

# Entwicklung eines oralen Lyophilisates als Darreichungsform für Midazolam

Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von  
Wehad Ibrahim  
aus Haba (Syrien)

Würzburg 2010

Eingereicht bei der Fakultät  
für Chemie und Pharmazie am:

\_\_\_\_\_

1. Gutachter der schriftlichen Arbeit \_\_\_\_\_

2. Gutachter der schriftlichen Arbeit \_\_\_\_\_

1. Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

2. Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums \_\_\_\_\_

3. Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums \_\_\_\_\_

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

*Ein im Herzen eines Apfels versteckter Kern ist ein unsichtbarer Obstgarten.  
Doch wenn dieser Kern auf felsigen Boden fällt, wird nichts daraus hervorgehen.*

**Khalil Gibran**

Meiner Familie

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ingfried Zimmermann am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise unterstützten und zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Besonderer Dank gilt vor allem:

- meinem Doktorvater, Herrn Prof. Zimmermann, für die Auswahl des interessanten Themas und seine allumfassende Unterstützung während der Promotion. Vor allem möchte ich ihm für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die zu jeglicher Zeit erwiesene Hilfsbereitschaft bei Problemen aller Art.
- Herrn Dr. Gieseler, der mich durch seine stets förderliche Diskussion mit vielfältigen Denkanstößen bereicherte. Vor allem bin ich ihm für die entgegenkommende Gewährleistung einer uneingeschränkten Gerätebenutzung zu Dank verpflichtet.
- der Universität Tishreen- Lattakia-Syrien für die gewährte finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums.
- Frau Dr. Anne-Kathrin Müller und Frau Claudia Raffauf, die mir stets hilfsbereite Kolleginnen waren. Für die schönen Momente, nicht zuletzt für die gewissenhaften und ausführlichen Korrekturen dieser Arbeit.
- meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl, Frau Silke Heydt, Herrn Dirk Leutner, Herrn Christian Pabel, Frau Dr. Joanna Ruppel, Frau Stefanie Schauer, Herrn Christoph Schlee und Frau Dr. Stefanie Weber für das freundschaftliche Verhältnis und die stets gute Zusammenarbeit.
- Herrn Dr. Sascha Zügner, Frau Doris Moret und Frau Christine Schneider für die geleistete Hilfe, gute Zusammenarbeit und persönliche Unterstützung.

- den Mitarbeitern der hausinternen Werkstatt für die Hilfe bei technischen Problemen.
- Herrn Dr. Kai Kretzler für die Hilfsbereitschaft bei der Besorgung der Blister.
- Herrn Prof. Dr. Georg Krohne, Frau Daniela Bunsen und Frau Claudia Gehrig von der Abteilung Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften für die Hilfestellung bei der Anfertigung der REM-Aufnahmen.
- Den Firmen Symrise GmbH & Co. KG, Gelita AG und Lauer-Fischer GmbH für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Materialien und Substanzen.

Im privaten Bereich schulde ich den größten Dank meinen Eltern für ihre grenzenlose Liebe und Unterstützung. Besonders bedanke ich mich für ihre Gebete.

Danken möchte ich auch meinen Brüdern, die mir das volle Vertrauen gegeben und mich aus der Ferne aufgemuntert haben. Meinem Schwager sowie den drei Blumen meines Lebens (Martin, Kathrin-Maria, Maja) danke ich für die schönen unvergesslichen Momente.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meiner Schwester richten, die mich mit ihrem großzügigen Herz durch alle Höhen und Tiefen geduldig begleitet hat. Njoud, danke für alles.

## Publikationen

- I. W. Ibrahim, H. Gieseler, I. Zimmermann: *Impact of Mannitol Crystallization on the Physical Properties of Freeze Dried Midazolam Hydrochloride Tablets*. 6<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, Spain, Apr. 07-10, 2008
  
- II. W. Ibrahim, H. Gieseler, I. Zimmermann: *Impact of Gelatin Type and pH on the Disintegration Time and Dissolution of Lyophilised Midazolam-HCl Tablets*, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Chemie-Symposium der Studierenden Manifranksens 2008, Wuerzburg, Germany, Dec. 2, 2008
  
- III. W. Ibrahim, H. Gieseler, I. Zimmermann: *Stability Study of Oral Lyophilisate of Midazolam-HCl in Different Packing Material*. 7<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valetta, Malta, March 8-11, 2010

---

<b>1</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>V</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Theorie und Stand der Forschung</b> .....	<b>4</b>
3.1	<b>Schmelztablette</b> .....	<b>4</b>
3.1.1	Herstellungsverfahren von Lyophilisaten zum Einnehmen .....	<b>5</b>
3.1.1.1	Zydis <sup>®</sup> -Technologie .....	<b>5</b>
3.1.1.2	Lyoc <sup>®</sup> -Technologie .....	<b>7</b>
3.1.1.3	Quicksolv <sup>®</sup> -Technologie .....	<b>8</b>
3.2	<b>Gefriertrocknung</b> .....	<b>9</b>
3.2.1	Definition .....	<b>9</b>
3.2.2	Vor- und Nachteile der Gefriertrocknung .....	<b>10</b>
3.2.3	Einsatzbereiche der Gefriertrocknung .....	<b>10</b>
3.2.4	Der Gefriertrocknungsprozess .....	<b>11</b>
3.2.4.1	Das Einfrieren .....	<b>12</b>
3.2.4.1.1	Unterkühlung und Eisnukleation .....	<b>13</b>
3.2.4.1.2	Gefrierverhalten der gelösten Stoffe .....	<b>16</b>
3.2.4.1.3	Tempern (Annealing) .....	<b>20</b>
3.2.4.2	Haupttrocknung .....	<b>21</b>
3.2.4.2.1	Energieübertragung .....	<b>21</b>
3.2.4.2.2	Massenstransfer (Wasserdampftransport) .....	<b>23</b>
3.2.4.2.3	Überwachung der Produkttemperatur .....	<b>26</b>
3.2.4.2.4	Endpunktdetektion .....	<b>27</b>
3.2.4.3	Nachtrocknung (Sekundärtrocknung) .....	<b>29</b>
3.2.5	Formulierung .....	<b>30</b>
3.2.5.1	Allgemeines zur Rezepturentwicklung eines Lyophilisats .....	<b>30</b>
3.2.5.2	Funktion der Hilfsstoffe .....	<b>31</b>
3.2.5.3	Zusammenhang zwischen Formulierung und Prozess .....	<b>35</b>
3.2.5.4	Lagerbedingungen .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>41</b>
5.1	<b>Materialien</b> .....	<b>41</b>

5.1.1	Wirkstoff .....	41
5.1.2	Hilfsstoffe .....	42
5.1.3	Behältnisse zum Gefriertrocknen und zur Lagerung.....	45
5.1.3.1	Behältnisse zur Gefriertrocknung.....	45
5.1.3.2	Behältnisse zur Lagerung .....	46
5.2	<b>Methoden</b> .....	46
5.2.1	Herstellung der Lösungen .....	46
5.2.2	Prüfung der hergestellten Lösungen.....	46
5.2.2.1	pH-Wert Messung .....	46
5.2.2.2	Dynamische Differenz Kalorimetrie .....	47
5.2.2.3	Gefriertrocknungsmikroskopie.....	48
5.2.3	Herstellung der Lyophilisate .....	49
5.2.4	Prüfung der hergestellten Lyophilisate .....	50
5.2.4.1	Hoch-Druck-Flüssig-Chromatographie (HPLC).....	50
5.2.4.2	UV-Vis-Spektrometer .....	51
5.2.4.3	Feuchtegehalt nach Karl Fischer .....	51
5.2.4.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	52
5.2.4.5	Freisetzunguntersuchung .....	53
5.2.4.6	Röntgendiffraktometrie (XRD).....	53
5.2.4.7	Lagerbedingung für die Stabilitätsuntersuchung.....	54
5.2.4.8	Statistische Auswertung:.....	54
6	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	55
6.1	<b>Charakterisierung des Wirkstoffs</b> .....	55
6.1.1	REM- Aufnahmen von Midazolam-HCl .....	55
6.1.2	Partikelgröße von Midazolam-HCl .....	56
6.1.3	Röntgendiffraktometrie von Midazolam-HCl.....	56
6.1.4	pK <sub>a</sub> -Bestimmung .....	57
6.2	<b>Kompatibilitätsuntersuchung</b> .....	58
6.3	<b>Rezepturentwicklung</b> .....	61
6.3.1	Der Einfluss der Konzentration von Gelatine und Mannitol.....	62
6.3.1.1	Einfrierverhalten.....	63
6.3.1.1.1	Glasübergangstemperatur.....	63
6.3.1.1.2	Tempern (Annealing).....	67

---

6.3.1.1.3	Kollapstemperatur .....	68
6.3.1.1.4	Zusammenfassung des Einfrierverhaltens.....	69
6.3.1.1.5	Herstellung der Lyophilisate .....	70
6.3.1.2	Charakterisierung der Lyophilisate .....	72
6.3.1.2.1	Feuchtigkeitsgehalt.....	72
6.3.1.2.2	Kristallisation .....	73
6.3.1.2.3	Die Auflösegeschwindigkeit .....	73
6.3.1.2.4	Makro- und Mikroskopische Eigenschaften .....	74
6.3.2	Der Einfluss des Gelatine-Typs.....	76
6.3.2.1	Einfrierverhalten.....	78
6.3.2.1.1	Glasübergangstemperatur ohne und nach dem Tempern .....	78
6.3.2.1.2	Die Kollapstemperatur .....	79
6.3.2.1.3	Zusammenfassung des Einfrierverhaltens.....	80
6.3.2.1.4	Herstellung der Lyophilisate .....	80
6.3.2.2	Charakterisierung der Lyophilisate .....	81
6.3.2.2.1	Kristallinität.....	81
6.3.2.2.2	Feuchtigkeitsgehalt.....	82
6.3.2.2.3	Die Auflösegeschwindigkeit .....	83
6.3.2.2.4	Makro- und Mikroskopische Eigenschaft .....	84
6.4	<b>Entwicklung der Tabletten</b> .....	84
6.4.1	Endprüfung der Tabletten.....	85
6.4.1.1	Gleichförmigkeit der Tabletten .....	86
6.4.1.2	Zerfallszeit.....	86
6.4.1.3	Wirkstofffreisetzung.....	87
6.4.1.4	Geschmacksuntersuchung .....	88
6.5	<b>Stabilitätsuntersuchungen</b> .....	90
6.5.1	Makro- und Mikroskopische Beobachtungen .....	91
6.5.2	Wirkstoffgehalt.....	93
6.5.3	Zerfallszeit.....	94
6.5.4	Feuchtigkeitsgehalt.....	94
6.5.5	Kristallinität.....	95
6.5.6	Die Glasübergangstemperatur .....	97
6.5.7	Schlussfolgerung .....	99
7	<b>Zusammenfassung</b> .....	100

8	<b>Summary</b> .....	104
9	<b>Anhang</b> .....	108
9.1	<b>Bestimmung des pK<sub>a</sub>-Wertes</b> .....	108
9.2	<b>Rohdaten</b> .....	110
9.2.1	Partikelgröße .....	110
9.2.2	Kompatibilitätsuntersuchung .....	110
9.2.3	Der Einfluss der Konzentration von Gelatine und Mannitol.....	113
9.2.3.1	Kollapstemperatur .....	113
9.2.3.2	Feuchtigkeitsgehalt.....	115
9.2.4	Die Auflösengeschwindigkeit .....	115
9.2.5	Der Einfluss des Gelatine Typs .....	116
9.2.5.1	Kollapstemperatur .....	116
9.2.5.2	Feuchtigkeitsgehalt.....	117
9.2.5.3	Die Auflösengeschwindigkeit .....	118
9.2.6	Entwicklung der Tabletten .....	119
9.2.6.1	Zerfallszeit.....	119
9.2.6.2	Gleichförmigkeit des Gehalts der Tabletten.....	119
9.2.6.3	Wirkstofffreisetzung.....	120
9.2.7	Stabilität .....	121
9.2.7.1	Feuchtigkeitsgehalt.....	121
9.2.7.2	Zerfallszeit der Tabletten während der Lagerung .....	122
9.2.7.3	Wirkstoffgehalt der Tabletten während der Lagerung.....	122
9.3	Statistische Auswertung: .....	124
9.3.1	Gleichförmigkeit des Gehalts der Tabletten.....	124
9.3.2	Wirkstoffgehalt während der Lagerung .....	125
9.3.3	Zerfallszeit der Tabletten der einzelnen Chargen .....	126
9.3.4	Zerfallszeit während der Lagerung .....	127
10	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	129

# 1 Abkürzungen

AE	Absorptionseinheit
$\theta$	Beugungswinkel
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FDDF	freeze dried dosage form
FDM	Freez drying Microscope
h	Stunde
HPLC	Hoch-Druck-Flüssig-Chromatographie
K	Kelvin
LN <sub>2</sub>	flüssiger Stickstoff
m	Masse [g]
min	Minute
ODT	Orally Disintegrating Tablet
p	Druck [hPa]
r. F.	relative Feuchtigkeit [%]
XRD	Röntgendiffraktometrie
rel. sdv	Relative Standardabweichung [%]
REM	Rasterelektronmikroskopie
s	Sekunde
sdv	empirische Standardabweichung
T <sub>c</sub>	Kollapstemperatur [°C]
T <sub>eu</sub>	Eutektische Temperatur [°C]
T <sub>g</sub>	Glasübergangstemperatur [°C]
T <sub>g</sub> '	Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung [°C]
T <sub>n</sub>	Nukleationstemperatur [°C]
T <sub>p</sub>	Produkttemperatur [°C]
T <sub>rc</sub>	Rekristallisationstemperatur [°C]
T <sub>s</sub>	Stellflächentemperatur [°C]



## 2 Einleitung

Feste orale Arzneiformen sind bei weitem die gebräuchlichsten. Allerdings haben 25% der Bevölkerung ein Problem beim Schlucken von Tabletten oder Kapseln. Deshalb halten sie die Verordnung des Arztes nicht ein [1]. Besonders betroffen sind ältere Menschen und Kinder oder Patienten mit einer Dysphagie, die gefährdet sind, durch Verschlucken von Tabletten zu ersticken. Außerdem ist manchmal der Patientenzugriff auf Wasser wie beim Reisen oder aktiver Arbeit sehr begrenzt.

Zusätzlich weisen viele Wirkstoffe nach oraler Applikation eine schlechte relative Bioverfügbarkeit auf. Dies kann auf unzureichende Resorption (schlechte Wasserlöslichkeit, Resorptionsfenster) oder den First-Pass-Effekt zurückzuführen sein. Der Wirkstoff wird bereits bei der ersten Leberpassage metabolisiert und steht dem Organismus nicht mehr zur Verfügung.

Deshalb ist die Entwicklung von Arzneiformen, die im Mundraum in wenigen Sekunden ohne zusätzliche Einnahme von Flüssigkeiten zerfallen und anschließend den Wirkstoff schnell freigegeben können, von steigendem Interesse. Ein First-Pass-Effekt kann hier bei löslichen Wirkstoffen umgangen werden, da der Wirkstoff über die Schleimhaut direkt ins Blut geht.

Tabletten dieser Art sind unter der Bezeichnung FDDF bekannt, was für „fast dissolving dosage form“ oder „freeze dried dosage form“ steht [2]. Sie wurden zum ersten Mal von der Firma Scherer entwickelt und im Jahr 1986 auf den Markt gebracht. Die Herstellung erfolgt durch Gefriertrocknung einer gemeinsamen Lösung des Wirkstoffs und eines wasserlöslichen Matrixbildners. Dadurch ist die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe von der Lösungsgeschwindigkeit und spezifischen Oberfläche des Matrixbildners abhängig [2].

Der Gefriertrocknungsprozess, auch „Lyophilisation“ genannt, stellt ein schonendes Trocknungsverfahren dar. Ein weiterer positiver Aspekt dieses Verfahrens ist die Entstehung eines hochporösen Kuchens mit einer großen Oberfläche, der sehr schnell löslich ist [2].

Auf Anfrage der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie an der Universität Würzburg wird in dieser Arbeit versucht, Midazolam-HCl-Lyophilisat-Tabletten zu entwickeln.

Midazolam-HCl gehört zu den 1,4-Benzodiazepinen. Es wirkt anxiolytisch und hypnotisch, in höheren Dosen zentral muskelrelaxierend und antikonvulsiv [3]. Midazolam wird häufig für die Sedation in der Prämedikation vor diagnostischen oder chirurgischen Eingriffen eingesetzt. Midazolam kann als intravenöse oder intramuskuläre Injektion appliziert werden.

Allerdings sind diese Applikationen meistens mit Angst und Unbehagen auf Seiten des Patienten verbunden. Deshalb sind sie besonders bei Kindern unbeliebt. Zusätzlich treten Nebenwirkungen des Midazolams wie Herz-Kreislauf-Störungen und Atemdepression bis zu Apnoe besonders nach parenteraler Gabe auf. Auf dem Markt ist Midazolam auch in Form von Tabletten oder Säften erhältlich. Die Einnahme von Tabletten ist meistens mit der Zugabe einer Flüssigkeit verbunden. Da diese Flüssigkeit die Nahrungskarenz beeinträchtigen könnte, erhöht sich die Gefahr der Narkosekomplikation z.B. die Aspiration von Mageninhalt. Außerdem ist die hepatische Clearance des Midazolams so hoch, dass die Bioverfügbarkeit von peroral applizierten Tabletten stark herabgesetzt ist. Sie beträgt zwischen 36% und 44% nach oraler Applikation [4,5]. Dies führt zu unbefriedigenden Ergebnissen für die Anästhesiologie und zur Forschung nach Alternativen, die keine zusätzliche Wassergabe erfordert wie der nasalen, rektalen oder bukkalen Applikation. Die Umgehung des First-Pass-Effekts durch diese neuen Applikationswege sollte zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit des Midazolams, zur Erniedrigung der Dosis und damit zur Verringerung der Nebenwirkungen führen.

Obwohl die nasale Applikation eine bessere Bioverfügbarkeit von 83% [6] und einen schnellen Wirkungseintritt aufweist, werden jedoch dadurch signifikante Irritationen in der Nasenschleimhaut hervorgerufen [7,8]. Im Gegensatz dazu bietet die sublinguale Applikation eine bessere Compliance [7]. Fujii [9] demonstriert eine vierfache Erhöhung der sublingualen Bioverfügbarkeit im Vergleich zu der oralen Einnahme. Er begründet diese Steigerung mit der Vermeidung des First-Pass-Effekts. Auf der anderen Seite bestätigt Schagmeier [10] die Vorteile des sublingualen Wegs mit Erhöhung der Bioverfügbarkeit auf 74,5%. McMillan stellt in seinem Patent [11] verschiedene Midazolam-Schmelztabletten vor. Die Bioverfügbarkeitsuntersuchungen in diesem Patent zeigen ungefähr gleiche  $c_{\max}$ - und  $t_{\max}$ -Werte nach der Applikation einer 10 mg-Schmelztablette und 5 mg-i.m.-Injektion. Außer der angenehmeren Applikation ergaben die Schmelztabletten im Vergleich zur i.m.-Injektion auch keinen Unterschied in der  $c_{\max}$  zwischen Frauen und Männern. Dies lässt bei den Schmelztabletten eine reproduzierbare Wirkung, die vom Geschlecht unabhängig ist, erwarten.

Diese Studien verdeutlichen die Wichtigkeit der Entwicklung einer Arzneiform von Midazolam wie eines Lyophilisats zum Einnehmen, die pregastrisch (buccal, sublingual, oropharyngeal und oesophageal) absorbiert wird. Diese Form sollte einen besseren klinischen Effekt als die konventionellen oralen Applikationen gewährleisten. Zusätzlich wird durch diese Darreichungsform eine Vermeidung der ansonsten erforderlichen Betreuung durch einen

Spezialisten im Vergleich zu einer i.v.-Applikation, die Vermeidung der Gabe einer Flüssigkeit vor der Narkose und eine Verbesserung der Compliance von Patienten mit Schluckbeschwerden erreicht.

Die Lyophilisate sollen den Anforderungen des europäischen Arzneibuchs für feste orale Darreichungsformen entsprechen. Besondere Aufmerksamkeit sollte auf der Zerfallszeit, der chemischen Stabilität des Midazolam-HCl's und der mechanischen Stabilität liegen.

## 3 Theorie und Stand der Forschung

### 3.1 Schmelztablette

Das Europäische Arzneibuch definiert Schmelztabletten als „... nicht überzogene Tabletten, die im Mund behalten werden, wo sie sich schnell verteilen, bevor sie geschluckt werden“ [12].

Die erste Technologie, nach der eine Schmelztablette hergestellt wurde, war die Zydis<sup>®</sup>-Technologie. Seitdem wurden zahlreiche Patente angemeldet, um andere Zusammensetzungen oder Verfahrenstechniken für die Herstellung dieser Arzneiform anzubieten. Daher gibt es für diese Arzneiformen verschiedene Bezeichnungen. Als Beispiele sind Fast Dissolving Dosage Form (FDDF) [2], Orally Disintegrating Tablet (ODT) [13] und Fast Melt Tablet (FMT) [14] zu nennen.

Inzwischen sind über 200 Markenprodukte und Generika als ODT kommerzialisiert [15]. Auf der Grundlage der aktuellen globalen Wachstumstendenz ist ein Umsatz des ODT-Markts von ca. \$ 8 Milliarde bis zum Jahr 2010 zu erwarten [15].

Dieses Wachstum ist auf die Vorteile dieser Zubereitung sowohl für die Patienten als auch für die Herstellungsfirmen zurückzuführen:

1. Verbesserung der Compliance (Die Tablette kann in den Mund gelegt werden und gibt den Wirkstoff sehr schnell an den Speichel ab. Eine zusätzliche Einnahme von Flüssigkeit ist nicht erforderlich.)
2. Rascher Wirkungseintritt durch schnelle Wirkstofffreigabe
3. Lösliche Wirkstoffe können durch die gute Permeation der Mundschleimhaut direkt ins Blut gehen. Ein First-Pass-Effekt wird dadurch umgangen, was eine Minderung der Dosis ermöglicht und folglich zur Erniedrigung der Nebenwirkungen führt.
4. Verlängerung der Lebensdauer eines patentierten Produkts und Erweiterung der Markt-Franchise
5. Die Entwicklung solcher Darreichungsformen ist relativ einfach und weniger riskant als andere Darreichungsformen.
6. Die klinische Anforderung an eine ODT-Formulierung, die Bioäquivalenz zu einem bestehenden oralen Produkt zeigen soll, ist minimal, was von Vorteil für die Hersteller ist.

Drei allgemeine Technologien sind für die Herstellung von Schmelztabletten bisher bekannt [14,16]:

- Gefriertrocknung
- Direktverpressung
- Formverfahren (Moulding)

Tabletten, die nach dem Gefriertrocknungsverfahren hergestellt werden, werden vom Europäischen Arzneibuch in seinem achten Nachtrag der fünften Ausgabe zum ersten Mal aufgeführt und als Lyophilisate zum Einnehmen bezeichnet. Sie werden definiert als „...feste Zubereitungen, die entweder im Mund behalten oder vor der Anwendung in Wasser dispergiert (oder gelöst) werden“ [12].

Die ausgezeichnete Zerfallszeit von ca. 5 Sekunden für die gefriergetrockneten Tabletten im Vergleich zu anderen Schmelztabletten führt dazu, dass das Gefriertrocknungsverfahren das erste und bevorzugte Herstellungsverfahren ist. Nachteilig an diesem Verfahren sind allerdings die höheren Kosten. Zusätzlich haben die Tabletten relativ geringe mechanische Stabilität und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Feuchtigkeit, wodurch höhere Anforderungen an spezielle Packmittel hervorgerufen werden. Unter den verschiedenen patentierten Blistern sind Lamine mit Aluminium, Polyester- und Polyamidfolien, die abziehbar sind, die geeigneten Packmittel. In den nächsten Abschnitten werden die Herstellungsverfahren ausführlicher erklärt.

### **3.1.1 Herstellungsverfahren von Lyophilisaten zum Einnehmen**

#### **3.1.1.1 Zydis<sup>®</sup>-Technologie**

Auf der Grundlage der Patente von Gregory et al [17,18] und Yarwood [19] entwickelte R.P. Scherer (Swindon, UK) Zydis<sup>®</sup> als die erste Form einer Schmelztablette (ODT). Zydis<sup>®</sup> ist eine Darreichungsform, die spontan in wenigen Sekunden im Mund zerfällt. Dies beruht auf der hoch porösen Struktur der Tablette nach der Gefriertrocknung, die das schnelle Eindringen des Speichels erlaubt. Demzufolge lösen sich die Hilfsstoffe und geben die Wirkstoffpartikel frei, damit sie als Lösung oder Suspension geschluckt und in der üblichen Weise absorbiert werden. Zusätzlich können einige Wirkstoffe in der Mundhöhle und im Rachenraum absorbiert werden, was zu einer Verbesserung der Bioverfügbarkeit im Vergleich zu normalen Tabletten führen kann.

Derzeit sind weltweit über 13 Zydis<sup>®</sup>-Produkte auf dem Markt (Tab. 3-1). In den meisten Fällen bieten diese Produkte nur eine Verbesserung der Patienten-Compliance. Im Gegensatz dazu ist Zelapar<sup>®</sup> mit dem löslichen Wirkstoff Selegilin das erste Beispiel für eine signifikante Erhöhung der Bioverfügbarkeit.

**Tab. 3-1:** Beispiele für Zydis<sup>®</sup>-Produkte auf dem Markt, nach [1]

<b>Produkt<sup>®</sup></b>	<b>Präparate</b>	<b>Firma</b>	<b>Erscheinungs- jahr</b>
Temsta <sup>®</sup>	Lorazepam	Wyeth	1986
Seresta <sup>®</sup>	Oxazepam	Wyeth	1986
Feldene <sup>®</sup>	Piroxicam	Pfizer	1992
Imodium <sup>®</sup>	Loperamid	Janssen	1993
Zelapar <sup>®</sup>	Selegilin	Elan	1998
Semper <sup>®</sup>	Scopolamin/ Chlorpheniramin	Taisho	2000
Zyprexa <sup>®</sup>	Olanzapin	Eli Lilly	2000

Laut Saeger [20] besteht die Zydis<sup>®</sup>-Matrix im Wesentlichen aus wasserlöslichen Hilfsstoffen, die nachfolgend mit ihrer Funktion erklärt werden. In erster Linie sorgt ein Polymer wie Dextran, Gelatine oder Alginat für die glasartige Struktur und dadurch eine bessere Auflösengeschwindigkeit. Ein Zuckeralkohol fördert durch seine Kristallisationseigenschaft die Ausbildung der Härte und der Eleganz des Endprodukts. Um die Verbesserung der chemischen Stabilität des Wirkstoffs und um optimale Bedingungen für die pregastrische Absorption des Wirkstoffs zu garantieren, ist eine Puffersubstanz in der Formulierung von großer Bedeutung. Penetrationsverbesserer wie Natriumlaurylsulfat optimieren die Resorption des Wirkstoffs über die pregastrische Schleimhaut. Kollapsschützende Substanzen wie Glycin verhindern ein Schrumpfen des Kuchens während der Lyophilisation und während der Lagerung. Aufgrund des niedrigen Wassergehalts im Endprodukt ist ein Konservierungsmittel wie Parabenzoesäure nur in der Phase zwischen der Herstellung der Lösung bzw. der Suspension und dem Einfrieren nötig. Schließlich sind Aromen und Süßstoffe einsetzbar, um einen schlechten Geschmack zu maskieren.

Die Herstellung von Zydis<sup>®</sup> erfolgt in mehreren Schritten. Als erstes werden alle Komponenten unter Rühren in einem Vakuum-Mischer in Wasser gelöst. Der Wirkstoff wird ebenfalls gelöst oder in der wässrigen Lösung dispergiert. Danach wird die Mischung nach Gewicht in die Näpfchen der Blisterverpackungen dosiert. Ein Dosiersystem wurde

entwickelt, um sicherzustellen, dass die Homogenität der Suspension während der Füllung nicht beeinträchtigt wird. Nach der Dosierung werden die Blister zum Einfrieren in einen mit flüssigem Stickstoff betriebenen Kühltunnel transportiert. Die Temperatur des Tunnels und die Dauer der Verweilzeit sind sorgfältig eingestellt, um eine optimale Qualität des Endprodukts zu erreichen. Das eingefrorene Produkt wird in Tiefkühlkabinen zwischengelagert. Diese Zwischenlagerung ermöglicht das Befüllen und Einfrieren aller Blister, damit sie gleichzeitig zum Trocknen in die Gefriertrocknungsanlage transportiert werden können. Zusätzlich können inzwischen amorphe Substanzen rekristallisieren, wodurch eine höhere mechanische Stabilität erreicht wird. Nach der Gefriertrocknung wird die Blisterverpackung versiegelt. Im Gegensatz zu anderen gefriergetrockneten Produkten wie Parenteralia ist ein Feuchtigkeitsgehalt von 2% am Ende der Trocknung typisch. Sobald das Produkt der Anlage entnommen wird, ist eine Reabsorption von atmosphärischem Wasser und eine Zunahme des Feuchtegehalts auf 3 bis 8% zu erwarten [1].

Der Nachteil dieses Verfahrens ist die Begrenzung des Wirkstoffgehalts, um eine poröse Struktur und dementsprechend eine schnelle Auflösung zu erhalten.

### **3.1.1.2 Lyoc<sup>®</sup>-Technologie**

Lyoc<sup>®</sup> ist eine Technologie der Firma Farmalyoc, Frankreich. Im Patent von Lafon [21] wird die Herstellung der Arzneiform durch Gefriertrocknung einer Öl-in-Wasser-Emulsion im Blister beschrieben. Die Besonderheit dieser Technologie liegt in der Vorbereitungsmethode, in der eine wie eine Paste verdickte Emulsion eingefroren wird. Der Wirkstoff liegt in der Emulsion als überzogene oder nicht überzogene Mikropartikel vor. Das Einfrieren wird im Gegensatz zur Zydis<sup>®</sup>-Technologie auf der Stellfläche der Gefriertrocknungsanlage im Bereich zwischen -20 °C und -50 °C durchgeführt. Um die Viskosität der Formulierung zu erhöhen und um damit die Inhomogenität durch Sedimentation während des Einfrierens zu verhindern, ist die Zugabe eines inerten Füllstoffs sehr wichtig. Allerdings könnte der höhere Anteil des Füllstoffs die Porosität des Endprodukts benachteiligen, was zu kompakten Tabletten und eventuell zu einer längeren Zerfallszeit führen könnte. Auf dem Markt sind 7 Produkte verfügbar, die nach Lyoc<sup>®</sup>-Technologie hergestellt werden. Beispiele sind in Tab. 3-2 aufgelistet.

**Tab. 3-2:** Beispiele für Lyoc<sup>®</sup>-Produkte auf dem Markt, nach [1]

<b>Produkt</b>	<b>Präparate</b>
Spasfon-Lyoc <sup>®</sup>	Phloroglucin
Proxalyoc <sup>®</sup>	Piroxicam
Paralyoc <sup>®</sup>	Acetaminophen
Loperamide-Lyoc <sup>®</sup>	Loperamid

### 3.1.1.3 Quicksolv<sup>®</sup>-Technologie

Die Firma Janssen Pharmceutica hat die Quicksolv<sup>®</sup>-Technologie entwickelt. Sie wird von Gole in dem US-Patent 5,215,756 [22] beschrieben. Dieses Patent verspricht die Überwindung der Nachteile der konventionellen Gefriertrocknungsverfahren, wie die Ausbildung des Stresses während der Eiskristallisation, die zur Rissentwicklung führt. Eine Erhöhung der Temperatur bei der Trocknung ist bei der Quicksolv<sup>®</sup>-Technologie nicht erforderlich, was die Gefahr des Schmelzens vermeiden könnte. Die Hauptbestandteile der Formulierung sind Matrixbildner wie Gelatine, Glycin, Pektin und Mannitol sowie zwei mischbare Lösungsmittel wie Wasser und absoluter Ethanol. Andere Bestandteile wie Süßstoffe und Geschmacksstoffe sind einsetzbar. Der Wirkstoff und die Hilfsstoffe sollten nicht in dem zweiten Lösungsmittel löslich sein.

Für die Herstellung der Formulierung [22] werden die Matrixkomponenten und der Wirkstoff im ersten Lösungsmittel gelöst oder dispergiert. Die Mischung wird auf Blister verteilt, und im Flüssig-Stickstoff-Kühltunnel oder in trockenem Eis tiefgefroren. Bei Temperaturen zwischen -5 °C und -20 °C werden die eingefrorenen Formen in das zweite Lösungsmittel (Ethanol) eingetaucht. Nachdem das Eis in dem zweiten Lösungsmittel gelöst ist, erfolgt unter Vakuum die Entfernung des zweiten Lösemittels.

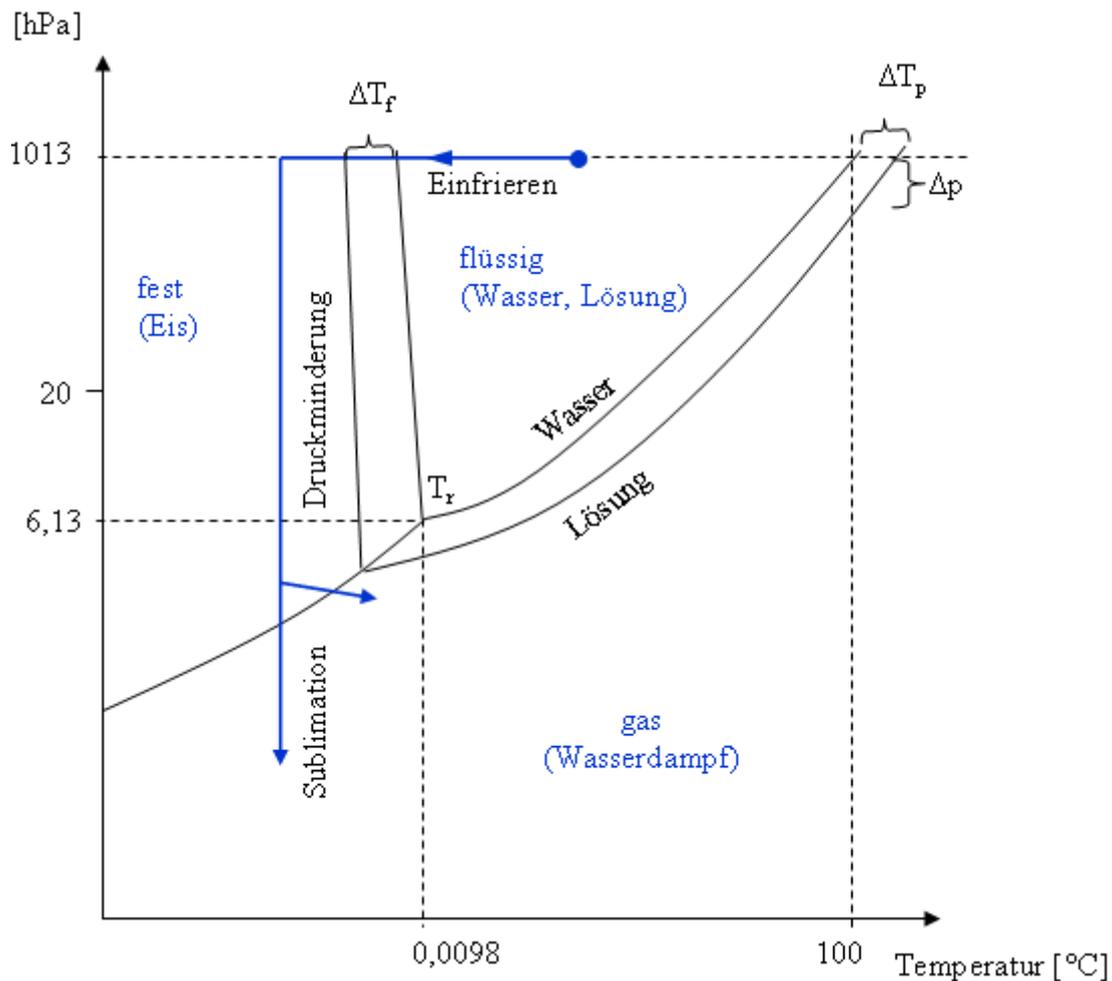
**Tab. 3-3:** Beispiele für die Quicksolv<sup>®</sup>-Technologie auf dem Markt, nach [1]

<b>Produkt</b>	<b>Präparate</b>
Propulsid Quicksolv <sup>®</sup>	Cisaprid Monohydrat
Remeron Soltab <sup>®</sup>	Mirtazapin
Risperdal-Janssen <sup>®</sup>	Risperidon

## 3.2 Gefriertrocknung

### 3.2.1 Definition

Gefriertrocknung ist ein schonendes Trocknungsverfahren, bei dem das Lösungsmittel (im allgemeinen Wasser) im festen (gefrorenen) Zustand durch Sublimation entfernt wird. Wie aus Abb. 3-1 ersichtlich wird, erfolgt die Sublimation erst unter dem Tripelpunkt des Wassers (Temperatur = 0,0098 °C, Druck= 6,13 hPa), an dem Eis, flüssiges Wasser, und Wasserdampf koexistieren.



$\Delta T_f$  = Gefrierpunkterniedrigung

$\Delta T_b$  = Siedepunkterhöhung

$\Delta p$  = Dampfdruckerniedrigung

$T_r$  = Tripelpunkt

Dampfdruck über Eis:				
[°C]	0	-18	-40	-58
[hPa]	6,11	1,25	0,13	0,014

**Abb. 3-1:** Phasendiagramm für Wasser und eine wässrige Lösung sowie Prozessschritte bei der Gefriertrocknung (nicht maßstabsgetreu), nach [23]

Grundsätzlich wird die Gefriertrocknung in zwei nacheinander ablaufende Schritte eingeteilt: Das Einfrieren der Lösung und das Trocknen des Lösungsmittels unter Vakuum zuerst durch Sublimation (Haupttrocknung) und dann durch Desorption (Sekundärtrocknung). Es ist zu bemerken, dass der Druck von 6,13 hPa sich auf den reinen Wasserdampfdruck über Eis und nicht auf den Absolutdruck bezieht. Von daher ist eine Gefriertrocknung bei Atmosphärendruck möglich [23].

Das getrocknete, meist hoch poröse Produkt löst sich sehr rasch wieder auf, deshalb wird es als Lyophilisat (von dem griechischen Wort lyophil: lösungsfreundlich) bezeichnet.

### **3.2.2 Vor- und Nachteile der Gefriertrocknung**

Die Gefriertrocknung ist eine Technik, die viele verschiedene Vorteile bietet:

- minimale Veränderungen und Aktivitätsverlust eines Wirkstoffs
- Durch Entstehen einer porösen, oftmals amorphen Struktur ist ein schnelles und vollständiges Auflösen möglich.
- Sterilität und Partikelfreiheit des Produkts wird durch die aseptische Verarbeitung im Endbehältnis gewährleistet.
- Genaue und saubere Dosierung im Endbehältnis ist möglich.

Dafür müssen aber auch einige Nachteile betrachtet werden:

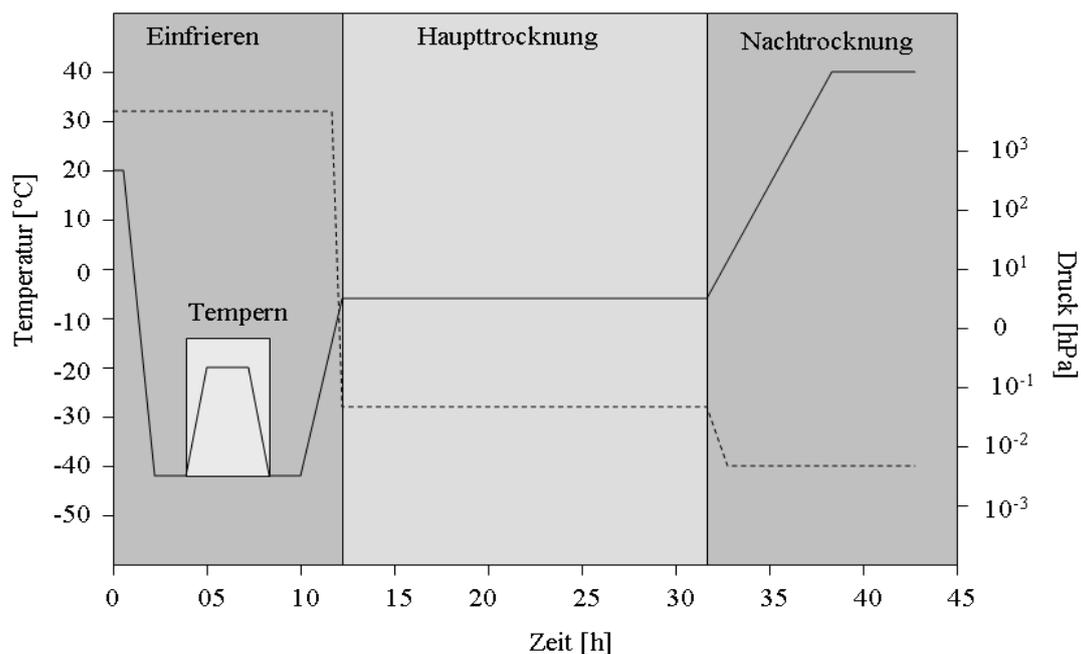
- Lyophilisation ist eine teure Trockenmethode.
- lange Prozesszeiten (bis zu mehreren Tagen)
- hoher Energieverbrauch
- geringe Chargengröße
- Das Lyophilisat ist sehr feuchtigkeitsempfindlich.

### **3.2.3 Einsatzbereiche der Gefriertrocknung**

Die Trocknung von Lebensmitteln und Pflanzen ist eine der ältesten Konservierungsmethoden der Menschheit. Schon die Inkas trockneten gefrorenes Fleisch in der Strahlungswärme der Sonne unter dem niedrigen Luftdruck des Altiplanos in Peru [24]. Obwohl bereits im Jahr 1890 zum ersten Mal über Einfrieren und Trocknung frischer Organstücke berichtet wurde, erwarb die Lyophilisation erst während des zweiten Weltkriegs in den USA eine großtechnische Bedeutung [23]. Dieses Verfahren wurde damals zur Stabilisierung von

Blutplasma und Penicillin herangezogen [24], was eine breite Anwendung des hydrolyseempfindlichen Penicillins ermöglicht hat. Mittlerweile ist die Lyophilisation in vielen Industriezweigen etabliert. Beispielsweise wird die Gefriertrocknung im Lebensmittelbereich bei der Produktion von löslichem Kaffee-Granulat, Säuglingsmilch, Säften, Kräutern und Gewürzen angewandt [25]. Technische Materialien wie Metalloxid-Keramikpulver werden ebenfalls per Lyophilisation getrocknet [26]. Im Bereich der Restauration und der Konservierung von historischen Dokumenten und Büchern wird ebenfalls Gefriertrocknung eingesetzt [25]. Biologische Materialien wie Blutplasma, Hornhaut, Ei- und Samenzellen können nach der Lyophilisation gelagert werden [25]. Eine der wichtigsten Einsatzbereiche ist jedoch die Pharmazeutische Industrie. Die Gefriertrocknung hat hier eine bedeutsame Rolle als Herstellungsmethode erlangt. Sie ermöglicht die Entwicklungen biotechnologischer Produkte wie Proteine, die meistens in gelöster Form thermolabil oder instabil sind. Beispielsweise sind Pulver zur parenteralen Anwendung wie Lebendimpfstoffe von Bakterien oder Viren, Proteine und Hormonpräparate gefriergetrocknet [26]. Zusätzlich werden Substanzen, die sehr kostspielig sind oder eine rasche vollständige Auflösung (Rehydratation) erfordern, mittels Gefriertrocknung verarbeitet.

### 3.2.4 Der Gefriertrocknungsprozess



**Abb. 3-2:** Gefriertrocknungszyklus mit einem Tempersschritt beim Einfrieren (Druck ---, Temperatur —)

Die Gefriertrocknung beinhaltet drei zeitlich aufeinander folgende Schritte:

- Einfrieren: Die Lösung wird in diesem Schritt üblicherweise bei Atmosphärendruck abgekühlt.
- Haupttrocknung: Hier wird das gefrorene Wasser durch Sublimation entfernt, dazu ist eine Druckminderung unter den Tripelpunkt der Lösung und eine hohe Energiezufuhr erforderlich.
- Nachtrocknung: Das adsorbierte oder stärker gebundene Wasser wird durch Erhöhung der Trocknungstemperatur entfernt.

### 3.2.4.1 Das Einfrieren

Das Einfrieren ist in der Regel der erste Schritt in einem Gefriertrocknungsprozess. In diesem Schritt wird die flüssige Ausgangslösung in den festen Aggregatzustand überführt [27]. Der größte Teil des Wassers liegt demzufolge als Eiskristalle in einer kristallartigen Matrix vor, oder es wechseln sich Zonen von kristallinem Eis mit glasartig erstarrten amorphen Zonen ab.

