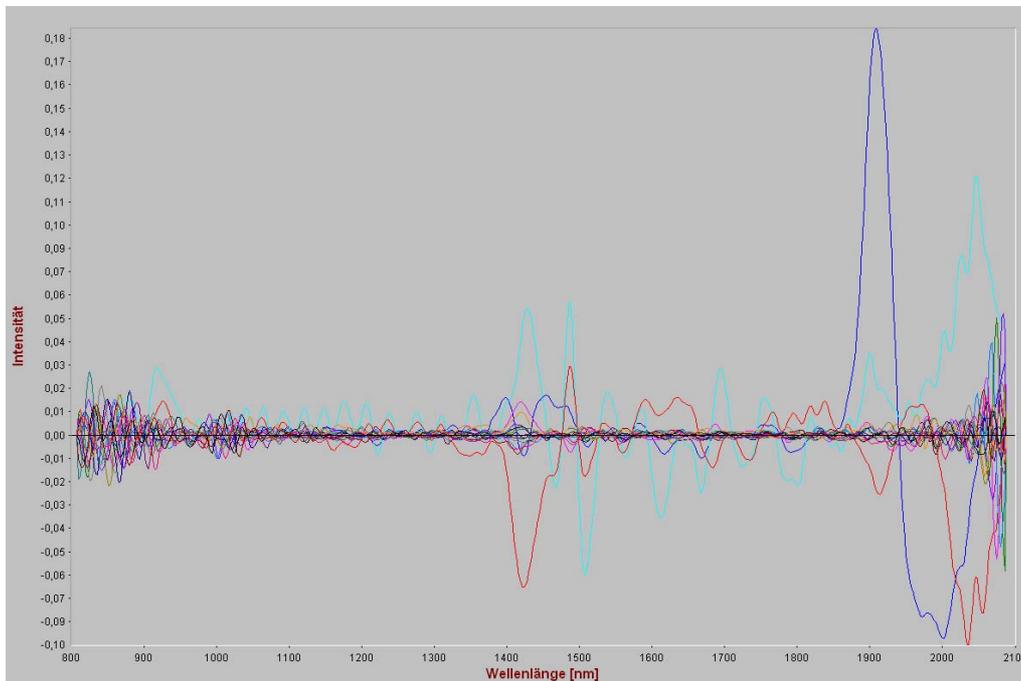


Abbildung III-56 Loadings der PLS-Regression

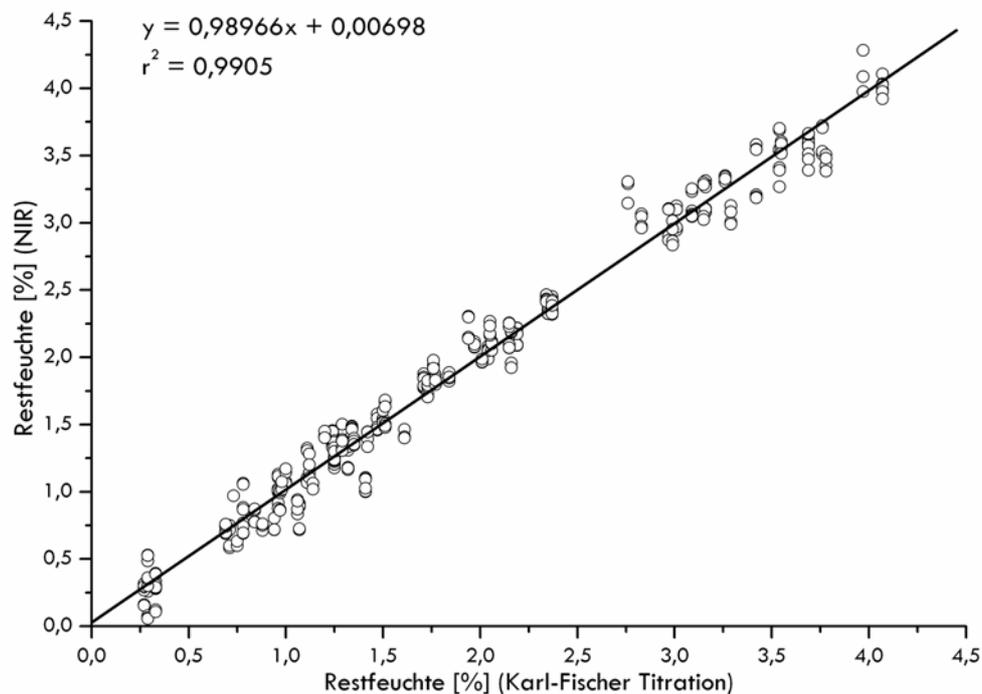


Abbildung III-57 Regressionsgerade: NIR gegen Karl-Fischer Restfeuchtedaten (n=128).

In Abbildung III-57 ist die Regressionsgerade der mit Hilfe der NIR Spektren berechneten Restfeuchte gegen die mit Karl-Fischer bestimmte Restfeuchte aufgetragen. Im Bereich bis 4% Restfeuchte konnte damit eine gute Korrelation bei einem Standardfehler von 0,1657 gezeigt

werden. Bei Betrachtung der Residuen (Abbildung III-58) zeigt sich damit eine Abweichung der meisten berechneten Daten von bis zu 0,25 Prozent zum Karl-Fischer Wert.

Im Vergleich von Daten aus der Literatur über Offline Messungen durch den Vialboden, liegt der Fehler der Methode innerhalb des erwarteten Fehlerbereiches mit einer Standardabweichung von 0,1 bis 0,25.^{31,59,75}

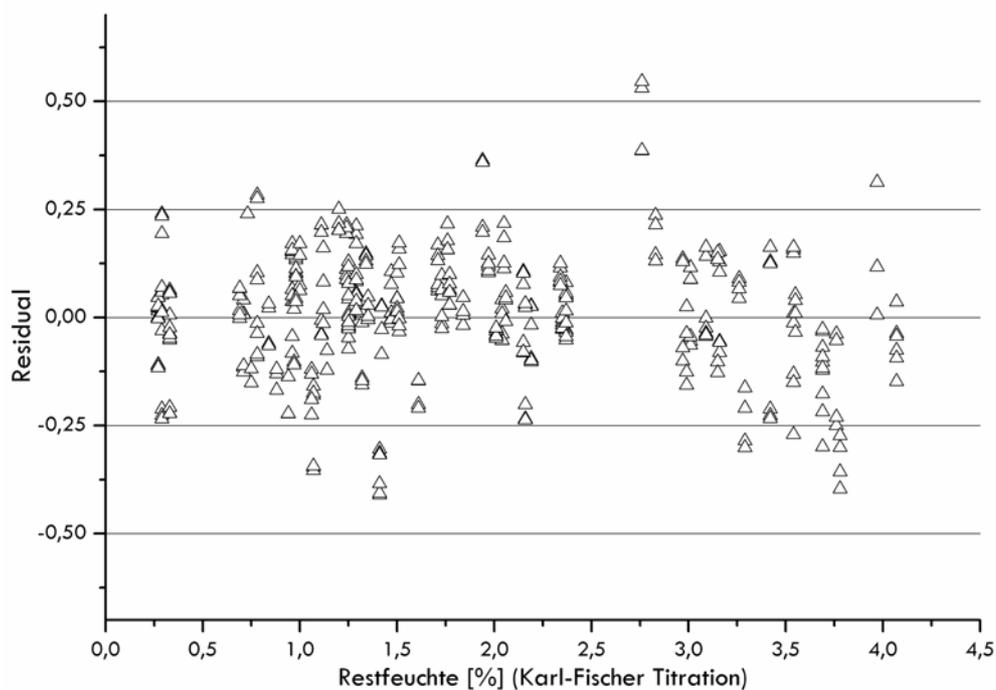


Abbildung III-58 Residuen der berechneten NIR Daten gegen die Restfeuchtedaten der Karl-Fischer Titration

Damit stellt die NIR Messung durch die Seitenwand des Glasvials eine gut funktionierende Messmethode dar.

3.3.1. Temperaturabhängigkeit der Spektren

Im nächsten Schritt wurde die Sonde mit einem verschlossenen Vial bekannter Restfeuchte (0,54%) in die Gefriertrocknungskammer eingebracht und einem Gefriertrocknungslauf unterzogen. Ziel war die Untersuchung der Temperatureinflüsse auf das Spektrum und gleichzeitig die Funktionskontrolle der Messsonde bei den vorherrschenden Temperaturen und Drücken.

Die aus diesem Versuch erhaltenen Spektren wurden mit Hilfe der erstellten Kalibration in Restfeuchtedaten umgerechnet und gemeinsam mit dem Trocknungsprogramm grafisch aufgetragen (Abbildung III-59).

Die Spektren zeigen wie erwartet eine leichte Temperaturabhängigkeit. Die temperaturbedingte Schwankung der Messwerte ist aber mit maximal 0,09% der Restfeuchte deutlich kleiner als der Fehler der Methode, und damit für den Zweck der Online Messung vernachlässigbar.

Mechanische Veränderungen durch die Temperatur oder den Unterdruck an der Messsonde wurden nicht festgestellt.

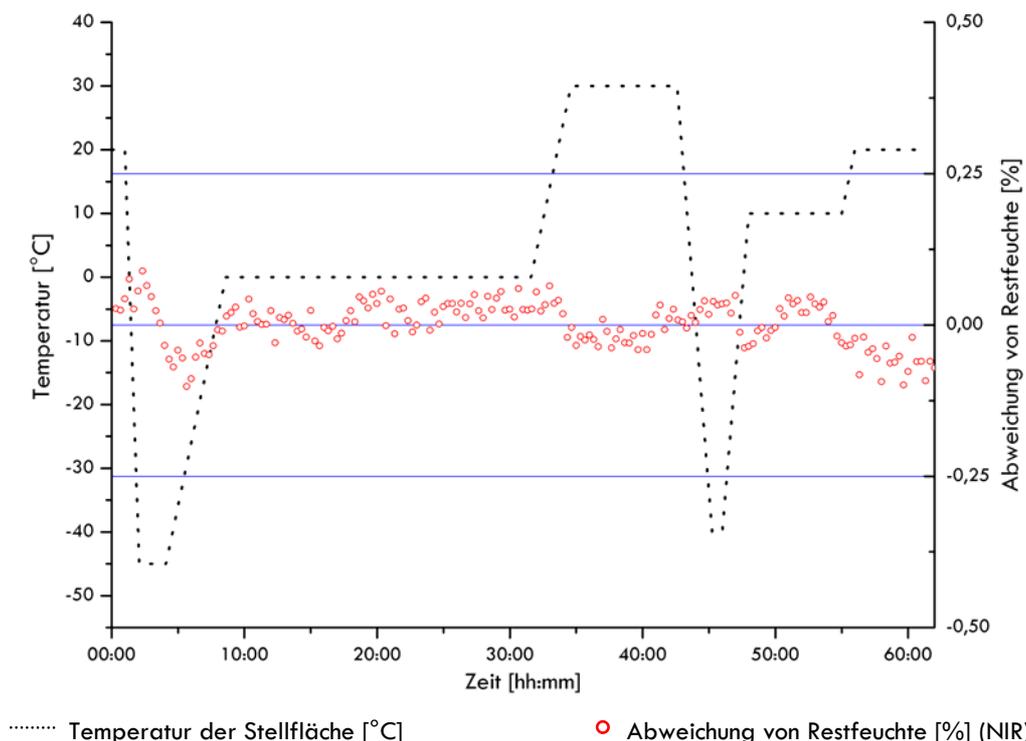


Abbildung III-59 Durch NIR Spektren berechnete Restfeuchtedaten eines verschlossenen Vials in Abhängigkeit vom Gefriertrocknungsprogramm.

3.3.2. Interpretation des Messsignals

Im Gegensatz zu den klassischen Standardmessmethoden ist durch die NIR Spektroskopie eine direkte Bestimmung der Restfeuchte im Vial während des Gefriertrocknungsprozesses möglich. In Abbildung III-60 ist das berechnete Restfeuchtesignal aus den NIR Spektren gegen den Trocknungsverlauf aufgetragen.