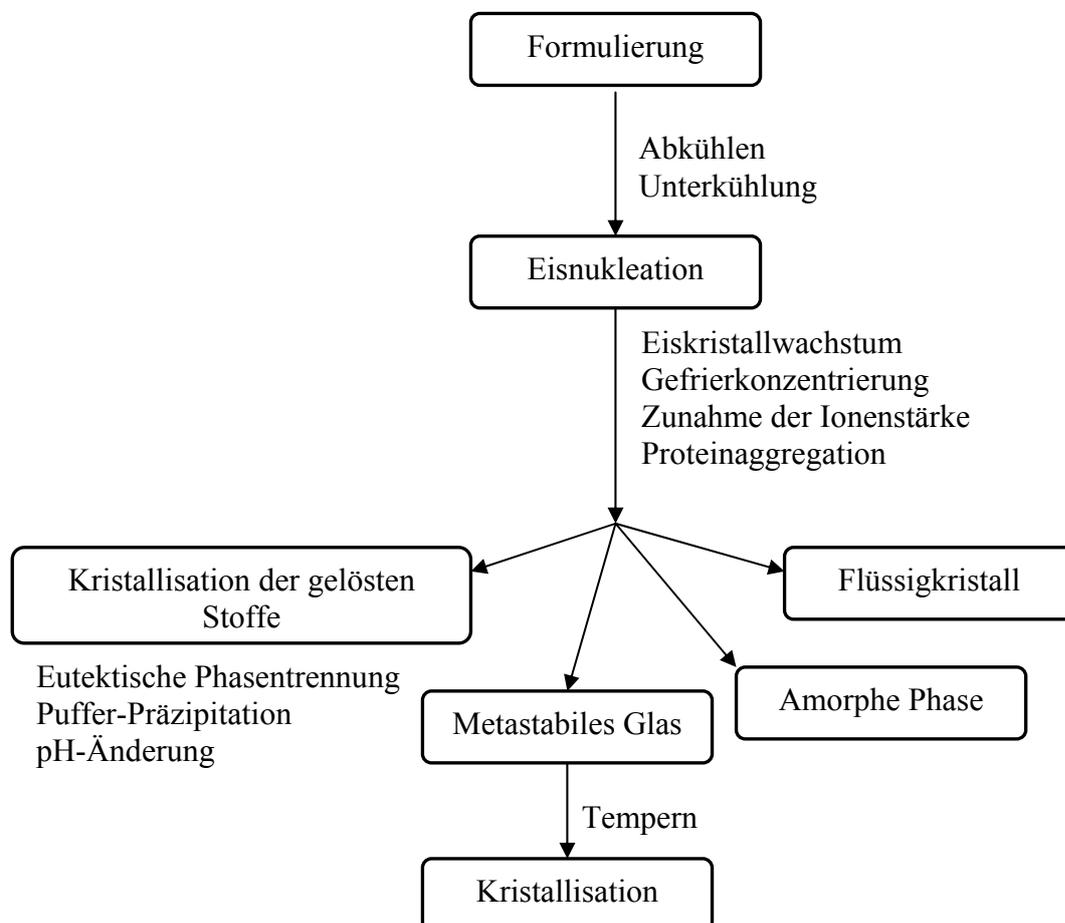


Abb. 3-3: Physikalische Ereignisse während des Einfrierens nach Nail [44]

Die Mikrostrukturen der Eiskristalle und der gelösten Stoffe bestimmen die Parameter der Haupt- und Nachtrocknung in einem Gefriertrocknungsprozess und damit die Qualität des Endprodukts [28]. Deshalb wird das Einfrieren als die kritische entscheidende Phase bezeichnet. Eine schematische Darstellung der physikalischen Ereignisse während des Einfrierens erfolgt in Abb. 3-3 und wird in den nächsten Abschnitten detailliert behandelt [29].

In der Technologie werden verschiedene Einfriermethoden verwendet. Sie unterscheiden sich in Abhängigkeit von dem Produkt und dem Verwendungszweck. Einige Beispiele werden hier genannt [30].

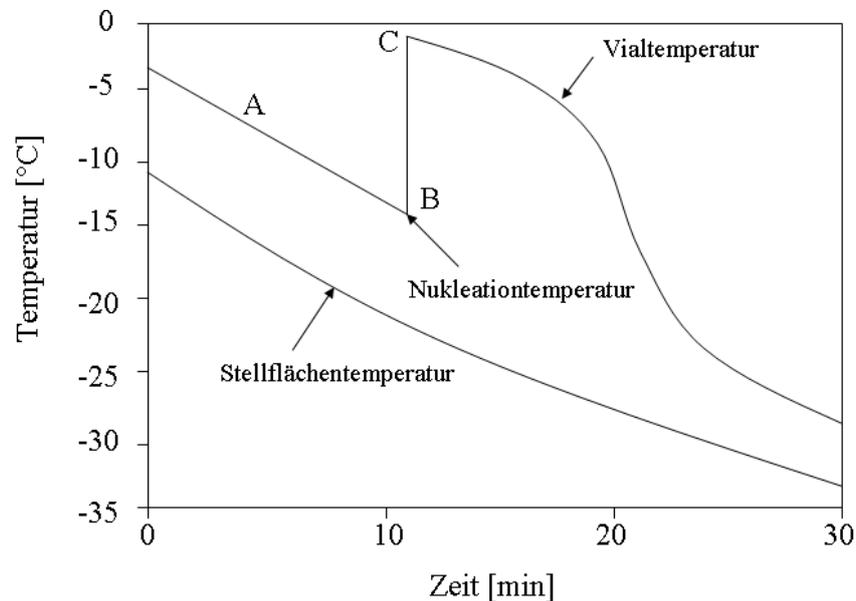
1. Die Vials werden auf eine vorgekühlte Stellfläche gestellt.
2. Die Vials werden bei Raumtemperatur auf eine Stellfläche gestellt. Die Stellfläche wird dann mit einer bestimmten Kühlrate auf eine tiefe Temperatur (unter der Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung  $T_g'$ ) abgekühlt.
3. Eintauchen in flüssigen Stickstoff.
4. Einfrieren in einem Tunnel, in den flüssiger Stickstoff eingesprüht wird.
5. Versprühen von Tröpfchen der Probe in flüssigem Stickstoff.

In der Industrie kommt die zweite Methode am häufigsten für das Einfrieren von Vials zum Einsatz [30]. Zum Einfrieren von Blistern wird meist die vierte Methode verwendet [20].

### **3.2.4.1.1 Unterkühlung und Eisnukleation**

Die Kristallisation einer Flüssigkeit ist das Resultat zweier aufeinander folgender Prozesse [26]. Zuerst entstehen Kristallkeime (Nukleation) bei einer bestimmten Temperatur (Nukleationstemperatur  $T_n$ ), dann folgt die Kristallwachstumsphase. Die Differenz zwischen der Nukleationstemperatur und dem Gefrierpunkt wird als Unterkühlung bezeichnet [27]. Die Ursache für diese Unterkühlung ist das Ausbleiben der Nukleation, die eine Voraussetzung für das Wachstum von Eiskristallen ist [23]. Das Ausmaß der Unterkühlung ist sowohl von der Eigenschaft der Lösung (Art und Menge der gelösten Stoffe) als auch von den Prozessbedingungen (Einfriermethode, Behältnis,...) abhängig [26]. Bei extrem gut von Fremdpartikeln gereinigtem Wasser konnte die Unterkühlung im flüssigen Zustand eine Temperatur bis  $-40\text{ °C}$  erreichen. In diesem Fall führen nur Cluster aus Wassermolekülen zur Eiskristallbildung und die Nukleation ist homogen [26]. Die Lösungen enthalten in der Praxis allerdings dispergierte Teilchen und Verunreinigungen, welche die Nukleation aus

energetischen Gründen erleichtern. Diese Nukleation wird als heterogen bezeichnet. In der Pharmazie zeigen sterile und partikelfreie Lösungen wie Parenteralia eine Unterkühlung von 10 bis 15 °C [27, 28].

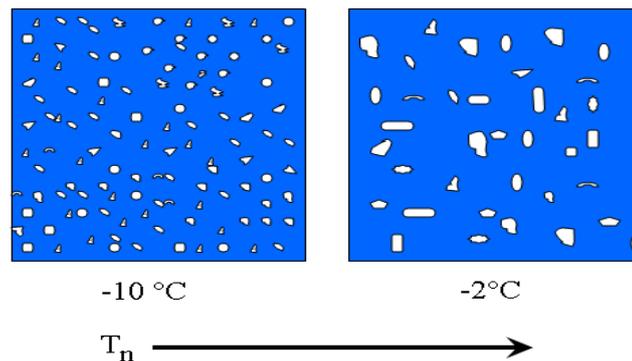


**Abb. 3-4:** Temperaturänderung des Vials und der Stellfläche mit der Zeit von einer 10% HES-Lösung nach Searles [30]

Als Beispiel demonstriert Searles [31] den Zeitverlauf des Einfrierens mit Unterkühlung einer 10 %-igen Hydroxyethylstärke. Wie in Abb. 3-4 ersichtlich ist, kühlt sich die Lösung ähnlich wie die Abkühlrate der Stellfläche ab, allerdings bleibt die Temperatur ca. 7 bis 8 °C höher als die Stellflächentemperatur (Zone A). Die Bildung des Eises findet erst bei -14 °C statt (Punkt B). Die Eisbildung ist ein exothermes Ereignis, was zur Erhöhung der Temperatur bis auf ca. -1 °C führt (Punkt C): Dadurch wird die Kristallisation des gesamten Wasseranteils verhindert. Bei weiterer Erniedrigung der Stellflächentemperatur kristallisiert dann noch ein höherer Wasseranteil aus, die Lösung konzentriert sich auf (Gefrierkonzentration) und die Produkttemperatur sinkt wieder.

In diesem Bereich deutet Searles [30] auf den Unterschied zwischen der Abkühlrate und Einfrierrate hin, obwohl diese Abgrenzung in manchen älteren Literaturstellen nicht vorgenommen wird. Die Abkühlrate bezeichnet die Geschwindigkeit, mit der die Probe in den Vials oder Blistern abkühlt, und wird in °C/min angegeben. Während die Abkühlrate einen Einfluss auf die Nukleationstemperatur ausübt, gilt die Einfrierrate für das Einfrieren erst nach der Nukleation.

Von den Prozessfaktoren, die Auswirkung auf die Unterkühlung haben, ist die Abkühlgeschwindigkeit einer der wichtigsten [26]. Die Abkühlrate beeinflusst die Unterkühlung und damit die Kristallgröße und Kristallform des Eises, was sich wiederum auf die Porosität und die Eigenschaften des Endprodukts auswirkt [23]. Eine rasche Abkühlrate verursacht ein großes Ausmaß an Unterkühlung, was zur Entstehung einer großen Zahl kleiner Kristallkeime führt (Abb. 3-5).



**Abb. 3-5:** Darstellung der Auswirkung der Unterkühlung auf die Anzahl der Eiskristalle nach Rambhatla [32]

Aufgrund des festen Gesamtbetrags des Wasseranteils in der Lösung bleiben die Eiskristalle klein [27] und hinterlassen bei der Trocknung kleine Poren. Die kleinen Poren in den getrockneten Schichten erschweren die Sublimation, in dem sie einen erhöhten Widerstand für den ausströmenden Wasserdampf darstellen. Auf der anderen Seite beschleunigt die feine, poröse Struktur des Produkts die Entfernung des nicht gefrorenen Wassers in der Nach Trocknung [27]. Wird hingegen mit einer geringeren Abkühlrate gearbeitet, wird die Unterkühlung vermieden. Durch langsames Eiskristallwachstum entstehen große Eiskristalle, die nach der Trocknung große Poren hinterlassen.

Die Nukleation ist ein zufälliger Vorgang und die Nukleationstemperatur ist völlig variabel, sogar in einem gut kontrollierten Prozess. Deshalb ist die Heterogenität bei der Eisbildung in einer Charge und demzufolge die Heterogenität in der Haupttrocknung schwer zu vermeiden [33]. Um den Einfluss der Verunreinigung auf die Unterkühlung und die Heterogenität auszuschließen, ist es notwendig, bei der Lösungsvorbereitung und Gefrier Trocknung in sehr sauberen Räumen wie Sterilräumen zu arbeiten. Auf der anderen Seite werden andere Möglichkeiten angeboten, um die Nukleation zu steuern und die Heterogenität in der Haupttrocknung herabzusetzen. Eine einfache Methode wie die Zugabe von Nukleationsmitteln (Silberiodid, Pseudomonas syringae) oder abgeriebenen Vials wurden von Searles et al. [31] untersucht. Rambhatla [33] benutzte eine Eis-Vernebelungstechnik (ice

fog), um die Unterkühlung zu kontrollieren. Mit der vakuum-induzierten Einfriermethode von Kramer [34] wurde die Unterkühlung umgangen. Der positive Effekt des Temperns auf die Minderung der Heterogenität wurde von Searles [35] illustriert und wird in Abschnitt 3.2.4.1.3 ausführlich erörtert.

Es ist darauf hinzuweisen, dass die inverse Beziehung zwischen der Unterkühlung und den kleinen Eiskristallen, der großen spezifischen Oberfläche und der Geschwindigkeit der Haupttrocknung nur bei einer so genannten allgemeine Unterkühlung gültig ist [30]. Entsteht dagegen beim Einfrieren ein Temperaturgradient in der Lösung, wird von gerichteter Erstarrung als Einfrierverhalten gesprochen. Der Einfluss der gerichteten Erstarrung auf die Morphologie des Produkts wird beim Einfrieren in Kältebädern als Beispiel dargestellt. Das Einfrieren in Kältebädern wie Eintauchen in flüssigen Stickstoff bewirkt einen sehr starken Temperaturgradienten von Boden und Wänden des Behältnisses in Richtung Mitte. Aufgrund der sehr hohen Abkühl- und damit Kristallisationsgeschwindigkeit, die am Boden und den Wänden ausgeübt wird, friert die Lösung von außen nach innen ein, und hinterlässt eine radial ausgerichtete Struktur. Bei diesem schnellen Vorgang werden die verbleibenden flüssigen Anteile zuerst nach innen und dann in der Mitte nach oben entzogen. Am Ende ist eine spitze Erhebung in der Mitte des Kuchens als typisches Merkmal dieser Einfrierart festzustellen [26].

### 3.2.4.1.2 Gefrierverhalten der gelösten Stoffe

Das Verhalten der gelösten Stoffe in der gefrierkonzentrierten Lösung ist ein Schlüssel für das Verständnis der Materialforschung in der Gefriertrocknung. Es gibt mehrere Möglichkeiten:

**Das eutektische System:** Dieses System stellt das einfachste Verhalten dar. Als Beispiel ist das Gefrierverhalten einfacher wässriger Lösungen wie einer Natriumchlorid-Lösung in Abb. 3-6 dargestellt [29]. Zunächst erfolgt eine Unterkühlung bis zur Nukleationstemperatur (b) bei etwa  $10\text{ °C}$  unter dem Gefrierpunkt ( $T_f$ ). Bei Erreichen von (b) kristallisieren die reinen Wassermoleküle aus, was zu einem leichten Temperaturanstieg in der Probe führt. Bei weiterer Abkühlung konzentriert sich die Lösung weiter auf, bis eine gesättigte Natriumchlorid-Lösung von  $\sim 23\%$  (w/w) entstanden ist. Am Punkt (c) kristallisieren die Natriumchlorid-Moleküle neben dem Wasser schlagartig aus, was wiederum zum Temperaturanstieg auf die eutektische Temperatur ( $T_{eu}$ ) führt. Unterhalb der  $T_{eu}$  trennt sich das System in Eis und NaCl-Kristalle und es bildet sich ein Kristallgemisch.

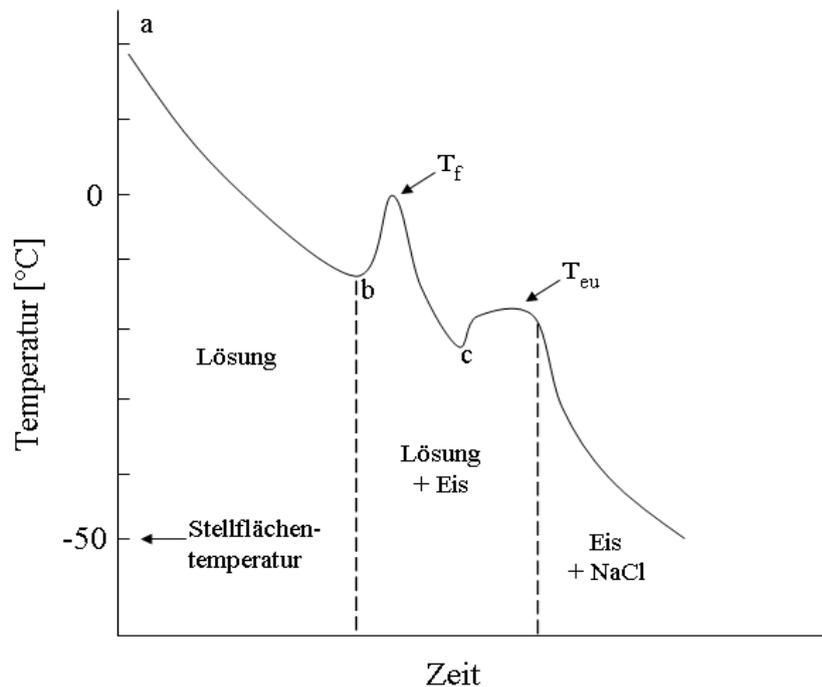


Abb. 3-6: Abkühlkurve von einer Natriumchloride Lösung nach Nail [29]

Bei Formulierungen mit unterschiedlich löslichen Bestandteilen löst die Gefrierkonzentration einen erheblichen Effekt aus. Beispielsweise kann es bei einem Puffersystem als Folge der Gefrierkonzentration zu einer Verschiebung im pH-Wert kommen. Beim Einfrieren eines Natriumphosphat-Puffer-Systems kristallisiert zuerst das weniger lösliche di-Natriumphosphat-Salz aus, was zur Absenkung des pHs von 7,4 auf 3,9 führt [36]. Dieser pH-Sprung könnte einen Aktivitätsverlust mancher Substanzen wie  $\beta$ -Galactosidase und Lactatdehydrogenase mit Phosphatpuffer gegenüber dem Einfrieren im TRIS- oder Citratpuffer hervorrufen [36]. Deshalb ist es vorteilhaft, den amorphen Zustand der gesamten Pufferkomponenten während des Einfrierens zu erhalten [37]. Um eine pH-Verschiebung während des Einfrierens vorzubeugen, kann entweder die Zugabe von einem Zucker als Glasbildner oder der Einsatz einer Abkühlrate, die schneller ist als die für die Kristallisation erforderliche Kühlrate, hilfreich sein [38].

**Das amorphe Glas:** Manche Substanzen wie Zucker, Proteine und andere Polymere verhalten sich allerdings anders und kristallisieren am eutektischen Punkt nicht aus, sondern erstarren als amorphes Glas. Dieses Verhalten wird im sogenannten Zustandsdiagramm (Abb. 3-7) einer Saccharoselösung dargestellt [39].

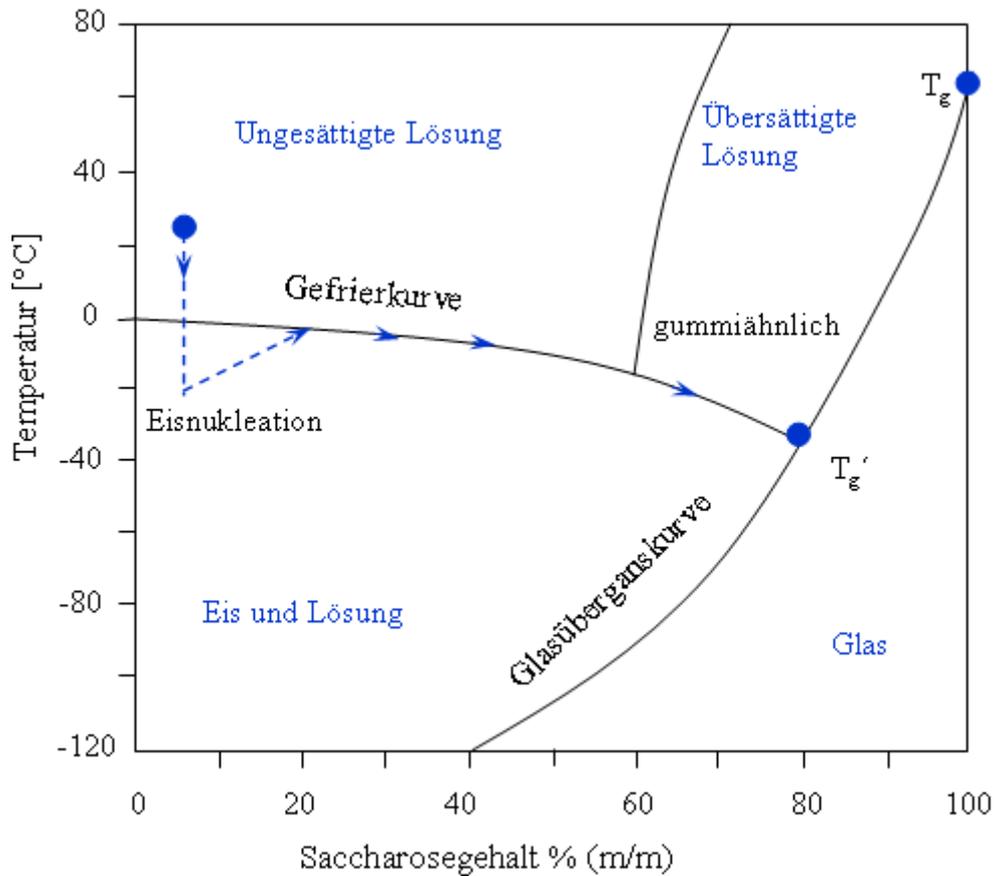


Abb. 3-7: Zustandsdiagramm eines Saccharose/Wasser Systems nach Franks [39]

Hier unterschreiten die gelösten Stoffe die eutektische Temperatur unter gleichzeitiger Zunahme der Konzentration. Im Verlauf der Konzentrierung steigt die Viskosität der Restlösung so lange an, bis die Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung ( $T_g'$ ) erreicht ist. Dabei entsteht eine thermodynamisch instabile übersättigte Lösung. Unter dieser Temperatur ist die Viskosität so hoch, dass die Diffusion zum Erliegen kommt und demzufolge die Bildung von Kristallkeimen verhindert wird [40]. Die Konzentration der Saccharoseanteile steigt in diesem Prozess von 10% auf eine stoffspezifische Konzentration von 81% beim Erreichen der  $T_g'$  an. Das spiegelt wiederum die großen Anteile von ungefrorenem Wasser von 12% im Glas wider [30]. Die  $T_g$ -Kurve in Abb. 3-7 beschreibt den Zustand gleicher Viskosität der Saccharose/Wasser-Lösung [41]. Wenn das Wasser des Glases im nächsten Schritt bei der Trocknung entfernt, erhöht sich die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ), was den Weichmachereffekt des Wassers verdeutlicht.

Eine Erhöhung der Temperatur über die  $T_g'$  bei der Haupttrocknung führt zur Senkung der Viskosität der amorphen Phase, so dass sie über die Poren möglicherweise ausströmt [42]. Eine solche Zerstörung der Gerüststruktur bei der Trocknung wird als Kollaps bei der

Kollapstemperatur ( $T_c$ ) bezeichnet. Diese Temperatur lässt sich nur mittels eines Gefriertrocknungsmikroskops bestimmen. Pikal illustriert eine schematische Darstellung für dieses Phänomen während der Haupt- und Nachtrocknung unter dem Gefriertrocknungsmikroskop [42].

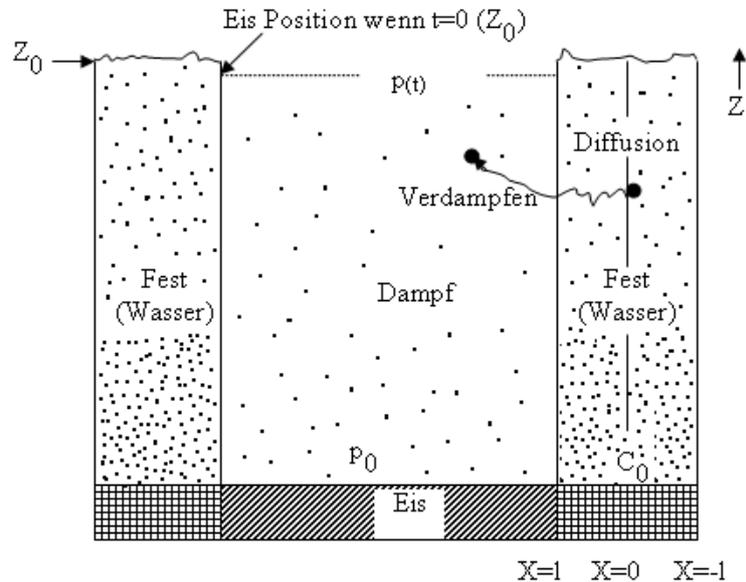


Abb. 3-8: Schematische Darstellung für die Haupt- und Nachtrocknung nach Pikal [42]

Wie die Abb. 3-8 zeigt, ist die Struktur eines gefriergetrockneten Systems als Kanal dargestellt. Nach dem Einfrieren (wenn die Zeit  $t=0$ ) ist dieser Kanal mit Eis gefüllt und von Wänden aus amorphen, gelösten Stoffen umgeben. Idealerweise sublimiert das Eis und zieht sich während der Haupttrocknung nach unten zurück. Bei der Nachtrocknung diffundieren die Wassermoleküle wegen des Druckunterschieds. Wird die Temperatur bei der Gefriertrocknung erhöht, sinkt die Viskosität der amorphen Phase bis  $T_g'$ . Und sobald sich das Eis nach unten zurückzieht, fangen die Wände an zu fließen und die Poren verlieren mit der Zeit ihre Struktur.

Dies deutet auf den Unterschied zwischen  $T_c$  und  $T_g'$  hin. Während sich  $T_g'$  auf den Glasübergang der amorphen Phase im Kontakt mit Eis bezieht, tritt der Kollaps als Ergebnis eines Glasübergangs in den getrockneten Regionen erst beim Trocknen ein [42]. Normalerweise liegt  $T_c$  ein paar Grad höher als  $T_g'$  [42,43].

Daraus wird ersichtlich, dass die  $T_{cu}$  und  $T_c/T_g'$  die kritischen Temperaturen während des Gefriertrocknungsprozesses darstellen.

**Metastabiles Glas:** Es stellt ein anderes Einfrierverhalten der gelösten Stoffe dar [44]. Solche Substanzen kristallisieren bei anschließendem Aufheizen wieder aus. Das bekannteste Beispiel ist Mannitol, das bei einer Temperatur über  $T_g'$  rekristallisiert. Wird Mannitol bei

dem Einfrierprozess nicht voll kristallisiert, tritt die Kristallisation erst bei der Erwärmung in der Haupttrocknung ein. Als Folge kommt ein Bruch des Vials als typisches Phänomen für die Gefriertrocknung von Mannitol häufig vor [45]. Das Ausmaß des Glasbruchs konnte mit Erniedrigung des Füllvolumens, Änderung der Lösungskonzentration sowie dem Zusatz anderer Hilfsstoffe verringert werden [45].

**Flüssigkristall:** Die Ordnung des flüssigkristallinen Zustandes liegt zwischen amorph und kristallin. Dieser wird im Allgemeinen von oberflächenaktiven Substanzen gebildet [44]. Flüssigkristalle haben eine höhere räumlich Ordnung als eine Mizelle, und stellen eine lamellare oder stabförmige Struktur dar. Der Einfluss dieses Zustands auf die Eigenschaften des Produkts ist noch weitgehend unerforscht.

### 3.2.4.1.3 Tempern (Annealing)

Tempern, bekannt als Annealing oder Thermal Treatment, stellt eine thermische Behandlung der Ausgangslösung während des Einfrierprozesses dar. Tempern kann während der ersten Abkühlung oder, wie am häufigsten in der Praxis verwendet, danach durchgeführt werden [30]. Beim Tempern nach dem Einfrieren wird die Probe über die  $T_g'$  erwärmt, allerdings ohne den Schmelzpunkt zu überschreiten. Diese Temperatur wird für eine Weile konstant gehalten, bevor wieder auf eine tiefere Temperatur abgekühlt wird. Durch die Erhöhung der Temperatur über die  $T_g'$  entstehen eine Reihe von Prozessen [30]:

- Entwicklung der Eiskristalle durch Ostwald-Reifung: Bei Temperaturen über  $T_g'$  erhöht sich die Beweglichkeit der Moleküle und die Diffusion wird wieder aktiviert [26]. Kristalle, die unter der kritischen Größe sind, wandeln sich in größere um. Dadurch kann die Heterogenität in der Struktur nach dem Einfrieren und demzufolge bei der Haupttrocknung, wie zuvor erwähnt wurde, vermindert werden [35].
- Kristallisation der gelösten Anteile: Hilfsstoffe und Füllstoffe, die nicht vollständig bei der ersten Abkühlung kristallisieren, wandeln sich beim Tempern von metastabilen, amorphen in kristalline, stabile Zustände um. Bekannte Beispiele sind die Rekristallisation von Glycin und Mannitol [46,47]. Dadurch ist eine Trocknung bei höherer Temperatur möglich, und die Umwandlung der amorphen Anteile wird während der Lagerung vermindert, was die Stabilität begünstigt.

In Abhängigkeit der Eigenschaften der Bestandteile kann das Tempern einen negativen oder positiven Effekt auf die Sublimationsgeschwindigkeit und dadurch auf die

Haupttrocknungszeit haben. Während Searles [35] eine 3,5-fache Erhöhung der Sublimationsgeschwindigkeit von Hydroxyethylstärke und Saccharose nachwies, ergaben Versuche mit einer aus Mannitol, Trehalose und Natriumchlorid bestehenden Formulierung einen verstärkten Widerstand gegen die Sublimation des Wassers und dadurch eine Zunahme der Haupttrocknungszeit [48].

### **3.2.4.2 Haupttrocknung**

In der Haupttrocknung wird das gefrorene Wasser direkt vom festen in den gasförmigen Zustand durch Sublimation überführt. Der Wasserdampf kondensiert wieder an der kältesten Stelle der Gefriertrocknungsanlage, dem Kondensator, und gefriert an dessen Oberfläche aus. Hierzu ist es erforderlich, für jedes Mol Eis ca. 51 kJ an die Sublimationsfront zu übertragen [26]. Diese Energie wird als Wärme über eine normalerweise beheizbare Stellfläche zugeführt. Die treibende Kraft für die Sublimation ist, wie in den nächsten Abschnitten ausführlich diskutiert wird, das Druckgefälle oder das Temperaturgefälle zwischen der Sublimationsfront und der Kondensatoroberfläche. Obwohl das Entfernen des Wasserdampfs bei Normaldruck prinzipiell gelingt [23], ist jedoch ein Vakuum für die Beschleunigung der Sublimation unerlässlich. Zusätzlich hilft ein kürzerer Transportweg für den Wasserdampf zum Kondensator, um eine effiziente Trocknung zu erleichtern.

Um die Trocknungszeit zu vermindern und damit hohe Kosten zu reduzieren, sollte die Temperatur des Produkts ( $T_p$ ) hoch eingestellt werden, allerdings ohne die eutektische oder Kollapstemperatur zu überschreiten. Deshalb ist eine sorgfältige Einstellung der Haupttrocknungsparameter (Temperatur, Druck) sehr wichtig.

#### **3.2.4.2.1 Energieübertragung**

Die Energieübertragung, die in Form von Wärme zugeführt wird, ist während der Trocknung sehr wichtig für die Sublimation. Für die Wärmeübertragung sind drei Wege von Bedeutung: Wärmeleitung, Gasströmung (Konvektion) und Wärmestrahlung [23, 26]. Das Ausmaß der Wirkung jeder Wärmeübertragung ist vom Kammerdruck, dem Material und der Form des Produktgefäßes sowie der Bauform der Gefriertrocknungsanlage abhängig. In Abb. 3-9 wird beispielsweise der Einfluss der Wärmeleitung auf ein Produkt im Glasvial auf einer beheizbaren Stellfläche dargestellt [23].

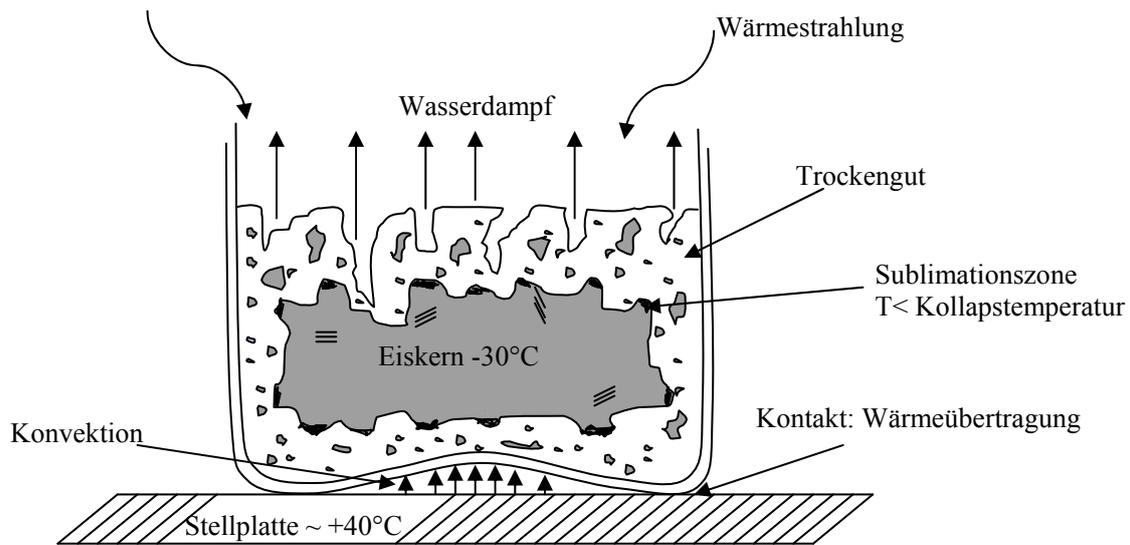


Abb. 3-9: Wärmeübertragung auf das Produkt im Glasvial, nach [23]

Die Wärmeleitung durch direkten Kontakt des Gefäßbodens mit der beheizten Stellfläche stellt den Hauptteil des Energiezufuhrweges (55-75%) dar [49]. Die Übertragung der Energiemenge von der Platte auf das Produkt pro Zeit  $dQ/dt$  [J/s] wird durch die Gleichung (Gl. 3-1) beschrieben.

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

Gl. 3-1

Dabei bezeichnet  $(T_s - T_p)$  die Differenz zwischen der Temperatur der Stellfläche  $T_s$  [°C] und der Produkttemperatur  $T_p$  [°C],  $A_v$  [cm<sup>2</sup>] ist die Vialbodenfläche und  $K_v$  der Wärmeleitkoeffizient [J · s<sup>-1</sup> · cm<sup>-2</sup> · K<sup>-1</sup>]

Dies erklärt die Bedeutung des direkten Kontakts zwischen dem Produktgefäß und der beheizbaren Stellfläche. Deshalb ist die Beladung auf ein Blech oder Tray zu vermeiden. Um die langsame Wärmezufuhr und dadurch auch einen langsamen Gefriertrocknungsprozess auszuschließen, werden momentan die so genannten „bottomless trays“ verwendet.

Die nach innen gewölbte Struktur des Vialbodens (Abb. 3-9) begrenzt den tatsächlichen Kontakt mit der Stellfläche auf einen kleinen Anteil der gesamten Bodenoberfläche [29]. Infolgedessen wird der Energiebeitrag durch Wärmeleitung abgeschwächt [29] und der Einfluss der Energiezufuhr über dem Gasraum (Konvektion) gefördert.

Die Rolle der Konvektion wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Oetjen [26] zeigt den Zusammenhang zwischen dem Heizplatte-Vial-Abstand und der Wärmeübertragung durch Konvektion. Die Konvektion spielt eine wesentliche Rolle, wenn die Abstände klein sind.

Auf der anderen Seite ist die Konvektion stark vom Kammerdruck abhängig. Bei der Erniedrigung des Kammerdrucks unter 0,1 hPa wird eine Beschleunigung des Trocknungsprozesses erwartet, da der Dampfdruck des Eises über den Kammerdruck liegt.

In der Praxis wird jedoch eine Erniedrigung der Sublimationsrate beobachtet. Grund dafür ist der Mangel an Gasmolekülen, die für den Wärmetransport durch Konvektion zur Verfügung stehen [23]. Bei höherem Druck ist die Differenz zwischen dem Dampfdruck des Eises und dem Kammerdruck zwar klein, aber wegen der besseren Wärmezufuhr steigt die Produkttemperatur und dadurch der Sättigungsdampfdruck [29].

Es ist daraus zu schließen, dass ein effizienter, konvektiver Wärmetransport viele Gasmoleküle benötigt. Allerdings sollte beachtet werden, dass die Diffusion von Wassermolekülen zum Kondensator während der Trocknung nicht behindert wird. Ein Kompromiss zwischen den beiden Aspekten muss gefunden werden.

Im Gegensatz zur Wärmeleitung und Konvektion benötigt die Wärmeübertragung durch Strahlung kein Trägermaterial [29]. Die Energieübertragung erreicht das Produkt hier von unten durch die Stellfläche und von oben durch die Strahlungsplatte [50]. Je nach Standort des Vials (Rand oder Mitte der Stellfläche) ist der Wärmestrahlungseffekt mehr oder weniger ausgeprägt. Dies könnte auf die Wirkung der Wände bzw. der Plexiglashaube oder der Plexiglastür zurückgeführt werden. Anders als die Konvektion geht die Rolle der Wärmestrahlung logarithmisch mit der Zunahme des Kammerdrucks und der Erniedrigung der Stellflächentemperatur zurück [51]. Im Gegensatz zur Konvektion wird der Effekt der Wärmeübertragung durch Strahlung ausgeprägt, wenn der Kammerdruck unter 0,05 hPa liegt [51].

In der Industrie wird bei der Herstellung von Lyophilisaten im Blister auf sehr kleine Abstände zwischen den Stellflächen geachtet. Dadurch wird die Wärmeübertragung durch Strahlung ausgeprägter [1].

#### **3.2.4.2.2 Massenstransfer (Wasserdampftransport)**

Der Massentransfer in der Haupttrocknung bezieht sich auf den Transfer des Wasserdampfs aus dem Kuchen durch die offenen Kanäle, welche sich bei der vorherigen Sublimation entwickelt haben, bis zum Kondensator [29]. Die Faktoren, die den Wasserdampfstrom und

dadurch die Geschwindigkeit der Sublimation beeinflussen, werden durch die Gl. 3-2 wiedergegeben. Hierbei wird die Sublimationsrate  $dm/dt$  [g/h per Vial] durch die Wassermenge  $dm$  [g] pro Zeit  $dt$  [h] definiert.  $p_0$  ist der Dampfdruck des Eises,  $p_c$  der Kammerdruck,  $R_p$  der Produktwiderstand, und  $R_s$  der Stopfenwiderstand.

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

**Gl. 3-2**

Es ist ersichtlich, dass die Differenz zwischen dem Dampfdruck des Eises und dem Kammerdruck die entscheidende treibende Kraft für den Sublimationsprozess ist.

Da der Dampfdruck des Eises mit der Temperatur exponentiell zunimmt (Abb. 3-1), führt die Erhöhung der Produkttemperatur zur Beschleunigung der Sublimationsgeschwindigkeit (ca. zweifache Geschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung von 5 °C) und dadurch zur Verkürzung der Trockenzeit. Der Zusammenhang zwischen der Sublimationsrate und der zugeführten Wärmemenge wird durch Gl. 3-3 dargestellt.

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

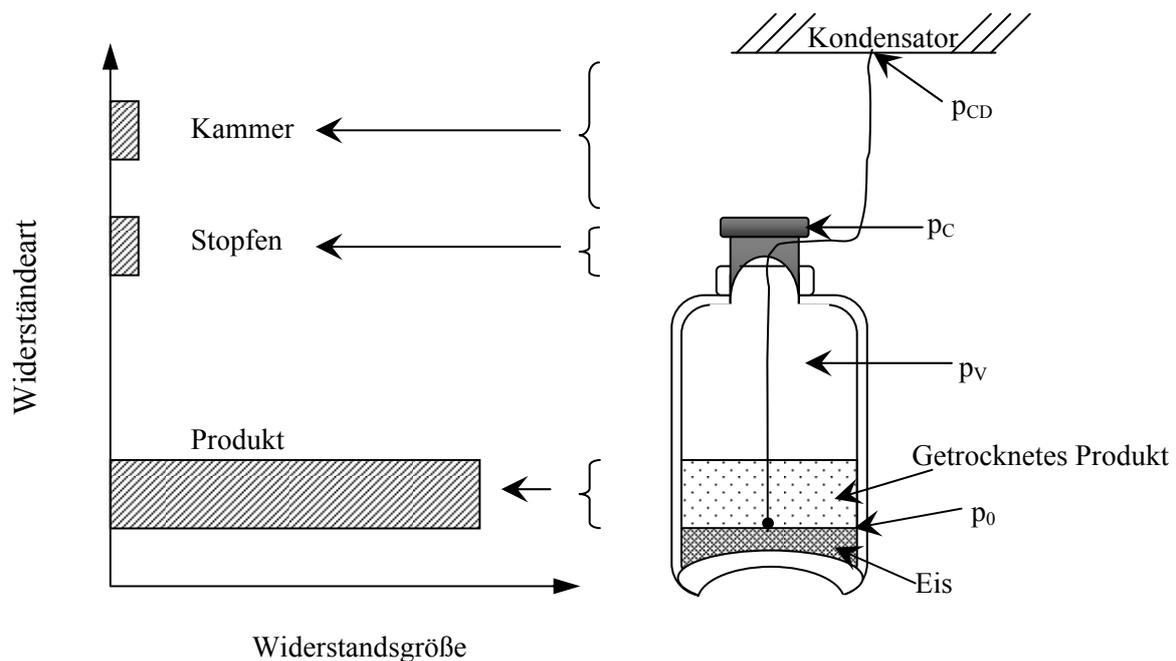
**Gl. 3-3**

Wobei  $dQ$  die Wärmeenergie [J] ist,  $\Delta H_s$  [J/g] die Sublimationsenergie des Eises.

Daher ist es sehr wichtig, die Produkttemperatur während der Trocknung hoch einzustellen, allerdings ohne die eutektische oder die Kollapstemperatur zu überschreiten.

Eine Verbesserung der Sublimationsrate ist zusätzlich durch die Erniedrigung des Kammerdrucks zu erreichen. Jedoch wirft ein sehr niedriger Druck (unter 0,066 hPa) auch Probleme auf. So verursachen die niedrigen Werte Heterogenität in der Wärmezufuhr und demzufolge steigt die Heterogenität der Produkttemperatur zwischen den Vials [52]. Außerdem ist es technisch schwierig, solche niedrigen Werte stabil zu halten [53].

Der Wasserdampftransport von der Sublimationsfront bis zum Kondensator wird auch durch verschiedene Barrieren erschwert. In Abb. 3-10 werden die drei Kammer-, Stopfen- und Produktwiderstände in der Gewichtung zueinander illustriert [27, 29].



**Abb. 3-10:** Widerstände für den Wasserdampfstrom während der Haupttrocknung nach Pikal [54]

Es ist ersichtlich, dass der Widerstand des getrockneten Produktkuchens den größten Anteil des Gesamtwiderstandes darstellt (Abb. 3-10). Der Produktwiderstand hängt stark von der getrockneten Schichtdicke, der Struktur des Produktkuchens, des Einfrierablaufs sowie der Konzentration der Lösung ab [29]. Im Gegensatz dazu spielt der Kammerwiderstand meistens eine vernachlässigbare Rolle. Der Kammerwiderstand ist durch die Anlagedimension und den Abstand zwischen der Trockenkammer und dem Kondensator definiert. Bei ungeeigneter Auswahl oder falsch gesetzter Stopfen kann der Stopfenwiderstand erheblichen Einfluss ausüben. Im Normalfall beträgt der Stopfenwiderstand jedoch 3 bis 10% des gesamten Widerstands [33].

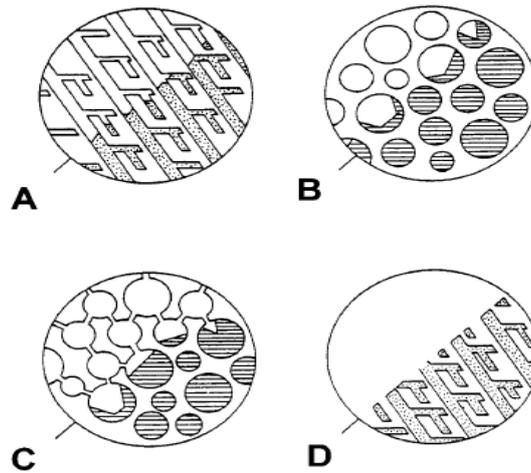
Abhängig von den Eigenschaften der Matrix und Temperatur tritt der Wasserdampf auf unterschiedliche Arten aus [55].

Entstehen beim Einfrieren Eiskristalle, die miteinander und mit der Oberfläche der Probe verbunden sind, wie in einer rigiden Matrix z.B. bei einer KCl-Lösung, so entweicht der Wasserdampf direkt durch Sublimation und hinterlässt neue Kanäle.

Bei amorphen Zuständen wie PVP- und Gelatinelösungen sind die Eiskristalle meistens nach einer Rekristallisation oder thermische Behandlung vollständig in der Matrix eingeschlossen. Der durch Sublimation entstehende Wasserdampf diffundiert hier durch die amorphe Matrix und wird von der Kuchenoberfläche abtransportiert.

Wenn die Diffusionswiderstände in der amorphen Matrix z.B. (Proteinlösung) sehr hoch sind, kann der Wasserdampf die Feststoffbrücken zwischen den Poren brechen. Infolgedessen kommt es in der Nachrocknung zur Rissbildung, die den Wasserdampftransport sehr erleichtert.

Letzteres kommt bei der Erhöhung der Trocknungstemperatur über die  $T_c$  vor. Hier lösen sich die Eiskristalle und die Struktur des Kuchens kollabiert.



**Abb. 3-11:** Trocknungsmechanismen während der Gefriertrocknung nach Mackenzie [55]

A: Direkte Sublimation B: Diffusion durch die Matrix C: Entweichen durch Rissbildung D: Kollaps

### 3.2.4.2.3 Überwachung der Produkttemperatur

Die letzten Abschnitte zeigten die Wichtigkeit der Kontrolle der Produkttemperatur während der Gefriertrocknung. Die Produkttemperatur wird durch das Gleichgewicht zwischen dem Wärme- und Massenübergang während der Gefriertrocknung determiniert [27]. Die Stellflächentemperatur und der Kammerdruck steuern den Wärme- und Massenübergang, was ihre Rolle als entscheidende Prozessvariablen erklärt. Die erhaltenen Werte dieser Variablen sind von der Messmethode abhängig. Zur Messung der Produkttemperatur während der Gefriertrocknung sind Thermoelemente und Widerstandsthermometer am gebräuchlichsten.