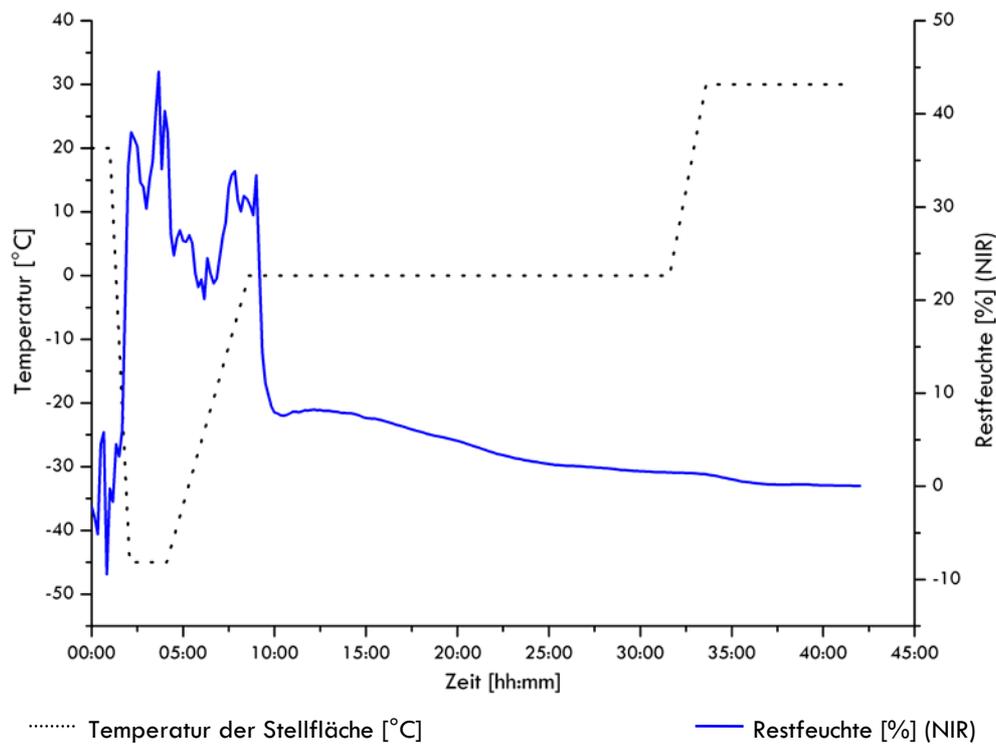


Abbildung III-60 Der Verlauf der Restfeuchte berechnet mit Hilfe der NIR Spektren über die Zeit. (Saccharose 5% 3ml, 10R Vial)

Deutlich ist hier, wie zu Beginn des Kapitels schon beschrieben, die qualitative Änderung des Spektrums in den ersten zehn Stunden anhand des nicht stabilen Restfeuchtesignals zu sehen.

Betrachtet man den weiteren Verlauf der Trocknung ab zehn Stunden, erscheinen die berechneten Restfeuchtedaten logisch. Gegen Ende der Primärtrocknung ähnelt der Verlauf der Restfeuchte dem Messsignal des Massenspektrometers. Nach einem steilen Abfall der Messkurve (Abbildung III-61 Abschnitt I) flacht die Steigung ab, und das Messsignal sinkt nur noch leicht bis zum Beginn der Sekundärtrocknung (Abbildung III-61 Abschnitt II). Dieser Knick in der Messkurve ist indirekt mit dem Ende der Primärtrocknung gleichzusetzen.

Da die NIR-Strahlung nicht bis zum Eiskern vordringen kann, ist eine Messung der gesamten Restfeuchte nicht möglich. Die gemessenen Daten geben direkt die Restfeuchte im Bereich nahe der Glaswand wieder. Wird die Restfeuchte des ganzen Vials betrachtet, liegt sie aufgrund des Eiskerns deutlich höher.

Der Knick in der Messkurve kann durch einen, beim Schrumpfen des Eiskerns im Laufe der Trocknung von außen nach innen, entstehenden Temperaturgradient erklärt werden. Die Temperatur des Vials und die der Schichten des Kuchens am Rand des Vials nähern sich in dem Maße der Stellflächentemperatur an, in dem der Eiskern sich in die Mitte des Vials zurückzieht. Dadurch wird mehr Energie in Form von Wärme in diesem Bereich für eine Desorption verfügbar und das leicht gebundene Wasser wird verdampft (Abbildung III-61 Abschnitt III). Mit Erreichen der Stellflächentemperatur ist ein konstantes Energieniveau erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist schon der größte Teil des leicht gebundenen Wassers, was bei dieser Temperatur schnell entfernt werden kann, verdampft. Die Desorption wird deutlich langsamer, was in den Messdaten auch deutlich zu sehen ist (Abbildung III-61 Abschnitt IV).

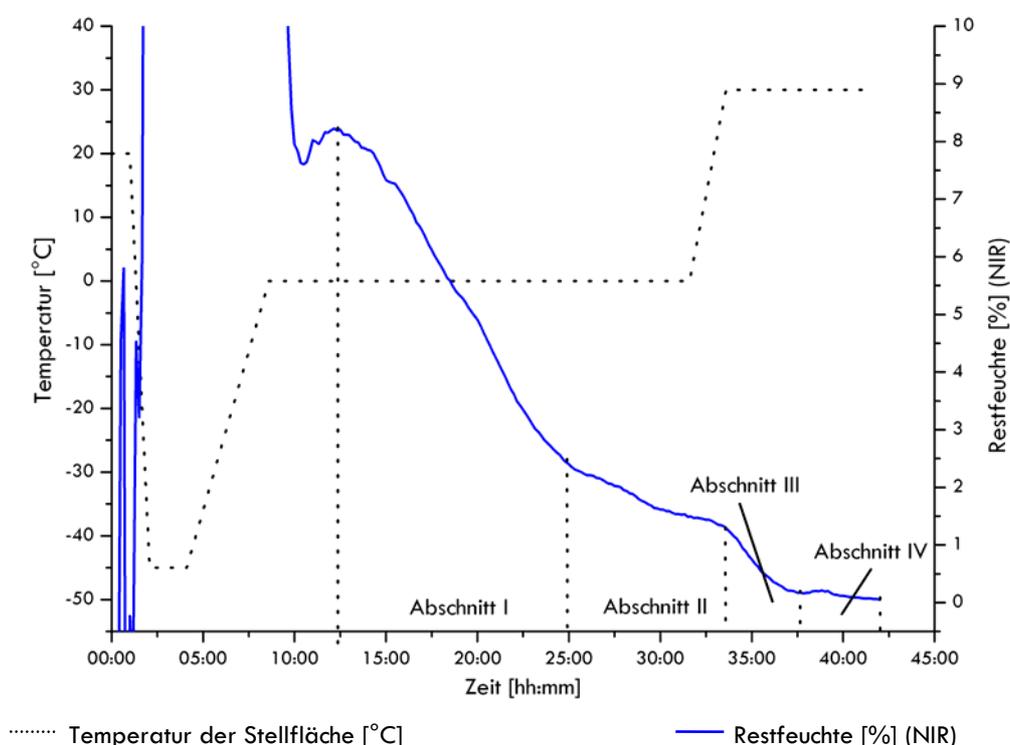


Abbildung III-61 Der Verlauf der Restfeuchte über die Zeit, vergrößert (Saccharose 5% 3ml, 10R Vial)

Der Knick in der Messkurve sollte auf keinen Fall ohne Sicherheitszuschlag als Schaltkriterium zur Steuerung der Gefriertrocknung verwendet werden, da keine direkte Messung des Eises erfolgt und mit der Messung nur eines Vials nicht die Bandbreite individuell unterschiedlichen Trocknungen erfasst wird. Die Genauigkeit bezüglich des Endes der Primärtrocknung ist mit einem nicht zentral gesetzten Temperaturfühler zu vergleichen, und damit nicht befriedigend. (Siehe Kapitel III.1.3.3)

Mit dem Beginn der Sekundärtrocknung wird die Trocknungstemperatur weiter erhöht. Mit zunehmender Temperatur lässt sich beobachten, wie die Restfeuchte schnell absinkt, solange bis der Kuchen wieder eine konstante Temperatur aufweist. Ab diesem Zeitpunkt sinkt die Restfeuchte wieder sehr langsam. Die Sekundärtrocknung ist beendet.

3.3.3. Reproduzierbarkeit

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit des Messsignals wurden zwei identische Gefriertrocknungsläufe durchgeführt. Abbildung III-62 zeigt die Verläufe der Restfeuchte einer Saccharoseformulierung.

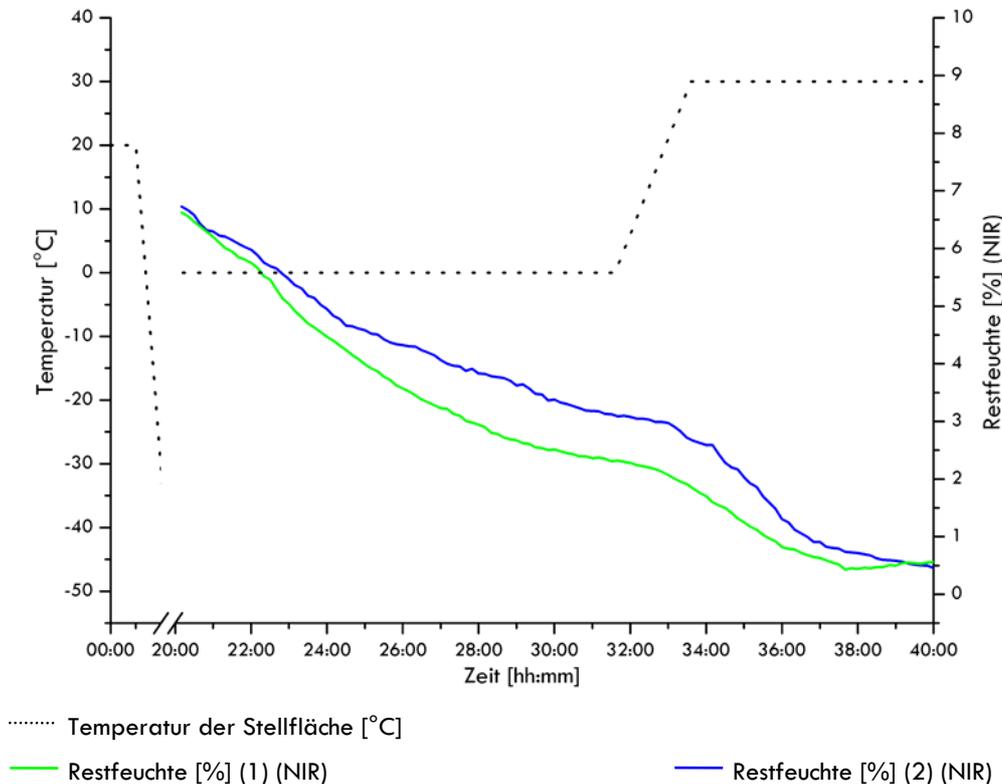


Abbildung III-62 Verlauf der Restfeuchte (NIR) von zwei identischen Gefriertrocknungsläufen

Der Ablauf der Trocknung ist in seinen Grundzügen bei beiden Gefriertrocknungsläufen gleich. Der Unterschied in den Restfeuchtedaten hängt, genau wie bei den Temperaturfühlern, mit einer individuellen Trocknung jedes Vials zusammen. Am Ende der Trocknung werden die gleichen Restfeuchten erreicht.

3.4. Vergleich mit Standardmessmethoden

Zum Vergleich der durch die NIR Spektroskopie bestimmten Restfeuchte mit den Standardmethoden, Temperaturmessung und Druckmessung, wurde jede Stellfläche mit 60 Vials in identischer Anordnung beladen. In Abbildung III-63 und Abbildung III-64 ist der direkte Verlauf der Restfeuchte im Vergleich zu den Messsignalen der Temperaturfühler und der Komparativen Druckmessung dargestellt.