**Widerstandsthermometer:** Das Prinzip dieser Methode liegt in der Änderung des elektrischen Widerstandes von Metallen mit der Temperatur [29]. Diese Thermometer haben hohe Messgenauigkeit, allerdings können sie durch Selbsterwärmung eine Erhöhung der Produkttemperatur verursachen.

**Thermoelemente (Thermofühler):** Sie bestehen aus zwei Drähten unterschiedlicher Metalle, die eine Anschlussstelle zueinander haben. An dieser Stelle entsteht bei einer Temperaturänderung eine thermoelektrische Spannung [29]. Sowohl Widerstandsthermometer als auch Thermoelemente haben Nachteile, weil sie nicht für die gesamte Charge repräsentativ sind [27]. Thermofühler können die Eisknucleationstemperatur im Vergleich zu den anderen Flaschen ohne Fühler erhöhen. Als Folge entstehen in den Produkten ohne Fühler kleinere Eiskristalle, kleinere Poren und ein größerer Wasserdampf Widerstand, wodurch die Haupttrocknungszeit verlängert wird. Deshalb wird eine zusätzliche Zeitverlängerung von ca. 10 bis 15% der gesamten Haupttrocknung empfohlen, um ein vollständiges Trocknen aller Flaschen zu garantieren [27]. Die gemessenen Temperaturwerte sind sehr stark von der Position der Vials und der Fühler in der Probe abhängig. Es wurden Temperaturunterschiede von 10 bis 15 °C zwischen zwei Flaschen gleicher Charge festgestellt [26].

**Barometrische Temperaturmessung:** Diese Methode gestattet sowohl eine berührungsfreie Messung, als auch Messwerte über die wandernde Sublimationsfront [26]. Bei dieser Methode wird die Trockenkammer mit einem Ventil für eine kürzere Zeit vom Kondensator abgetrennt. Der aus dem Kuchen strömende Wasserdampf führt zu einem Anstieg des Drucks in der Trockenkammer bis zum Erreichen des Gleichgewichtsdampfdrucks über dem Eis. Aus dem Phasendiagramm des Wassers (Abb. 3-1) wird die Temperatur der Sublimationsfront ermittelt. Diese Methode verlangt eine hohe Dichtigkeit der Kammer.

#### 3.2.4.2.4 Endpunktdetektion

Am Ende der Haupttrocknung findet keine Eissublimation mehr statt. Weil die Wärme nicht mehr für die Sublimation gebraucht wird, steigt die Produkttemperatur bis zum Erreichen der Stellflächentemperatur an und die Dampfzusammensetzung ändert sich von Wasserdampf zu Luft oder Stickstoff [53]. Eine frühzeitige Umschaltung in die Sekundärtrocknung vor dem vollständigen Sublimationsabschluss führt zur Erhöhung der Restfeuchten oder einem Strukturkollaps. Deshalb ist die Erkennung des Endpunktes der Sublimation von großer Bedeutung. Dafür stehen verschiedene Messmethoden zur Verfügung. Hier sind einige aufgezählt:

**Temperaturmessung:** Wie zuvor berichtet wurde, steigt die Produkttemperatur nach dem Ende der Sublimation bis zur Stellflächentemperatur. Die Nachteile des Thermofühlers werden ausführlich im Abschnitt (3.2.4.2.3) diskutiert.

**Druckanstiegstest:** Wird das Ventil zwischen der Trockenkammer und dem Kondensator für 10 bis 20 Sekunden geschlossen, steigt der Wasserdampf in der Kammer. Am Ende der Haupttrocknung entsteht fast kein Wasserdampf mehr. Der Druckanstieg lässt nach oder fehlt sogar völlig.

**Komparative Druckmessung:** Das Prinzip dieser Messung basiert auf dem unterschiedlichen Ansprechen der Manometer auf verschiedene Gasarten in der Umgebung. Dazu werden ein Wärmeleitfähigkeitsmanometer (Pirani-Röhre) und ein kapazitives Manometer verwendet. Das Wärmeleitfähigkeitsmanometer wird meistens mit Stickstoff kalibriert. Es zeigt bei hoher Wasserdampfumgebung zu hohe, unwahrscheinliche Werte an, weil Wasserdampf die doppelte spezifische Wärmeleitfähigkeit von Stickstoff hat. Das kapazitive Manometer ist dagegen unabhängig von der Gasart und zeigt korrekte Werte an. Am Anfang der Sublimation sind in der Trockenkammer viele Wasserdampfanteile vorhanden. Die beiden Manometer zeigen unterschiedliche Messwerte an. Im Lauf der Haupttrocknung verarmt die Gasphase an Wasser, was zum Absinken der Pirani-Druckanzeige führt. Am Ende der Haupttrocknung ist kaum noch Wasserdampf anwesend und es kommt bei den Manometern zu einer Messwertübereinstimmung.

**Gefriertrocknungswaagen:** Das Gewicht eines Vials kann im Verlauf der Zeit in dem Gefriertrockner mittels einer Präzisionswaage detektiert werden. Durch die erhaltenen Werte können die Trocknungsgeschwindigkeit und das Trocknungsende ermittelt werden.

**Feuchtigkeitssensoren:** Kapazitive Feuchtesensoren können durch Messung der relativen Feuchtigkeit in der Trocknungskammer Hinweise über den Verlauf der Trocknung geben [29].

**Gasanalytoren:** Das Messprinzip nutzt die Änderung der Zusammensetzung der Kammeratmosphäre mit der Zeit. Gasanalytoren können durch eine Massenspektroskopie die Trocknung verfolgen [29].

### 3.2.4.3 Nachtrocknung (Sekundärtrocknung)

Nach dem Ende der Sublimation verbleiben noch ca. 5-30% des ursprünglich vorhandenen Wassers im Kuchen zurück [23]. Dieses Wasser hat so starke Wechselwirkungen mit der Festsubstanz, dass es beim Einfrieren nicht als Eis kristallisieren kann. Es adsorbiert in einem kristallinen Produkt an der Oberfläche der Kristalle oder befindet sich innerhalb des Kuchens als Hydrat. Im amorphen Produkt hoher Viskosität liegt das Wasser im flüssigen Zustand vor. Deshalb kann es nicht in der Haupttrocknung entzogen werden und lässt sich erst bei einem zusätzlichen Trockenschritt (Sekundärtrocknung) entfernen [26].

Während bei kristallinen Produkten die Entfernung des Wassers schnell durch Desorption und Verdampfung erfolgt, findet in amorphen Substanzen ein Diffusionsvorgang aus dem Inneren an die Oberfläche statt. Daher kann die Nachtrocknung der amorphen Produkte wegen der höheren Wasseranteile und dem langsamen Übergangsmechanismus den längsten Schritt der Gefriertrocknung darstellen [29].

Die Desorptionsvorgänge der Sekundärtrocknung beginnen bereits während der Haupttrocknung in den vorher getrockneten Bereichen des Produktes. Aber häufig wird die Sekundärtrocknung als ein operativer Schritt definiert, wenn das Eis bereits vollständig sublimiert ist. Das nicht gefrorene Wasser ist, wie vorher erwähnt, stark an den Festsubstanzen gebunden, deshalb ist eine höhere Energie zur Entfernung erforderlich. Diese Energie kann bei einer Erhöhung der Stellflächentemperatur auf eine Temperatur zwischen 25-50 °C ohne merklichen Qualitätsverlust zugeführt werden. Da der Entzug des Wassers bei amorphen Strukturen in der Haupttrocknung auch dessen Weichmachereffekt reduziert, steigt entsprechend die  $T_g$ , so dass sich die Kollapsgefahr bei höheren Temperaturen vermindert. Allerdings muss beachtet werden, dass eine höhere Temperatur eine Zersetzung oder einen Aktivitätsverlust einiger Wirkstoffe verursachen kann.

Die Sekundärtrocknung wird im amorphen Produkt wie bei der Haupttrocknung durch verschiedene Widerstände behindert, die die Geschwindigkeit beeinflussen können. Diese Widerstände hindern nach Pikal [56]:

1. Den Wärmeübergang von der Stellfläche bis zum Verdampfungsbereich
2. Die molekulare Diffusion des Wassers in dem Produkt aus dem Inneren bis zur Oberfläche
3. Verdampfung an der Feststoff- Dampf- Grenzfläche
4. Dampftransport durch die Poren des Kuchens
5. Dampftransport vom Vial bis zum Kondensator

In der gleichen Veröffentlichung beschreibt Pikal die Kinetik der Sekundärtrocknung und die Einflussfaktoren. Er fand heraus, dass der Wassergehalt des Produkts zu Beginn der Sekundärtrocknung schnell bis zum Erreichen eines Plateaus sinkt. Je höher die Produkttemperatur ist, desto niedriger ist das Wassergehaltsplateau. Im Gegensatz zu der Haupttrocknung zeigen weder die Schichtdicke des Kuchens, noch der Kammerdruck im Bereich unter 0,26 hPa einen signifikanten Effekt auf die Nachtrocknungsgeschwindigkeit. Die spezifische Oberfläche hingegen spielt eine entscheidende Rolle, indem ihre Erhöhung zum Absinken der Sekundärtrocknungszeit führt. Deshalb wird die Nachtrocknungsgeschwindigkeit von Faktoren wie höhere Konzentration und niedrige Unterkühlung, die die spezifische Oberfläche herabsetzen, benachteiligt.

Welche Zeitdauer für die Nachtrocknung nötig ist, bezieht sich auf den Sollbereich der Produktrestfeuchte. Das Motto „je trockener desto besser“ trifft also nicht immer zu [23].

### **3.2.5 Formulierung**

#### **3.2.5.1 Allgemeines zur Rezepturentwicklung eines Lyophilisats**

Die galenische Entwicklung eines Lyophilisats umfasst wie die anderer fester Arzneiformen verschiedene Stufen: Präformulierung, Rezepturfindung, technische Optimierung [23].

**Präformulierung:** In der ersten Phase der galenischen Entwicklung werden die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs ermittelt. Beispiele sind das Löslichkeitsverhalten in verschiedenen Lösungsmitteln,  $pK_a$ -Werte von Wirkstoffsäure bzw. -base, Kristallmodifikationen, chemische Stabilität, Verteilungsverhalten, Zuordnung zum Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem (BCS).

Neben den erwähnten Eigenschaften des Wirkstoffs bilden die Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen dem Wirkstoff und den Hilfsstoffen die zweite große Säule der Präformulierung [57]. Die Wechselwirkung zwischen den Ausgangsstoffen kann chemische, physikalisch-chemische oder physikalische Ursachen haben. Sowohl chemische als auch physikalische Inkompatibilitäten treten immer nur unter bestimmten Bedingungen wie Temperatur und Druck auf. Die Inkompatibilität führt manchmal zu unmittelbar sensorisch wahrnehmbaren Veränderungen und wird als manifest bezeichnet. Im Gegensatz dazu kann die larvierte Inkompatibilität nur mit analytischen Maßnahmen erfasst werden [58].

**Rezepturfindung:** Die im ersten Schritt erhaltenen Informationen werden zur Formulierung von Rezepturen herangezogen. Die Gefriertrocknungsparameter werden in dieser Stufe bestimmt. Sie sind:

- Das Einfrierverhalten der Formulierung bei verschiedenen Temperaturen und Einfriergeschwindigkeiten
- Einstellung der Temperatur und des Druckes während der Haupt- und Nachtrocknung
- Begleitende Untersuchung der Stabilität als Kriterium für die Rezepturauswahl

**Technische Optimierung:** Ziel dieser Stufe ist die Definition der besten und stabilsten Zusammensetzung für das Präparat. Außerdem werden die Parameter für die Herstellung endgültig festgelegt im Hinblick auf die klinische Prüfung der Phasen II und III.

**Up-Scaling und Validierung:** Die endgültige Rezeptur und das Herstellungsverfahren werden vom Labor- auf den Produktionsmaßstab übertragen und validiert.

In den letzten Stufen wird die Langzeit-Stabilitätsuntersuchung durchgeführt, um herauszufinden, wie sich das Arzneimittel unter bestimmten Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Licht) während einer bestimmten Zeitspanne verändert. Die Haltbarkeit und die empfohlenen Lagerbedingungen eines pharmazeutischen Produkts werden aus den Ergebnissen der Stabilitätsuntersuchung bestimmt.

Am Ende sollen die hergestellten Lyophilisate die Anforderungen des Arzneibuchs erfüllen. So müssen sie einen Zerfall und eine genügende Härte aufweisen, die ihrer Anwendung entsprechen. Des Weiteren sind die Abweichungen des Arzneistoffgehalts streng geregelt.

### 3.2.5.2 Funktion der Hilfsstoffe

Während manche gefriergetrockneten Zubereitungen (z.B. Cephalosporine, Vancomycin) in Parenteralia keine Zusatzstoffe erfordern, sind Hilfsstoffe bei anderen Formulierungen unerlässlich. Im Rahmen der Entwicklung von Lyophilisaten müssen die Hilfsstoffe verschiedene Funktionen erfüllen. Diese Funktionen werden hauptsächlich durch den eingesetzten Wirkstoff (nieder- oder hochmolekular) und den Applikationsort (z.B. Parenteralia oder Oralia) bestimmt. Auf jeden Fall müssen die Hilfsstoffe sowohl mit dem Wirkstoff kompatibel, als auch lyophilisierbar sein. In diesem Abschnitt werden einige

Funktionen der Hilfsstoffe, die zur Herstellung von Lyophilisaten zur oralen Applikation eingesetzt werden, näher erläutert.

**Gerüstbildner:** Bei der Gefriertrocknung von sehr verdünnten Lösungen kann die Wasserdampfströmung in der Haupttrocknung eine so starke Kraft erzeugen, dass die Kuchenstruktur bricht und etwas von dem Produkt aus dem Gefäß heraus getragen wird [59]. Das Ausblasen kommt normalerweise vor, wenn die Konzentration der Lösung sehr niedrig ist (ca. 1% oder weniger). Deshalb kommt dem Gerüstbildner die erforderliche Rolle als Füllstoff zu [27]. Typische Vertreter dieser Stoffgruppe sind kristallin erstarrende Stoffe wie Mannitol und Glycin.

Kristalline Stoffe sorgen für ein elegantes Produkt sowie einen mechanisch ausreichend stabilen Kuchen. Mannitol ist bei weitem der am häufigsten verwendete Füllstoff. Die Kristallisation des Mannitols sollte jedoch während des Einfrierens abgeschlossen werden. Kristallisiert Mannitol beim Einfrieren nicht vollständig, erfolgt dies erst in der Haupttrocknung oder bei der Lagerung. Die Mannitolkristallisation kann in der Haupttrocknung, wie vorher erläutert, einen Vialbruch verursachen [45]. Während der Lagerung hat die Rekristallisation des Mannitols meistens einen sehr negativen Einfluss auf die Stabilität des Produkts. Das Wasser des amorphen Mannitols wird bei der Rekristallisation freigesetzt, was den restlichen Wassergehalt im amorphen Anteil erhöht. Die Steigerung des Wassergehalts kann zur Wechselwirkung mit dem Wirkstoff führen, was die Stabilität beeinflussen kann. Zusätzlich führt die Erhöhung des Wassergehalts zur Erniedrigung der  $T_g$ . Entsprechend ist vereinzelt mit dem Kollaps des Kuchens zu rechnen [60].

Um diese Probleme zu vermeiden, kann die Kristallisation beim Einfrieren entweder durch den Einsatz einer höheren Konzentration des kristallinen Hilfsstoffs (ca. mehr als 50% des gesamten Feststoffanteils) oder durch einen Annealing-Schritt gefördert werden [27].

Mannitol kann bei der Gefriertrocknung in drei verschiedene Modifikationen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) auskristallisieren, wobei die  $\beta$ -Form bei normalen Bedingungen die stabilste ist [61]. Dies ist von verschiedenen Faktoren abhängig: der Konzentration und der Anwesenheit anderer Bestandteile in der Formulierung sowie von den Prozessbedingungen. Kim [61] beschreibt die Entwicklung der  $\beta$ -Form nach schnellem Einfrieren einer 5 %igen Mannitollösung. Wenn die Konzentration auf 10% erhöht wird, entsteht unter diesen Bedingungen die  $\delta$ -Form. In der gleichen Publikation wird der Einfluss der Einfriereschwindigkeit auf die Kristallisation einer 10%igen Mannitollösung dargestellt. Während bei langsamem Einfrieren eine Mischung

aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -polymorphen Formen entsteht, ist die  $\delta$ -Form bei schnellen Gefrieraten zu beobachten. Die Veröffentlichungen über die Auswirkungen anderer Stoffe in der Formulierung sowohl auf die Kristallinität als auch die Polymorphie des Mannitols sind zahlreich [62,63,64]. Es wird über die Verhinderung der Mannitolkristallinität durch den Zusatz anderer Stoffe entsprechend dieser Reihenfolge berichtet: Salz > Alditol > Polyvinylpyrrolidon >  $\alpha$ -Cyclodextrin > Polysorbate 80 ~ Polyethylenglycol ~ Poloxamer [65].

Zusätzlich wird über die Entwicklung von metastabilem Mannitolhydrat unter bestimmten Umständen berichtet [66]. Zum Beispiel illustriert Hawe [47] einen Zusammenhang zwischen Tempern und der Entstehung von Mannitolhydrat, wobei hier die größte Menge nach dem Tempern bei niedriger Temperatur (-30 °C) zu finden war.

Die Ausbildung des Hydrats hat Konsequenzen sowohl für den Herstellungsprozess als auch für die Lagerung. Im Hydrat befinden sich die Wassermoleküle im Kristallgitter gebunden, was das Entfernen erschwert und die Trocknungsgeschwindigkeit reduziert. Eine aggressive Nachtrocknung ist dann bei Temperaturen über 40 °C über einen langen Zeitraum erforderlich [67].

Das Hydrat stellt während der Lagerung meistens eine langfristige Gefahr dar, weil es das Wasser freisetzen könnte. Demzufolge erhöht sich die Möglichkeit einer Veränderung der chemischen oder physikalischen Eigenschaften des Produkts.

**Amorph erstarrende Stoffe:** Solche Stoffe werden in proteinhaltigen Formulierungen meistens als Stabilisatoren eingesetzt. Sie schützen den Wirkstoff entweder während des Einfrierens (Kryoprotektoren) und/oder während der Trocknung (Lyoprotektoren) [37]. Als typische Vertreter sind Disaccharide (Saccharose, Trehalose) und Polymere (Dextran, Dextrin, Polyvinylpyrrolidon und nicht zuletzt Gelatinederivate) zu nennen. Der Schutzmechanismus der Kryoprotektoren beruht auf der so genannten „Preferential Exclusion“. In einer Lösung befinden sich die Kryoprotektoren in niedriger Konzentration in der Nähe einer Proteinoberfläche, deshalb werden sie als ausgeschlossen bezeichnet [27]. Demzufolge liegen die Proteine in einer Hydrathülle und werden so voneinander abgeschirmt, dass sie nicht mehr miteinander reagieren können. Bei der Trocknung wird diese Hydrathülle entfernt, was die Stabilität des Proteins bedroht und das Einsetzen der Lyoprotektoren begründet. Lyoprotektoren schützen den Wirkstoff in der Trocknung entweder durch Bildung eines hochviskosen Glases (Vitrification) oder durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zu den funktionellen polaren Gruppen der Wirkstoffmoleküle und fungieren so als Wasserersatz [37].

Die Polymere stellen den Grundstein bei der Herstellung von oralen Lyophilisaten dar. Sie werden als feste Lösungsmittel eingesetzt, in denen der Wirkstoff molekulardispers vorliegt. Um die Löslichkeit des Wirkstoffs zu gewährleisten, ist deshalb ein amorpher Zustand des Kuchens anzustreben.

Damit sich der Wirkstoff löst, müssen einige Kriterien erfüllt sein [2]: (1) Hochpolare Polymere, besonders solche mit verschiedenen polaren funktionellen Gruppen. (2) Der Wirkstoff sollte polare Gruppen besitzen, die die Wechselwirkung mit dem Polymer ermöglichen. (3) Die Konzentration des Wirkstoffs soll niedrig sein, weil bei höherer Konzentration der Wirkstoff mikrokristallin oder feinkristallin ausfallen kann. Die Umkristallisation des Wirkstoffs soll, wenn möglich, vermieden werden, um Veränderungen im Wirkstofffreigabeverhalten zu umgehen.

Obwohl die Beispiele über die Verbesserung der Freisetzung des Wirkstoffs aus einer festen Dispersion zahlreich sind [68,69], sind Publikationen über die gefriergetrocknete feste Dispersion rar. Beispielweise zeigt Cavallari [70] eine deutliche Erhöhung der Freisetzung des Indomethazins aus einer (Indomethazin-PVP) gefriergetrockneten festen Dispersion im Vergleich zum reinen Wirkstoff.

Die feste Lösung in einem amorphen, leicht löslichen Träger bietet zahlreiche Vorteile. Polymere erhöhen die  $T_c$  der Formulierung, was einen effektiven Herstellungsprozess ermöglicht. Nach der Lyophilisation fördert die feste Lösung nicht nur eine rasche Wirkstofffreisetzung, sondern auch eine bessere Stabilität während der Lagerung, da die meisten Polymere eine höhere Glasübergangstemperatur haben (PVP K30: 180 °C,  $\beta$ -Cyclodextrin: 108 °C, Dextran: 94 °C) [37].

**Puffer:** Zur Einstellung des pH-Wertes werden Puffer verwendet. Aufgrund der Unterkühlung kann eine Kristallisation eines Salzes des Puffersystems beim Einfrieren eintreten, was zu einer pH-Verschiebung führt. Deshalb ist der amorphe Zustand des Puffers zu bevorzugen [27].

Allerdings haben die meisten Puffer eine niedrige  $T_g'$  (Natriumacetat: -64 °C, Tris-HCl: -65 °C) [71], was den Prozess benachteiligt. Chang [72] zeigte eine Erniedrigung der  $T_g$  einer gefriergetrockneten rhIL-1ra Formulierung, die 1% Saccharose, 4% Mannitol und 2% Glycin enthält, von 46 °C auf 26 °C, wenn als Pufferkomponente Natriumphosphat statt Natriumcitrat eingesetzt wird. Dies hat einen negativen Effekt auf die Produktstabilität während der Lagerung (siehe 3.2.5.4). Aus diesen Gründen müssen Puffer sehr sparsam verwendet werden.

**Tenside:** Diese Gruppe hilft, die Löslichkeit des Wirkstoffs zu verbessern und die Adsorption an der Gefäßoberfläche herabzusetzen. Tween 80 und Poloxamer werden am häufigsten in niedriger Konzentration von ca. 0,05% (m/m) eingesetzt [27].

**Konservierungsmittel:** Konservierungsmittel wie Propyl- und Methyl-Parabene haben mit ihren äußerst niedrigen Konzentrationen (z.B.  $\leq 0,1\%$ ) keinen Einfluss auf die Kollapstemperatur des Produkts.

### 3.2.5.3 Zusammenhang zwischen Formulierung und Prozess

Ausgangspunkt eines Entwurfes eines Gefriertrocknungsprozesses ist die Kenntnis über die kritischen Eigenschaften der Formulierung. Sie umfassen die Kollapstemperatur der Formulierung, die Stabilität des Wirkstoffs und die Eigenschaften der Hilfsstoffe.

Die  $T_g'$  und  $T_c$  sind stark von der Zusammensetzung der Formulierung abhängig. Die Kristallisation eines der Bestandteile der Formulierung ist mit einer großen Änderung der  $T_c$  verbunden. Daher kann eine Formulierungs- oder Prozessänderung, die die Kristallisation einer Substanz fördert, den physikalischen Zustand der Formulierung beeinflussen [27]. Zum Beispiel untersuchte Jonson [67] das Verhalten einer Mannitol-Saccharose-Mischung. Bei einem Verhältnis von Mannitol zu Saccharose von mehr als 3:1 ist die Kristallisation des Mannitols begünstigt. Dieses gestattet die Gefriertrocknung bei einer Produkttemperatur von  $-10\text{ °C}$  ohne Kollaps, obwohl die  $T_g'$  der amorphen Saccharose in der Formulierung bei  $-35\text{ °C}$  liegt. Bei einem Verhältnis von weniger als 3:1 wird Annealing eingesetzt, um die Kristallisation des Mannitols zu fördern. Ähnlich verhält sich Glycin in einer Trehalose- oder Raffinose- Mischung [73]. Glycin kristallisiert, wenn sein Verhältnis zu Trehalose  $\geq 1,56$  und zu Raffinose  $\geq 1,18$  ist. Dies ermöglicht eine Gefriertrocknung bei einer Produkttemperatur von mindestens  $10\text{ °C}$  über der Kollapstemperatur der amorphen Anteile, ohne die Struktur des Kuchens zu benachteiligen. Daraus wird deutlich, dass die Kristallisation sehr bedeutsam ist. So kann sich die Lyophilisation einer Formulierung von einem äußerst schwierigen zu einem ökonomischen und praktischen Prozess wandeln [74].

Die Glasübergangstemperatur eines amorphen Systems lässt sich durch die Glasübergangstemperaturen der amorphen Bestandteile abschätzen. Die Fox-Flory-Gleichung (Gl. 3-4) beschreibt diesen Zusammenhang [75]. Wobei  $W_1$  und  $W_2$  die Gewichtsanteile der Bestandteile sind.  $T_{g1}$  und  $T_{g2}$  sind die Glasübergangstemperaturen jeder Komponente.

$$\frac{1}{T_g} = \frac{W_1}{T_{g1}} + \frac{W_2}{T_{g2}}$$

**Gl. 3-4**

Obwohl diese Gleichung für die Berechnung der  $T_g$  abgeleitet wurde, weist Pikal darauf hin, dass sie auch für die Berechnung der  $T_g'$  geeignet ist. [27]. Bei der Behandlung von gefrierkonzentrierten Lösungen wird  $T_g'$  der Bestandteile angewendet, um die  $T_g'$  der Formulierung zu bestimmen.

Im zweiten Schritt der Entwicklung eines Gefriertrocknungsprozesses werden die Parameter anhand der Eigenschaften der Formulierung eingestellt. Die Einstellung der Parameter wird hier nach Tang und Pikal zusammengefasst [53].

Die Quintessenz der Haupttrocknung ist die Wahl der optimalen  $T_p$ , um das Produkt schnell auf diese Temperatur zu bringen, und dann während der gesamten Haupttrocknung nahezu konstant zu halten. Im Allgemeinen soll die  $T_p$  einige Grad unterhalb der eutektischen oder Kollapstemperatur liegen. Je nach Trocknungszeit muss eine Sicherheitsspanne zwischen 2-5 °C berücksichtigt werden.

Der Dampfdruck von Eis ( $p_0$ ) steigt exponentiell mit der Temperatur ( $T$ ). Deshalb kann die Trocknung, durch eine Erhöhung der Temperatur beschleunigt werden. Dies wird durch die Gl. 3-5 beschrieben.

$$p_0 = b \cdot e^{-\frac{W}{R \cdot T}}$$

**Gl. 3-5**

Dabei ist  $W$  [ $\text{J mol}^{-1}$ ] die molare Verdampfungsenergie der Flüssigkeit,  $R$  ist die universelle Gaskonstante [ $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ] und  $b$  ist eine Konstante.

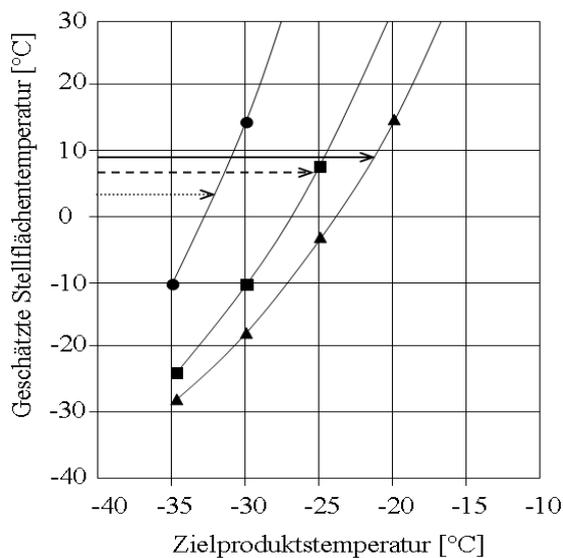
Ein optimaler Kammerdruck ist allerdings wie in Abschnitt 3.2.4.2 erwähnt ein Kompromiss zwischen höherer Sublimationsgeschwindigkeit und homogener Wärmeübertragung. Mit Hilfe der Gl. 3-6 nach Tang [53] kann die erste Schätzung für einen optimalen Kammerdruck ( $p_c$ ) ermittelt werden.

$$p_C = 0,29 * 10^{(0,019 * T_p)}$$

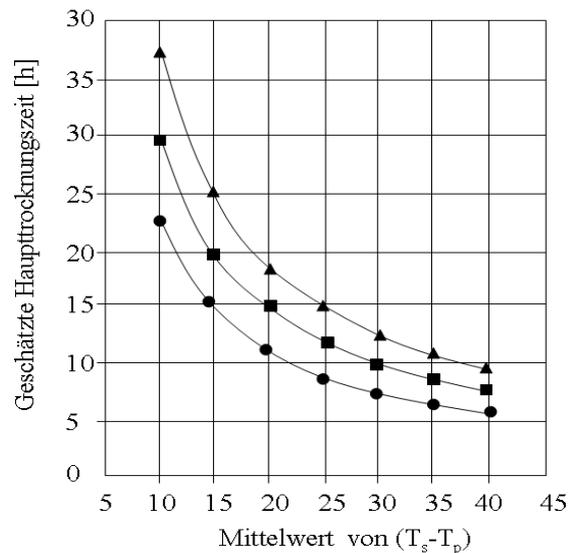
Gl. 3-6

Für die Abschätzung der Temperatur der Stellflächen muss beachtet werden, dass die Produkttemperatur normalerweise 5 bis 40 °C niedriger als die Stellflächentemperatur ist. Sie hängt von dem Produktwiderstand und dadurch von der Konzentration der Lösung ab.

In der Abb. 3-12 wird die geschätzte Stellflächentemperatur dargestellt, die für das Erreichen der Zielprodukttemperatur erforderlich ist. Diese Daten gehen davon aus, dass Röhrenglasvials und einer Produktdicke von 1 cm verwendet werden, und können als Leitlinie für die erste Auswahl der Stellflächentemperatur hilfreich sein. Es ist wichtig zu beachten, dass der Wärme- und Masseübergang nicht die Fähigkeiten der Anlage überschreitet. Die maximale Stellflächentemperatur wird grob für eine typische Anlage als die höchste Temperatur, die keine Überlastungsgefahr ausübt, mit Pfeilen in der Abb. 3-12 gekennzeichnet.



**Abb. 3-12:** Abschätzung der Stellflächentemperatur (Haupttrocknung) bei gegebener Zielprodukttemperatur für unterschiedlich konzentrierte Lösungen (unterschiedliche Produktwiderstände) ●: niedriger Produktwiderstand, Feststoffanteil  $\leq 1\%$ . ■: mittlerer Produktwiderstand,  $1\% < \text{Feststoffanteil} < 10\%$ . ▲: hoher Produktwiderstand, Feststoffanteil  $\geq 10\%$ , nach [53].



**Abb. 3-13:** Abschätzung der Haupttrocknungszeit in Abhängigkeit von der Lösungskonzentration: ●: niedriger Produktwiderstand, Feststoffanteil  $\leq 1\%$ . ■: mittlerer Produktwiderstand,  $1\% < \text{Feststoffanteil} < 10\%$ . ▲: hoher Produktwiderstand, Feststoffanteil  $\geq 10\%$ . Schichtdicke der Lösung 1cm nach dem Einfrieren, nach [53].

Die Dauer der Haupttrocknung kann ebenso anhand der Abb. 3-13 abgeschätzt werden. Der Endpunkt der Haupttrocknung kann, wie vorher erwähnt in Kapitel 3.2.4.2.4, durch verschiedene Methoden ermittelt werden.

Um einen Produktkollaps zu vermeiden, sollte die Temperatur langsam bis zur letzten Phase (Nachtrocknung) erhöht werden. Bei einem amorphen Produkt ist ein langsamer Anstieg (0,1 oder 0,15 °C/min) besser geeignet. Dagegen ist bei kristallinen Produkten ein schnellerer Anstieg (0,3 oder 0,4 °C/min) möglich. Die Endtemperatur der Nachtrocknung liegt je nach der Formulierung im Bereich zwischen 40 und 50 °C.

### **3.2.5.4 Lagerbedingungen**

Verschiedene Faktoren können die Produktstabilität während der Lagerung beträchtlich beeinflussen. Sie beinhalten die Glasübergangstemperatur, die Lagertemperatur und den Restfeuchtigkeitsgehalt, die zueinander in Beziehung stehen.

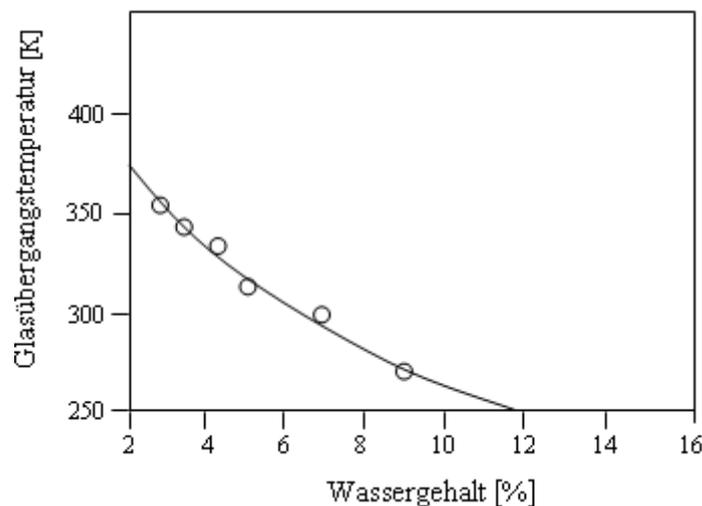
Im Allgemeinen gilt die Regel, je höher die  $T_g$  ist, desto stabiler ist die Formulierung. Deshalb kann die  $T_g$  verwendet werden, um eine grobe Schätzung der Lagerstabilität einer Formulierung vorzunehmen. Es wird empfohlen, dass die  $T_g$  der Formulierung mindestens 20 °C über der Lagertemperatur sein sollte. Mit anderen Worten: um eine langfristige Stabilität zu garantieren, soll die  $T_g$  der Formulierung höher als 40 °C sein [76,37].

Die Glasübergangstemperatur hängt stark vom Wassergehalt ab, der einen Weichmachereffekt auf die amorphen Anteile hat. Eine 1%ige Zunahme der Restfeuchtigkeit des Produkts kann eine Erniedrigung der  $T_g$  von 10 °C oder mehr verursachen [77].

Wird das Produkt oberhalb der  $T_g$  gelagert, kommt es zum Übergang vom Glaszustand des Produkts in einen gummiähnlichen Zustand. Beim gummiartigen Zustand ist die Mobilität größer, weil die freien Volumina größer sind, und der Grad der Translations- und Rotationsfreiheit höher ist. Als Folge davon tritt ein Produktkollaps ein. Außerdem kann die Erhöhung der Lagertemperatur die Kristallisation der amorphen Anteile in der Formulierung fördern, was die Eigenschaften der Formulierung benachteiligt [37].

Eine langfristige physikalische Stabilität des gefriergetrockneten Produkts kann vorausgesagt werden, indem der Kollaps oder das Schrumpfen des Kuchens als Funktion der Lagertemperatur und der relativen Feuchtigkeit gemessen werden [78]. Ein Schrumpfen tritt auf, wenn die Lagertemperatur die  $T_g$  des Produkts überschreitet. Das Schrumpfen kann durch

einfache optische Beobachtung festgestellt werden. Fitzpatrick [78] ermittelte unter Verwendung von Feuchtigkeitssorptionsisothermen die Temperatur und die relative Feuchtigkeit, die ein Schrumpfen der behandelten Zydis<sup>®</sup>-Formulierung verursachten. Er zeigte bei der Lagerung unter verschiedenen relativen Feuchtigkeiten (74, 65 und 56%) einen Anstieg des Wassergehalts (von 4,3% auf 8%, 6,6% und 5,4%) und eine Erniedrigung der  $T_g$  (von 56 °C auf 10, 25 und 40 °C). Somit verursachte eine Lagerung bei 40 °C bei diesen relativen Feuchtigkeiten für einen Tag eine Erniedrigung der  $T_g$  durch den Weichmachereffekt der absorbierten Wasseranteile und dadurch ein Schrumpfen. Der Einfluss des Wassergehalts auf die  $T_g$  des Zydis<sup>®</sup>-Units wird in der Abb. 3-14 dargestellt.



**Abb. 3-14:** Der Einfluss des Wassergehalts auf die Glasübergangstemperatur der Zydis<sup>®</sup>-Unit nach Fitzpatrick [78]

Diese Ergebnisse lassen den Autor darauf schließen, dass eine Verbesserung der Robustheit der Formulierung mit einer Erhöhung der  $T_g$  erreicht wird. Dies kann entweder durch den Zusatz anderer amorpher Komponenten mit höherer  $T_g$  oder durch eine Optimierung des Prozesses zur Verbesserung der Kristallisation der amorphen Bestandteile erreicht werden.

## 4 Ziel der Arbeit

Lyophilisation wird in den meisten Fällen zur Herstellung von parenteralen Darreichungsformen angewendet. In der letzten Zeit mehren sich in der Literatur die Hinweise, diesen Prozess auch in die Entwicklung von oralen Arzneiformen mit einzubeziehen.

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die Anwendung dieser Technik in der Entwicklung von Tabletten, die im Mund schnell zerfallen. Diese Art von Tabletten erfordert keine Zugabe von Wasser. Dementsprechend sollte sie helfen, die Patienten mit einem möglichst geringen Risiko der Komplikationen (Rückfluss von Mageninhalt) während und nach der Operation auszusetzen. Darüber hinaus können Patienten mit Schluckbeschwerden mit Hilfe von Schmelztabletten dieses Problem umgehen.

Midazolamhydrochlorid wird aufgrund der Anregung der Uni-Klinik für Anästhesiologie als Modell-Wirkstoff verwendet. Dies beruht sowohl auf der weiten Anwendung dieser Substanz für die Beruhigung von Patienten vor diagnostischen oder chirurgischen Eingriffen als auch auf der Notwendigkeit, ihnen eine angenehme Applikation zu bieten.

Sollte es gelingen, dass die Absorption des Wirkstoffs in der Mundhöhle erfolgt, so ist eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit wird eine ausführliche Entwicklung und Untersuchung der Lyophilisat-Tabletten durchgeführt. Zusätzlich wird die Stabilität der erhaltenen Tabletten bei verschiedenen Lagerbedingungen geprüft, um die Anforderungen der Klinik zu erfüllen.

## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Wirkstoff

Midazolam wurde 1976 als ein Derivat aus der Reihe der Imidazolbenzodiazepine erstmals synthetisiert. Der Imidazolring führte zur Änderung der klassischen Eigenschaften der Benzodiazepine wie der Basizität und der Stabilität in wässrigen Lösungen [79]. Aufgrund der Basizität ist die Gewinnung wasserlöslicher Salze mit z.B. Salzsäure, Maleinsäure oder Milchsäure möglich. Die Angabe zur Protonierung des Imidazol-Stickstoffs in Position 2 (Abb. 5-1) schwankt zwischen 5,5 und 6,15 [3]. In saurer Lösung liegt Midazolam im Gleichgewicht mit der ringoffenen Form vor. Bei pH-Werten unter 4 tritt eine reversible Ringöffnung ein. Wenn der pH über 4 ist, schließt sich der Ring wieder (Abb. 5-1).

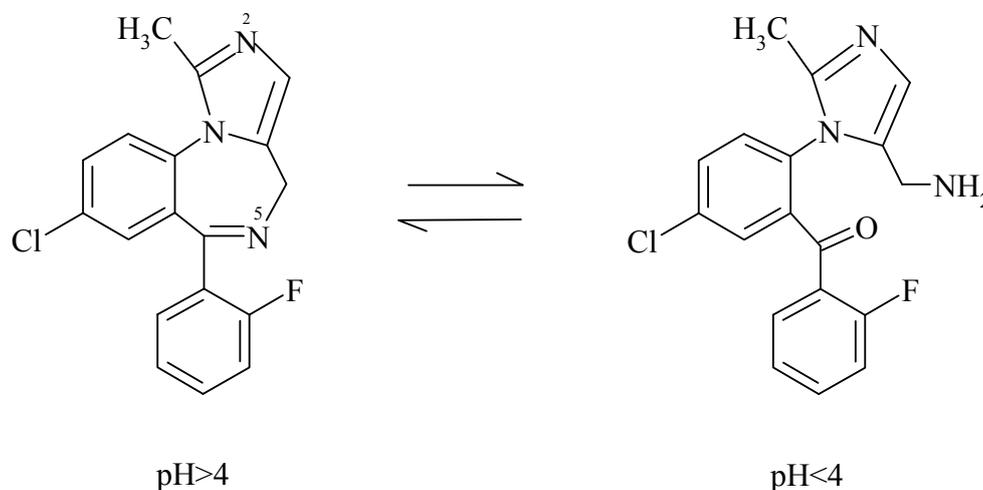


Abb. 5-1: Die Struktur von Midazolam in Abhängigkeit des pH-Werts

Der Verteilungskoeffizient  $P$  zwischen *n*-Octanol und Phosphat-Puffer pH 7,5 beträgt ca. 475 [79], was die schnelle Resorption des Midazolam nach oraler Gabe erklären könnte. Auf der anderen Seite ist die Methyl-Gruppe in Position 1 für die kurze Wirkdauer von Midazolam verantwortlich. Diese Gruppe wird von Leberenzymen sehr schnell hydroxyliert. Der Hauptmetabolit 1-Hydroxymidazolam wird an Glukuronsäure gekoppelt und dann als pharmakologisch inaktives Glukuronid renal eliminiert. Midazolam besitzt mit 1,5 bis 4,5 Stunden von allen Benzodiazepinen die kürzeste Eliminationshalbwertszeit [80]. Aufgrund

eines ausgeprägten First-Pass-Effekts liegt die Bioverfügbarkeit zwischen 36% und 44% nach oraler Applikation [4,5]. Daraus resultiert die Notwendigkeit einer etwa doppelt so hohen oralen Dosis im Vergleich zur intravenösen Dosis [81].

Midazolam findet aufgrund seiner beruhigenden, entspannenden, anxiolytischen, sedativ-hypnotischen, antikonvulsiven und muskelrelaxierenden Wirkung [3] und seiner im Vergleich zu anderen Anästhetika geringen Toxizität breite Anwendung. In der Anästhesie wird es zur Prämedikation, zur Narkoseeinleitung, als Adjuvans bei Neuroleptanästhesien und zur Narkose während diagnostischer und therapeutischer Eingriffe (Endoskopie, Koronarangiographie, Kardioversion etc.) eingesetzt. In der Intensivmedizin wird es zur Notfalltherapie des Status epilepticus und Langzeitsedierung von künstlich beatmeten Patienten [3] verwendet.

In dieser Arbeit wird Midazolamhydrochlorid (Midazolam-HCl) der Firma Fagron als Modellwirkstoff bei der Herstellung von Lyophilisaten eingesetzt.

Laut Analysenzertifikat hat Midazolam-HCl folgende Eigenschaften:

Aussehen: weißes bis fast weißes, feinkristallines Pulver

Molekulargewicht: 362,2 g/mol

Schmelztemperatur: 161 bis 164 °C (Niederschlag aus NH<sub>3</sub>-Lsg., umkristallisiert aus Hexan)

pH-Wert: 4,3 (40 mg in 20 ml H<sub>2</sub>O)

Midazolam-Gehalt: liegt zwischen 99,6 und 100,8% (berechnet auf die getrocknete Substanz).

## 5.1.2 Hilfsstoffe

### **Gelatine:**

Gelatine ist ein Hydrokolloid, das zu etwa 84 bis 86% aus Proteinen, 8-12% aus Wasser und zu 2 bis 4% aus Mineralsalzen besteht. Durch den Abbau kollagen haltiger Bindegewebe von Tieren wird Gelatine gewonnen. Je nach dem Herstellverfahren werden zwei verschiedene Gelatintypen (A und B) erhalten. Sie unterscheiden sich vor allem in der Lage des isoelektrischen Punktes. Durch die Hydrolyse mit Säuren erhält man den Typ A, dessen isoelektrischer Punkt zwischen pH 6 und 9,5 liegt. Bei der alkalischen Hydrolyse entsteht Typ B mit einem isoelektrischen Punkt zwischen pH 4,7 und 5,6. Unabhängig vom isoelektrischen Punkt wird die gereinigte Gelatine (A und B) nach dem Aufschluss auf einen pH-Wert zwischen 4 und 7,5 eingestellt [82]. Gelatine wird wie ihre molekularen Bausteine, die Aminosäuren, als amphoterer Elektrolyt oder Ampholyt bezeichnet. Unterhalb des

isoelektrischen Punkts sind beide Gelatinetypen kationenaktiv, oberhalb sind sie dagegen anionenaktiv [83].

Gelatine ist in den üblichen organischen Lösungsmitteln praktisch unlöslich. Im Wasser löst sich Gelatine unter Quellung zu einer viskosen Flüssigkeit.