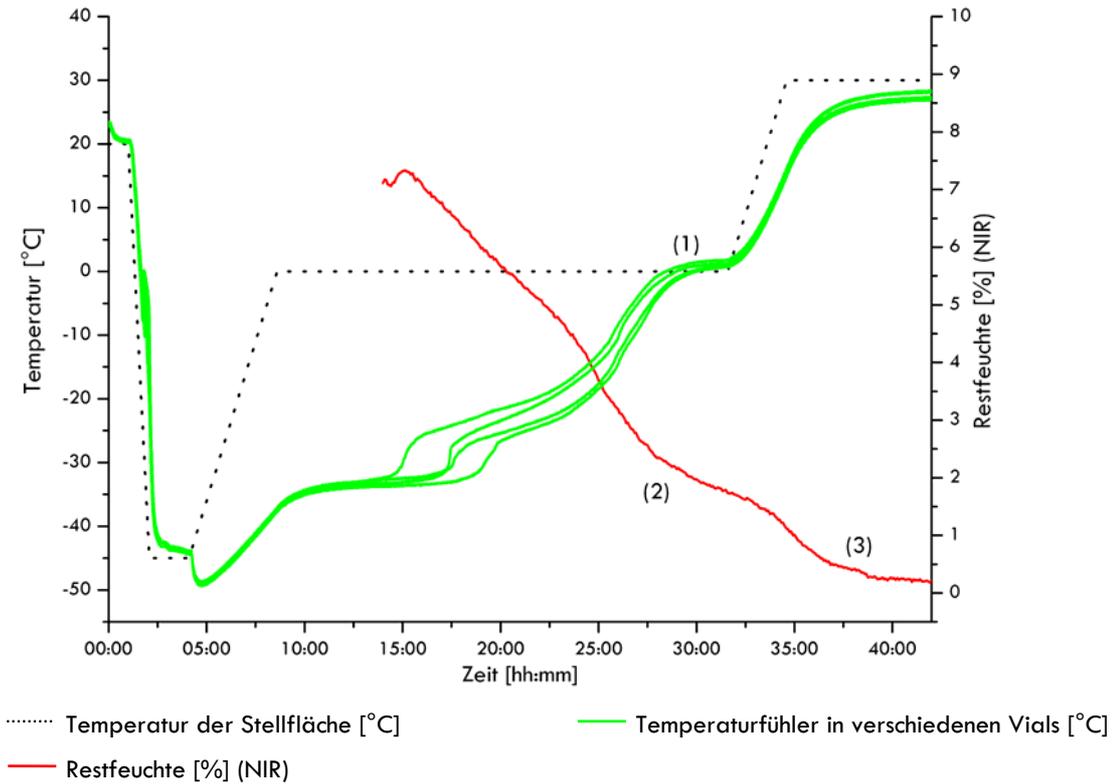


Abbildung III-63 Verlauf der Restfeuchte (NIR) im Vergleich zum Temperatur-Zeitverlauf von Temperaturfühlern in der Mitte der Stellfläche. (Saccharose 5%, 3ml, 10R Vial)

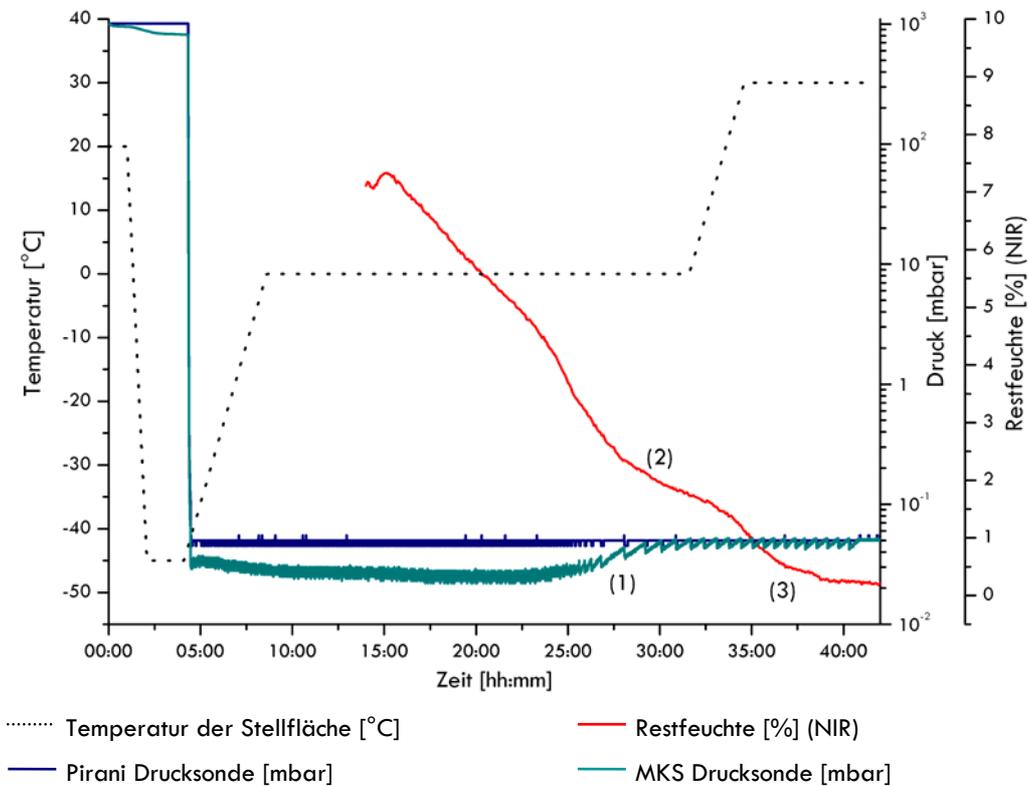


Abbildung III-64 Verlauf der Restfeuchte (NIR) im Vergleich zur Komparativen Druckmessung. (Saccharose 5%, 3ml, 10R Vial)

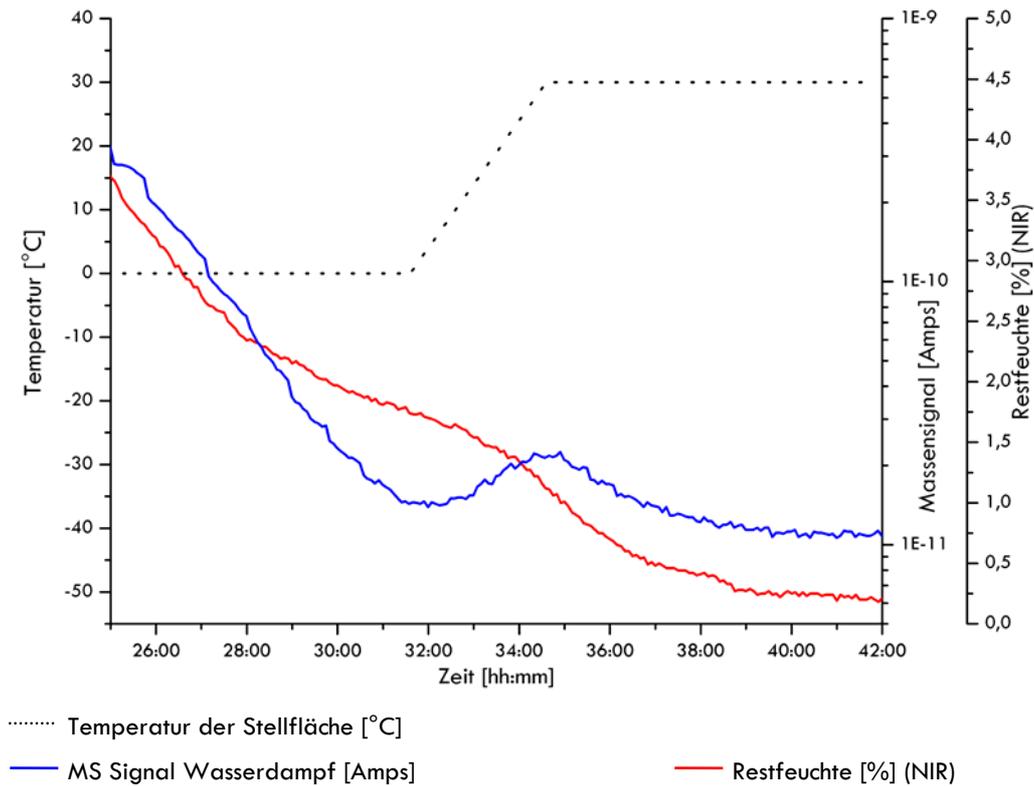


Abbildung III-66 Vergrößerte Darstellung des Verlaufes der Restfeuchte (NIR) in der Sekundärtrocknung im Vergleich zum Massensignal des Wasserdampfes. (Saccharose 5%, 3ml, 10R Vial)

Damit ist die Nah Infrarot Spektroskopie eine geeignete Messmethode zur Überwachung des Endes der Primärtrocknung und zur Detektion des Endes der Sekundärtrocknung. Durch die Messung der Restfeuchte im Vial sollte es damit möglich sein, das Ende der Sekundärtrocknung in Abhängigkeit einer bestimmten Restfeuchte gezielt festzulegen.

Damit wäre die NIR Spektroskopie die erste Online Messmethode, die durch eine direkte Messung der Restfeuchte ein genaues Ansteuern einer bestimmten Restfeuchte ermöglicht.

3.5. Gezielte Einstellung der Restfeuchte

Zur Überprüfung der durch die Nah Infrarot Spektroskopie im Vial berechneten Restfeuchte auf die Gesamtheit der Vials im Gefriertrockner, wurde die Trocknung bei einem bestimmten Restfeuchtelevel abgebrochen, und Proben gezogen. Von allen Proben wurde zuerst ein NIR Spektrum aufgezeichnet, und dann die Restfeuchte mit Karl-Fischer Titration bestimmt.

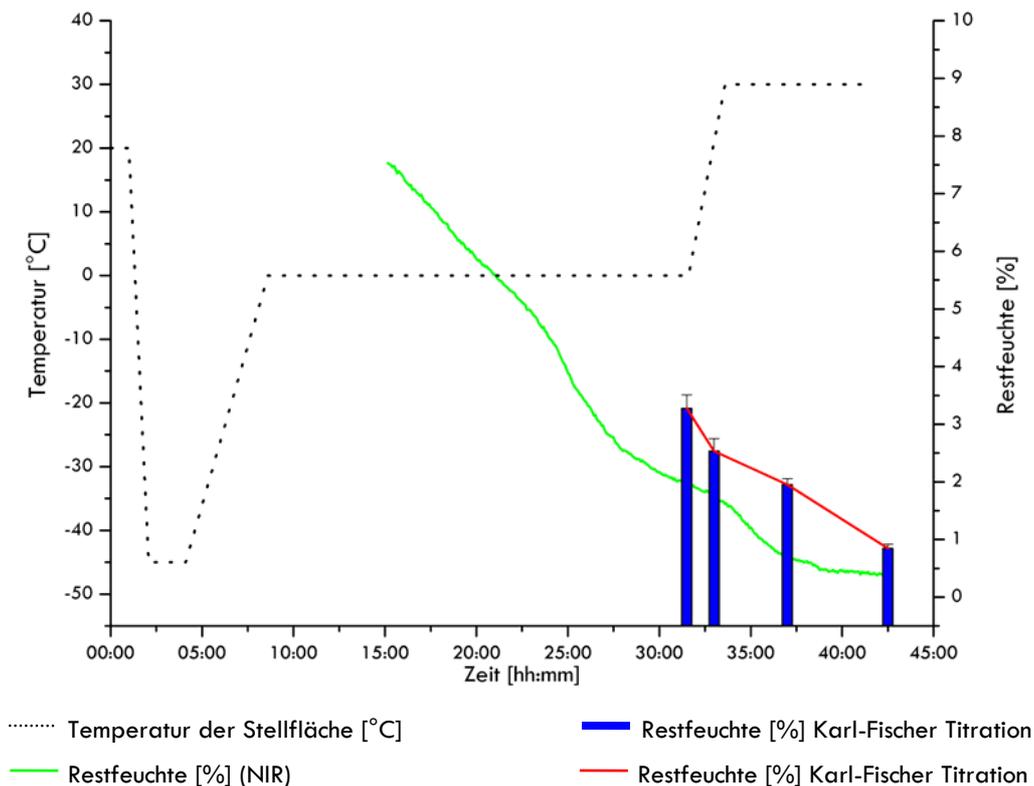


Abbildung III-67 Restfeuchteverlauf berechnet mit Hilfe der NIR Spektren im Vergleich zu Restfeuchtedaten nach Probenzug bestimmt durch Karl-Fischer (Saccharose 5%, 3ml, 10R Vial)