Eine der wichtigsten Qualitätsmerkmale der Gelatine ist die Bildung temperaturreversibler Gele aus Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 70%, was man als Gelbildungsvermögen bezeichnet. Die Gelierstärke oder das Gelbildungsvermögen lässt sich mittels eines speziellen Penetrometers, des Bloom-Gelometers, ermitteln. Zur Bestimmung der Gelierstärke wird ein definierter Stempel von 12,7 mm Durchmesser in ein 17 Stunden bei 10 °C gealtertes Gelatinegel (6,67% m/m) gedrückt. Erfasst wird das Gewicht [g], das notwendig ist, um mit dem Stempel im Gel eine 4 mm tiefe Verformung hervorzurufen. Die Ergebnisse werden als Bloom-Werte (auch Bloomzahl oder Bloomgramm) angegeben. Auf dem Markt erhält man Gelatine mit verschiedenen Bloom-Zahlen; als niedrigbloomige mit Werten zwischen 50 und 100 g, als mittelbloomige mit Werten zwischen 100 und 200 g und zwischen 200 und 300 g als hochbloomige Gelatine. Außerdem gibt es Gelatinehydrolysate, die kein Gelbildungsvermögen besitzen [84].

Die Bloom-Zahl spiegelt die Differenz zwischen den Produkten mit unterschiedlichem Molekulargewicht bzw. unterschiedlicher Kettenlänge wider. Deshalb ist sie von großer Bedeutung für die Einsatzbereiche der Gelatine in der Pharmazeutischen Technologie. Die Unterschiede der verwendeten Gelatinetypen werden in Tab. 5-1 dargestellt. Die eingesetzte Gelatine dient hier als Gerüstbildner für das Lyophilisat, in das der Arzneistoff molekulardispers oder suspendiert eingebettet ist.

**Tab. 5-1:** Unterschiede in der verwendeten Gelatine

<b>Gelatine Typ</b>	A	B
<b>Bloom-Zahl</b>	195	60
<b>pH</b>	5,1 (1%, 55 °C)	5,8 (6,67%, 60 °C)

### **Mannitol**

Mannitol ist ein sechswertiger Alkohol (Abb. 5-2), dessen Molekulargewicht 182,17 g/mol beträgt. Mannitol ist ein weißes, kristallines, nichthygroskopisches, geruchloses Pulver von schwachem, süßem, kühlendem Geschmack. Es zeigt drei Modifikationen:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$ . Die Schmelztemperatur liegt zwischen 164 und 168°C. Nach der Gefriertrocknung liegt Mannitol

kristallin vor. Deshalb wird es in weitem Ausmaß in der Gefriertrocknung und Sprühtrocknung als Gerüstbildner verwendet [83].

In dieser Arbeit wird Mannitol zur Herstellung von Lyophilisaten im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 5% verwendet.

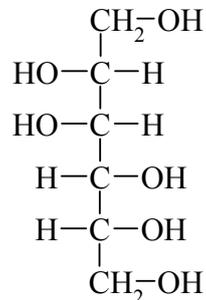


Abb. 5-2: Strukturformel von Mannitol

### Saccharose

Saccharose oder Rohrzucker ist ein Disaccharid, das aus  $\beta$ -Fructose und  $\alpha$ -Glucose besteht (Abb. 5-3). Das Molekulargewicht beträgt 342,30 g/mol. Saccharose bildet geruchlose, weiße und süß schmeckende Kristalle, die in Wasser sehr gut löslich sind.

Beim Einfrieren kristallisiert Saccharose nicht, sondern bildet eine übersättigte Lösung. Nach der Gefriertrocknung liegt Saccharose daher als amorphes Glas vor.

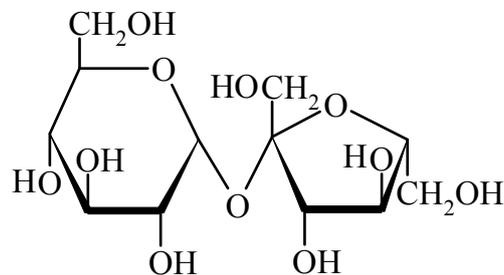


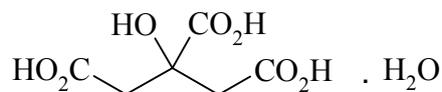
Abb. 5-3: : Strukturformel von Saccharose

### Zitronensäure-Monohydrat

Das Zitronensäure-Monohydrat bildet rhombisch-bipyramidale Kristalle mit einem Molekulargewicht von 210,1 g/mol (Abb. 5-4). Das Monohydrat zeigt keinen definierten Schmelzpunkt. Es gibt bei etwa 75°C langsam sein Hydratwasser ab, wobei erst ab etwa 100 bis 153°C die Kristalle schmelzen. Zitronensäure ist eine dreibasige Säure, deren einprozentige wässrige Lösung einen pH-Wert von 2,3 bei 25°C ergibt.

Zitronensäure wird in verschiedenen Bereichen zur Geschmacksverbesserung und zur Herstellung von Citratpuffer eingesetzt. Wegen des sauren Geschmacks stimuliert die

Zitronensäure den Speichel, was einen gewissen Einfluss auf die Absorption des Wirkstoffs in der Mundhöhle hat.



**Abb. 5-4:** Strukturformel von Zitronensäure -onohydrat

Zur Herstellung der Lyophilisate wurden die in der Tabelle angegebenen Materialien verwendet.

**Tab. 5-2:** Verzeichnis der verwendeten Materialien in den Formulierungen

Substanz	Charge Nr.	Lieferant
Midazolam Hydrochlorid	0512A279 07A09-N02 08F30-N02	Fagron GmbH
Gelatine Weiss A	06B23-N10	Fagron GmbH & Co. KG
GELITA® Bovine Hide Gelatine 60 Bloom	625539	Gelita AG
Mannitol	2045E1	Lehmann & Voss & Co
Zitronensäure- Monohydrat	8345	Grüssing GmbH
Polysorbat 80 .	53445146	Caesar & Loretz GmbH
CITRONEN AROMA SD	108	Symrise GmbH & Co. KG
Pfefferminz-Aroma	30	Symrise GmbH & Co. KG
Aspartam	07C29-N02 07H02-N03	Fagron GmbH

### 5.1.3 Behältnisse zum Gefriertrocknen und zur Lagerung

#### 5.1.3.1 Behältnisse zur Gefriertrocknung

Für die Gefriertrocknung wurde jeweils 1 ml Lösung in 10 ml Röhrenglasvials (DIN 58366) eingefüllt. Danach wurden graue, gerillte Gummistopfen aus Chlorobutylkautschuk zum Verschließen aufgesetzt.

Für die Herstellung im Blister wurden Triplex Folien 380 µm (TOPAS mit PolyPropylene/ Cyclo-Olefin-Copolymer/ PolyPropylene) verwendet. Die Abmessung der Kavität betrug: 16 mm·7,5 mm.

### **5.1.3.2 Behältnisse zur Lagerung**

Aufgrund der Empfindlichkeit der Tabletten gegen Feuchtigkeit wurden zwei verschiedene in der Klinik einsetzbare Behältnisse zur Lagerung untersucht.

**PVC-Blister von Lauer Fischer GmbH:** Die Blister erfüllen die Klasse „B“ für die Feuchtigkeitspermeation nach der USP (5 mg pro Tag). Die Blister wurden mittels auf die zugehörigen Aluminiumbeschichteten Kartonrückseiten klat aufgeklebt.

**Glasflaschen:** 100 ml Braunglasflaschen wurden mit den Tabletten gefüllt und dann fest mit einem Plastikdeckel und Parafilm verschlossen.

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Herstellung der Lösungen**

Um bei der Gefriertrocknung stabile Kuchen zu erhalten, wurden Lösungen mit ca. 7,5% (m/m) lyophilisiert. Gelatine und gereinigtes Wasser wurden auf einem Magnetrührer gemischt und bis auf ca. 45 °C erwärmt, bis die Gelatine völlig gelöst ist. Die anderen Bestandteile werden dann bei Raumtemperatur unter Rühren zugefügt. Mit Hilfe einer Eppendorfpipette wurde dann jeweils 1 ml der Lösung in die Behältnisse eingefüllt.

### **5.2.2 Prüfung der hergestellten Lösungen**

#### **5.2.2.1 pH-Wert Messung**

Um eine Aussage über den Zustand des Midazolam-HCl<sub>s</sub> in der Lösung machen zu können, wurde der pH-Wert der Lösungen mit einem pH-Meter (Knick), ausgerüstet mit einer

Glaselektrode (pH 0-14, Metrohm Nr. 6.0222.100), überprüft. Das pH-Meter wurde nach Ph.Eur. 5.-2.2.3 kalibriert.

### 5.2.2.2 Dynamische Differenz Kalorimetrie

Dynamische Differenz Kalorimetrie oder im englischen Wortgebrauch Differential Scanning Calorimetry (DSC) ist ein Verfahren der thermischen Analyse, bei der die Wärmestromdifferenzen zwischen Probe und Vergleichsprobe (Referenz) gemessen werden, während beide Proben einem vorgegebenen Temperatur-Zeit-Programm unterworfen werden. Die Probe und die Referenz befinden sich in dem Wärmestrom-Kalorimeter auf einer Messzelle in einem Heizofen. Die Differenz der Wärmeströme von Probe und Referenz wird aufgezeichnet und in einem entsprechenden DSC-Thermogramm gegen die Temperatur dargestellt. Benötigt die Probe zum Schmelzen mehr Energie als die Referenz, wird von einem positiven Wärmestrom gesprochen. Die Kristallisation ist durch einen negativen Wärmestrom gekennzeichnet, weil bei der Kristallisation als exothermen Prozess Energie frei wird. Im Gegensatz zu einer Phasenumwandlung kommt es beim Übergang einer amorphen Substanz nur zu einer sprunghaften Zunahme der Wärmekapazität, ohne dass dabei ein zusätzlicher Wärmetransfer in die Probe erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines Kalorimeters Mettler Toledo DSC822<sup>e</sup> (Mettler Scientific Instruments, Göttingen, Deutschland) die Glasübergangstemperatur der maximal konzentrierten Lösung ( $T_g'$ ) und die Glasübergangstemperatur der Lyophilisate ( $T_g$ ) überprüft.

Zur Prüfung wurden 20-40  $\mu$ l der Lösung in tarierte Aluminiumtiegel gewogen und die Tiegel danach verschweißt. Anschließend wurden die Tiegel zweimal hintereinander von Raumtemperatur mit Kühlrate von 10 K/min auf -60 °C abgekühlt und diese Temperatur 5 min beibehalten. Das Wiedererwärmen erfolgte mit zwei unterschiedlichen Heizraten. Die erste Heizrate beträgt 10 K/min und die zweite 3 K/min. Ein Temper-Schritt wurde dazwischen durchgeführt. In diesem Fall wurde die Temperatur auf -20 °C (wenn nicht anders angegeben) erhöht, diese Temperatur eine Weile beibehalten und dann wieder abgekühlt. Nur die Aufwärmkurve wurde ausgewertet.

Zur Bestimmung der  $T_g$  der Lyophilisate wurden die Proben auf 100 °C mit einer Heizrate von 10 K/min erwärmt, abgekühlt (10 K/min) und wieder mit 3 K/min erhitzt. Um den

Einfluss der Enthalpie-Relaxation zu eliminieren, wurde zur Auswertung die zweite Aufheizrate herangezogen.

Der Mittelpunkt und der Inflektionspunkt der Glasübergänge wurden mit Hilfe einer Software (Mettler STARe SW 9,01) analysiert. Die Messzelle wurde während der Messung mit hoch reinem, trockenem Stickstoff (100 ml/min) abgekühlt und mit 30 ml/min durchgespült. Dies soll bei trockenen Proben die oxidative Zersetzung bzw. bei der Messung von Lösungen die Kondensation von Feuchtigkeit am Messkopf verhindern.

### **5.2.2.3 Gefriertrocknungsmikroskopie**

Gefriertrocknungsmikroskopie oder im englischen Sprachgebrauch „Freeze Drying Microscop“ (FDM) ist ein Messsystem zur Bestimmung der Kollapstemperatur. Das System besteht aus einem Lichtmikroskop und einer so genannten Stage (Probentisch). Zur Stage gehört eine Vakuumkammer, in der ein kühl- und beheizbarer Silberblock steht. Die Probe wurde auf eine runde Glasscheibe auf dem Silberblock pipettiert und durch eine weitere Glasscheibe abgedeckt. Zwischen die beiden Glasscheiben wurde ein metallischer Ring gelegt, um die Probendicke in allen Versuchen fast konstant zu halten. Danach wurde die Vakuumkammer verschlossen.

Ähnlich wie bei der DSC ist es durch eine entsprechende Temperatursteuerung möglich, die Probe einem kontrollierten Temperatur-Zeit-Programm zu unterwerfen und sie dabei lichtmikroskopisch durch ein Fenster im Deckel der Vakuumkammer zu betrachten. Um den Gefriertrocknungsprozess zu simulieren, wird die Probe zuerst eingefroren (es wird flüssiger Stickstoff als Kühlmittel verwendet). Nach dem Einstellen des Vakuums mittels einer Pumpe wurde die Temperatur des Silberblocks erhöht. Am Anfang fängt das Eis am Rand der Probe an zu sublimieren. Eine Sublimationsfront entsteht mit der Zeit und geht in Richtung Mitte vor. Bei Erhöhung der Temperatur fängt die Probe an zu kollabieren, was als Löcher in der Sublimationsfront erkennbar ist [85].

Die Kollapstemperatur wurde in dieser Arbeit mit einem Linkam FDSC 196 Stage (Linkam Scientific Instruments, UK) und einem Olympus XB 40 Mikroskop ermittelt. Die Bilder wurden mit einer Digitalkamera (Olympus<sup>®</sup> CAMEDIA C-3040 Zoom) aufgenommen.

Für die Bestimmung der Kollapstemperatur wurde die Probe (ca. 3 µl) mit einer Kühlrate von 10 K/min bis -50 °C abgekühlt und diese Temperatur ca. 5 min zum Equilibrieren beibehalten. Das Vakuum wird dann bis zum Erreichen von weniger als 0,1 hPa angelegt. Der

Silberblock wurde zuerst mit einer Heizrate von 2 K/min dann mit 1 K/min bis zum Überschreiten der Kollapstemperatur aufgeheizt.

### 5.2.3 Herstellung der Lyophilisate

Der „Trial and Error“- Charakter der Entwicklung eines Gefriertrocknungsprozesses kann viel Zeit in Anspruch nehmen. Daher versuchten Tang und Pikal in ihrer Veröffentlichung [53] eine Richtlinie zur rationalen Prozessentwicklung und Optimierung aufzuzeigen. In dieser Publikation werden die theoretischen Grundlagen in die Praxis umgesetzt und beim praktischen Teil dieser Arbeit zum Vorbild genommen.

Die Gefriertrocknungsläufe wurden in verschiedenen Gefriertrocknungsanlagen, Alpha 1-4/LDC-1M und Delta 1-24 KD (Abb. 5-5, Abb. 5-6), der Firma Christ- Osterodo am Harz durchgeführt.

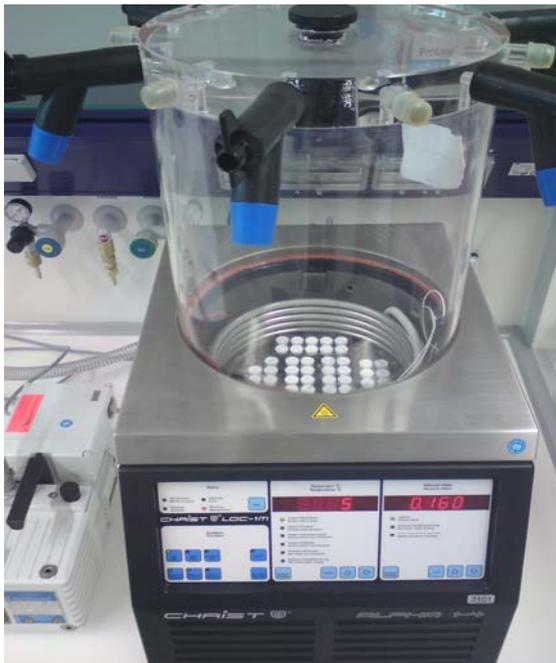


Abb. 5-5: Christ Alpha 1-4



Abb. 5-6: Christ Delta 1-24KD

Zur Kompatibilitätsuntersuchung wurden die Vials durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und schnell auf die Stellfläche der Anlage Alpha 1-4 gestellt. Die Haupttrocknung fand bei  $p = 0,370$  hPa und unkontrollierter Temperatur statt. Die Nachtrocknung erfolgt bei  $p = 0,1$  hPa und einer Temperatur von  $30$  °C. Die Vials wurden dann bei verschiedenen Temperaturen ( $-20$  °C, RT und  $40$  °C) gelagert.

Die Herstellung der Lyophilisate in Blistern erfolgte, wenn nicht anders angegeben, unter den in der Tab. 5-3 zusammengefassten Bedingungen. Zur Erfassung der Produkttemperatur wird ein Thermofühler eingebracht. Die Einfrierschritte werden je nach der verwendeten Anlage angepasst.

**Tab. 5-3:** Herstellungsprozess des Lyophilisates (H.T.: Haupttrocknung, N.T.: Nachtrocknung)

Operation	Schritt	Beginn (°C)	Ende (°C)	p (hPa)	Rate	Zeit (h)
Beladung	1	-40	-40			15 min
	2	-40	-20		1 °C/min	
	3	-20	-20			20
	4	-20	-40		1 °C/min	
H.T.	7	-40	-40	0,160		
	8	-40	5	0,160	1 °C/min	
	9	5	5	0,160		15
N.T.	10	5	40	0,120	0,2 °C/min	
	11	40	40	0,120		2

## 5.2.4 Prüfung der hergestellten Lyophilisate

### 5.2.4.1 Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC-Untersuchung mit einer Kontron Instrument HPLC Pumpe 422 und einem Kontron Detektor 332 diente zur Gehaltbestimmung des Midazolams in den Kuchen, um die Kompatibilität mit den Hilfsstoffen zu prüfen. Für das Aufgabesystem wurde eine Rheodyne 20 µl-Probenschleife, Modell 7725 verwendet. Die Daten wurden mit einem Geminix Standard-Software Single System Goebel Elektro GmbH-Ludwigshafen ausgewertet. Die validierte Methode von Andersin wurde zum Vorbild genommen [86].

#### Prüfbedingungen:

Säule: RP-18 (125 mm- ø: 4 mm, Körnung: ø =5 µm)

Flussrate: 1 ml/min

Detektion: UV-Detektion bei 220 nm

Fließmittel: Puffer/Methanol-Gemisch (35/65). Der Puffer besteht aus 50 mM Phosphorsäure mit 14,4 mM TEM. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 3,5 eingestellt.

Die Vorbereitung der Probe wird, anders als es von Andersin beschrieben wurde, durchgeführt, um eine Beschädigung der Säule durch die Gelatine zu vermeiden. Die Proben werden zuerst in Wasser gelöst, dann mit Methanol behandelt und zentrifugiert, um die Gelatine abzutrennen. Zum Schluss wird 1 ml des Überstands mit einer internen Standard-Lösung (Ethyl-4-hydroxybenzoat von Fluka<sup>®</sup>) gemischt und mit der mobilen Phase verdünnt. Nach der Filtration wurde mit einer Hamilton-Spritze eingespritzt. An jedem Untersuchungstag wurde der Kalibrierfaktor der enthaltenen Ethyl-4-hydroxybenzoat (Nipagin A)-Kalibrierlösung bestimmt. Danach wird die Konzentration des Midazolams in dem Kuchen ermittelt.

#### **5.2.4.2 UV-Vis-Spektrometer**

Die Konzentration des Midazolams in der Formulierung wird mit Hilfe eines UV-Vis-Spektrometers Lambda 14 (Perkin Elmer, UK) bestimmt. Die Absorption, das Auflösungsvermögen, das Streulicht sowie der Wellenlängenbereich des Geräts wurden nach Ph.Eur. 5.- 2.2.25 überprüft.

Nach einer geeigneten Verdünnung wird die Lösung in einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von  $d=1$  cm vermessen. Von jeder Lösung wird ein Spektrum aufgenommen, um Abweichungen im Absorptionsmaximum in Abhängigkeit von der Zeit beobachten zu können.

#### **5.2.4.3 Feuchtegehalt nach Karl Fischer**

Der Wassergehalt der Lyophilisate wurde nach dem Karl-Fischer-Verfahren bestimmt. Die herkömmliche Methode beruht auf der Titration des Wassers in Anwesenheit von Schwefeldioxid, Methanol und einer geeigneten Base als Puffersubstanz durch Zugabe von Jod. In dieser Arbeit wird ein Mitsubishi Feuchtigkeitsbestimmungssystem (Model CA-06 Coulometric) und eine Mitsubishi Wasserverdampfungseinheit (Model VA-06) verwendet.

Das Gerät wird folgendermaßen eingestellt:

Ofentemperatur: 140°C

Trägergas: Stickstoff

Gasflussrate: 200 ml/min

Initiale Titrationsrate:  $\leq 10 \mu\text{g H}_2\text{O}/\text{min}$

Die Vorbereitungen der Proben erfolgten in einer Glove-Box bei einer relativen Feuchte von  $\leq 10\%$ . Für jede Messung wurden ca. 20-40 mg Lyophilisate mittels einer Mikrowaage (Delta Range AT 261/ Fa. Mettler) eingewogen. Von jeder Probe wurden mindestens 3 Bestimmungen des Wassergehalts durchgeführt.

#### **5.2.4.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die Rasterelektronenmikroskopie zeichnet sich durch eine große Tiefenschärfe und eine hohe Auflösung von bis zu 3 nm aus. Das Abbild einer Probe entsteht aus den Wechselwirkungen eines Elektronenstrahls und der Probenoberfläche. Dazu wird eine Elektronenquelle zur Erzeugung des Elektronenstrahls herangezogen. Die Elektronen werden dann in einem elektrischen Feld mit einer festgelegten Spannung beschleunigt und anschließend auf einen kleinen Punkt an der Probenoberfläche fokussiert. Die Oberfläche wird dann so zeilenweise abgetastet.

Um Elektronen des Strahls abführen zu können, muss die Probe an der Oberfläche eine elektrische Leitfähigkeit besitzen. Nichtmetallische Proben müssen daher mit einer leitfähigen Schicht überzogen werden. Dieses Beschichtungsverfahren unter Argon-Atmosphäre wird auch als „sputtering“ bezeichnet. Nach der Beschichtung können die Elektronen direkt von der Probenoberfläche entweder gestreut oder emittiert werden. Diese werden von einem Detektor erfasst und elektronisch zu Abbildungen verarbeitet.

Um die Struktur der Lyophilisate zu untersuchen, wurden REM-Aufnahmen mit einem Elektronenmikroskop Zeiss DSM 962 (ZEISS GmbH, Oberkochen, Deutschland) gemacht. Die Beschleunigungsspannung wird je nach Größe und Empfindlichkeit der Probe auf 15 oder 20 kV eingestellt.

Ein dreieckiges Stück des Lyophilisats wird auf eine elektrisch leitende, beidseitig klebende Folie (PROVAC GmbH, Oestrich Winkel, Deutschland) aufgebracht, die zuvor auf einem kleinen Metallträger befestigt wurde. Die Proben werden dann mit einem sehr dünnen Film einer Gold/Palladium-Legierung (SCD005 BALTEC GmbH, Witten, Deutschland) im Vakuum (0,04 hPa) beschichtet. Von jeder der vier zugänglichen Oberflächen des Probenstücks wird eine Aufnahme gemacht.

### 5.2.4.5 Freisetzungsuntersuchung

Die Freisetzungsuntersuchungen wurden in einer Blattrührer-Apparatur (Erweka, Type: DT6R, Heusenstamm, Germany), die den Anforderungen der Ph. Eur. entspricht, durchgeführt. Für die Freisetzung des Wirkstoffs aus den Lyophilisaten wurden 1 Liter-Standardgefäße verwendet. Die Gefäße wurden mit 900 ml Wasser als Prüfmedium gefüllt und die Temperatur auf  $37 \pm 0,5$  °C eingestellt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit der Blattrührer wurde auf 50 UPM eingestellt. Die Probenentnahme erfolgte mittels einer 5 ml Vollpipette und wurde 2, 4, 6, 10 und 30 Minuten nach der Zugabe der Lyophilisate durchgeführt. Die entnommenen Proben wurden anschließend schnell mit einem  $0,45 \mu\text{m}$  Cellulose-Acetat-Filter (Whatman<sup>®</sup>, Germany) filtriert. Nach der geeigneten Verdünnung wurde die Konzentration des Wirkstoffs mit dem UV-Vis-Spektrometer bei 220 nm bestimmt.

### 5.2.4.6 Röntgendiffraktometrie (XRD)

Während die Lichtmikroskopie nur die Bestimmung des Habitus einer Festsubstanz ermöglicht, gestattet das Röntgendiffraktometer die genaue Untersuchung der Atomanordnung in einer Festsubstanz. Der Unterschied zwischen dem Röntgendiffraktometer und der Lichtmikroskopie beruht auf den kleinen interatomaren Abständen im Bereich zwischen 0,1-0,3 nm. Während die lichtmikroskopische Methode mit einem Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm arbeitet, handelt es sich bei der Untersuchung mit Röntgenstrahlung um sehr kurzwellige, elektromagnetische Strahlen im Bereich von 0,1 bis 10 nm. In diesem Längenbereich befinden sich auch die Atomabstände. Dadurch lassen sich sowohl polymorphe Kristallstrukturen als auch die amorphen Anteile einer Festsubstanz mittels Röntgendiffraktometrie identifizieren. Dem Messprinzip liegt die Beugung der Röntgenstrahlen in Folge der Wechselwirkung der Röntgenstrahlen mit den Elektronenwolken der Atome zugrunde. Je nach der Anordnung der Atome ergeben sich Interferenzen der gebeugten Strahlung. Verstärkung auf Grund der Interferenz setzt bestimmte geometrische Bedingungen voraus, die mit Hilfe der Braggschen Reflexionsbedingung beschrieben werden können [87].

Die Untersuchung mit Röntgenstrahlung ermöglicht, zwischen amorphen und kristallinen Anteilen zu unterscheiden. Amorphe Anteile besitzen im Gegensatz zu kristallinen eine geringe Nah- und keine Fernordnung. Dies führt auf einer Seite zur Aufweitung der Interferenzen und zur Abnahme der Intensität der Interferenzmaxima. Auf der anderen Seite

wächst der Anteil der diffusen Röntgenstreuung, was charakteristisch für amorphe Proben ist und flache breite Halos ergibt [88]. Der Kristallinitätsindex wird durch die Berechnung des prozentualen Anteils der kristallinen Peaks zu der Gesamtfläche ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung der Struktur der Lyophilisate mit einem Diffraktometer der Firma Phillips, Model X'pert MPD mit Cu-K $\alpha$ -Strahlung durchgeführt. Die Messungen fanden bei einer Anodenspannung von 40 kV und einer Stromstärke von 40 mA statt. Der Weitwinkelbereich lag zwischen 5 und 40° bei einer Schrittweite von 0,02°/s. Die Reflexionsmessung erfolgte bei Raumtemperatur. In den Röntgendiffraktogrammen wird die Intensität (counts/s) gegen den Winkel 2 theta (2  $\theta$ ) aufgetragen.

#### 5.2.4.7 Lagerbedingung für die Stabilitätsuntersuchung

Die Lagerung der Lyophilisate erfolgte in Exsikkatoren, die zur Einstellung der relativen Feuchte (r.F.) entweder gesättigte Salzlösungen [89] oder getrocknetes Silicagel enthalten.

Die Feuchtigkeit wurde für die normal sowie für die Stress- Lagerbedingung nach der ICH-Leitlinie-Q1A (R2) (International Conference of Harmonization) eingestellt. Die verwendeten gesättigten Salzlösungen werden in Tab. 5-4 zusammengefasst. Die Exsikkatoren wurden im Trockenschrank bei 25 °C für die Normal- und bei 40°C für die Stress- Lagerbedingung gelagert.

**Tab. 5-4:** verwendete gesättigte Salzlösungen zur Einstellung der relativen Feuchte bei 25°C

<b>Relative Feuchte (%)</b>	60	75
<b>Gesättigte Salzlösung</b>	NaBr	NaCl

#### 5.2.4.8 Statistische Auswertung:

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS Version 11.0 verwendet. Die Gleichheit zwischen den Chargen wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé geprüft. Zusätzlich wurden die Daten der Zerfallszeit des Lyophilisates und die Midazolamkonzentration während der Lagerzeit auf Signifikanz untersucht. Die Signifikanz wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % geprüft.

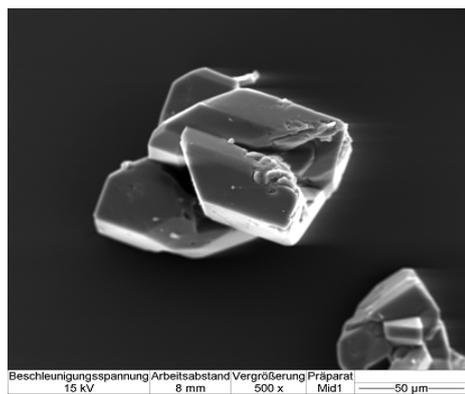
## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Charakterisierung des Wirkstoffs

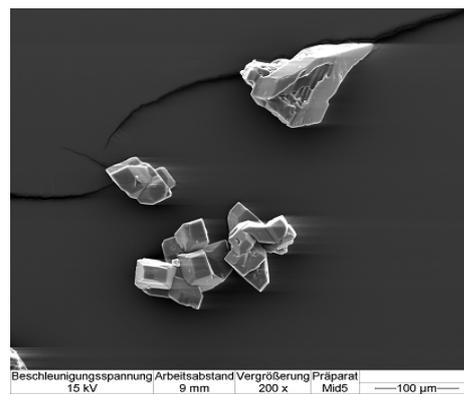
Bei einer Rezepturentwicklung ist die Charakterisierung eines Wirkstoffs sehr bedeutsam. Die Löslichkeit des Wirkstoffs ist das wichtigste Kriterium für die Formulierung. Bei Substanzen, deren Wasserlöslichkeit weniger als 0,5% beträgt, können Resorptionsprobleme auftreten [90]. Löst sich der Wirkstoff bereits in der Mundhöhle und kann dort schnell resorbiert werden, so ist eine Vermeidung des First-Pass-Effekts zu erwarten. Ist der Wirkstoff allerdings wasserunlöslich, so ist im Vergleich zu herkömmlichen oralen Tabletten nicht mit einer signifikanten Änderung der Bioverfügbarkeit zu rechnen. Die Partikelgröße des Wirkstoffs muss auch während der Herstellung berücksichtigt werden, um eine Sedimentation von unlöslichen Wirkstoffen zu vermeiden.

#### 6.1.1 REM- Aufnahmen von Midazolam-HCl

Die REM-Bilder (Abb. 6-1, Abb. 6-2) zeigen eine kantige Struktur der Partikel. Sie sind zumeist als Ansammlung von kleineren eckigen Partikeln (Agglomerat) zu sehen.



**Abb. 6-1:** REM- Aufnahme von Midazolam-HCl, Mikroskop- Vergrößerung 500x



**Abb. 6-2:** REM- Aufnahme von Midazolam-HCl, Mikroskop -Vergrößerung 200x

### 6.1.2 Partikelgröße von Midazolam-HCl

Mit Hilfe des Bildanalyse-Systems KS 300<sup>®</sup> von Carl Zeiss wird der Partikeldurchmesser bestimmt. Aus den REM-Aufnahmen ist ersichtlich, dass die Partikel nicht sphärisch sind. Zur Charakterisierung der Teilchen wird daher sowohl der Ferret-Durchmesser als auch der Durchmesser des zur Projektionsfläche äquivalenten Kreises berechnet.

Tab. 6-1 zeigt eine Differenz von ca. 10  $\mu\text{m}$  zwischen den beiden gemessenen Durchmessern. Auch wird in beiden Fällen deutlich, dass die Wirkstoffpartikel einen Durchmesser von mehr als 50  $\mu\text{m}$  besitzen. Seager [20] erwähnte, dass die Partikelgröße unlöslicher Wirkstoffe kleiner als 50  $\mu\text{m}$  sein muss, um eine Sedimentation während der Herstellung zu verhindern. Außerdem sind kleinere Partikel wünschenswert, um den Eindruck einer sandigen Konsistenz im Mund und Rachenraum während des Schluckens zu vermeiden.

**Tab. 6-1:** Ferret- Durchmesser und Durchmesser eines äquivalenten Kreises von Midazolam-HCl-Partikel (n=25)

	<b>Kreis-Äquivalent D.</b>	<b>Formfaktor</b>	<b>Ferret-D.</b>
Durchmesser	81,8 [ $\mu\text{m}$ ]	0,51	92,6 [ $\mu\text{m}$ ]
sdv	18,6 [ $\mu\text{m}$ ]	0,19	27,4 [ $\mu\text{m}$ ]
rel. sdv	22,8 [%]	37,54 [%]	29,7 [%]
Max	115,2 [ $\mu\text{m}$ ]	0,74	160,87 [ $\mu\text{m}$ ]
Min	46,73 [ $\mu\text{m}$ ]	0,04	50,81 [ $\mu\text{m}$ ]

### 6.1.3 Röntgendiffraktometrie von Midazolam-HCl

Die Röntgendiffraktometrie bietet die Möglichkeit, die Struktur von Substanzen sowie von deren Gemischen zu erfassen. Jede kristalline Substanz zeigt ein spezifisches Beugungsspektrum, das zu deren qualitativer und quantitativer Bestimmung herangezogen werden kann. Die Bildung teilmorpher Strukturen kann durch eine Verringerung der Intensität der typischen Beugungsreflexe und eine Vergrößerung der diffusen Signale detektiert werden. Die Abwesenheit des charakteristischen Midazolam-Peaks weist auf einen amorphen Zustand in der Dispersion hin. Zudem wird das Ausbleiben dieses Peaks bei den Stabilitätsuntersuchungen überprüft, um die Rekristallisation des Midazolam-HCl mit der Zeit zu verfolgen. Das Beugungsmuster von Midazolam-HCl wurde unter den im Kap. 5.2.4.6

genannten Bedingungen aufgenommen. Abb. 6-3 zeigt das experimentell ermittelte Beugungsdiagramm von Midazolam-HCl. Deutliche, scharfe Beugungspeaks sind bei  $2\theta = 28,4^\circ$  und  $21,1^\circ$  gut erkennbar.

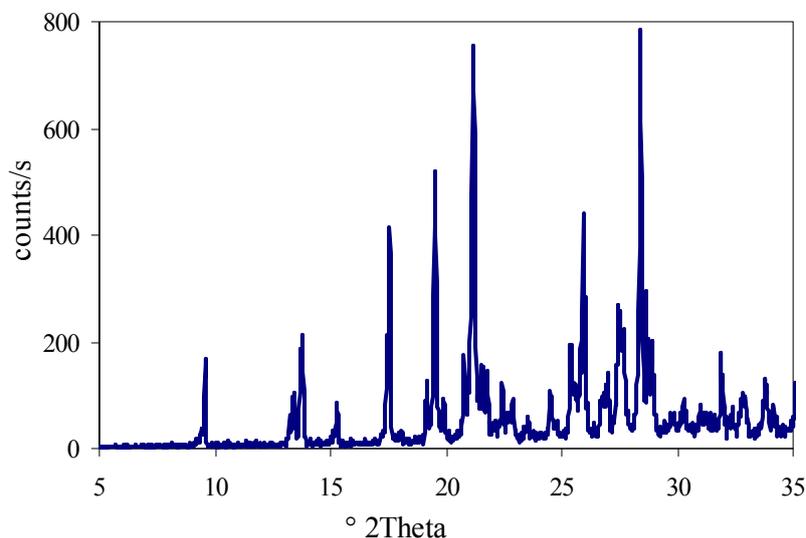


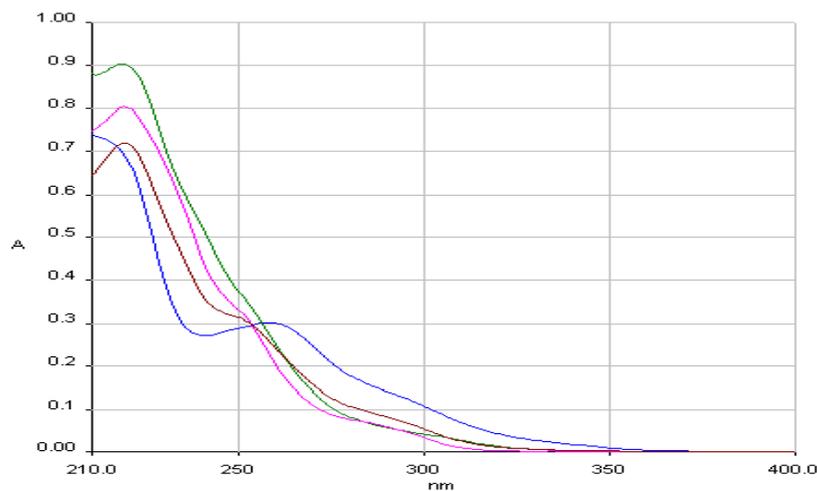
Abb. 6-3: Röntgendiffraktogramm des Midazolam-HCl

#### 6.1.4 $pK_a$ -Bestimmung

Die Löslichkeit von Midazolam-HCl ist pH-abhängig. Die Bestimmung des  $pK_a$ -Wertes und dadurch des pH-Werts für die optimale Löslichkeit des Midazolams ist ein bedeutsamer Schritt bei der Rezepturentwicklung. Um die genaue Lage des UV-Absorptionsmaximums zu bestimmen, wurden zunächst UV-Spektren des Midazolam-HCl in Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen. Die Abb. 6-4 zeigt die Änderung in dem Absorptionsmaximum mit der Änderung des pH-Wertes.

Es ist ersichtlich, dass mit sinkendem pH-Wert auch die Absorption bei ca. 219 nm sinkt und ein weiterer Peak bei ca. 257 nm auftaucht [91]. Ursache für diese Änderung im Verlauf des Spektrums ist der offene Benzophenon-Ring [92]. In dem untersuchten pH-Bereich von 5,5 bis 9 war diese Tendenz nicht erkennbar. Für die Messung wird eine überschüssige Menge Midazolam-HCl zu Phosphatpuffer bis zum Entstehen eines Bodensatzes zugegeben. Die Suspension wird für 20 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt und dann bei  $25^\circ\text{C}$  im Trockenschrank für 24 Stunden stehen gelassen, um eine Gleichgewichtseinstellung zu gewährleisten. Die Löslichkeit des Midazolam-HCl im Puffer bei verschiedenen pH-Werten wird anhand der Konzentration der Substanz in dem klaren Überstand bestimmt. Die

Berechnung erfolgt nach Zimmermann [93,94] und wird im Anhang (9.1) demonstriert. Die Bestimmung der Neutralform wird zuerst bei einem pH-Wert, bei dem ein neutrales Molekül von Midazolam vorliegt, dann mit 0,5 pH-Einheiten höher und tiefer durchgeführt. Die Neutralform liegt hier im pH-Bereich zwischen 7,47 und 8,80. Ihre Löslichkeit beträgt 2,94 mg/100 ml. Der ermittelte  $pK_a$ -Wert von Midazolam-HCl beträgt folglich 6,23 und stimmt mit den von Andersin (6,04), von Clarks Handbuch (6,20) und von Walser (6,15) ermittelten Ergebnissen überein [92,95,96].



**Abb. 6-4:** Änderung des Absorptionsmaximums von Midazolam-HCl bei verschiedenen pH-Werten  
Blau: Midazolam in 0,1 N HCl; Rot: pH= 2,85; Rosa: pH=4,75; Grün: pH=7

## 6.2 Kompatibilitätsuntersuchung

Die erfolgreiche Entwicklung eines stabilen Lyophilisats hängt vom Wirkstoff, der Formulierung und dem Gefriertrocknungsverfahren ab. Versucht wird, mit dem Wirkstoff kompatible Hilfsstoffe zu finden, welche die Lyophilisierbarkeit gewährleisten und für ein stabiles Trockenprodukt sorgen.

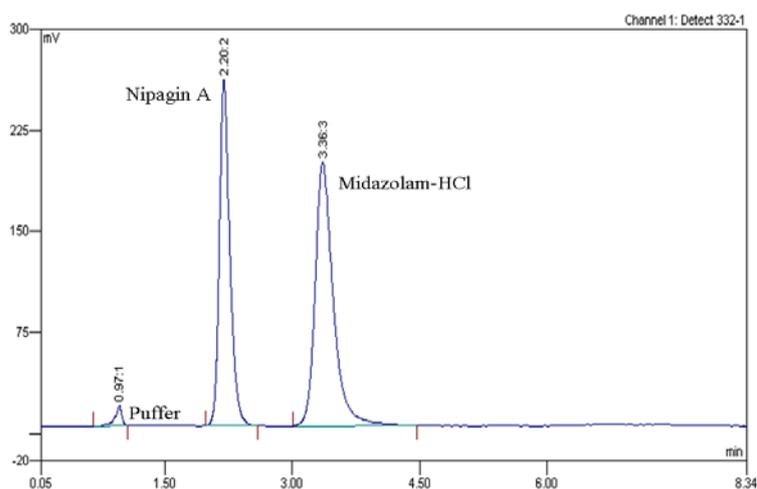
In diesem Versuchsblock wird die Kompatibilität zwischen dem Wirkstoff und ausgewählten Hilfsstoffen überprüft. Drei verschiedene Formulierungen (Tab. 6-2) wurden in Flaschen mit jeweils 1 ml Lösung gefriergetrocknet.

Die Proben wiesen Risse auf. Vor allem die Formulierung mit Saccharose zeigt keine konsistente Struktur, was auf eine ungeeignete Herstellungsmethode zurückzuführen sein könnte.

**Tab. 6-2:** Zusammensetzung der Formulierungen für die Kompatibilitätsuntersuchung

	Midazolam-HCl [mg/ml]	Gelatine A [%]	Mannitol [%]	Tween 80 [%]	Saccharose [%]
1	3,75	3	3	-	-
2	3,75	3	-	0,025	-
3	3,75	3	-	-	3

Die Gehaltbestimmung des Midazolam-HCl in den Kuchen wird mittels HPLC, Kap.5.2.4.1, durchgeführt. Das Midazolam-HCl zeigt einen Retentionsfaktor von ~2,7 im Vergleich zum Retentionsfaktor des internen Standards Nipagin A mit ~1,4, was auf eine ausreichende Trennung zwischen beiden Substanzen hinweist. In Abb. 6-5. ist ein Chromatogramm der Formulierung 3 nach 6 Wochen Lagerung bei 40 °C als Beispiel gezeigt.



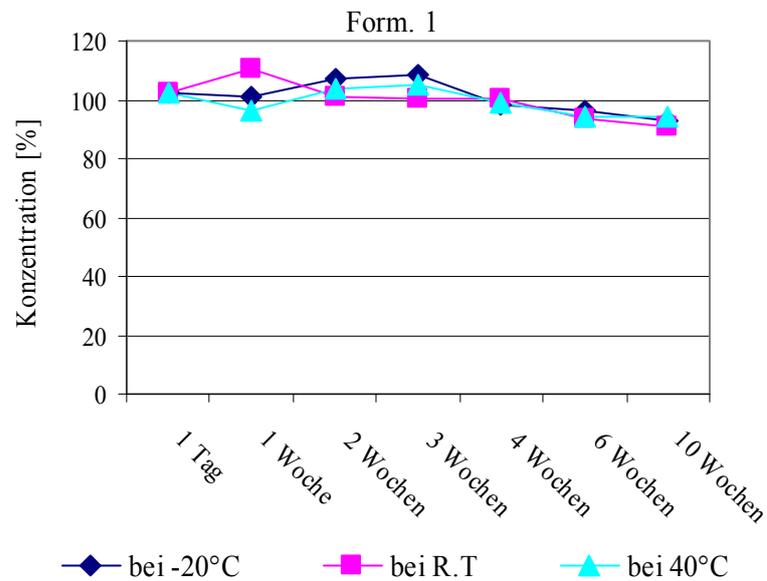
**Abb. 6-5:** HPLC- Chromatogramm von dem Kuchen bei 220 nm

Die Ergebnisse der Kompatibilitätsuntersuchung im Zeitraum bis zu 10 Wochen bei verschiedenen Temperaturen sind in Abb. 6-6, Abb. 6-7 und Abb. 6-8 dargestellt. Eine tendenziell leichte Abnahme des Midazolamsgehalts von maximal 8% ist in den Formulierungen mit Mannitol oder Mannitol und Tween nach 9 Wochen festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigt die Formulierung mit Saccharose nach 9 Wochen keine signifikante Änderung. Das zeitweise Absinken nach 6 Wochen ist wahrscheinlich auf einen systematischen Fehler zurückzuführen.

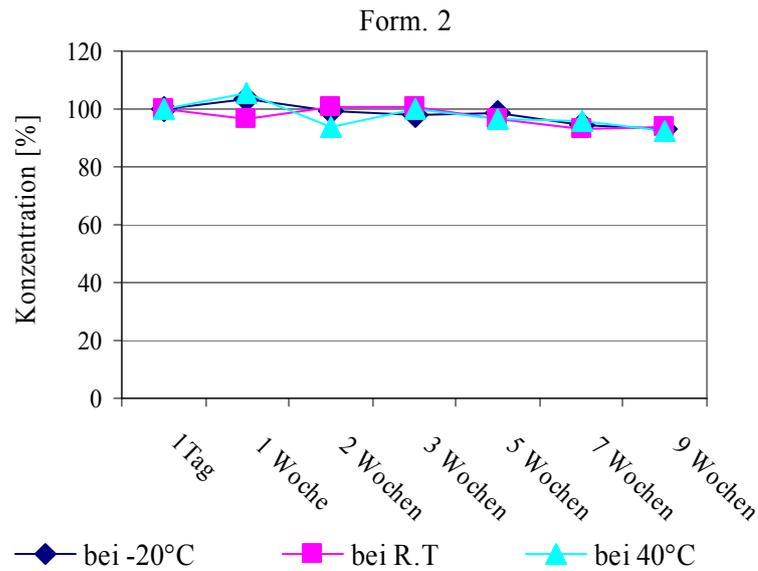
In der Literatur wurde über die Stabilität des Midazolam-HCl in einer „flavored Gelatine“ für eine Lagerdauer von 28 Tagen bei -20 °C und von 14 Tagen bei 4 °C berichtet [97]. Die begrenzte Lagerdauer war mikrobiologisch bedingt. Die meisten anderen Studien befassten sich mit der Stabilität des Midazolam-HCl in der flüssigen Form. Beispielweise fand

Steedman, dass ein Injektionslösungspräparat von Midazolam-HCl in Sirup (Saccharose, Glycerin, Geschmacksstoff und Wasser) mit einem pH=4,2 nach Lagerung bei 40 °C über eine Dauer von 56 Tagen keine Zersetzung zeigt [98].

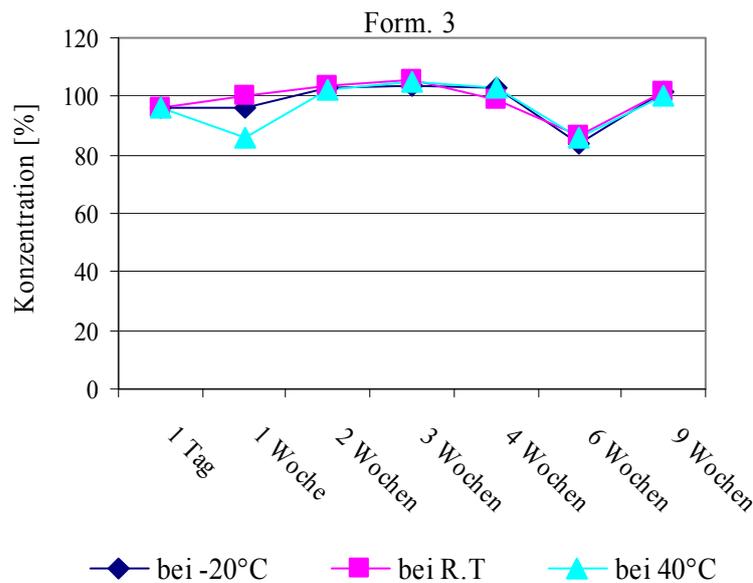
Verschiedene Faktoren führten allerdings zum Entschluss, weiter mit Mannitol als kristallinen Gerüstbildner zu arbeiten. Dazu zählen unter diesen Faktoren das unakzeptable Aussehen sowie die Schwierigkeit bei der Bearbeitung des saccharosehaltigen Produkts. Saccharose ist eine amorphe Substanz mit  $T_g = -33 \text{ °C}$  [99] was eine niedrige Stellflächentemperatur bei der Gefriertrocknung verlangt. Laut Literatur zeigen mannitolhaltige Formulierungen schnellere Wirkstofffreisetzung gegenüber den saccharosehaltigen Formulierungen [100]. Außerdem waren in der Literatur keine Hinweise auf eine mögliche Inkompatibilität zwischen Midazolam, Gelatine und Mannitol zu finden.



**Abb. 6-6:** Kompatibilitätsuntersuchung zwischen Midazolam, Gelatine und Mannitol bei drei verschiedenen Lagertemperaturen



**Abb. 6-7:** Kompatibilitätsuntersuchung zwischen Midazolam, Gelatine, Mannitol und Tween 80 bei drei verschiedenen Lagertemperaturen



**Abb. 6-8:** Kompatibilitätsuntersuchung zwischen Midazolam, Gelatine und Saccharose bei drei verschiedenen Lagertemperaturen

### 6.3 Rezepturentwicklung

Nach der Bestimmung der physikalisch-chemischen Daten des Wirkstoffs wurden in der nächsten Stufe sowohl die Formulierungsparameter als auch die Parameter für die Gefriertrocknung bestimmt. In Bezug auf die Formulierungsparameter wird in der ersten Versuchsreihe der Einfluss der Konzentration von Gelatine und Mannitol auf die

Eigenschaften der Lyophilisate geprüft. Im zweiten Schritt werden verschiedene Gelatinetypen untersucht. Für den Gefriertrocknungsprozess sind folgende Parameter wichtig: das Einfrierverhalten, die Temperatur und der Druckverlauf während der Haupttrocknung sowie die Temperatur und der Druckverlauf während der Nachtrocknung.

### 6.3.1 Der Einfluss der Konzentration von Gelatine und Mannitol

In den folgenden Versuchsreihen wird überprüft, ob eine Änderung der Konzentration der Hilfsstoffe zu einer Verbesserung der physikalischen Eigenschaften der Lyophilisate führt. Deshalb werden Rezepturen miteinander verglichen, in denen Gelatine und Mannitol in verschiedenen Konzentrationen vorliegen.

Die Midazolam Dosis pro Tablette beträgt 7,5 mg [3]. Um optisch akzeptable Lyophilisate zu erhalten, sind jedoch zusätzliche Hilfsstoffe unerlässlich. Allerdings erniedrigt die steigende Konzentration an gelösten Stoffen die Temperatur, bei der das System vollständig gefriert. Zusätzlich erhöht sie die Resistenz der getrockneten Schichten gegen den Wasserdampfstrom bei der Trocknung [27]. Aus diesen Gründen wird beachtet, dass bei allen Formulierungen die Feststoffkonzentration weniger als 100 mg/ml [27], in den untersuchten Fällen ~76 bis 78 mg/ml, beträgt.

Die Zusammensetzung der Formulierungen 1 bis 5 wird in der Tab. 6-3 gezeigt. Bei der Herstellung werden pro 1 ml Formulierung 8,33 mg Midazolam-HCl zugegeben, um Tabletten mit 7,5 mg Midazolam-Base im Endprodukt zu erhalten.

**Tab. 6-3:** Die Zusammensetzung der Formulierungen

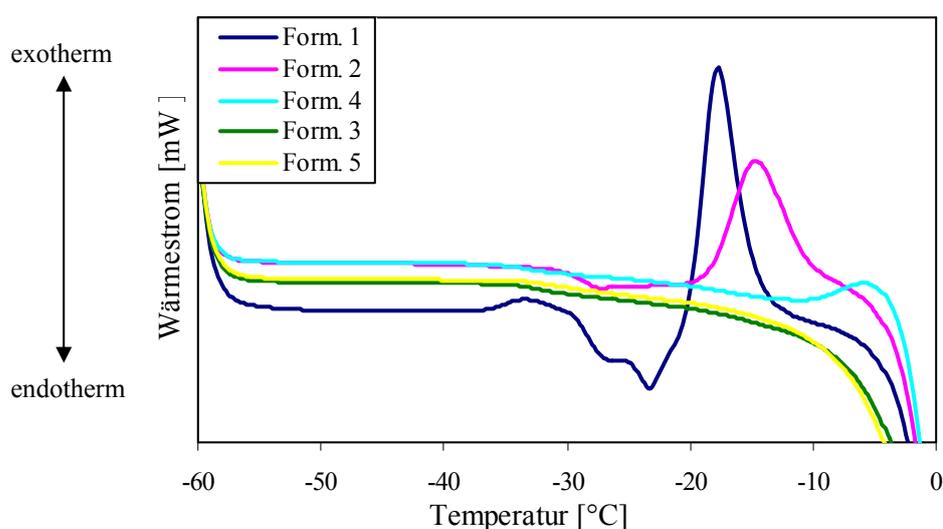
	<b>Gelatine</b> [%]	<b>Mannitol</b> [%]	<b>Zitronensäure</b> [%]	<b>Aspartam</b> [%]	<b>Lemon Aroma</b> [%]
<b>1</b>	1	5	0,175	0,5	0,1
<b>2</b>	2	4	0,25	0,5	0,1
<b>3</b>	3	3	0,325	0,5	0,1
<b>4</b>	2,57	3,43	0,3	0,5	0,1
<b>5</b>	3,43	2,57	0,375	0,5	0,1

### 6.3.1.1 Einfrierverhalten

Von den 3 Phasen der Gefriertrocknung kommt dem Einfrieren eine entscheidende Bedeutung zu, weil in dieser Phase die Grundlage für das Gelingen der Trocknung und die Qualität des Endproduktes gelegt wird. Die Bestimmung des Einfrierverhaltens erfolgt mittels DSC und FDM. Die dabei erhaltenen Informationen wie Glasübergangstemperatur, Kollapstemperatur und Tempern dienen der Festlegung der maximal erlaubten Produkttemperatur in der Haupttrocknung.

#### 6.3.1.1.1 Glasübergangstemperatur

Die Glasübergangstemperatur ( $T_g'$ ) ist einer der wichtigsten Formulierungsparameter. Der Vorteil ihrer Messung ist die Vermeidung des nicht klar definierten Grenzübergangs zwischen dem Anfang des partiellen Kollapses, des partiellen Kollapses und des vollen Kollapses bei der FDM-Messung [42]. Die Abb. 6-9 zeigt das erste Aufheizen mit einer Heizrate 10 K/min einer Lösung, die zuvor mit einer Kühlrate von 10 K/min auf eine Temperatur von  $-60\text{ °C}$  abgekühlt wurde. Ein exothermer Vorgang taucht in diesem Heizlauf auf. Dieses exotherme Ereignis ist eher auf die eruptive Rekristallisation von amorph gebliebenen Bestandteilen, am meisten von Mannitol zurückzuführen. Mit der Erhöhung der Gelatineanteile und einer Erniedrigung des Mannitolanteils verschiebt sich der Peak der Rekristallisation zu höheren Temperaturen bis zur Überlagerung mit dem Schmelzpeak.

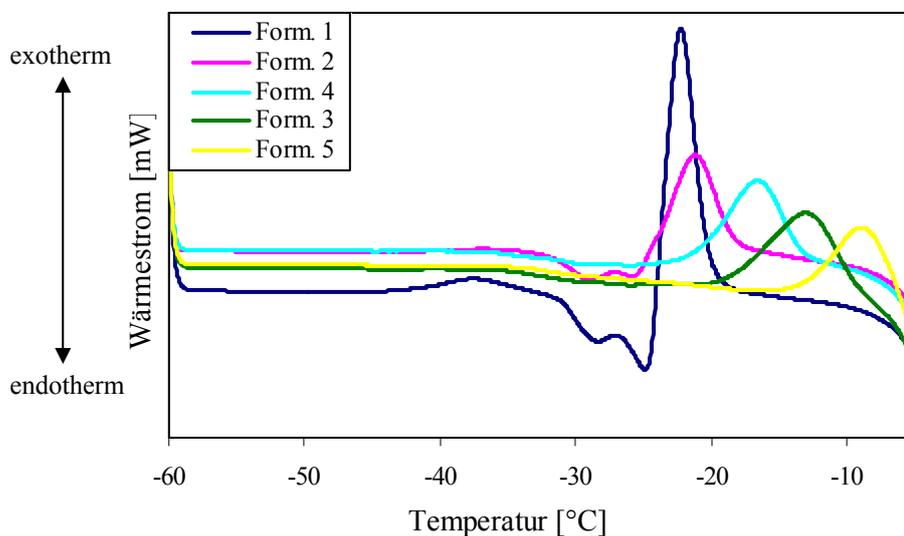


**Abb. 6-9:** DSC-Thermogramm der ersten Aufheizung [10 K/min] der Formulierungslösungen (1; 2; 3; 4 und 5 vgl. Tab. 6-3).

Die zweite Heizrate 3 K/min in Abb. 6-10 zeigt bei allen untersuchten Formulierungen einen Rekristallisationspeak mit deutlicher Verschiebung von ca.  $-22\text{ °C}$  bis auf ca.  $-2,5\text{ °C}$ .

Der Unterschied zwischen der Abb. 6-9 und der Abb. 6-10 deutet auf den Einfluss der Heizrate auf die thermischen Ereignisse in dem DSC-Thermogramm. Besonders sind die Formulierungen 3 und 5 betroffen. In diesen Formulierungen ist die Heizrate 10 K/min für die metastabilen Anteile zu hoch, um innerhalb der vorgegebenen Zeit zu rekristallisieren.

Ein ausgeprägtes Absinken in der Höhe des Rekristallisationspeaks ist sowohl zwischen den untersuchten Heizraten 3 K/min und 10 K/min (Abb. 6-11) als auch zwischen den Formulierungen 1 und 5 (Abb. 6-10) erkennbar.



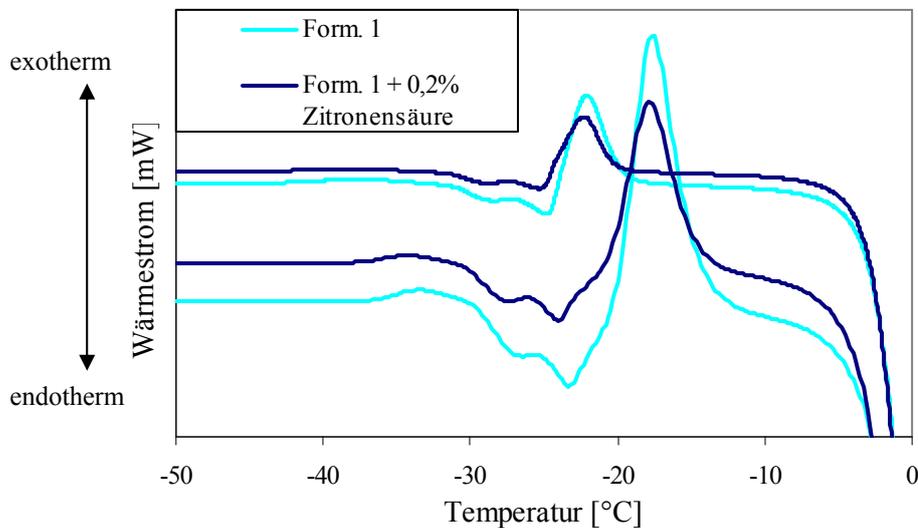
**Abb. 6-10:** DSC-Thermogramm der ersten Aufheizung [3 K/min] der Formulierungslösungen (1; 2; 3; 4 und 5 vgl. Tab. 6-3).

Wie die Tab. 6-4 zeigt, sind mehr als eine  $T_g'$  bei den Formulierungen 1 und 2 bei jedem Heizlauf zu bemerken. Mit der Erhöhung der Gelatineanteile und Erniedrigung der Mannitolanteile wird nur eine  $T_g'$  gefunden. In den meisten Formulierungen liegt die erste  $T_g'$  bei der 10 K/min-Heizrate zwischen  $-35\text{ °C}$  und  $-32\text{ °C}$ . Diese Temperaturen liegen in der Nähe der Literaturangaben der  $T_g'$  von Mannitol [99,101]. Deshalb könnten diese Werte auf das nach der Abkühlung amorph gebliebene Mannitol zurückzuführen sein. Die niedrigen Glassübergangstemperaturen der Formulierungen bestätigen die hemmende Wirkung der Gelatine auf die Kristallisation des Mannitols [102]. Chitra beobachtete, dass PVP K40 eine Verzögerung der Mannitolkristallisation sowohl bei der Abkühlung als auch bei der Erwärmung bewirkt.

**Tab. 6-4:** Die  $T_g'$  der Formulierungen bei der Heizphase [10 °K/min] ( $n \geq 2$ )

Formulierung	$T_g'$ (°C) bei 10°C/min	
	$T_g'$ (a)	$T_g'$ (b)
1	-28,4	-24,2
2	-35,2 ±0,4	-28,7 ±0,3
3	-33,4 ±0,5	-
4	-34,1 ±1	-
5	-32,1	-

Um einen Einfluss der Zitronensäure auf die  $T_g'$  der Formulierungen und die Verschiebung des Peaks der Rekristallisation bei der Heizphase auszuschließen, wird die Konzentration der Zitronensäure verändert und daraufhin die DSC-Untersuchung erneut durchgeführt. Die Formulierung mit einem Gelatineanteil von 1% und einem Mannitolanteil von 5% wird dazu mit einem erhöhten Anteil an Zitronensäure von 0,175% auf 0,375 % neu hergestellt.



**Abb. 6-11 :** DSC-Thermogramm zeigt die Rekristallisation beim Aufheizen mit einer Heizrate 10 K/min (untere Linien) und einer 3 K/min (obere Linien) in den Formulierungen mit verschiedenen Konzentration von Zitronensäure

Das Diagramm (Abb. 6-11) zeigt keine Verschiebung des Rekristallisationspeaks im Folge des Zusatzes von Zitronensäure. Ein signifikanter Einfluss auf die  $T_g'$  in der untersuchten Konzentration wurde nicht festgestellt. Das stimmt mit den Ergebnissen in der Literatur

[102,103] überein, wo ein vergleichbares Ergebnis zwischen einer Mannitollösung und einer Mannitol/Zitronensäure-Formulierung erzielt wurde.

Zum Vergleich mit der gemessenen  $T_g'$  der Formulierungen werden die  $T_g'$  nach der Fox-Gleichung (Gl. 3-4) berechnet. Dazu wird die  $T_g'$  der einzelnen Bestandteile wie in Tab. 6-5 dargestellt entweder der Literatur entnommen oder experimentell ermittelt.

**Tab. 6-5:**  $T_g'$  der Bestandteile

Substanz	$T_g'$ (°C)	Quelle
Midazolam-HCl	-18,5	experimentell
Mannitol	-35	[104,105]
Gelatine	-9	[Nail 99]
Zitronensäure	-54	[Lu 106]
Aspartam	~-7,5*	experimentell
Lemon aroma	-19,5	experimentell
Tween 80	-72	[Beirowski 107]

Bei der ersten Rechnung werden die metastabile Substanzen nicht berücksichtigt. Die erhaltenen Werte werden in der Tab. 6-6 und Abb. 6-18 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine starke Abweichung von der gemessenen  $T_g'$  der Formulierungen.

Wird angenommen, dass alle Bestandteile amorph bleiben, was nicht der Fall ist, erniedrigt sich die  $T_g'$ , ohne der gemessenen  $T_g'$  zu entsprechen.

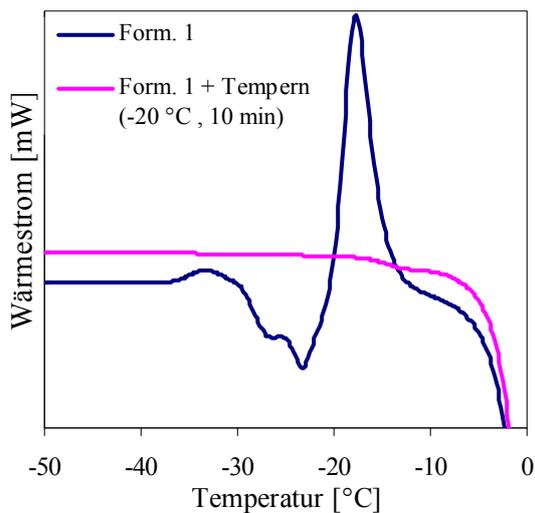
**Tab. 6-6:** Die berechnete  $T_g'$  der Formulierungen nach der Fox-Gleichung

Form.	1	2	3	4	5
Berechnete $T_g'$ [°C]	-10,5	-9,9	-9,7	-9,6	-9,5
Berechnete $T_g'$ [°C] (alle Bestandteile sind amorph)	-28,9	-25,9	-24,2	-22,9	-21,7

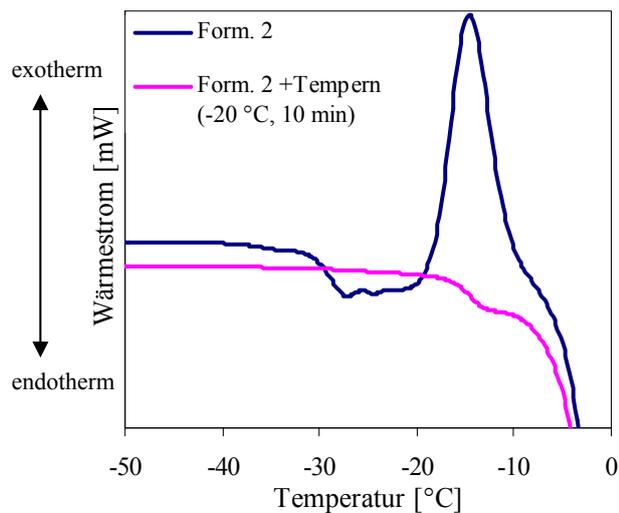
\* Obwohl die Bestimmung am MDSC erfolgte (2 K/min,  $\pm 0,5$  K pro 100 Sekunde), war die  $T_g'$  nicht ganz eindeutig zu bestimmen.

### 6.3.1.1.2 Tempern (Annealing)

Nachdem die  $T_g'$  und die  $T_{rc}$  der gefrorenen Formulierungen ermittelt wurde, konnten die Bedingungen für das Tempren festgelegt werden. Durch die thermische Behandlung sollen amorph gebliebene Bestandteile und nicht gefrorenes Wasser, die beim ersten Abkühlen nicht auskristallisiert sind, zur Kristallisation gebracht werden. Das Tempren sollte bei einer möglichst hohen Temperatur oberhalb  $T_g'$  bzw.  $T_{rc}$  aber unterhalb  $T_{schmelz}$  durchgeführt werden.



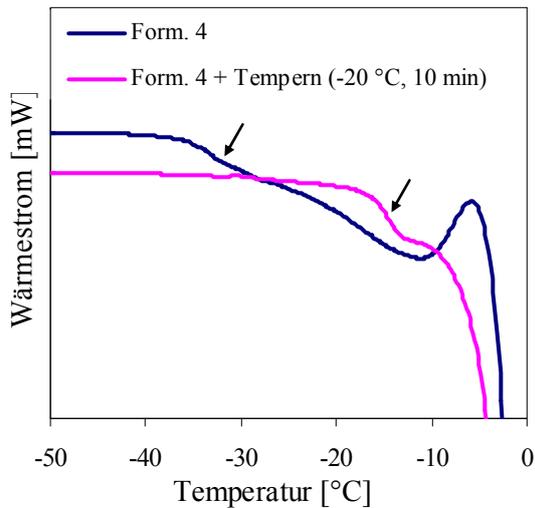
**Abb. 6-12:** DSC-Thermogramm der Form. 1 beim Aufheizen mit einer Heizrate 10 K/min ohne oder nach dem Tempren bei -20 °C für 10 min



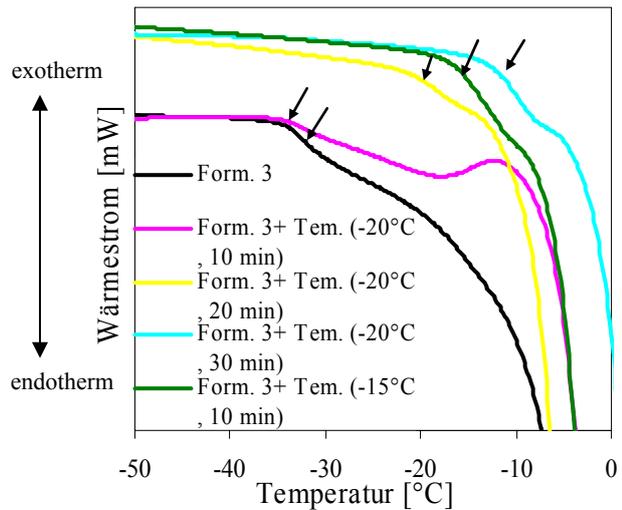
**Abb. 6-13:** DSC-Thermogramm der Form. 2 beim Aufheizen mit einer Heizrate 10 K/min ohne oder nach dem Tempren bei -20 °C für 10 min

Bei einer Heizrate von 10 K/min nach dem Tempren bei -20 °C für 10 min verschwindet der Kristallisationspeak in den Formulierungen 1, 2 und 4 und die  $T_g'$  erhöht sich auf ca. -15 °C (Abb. 6-12, Abb. 6-13, Abb. 6-14).

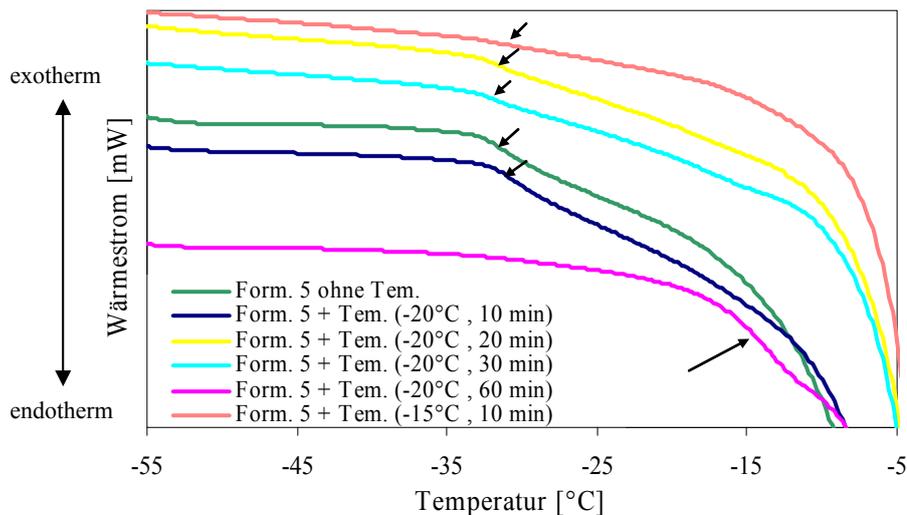
Im Gegensatz dazu erweist sich dieses Tempren bei den Formulierungen 3 und 5 als uneffektiv, da sich die  $T_g'$  dabei nicht verändert (Abb. 6-15, Abb. 6-16). Wenn die Zeitdauer des Temprens bei einer Temperatur von -20 °C erhöht wird, ist eine Erhöhung der  $T_g'$  der Formulierung 3 nach 20 Minuten wahrnehmbar (-17,2 °C), und erst nach 60 Minuten ist diese Erhöhung bei der Formulierung 5 zu beobachten (-16,1 °C). Die Durchführung des Temprens bei höherer Temperatur (-15 °C) führt zum Anstieg der  $T_g'$  der Formulierung 3 nach 10 min. Bei der Formulierung 5 ist eine Änderung nicht zu erkennen. Das Verhalten der Formulierungen nach dem Tempren spiegelt wiederum den Einfluss des Verhältnisses zwischen Mannitol und Gelatine wider. Dies lässt auf eine Verhinderung des Übergangs des Mannitols in den kristallinen Zustand mit Erhöhung des Gelatineanteils schließen.



**Abb. 6-14:** DSC-Thermogramm der Form.4 beim Aufheizen mit einer Heizrate 10 K/min ohne und nach dem Temern bei -20 °C für 10 min



**Abb. 6-15:** DSC-Thermogramm der Form.3 beim Aufheizen mit einer Heizrate 10 K/min ohne und nach dem Temern bei -20 °C für 10, 20, und 30 min und bei -15 °C für 10 min

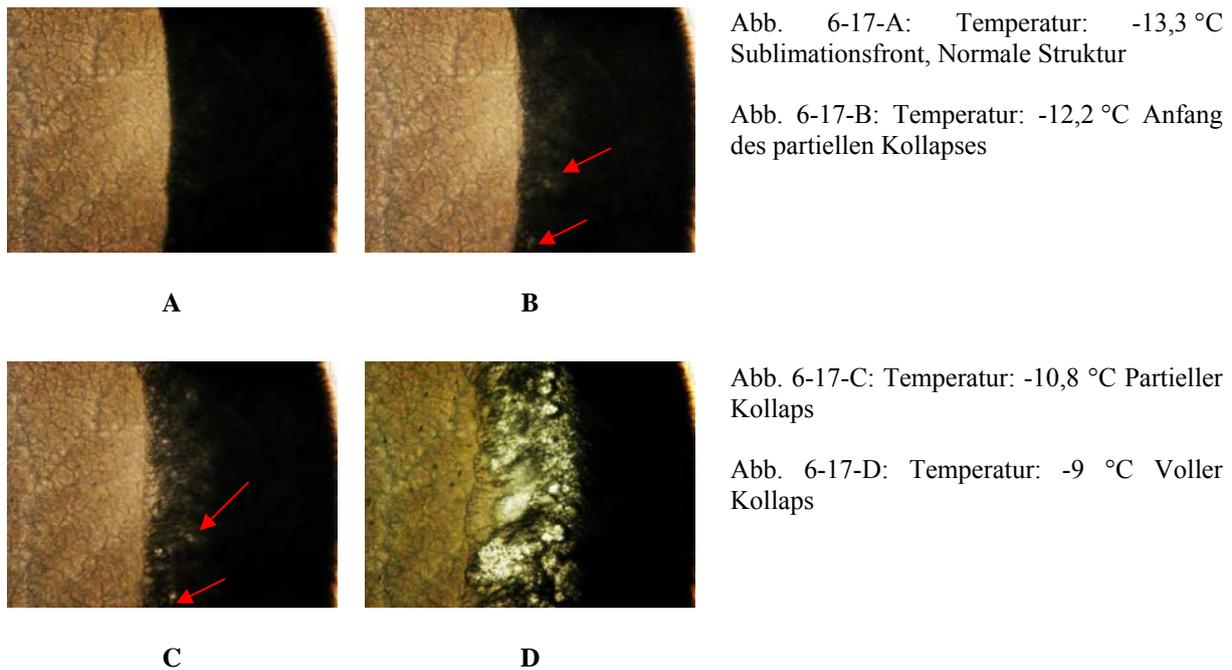


**Abb. 6-16:** DSC-Thermogramm der Form.5 beim Aufheizen mit einer Heizrate 10 K/min ohne und nach dem Temern bei -20 °C für 10, 20, 30 und 60 min oder bei -15 °C für 10 min

### 6.3.1.1.3 Kollapstemperatur

Die Kenntnisse über die kritischen Temperaturbereiche sind für eine erfolgreiche Gefriertrocknung unerlässlich. Bei der Trocknung sollte die Produkttemperatur meistens einige Grad unterhalb der Kollapstemperatur liegen, um ein trockenes Produkt ohne strukturellen Kollaps zu erhalten. Gleichzeitig sollte die Produkttemperatur so hoch wie möglich sein, um eine Optimierung des Trocknungsprozesses zu erreichen [53]. Die

Formulierungen werden bis  $-50\text{ °C}$  abgekühlt und die Kollapstemperatur wird mittels FDM bei einer Heizrate von  $2\text{ K/min}$  ermittelt. Es wird zwischen drei Temperaturen unterschieden: Anfang des partiellen Kollapses (Schattierung in Form kleiner Löcher), des partiellen Kollapses (Die Löcher werden heller) und des vollen Kollapses (großflächiger Verlust in der Struktur). Die Abb. 6-17 (A bis D) zeigen diese Temperaturen bei der Untersuchung der Formulierung 2 als Beispiel. Die Kollapstemperaturen der Formulierungen werden in Abb. 6-18 und im Kapitel 9.2.3.1 dargestellt.



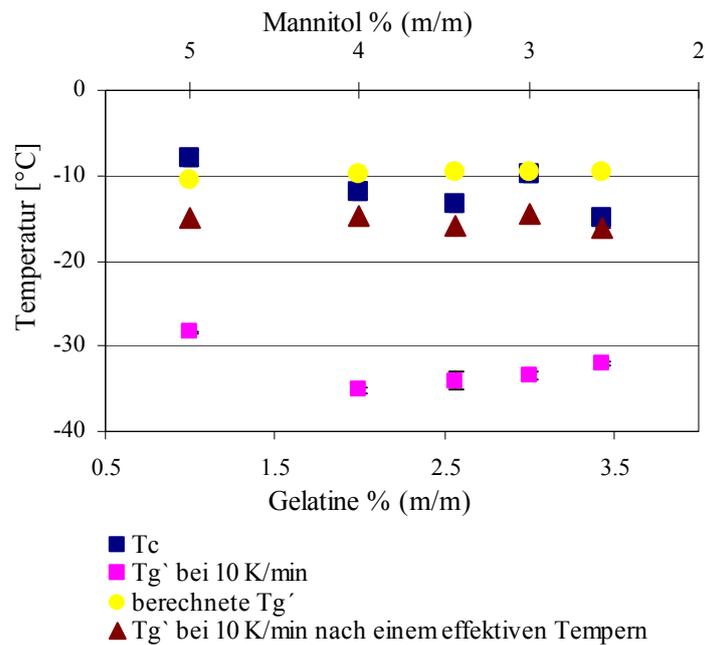
**Abb. 6-17:** Die Bestimmung der  $T_c$  von Formulierung 2 mittels FDM

#### 6.3.1.1.4 Zusammenfassung des Einfrierverhaltens

In der Literatur [53, 42, 43] wird von einem Unterschied zwischen der  $T_c$  und  $T_g'$  in einem Bereich von  $2\text{--}5\text{ °C}$  berichtet, was den Ergebnissen in der Abb. 6-18 widerspricht. Auf der anderen Seite wird oft bei hochkonzentrierten Proteinformulierungen eine Differenz von 12 bis  $15\text{ °C}$  zwischen den beiden Temperaturen angegeben [108,109]. Als Grund dafür nimmt Colandene [109] an, dass die höhere Proteinkonzentration eine höhere Viskosität verursacht. Dadurch ist die Bewegungsfreiheit der amorphen Anteile eingeschränkt. Dies verhindert den makroskopischen Kollaps während der Gefriertrocknung, wenn die  $T_g'$  überschritten wird. Die große Differenz zwischen  $T_c$  und  $T_g'$  (ca.  $22\text{ °C}$ ) bei diesem Experiment (Abb. 6-18) kann zum einen auf die Messmethode (der Unterschied in der Heizrate) als auch auf die

Zusammensetzung der Formulierungen (Gelatine, Aspartam) zurückgeführt werden. Nach einem effektiven Tempern liegt der Unterschied zwischen den  $T_c$  und  $T_g'$  der Formulierungen im Bereich von 1 bis 7 °C. Dies führt zum Rückschluss, dass bei dieser FDM-Messung eine Kristallisation der amorph gebliebenen Anteile stattfindet. Diese Aussage könnte durch die Ergebnisse von Passot [110] bestätigt werden. Der Autor findet eine Übereinstimmung zwischen der gemessenen  $T_c$  und  $T_g'$  wenn die Formulierungen nur amorphe Substanzen enthalten. Im Gegensatz dazu zeigen die Formulierungen, die kristalline Substanzen wie Mannitol oder Glycin enthalten, eine weit niedrigere  $T_g'$  im Vergleich zur  $T_c$ .

Die berechnete  $T_g'$  führt zu größeren Werten als die experimentelle  $T_g'$ . Der Unterschied kann auf die Eigenschaften der Formulierungen zurückgeführt werden. Es ist zu beachten, dass manche Substanzen wie Mannitol nicht völlig kristallisieren. Dies führt zur Verfälschung der Rechnung. Außerdem fand Hancock [111] die Fox-Gleichung nicht ausreichend für glasbildende Substanzen wie Zucker, die ein niedriges Molekulargewicht haben. Er begründete das mit dem Unterschied in den Dichten der Bestandteile.



**Abb. 6-18:** Die kritischen Temperaturen der in Tab. 6-3 Formulierungen

### 6.3.1.1.5 Herstellung der Lyophilisate

Aufgrund der oben berichteten Befunde wurde die  $T_c$  auf -15 °C festgelegt. Damit konnten die Prozessparameter wie die Stellflächentemperatur und der Druck mit Hilfe von Literaturangaben [53] bestimmt werden. Dabei werden Kriterien [53] wie „medium dry layer

resistance“ (10% > Feststoffe > 1%), und die Überlastung der Gefriertrocknungsanlage bei höheren Stellflächentemperaturen bei der Rechnung berücksichtigt. Für die Durchführung der Versuche wurden für jede Formulierung jeweils 1 ml Lösung in ein 10 ml Vial pipettiert.

Im Rahmen der Entwicklung der Lyophilisate wurden einige Vorversuche gemacht, um die anderen Prozessparameter wie Einfriermethode und Trockendauer festzulegen. Die Vorversuche wurden an einer Lyostar II Anlage (FTS, Stone Ridge, USA), die mit einer Pirani-Röhre und einem kapazitiven Manometer ausgerüstet ist, durchgeführt.

Für das optimale Einfrieren wurden das Eintauchen in flüssigen Stickstoff und das Stellen auf die auf -40 °C vorgekühlte Stellfläche untersucht. Die Tabletten, die in der Anlage eingefroren wurden, waren ohne Risse. Die REM-Bilder zeigen jedoch nicht nur eine porenfrei Oberfläche, sondern auch ein Häutchen, was für eine vorgekühlte Einfriermethode ziemlich typisch ist (Abb. 6-26). Das Häutchen kann zu einer Verminderung der Benetzbarkeit führen, was die schlechte Auflösengeschwindigkeit gegenüber den mit flüssigem Stickstoff eingefrorenen Proben erklären kann. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen vom Kim [61]. Er zeigte, dass die schnell gefrorenen Proben im Vergleich zu den langsam gefrorenen Proben eine bessere Auflösengeschwindigkeit aufweisen. Das Eintauchen in flüssigen Stickstoff wird daher als Einfriermethode für alle Versuche verwendet.

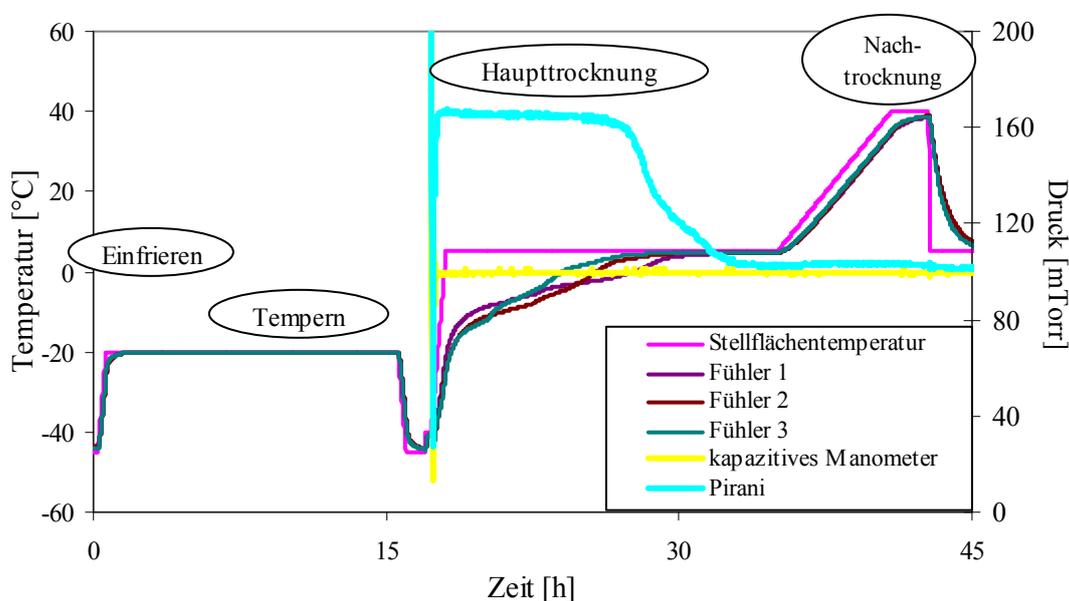


Abb. 6-19: Temperatur- und Druck-Zeit-Verlauf bei der Gefriertrocknung in der FTS-Anlage

Die mittels DSC ermittelte Temperbedingung (-20 °C für 1 Stunde) wurde bei der Herstellung der Proben im Gefriertrockner nicht beibehalten. Die Vorversuche haben gezeigt, dass eine

längere Temperzeit zur Verbesserung der Auflösungsgeschwindigkeit führen kann. Die lange erforderliche Temperzeit wird auch von Mallindine [112] berichtet. Das erste Zeichen der Rekristallisation des Mannitols in einer Zydis<sup>®</sup>-Formulierung wird erst nach 8 Stunden Zwischenlagerung bei -25 °C festgestellt. Eine Verlängerung der Zwischenlagerung führte zur Zunahme der Rekristallisation des Mannitols. Aus diesen Gründen wird das Tempern bei der Herstellung bei -20 °C für 15 Stunden durchgeführt.

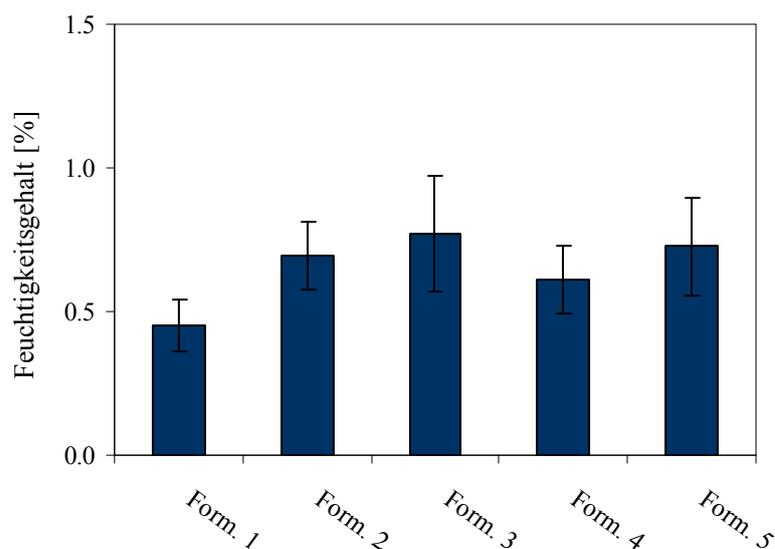
Die Dauer der Trocknung wird ebenfalls optimiert. Eine Übereinstimmung zwischen der Temperaturmessmethode und der komparativen Druckmessungsmethode bestätigt den Abschluss der Haupttrocknung (3.2.4.2.4). Diese ist nach ca. 14 Stunden erreicht (Abb. 6-19) und wird für die nächsten Versuche übernommen.

### 6.3.1.2 Charakterisierung der Lyophilisate

#### 6.3.1.2.1 Feuchtigkeitsgehalt

Die Untersuchung der Restfeuchte ergibt, wie in Abb. 6-20 dargestellt, bei den gefriergetrockneten Formulierungen einen Feuchtegehalt von weniger als 1%.

Allerdings zeigt die Formulierung 1 mit 1% Gelatine und 5% Mannitol die niedrigste Restfeuchte. Dies stimmt mit der röntgenografischen Befunden (Abb. 6-21) überein, die auf den höchsten kristallinen Mannitolanteil in dieser Formulierung 1 schließen lassen.



**Abb. 6-20:** Restfeuchte in den gefriergetrockneten Formulierungen (vgl. Tab. 6-3) (n=3)

### 6.3.1.2.2 Kristallisation

Die Röntgendiffraktogramme der gefriergetrockneten Formulierungen (Abb. 6-21) zeigen das Beugungsmuster von Mannitol in der metastabilen  $\delta$ -Modifikation mit dem charakteristischen Peak bei  $2\theta=9,7^\circ$  [61]. Signale der anderen Bestandteile in den untersuchten Formulierungen können nicht identifiziert werden. Der Grund dafür ist entweder die niedrige Konzentration (z.B. beträgt der Anteil des Midazolam-HCl im Produkt ca. 11%) oder das amorphe Vorliegen dieser Substanzen.

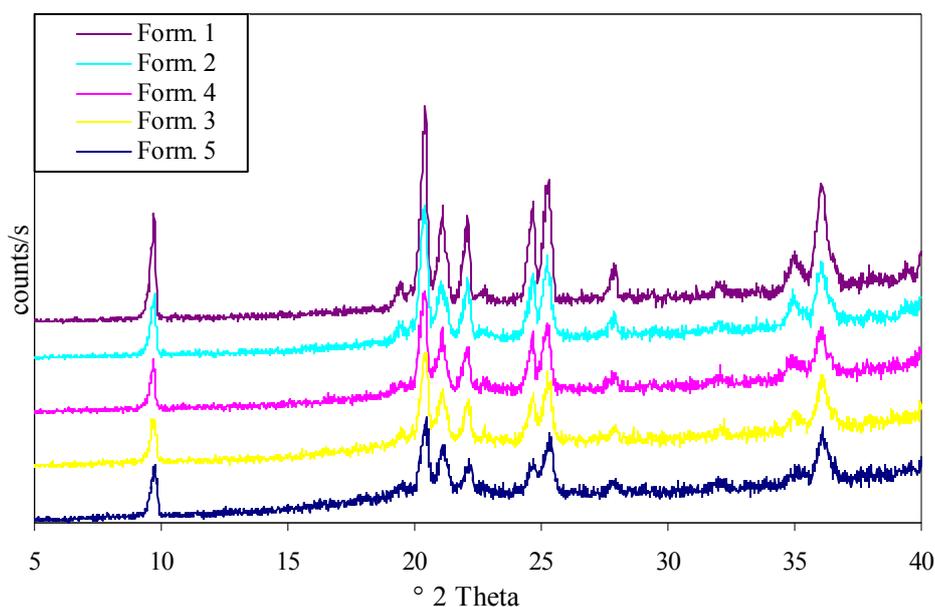


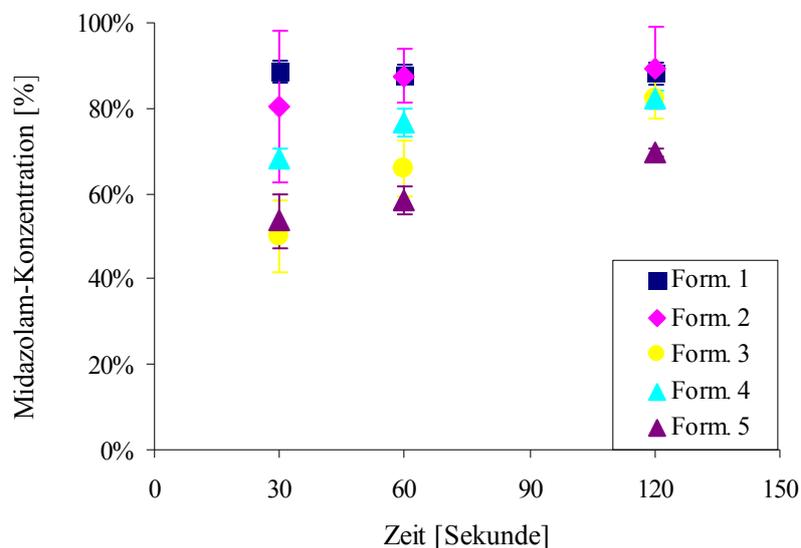
Abb. 6-21: Röntgendiffraktogramm der gefriergetrockneten Formulierungen (vgl. Tab. 6-3)

### 6.3.1.2.3 Die Auflösegeschwindigkeit

Wie in Kapitel 6.3.1.1.5 beschrieben, wurden die Lyophilisate in Vials, hergestellt. Für die Untersuchung der Auflösegeschwindigkeit werden die Vials mit jeweils 2 ml demineralisiertem Wasser aufgefüllt. Die Kuchen aller Formulierungen zerfielen in weniger als zwei Minuten. Die Auflösung war mit Schaumbildung verbunden, und einige Bruchteile sammelten sich am Rand der Vials. Dieses Phänomen war umso ausgeprägter je höher der Gelatineanteil war.