Aus Gründen der Darstellung wurde exemplarisch ein Versuch ausgewählt. Die Daten der anderen Versuche aus dieser Reihe zeigten ähnliche Ergebnisse. Der in Abbildung III-67 dargestellte Verlauf der berechneten Restfeuchte aus den NIR Spektren liegt deutlich unterhalb der nach Karl-Fischer bestimmten Restfeuchte. Der Unterschied kann teilweise mit einer inhomogenen Trocknung zwischen den Vials und auch innerhalb eines Vials begründet werden.⁹⁵ Ähnlich der Primärtrocknung verläuft in der Sekundärtrocknung die Trocknung auch von oben nach unten und von den Seitenwänden zur Mitte des Kuchens. Damit eilt die berechnete Restfeuchte aus den NIR Spektren dem Trocknungsverlauf voraus. Dieser Unterschied von anfangs mehr als einem Prozent reduziert sich gegen Ende der Sekundärtrocknung auf ca. 0,4%. Erklärt werden kann dieser Unterschied durch den Temperaturgradienten im Kuchen und der damit verbundenen inhomogenen Trocknung. Im

Verlauf der Sekundärtrocknung verringert sich dieser Temperaturgradient und damit auch die Unterschiede in der Restfeuchte zwischen den Randgebieten und der Mitte des Vials.⁹⁵

Neben der inhomogenen Trocknung spielt auch die Rückbefeuchtung, durch im Stopfen gebundenes Wasser, eine Rolle.^{25,94} Je nach Lagertemperatur und Zeitraum ist ein Anstieg der Restfeuchte zu beobachten, was zu einer Verfälschung zwischen dem errechneten NIR Spektrum und der mit Karl-Fischer Titration bestimmten Restfeuchte führen kann.

Zur Untersuchung der Veränderung der Restfeuchte über die Zeit wurde ein Vial direkt nach dem Trocknungsprozess verschlossen, und NIR Spektren über einen Zeitraum von 24 Stunden in stündlichem Rhythmus aufgezeichnet (Abbildung III-68).

Gleichzeitig wurden aus jeder der drei Stellflächen zehn Proben gezogen und von einer Hälfte sofort die NIR Spektren der Proben aufgezeichnet. Von der anderen Hälfte der Proben wurde die Restfeuchte mit Karl-Fischer Titration bestimmt. Nach zwei Wochen Lagerung bei Raumtemperatur wurden die NIR Spektren erneut aufgezeichnet, und anschließend von diesen Vials die Restfeuchte nach Karl-Fischer bestimmt (Abbildung III-69).

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Restfeuchteverteilung innerhalb eines Vials gegenüber der Zunahme der Restfeuchte über die Lagerdauer abzugrenzen.

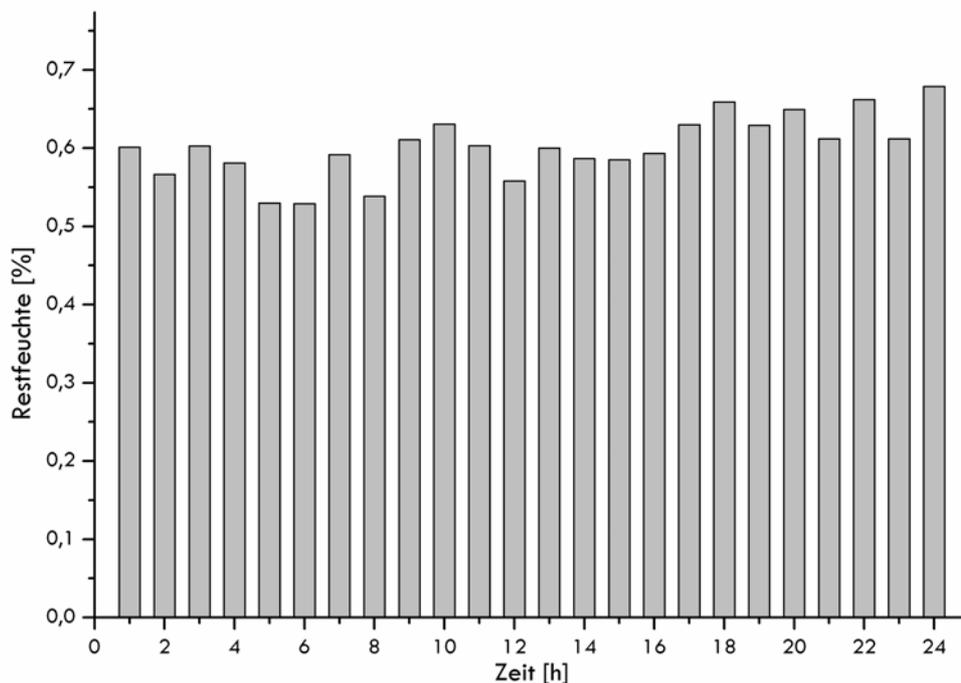


Abbildung III-68 Veränderung der Restfeuchte in Abhängigkeit von der Zeit

Innerhalb von 24 Stunden ändert sich die berechnete Restfeuchte im Vial minimal. Jedoch über einen Zeitraum von zwei Wochen betrachtet, ist eine Erhöhung der Restfeuchte, berechnet aus den NIR-Spektren, um 0,4% zu detektieren (Abbildung III-69). Diese Differenz in der Restfeuchte lässt sich wie folgt aufschlüsseln:

Direkt nach der Trocknung unterscheiden sich die Restfeuchtedaten aus NIR und Karl-Fischer um ca. 0,25%, was auf eine inhomogene Restfeuchteverteilung schließen lässt, und damit durch die NIR-Sonde nicht erfassbar ist.

Im Laufe von zwei Wochen ist auch ein Anstieg der durch Karl-Fischer bestimmten Restfeuchte zu beobachten. Dieser Anstieg von ca. 0,1% ist auf die Freisetzung von Wasser aus dem Stopfen zurückzuführen. Dies zeigt auch die Tatsache, dass die Karl-Fischer Daten und die aus den NIR-Spektren errechneten Restfeuchten gleich sind, was auch auf eine Equilibrierung der Restfeuchte innerhalb des Vials hindeutet.

Diese Differenz von 0,4% setzt sich somit aus ca. zwei Drittel inhomogen verteilter Restfeuchte innerhalb des Kuchens und aus einem Drittel aus dem Stopfen freigesetzte Restfeuchte zusammen.

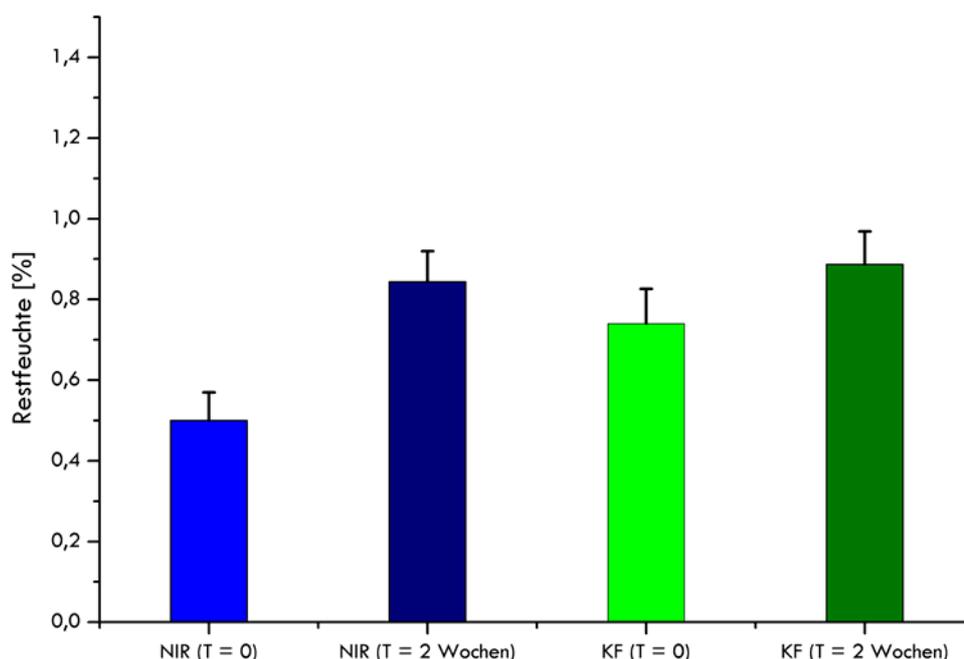


Abbildung III-69 Vergleich der Restfeuchtedaten, bestimmt durch NIR-Spektroskopie und durch Karl-Fischer Titration zu unterschiedlichen Zeitpunkten (n=15).

Die durch die NIR-Spektren berechneten Restfeuchten der Saccharoseformulierung sind somit der Trocknung um ca. 0,2% bis 0,3% voraus. Die Detektion der schneller trocknenden Bereiche kann gerade bei Proteinformulierungen auch von Vorteil sein. Da die Stabilität von Proteinen oft mit einer optimalen Restfeuchte verknüpft ist, kann es durch Übertrocknung zu einem Aktivitätsverlust kommen⁹⁵. Durch Detektion dieser Bereiche kann die Trocknung rechtzeitig abgebrochen werden, bevor durch Übertrocknung Schaden entsteht.

3.6. Auswertung anderer Formulierungen

Da zu jeder Formulierung eine zeitaufwendige Kalibrierung erforderlich ist, die gerade im Entwicklungsstadium allein schon aus Materialgründen nicht möglich ist, wurde untersucht, ob eine Standardkalibration auf verschiedene Formulierungen anwendbar ist. In einer Versuchsreihe wurden Spektren verschiedener Gerüstbildner während des Gefriertrocknungsprozesses aufgezeichnet, und mit der für Saccharose erstellten Kalibration die Restfeuchte berechnet.

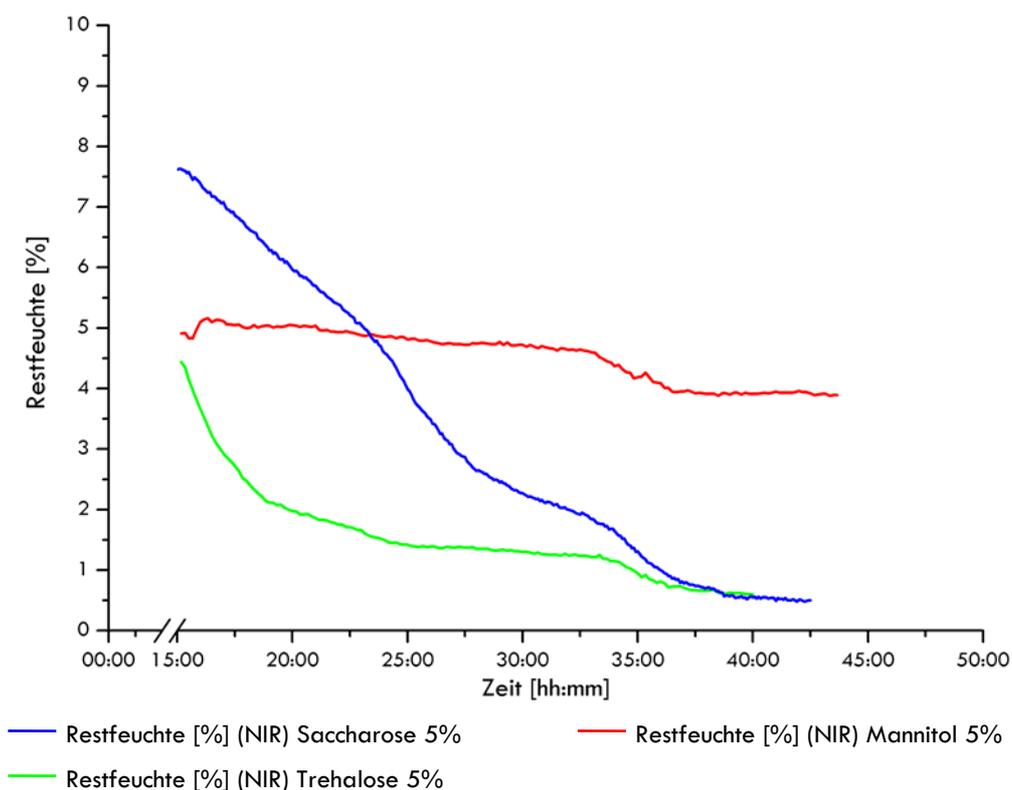


Abbildung III-70 Aus den Spektren berechnete Restfeuchten mit Hilfe der Kalibration bei Saccharose.

Wie Abbildung III-70 zeigt, ist es möglich die Trocknung tendenziell darzustellen. Die große spektrale Ähnlichkeit zwischen Saccharose und Trehalose (Abbildung III-71) führt zu einem plausibel berechneten Trocknungsverlauf, und die errechneten Restfeuchten entsprechen den mit Karl-Fischer Titration bestimmten Restfeuchten (Abbildung III-72). Im Gegensatz dazu, zeigt die Berechnung aus den Spektren des Mannitols trotz der spektralen Ähnlichkeit (Abbildung III-71) einen deutlichen Unterschied. Der deutlich höhere Restfeuchtegehalt hängt mit der anderen Kuchenstruktur und einem daraus resultierenden stärkeren Offset der Spektren zusammen, der nicht in der Kalibration berücksichtigt ist.

Trotzdem kann auch die wasserabhängige Veränderung des Spektrums durch die Kalibration erfasst werden, und die Berechnung resultiert in einem der Saccharose ähnlichen Kurvenverlauf mit einem Wasserverlust zu Beginn der Sekundärtrocknung.

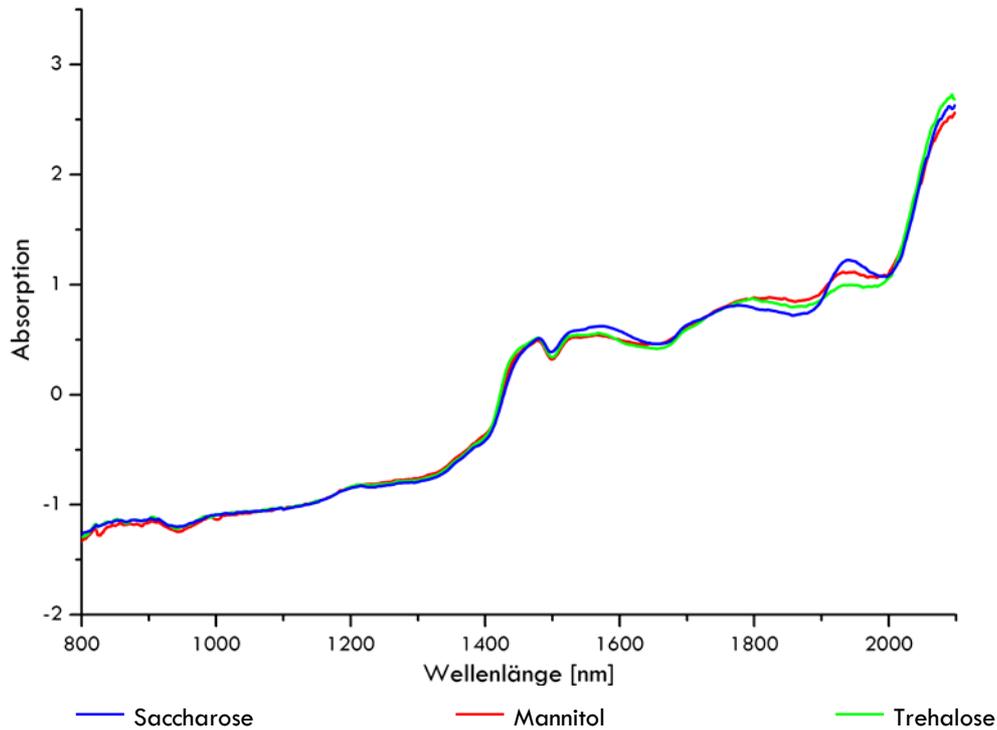


Abbildung III-71 NIR-Spektren eines Saccharose-, Mannitol- und Trehalose-Lyophilisates

Die Berechnung der Restfeuchte mit knapp vier Prozent liegt jedoch deutlich über den mit Karl-Fischer Titration bestimmten Restfeuchten (Abbildung III-72).

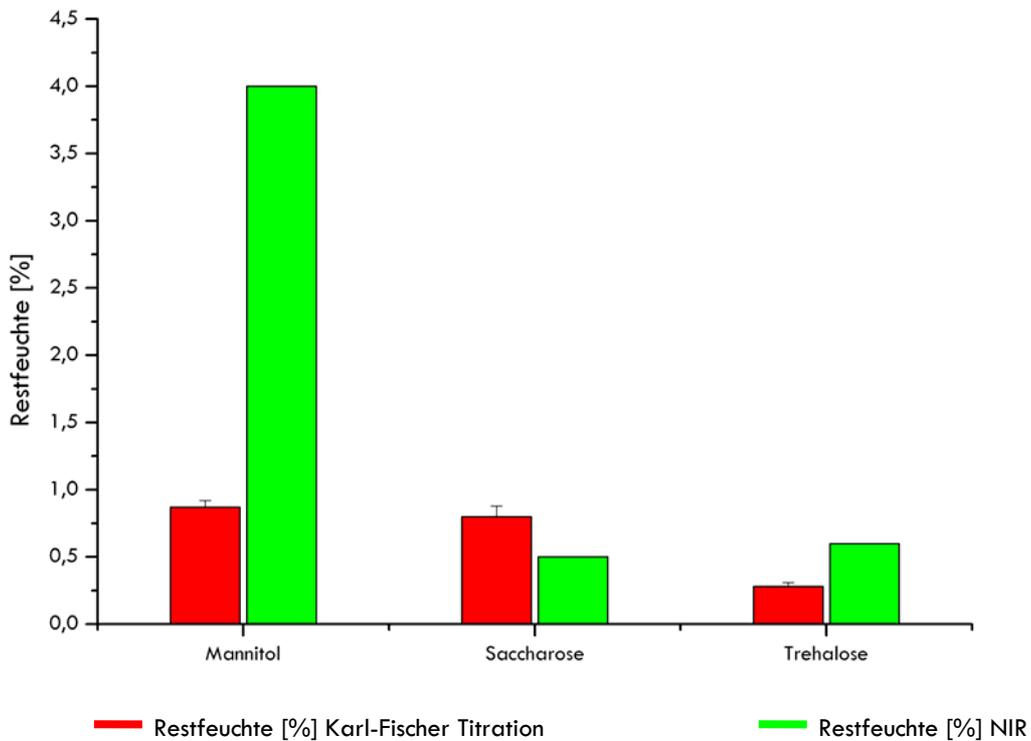


Abbildung III-72 Vergleich der Restfeuchtedaten aus NIR und Karl-Fischer Titration von verschiedenen Gerüstbildnern (n=10).

3.7. Beurteilung des Nah Infrarot Spektrometers

Mit der direkten Messung der Restfeuchte während der Trocknung bietet das Nah Infrarot Spektrometer völlig neue Möglichkeiten. Wie gezeigt werden konnte, ist es trotz einer Eindringtiefe von max. 5mm möglich⁷⁷, sowohl das Ende der Primärtrocknung, als auch das Ende der Sekundärtrocknung mit einer definierten Restfeuchte bei Messung durch die Seitenwand des Vials zu bestimmen.

Eine alternative NIR Online Messvariante wurde parallel von Bruells et al. Entwickelt.¹⁰ Die Spektren wurden mit einer Messsonde, die direkt von oben durch die Öffnung des Vials in das Produkt gesteckt wird, aufgezeichnet. Diese Methode ermöglicht eine genauere Bestimmung der Primärtrocknung, da in der Zone der langsamsten Trocknung gemessen wird.

Durch den direkten Kontakt mit dem Produkt ist jedoch eine Veränderung der Trocknung, wie sie bei den Temperaturfühlern bekannt ist, wahrscheinlich. Ebenso erscheint ein automatisches Verschließen der Vials aufgrund der Sondenführung schwierig.

Die durch das NIR Spektrometer detektierte, leicht schnellere Trocknung der Randbereiche im Vial (Differenz von 0,4% bis 1%) ist für die Einstellung der Restfeuchte zu betrachten. Je höher die gewünschte Restfeuchte ist, desto stärker ist diese Differenz ausgeprägt. Der Grund liegt in der inhomogenen Trocknung des Kuchens. Durch einen Temperaturgradienten im Kuchen trocknen die Bereiche am Rand schneller, was zu dieser Messdifferenz führt.

Bei Lagerung der Vials über einen Zeitraum von zwei Wochen verteilt sich die Restfeuchte homogen, wodurch eine Offline Messung auch durch die Seitenwand des Vials mit hoher Genauigkeit möglich ist.

Interessant wäre die Möglichkeit den inhomogenen Trocknungsverlauf in die Kalibration mit aufzunehmen. Da Faktoren wie die Glasdicke und der Kuchendurchmesser mit einfließen wäre diese Kalibration wahrscheinlich nur für eine bestimmte Vialgröße gültig.

Besonders die Prozessentwicklung lässt sich mit Hilfe dieser neuen Online Messmethode deutlich beschleunigen. Neben der besseren Prozessüberwachung und der Bestimmung der Prozessparameter innerhalb weniger Läufe, ist es für Stabilitätsstudien möglich, gezielt Restfeuchten anzusteuern, was besonders für Proteinformulierungen von hohem Interesse ist. Gleichzeitig bietet das NIR- Spektrometer die Möglichkeit, durch Messung des schnell trocknenden Bereiches am Rand des Kuchens eine Übertrocknung des Kuchens rechtzeitig zu erkennen.

Aus diesen Gründen ist das Nah Infrarot Spektrometer ein ideales Entwicklungstool. Auch bei einem Scale-Up oder Transfer zwischen verschiedenen Gefriertrocknungsanlagen, ist das NIR-

Spektrometer besonders zur Bestimmung der Sekundärtrocknungszeit vorteilhaft. Durch die Sterilisierbarkeit der Messsonde ist der Einsatz in aseptischen Produktionsbereichen möglich.

Um die Aussagekraft der Messwerte zu erhöhen, ist die Verwendung von mehreren Sonden zu empfehlen. Durch den sehr hohen Anschaffungspreis des Spektrometers und der Messsonden sind hier aber sehr schnell Grenzen gesetzt.

Die aufwendige Kalibrierung des NIR-Spektrometers für jede Formulierung ist ein großer Nachteil dieser Messmethode. Wie von Last und Prebble am Beispiel von Formulierungen mit unterschiedlichem Wirkstoffgehalt gezeigt, und im Rahmen dieser Arbeit durch Versuche mit unterschiedlichen Gerüstbildnern bestätigt, ist es möglich, mit einer ‚falschen‘ Kalibrierung, Trends in der Restfeuchte von anderen Formulierungen zu bestimmen.⁷¹ Zur Prozessentwicklung sind die Trends oft ausreichend, um schnell einen groben Trocknungsprozess festzulegen.

Aufgrund des hohen Anschaffungspreises und einer notwendigen manuellen Platzierung, wie bei Temperaturfühler in die Trocknungskammer, ist das NIR-Spektrometer als Routinemessgerät für die Produktion wenig geeignet.

IV. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit innovativen Online Messverfahren zur Überwachung und Optimierung der Gefriertrocknung. Ziel ist es, mit Hilfe dieser Online Messsysteme genauere Informationen über den Verlauf und das Ende der Primär- und Sekundärtrocknung zu erhalten, wodurch eine Optimierung bestehender Prozesse, eine deutliche Vereinfachung der Steuerung sowie Beschleunigung der Entwicklung neuer Prozesse möglich ist.

Nachteilig bei der Gefriertrocknung sind vor allem die hohen Betriebskosten, verursacht durch meist lange Prozesszeiten.³² Aufgrund der schonenden Trocknung ist sie jedoch zur Stabilisierung von empfindlichen Arzneistoffen die Methode der Wahl, wie zum Beispiel bei Proteinen.⁷⁴ Gerade bei Zuckermatrices, die zu amorphen Strukturen führen sollen und zur Stabilisierung der Proteine besonders interessant sind, ist eine Trocknung bei tiefen Temperaturen unterhalb der Kollapstemperatur und damit eine langsame Trocknung notwendig.⁸⁷

Online Messsysteme sollten in der Lage sein, ein robustes Messsignal über den Zustand des Produktes, oder den daran abgeleiteten physikalischen Größen in der Trocknungskammer, zu liefern und das Ende von Primär- und Sekundärtrocknung exakt zu erkennen. So kann durch Elimination unnötiger Trocknungszeiten die Prozesszeit optimiert werden.