Die Konzentration des Midazolam-HCl wird nach 30, 60 und 120 Sekunden nach der Wasserzugabe mit UV bei der geeigneten Wellenlänge ermittelt. Die Abb. 6-22 stellt den Anstieg der verfügbaren Midazolam-HCl-Konzentration mit Erhöhung der Mannitol-Anteile

dar. Diese Ergebnisse stimmen mit den Versuchen von Chandrasekhar [100] überein. Er zeigte, dass eine Erhöhung der Gelatinekonzentration von 2% auf 5% sowohl zu einer ca. 5-fachen Erhöhung in der Zerfallszeit der Lyophilisate als auch zur Steigerung der Härte führt. Der Autor begründet diese Tendenz mit der Erhöhung der Quervernetzung der Gelatineketten. Beim schnellen Abkühlen einer erwärmten wässrigen Gelatinelösung unter 40 °C entsteht ein dreidimensionales Netzwerk, das durch Hydratation Wassermoleküle einbindet. Wenn das Wasser bei der Gefriertrocknung sublimiert, hinterlässt es nur das dreidimensionale Netzwerk. Die Erhöhung der Gelatine-Konzentration ergibt eine Zunahme der Anzahl der Gelatineketten und deren Wasserstoffbrücken. Das führt zu stabilen Gittern und zur Erhöhung der Lyophilisathärte, was den Zerfall benachteiligt.



**Abb. 6-22:** Die Verfügbarkeit des Midazolam-HCl in den verschiedenen Formulierungen (vgl. Tab. 6-3) nach 30, 60 und 120 Sekunden

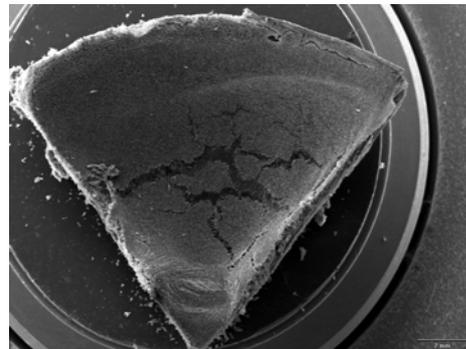
#### 6.3.1.2.4 Makro- und mikroskopische Eigenschaften

Die meisten gefriergetrockneten Kuchen haben schon vor der Nach Trocknung Risse auf der Oberfläche gezeigt (Abb. 6-23, Abb. 6-24), was auf das Einfrieren mit flüssigen Stickstoff ( $\text{LN}_2$ ) zurückzuführen ist. Schnelle Abkühlung führt zu größeren freien Volumina, was wiederum einen höheren verbleibenden Stress in dem gefriergetrockneten Kuchen verursacht [113]. Tempern sollte dazu beitragen, die Lösung im Glasanteil zu entspannen und dadurch weniger freies Volumen und weniger internen Stress zu verursachen. Obwohl das Tempern in

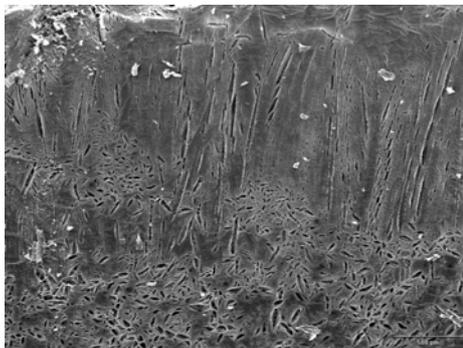
dieser Versuchsreihe oberhalb der  $T_g'$  und für längere Zeit durchgeführt wird, war es nicht ausreichend, die Stresscracks in den Kuchen zu verhindern.



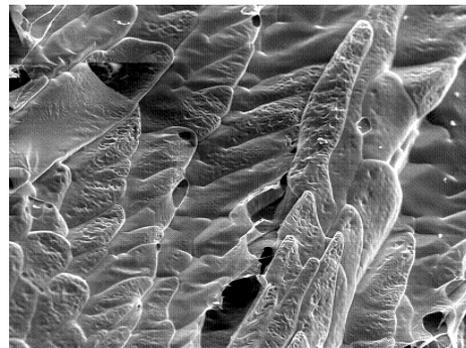
**Abb. 6-23:** Oberfläche von Form.4, eingefroren mit  $LN_2$



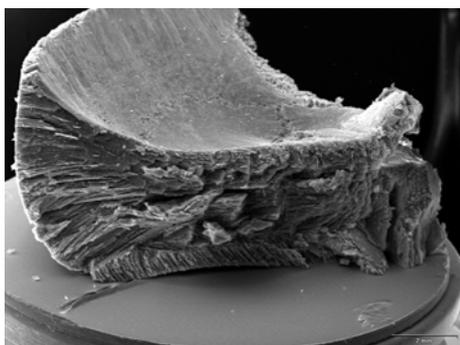
**Abb. 6-24:** REM- Aufnahme von Form.5, eingefroren mit  $LN_2$  (Oberfläche, Mikroskop- Vergrößerung 9x)



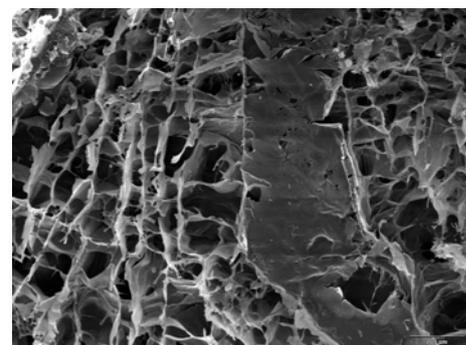
**Abb. 6-25:** REM- Aufnahme von Form. 4. (eingefroren mit  $LN_2$ , Oberfläche-Rand, Mikroskop- Vergrößerung 50x)



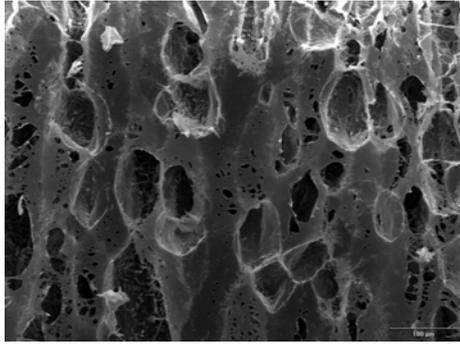
**Abb. 6-26 :** REM- Aufnahme von Form. 3 (Oberfläche-Mitte, eingefroren auf einer vorgekühlten Stellfläche, Mikroskop-Vergrößerung 100x)



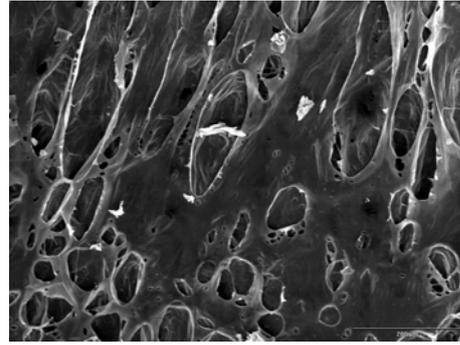
**Abb. 6-27:** REM- Aufnahme von Form. 5 eingefroren mit  $LN_2$  (Bruchkante-Rand, Mikroskop- Vergrößerung 35x)



**Abb. 6-28:** REM- Aufnahme von Form. 3 eingefroren mit  $LN_2$  (Außenwand, Mikroskop- Vergrößerung 100x)



**Abb. 6-29:** REM- Aufnahme von Form. 1 eingefroren mit LN<sub>2</sub> (Oberfläche-Rand, Mikroskop- Vergrößerung 250x)



**Abb. 6-30:** REM- Aufnahme von Form. 3 eingefroren mit LN<sub>2</sub> (Oberfläche-Rand, Mikroskop- Vergrößerung 200x)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen aller Formulierungen, die mit flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, zeigen eine poröse Oberfläche. Am Rand der Oberfläche befinden sich spaltenartig Poren und in Richtung des Zentrums werden diese rund (Abb. 6-25). Die Produktmorphologie aller Formulierungen zeigt kanalartige Strukturen, die sich von der Wand des Vials in Richtung des Zentrums entwickeln und zu einer spitzigenförmigen Aufwölbung des Kuchens in der Mitte führt (Abb. 6-23, Abb. 6-27). Gieseler [114] hat derartige Strukturen gezeigt, allerdings mit glatter nicht-poröser Oberfläche, was auf den Eigenschaften der Substanzen oder dem Tempern beruhen kann. An der Außenwand des Kuchens ist eine dünne Schicht und darunter eine hoch poröse Struktur zu erkennen (Abb. 6-28).

Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch ist schwer zwischen den einzelnen Formulierungen zu unterscheiden. Nur die Formulierung 1 hat eine erkennbare fragile Struktur gezeigt. Der Unterschied zwischen den Oberflächen der Formulierung 1 und 3 ist in Abb. 6-29 und Abb. 6-30 dargestellt.

### 6.3.2 Der Einfluss des Gelatine-Typs

Im ersten Versuchsblock wurde festgestellt, dass die Formulierung 1 mit den Anteilen Gelatine zu Mannitol von 1:5 die beste Auflösegeschwindigkeit aufwies. Aufgrund der Zerbrechlichkeit bei der Handhabung dieser Formulierung wird die Prüfung des Einflusses des Gelatine-Typs stattdessen an der Formulierung 2 mit den Anteilen Gelatine zu Mannitol von 2:4 untersucht. Wie die Röntgenaufnahme gezeigt hat, gab es keine Anzeichen von kristallinem Wirkstoff in dem gefriergetrockneten Produkt. Deshalb wird angenommen, dass der Wirkstoff molekulardispers in der Polymermatrix vorliegt. Die Freigabegeschwindigkeit

des Wirkstoffs ist daher ausschließlich durch die Lösungsgeschwindigkeit und die spezifische Oberfläche der Matrix gegeben [2]. Wird die Löslichkeit der Matrix erhöht, ist eine bessere Wirkstofffreigabegeschwindigkeit zu erwarten.

In dieser Versuchsreihe wird der Einfluss des Gelatine-Typs auf die Eigenschaften der Lyophilisate überprüft. Zwei Typen von Gelatine (A und B) werden verwendet. Sie unterscheiden sich zusätzlich in der Bloom-Zahl und dadurch in der Kettenlänge des Peptids (Tab. 5-1). Die Quervernetzung der Ketten in der Gelatine mit niedriger Bloom-Zahl ist geringer als in der Gelatine mit höherer Bloom-Zahl, was zur Bildung eines geringer kohäsiven Gels führen könnte. Dies kann einen bedeutsamen Einfluss auf die Zerfallszeit des Lyophilisates haben. Die Zusammensetzung der Formulierungen wird in Tab. 6-7 dargestellt.

**Tab. 6-7:** Die Zusammensetzung der Formulierungen, um den Einfluss des Gelatine-Typs zu überprüfen

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
Gelatine (A) [%]	2	-	2	-
Gelatine (B) [%]	-	2	-	2
Mannitol [%]	4	4	4	4
Zitronensäure [%]	0,25	0,4	0,01	0,04
Aspartam [%]	0,5	0,5	0,5	0,5
Pfefferminzaroma [%]	0,7	0,7	0,7	0,7
Tween-80 [%]	-	-	0,05	0,05
H <sub>2</sub> O [%]	92,55	92,4	92,74	92,71
pH	~3,7	~3,7	~5	~5

Die Formulierungen unterscheiden sich neben dem Gelatine-Typ in den Zitronensäureanteilen und dadurch im pH-Wert. Hintergrund für die unterschiedliche pH-Einstellung war die pH-Abhängigkeit der Absorption von Midazolam. Es wird von einem für die Absorption optimalen pH-Wert zwischen 5 und 6 berichtet [115,116]. Odou zeigte, dass die Erhöhung des Zitronensäure-Anteils bei den untersuchten sublingualen Tabletten eine Verbesserung der Auflösungs geschwindigkeit und eine Erniedrigung der Diffusion verursacht. Grund dafür ist der ionisierte Zustand des Midazolams. Er fand einen Kompromiss, in dem er nur 5 mg Zitronensäure zu den anderen Bestandteilen der Tablette (Midazolam 5 mg, Sorbitol 490 mg, Magnesiumstearat 0,5 mg) zugefügt hat [115].

Normalerweise ist Midazolam im Mund bei einem pH-Wert von (6,2-7,4) nicht ionisiert, was die Lipophilie und demzufolge die Diffusion fördert. Auf der anderen Seite kann eine

Sedimentation bei einem pH-Wert  $> 6$  eintreten, was die Diffusion benachteiligt. Dadurch wird die Löslichkeit des Midazolams zum limitierenden Faktor in der Absorption von Midazolam durch die lipophile Membran.

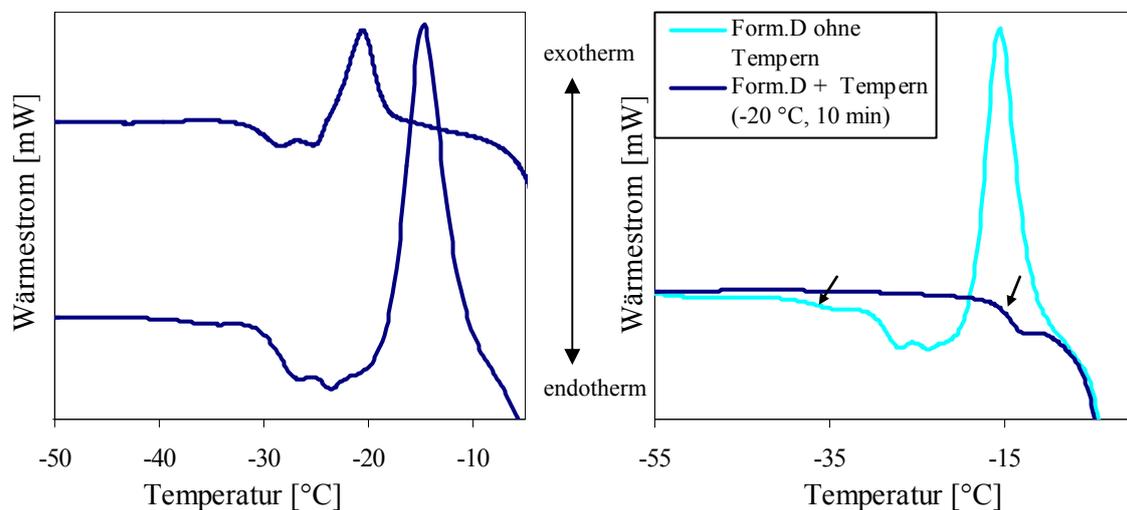
Bei der Herstellung werden pro 1 ml der Formulierung 8,33 mg Midazolam-HCl eingesetzt, um Tabletten mit 7,5 mg Midazolam-Base zu erhalten.

### 6.3.2.1 Einfrierverhalten

Im Rahmen der Entwicklung der Lyophilisate werden Daten hinsichtlich des Verhaltens des Produktes beim Einfrieren bzw. Erwärmen überprüft.

#### 6.3.2.1.1 Glasübergangstemperatur ohne und nach dem Tempern

Bei der Untersuchung der Formulierungen mittels DSC ist ein Kristallisationspeak bei den beiden Aufheizphasen erkennbar (Kap. 6.3.1.1.1). Die Erkennung der verschiedenen  $T_g'$  bei den beiden Aufheizphasen wird in Formulierung B als Beispiel in Abb. 6-31 dargestellt. Bei der Aufheizrate von 10 K/min beginnt der Kristallisationspeak bei ca.  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Deshalb wird für das Tempern eine Temperatur von  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  beibehalten.



**Abb. 6-31.:** DSC Thermogramm beim Aufheizen der Form. B bei 10 K/min (untere Linie) und 3 K/min (obere Linie) ohne Tempern

**Abb. 6-32.** DSC-Thermogramm der Form. D bei einem Heizrate von 10 K/min vor und nach dem Tempern bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min

Wird die Probe mit einer Temperatur von  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  für 10 Minuten getempert, so verschwindet der Kristallisationspeak. In der Abb. 6-32 (Form. D als Beispiel) ist ersichtlich, dass das

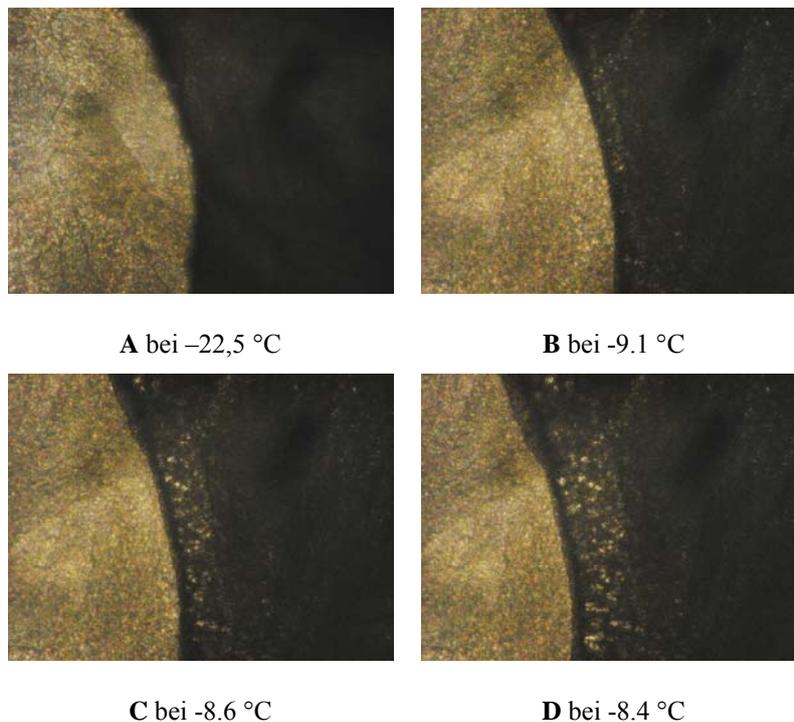
Tempern ausreichend war, um die beim Einfrieren amorph gebliebenen Anteilen zu rekrisallisieren und um die  $T_g'$  zu erhöhen. Die Glasübergangstemperaturen von allen Formulierungen nach und ohne Tempern werden in der Tab. 6-8 und Abb. 6-34 dargestellt.

**Tab. 6-8:** Glasübergangstemperatur jeder Formulierung (vgl. Tab. 6-7) nach und ohne Tempern

	A	B	C	D
$T_g'$ (1) bei 10 K/min (n=2)	-34,3	-36,65	-37,18	-37,17
$T_g'$ (2) bei 10 K/min (n=2)	-29,1	-28,48	-29,53	-29,02
$T_g'$ nach dem Tempern bei 10 K/min	-14,61	-13,34	-16,31	-14,47

### 6.3.2.1.2 Die Kollapstemperatur

Für die Bestimmung der Kollapstemperatur wird die Probe bis  $-50\text{ °C}$  abgekühlt. Nach 5 Minuten Äquilibration wird die Temperatur zuerst mit 2 K/min bis  $-40\text{ °C}$  erhöht, anschließend beträgt die Heizrate bis zum Überschreiten der Kollapstemperatur 1 K/min. In Abb. 6-33 (A-D) ist die Entwicklung von Löchern in der Sublimationsfront mit Erhöhung der Temperatur in der Formulierung B als Beispiel erkennbar.

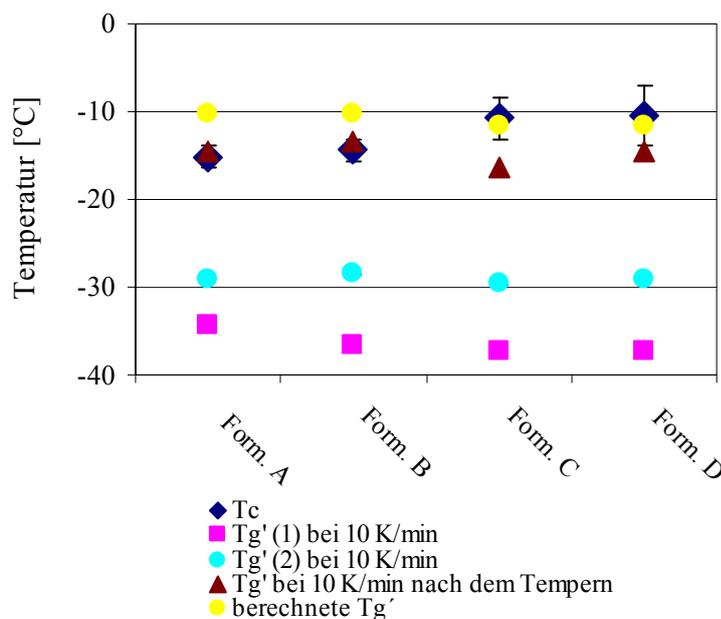


**Abb. 6-33 (A-D):** Entwicklung von Löchern in der Sublimationsfront bei der Temperaturerhöhung

Wie aus Abb. 6-34 und 9.2.5.1 ersichtlich ist, zeigen die Formulierungen C und D höhere  $T_c$  als die beiden anderen Formulierungen. Grund dafür könnte der Anteil von ungelöstem Midazolam-HCl bei pH~ 5 sein.

### 6.3.2.1.3 Zusammenfassung des Einfrierverhaltens

Der Einfluss des Gelatine-Typs auf das Einfrierverhalten der Formulierungen ist vernachlässigbar. Außer dem Anstieg in der  $T_c$  zeigen die Formulierungen mit höherem pH keinen signifikanten Unterschied. Bei der Berechnung der  $T_g'$  nach der Fox-Gleichung wurden metastabile Substanzen wie Mannitol nicht berücksichtigt. Die berechnete  $T_g'$  liegt höher als die mit DSC ermittelte  $T_g'$  der Formulierung nach dem Tempern. (Die  $T_g'$  des Pfefferminz-Aromas beträgt  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ , für  $T_g'$  der anderen Bestandteile siehe Tab. 6-5)



**Abb. 6-34:**  $T_c$ ,  $T_g'$  ohne und nach dem Tempern bei der Heizrate 10 K/min sowie die berechnete  $T_g'$  nach Fox

### 6.3.2.1.4 Herstellung der Lyophilisate

Die Herstellung der Lyophilisate wird in Blistern nach dem beschriebenen Programm (Tab. 5-3.) durchgeführt. Die Herstellung im Blister sollte die Handhabung der Tabletten ohne deren Beschädigung ermöglichen. Obwohl ein großer Unterschied in den Behältnissen besteht (Blister im Vergleich zu den Vials mit Stopfen) und sich demzufolge die

Wärmetransportparameter unterscheiden, werden manche Prozessparameter wie Druck und Temperatur nach [53] reguliert. Es wird jeweils 1 ml Lösung direkt in die Nöpfchen (Höhe von ~0,5 mm) pipettiert. Die Blister werden auf ein Gitter gelegt und dieses schnell in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Danach werden die Blister auf eine auf -40 °C vorgekühlte Stellfläche gestellt.

Der Temperatur-Zeit-Verlauf in Abb. 6-35 zeigt, dass die Einstellungen der Prozessparameter für die Herstellung im Blister verwendet werden können. Die Produkttemperatur erreicht die Stellflächentemperatur in ca. 12 Stunden, was das Ende der Haupttrocknung anzeigt.

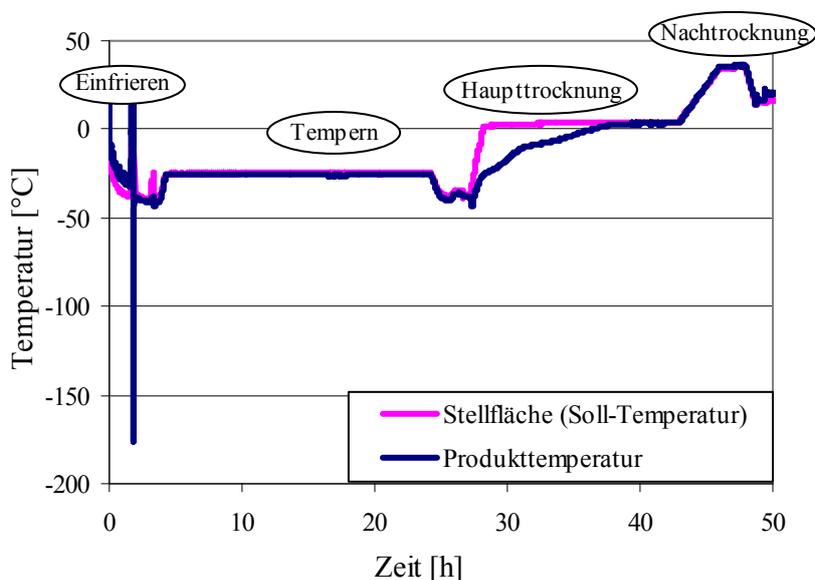


Abb. 6-35: Temperatur-Zeit-Verlauf während der Gefriertrocknung im Blister

### 6.3.2.2 Charakterisierung der Lyophilisate

#### 6.3.2.2.1 Kristallinität

Die XRD-Aufnahme in der Abb. 6-36 stellen die Kristallstrukturen der gefriergetrockneten Formulierungen und einem Placebo (hier Form. A) dar. Die Beugungsbilder sind identisch und zeigen die metastabile  $\delta$ -Modifikation von Mannitol [66]. Die Röntgendiffraktogramme zeigen erneut, dass der verwendete Gelatine-Typ keinen Einfluss auf die Kristallstruktur der untersuchten Lyophilisate hat. Obwohl Midazolam-HCl in den Formulierungen C und D nicht völlig gelöst ist, konnten in dem getrockneten Endprodukt keine Hinweise auf Kristalle beobachtet werden.

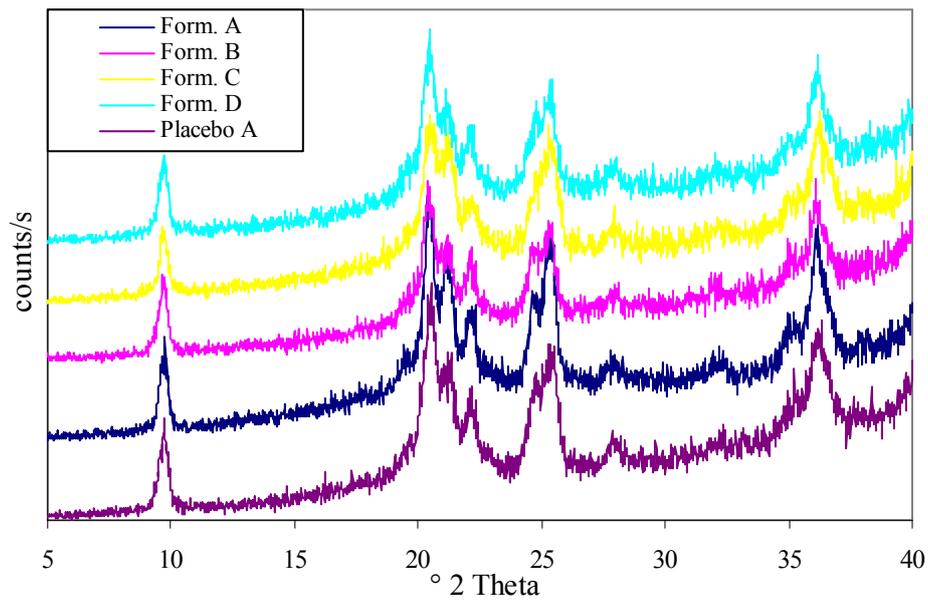


Abb. 6-36: Röntgen-Aufnahme von den Form. A, B, C, D und Placebo von A

### 6.3.2.2.2 Feuchtigkeitsgehalt

Der Feuchtigkeitsgehalt in den Formulierungen liegt zwischen 1% und 2%. Abb. 6-37 gibt keinen Hinweis auf einen signifikanten Unterschied zwischen den Formulierungen. Dies lässt darauf schließen, dass der Gelatine-Typ wiederum keine Auswirkung auf das Endprodukt hat.

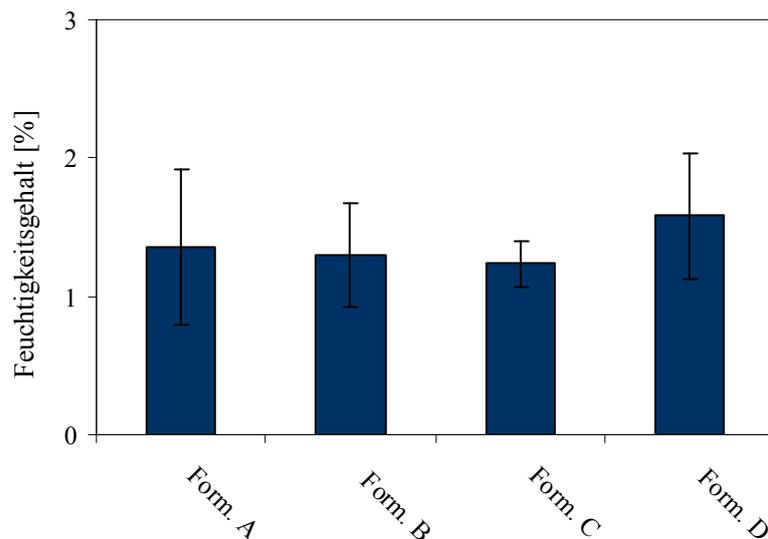
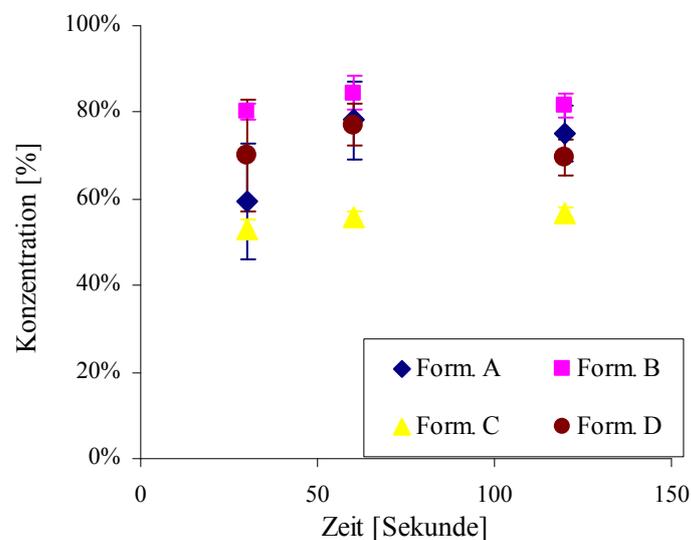


Abb. 6-37: Relative Feuchte der Lyophilisate A, B, C und D (vgl. Tab. 6-7) (n=3)

### 6.3.2.2.3 Die Auflösegeschwindigkeit

Es wird jeweils eine Tablette dem Blister entnommen und in eine 10 ml Glasflasche gegeben. Anschließend werden 5 ml demineralisiertes Wasser hinzugefügt. Die Auflösung war mit Schaumbildung verbunden, und einige Bruchteile sammelten sich am Rand. In den Formulierungen B und D war dieses Verhalten weniger ausgeprägt. In den Glasflaschen mit Tabletten der Formulierung C und D entstand schnell ein Bodensatz. Dies kann auf die Ausfällung des Midazolam-HCl<sub>s</sub> aufgrund des hohen pH-Wertes zurückgeführt werden. Die Konzentration des Wirkstoffes wird dann bei der Wellenlänge von 220 nm am UV nach 30, 60, und 120 Sekunden nach einer Filtration bestimmt. Die Untersuchung des verfügbaren Midazolam-HCl ergibt, wie in Abb. 6-38 dargestellt, eine Bestätigung für die visuelle Beobachtung. Die Formulierung B zeigt eine bessere Auflösegeschwindigkeit als A, und die Formulierung D besser als C, was darauf schließen lässt, dass die Gelatine mit der niedrigen Bloom-Zahl für die Auflösegeschwindigkeit von Vorteil ist, ohne weitere physikalische Eigenschaften zu benachteiligen. In der Literatur wird ebenfalls über den Einfluss der Gelatine mit niedriger Bloom-Zahl auf die Verbesserung der Zerfallszeit berichtet. Einen negativen Einfluss auf die Bruchfestigkeit der Lyophilisate wird jedoch nicht beobachtet [100].

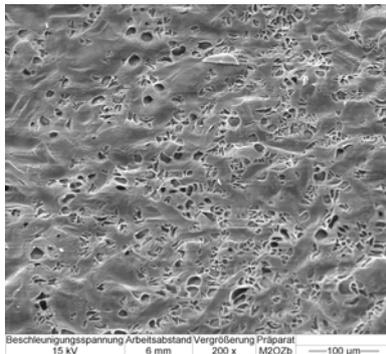
Auf der anderen Seite zeigen die Formulierungen mit höherem pH weniger verfügbares Midazolam. Das stimmt mit der Freisetzungsuntersuchung von Odou [115] überein, bei der die Formulierung ohne Zitronensäure viel weniger gelöstes Midazolam im Vergleich zu anderen Formulierungen mit höherem Zitronensäureanteil gezeigt hat.



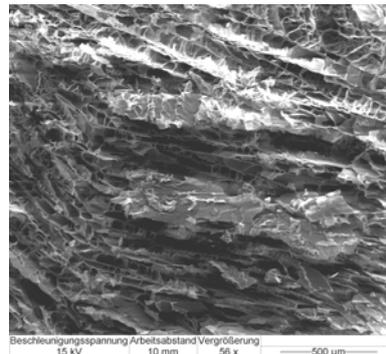
**Abb. 6-38:** Verfügbares Midazolam nach 30, 60, und 120 Sekunden nach der Wasserzugabe

### 6.3.2.2.4 Makro- und mikroskopische Eigenschaften

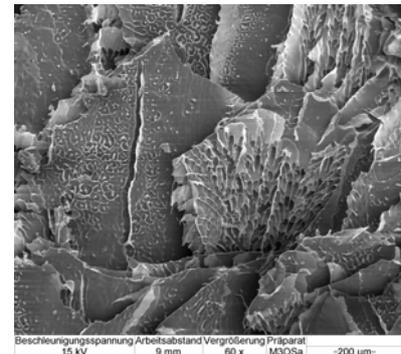
Oberflächencracks waren in dem Endprodukt dieser Versuchsreihe teilweise ausgeprägt. Die Produktmorphologie aller Formulierungen zeigt wegen des schnellen Einfrierens [117] eine inhomogene Kuchenstruktur. Wie die Abb. 6-40 und Abb. 6-41 zeigen, kamen sowohl gerichtete als auch gekrümmte Kanäle vor. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen aller Formulierungen zeigen eine poröse Oberfläche (Abb. 6-39). Laut REM-Bilder sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Formulierungen zu erkennen.



**Abb. 6-39:** REM- Aufnahme der Form. D (Oberfläche-Zentrum), Mikroskop- Vergrößerung 200x



**Abb. 6-40:** REM- Aufnahme der Form. A (Bruchkante am Rand), Mikroskop- Vergrößerung 56x



**Abb. 6-41:** REM-Aufnahme der Form. D (Bruchkante in der Mitte), Mikroskop- Vergrößerung 60x

## 6.4 Entwicklung der Tabletten

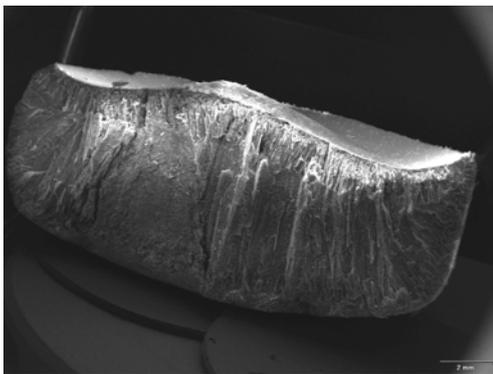
In den vorherigen Ergebnissen wurde festgestellt, dass die Gelatintypen keinen Einfluss auf das Einfrierverhalten der Formulierung, die Kristallinität, den Wassergehalt, die makro- und mikroskopische Erscheinung hat. Allerdings ist eine deutliche Verbesserung der Auflösengeschwindigkeit der Formulierungen mit einer niedrigbloomigen Gelatine zu erkennen. Der höhere pH-Wert hat eine Sedimentation des Midazolam-HCl nach der Auflösung des Lyophilisats verursacht. Daher wird in den nächsten Schritten nur die Formulierung B weiter untersucht.

In diesem Abschnitt werden die Tabletten am Christ-LDC-1M hergestellt und überprüft, ob sie den Anforderungen des Arzneibuchs für feste orale Darreichungsformen entsprechen.

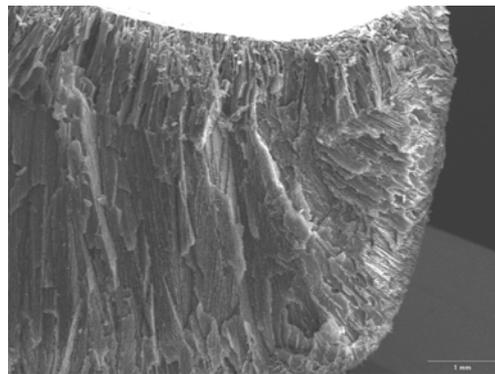
Die Herstellung erfolgt nach dem bisherigen Programm (siehe Tab. 5-3) was die Temperatur- und Druck-Einstellung bei der Trocknung betrifft, allerdings begrenzen die Eigenschaften der Christ-Anlage ALPHA 1-4 manche Schritte. Das Tempern wird anstatt auf der Gerätestellfläche in einem Gefrierschrank bei ca.  $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  für 20 Stunden durchgeführt.

Um die Stellflächentemperatur bei +5 °C zu halten, wird die Haupttrocknung nach dem Verfahren A [118] durchgeführt, in dem die Stellfläche in den Kondensatorraum gelegt wird. Die Erhöhung der Temperatur erfolgt manuell um 1 K/5 min bis auf +40 °C, bei der dann die Sekundärtrocknung durchgeführt wurden.

Es wurden einige Vorversuche durchgeführt, um ein optimales Einfrieren zu gewährleisten und so Oberflächencracks vermeiden zu können. Die Blister werden daher auf das Gitter gelegt und langsam in flüssigen Stickstoff getaucht, so dass möglichst nur der Blisterboden in Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff kommt. Erst dann werden sie ganz eingetaucht. Dieses schrittweise Einfrieren ermöglicht die Bildung von vertikalen Kanälen (Abb. 6-42, Abb. 6-43), was den Transport von Wassermolekülen erleichtert. Dadurch ist eine Stressverminderung im Kuchen bei der Haupttrocknung im Vergleich zu der vorherigen Einfrieremethode zu erwarten (vgl. Abb. 6-27).



**Abb. 6-42:** REM-Aufnahme. (Bruchkante), Mikroskop- Vergrößerung 7,5x



**Abb. 6-43:** REM-Aufnahme. (Bruchkante, Mitte) Mikroskop- Vergrößerung 20x

### 6.4.1 Endprüfung der Tabletten

Bei den Qualitätsmerkmalen eines Arzneimittels wird zwischen zwei verschiedenen Gruppen unterschieden. Die erste Gruppe umfasst die patientenbezogenen Qualitätsparameter, die für den Therapieerfolg wichtig sind wie z.B. die Einheitlichkeit und Genauigkeit der Dosierung innerhalb einer Charge und zwischen den Chargen. Die zweite Gruppe umfasst technische Qualitätsparameter, welche die Eigenschaften der Arzneiformen bei der Herstellung beschreiben wie z.B. die Härte einer Tablette oder ihre Zerfallszeit [90].

Der größte Teil der Endkontrolluntersuchung von Lyophilisaten beschränkt sich auf die Untersuchung des Wirkstoffgehalts, der Zerfallszeit und der Wirkstofffreisetzung dieses Systems.

#### 6.4.1.1 Gleichförmigkeit der Tabletten

Wie oben beschrieben, ist die Einheitlichkeit und Genauigkeit der Dosierung eine der wichtigsten Tabletteneigenschaften. Um die Gleichförmigkeit des Wirkstoffgehaltes der Tabletten sicherzustellen, sollte jede Tablette einer Charge einen Wirkstoffgehalt aufweisen, der innerhalb eines engen, vom Arzneibuch festgelegten Bereichs liegt.

In der Ph. Eur. 6.0/2.09.06 wird für die Bestimmung der Gleichförmigkeit des Gehalts einzeldosierter Arzneiformen die Untersuchung von 10 Einheiten gefordert. In dieser Arbeit wird die Midazolamkonzentration wegen der Chargengröße (maximal 55 Tabletten) nur an 3 Tabletten pro Charge (Chargenanzahl = 5) mit UV-Messung ermittelt. Wie aus Tab. 6-9 ersichtlich ist, liegt der Wirkstoffgehalt innerhalb der von der Ph. Eur. zugelassenen Grenzen (zwischen 85% und 115%).

Laut der statistischen Auswertung nach Scheffé wird zwischen den Chargen kein signifikanter Unterschied festgestellt (siehe 9.3.1).

**Tab. 6-9:** Wirkstoffgehalt der Lyophilisate (n=3)

Charge	A	B	D	E	F
Konzentration $\bar{X}$ [%]	93,41	94,93	90,74	95,16	92,28
sdv [%]	2,14	3,52	1,69	2,12	0,61
rel. sdv [%]	2,29	3,71	1,86	2,23	0,66

#### 6.4.1.2 Zerfallszeit

Die Zerfallszeit ist das wichtigste Kriterium bei der Entwicklung eines Lyophilisats. In der Literatur werden verschiedene Methoden zu deren exakter Bestimmung beschrieben [119], wie beispielsweise mit einem Texture Analyser. Das Europäische Arzneibuch führt in seinem achten Nachtrag der fünften Ausgabe das erste Mal eine Methode zur Bestimmung der Zerfallszeit eines Lyophilisats auf. Dort heißt es: „Ein Lyophilisat zum Einnehmen wird in ein Becherglas mit 200 ml Wasser R von 15 bis 25 °C gegeben und muss innerhalb von 3 min

zerfallen“ [120]. Ein bestimmtes Kriterium für den erfolgten Zerfall wird allerdings nicht festgelegt. Deshalb wird für diese Arbeit festgelegt, dass keine Bruchteile mehr sichtbar sein dürfen. Aufgrund der Chargengröße wird die Untersuchung nur auf 3 Tabletten von den 5 hergestellten Chargen beschränkt. Trotz der strengen Maßstäbe bei der Bestimmung der Zerfallszeit zeigen die Tabletten einen Zerfall, der den Vorgaben des Europäischen Arzneibuches entspricht. Die Zerfallszeit liegt unter 1 Minute, vgl. Tab. 6-10. Die Chargen haben laut der statistischen Untersuchung nach Scheffé keinen signifikanten Unterschied gezeigt (siehe 9.3.3).

**Tab. 6-10:** Zerfallszeit der Lyophilisate nach Ph. Eur (n=15; 3 Tabletten, 5 Chargen)

Zerfallszeit [Sekunden]	49,20
sdv [Sekunden]	18,83
rel. sdv [%]	38,27

### 6.4.1.3 Wirkstofffreisetzung

Die Freisetzung eines Wirkstoffs aus einer Darreichungsform spiegelt sowohl den physikalisch-chemischen Zustand der Darreichungsform als auch ihre Eigenschaften bei Kontakt mit dem Freisetzungsmedium wider. Mit Hilfe von Untersuchungen der Freisetzung gelingt daher nicht nur die Charakterisierung der Art der Verteilung des Arzneistoffs im Träger, sondern auch die Abschätzung des Einflusses der Darreichungsform auf die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes.

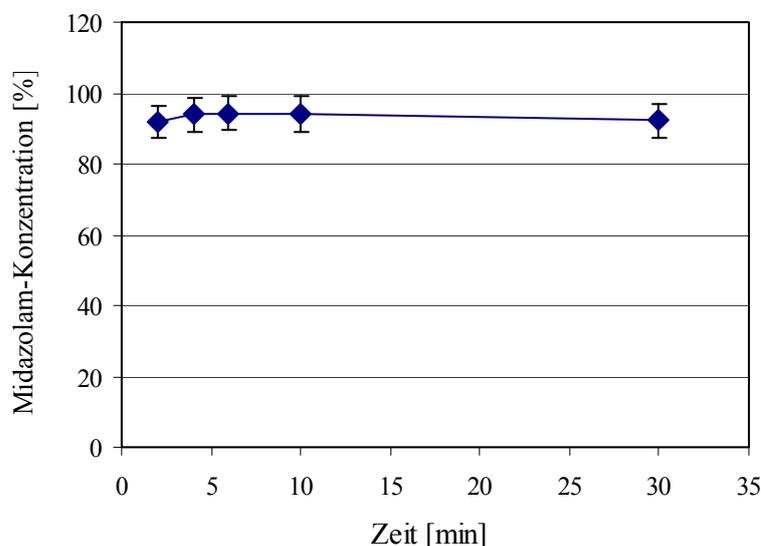
Generell ist eine genaue Aussage über die Wirkstofffreisetzung aus Darreichungsformen, die in der Mundhöhle zerfallen wie Lyophilisate, Bukkaltabletten und Kautabletten, nicht einfach mit der konventionellen Freisetzungsmethode zu treffen [121]. Grund dafür ist, dass diese Darreichungsformen andere Anforderungen an die Auflösung im Vergleich zu herkömmlichen oralen Tabletten haben. Das Auflösevolumen und die Aufenthaltszeit sind jeweils unterschiedlich. Loftsson [122] zeigt, wie die Änderung der Darreichungsform eines Stoffes zur Änderung der Einteilung in das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (BCS) führen kann. In der typischen Klassifikation der konventionellen oralen Tabletten beruht die Berechnung der Löslichkeit einer Substanz auf dem Magensaftvolumen (250 ml). Wird eine Substanz, die der Klasse I zugeordnet wird, zur nasalen, vaginalen oder bukkalen Applikation verwendet, nimmt die Löslichkeit stark ab und die Substanz wird so zur Klasse II

gehören. Ursache ist die Erniedrigung des Mediumsvolumens auf ca. 5 ml wie beim Speichel oder sogar auf nur 0,3 ml wie bei der nasalen Applikation.