Die eingesetzten Standard Messmethoden, wie beispielsweise die Temperaturmessung im Vial, die Komparative Druckmessung oder der Druckanstiegstest, liefern kein Signal zur Überwachung der Sekundärtrocknung oder stellen bei falscher Anwendung ein Risiko für das Produkt dar. Durch einen zu früh angesetzten Druckanstiegstest kann es zu einem zu starken Druckanstieg in der Trocknungskammer kommen und die daraus resultierende Erhöhung der Produkttemperatur kann zu kollabierten Strukturen im Produkt führen. Ein Risiko für aseptische Prozesse entsteht durch Platzierung von Temperaturfühlern in der Trocknungskammer und behindert den Einsatz dieser Methode dort, wo sie besonders wichtig wäre, in der Mitte der Stellfläche.

Der Trocknungsprozess kann auch durch das Messsystem beeinflusst werden und die sonst passenden Daten stellen eigentlich Artefakte dar oder sind zumindest nicht repräsentativ. Klassisches Beispiel ist der Temperaturfühler im Vial, der eine Unterkühlung vermindern und dadurch teilweise die Strukturen und damit die Trocknung verändern kann.⁹⁰

Mit dem Wägesystem der Fa. Christ stand für die Arbeit ein Online Messsystem zur Verfügung, das mit der Messung des Gewichtsverlustes über die Zeit einen scharfen Endpunkt der Primärtrocknung und eine leicht in die Restfeuchte umzurechnende Größe liefert.¹⁰⁹

Aufgrund dieser Tatsache sollte eine automatische Umschaltung von der Primär- in die Sekundärtrocknung, basierend auf den Daten des Wägesystems, etabliert werden. Zunächst wurde ein Computerprogramm entwickelt, das eine automatische Auswertung der Daten ermöglicht.

Mit Hilfe eines Makros wurde ein Werkzeug geschaffen, das neben der Auswertung durch Berechnung des Endpunktes, d.h. durch Bildung der zweiten Ableitung über die Zeit, die Daten automatisch grafisch darstellt und die weitere Nutzung der Daten deutlich vereinfacht.

Bei Versuchen mit voll beladenen Gefriertrocknungsanlagen zeigte sich, dass die Waage durch Wärmestrahlung den Trocknungsprozess des Messvials und der umliegenden Vials deutlich beschleunigt. Dadurch ist eine Verwendung des Wägesystems als alleinige Steuerung voll beladener Gefriertrocknungsprozesse ungeeignet. Zudem ist das Wägesystem nicht sterilisierbar und damit für aseptische Prozesse ungeeignet.

Trotzdem ist die Messung der Sublimationsgeschwindigkeit während der Primärtrocknung mit einem deutlichen Endpunkt für die Prozessentwicklung sehr wertvoll. Durch Einbindung des Wägesystems in die Steuerung der Gefriertrocknung sollte es in Kombination mit dem Auswertungsprogramm möglich sein, in kurzer Zeit die Primärtrocknung bei unbekanntem Prozess im Small Scale Maßstab zu entwickeln und zu optimieren.

Mit dem Massenspektrometer stand ein Online Messgerät zur Verfügung, das nicht individuelle Einheiten sondern die Gesamtheit der zu trocknenden Objekte in einem System bewerten kann. Von Connelly et al. wurde 1993 gezeigt, dass die Massenspektrometrie zur Detektion des Endpunktes der Primärtrocknung erfolgreich eingesetzt werden kann.²⁴

Das Massenspektrometer, das ähnlich den Drucksonden an die Trocknungskammer angeflanscht wird, zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus und stört die Trocknung in keiner Weise. Es konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, neben der Primärtrocknung auch den Verlauf der Sekundärtrocknung durch Messung des Wasserdampfgehaltes in der Trocknungskammer zu detektieren. Ein direkter Vergleich des detektierten Endes der Primärtrocknung zwischen Temperaturfühlern, Komparativer Druckmessung und dem Massenspektrometer zeigte eine sehr gute Übereinstimmung. Für die Bewertung der Sekundärtrocknung wurde das erhaltene Massensignal mit einem durch Probenzug erstellten Restfeuchteverlauf verglichen und zeigte ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung.

Zur Auswertung des Messsignals wurde ein Computerprogramm entwickelt, welches Endpunkte von sowohl Primär- als auch Sekundärtrocknung automatisch berechnet.

Um das Einsatzgebiet des Massenspektrometers auf aseptische Gefriertrocknungsprozesse auszuweiten, wurde untersucht, ob ein Sterilfilter zwischen Gefriertrocknungsanlage und Massenspektrometer geschaltet werden kann, ohne dass der Filter einen Einfluss auf den Verlauf des Massensignals hat. Der positive Ausgang dieses Versuches zeigt die Möglichkeit

auf, zukünftig auch aseptische, validierbare Gefriertrocknungsprozesse mit dem Massenspektrometer zu überwachen oder gezielt zu steuern.

Das Massenspektrometer ist damit ein für den gesamten Verlauf der Gefriertrocknung einsetzbares Online Messverfahren. Aufgrund seiner Mobilität, der einfachen Anschlussmöglichkeit und der Einsatzmöglichkeit auch bei aseptischen Prozessen ist die Massenspektrometrie für die Prozessentwicklung sowie den Transfer und Scale-up ein ideales Online Messsystem.

Als nächsten Schritt wäre die Kopplung des Massenspektrometers mit der Steuerung der Gefriertrocknungsanlage denkbar, um eine selbständige Steuerung von sowohl der Primär- als auch der Sekundärtrocknung zu ermöglichen.

Allen bislang verwendeten Online Messsystemen gemeinsam ist, dass durch Messung einer Ersatzgröße auf den Trocknungsverlauf, d.h. den Wassergehalt, im Vial geschlossen wird. Besonders wünschenswert wäre eine Methode, welche die Restfeuchte im Vial direkt messbar machen würde.

Mit der Wahl der Nah Infrarot Spektroskopie als Methode zur direkten Bestimmung der Restfeuchte, sollte eine solche neue Form der Online Messung entwickelt werden.

In der Literatur war zuvor gezeigt worden, dass eine Restfeuchtebestimmung mittels NIR durch den Boden des zuvor getrockneten und verschlossenen Glasvials offline möglich ist.^{31,58,59,71,75}

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Foss (D-Hamburg) eine NIR Messsonde entwickelt, die während des Gefriertrocknungsprozesses durch die Seitenwand des Vials NIR Spektren aufzeichnen kann.

Durch die kompakte Bauweise der Sonde und der Probenhalterung wurden die messsystembedingten Einflüsse auf die Trocknung minimiert.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Kalibration der Methode Messungen von Lyophilisaten durch die Seitenwand des Vials mit Restfeuchtwerten gut korrelieren, die nach Karl-Fischer Titration bestimmt wurden.

Bei der Online Messung direkt in der Trocknungskammer konnte eine leichte Temperaturabhängigkeit der Spektren festgestellt werden, die aber aufgrund des geringen Ausmaßes zu vernachlässigen ist.

Durch die geringe Eindringtiefe von maximal fünf Millimetern ist die Detektion des Endes der Primärtrocknung nicht direkt möglich.⁷⁷ Mit der Bestimmung der Restfeuchte im äußeren Bereich des Vials, die direkt von der Temperatur und damit von der Kühlung durch das sublimierende Eis abhängt, lässt sich ein nur unscharfer Endpunkt für die Primärtrocknung bestimmen. In einem Vergleich der Endpunkte wie sie aus Temperaturmessungen oder Komparativer Druckmessung erhalten wurden, konnte dies bestätigt werden.

Interessanterweise ist die Berechnung eines Restfeuchteverlaufes in der Sekundärtrocknung möglich. Im Vergleich zu den Daten des Massenspektrometers zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Messsignale. Eine Überprüfung durch Erstellung einer Trocknungskinetik mittels Probenzug zeigte eine Differenz in der absoluten Restfeuchte zwischen 1% und 0,4% im Vergleich zur Karl-Fischer Titration auf. Diese Differenz ist durch die inhomogene Trocknung des Kuchens begründet. Nach einer Wartezeit verteilt sich die Restfeuchte homogen im Kuchen und die mit Hilfe der NIR Spektren berechnete Restfeuchte gleicht sich dem Messwert nach Karl-Fischer an.

Die direkte Messung der Restfeuchte während der Trocknung durch die NIR Spektroskopie ermöglicht es, gezielt eine bestimmte Restfeuchte anzusteuern. Dabei ist allerdings die oben genannte Aberration der Messwerte, bedingt durch die inhomogene Trocknung, zu berücksichtigen. Nach Kalibration auf eine bestimmte Rezeptur und Vialgeometrie sollte dies quantitativ möglich sein.

Umgekehrt kann durch Messung der trockensten Stellen eine Übertrocknung verhindert werden. Für Proteine gibt es in der Regel ein Restfeuchteoptimum, in dem sie die maximale Lagerstabilität zeigen.⁴⁹

Durch Auswertung von NIR Spektren anderer Formulierungen mit der Saccharosekalibrierung konnte bei gleichem Spektrum und gleicher amorpher Kuchenstruktur ein Ergebnis nahe den Karl-Fischer Daten erzielt werden (z.B. Trehalose). Eine Veränderung der Kuchenstruktur, wie zum Beispiel die kristalline Struktur von Mannitol, hingegen wirkte sich deutlich auf das errechnete Ergebnis der Restfeuchten aus. Der Verlauf der Trocknung konnte aber tendenziell bestimmt werden.

Parallel zu dieser Arbeit wurde von Bruells et al. ebenfalls ein Online NIR Messsystem entwickelt.¹⁰ Die Messung bei diesem System erfolgt durch Einbringen der Messsonde über die Vialöffnung direkt von oben in das Produkt. Nachteil dieses Versuchsaufbaus ist die Beeinflussung der Trocknung durch die Sonde im Produkt. Ebenso treten durch die Sondenführung Probleme beim automatischen Verschließen der Vials auf.

Ein interessanter Ansatz, der von Bruells et al. untersucht wurde, ist die Beurteilung des Einfriervorgangs durch die Veränderung der Spektren.

Abschließend kann man festhalten, dass durch die Entwicklung der NIR Online Messmethode erstmals eine direkte Betrachtung der eigentlichen Zielgröße (Restfeuchte) möglich ist, die geringe Eindringtiefe relativiert jedoch den Einsatz bei großvolumigen Gebinden beträchtlich.

Optimal erscheint die Anwendung einer Kombination aus Massenspektrometrie zur Detektion des Endpunktes der Primärtrocknung und aus NIR Spektroskopie zur Bestätigung der erzielten Restfeuchte am Ende der Sekundärtrocknung.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Adams, G. D.; Irons, L. I. Some implications of structural collapse during freeze-drying using *Erwinia caratovora* L-asparaginase as a model. *J Chem. Technol. Biotechnol.* **1993**, *58*, 71-76.
- [2] Adams, G. D.; Ramsay, J. R. Optimizing the lyophilization cycle and the consequences of collapse on the pharmaceutical acceptability of *Erwinia* L-asparaginase. *J Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1301-1305.
- [3] Akers, M. J.; Milton, N.; Byrn, S. R.; Nail, S. L. Glycine crystallization during freezing: the effects of salt form, pH, and ionic strength. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1457-1461.
- [4] Anja Kempf. Kempf Präparationstechnik International. <http://www.kempf-fische.de/home.html> . **2003**.
- [5] B.G.Osborn; T.Fearn Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis. Wiley: New York, **1986**.
- [6] Baffi, R. A.; Garnick, R. L. Quality control issues in the analysis of lyophilized proteins. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 181-184.
- [7] Bardat, A.; Biguet, J.; Chatenet, E.; Courteille, F. Moisture measurement: a new method for monitoring freeze-drying cycles. *J Parenter. Sci Technol.* **1993**, *47*, 293-299.
- [8] Bauer K.H.; Frömmering H.-H.; Führer C. Pharmazeutische Technologie. Georg-Thieme Verlag: Stuttgart, **1993**.
- [9] Bittle, J. L. Importance of freeze-drying of biological products. *Dev. Biol Stand.* **1976**, *36*, 5-6.
- [10] Bruells, M.; Folestad, S.; Sparen, A.; Rasmuson, A. In-Situ Near-Infrared Spectroscopy Monitoring of the Lyophilization Process. *Pharmaceutical Research* **2003**, *20*, 494-499.
- [11] Brulls, M.; Rasmuson, A. Heat transfer in vial lyophilization. *Int. J. Pharm.* **2002**, *246*, 1-16.
- [12] Buckton, G.; Yonemochi, E.; Yoon, W. L.; Moffat, A. C. Water sorption and near IR spectroscopy to study the differences between microcrystalline cellulose and silicified microcrystalline cellulose before and after wet granulation. *Int. J Pharm.* **1999**, *181*, 41-47.
- [13] Bundesverband der Hersteller von Löslichem Kaffee. Jahresbericht: Konsum löslicher Kaffegetränke. **2002**. Jahrespressekonferenz. 14-5-2002.
- [14] Burns, D. A.; Ciurczak, E. W.; Editors. Handbook of Near-Infrared Analysis, Second Edition, Revised and Expanded. [In: *Pract. Spectrosc.*, 2001; 27]. **2001**.
- [15] Carpenter, J. F.; Pikal, M. J.; Chang, B. S.; Randolph, T. W. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 969-975.
- [16] Cavatur, R. K.; Suryanarayanan, R. Characterization of phase transitions during freeze-drying by in situ X- ray powder diffractometry. *Pharm. Dev. Technol.* **1998**, *3*, 579-586.

-
- [17] Cavatur, R. K.; Vemuri, N. M.; Pyne, A.; Chrzan, Z.; Toledo-Velasquez, D.; Suryanarayanan, R. Crystallization Behavior of Mannitol in Frozen Aqueous Solutions 41. *Pharmaceutical Research* **2002**, *19*, 894-900.
- [18] Chen, T.; Oakley D.M. Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest. *Thermochimica Acta* **1993**, *248*, 229-244.
- [19] Chongprasert, S.; Knopp, S. A.; Nail, S. L. Characterization of frozen solutions of glycine. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1720-1728.
- [20] Chou, B. C. S.; Chen, C. N.; Shie, J. S. Fabrication and study of a shallow-gap Pirani vacuum sensor with a linearly measurable atmospheric pressure range. *Sensors and Materials* **1999**, *11*, 383-392.
- [21] Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of proteins. *NATO ASI Series, Series B: Physics* **1991**, *269*, 201-210.
- [22] Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 9012-9013.
- [23] Ciurczak, E. W. Growth of near-infrared spectroscopy in pharmaceutical and medical sciences. *American Pharmaceutical Review* **2002**, *5*, 68,73.
- [24] Connelly, J. P.; Welch, J. V. Monitor lyophilization with mass spectrometer gas analysis. *J Parenter. Sci. Technol.* **1993**, *47*, 70-75.
- [25] Corveleyn, S.; De Smedt, S.; Remon, J. P. Moisture absorption and desorption of different rubber lyophilization closures. *Int. J. Pharm.* **1997**, *159*, 57-65.
- [26] Couriel, B. Advances in lyophilization technology. *Bulletin of Parenteral Drug Association* **1977**, *31*, 227-236.
- [27] Craig, D. Q. M.; Royall, P. G. The use of modulated temperature DSC for the study of pharmaceutical systems: potential uses and limitations. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1152-1153.
- [28] Cuschler, G.; Carius, W.; Bauer, K. H. Single-step granulation: development of a vacuum-based IR drying method (pilot scale results). *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 119-126.
- [29] Dawson, P. J.; Hockley, D. J. Scanning electron microscopy of freeze-dried preparations: relationship of morphology to freeze-drying parameters. *Dev. Biol Stand.* **1992**, *74*, 185-192.
- [30] DeLuca, P. P. Research and development of pharmaceutical dosage forms. *Dev. Biol Stand.* **1976**, *36*, 41-50.
- [31] Derksen, M. W.; van de Oetelaar, P. J.; Maris, F. A. The use of near-infrared spectroscopy in the efficient prediction of a specification for the residual moisture content of a freeze-dried product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 473-480.

-
- [32] Essig D.; Oschmann R. Lyophilisation. Paperback APV: Mainz, **2000**.
- [33] Fiedler, P. Lexikon Der Hilfsstoffe Für Pharmazie, Kosmetik Und Angrenzende Gebiete. Verlag Editio Cantor, Aulendorf: **2002**.
- [34] Frake, P.; Greenhalgh, D.; Grierson, S. M.; Hempenstall, J. M.; Rudd, D. R. Process control and end-point determination of a fluid bed granulation by application of near infrared spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, *151*, 75-80.
- [35] Franks, F. Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions. *Dev. Biol Stand.* **1992**, *74*, 9-18.
- [36] Franks, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm* **1998**, *45*, 221-229.
- [37] Franks, F.; Skaer, H. L. Aqueous glasses as matrices in freeze-fracture electron microscopy. *Nature* **1976**, *262*, 323-325.
- [38] Franks, F.; Hatley, R. H. M.; Mathias, S. F. Materials science and the production of shelf-stable biologicals. *BioPharm* **1991**, *4*, 38, 40-2, 55.
- [39] Gölker C. Gefriertrocknung biotechnologische Produkte. *Pharma. Technol. J.* **1989**, *10*, 30.
- [40] Greiff, D. Factors affecting the statistical parameters and patterns of distribution of residual moistures in arrays of samples following lyophilization. *J Parenter. Sci. Technol.* **1990**, *44*, 118-129.
- [41] Greiff, D. Development of cycles for lyophilization. *Dev. Biol Stand.* **1992**, *74*, 85-92.
- [42] Hancock, B. C.; Shamblin, S. L.; Zografi, G. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm. Res* **1995**, *12*, 799-806.
- [43] Hancock, B. C.; Zografi, G. The relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids. *Pharm. Res* **1994**, *11*, 471-477.
- [44] Harris R.H.; Hower R.O. Freeze-Drying Biological Specimens: A Laboratory Manual. *Smithsonian Institution Press* **1979**, 169 pp.
- [45] Haseley P. Neue Steuerungstechnik bei Lyophilisationsanlagen. **16-5-2000**. Millenium Symposium Pharmazie & Glas 2000, Steris GmbH, Hürth, Deutschland.
- [46] Her, L. M.; Jefferis, R. P.; Gatlin, L. A.; Braxton, B.; Nail, S. L. Measurement of glass transition temperatures in freeze concentrated solutions of non-electrolytes by electrical thermal analysis. *Pharm. Res* **1994**, *11*, 1023-1029.
- [47] Her, L. M.; Nail, S. L. Measurement of glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes by differential scanning calorimetry. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 54-59.

-
- [48] Ho, N. F.; Roseman, T. J. Lyophilization of pharmaceutical injections: theoretical physical model. *J Pharm. Sci.* **1979**, *68*, 1170-1174.
- [49] Hsu, C. C.; Ward, C. A.; Pearlman, R.; Nguyen, H. M.; Yeung, D. A.; Curley, J. G. Determining the optimum residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 255-271.
- [50] Hunnius Pharmazeutische Wörterbuch. de Gruyter: Berlin, **1993**.
- [51] Ito, K. Freeze drying of pharmaceuticals. Change in the macroscopic appearance during freezing and the critical temperature necessary for freeze drying. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1970**, *18*, 1509-1518.
- [52] Ito, K. Freeze drying of pharmaceuticals. Macroscopic appearance of frozen and dried samples in connection with the growth of the eutectic crystals. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1970**, *18*, 1519-1525.
- [53] Izutsu, K.; Yoshioka, S.; Kojima, S. Physical stability and protein stability of freeze-dried cakes during storage at elevated temperatures. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 995-999.
- [54] Jennings, T. A. Application of the microcomputer to vacuum freeze drying equipment. *J Parenter. Drug Assoc.* **1978**, *32*, 273-284.
- [55] Jennings, T. A. Residual gas analysis and vacuum freeze drying. *J Parenter. Drug Assoc.* **1980**, *34*, 62-69.
- [56] Jennings, T. A. Effect of pressure on the sublimation rate of ice. *J. Parenter. Sci. Technol.* **1986**, *40*, 95-97.
- [57] Jennings, T. A. Lyophilization: Introduction and Basic Principles. Interpharm Press: Buffalo Grove, **1999**.
- [58] Jones, J. A.; Last, I. R.; MacDonald, B. F.; Prebble, K. A. Development and transferability of near-infrared methods for determination of moisture in a freeze-dried injection product. *J Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 1227-1231.
- [59] Kamat, M. S.; Lodder, R. A.; DeLuca, P. P. Near-infrared spectroscopic determination of residual moisture in lyophilized sucrose through intact glass vials. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 961-965.
- [60] Kasraian, K.; Spitznagel, T. M.; Juneau, J. A.; Yim, K. Characterization of the sucrose/glycine/water system by differential scanning calorimetry and freeze-drying microscopy. *Pharm. Dev. Technol.* **1998**, *3*, 233-239.
- [61] Kaye, W. Near-infrared spectroscopy. I. Spectral identification and analytical applications. *Spectrochim. Acta* **1954**, *6*, 257-287.
- [62] Kaye, W. Near-infrared spectroscopy. II. Instrumentation and technique. *Spectrochim. Acta* **1955**, *7*, 181-204.

-
- [63] Kett, V. L.; Craig, D. Q. M. The effect of annealing on the glass transition region of sucrose solutions. *Proceedings of the NATAS Annual Conference on Thermal Analysis and Applications* **2000**, 28th, 653-658.
- [64] Kim, A. I.; Akers, M. J.; Nail, S. L. The physical state of mannitol after freeze-drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 931-935.
- [65] Kirsch, J. D.; Drennen, J. K. Near-infrared spectroscopic monitoring of the film coating process. *Pharmaceutical Research* **13**, 234-237.
- [66] Kochs, M.; Koerber, C.; Heschel, I.; Nunner, B. The influence of the freezing process on vapor transport during sublimation in vacuum-freeze-drying of macroscopic samples. *International Journal of Heat and Mass Transfer* **1993**, 36, 1727-1738.
- [67] Kochs, M.; Koerber, C.; Nunner, B.; Heschel, I. The influence of the freezing process on vapor transport during sublimation in vacuum-freeze-drying. *International Journal of Heat and Mass Transfer* **1991**, 34, 2395-2408.
- [68] Kolodej, P.; Yakimets, W. W. An inexpensive freeze-dryer. *J Electron Microsc. (Tokyo)* **1981**, 30, 211-212.
- [69] Koyama, Y.; Kamat, M.; De Angelis, R. J.; Srinivasan, R.; DeLuca, P. P. Effect of solvent addition and thermal treatment on freeze drying of cefazolin sodium. *J Parenter. Sci. Technol.* **1988**, 42, 47-52.
- [70] Kramer, M.; Sennhenn, B.; Lee, G. Freeze-drying using vacuum-induced surface freezing. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, 91, 433-443.
- [71] Last, I. R.; Prebble, K. A. Suitability of near-infrared methods for the determination of moisture in a freeze-dried injection product containing different amounts of the active ingredient. *J Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, 11, 1071-1076.
- [72] Leebron, K. S.; Jennings, T. A. Determination of the vacuum outgassing properties of elastic closures by mass spectrometry. *J. Parenter. Sci. Technol.* **1981**, 35, 100-105.
- [73] Liapis, A. I.; Marchello, J. M. Advances in the modeling and control of freeze-drying. *Advances in Drying* **1984**, 3, 217-244.
- [74] Liapis, A. I.; Pikal, M. J.; Bruttini, R. Research and development needs and opportunities in freeze drying. *Drying Technology* **1996**, 14, 1265-1300.
- [75] Lin, T. P.; Hsu, C. C. Determination of residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals using a rapid and non-invasive method: near infrared spectroscopy. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* **2002**, 56, 196-205.
- [76] Livesey, R. G.; Rowe, T. W. A discussion of the effect of chamber pressure on heat and mass transfer in freeze-drying. *J Parenter. Sci. Technol.* **1987**, 41, 169-171.