Andere Forschungsgruppen [123] befassen sich mit der Entwicklung einer Methode, um einen möglichst engen Zusammenhang zwischen in Vivo- und in Vitro-Freisetzung für diese Darreichungsformen zu erreichen.

Bis heute führen die USP und die Ph. Eur. allerdings keine Alternative zur konventionellen Methode auf. Einen Hinweis auf die Midazolam-HCl Freisetzung aus einer oralen Arzneiform gibt es auch nicht. Nach den Richtlinien der Federation International Pharmaceutique (FIP) und American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) [124] sollte die Auflösungsuntersuchung der ODT (Orally disintegrating Tablets) nach den Grundsätzen der festen oralen Darreichungsformen (Tabletten) erfolgen. Es wird die Blattrührerapparatur (Apparatur 2) nach Ph. Eur. 06/2.09.03 mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 50 UPM empfohlen.

Die Abb. 6-44 zeigt das Freisetzungverhalten von vier verschiedenen Chargen, jeweils aus 6 Tabletten. Ca. 85% des Wirkstoffes sind bereits nach den ersten zwei Minuten freigesetzt.



**Abb. 6-44:** Wirkstofffreisetzung des Midazolam-HCl aus den Lyophilisaten nach 2, 4, 6, 10 und 30 Minuten (n= 24; 6 Tabletten, 4 Charge)

#### 6.4.1.4 Geschmacksuntersuchung

Aufgrund des bitteren Geschmacks des Midazolams stellt die Überdeckung des Geschmacks einen erforderlichen Schritt bei der Entwicklung des Lyophilisats dar.

Die primären Methoden der Geschmacksmaskierung sind die Mikroverkapselung des Wirkstoffes, seine Adsorption oder Komplexbildung mit dem Träger und spray coating von Partikelteilchen. Allerdings sind diese Methoden immer mit großem Aufwand und Einfluss auf die Freisetzung des Wirkstoffs verbunden. In dieser Arbeit wird die einfachste Methode, das Einsetzen eines Aromastoffs, verwendet, um den Einfluss auf die Absorption des Wirkstoffs in der Mundhöhle auszuschließen. Die Überdeckung eines bitteren Geschmacks ist eine schwierige Aufgabe. Meistens reicht ein angenehmes Aroma nicht aus, um eine befriedigende Überdeckung zu erreichen. Sondern es müssen die anderen drei Geschmackstypen (salzig, süß und sauer) durch die Zugabe weiterer Zusatzstoffen wie (Kochsalz, Zucker) harmonisch ausgeglichen werden [125]. Die Bitterkeit ist ein lang anhaltender Geschmack. Deshalb ist die Verwendung von Süßstoffen mit längeren zeitlichen Profilen (z.B. Aspartam) erfolgreicher als die von schnell und kurzfristig wirkende Süßstoffen wie Saccharin [126]. Von den zahlreichen Möglichkeiten der Geschmackskorrektur hat sich das Pfefferminzaroma zusammen mit seinem Hauptbestandteil Menthol besonders bewährt. Dieses hat zudem eine deutliche Kühlwirkung. Bei höheren Dosierungen kann Pfefferminz sogar die Geschmacksnerven bis zu einem gewissen Grad betäuben, was zusätzlich zur Überdeckung des bitteren Geschmacks beitragen kann.

Bei der Dosierung des Aromas in der Formulierung werden die Angaben der Herstellerfirma Symrise® [127] für die zugelassene Menge von Pulegone in dem Endprodukt beachtet.

Eine Bitterwertsbestimmung mit 6 Probanden wird nach der Ph.Eur 6/2.08.15 [128] durchgeführt. Der Bitterwert wird in der Quelle mit dem reziproken Wert jener Verdünnung einer Flüssigkeit oder eines Extrakts, die noch eben bitter schmeckt, definiert. Zum Vergleich wird Chininhydrochlorid, dessen Bitterwert mit 200 000 festgesetzt wird, verwendet. Die Ergebnisse in Tab. 6-11 zeigen trotz der Aromatisierung die Empfindung des bitteren Geschmacks des Lyophilisates. Andere Maßnahmen wie Mikroverkapselung oder Komplexbildung wären guten Alternativen, allerdings muss beachtet werden, dass die Absorption in der Mundhöhle nicht verzögert werden darf.

**Tab. 6-11:** Bitterwert des Lyophilisates

Person	1	2	3	4	5	6	$\bar{X} \pm s_{dv}$
<b>Bitterwert</b>	360000	333333,33	77333,33	380000	125000	100000	<b>229277,77±</b> 135718,13

## 6.5 Stabilitätsuntersuchungen

In der Entwicklung von Fertigarzneimitteln ist die Stabilität der Formulierungen ein wichtiges Merkmal für die Pharmazeutische Qualität. Ein pharmazeutisches Präparat wird dann als stabil bezeichnet, wenn sich seine wichtigen Eigenschaften eine angemessene Zeit nicht oder lediglich in einem zulässigen Ausmaß verändern. Um den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen in den verschiedenen Ländern der Erde gerecht zu werden, wurden diese in vier verschiedene Klimazonen mit definierter Temperatur und Feuchtigkeit eingeteilt (Tab. 6-12).

**Tab. 6-12:** Lagerungsbedingungen für Stabilitätsuntersuchungen am Fertigarzneimittel in den vier Klimazonen und für ICH-Stabilitätsuntersuchungen

Lagerbedingung für die Klimazonen			Lagerbedingungen für Fertigarzneimittel nach ICH Q1A		
Klimazone	Temperatur	Luftfeuchtigkeit		Temperatur	Luftfeuchtigkeit
I gemäßigt	21 °C	45%	Langzeit	25±2 °C	60±5%
II subtropisch	25 °C	60%	Intermediate	30±2 °C	60±5%
III trocken-heiß	30 °C	35%			
IV feucht-heiß	30 °C	70%	Beschleunigung	40±2 °C	75±5%

Für die Zulassung eines neuen Arzneimittels sind in Europa Stabilitätsdaten nach Lagerung unter den Lagerungsbedingungen der Klimazone II (normale Bedingung 25 °C, 60 % r. F.) über mindestens 12 Monate vorzulegen. Allerdings werden in dieser Arbeit die Stabilitätsuntersuchungen auf 6 Monate beschränkt, weil es sich nur um die Herstellung von Klinik-Präparaten handelt. Für die Stressbedingungen fordert die ICH-Richtlinie Stabilitätsuntersuchungen über 6 Monate. Die Empfindlichkeit der Lyophilisate gegen Feuchtigkeit hat, wie die nächsten Kapitel zeigen, diese Untersuchung sehr beschränkt.

Die Tabletten werden, wie im Kapitel 6.4 ausführlich erläutert, hergestellt und in einer Glov-Bag unter einer relativen Feuchtigkeit von weniger als 15% in das Endbehältnis verpackt. Vier verschiedene Chargen (B, D, E, F) werden hergestellt. Die erste Charge (B) wird gleich nach der Herstellung in zwei Teile geteilt und jeweils in eine gut verschlossene Glasflasche gefüllt. Die Flaschen werden unter normalen und unter Stressbedingungen gelagert. Die anderen 3 Chargen (D, E, F) werden in PVC-Blister verpackt und nur unter normalen Bedingungen gelagert. Es erfolgte keine Lagerung für die Tabletten im Blister unter

Stressbedingungen, weil die Vorversuche nicht erfolgreich waren. Die physikalischen und chemischen Änderungen der Tabletten werden gleich nach der Herstellung sowie nach 4, 12 und 24 Wochen vermessen.

### 6.5.1 Makro- und mikroskopische Beobachtungen

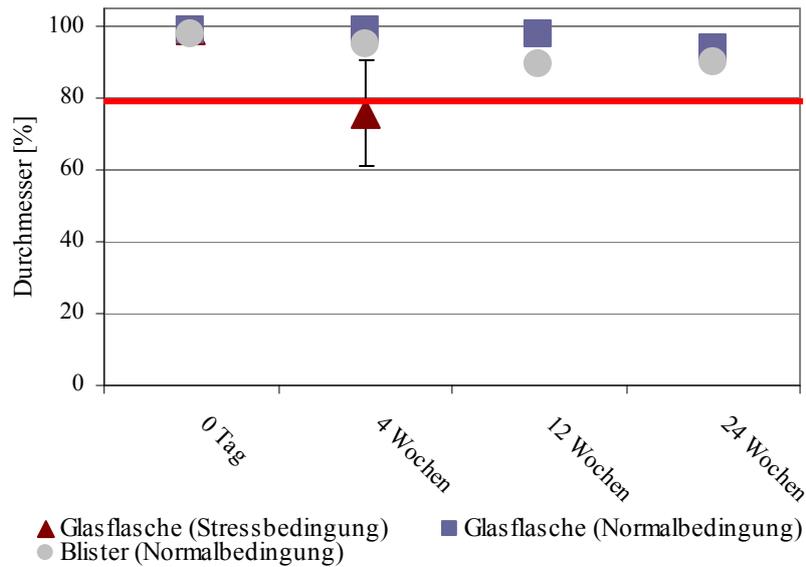
Das Aussehen der Tabletten ist ein wichtiges Prüfkriterium, um eine schnelle Aussage über die Stabilität der Zubereitung zu treffen. Durch die Messung des Durchmessers konnte die Änderung des Aussehens mit der Zeit beurteilt werden. Eine Abnahme von mehr als 20% ist nicht akzeptabel [20].



**Abb. 6-45:** Schrumpfen des Lyophilisat-Durchmessers während der Lagerung unter Stressbedingungen im Lauf der Zeit

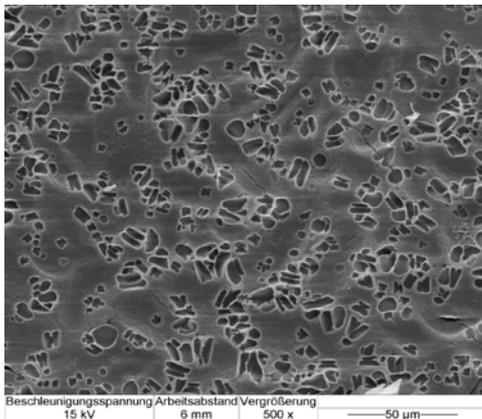
Die Abb. 6-45 und Abb. 6-46 zeigen eine deutliche Abnahme des Durchmessers der Tabletten, die in einer Glasflasche unter Stressbedingungen gelagert wurden (n=15). Sie unterschreiten die zugelassene Grenze und sind ab diesem Datum nicht mehr untersuchbar. Die Abnahme des Durchmessers während der Lagerung bei normalen Bedingungen (n=3) liegt im Bereich von 5-10% und ist in den Blistern (n=3 Tabletten, 3 Chargen) etwas stärker ausgeprägt als in der Glasflasche.

Ein Zusammenhang zwischen der Abnahme des Durchmessers und der Zerfallszeit ist nicht erkennbar. Andere Versuche (nicht gezeigt) haben jedoch zu einer deutlichen Verlängerung der Zerfallszeit geführt, wenn die Abnahme des Durchmessers mehr als 20% betragen hat.

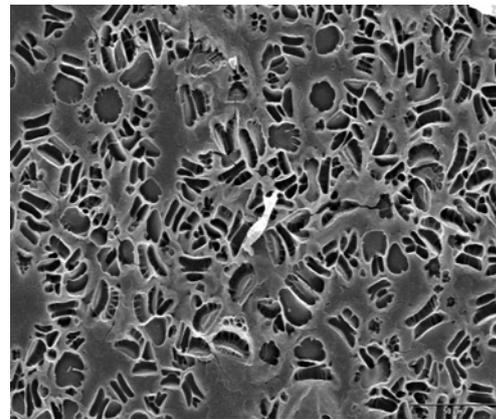


**Abb. 6-46:** Änderung des Durchmessers des Lyophilisats während der Lagerung unter Normal- und Stressbedingung

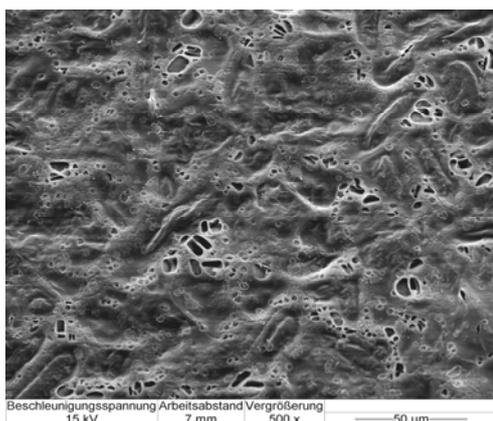
Mikroskopische Untersuchungen ergänzen diese vorherigen Beobachtungen. Das Schrumpfen der Tabletten in der Glasflasche bei Stressbedingung ist auch auf den REM-Bildern (Abb. 6-50) anhand einer wellenartigen Struktur zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigen die Tabletten in der Glasflasche unter normalen Bedingungen keine Änderung (Abb. 6-48). Die Tabletten in den Blistern besitzen zum Teil ebenfalls eine wellenartige Struktur (Abb. 6-49).



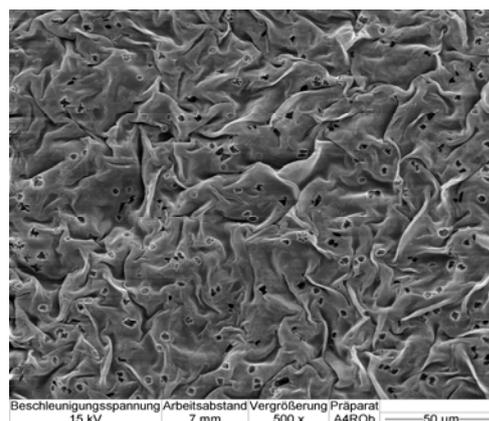
**Abb. 6-47:** REM-Aufnahme von Charge D 2 Tage nach der Herstellung/ Oberfläche, Mikroskop-Vergrößerung 500x



**Abb. 6-48:** REM-Aufnahme von Charge B nach 24 Wochen in Glasflasche bei normalen Bedingungen /Oberfläche, Mikroskop-Vergrößerung 500x



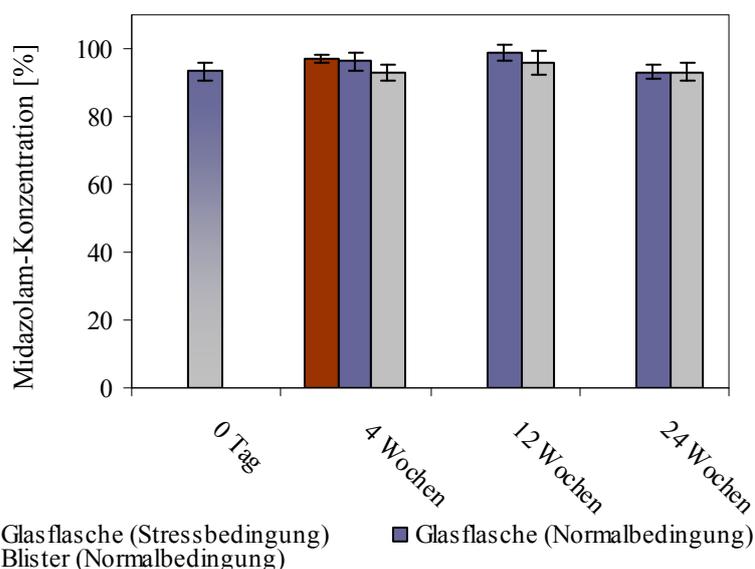
**Abb. 6-49:** REM-Aufnahme von Charge D nach 12 Wochen im Blister bei normaler Bedingung/ Oberfläche Mikroskop-Vergrößerung 500x



**Abb. 6-50:** REM-Aufnahme Charge B nach 4 Wochen in Glasflasche bei Stressbedingung/ Oberfläche Mikroskop-Vergrößerung 500x

### 6.5.2 Wirkstoffgehalt

Arzneimittel stellen oft keine thermodynamisch stabilen Systeme dar. Durch physikalische oder chemische Veränderungen kann es, z. B. bei Lagerung unter dem Einfluss von Temperatur und Feuchtigkeit, zu einer Abnahme des Wirkstoffgehaltes kommen. In dieser Versuchsreihe wird die Restmenge an unverändertem Wirkstoff mittels UV-Absorption bei 220 nm bestimmt. Die Gehaltsabnahme, die mittels UV-Messung bestimmt werden kann, wird statistisch nach Grimm [129] ermittelt. Es wird festgestellt, dass eine Abnahme von mehr als 5,5% der Midazolamkonzentration bestimmbar ist (siehe 9.2.6.2).



**Abb. 6-51:** Die Änderung der Wirkstoffkonzentration während der Lagerung unter Normal- und Stressbedingung

Abb. 6-51 zeigt unter den Stabilitätsbedingungen der Klimazone 2 für die in Blistern (n=9; 3 Tabletten, 3 Chargen) und Glasflaschen (n=3) gelagerten Tabletten keinen nachweisbaren Wirkstoffverlust (siehe die statistische Auswertung 9.3.2.). Die Tabletten in der Glasflasche (n=3) haben auch unter Stressbedingung keinen Wirkstoffverlust gezeigt, allerdings waren sie nach 4 Wochen nicht mehr untersuchbar (siehe Abb. 6-46).

### 6.5.3 Zerfallszeit

In dieser Versuchreihe wird überprüft, ob die Lagerbedingungen die Zerfallszeit der Tabletten negativ beeinflussen. Die Zerfallszeit der Tabletten zeigt keine signifikante Änderung nach 24 Wochen Lagerung (siehe die statistische Auswertung 9.3.4) und bleibt weit unter der Vorgabe des europäischen Arzneibuchs. Allerdings ist mit der Zeit eine Steigerung der Standardabweichung feststellbar. (Blister: n=9; 3 Tabletten, 3 Chargen; Glasflasche bei normaler Bedingung n=3, Glasflasche bei Stressbedingung n=3).

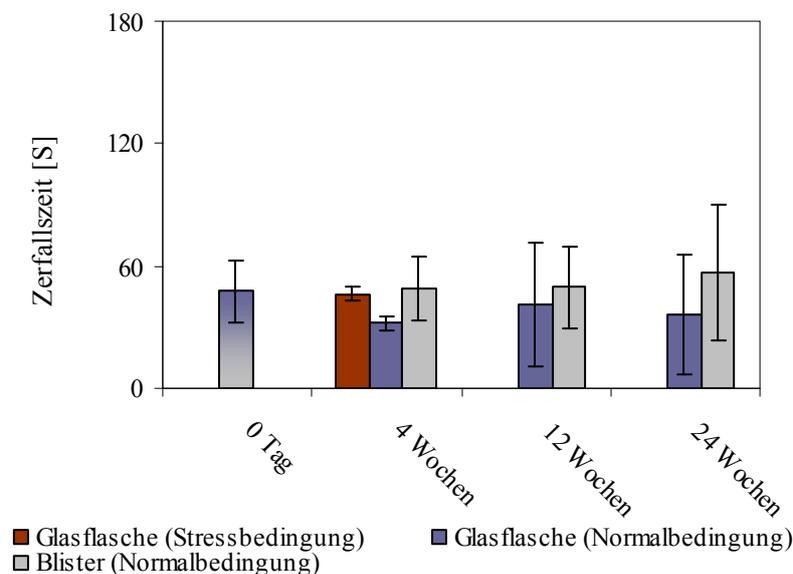
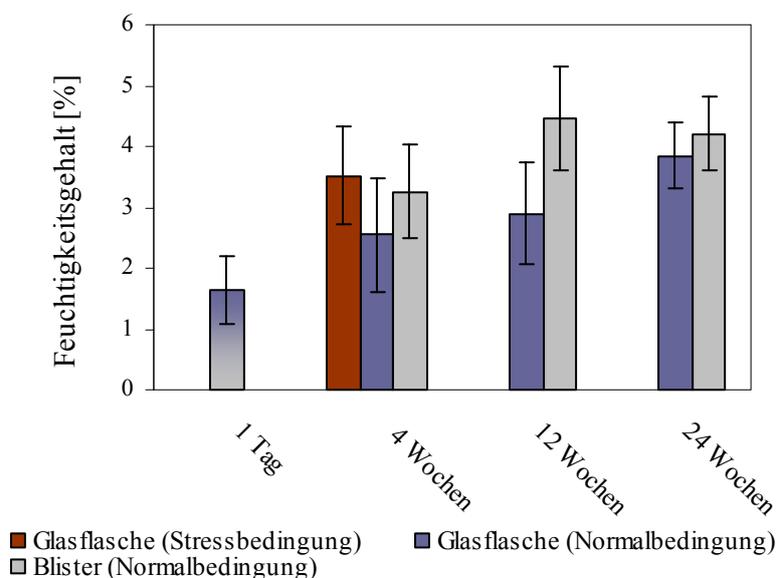


Abb. 6-52: Die Zerfallszeit der Tabletten während der Lagerung unter Normal- und Stressbedingung

### 6.5.4 Feuchtigkeitsgehalt

Die Wichtigkeit der Änderung des Feuchtigkeitsgehalts beruht auf ihrem Einfluss auf die  $T_g$  des gefriergetrockneten Kuchens. Eine Erhöhung des Wassergehalts führt zur Erniedrigung der  $T_g$  [130] und demzufolge zu eventuellem Schrumpfen oder Kollaps, wenn die  $T_g$  die Lagertemperatur unterschreitet. Wie aus Abb. 6-53 ersichtlich ist, steigt der relative

Feuchtigkeitsgehalt der Tabletten im Lauf der Lagerung sowohl in der Glasflasche als auch im Blister um etwa 2% (siehe 9.2.7.1). Die Steigerung im Blister (n=9; 3 Tabletten, 3 Chargen) ist ausgeprägter als in der Glasflasche (n=3) unter gleichen Bedingungen, was mit der Beobachtung des Durchmessers übereinstimmt. Die Standardabweichung zeigt wieder eine Zunahme im Verlauf der Zeit.



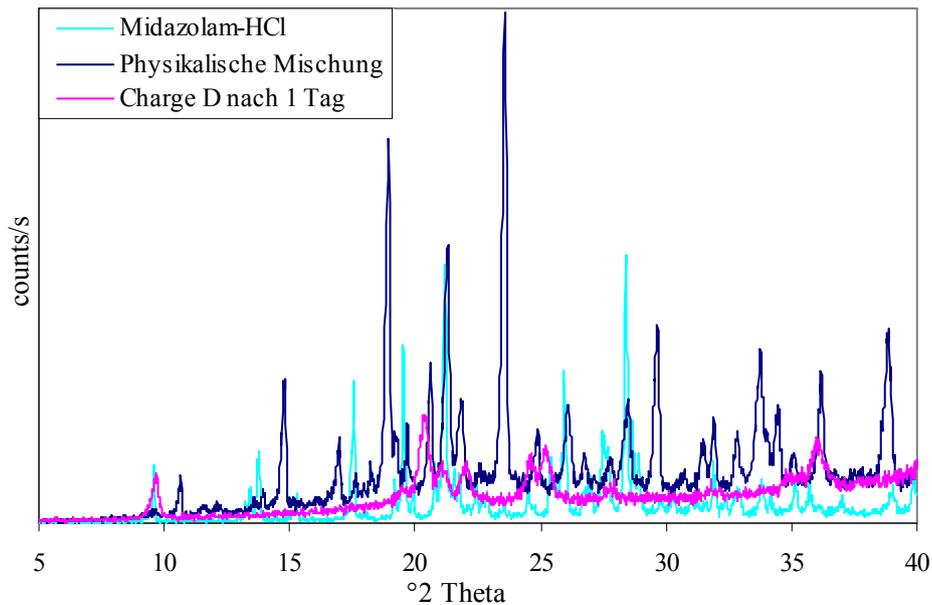
**Abb. 6-53\*\*** : Feuchtigkeitsgehalt der Lyophilisate während der Lagerung unter Normal- und Stressbedingung

### 6.5.5 Kristallinität

Der amorphe Zustand ist metastabil und zeigt wegen der höheren inneren Energie eine mehr oder weniger ausgeprägte Tendenz, in einen thermodynamisch stabileren Zustand überzugehen. Deshalb ist die Beobachtung der Wirkstoffpeaks in der Röntgenaufnahme sehr bedeutsam, um Änderungen im Wirkstoffzustand nachzuweisen.

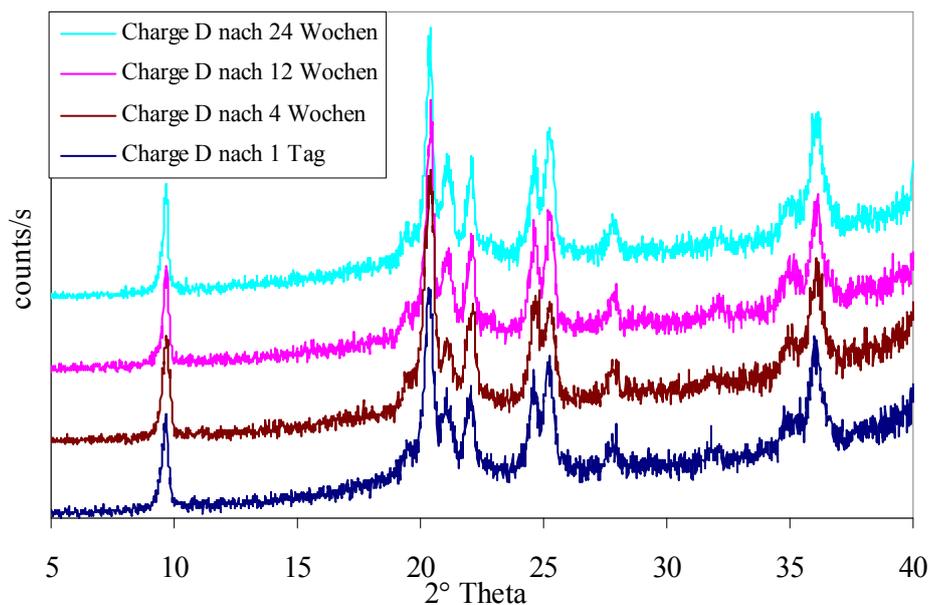
Eine Röntgenaufnahme des Lyophilisats nach der Herstellung zeigt die Änderung in der kristallinen Struktur im Vergleich zu der physikalischen Mischung der Formulierungsbestandteile. Bei der Gefriertrocknung wird die Kristallinität deutlich erniedrigt. Die Modifikation des Mannitols wandelt sich von einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form zu einer  $\delta$ -Form um. Alle anderen Peaks sind nicht mehr zu erkennen.

\*\* Für alle Messungen, die nach einem Tag nach der Herstellung durchgeführt wurde, wurden die Tabletten bei r. F. von weniger als 18% und R.T. ( $25 \pm 2$  °C) gelagert.



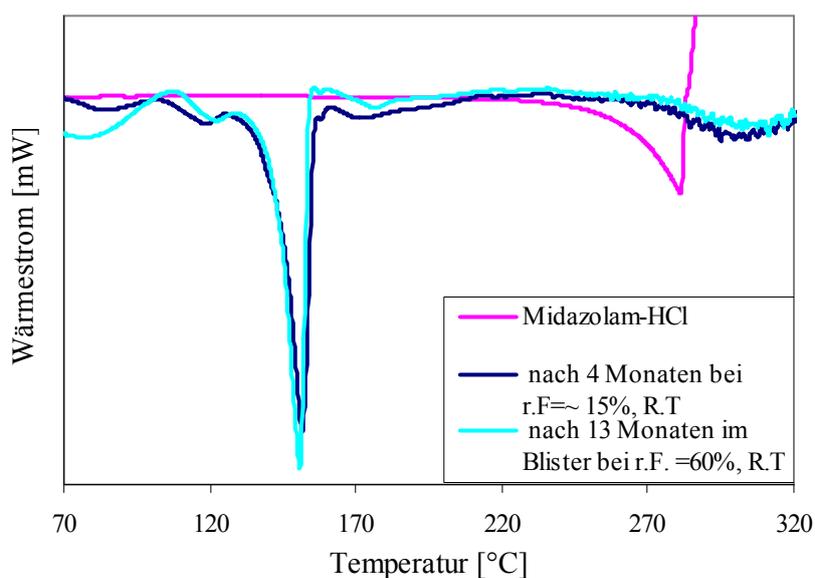
**Abb. 6-54\*\*:** Röntgenaufnahme von Midazolam-HCl, einer Tablette der Charge D ein Tag nach der Herstellung, und einer physikalischen Mischung der Formulierungsbestandteile

Sowohl die Tabletten in den Glasflaschen als auch die Tabletten in den Blistern zeigen innerhalb des Lagerungszeitraums von 24 Wochen keine erkennbaren Anzeichen einer Rekristallisation des Midazolam-HCl oder anderer Bestandteile. Die Abb. 6-55 zeigt als Beispiel die Röntgenaufnahme einer Charge, die im Blister unter normalen Bedingungen gelagert wurde.



**Abb. 6-55\*\*:** Röntgenaufnahme von Tabletten in Blister bei Normalbedingung im Verlauf der Zeit

Um weiter eine genaue Aussage über den Zustand des Midazolam-HCl<sub>s</sub> in dem Lyophilisat zu machen, wird der Midazolam-Schmelzpeak untersucht. Laut Literatur schmilzt Midazolam-HCl unter Zersetzung bei Temperaturen über 289 °C [131]. Dies ist bei der gemachten DSC-Untersuchung durch einen Schmelzpeak bei ca. 280 °C und einem folgenden scharfen Anstieg des Wärmestroms zu erkennen (Abb. 6-56). Das DSC-Thermogramm des Lyophilisats gibt keinen deutlichen Hinweis auf den Zustand des Midazolam-HCl<sub>s</sub>. Eine Änderung mit der Zeit ist allerdings nicht festzustellen.



**Abb. 6-56:** DSC-Thermogramm von Midazolam-HCl, Tablette in Glasflasche nach 4 Monaten Lagerung bei einer relativen Feuchtigkeit von ca. 15% und Raumtemperatur und eine Tablette im Blister nach 13 Monaten Lagerung bei einer relativen Feuchtigkeit von ca. 60% und Raumtemperatur

### 6.5.6 Die Glasübergangstemperatur

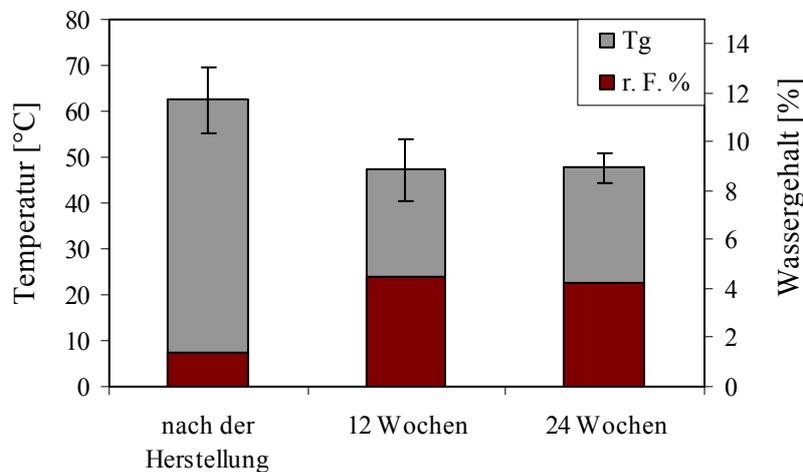
Während der Entwicklung der Lyophilisate ist die Ermittlung der Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) ein wichtiger Schritt.

Die untersuchten Lyophilisate zeigten nach der Lagerung über 24 Wochen im Blister eine Glasübergangstemperatur von ca. 47 °C (Tab. 6-13). Nach Wang [37] ist damit die Voraussetzung für eine langfristige Stabilität erfüllt.

**Tab. 6-13:**  $T_g$  der Tabletten im Blister

Charge	Anzahl der Tabletten	1 Tag nach der Herstellung**	12 Wochen	24 Woche
<b>D</b>	1	57,39	60,99	46,73
	2		44,23	43,76
<b>E</b>	1	59,37	45,81	44,49
	2		43,49	51,86
<b>F</b>	1	70,43	44,29	50,1
	2		44,94	49,38
<b><math>T_g</math> [°C]</b>		62,40±7,03	47,29±6,76	47,72±3,25

Direkt nach der Herstellung der Lyophilisate konnte die  $T_g$  nur bei einer Tablette pro Charge bestimmt werden. Deshalb kann keine genaue Aussage über einen Zusammenhang zwischen der  $T_g$  und dem Wassergehalt in den Lyophilisaten gemacht werden. Die erhaltenen Ergebnisse deuten allerdings auf eine Erniedrigung in der  $T_g$  um ca. 15 °C bei einer Zunahme des Wassergehaltes um 2,8% nach der 12-Wochen Lagerzeit (Abb. 6-57). Da sich der Wassergehalt zwischen der 12 und 24-wöchigen Lagerung nicht wesentlich geändert hat, ist auch keine signifikante Änderung in der  $T_g$  zu erwarten.

**Abb. 6-57:** Änderung der  $T_g$  und der relativen Feuchte der Tabletten (r.F.%) während der Lagerung im Blister unter normaler Bedingung

Die  $T_g$  der Lyophilisate ist das Resultat der  $T_g$  der Bestandteile, vgl. (Gl. 3-4). Deshalb wird die niedrige Glasübergangstemperatur der Tablette im Vergleich zur  $T_g$  der reinen Gelatine (mehr als 100 °C) nicht nur auf den Weichmachereffekt des Wassers, sondern auch auf den Effekt der anderen Hilfsstoffe zurückzuführen sein. In der Literatur wird oft über den

Weichmachereffekt des Polyols und dessen Konzentration auf die Erniedrigung der  $T_g$  der Gelatine berichtet [132].

### **6.5.7 Schlussfolgerung**

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die in dieser Arbeit hergestellten Lyophilisate zum Einnehmen über den untersuchten Zeitraum (6 Monaten) als stabil betrachtet werden können. Als Lagerungsbedingung muss eine Lagerung unterhalb von 25 °C und ein Schutz vor Feuchtigkeit beachtet werden.

## 7 Zusammenfassung

Aufgrund einer Bitte der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg zielte diese Arbeit darauf ab, eine neue Darreichungsform für Midazolam zu entwickeln. In der Anästhesie wird Midazolam häufig als Beruhigungsmittel vor operativen Eingriffen und zur Narkoseeinleitung eingesetzt. Die parenterale Darreichungsform stellt eine unangenehme Applikationsart dar. Sie ist meistens mit Angst und Unbehagen verbunden. Im Gegensatz dazu sind Tabletten ohne fremde Hilfe leicht zu applizieren. Sie sind allerdings mit einer schlechten Bioverfügbarkeit und einem Schluckproblem behaftet. Zudem ist eine Einnahme von Wasser erforderlich. Bei einer größeren Wassermenge könnte ein ungewollter Rückfluss von Mageninhalt während der Operation auftreten. Diese Komplikation ist eines der häufigsten Narkoseprobleme.

Schmelztabletten stellen eine Möglichkeit dar, diese Probleme zu umgehen. Sie zerfallen schnell im Mund ohne zusätzliche Wassergabe. Die wasserlöslichen Wirkstoffe gelangen über die Mundschleimhaut sofort ins Blut. Dadurch kann ein First-Pass-Effekt vermieden werden.

Unter den Schmelztabletten waren diejenigen Tabletten, die mittels Gefriertrocknung hergestellt werden, von besonderem Interesse.

Als erster Schritt in der Präformulierung wurden charakteristische Eigenschaften des Wirkstoffs untersucht. Hier wurden die Partikelgröße, das Röntgendiffraktogramm sowie der  $pK_a$ -Wert von Midazolam-HCl ermittelt. Die Partikel besitzen einen mittleren Durchmesser von  $81\ \mu\text{m}$  und zeigen unter dem Röntgendiffraktometer ein Spektrum mit scharfen Beugungspeaks bei  $2\theta = 21,1^\circ$  und  $28,4^\circ$ . Der  $pK_a$ -Wert von 6,23 stimmt mit Literaturangaben überein [95, 96].

Zusätzlich wurde die Kompatibilität zwischen Midazolam-HCl und einigen ausgewählten Hilfsstoffen untersucht. Die Bestimmung des Wirkstoffgehaltes mittels HPLC deutete auf eine Konzentrationsabnahme von ca. 8% nach 9 Wochen in einer Formulierung, die Midazolam-HCl, Gelatine A, Mannitol mit oder ohne Tween 80 enthielt, hin. In der Formulierung mit Midazolam-HCl, Gelatine A und Saccharose wurde keine Wirkstoffabnahme festgestellt.

Im Rahmen der Rezepturentwicklung wurde der Einfluss der Zusammensetzung der Formulierung auf die Eigenschaften der Lyophilisate eruiert. Gleichzeitig wurde der Prozess durch die Untersuchung des Einfrierverhaltens der Formulierung und die Bestimmung der notwendigen Parameter optimiert.

Die Rezeptur setzte sich aus Midazolam-HCl als Wirkstoff, einem Polymer (Gelatine) als festem Lösungsmittel, Mannitol als kristallinem Gerüstbildner und Zitronensäure für die Einstellung des pH-Werts zusammen.

Während der Prozessoptimierung wurde das Einfrieren mit flüssigem Stickstoff mit dem Einfrieren auf einer vorgekühlten Stellfläche verglichen. Die Einfriermethode mit flüssigem Stickstoff hat zwar Lyophilisate mit Rissen an der Oberfläche ergeben, aber die Auflösungsgeschwindigkeit war besser. Um Risse an der Oberfläche zu vermeiden und so ein elegantes Endprodukt zu erhalten, wurde in den weiteren Versuchen gezeigt, dass ein langsames Eintauchen (nur den Boden des Blisters) in flüssigen Stickstoff von Vorteil ist. Grund dafür ist die Ausbildung vertikaler Kanäle statt horizontaler wie beim schnellen Eintauchen, was den Transport des Wasserdampfs erleichtert.

Für die Einstellung der Prozessparameter wie Stellflächentemperatur, Druck und Zeit während der Haupt- und Nachtrocknung wurde zuerst die Produkttemperatur festgelegt. Dies erfolgte nach der Bestimmung der Kollapstemperatur ( $T_c$ ) der Formulierung und das Einhalten auf eine Sicherheitsspanne von ca. 3 °C. Mittels DSC wurde der Einfluss des Temperns auf die Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung ( $T_g'$ ) ermittelt. Ein effektives Tempern verursacht eine bedeutsame Erhöhung der  $T_g'$ , was auf die Wichtigkeit des Temperns in der Optimierung des Prozesses hindeutet.

Bemerkbar war der Unterschied zwischen den  $T_c$  und  $T_g'$  von ca. 22 °C, was den Unterschieden (3- 5 °C) in vielen Literaturangaben widerspricht [53]. Dieser Unterschied kann nicht nur auf die Zusammensetzung der Formulierung, sondern auch auf eine Rekristallisation der metastabilen Formulierungsanteile während der Messung mittels der FDM zurückgeführt werden. Dies wurde durch die Annäherung der  $T_g'$  nach dem Tempern von der  $T_c$  (Unterschied von ca. 5 °C) bestätigt. Für ein besseres Verständnis des Verhaltens einer Formulierung beim Einfrieren ist daher sowohl die DSC- als auch die FDM-Untersuchung erforderlich.

Die Trocknungszeit wird in Vorversuchen durch die komparative Druckmessung ermittelt und mit der Annäherung der Produkttemperatur an die Stellflächentemperatur in der weiteren Versuchsreihe bestätigt.

Die Auswirkung der Konzentration von Gelatine und Mannitol auf die Formulierung vor und nach der Gefriertrocknung wurde erforscht. Die DSC-Untersuchung zeigte mit der Steigerung der Gelatineanteile eine Verhinderung der Rekristallisation der metastabilen Anteile beim Heizlauf. Der Einfluss der Hilfsstoffkonzentration auf die Auflösungsgeschwindigkeit war

nach der Gefriertrocknung besonders ausgeprägt. Die Formulierung mit höheren Mannitolanteilen und niedrigen Gelatineanteilen zeigte die bessere Auflösungsgeschwindigkeit und dadurch eine höhere Konzentration bei der Gehaltsbestimmung von Midazolam-HCl nach 120 Sekunden.

Im zweiten Abschnitt wurde sowohl der Einfluss des Gelatinetyps als auch der des pHs der Formulierung auf die physikalischen Eigenschaften des Lyophilisats erforscht. Zwei Gelatinetypen (A und B) wurden untersucht. Sie wurden in dem pH-Bereich verwendet, in dem sie kationisch vorliegen und dadurch kein signifikanter Unterschied im Bezug auf die chemische Kompatibilität zu erwarten war. Außerdem unterschieden sie sich in der Bloomzahl, wobei sie als mittelbloomig und niedrigbloomig bezeichnet wurden.

Die Erforschung des Verhaltens beim Einfrieren deutete auf keinen signifikanten Unterschied zwischen den Formulierungen hin. Dagegen zeigten die gefriergetrockneten Formulierungen mit der niedrigbloomigen Gelatine eine höhere Auflösungsgeschwindigkeit gegenüber den mit mittelbloomiger Gelatine hergestellten Formulierungen. Eine Erhöhung des pH-Werts der Formulierung führte zur Sedimentation des Midazolam-HCl nach der Auflösung des Lyophilisats, was die verfügbaren Anteile des Wirkstoffs herabgesetzt hat. Im Bezug auf die anderen Eigenschaften wie die Kristallinität, der Feuchtigkeitsgehalt und die makro- und mikroskopische Erscheinung wurde kein bemerkbarer Unterschied festgestellt.

Aus diesen Gründen wurde die niedrigbloomige Gelatine für die Herstellung des Lyophilisats verwendet.

Da die Lyophilisate den Anforderungen des Arzneibuchs entsprechen müssen, wurden sie hinsichtlich der Gleichförmigkeit des Gehalts, der Zerfallszeit und der Wirkstofffreisetzung geprüft. Der Wirkstoffgehalt lag im Bereich von 93,41% des Sollwerts und damit wird die Anforderung erfüllt. Die fünf untersuchten Chargen haben statistisch keinen signifikanten Unterschied gezeigt. Ebenso zeigten die Chargen keinen Unterschied im Hinblick auf die Zerfallszeit. Eine Zerfallszeit von ca. 49 Sekunden wurde erlangt.

Für die Untersuchung der Freisetzung des Midazolam-HCl gibt es keine Vorschrift im USP oder in der Ph. Eur. Deshalb wurde die konventionelle Methode (siehe 5.2.4.5) verwendet. Die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung erwies sich als ungeeignet. Die Methode war nicht in der Lage, die Änderung der Wirkstoff-Konzentration mit der Zeit zu erfassen. Es muss eine andere Methode entwickelt werden, um die Schwächen dieser Methode zu vermeiden. Dies betrifft zuerst die Wahl des Volumens des Lösungsmittels, das nicht annähernd mit der Speichelmenge übereinstimmt. Außerdem verlangt die schnelle

Auflösungsgeschwindigkeit des Lyophilisats einen maximalen Zeitabstand bei der Probenentnahme im Bereich von einer Minute.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung der Lyophilisatstabilität unter verschiedenen Lagerbedingungen. Für die Verpackung wurden Behältnisse, die in der Klinik erhältlich sind, verwendet. Nach einem Zeitraum von 6 Monaten zeigten die untersuchten Chargen keine statistisch erkennbare Änderung im Wirkstoffgehalt unter normalen Lagerbedingungen. Von den physikalischen Eigenschaften war auch kein Unterschied im Bezug auf die Zerfallszeit oder die Kristallinität festzustellen. Auf der anderen Seite führte eine Zunahme von ca. 2,8% im Feuchtigkeitsgehalt des Lyophilisats zu einer Abnahme von ca. 15 °C in der Glasübergangstemperatur und ca. 9% im Durchmesser.

Die Tabletten in Glasflaschen, die bei Stressbedingung gelagert wurden, zeigten ebenso eine chemische Stabilität nach einem Monat, sie sind aber so geschrumpft, dass die Abnahme des Durchmessers die 80%-Grenzen unterschreitet.

Die Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass die Lyophilisate nicht bei Temperaturen oberhalb 25 °C aufbewahrt werden dürfen und vor Feuchtigkeit geschützt werden müssen.

## 8 Summary

Thanks to an inquiry from the Department of Anaesthesia and polyclinic of the University of Würzburg this work is aimed at developing a new form of administration for midazolam. In anesthesia midazolam is frequently used as a tranquillizer before surgery. The parenteral dosage form represents an unpleasant kind of application. It is mostly associated with fear and discomfort. On the contrary, tablets are easy to ingest without assistance. However, they are linked with bad bioavailability and swallowing problems. In addition, an intake of water is required. Large quantities of water may cause an involuntary reflux of gastric content during surgery. This complication is one of the most common anesthetic problems.

Orodispersible tablets provide a possibility to avoid these problems. They disintegrate fast in the mouth without any need for additional water. Water-soluble drugs may immediately enter the blood through the oral mucosa. Thus the first pass effect can be avoided.

One form of orodispersible tablets is being manufactured by means of freeze-drying and presents the most interesting form.