- [77] MacDonald, B. F.; Prebble, K. A. Some applications of near-infrared reflectance analysis in the pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 1077-1085.
- [78] MacKenzie, A. P. Collapse during freeze drying - qualitative and quantitative aspects. **1975**. Freeze Drying Adv. Food Technol., [Int. Course Chicago], Meeting Date 1973.
- [79] MacKenzie, A. P. Principles of freeze-drying. *Transplant. Proc.* **1976**, *8*, 181-188.
- [80] MacKenzie, A. P. The physico-chemical basis for the freeze-drying process. *Dev. Biol Stand.* **1976**, *36*, 51-67.
- [81] MacKenzie, A. P. Comparative studies on the freeze-drying survival of various bacteria: gram type, suspending medium, and freezing rate. *Developments in Biological Standardization* **1977**, *36*, 263-277.
- [82] Martin Christ GmbH. Produktinformationen. www.martin-christ.de . **2003**. Osterode, Deutschland.
- [83] McPhillips, H.; Craig, D. Q. M.; Royall, P. G.; Hill, V. L. Characterization of the glass transition of HPMC using modulated temperature differential scanning calorimetry 30. *Int. J. Pharm.* **1999**, *180*, 83-90.
- [84] Meryman, H. T. Historical recollections of freeze-drying. *Dev. Biol Stand.* **1976**, *36*, 29-32.
- [85] Milton, N.; Pikal, M. J.; Roy, M. L.; Nail, S. L. Evaluation of manometric temperature measurement as a method of monitoring product temperature during lyophilization. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **1997**, *51*, 7-16.
- [86] Nail, S. L. The effect of chamber pressure on heat transfer in the freeze drying of parenteral solutions. *J. Parenter. Drug Assoc.* **1980**, *34*, 358-368.
- [87] Nail, S. L.; Jiang, S.; Chongprasert, S.; Knopp, S. A. Fundamentals of freeze-drying. *Pharm. Biotechnol.* **2002**, *14*, 281-360.
- [88] Nail, S. L.; Johnson, W. Methodology for in-process determination of residual water in freeze-dried products. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 137-151.
- [89] Nail, S. L.; Gatlin, L. A. Advances in control of production freeze dryers. *J. Parenter. Sci. Technol.* **1985**, *39*, 16-27.
- [90] Oetjen G.-W. Gefriertrocknung. VCH-Verlag: Weinheim, **1997**.
- [91] Oetjen G.-W. Kälte und Vakuum richtig dosiert. *Pharma + Food* 5/99, 34-39. **1999**.
- [92] Oetjen, Georg Wilhelm, Haseley, Peter, Kluetsch, Hubert, and Leineweber, Marion. Controlling of freeze-drying process. AMSCO Finn-Aqua, G. 97-19719398[19719398], 8. **7-5-1997**. DE.
- [93] Overcashier, D. E.; Patapoff, T. W.; Hsu, C. C. Lyophilization of Protein Formulations in Vials: Investigation of the Relationship between Resistance to Vapor Flow during Primary Drying and Small-Scale Product Collapse. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 688-695.

- [94] Pikal, M. J.; Shah, S. Moisture transfer from stopper to product and resulting stability implications. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 165-179.
- [95] Pikal, M. J.; Shah, S. Intravial distribution of moisture during the secondary drying stage of freeze drying. *PDA J Pharm. Sci. Technol.* **1997**, *51*, 17-24.
- [96] 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* **1990**, *60*, 203-217.
- [97] Pikal, M. J.; Shah, S.; Senior, D.; Lang, J. E. Physical chemistry of freeze-drying: measurement of sublimation rates for frozen aqueous solutions by a microbalance technique. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 635-650.
- [98] Pikal, M. J. Freeze-drying of proteins. Part I: process design. *BioPharm* **1990**, *3*, 18-20, 22.
- [99] Pikal, M. J. Freeze-drying of proteins: process, formulation, and stability. *ACS Symp. Ser.* **1994**, *567*, 120-133.
- [100] Pover, R.; Sander, D. NIR moisture analyzers for contactless on-line measurements under production conditions. *Tech. Mess.* **1992**, *59*, 116-120.
- [101] Pupp W.; Hartmann H.K. Trocknung und Endgasung. In *Vakuumtechnik Grundlagen Und Anwendung*; Carl Hanser Verlag: München Wien, **1991**.
- [102] Pyne, A.; Surana, R.; Suryanarayanan, R. Crystallization of Mannitol below T_g' during Freeze-Drying in Binary and Ternary Aqueous Systems. *Pharmaceutical Research* **2002**, *19*, 901-908.
- [103] Pyne, A.; Suryanarayanan, R. Phase transitions of glycine in frozen aqueous solutions and during freeze-drying. *Pharmaceutical Research* **2001**, *18*, 1448-1454.
- [104] Rantanen, J.; Antikainen, O.; Mannermaa, J. P.; Yliruusi, J. Use of the near-infrared reflectance method for measurement of moisture content during granulation. *Pharm. Dev. Technol.* **2000**, *5*, 209-217.
- [105] Rantanen, J.; Rasanen, E.; Tenhunen, J.; Kansakoski, M.; Mannermaa, J.; Yliruusi, J. In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near infrared sensor: an evaluation of particle size and binder effects. *Eur. J Pharm. Biopharm* **2000**, *50*, 271-276.
- [106] Remmele, R. L., Jr.; Gombotz, W. R. Differential scanning calorimetry: a practical tool for elucidating the stability of liquid biopharmaceuticals. *Biopharm Eur.* **2000**, *56*, 58-60, 62.
- [107] Rey, L. R. Glimpses into the fundamental aspects of freeze-drying. *Dev. Biol Stand.* **1976**, *36*, 19-27.
- [108] Rey, L. R. Basic aspects and future trends in the freeze-drying of pharmaceuticals. *Dev. Biol Stand.* **1992**, *74*, 3-8.

- [109] Roth, C.; Winter, G.; Lee, G. Continuous measurement of drying rate of crystalline and amorphous systems during freeze-drying using an in situ microbalance technique 62. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, *90*, 1345-1355.
- [110] Rovero, G.; Ghio, S.; Barresi, A. A. Development of a prototype capacitive balance for freeze-drying studies. *Chemical Engineering Science* **2001**, *56*, 3575-3584.
- [111] Rowe, T. W. Optimization in freeze-drying. *Dev. Biol Stand.* **1976**, *36*, 79-97.
- [112] Roy, M. L.; Pikal, M. J. Process control in freeze drying: determination of the end point of sublimation drying by an electronic moisture sensor. *J. Parenter. Sci. Technol.* **1989**, *43*, 60-66.
- [113] Schimpf Uwe. Fourieranalyse mikroskaliger Temperaturfluktuationen der Wasseroberfläche. Kapitel: Wärmeleitung und Diffusion. **1996**. Heidelberg, Fakultät für Physik und Astronomie Ruprecht-Karls-Universität.
- [114] Schoof, H.; Apel, J.; Heschel, I.; Rau, G. Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges 190. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *58*, 352-357.
- [115] Schopphoff A.; Böttcher J.; Pfeifer F. Verwendung intelligenter Totaldrucktransmitter in der Vakuumtechnik. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2001**, *6/2001*, 637-640.
- [116] Schott Pharmaceutical Packaging. Productinformation TopPac. **2000**.
- [117] Searles, J. A.; Carpenter, J. F.; Randolph, T. W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine Tg' in pharmaceutical lyophilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, *90*, 872-887.
- [118] Sheehan, P.; Liapis, A. I. Modeling of the primary and secondary drying stages of the freeze drying of pharmaceutical products in vials: numerical results obtained from the solution of a dynamic and spatially multi-dimensional lyophilization model for different operational policies. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 712-728.
- [119] Skrabanja, A. T.; de Meere, A. L.; de Ruiter, R. A.; van den Oetelaar, P. J. Lyophilization of biotechnology products. *PDA J Pharm. Sci. Technol.* **1994**, *48*, 311-317.
- [120] Stokvold, A.; Dyrstad, K.; Libnau, F. O. Sensitive NIRS measurement of increased moisture in stored hygroscopic freeze dried product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *28*, 867-873.
- [121] Stricker H.; Martin; Swarbrick; Cammarata Physikalische Pharmazie. WVG: Stuttgart, **1987**.
- [122] Sucker H.; Fuchs P.; Speiser P. Pharmazeutische Technologie. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **1991**.
- [123] Sun, W. Q.; Leopold, A. C.; Crowe, L. M.; Crowe, J. H. Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophys J.* **1996**, *70*, 1769-1776.

- [124] Thomson J.J. On the Masses of the Ions in Gases at Low Pressures. *Philosophical Magazine* **1899**, 48, 547-567.
- [125] Towart, R. Proceedings: A simple, low-cost freeze-drier. *Br. J Pharmacol* **1973**, 49, 180P.
- [126] VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen(GVC) VDI-Wärmeatlas. Düsseldorf, **1988**.
- [127] Virtis. Produktinformation. **2002**. Gardiner, NY, USA.
- [128] W.L.Gore & Associates, Inc. Lyoguard Freeze-Dry Packaging. Internet - Homepage . **2001**. Newark, USA.
- [129] Walsh, G. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, 55, 3-10.
- [130] Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **2000**, 203, 1-60.
- [131] Willemer, H. Physikalische Grundlagen der Gefriertrocknung Fortschritte und Entwicklungstendenzen der Gefriertrocknung. 3[10], 4-13. **1989**. Concept Heidelberg. Gefriertrocknung in Entwicklung und Produktion. 1988.
- [132] Willemer, H. Measurements of temperatures, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze-drying. *Dev. Biol Stand.* **1992**, 74, 123-134.
- [133] Williams, N. A.; Dean, T. Vial breakage by frozen mannitol solutions: correlation with thermal characteristics and effect of stereoisomerism, additives, and vial configuration. *J Parenter. Sci. Technol.* **1991**, 45, 94-100.
- [134] Williams, N. A.; Guglielmo, J. Thermal mechanical analysis of frozen solutions of mannitol and some related stereoisomers: evidence of expansion during warming and correlation with vial breakage during lyophilization. *J Parenter. Sci. Technol.* **1993**, 47, 119-123.
- [135] Yalkowsky, S. H.; Patel, S. D. Acceleration of heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals. II. A fluid cushion device. *Pharm. Res.* **1992**, 9, 753-758.
- [136] Ybema, H.; Kolkman-Roodbeen, L.; te Booy, M. P.; Vromans, H. Vial lyophilization: calculations on rate limitation during primary drying. *Pharm. Res* **1995**, 12, 1260-1263.
- [137] Yu, L.; Mishra, D. S.; Rigsbee, D. R. Determination of the glass properties of D-mannitol using sorbitol as an impurity. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 774-777.
- [138] Zhuravskaya, N. K.; Yanushkin, N.; Kaukshishvili, E. I.; Moiseev, A. A. Energy of water desorption during the freeze-drying of protein-containing products. *Annexe au Bulletin de l'Institut International du Froid* **1969**, 99-103.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Ingo Presser
Geboren am 27. Juni 1974
in Eberbach am Neckar

ledig
deutsch

Schulausbildung

1980 - 1984	Grundschule Osterburken
1984 - 1993	GTO Ganztagesgymnasium Osterburken
1993	Abitur

Wehrdienst

1993 - 1994	4./ Panzerflugabwehrkanonenbatallion 12, Hardheim
-------------	---

Studium

05/94 - 02/98	Pharmazie, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
07/99	Approbation als Apotheker

Praktika

04/98 - 05/99	Eli Lilly Deutschland GmbH, Abteilung Präformulierung, Hamburg Schumann Apotheke, Dresden
---------------	--

Wissenschaftliche Tätigkeit

11/99 - 07/03	Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Winter im Rahmen einer Forschungs-kooperation mit der Fa. Boehringer Ingelheim GmbH & Co KG.
---------------	--

Berufliche Tätigkeit

11/99 - 07/03	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität, München
---------------	--