In the first part of this work the characteristic properties of the substance were examined. These include the particle size, X-ray diffraction, and  $pK_a$  value of midazolam-HCl. The particles did have a diameter of 81  $\mu\text{m}$ . They showed an X-ray spectrum with sharp diffraction peaks at  $2\theta = 21.1^\circ$  and  $28.4^\circ$ . The determined  $pK_a$  value of 6.23 matches the literature data [95, 96].

In addition the compatibility between midazolam-HCl and several selected excipients was investigated. The determination of the content of midazolam-HCl by means of HPLC indicated a decrease in concentration of about 8% after 9 weeks in formulations containing midazolam-HCl, gelatin A, mannitol, with or without Tween 80. There was no drop in the concentration of midazolam-HCl detected in the formulation containing midazolam-HCl, gelatin A and sucrose.

In the context of the formulation development the influence of the composition on the physical properties of the product was investigated. At the same time the process was optimized by studying the freezing behaviour of the formulation and determination of the necessary parameters.

The formulation consisted of midazolam-HCl as an active ingredient, a polymer (gelatin) as a solid solvent, mannitol to impart crystallinity and elegance to the tablet and citric acid to adjust the pH.

During the term of process optimization freezing with liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) was compared to freezing on a pre-cooled shelf. The freezing method with liquid nitrogen has indeed yielded lyophilisates with cracks on the surface, but their disintegration time was better. Many further attempts were performed to obtain elegant products which don't have cracks on the surface. They showed that slow immersion in LN<sub>2</sub> (at first just the bottom of the container) is beneficial. This is due to the formation of vertical channels instead of horizontal ones as when fast immersing was used. Thus it facilitates the transport of water vapour during the sublimation.

The product temperature was at first ascertained to adjust the process parameters such as shelf temperature, pressure and time during primary and secondary drying. This based on the determination of the collapse temperature ( $T_c$ ) of the formulation and keeping a safety margin of approx. 3 °C. The influence of annealing on the glass transition temperature of the maximal freeze concentrated solute ( $T_g'$ ) was studied by means of DSC. The results showed that effective annealing induced a significant increase in the  $T_g'$ , which indicates the importance of annealing in the optimization of the process.

The difference between  $T_c$  and  $T_g'$  was noticeable being about 22 °C. This stands in contrast to the differences (3- 5 °C) published in many references [53]. This discrepancy can be attributed not only to the composition of the formulation, but also to a recrystallization of metastable substances during the measurement by means of the FDM. This was confirmed by the approach of  $T_g'$  after annealing to  $T_c$  (a difference of about 5 °C). Therefore, both analysis with DSC and FDM are necessary for a better understanding of the behaviour of a formulation during freezing.

The effect of the concentration of gelatin and mannitol in the formulation with and without annealing was investigated. The DSC study showed a prevention of the recrystallisation of metastable portions during the heating run with the increase of the concentration of gelatin. A distinct influence of the used excipient concentration on the dissolution time of the product was noticed. The formulation with a higher proportion of gelatin and a lower proportion of mannitol showed a better dissolution time and thus a higher concentration of available midazolam-HCl after 120 seconds.

In the second section, the influence of the type of gelatin as well as the influence of the pH value of the formulation on the physical properties of the lyophilisate was explored. Two types of gelatin (A und B) were investigated. They vary moreover in the bloom number (medium bloom and low bloom). As both types were cationic in the studied pH range, there were no expected differences regarding chemical compatibility.

No significant difference in the freezing behaviour of the formulations was indicated. There was also no considerable difference in the other properties of the lyophilisates such as crystallinity, residual water, and macro- or microscopic appearance. On the other hand, the freeze dried formulations with 60-bloom gelatin showed a better dissolution rate compared to those with 195-bloom gelatin. An increase of the pH value of the formulation led to the sedimentation of midazolam-HCl after the dissolution of the lyophilisate. Thus a decrease in the available active ingredient was detected.

Consequently the 60 bloom gelatin was used for the preparation of lyophilisates in further experiments.

As the lyophilisates must meet the requirements of the pharmacopoeia, the uniformity of the drug content, the disintegrating time, and the dissolution rate were examined. The drug content was about 93.41% of the specified value. Thus the requirement of (85% to 115%) was fulfilled. There was no statistically significant difference between the five examined batches detected. Similarly, the batches showed no difference regarding disintegration time. On average the tablets disintegrated in 49 seconds.

The investigation of the drug release was not suitable. With the method (solvent: 900 mL water, sampling: after 2, 4, 6, 10 and 30 minutes) it was not feasible to detect the change of the concentration of the active ingredient. Therefore, it will be necessary to develop another method, which avoids the weaknesses of the one used. This concerns firstly the choice of the solvent, which does not approach the quantity of saliva. In addition, the fast dissolution rate of lyophilisate requires a shorter time interval for sampling.

The last part of this work focused on the investigation of the stability of lyophilisate under different storage conditions. The lyophilisates were packed in containers which are available in the hospital (glass bottle and PVC-blister). After a storage period of 6 months under normal conditions, the examined batches showed no statistically detectable change in the drug content and in the other physical properties such as crystallinity and disintegrating time. On

the other hand, the increase of about 2.8% in the moisture content of the lyophilisates led to a decrease in the glass transition temperature of approx. 15 °C and in the diameter of about 9%. The tablets which were stored in a glass bottle under accelerated conditions showed no chemical instability after a storage period of one month. However, there was shrinkage in the diameter which fall below the accepted limits of 80%.

The stability studies revealed that the lyophilisates must not be stored at temperatures above 25 °C and must be protected from humidity.

## 9 Anhang

### 9.1 Bestimmung des pK<sub>a</sub>-Wertes

Eine Kalibriergerade ( $y=85,977x-0,0448$ ) mit  $R^2= 0,9976$  wird erstellt. Die Midazolamkonzentrationen in der Lösung bei jedem pH-Wert werden dann mit Hilfe dieser Eichgerade berechnet.

Von den ermittelten Löslichkeitswerten wird dann der pK<sub>a</sub> bestimmt. Die Rechnung beruht auf der Krebs-Speakman-Gleichung:

$$pKa = pH_i + \log \left\{ \frac{S_i}{[B]} - 1 \right\}$$

Gl. 9-1

Wobei S<sub>i</sub> die Löslichkeit bei den gegebenen pH<sub>i</sub> ist

**Tab. 9-1:** Experimentelle und berechnete Daten für Midazolam-HCl

pH-Werte	Löslichkeiten in mg/100ml		Differenz  Ber.-EXP.	Fehler in %
	EXP.	Ber.		
8,8	2,7	2,95	0,25	8,33
8,78	2,84	2,95	0,11	3,58
8,7	2,91	2,95	0,04	1,28
8,33	3,12	2,96	0,16	5,28
8,01	2,9	2,99	0,09	3,04
7,97	3,17	2,99	0,18	6,03
7,97	3,4	2,99	0,41	13,6
7,95	3,19	2,99	0,19	6,41
7,53	3,5	3,08	0,42	13,46
7,47	3,55	3,11	0,44	14,17
7,47	3,56	3,11	0,46	14,71
7,48	3,58	3,1	0,48	15,46
6,99	3,03	3,45	0,42	12,11
6,5	5,44	4,51	0,93	20,59
6,48	4,26	4,58	0,32	6,98
6,48	5,02	4,58	0,44	9,54
6,48	5,17	4,58	0,58	12,72
6,3	5,37	5,43	0,06	1,11
6,26	6,01	5,67	0,34	5,99
6,26	5,86	5,67	0,19	3,39

pH-Werte	Löslichkeiten in mg/100ml		Differenz  Ber.-EXP.	Fehler in %
	EXP.	Ber.		
6,26	6,54	5,67	0,87	15,37
6,15	6,68	6,46	0,22	3,4
6,14	6,73	6,54	0,19	2,88
6,15	6,45	6,46	0,01	0,14
5,95	7,94	8,52	0,58	6,76
5,98	7,87	8,14	0,28	3,39
5,98	8,13	8,14	0,01	0,13
5,85	8,46	9,96	1,5	15,03
5,57	14,22	16,32	2,09	12,84
5,66	13,11	13,81	0,7	5,1
5,6	13,48	15,42	1,94	12,61
5,15	40,15	38,13	2,02	5,31
5,2	34,18	34,3	0,12	0,36

Löslichkeit der Neutralform von Midazolam-HCl: 2,94 mg/100 ml

pK<sub>a</sub>-Wert : 6,23

Regressionskoeffizient: R=0,996

## 9.2 Rohdaten

### 9.2.1 Partikelgröße

Nr	Kreis-Äquivalent D.	Ferret'scher D.
1	102,55	101,08
2	90,45	99,03
3	85,38	80,11
4	115,2	160,87
5	113,2	108,15
6	71,53	70,11
7	65,18	65,22
8	81,67	99,46
9	85,87	120,11
10	95,9	120,11
11	63,68	54,35
12	85,48	126,09
13	85,74	80,43
14	56,1	50,81
15	46,73	51,62
16	79,59	74,59
17	53,71	70,81
18	57,79	76,22
19	89,49	93,78
20	89,84	98,11
21	77,33	94,59
22	112,95	113,51
23	64,78	63,78
24	84,94	119,73
25	91,26	121,35
$\bar{X}$ [ $\mu\text{m}$ ]	<b>81,8</b>	<b>92,6</b>
sdv [ $\mu\text{m}$ ]	<b>18,6</b>	<b>27,4</b>
rel. sdv [%]	<b>22,8 %</b>	<b>29,7 %</b>
Max [ $\mu\text{m}$ ]	<b>115,2</b>	<b>160,87</b>
Min [ $\mu\text{m}$ ]	<b>46,73</b>	<b>50,81</b>

### 9.2.2 Kompatibilitätsuntersuchung

Die Peakfläche von Midazolam und dem Internen Standard wird mit der Geminix Standard-Software berechnet. Die Rechnung der Konzentration wird an dem Untersuchungstag im

Bezug auf einen Internen Standard, der sowohl zur Kalibrier- als auch zur Probelösung zugegeben wurde, nach Gl. 9-2 durchgeführt.

$$A_{\text{mid}}/C_{\text{mid}} = F(A_{\text{nip}}/C_{\text{nip}})$$

**Gl. 9-2**

Wobei  $A_{\text{mid}}$ ,  $C_{\text{mid}}$  Peakfläche und Konzentration von Midazolam sind.

$A_{\text{nip}}$ ,  $C_{\text{nip}}$  sind Peakfläche und Konzentration des Internen Standards (Nipagin).

F wird durch diese Gleichung allerdings von der Kalibrierlösung bestimmt.

<b>Midazolam+Gelatine+Mannitol</b>			
<b>Bei -20°C</b>	Midazolam- Peakfläche± sdv [Flächeneinheit]	I.S.Peakfläche± sdv [Flächeneinheit]	Midazolam- Konzentraion± sdv [%]
1 Tag	48,1±2,7	36±1,7	102,5±1,2
1 Woche	47,1±0,7	34,7±0,5	100,7±0,7
2 Wochen	47,1±0,3	34,7±0,4	107,1±1,2
3 Wochen	49,9±0,5	35,3±0,1	108,7±1,5
4 Wochen	46,1±0,7	35,7±0,3	98,6±1,3
6 Wochen	48,3±1	35,6±1,3	96±2,82
10 Wochen	46,7±0,7	35,8±0,5	92,8±0,2
<b>Bei R.T</b>			
1 Tag	48,1±2,7	36±1,7	102,5±1,2
1 Woche	45,2±0,1	30,3±0,2	110,6±0,8
2 Wochen	46,3±0,4	36,3±0,4	100,7±1,1
3 Wochen	42,9±0,9	32,9±0,4	100,3±2,1
4 Wochen	47,9±0,5	36,0±0,4	100,0±0,3
6 Wochen	39,8±0,5	30,1±0,4	93,6±0,6
10 Wochen	46±0,6	36,1±0,4	90,6±1,0
<b>Bei 40°C</b>			
1 Tag	48,1±2,7	36 ±1,7	102,5±1,2
1 Woche	45,7±0,9	35,3±0,4	96,5±1
2 Wochen	47,8±0,6	36,3±0,3	103,9±1,4
3 Wochen	47,0±0,3	34,1±0,5	106,1±1,2
4 Wochen	48,1±0,8	36,4±0,6	99,2±0,4
6 Wochen	46,8±0,6	35,2±0,4	94,1±0,5
10 Wochen	47,3±1	35,7±0,6	94,3±0,6

<b>Midazolam+Gelatine+Mannitol+Tween</b>			
<b>Bei -20°C</b>	Midazolam- Peakfläche± sdv [Flächeneinheit]	I.S.Peakfläche± sdv [Flächeneinheit]	Midazolam- Konzentraion± sdv [%]
1 Tag	46,7±2	34,7±1,3	100,1±0,9
1 Woche	48,1±1,1	36,7±0,3	103,4±1,7
2 Wochen	47,1±0,5	37,5±0,3	99,1±1,1
3 Wochen	46,4±0,4	35,7±0,2	97,6±0,2
5 Wochen	47,4±0,6	34,8±0,4	98,3±0,2
7 Wochen	47,8±0,3	36±0,1	94,5±0,4
9 Wochen	47,1±1,0	36,1±0,6	92,8±0,7
<b>Bei R.T</b>			
1 Tag	46,7±1,9	34,7±1,3	100,1±0,9
1 Woche	44,3±0,8	36,7±0,5	96,6±0,6
2 Wochen	47,7±0,4	37,4±0,4	100,6±0,5
3 Wochen	46,8±0,3	35,0±0,3	100,6±0,4
5 Wochen	48,1±0,4	35,3±0,3	96,5±0,6
7 Wochen	47,3±0,7	36±0,5	93,4±0,4
9 Wochen	47,5±0,7	36,0±0,4	93,8±1,26
<b>Bei 40°C</b>			
1 Tag	46,7±1,9	34,7±1,3	100,1±0,9
1 Woche	47,9±0,9	36,4±0,5	105,4±0,5
2 Wochen	47,6±0,6	37,5±0,5	100,1±0,4
3 Wochen	48,8±0,6	36,7±0,5	100±0,3
5 Wochen	47,3±0,7	35,3±0,6	96,7±0,5
7 Wochen	47,6±0,6	35,4±0,5	95,6±0,1
9 Wochen	46,3±0,5	35,5±0,3	92,7±0,9

<b>Midazolam+Gelatine+Saccharose</b>			
<b>Bei -20°C</b>	Midazolam- Peakfläche± sdv [Flächeneinheit]	I.S.Peakfläche± sdv [Flächeneinheit]	Midazolam- Konzentraion± sdv [%]
1 Tag	45,5±1,6	36,4±1,2	95,8±1,3
1 Woche	46,1±0,6	35,7±0,1	96±1,4
2 Wochen	47,9±0,9	37,4±0,6	102,3±0,4
3 Wochen	46,7±0,8	35,6±0,5	103,6±1,4
4 Wochen	49±0,5	36,3±0,4	102,9±0,3

<b>Midazolam+Gelatine+Saccharose</b>			
<b>Bei -20°C</b>	Midazolam- Peakfläche± sdv [Flächeneinheit]	I.S.Peakfläche± sdv [Flächeneinheit]	Midazolam- Konzentraion± sdv [%]
6 Wochen	47,9±1,0	37±0,5	84,1±0,82
9 Wochen	47,4±1,1	35,3±0,6	101,5±0,64
<b>Bei R.T</b>			
1 Tag	45,5±1,6	36,4±1,2	95,8±1,3
1 Woche	48,3±1,2	35,9±0,8	100,2±0,6
2 Wochen	42,9±0,8	33,2±0,3	103,5±1
3 Wochen	48,2±0,9	36,2±0,5	105,5±1,1
4 Wochen	46,7±0,4	36,1±0,3	98,7±0,3
6 Wochen	49,3±1,1	37,0±0,6	86,5±0,7
9 Wochen	47,9±0,4	35,8±0,2	101,3±0,4
<b>Bei 40°C</b>			
1 Tag	45,5±1,6	36,4±1,2	95,8±1,3
1 Woche	40,1±0,8	34,7±0,7	86,2±0,8
2 Wochen	47,6±0,4	37,2±0,2	102,3±0,7
3 Wochen	47,9±0,8	36,1±0,5	105±1,4
4 Wochen	50,1±0,5	36,9±0,4	103,4±0,4
6 Wochen	48,5±0,3	36,6±0,2	85,9±0,3
9 Wochen	48,8±0,6	35,8±0,2	100,36±5,7

## 9.2.3 Der Einfluss der Konzentration von Gelatine und Mannitol

### 9.2.3.1 Kollapstemperatur

	<b>Anfangs des Kollapses</b>	<b>Partieller Kollaps</b>	<b>Voller Kollaps</b>
<b>Form. 1</b>			
1	-8,9	-7,4	-6,4
2	-12,6	-11,9	-11,1
3	-8,9	-7,8	-6,2
4	-10,6	-9,7	-8,1
5	-10,4	-9,8	-7,8
6	-11,2	-10,1	-7,9
$\bar{X}$ [°C]	<b>-10,4</b>	<b>-9,5</b>	<b>-7,9</b>
sdv [°C]	1,5	1,8	2,0
rel. sdv [%]	-14,6	-19,1	-24,8

	Anfangs des Kollapses	Partieller Kollaps	Voller Kollaps
<b>Form. 2</b>			
1	-17,5	-16,4	-14,7
2	-16,8	-15,9	-15,5
3	-10,3	-9,8	-8,7
4	-13,3	-12,2	-10,8
5	-14,7	-13,9	-13,1
6	-12,3	-9,0	-7,9
$\bar{X}$ [°C]	<b>-14,2</b>	<b>-12,9</b>	<b>-11,8</b>
sdv [°C]	2,7	3,1	3,1
rel. sdv [%]	-19,4	-24,0	-26,7
<b>Form. 3</b>			
1	-15,3	-13,7	-12,4
2	-16,3	-15,0	-14,6
3	-12,0	-10,2	-9,6
4	-12,0	-9,0	-8,0
5	-8,6	-8,2	-7,5
6	-8,6	-7,3	-6,9
$\bar{X}$ [°C]	<b>-12,1</b>	<b>-10,6</b>	<b>-9,8</b>
sdv [°C]	3,2	3,1	3,1
rel. sdv [%]	-26,7	-29,4	-31,1
<b>Form. 4</b>			
1	-16,3	-15,2	-14,0
2	-16,3	-15,2	-14,6
3	-15,1	-13,7	-12,3
4	-15,2	-14	-13
5	-14,7	-13,8	-12,8
6	-16,3	-14,0	-13,1
$\bar{X}$ [°C]	<b>-15,7</b>	<b>-14,3</b>	<b>-13,3</b>
sdv [°C]	0,7	0,1	0,4
rel. sdv [%]	-4,4	-1,0	-2,7
<b>Form. 5</b>			
1	-19,1	-18,5	-17,3
2	-20,9	-19,5	-18,1
3	-17,8	-16,4	-15,8
4	-16,6	-14,5	-14,0
5	-13,5	-11,2	-10,2
6	-16,3	-15,1	-14,8
$\bar{X}$ [°C]	<b>-17,4</b>	<b>-15,9</b>	<b>-15,0</b>
sdv [°C]	2,5	3,0	2,6
rel. sdv [%]	-14,6	-18,8	-17,1

### 9.2.3.2 Feuchtigkeitsgehalt

Formulierung	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4	Form. 5
	0,382	0,576	1,00	0,492	0,578
	0,423	0,691	0,669	0,608	0,689
	0,552	0,813	0,640	0,734	0,9128
$\bar{X}$ [%]	0,45	0,69	0,77	0,61	0,73
sdv [%]	0,09	0,12	0,20	0,12	0,17
rel. sdv [%]	19,56	17,11	26,17	19,76	23,48

### 9.2.4 Die Auflösegeschwindigkeit

Für jede Formulierung wird eine Kalibriergerade erstellt und die Konzentration dann in zwei oder drei Proben berechnet.

$$y = 91,256x + 0,0009$$

$$R^2 = 0,9998$$

$$n=2$$

Form. 1	AE bei 219	C [%]
A30s	0,66	86,94
B30s	0,69	90,23
$\bar{X}$ nach 30s [%]		<b>88,59</b>
A60s	0,69	89,89
B60s	0,66	86,27
$\bar{X}$ nach 60S [%]	0,67	<b>88,08</b>
A120s	0,68	86,43
B120s	0,69	89,87
$\bar{X}$ nach 120S [%]	0,69	<b>88,15</b>

$$y = 88,271x - 0,0147$$

$$R^2 = 0,9994$$

$$n=2$$

Form. 4	AE bei 220	C [%]
A30s	0,50	70,30
B30s	0,47	66,19
$\bar{X}$ nach 30s [%]		<b>68,25</b>
A60s	0,58	79,75
B60s	0,53	73,50
$\bar{X}$ nach 60S [%]	0,55	<b>76,62</b>
A120s	0,61	83,78
B120s	0,59	80,64
$\bar{X}$ nach 120S [%]	0,60	<b>82,21</b>

$$y = 86,323x - 0,0131$$

$$R^2 = 0,998$$

$$n=2$$

Form. 5	AE bei 222	C [%]
A30s	0,33	47,57
B30s	0,41	58,75
$\bar{X}$ nach 30s [%]		<b>53,16</b>
A60s	0,44	61,42
B60s	0,39	55,47
$\bar{X}$ nach 60S [%]	0,41	<b>58,44</b>
A120s	0,50	69,42
B120s	0,51	70,15
$\bar{X}$ nach 120S [%]	0,50	<b>69,78</b>

$$y = 91,256x + 0,0009$$

$$R^2 = 0,9998$$

n=3

Form. 2	AE bei 219	C [%]
A30s	0,74	96,80
B30s	0,66	86,82
C30s	0,44	57,56
$\bar{X}$ nach 30S [%]	0,61	<b>80,40</b>
A60s	0,73	95,69
B60s	0,67	87,79
C60s	0,61	78,90
$\bar{X}$ nach 60S [%]	0,67	<b>87,46</b>
A120s	0,78	101,12
B120s	0,68	88,12
C120s	0,62	79,16
$\bar{X}$ nach 120S [%]	0,69	<b>89,47</b>

$$y = 84,187x + 0,0227$$

$$R^2 = 0,9951$$

n=3

Form. 3	AE bei 222	C [%]
A30s	0,30	39,77
B30s	0,41	55,71
C30s	0,40	54,43
$\bar{X}$ nach 30S [%]	0,37	<b>49,97</b>
A60s	0,45	59,10
B60s	0,55	73,70
C60s	0,49	65,15
$\bar{X}$ nach 60S [%]	0,49	<b>65,98</b>
A120s	0,63	82,10
B120s	0,66	87,40
C120s	0,58	77,02
$\bar{X}$ nach 120S [%]	0,62	<b>82,18</b>

## 9.2.5 Der Einfluss des Gelatine-Typs

### 9.2.5.1 Kollapstemperatur

	Anfang des Kollapses	Partieller Kollaps	voller Kollaps
<b>Form. A</b>			
1	-17,8	-16,6	-16,1
2	-16	-14,2	-13,5
3	-17,5	-16,5	-15,8
$\bar{X}$ [°C]	<b>-17,10</b>	<b>-15,77</b>	<b>-15,13</b>
sdv [°C]	0,79	1,11	1,16
rel. sdv [%]	-4,60	-7,03	-7,67
<b>Form. B</b>			
1	-17	-15,5	-14,5
2	-16,9	-16,1	-15,5
3	-14,5	-13,9	-13
$\bar{X}$ [°C]	<b>-16,13</b>	<b>-15,17</b>	<b>-14,33</b>
sdv [°C]	1,42	1,14	1,26
rel. sdv [%]	-8,77	-7,50	-8,78

<b>Form. C</b>			
1	-16,5	-15,1	-13,4
2	-12,3	-11,8	-10
3	-10,4	-9,3	-8,9
$\bar{X}$ [°C]	<b>-13,07</b>	<b>-12,07</b>	<b>-10,77</b>
sdv [°C]	3,12	2,91	2,35
rel. sdv [%]	-23,89	-24,11	-21,79
<b>Form. D</b>			
1	-16	-9,7	-11,5
2	-14,4	-13,8	-13,3
3	-8,8	-7,3	-6,7
$\bar{X}$ [°C]	<b>-13,1</b>	<b>-10,3</b>	<b>-10,5</b>
sdv [°C]	<b>3,8</b>	<b>3,3</b>	3,4
rel. sdv [%]	-28,93	-32,01	-32,49

### 9.2.5.2 Feuchtigkeitsgehalt

<b>Formulierung</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
	1,933	1,059	1,154	1,28
	0,807	1,737	1,127	1,347
	1,325	1,117	1,428	2,109
$\bar{X}$ [°C]	<b>1.355</b>	<b>1.304</b>	<b>1.236</b>	<b>1,580</b>
sdv [°C]	0,564	0,376	0,166	0,459
rel. sdv [%]	41,61	28,83	13,46	29,06

### 9.2.5.3 Die Auflösegeschwindigkeit

$$y = 89.147x + 0.0023$$

$$R^2 = 0.9989$$

$$n=3$$

Form. A	AE bei 220	C [%]
A30s	0,15	49,20
B30s	0,23	77,19
C30s	0,16	51,66
$\bar{X}$ [%]	0,18	59,35
sdv [%]		13,44
rel. sdv [%]		22,64
A60s	0,22	67,50
B60s	0,28	87,91
C60s	0,26	79,01
$\bar{X}$ [%]	0,26	78,14
sdv [%]		8,95
rel. sdv [%]		11,45
A120s	0,25	71,15
B120s	0,29	79,83
C120s	0,29	77,10
$\bar{X}$ [%]	0,28	75,19
sdv [%]		6,42
rel. sdv [%]		8,54

Form. B	AE bei 220	C [%]
A30s	0,24	79,49
B30s	0,24	78,56
C30s	0,25	82,57
$\bar{X}$ [%]	0,24	80,21
sdv [%]		1,94
rel. sdv [%]		2,42
A60s	0,29	89,86
B60s	0,26	82,30
C60s	0,26	82,17
$\bar{X}$ [%]	0,27	84,51
sdv [%]		3,74
rel. sdv [%]		4,43
A120s	0,31	83,44
B120s	0,29	79,60
C120s	0,28	80,16
$\bar{X}$ [%]	0,29	81,51
sdv [%]		2,88
rel. sdv [%]		3,53

Form. C	AE bei 220	C [%]
A30s	0,34	52,98
B30s	0,33	50,88
C30s	0,35	55,65
$\bar{X}$ [%]	0,34	53,17
sdv [%]		2,09
rel. sdv [%]		3,94
C60s	0,36	53,94
B60s	0,38	56,50
C60s	0,38	57,05
$\bar{X}$ [%]	0,38	55,83
sdv [%]		1,459
rel. sdv [%]		2,61

Form. D	AE bei 220	C [%]
A30s	0,18	61,37
B30s	0,18	61,25
C30s	0,26	87,12
$\bar{X}$ [%]	0,21	69,92
sdv [%]		12,92
rel. sdv [%]		18,48
A60s	0,23	71,04
B60s	0,27	80,75
C60s	0,25	79,72
$\bar{X}$ [%]	0,25	77,17
sdv [%]		4,646
rel. sdv [%]		6,02

<b>C</b>	AE bei 220	C [%]
A120s	0,44	56,44
B120s	0,42	56,20
C120s	0,44	57,67
$\bar{X}$ [%]	0,44	56,77
sdv [%]		1,16
rel. sdv [%]		2,04

<b>D</b>	AE bei 220	C [%]
A120s	0,23	67,28
B120s	0,26	72,11
C120s	0,24	70,61
$\bar{X}$ [%]	0,24	70,00
sdv [%]		4,09
rel. sdv [%]		5,89

## 9.2.6 Entwicklung der Tabletten

### 9.2.6.1 Zerfallszeit

<b>Charge</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
	45	40	65	43	80
	90	55	55	30	30
	30	50	25	40	60
$\bar{X}$ [s]	55,00	48,33	48,33	37,67	56,67
sdv [s]	31,22	7,64	20,82	6,81	25,17
rel. sdv [%]	56,77	15,80	43,07	18,07	44,41

### 9.2.6.2 Gleichförmigkeit des Gehalts der Tabletten

<b>Charge</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
	95,87	95,22	91,36	94,80	91,67
	92,47	89,88	92,03	93,25	92,27
	91,91	97,63	88,83	97,44	92,89
		97,00			
Konzentration $\bar{X}$ [%]	<b>93,41</b>	<b>94,93</b>	<b>90,74</b>	<b>95,16</b>	<b>92,28</b>
sdv [%]	2,14	3,52	1,69	2,12	0,61
rel. sdv [%]	2,29	3,71	1,86	2,23	0,66
Erkennbare Gehaltabnahme	5,69	5,93	4,62	5,53	1,64

Mit Hilfe eines t-Tests stellt Grimm [129] in einer Tabelle die Relation zwischen der Anzahl der Proben (n) und der relativen Standardabweichung dar. Wenn die in dieser Arbeit gemessene relative Standardabweichung in der Tabelle exakt nicht zu finden, wurden diese Werte mit Hilfe der linearen Zusammenhang  $y = 2,4824x - 0,0032$  mit  $R^2 = 1$  bei  $n=3$  und  $y = 1,6x$  mit  $R^2 = 1$  bei  $n=4$  berechnet.

### 9.2.6.3 Wirkstofffreisetzung

	Tablette	2 min	4 min	6 min	10 min	30 min
Charge A	1	89,74	93,22	94,81	97,16	95,60
	2	94,33	95,21	96,45	95,28	89,31
	3	95,16	96,53	96,53	95,27	90,56
	4	96,68	96,56	96,69	97,72	94,80
	5	94,00	97,28	97,79	99,32	96,56
	6	96,27	100,79	101,62	101,45	102,08
Charge B	1	94,30	96,65	96,33	95,08	92,34
	2	91,76	92,18	90,70	90,70	97,09
	3	93,01	95,14	94,69	94,03	92,69
	4	93,98	97,15	97,27	94,76	94,44
	5	94,50	95,41	93,26	90,25	90,92
	6	96,82	96,86	97,30	98,56	94,50
Charge D	1	83,60	86,45	88,62	87,32	84,98
	2	83,83	86,53	86,58	87,19	85,05
	3	84,21	87,63	87,49	88,03	85,81
	4	84,66	86,05	86,70	85,13	84,79
	5	85,03	85,80	85,94	86,28	83,74
	6	83,79	86,15	85,32	86,91	84,11
Charge E	1	96,50	100,67	99,79	100,38	97,95
	2	94,38	96,52	96,43	98,23	94,11
	3	92,97	95,60	96,80	95,89	94,12
	4	96,41	99,41	100,94	99,44	96,96
	5	94,22	96,72	97,47	96,93	94,68
	6	93,38	96,14	96,16	98,66	93,55
Konzentration $\bar{x}$ [%]		91,81	94,03	94,24	94,17	92,11
sdv [%]		4,72	4,81	4,89	5,03	5,02
rel. sdv [%]		5,14	5,11	5,19	5,34	5,45

## 9.2.7 Stabilität

### 9.2.7.1 Feuchtigkeitsgehalt

Lagerbedingung	1 Tag	4 Wochen	12 Wochen	24 Wochen
Glasflasche (normale Bedingung)	2,4557	3,4844	3,5865	4,1519
	2,263	1,7576	2,1712	4,3772
	2,5224	1,745	2,1472	3,1646
	2,414	3,208	3,694	3,714
$\bar{X}$ [%]	<b>2,414</b>	<b>2,549</b>	<b>2,900</b>	<b>3,852</b>
sdv [%]	0,110	0,928	0,824	0,535
rel. sdv [%]	4,56	36,40	28,42	13,88
Glasflasche (Stressbedingung)		3,147		
		2,589		
		4,360		
		3,997		
$\bar{X}$ [%]		<b>3,523</b>		
sdv [%]		0,804		
rel. sdv [%]		36,40		
Blister (normale Bedingung)	1,524	3,228	3,599	4,125
	1,242	3,814	5,373	3,207
	2,095	2,626	3,239	3,888
	1,148	2,381		
	1,434	4,637	4,593	5,490
	1,363	3,068	5,269	4,347
	1,427	3,831	5,457	4,117
	1,447	2,538		
	1,534	4,029	4,743	4,919
	0,838	2,898	4,444	3,976
	1,610	2,231	3,386	4,064
	0,908	3,843		3,946
$\bar{X}$ [%]	<b>1,381</b>	<b>3,260</b>	<b>4,456</b>	<b>4,208</b>
sdv [%]	0,331	0,762	0,863	0,618
rel. sdv [%]	21,03	22,13	22,32	14,68

### 9.2.7.2 Zerfallszeit der Tabletten während der Lagerung

Lagerbedingung	0 Tag	4 Wochen	12 Wochen	24 Wochen
Glasflasche (normale Bedingung)	40	30	75	24
	55	36	32	15
	50	30	17	70
$\bar{X}$ [s]	<b>48,33</b>	<b>32,00</b>	<b>41,33</b>	<b>36,33</b>
sdv [s]	7,64	3,46	30,11	29,50
rel. sdv [%]	15,80	10,83	72,84	81,20
Glasflasche (Stressbedingung)		45		
		44		
		50		
$\bar{X}$ [s]		<b>46,33</b>		
sdv [s]		3,21		
rel. sdv [%]		6,94		
Blister (normale Bedingung)	65	65	70	72
	55	55	65	52
	25	25	60	112
	43	45	15	95
	30	63	17	37
	40	45	55	73
	80	70	58	20
	30	47	52	19
	60	27	55	33
$\bar{X}$ [s]	<b>47,56</b>	<b>49,11</b>	<b>49,67</b>	<b>57,00</b>
sdv [s]	18,61	15,91	19,86	33,10
rel. sdv [%]	39,13	32,39	39,99	58,07

### 9.2.7.3 Wirkstoffgehalt der Tabletten während der Lagerung

Lagerbedingung	AE	C [%] (0Tag)	AE	C [%] (4 Wochen)	AE	C [%] (12 Wochen)	AE	C [%] (24 Wochen)
Glasflasche (normale Bedingung)	0,745	89,916	0,772	93,197	0,796	96,114	0,790	95,315
	0,744	89,831	0,777	93,753	0,805	97,143	0,796	96,090
	0,745	89,904	0,777	93,778	0,798	96,296	0,794	95,848
	0,812	98,039	0,800	96,562	0,819	98,911	0,757	91,308
	0,808	97,579	0,800	96,538	0,818	98,705	0,755	91,114

	0,806	97,276	0,796	96,090	0,816	98,463	0,748	90,303
	0,805	97,143	0,808	97,506	0,844	101,889	0,758	91,538
	0,802	96,780	0,807	97,361	0,844	101,877	0,762	91,925
	0,804	97,083	0,835	100,848	0,843	101,816	0,757	91,332
$\bar{x}$ [%]		<b>94,839</b>		<b>96,181</b>		<b>99,024</b>		<b>92,753</b>
sdv [%]		3,733		2,392		2,346		2,298
rel. sdv [%]		3,936		2,487		2,369		3,936
Glasflasche (Stress- bedingung)			0,813	98,172				
			0,816	98,475				
			0,813	98,160				
			0,796	96,078				
			0,793	95,727				
			0,795	95,933				
			0,804	97,010				
			0,800	96,574				
			0,799	96,502				
$\bar{x}$ [%]				<b>96,959</b>				
sdv [%]				1,056				
rel. sdv [%]				1,089				
Blister (normale Bedingung)	0,757	91,650	0,734	88,797	0,790	95,363	0,779	94,019
	0,754	91,298	0,733	88,749	0,791	95,532	0,784	94,624
	0,753	91,140	0,733	88,688	0,791	95,423	0,783	94,551
	0,761	92,050	0,746	90,254	0,785	94,769	0,749	90,350
	0,759	91,881	0,744	90,011	0,790	95,302	0,744	89,830
	0,762	92,160	0,744	90,035	0,783	94,551	0,745	89,963
	0,733	88,749	0,789	95,498	0,759	91,597	0,762	91,924
	0,735	88,967	0,791	95,704	0,758	91,501	0,758	91,476
	0,734	88,773	0,788	95,389	0,764	92,215	0,758	91,428
	0,787	94,975	0,787	95,024	0,825	99,551	0,800	96,549
	0,783	94,467	0,786	94,890	0,827	99,793	0,797	96,246
	0,787	94,963	0,786	94,890	0,833	100,508	0,798	96,271
	0,775	93,486	0,796	96,028	0,842	101,622	0,788	95,145
	0,775	93,534	0,793	95,774	0,840	101,392	0,789	95,181
	0,768	92,723	0,794	95,798	0,843	101,755	0,787	94,963
	0,808	97,481	0,773	93,280	0,820	98,970	0,799	96,501
	0,805	97,166	0,770	92,881	0,818	98,752	0,796	96,028
	0,809	97,675	0,772	93,147	0,817	98,595	0,796	96,040
0,760	91,731	0,752	90,811	0,767	92,578	0,766	92,433	
0,759	91,622	0,753	90,835	0,765	92,360	0,766	92,445	
0,759	91,658	0,751	90,665	0,769	92,796	0,766	92,409	

	0,766	92,481	0,767	92,578	0,773	93,341	0,772	93,159
	0,764	92,154	0,766	92,481	0,775	93,486	0,766	92,505
	0,764	92,179	0,766	92,409	0,778	93,873	0,762	91,912
	0,767	92,542	0,784	94,685	0,766	92,409	0,735	88,704
	0,772	93,183	0,782	94,358	0,762	91,949	0,736	88,789
	0,770	92,953	0,781	94,261	0,765	92,336	0,737	88,946
$\bar{x}$ [%]		<b>92,727</b>		<b>92,886</b>		<b>95,641</b>		<b>93,052</b>
sdv [%]		2,306		2,454		3,484		2,565
rel. sdv [%]		3,589		2,605		3,520		2,856

### 9.3 Statistische Auswertung:

#### 9.3.1 Gleichförmigkeit des Gehalts der Tabletten

Midazolamkonzentration in den Chargen (A, B, D, E, F)			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen Chargen		Signifikanz	signifikanter Unterschied
A	B	0,979	nein
	D	0,645	nein
	E	0,968	nein
	F	0,956	nein
B	D	0,302	nein
	E	0,979	nein
	F	0,700	nein
D	E	0,314	nein
	F	0,953	nein
E	F	0,688	nein

### 9.3.2 Wirkstoffgehalt während der Lagerung

Midazolamkonzentration in Charge B nach 0, 4, 12 und 24 Wochen			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen der Lagerzeit (Wochen)		Signifikanz	Signifikanter Unterschied
0	4	0,962	nein
	12	0,482	nein
	24	0,877	nein
4	12	0,747	nein
	24	0,630	nein
12	24	0,189	nein

Midazolamkonzentration in Charge D nach 0, 4, 12 und 24 Wochen			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen der Lagerzeit (Wochen)		Signifikanz	Signifikanter Unterschied
0	4	0,988	nein
	12	0,490	nein
	24	0,937	nein
4	12	0,669	nein
	24	0,994	nein
12	24	0,804	nein

Midazolamkonzentration in Charge E nach 0, 4, 12 und 24 Wochen			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen der Lagerzeit (Wochen)		Signifikanz	Signifikanter Unterschied
0	4	0,978	nein
	12	0,024	ja
	24	0,949	nein
4	12	0,014	ja
	24	0,793	nein
12	24	0,052	nein

Midazolamkonzentration in Charge F nach 0, 4, 12 und 24 Wochen			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen der Lagerzeit (Wochen)		Signifikanz	Signifikanter Unterschied
0	4	0,996	nein
	12	0,979	nein
	24	0,866	nein
4	12	0,998	nein
	24	0,761	nein
12	24	0,666	nein

### 9.3.3 Zerfallszeit der Tabletten der einzelnen Chargen

Zerfallszeit der Tabletten in den Chargen (A,B,D,E,F)			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen den Chargen		Signifikanz	signifikanter Unterschied
A	B	0,997	nein
	D	1,000	nein
	E	0,98	nein
	F	0,992	nein
B	D	0,997	nein
	E	0,895	nein
	F	1,000	nein
D	E	0,98	nein
	F	0,992	nein
E	F	0,861	nein

### 9.3.4 Zerfallszeit während der Lagerung

Zerfallszeit in Charge B nach 0, 4, 12 und 24 Wochen			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen die Lagerzeit (Wochen)		Signifikanz	Signifikanter Unterschied
0	4	0,832	nein
	12	0,983	nein
	24	0,923	nein
4	12	0,961	nein
	24	0,996	nein
12	24	0,994	nein

Zerfallszeit in Charge D nach 0, 4, 12 und 24 Wochen			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen die Lagerzeit (Wochen)		Signifikanz	Signifikanter Unterschied
0	4	1,000	nein
	12	0,822	nein
	24	0,438	nein
4	12	0,822	nein
	24	0,438	nein
12	24	0,890	nein

Zerfallszeit in Charge E nach 0, 4, 12 und 24 Wochen			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha=0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen die Lagerzeit (Wochen)		Signifikanz	Signifikanter Unterschied
0	4	0,870	nein
	12	0,958	nein
	24	0,358	nein
4	12	0,612	nein
	24	0,760	nein
12	24	0,187	nein

Zerfallszeit in Charge F nach 0, 4, 12 und 24 Wochen			
Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA nach Scheffé, $\alpha= 0,05$ , $n=3$			
Vergleich zwischen die Lagerzeit (Wochen)		Signifikanz	Signifikanter Unterschied
0	4	0,940	nein
	12	1,000	nein
	24	0,220	nein
4	12	0,967	nein
	24	0,446	nein
12	24	0,254	nein

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Kearney, P.: The Zydis oral fast-dissolving dosage form. In: Rathbone, M.; Hadgraft, J.; Roberts, M.: *Modified-release Drug Delivery Technology*. New York: Marcel Dekker, 2003, S. 191-201.
- [2] Führe, C.: *Moderne feste Arzneiformen*. In: Müller, R. H.; Hildebrand, G. E.: *Pharmazeutische Technologie: moderne Arzneiformen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1998.
- [3] *Kommentar zur Ph. Eur. 5.4; 0936. Midazolam*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 25. Lfg. 2006.
- [4] Reed, M.D.; Rodarte, A.; Blumer, J. L.; Khoo, K.; Akbari, B.; Pou, S.; Kearns, G.: The single-dose pharmacokinetics of Midazolam and its primary metabolite in pediatric patients after oral and intravenous administration. *J. Clin. Pharmacol.* 41(2001), S. 1359-1369.
- [5] Allonen, Hannu; Ziegler, Gismar; Klotz, Ulrich.: *Midazolam Kinetics*. *Clin. Pharmacol. Ther.* 30 (1981), S. 653-661.
- [6] Bjorkman, S.; Rigemar, G.; Idvall, J.: Pharmacokinetics of Midazolam given as an intranasal spray to adult surgical patients. *Br. J. Anaest.* 79 (1997), S. 575-580.
- [7] Naqash, I.; Waqar-ul-Nida; Zargar, J.; Farooqi, A.: Midazolam premedication in children: comparison of nasal and sublingual routes. *J. Anaesth. Clin. Pharmacol.* 20 (2004), S. 141-145.
- [8] Kogan, A.; Katz, J.; Efrat, R.; Eidelman, L.A.: Premedication with midazolam in young children: a comparison of four routes of administration. *Paediatr. Anaesth.* 12 (2002), S. 685-689.
- [9] Fujii, U.; Inotsume, N.; Nakano, M.: Relative bioavailability of midazolam following sublingual versus oral administration in healthy volunteer. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11 (1988), S. 206-209.
- [10] Schwagmeier, R.; Alincic, S.; Striebel, H. W.: Midazolam pharmacokinetics following intravenous and buccal administration. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46 (1998), S. 203-206.
- [11] Mcmillan, I.: *Pharmaceutical composition containing Midazolam*. Eu. Patent, WO9909989, 1999.
- [12] *Europäisches Arzneibuch. 5.Ausgabe.8-Nachtrag, Grundwerk 2007*, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag Amtliche deutsche Ausgabe vom 2007.
- [13] Food and Drug Administration, *Guidance for industry, orally disintegrating tablets*, December 2008.
- [14] Dobbetti L.: Fast-melting tablets: developments and technologies. *Pharm. Tech.* 12 (2000), S. 32-42.

- [15] Technology Catalysts International: Orally disintegrating tablet and film technologies, 5th Edition, 2008.
- [16] Parakh, S.R.; Gothoskar, A.V.: A review of mouth dissolving tablet technologies. *Pharm. Tech.*, (2003) S. 92-100.
- [17] Gregory, G.K.E; Ho; David S.S.: Pharmaceutical dosage form Packages. US Patent 4 305 502, 1981.
- [18] Gregory, G.K.E; Peach, J.M.; Du Mayne, J.D.: Articles for carrying chemicals. US Patent 4 371 516, 1983.
- [19] Virley, P.; Yarwood, R.: Zydis-A Novel, fast-dissolving dosage form. *Manufacturing Chemist*, February (1990), S. 36-37.
- [20] Seager H.: Drug –delivery products and th Zydis fast-dissolving dosage form. *J. Pharm. Pharmacol.*, 50 (1998), S. 375-382.
- [21] Lafon, L.: Galenic form for oral administration and its method of preparation by lyophilisation of an oil in water. US Patent 4 616 047, 1986.
- [22] Gole, D.J.; Levinson, Carbone, J.; R.S.;Davies, J.D. : Preparation of pharmaceutical and other matrix systems by solid-state dissolution. US-Patent 5 215 756, 1993.
- [23] Essig, D.; Oschmann, R.: Lyophilisation. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1993.
- [24] Rey, L.: Glimpses into the Realm of Freeze-Drying: Fundamental Issues. In: Rey, Louis; May, Joan C.: *Freeze-drying/lyophilisation of pharmaceutical and biological products. Drugs and the pharmaceutical sciences.* New York: Marcel Dekker, 2004, S. 1-33.
- [25] Murgatroyd, K.: The Freeze Drying Process. In: Cameron, P.: *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice.* Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, 1997.
- [26] Oetjen, Georg-Wilhelm: *Gefriertrocknen.* Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1997.
- [27] Pikal, M. J.: Freeze drying. In: Swarbrick, J. :*Encyclopedia of pharmaceutical Technology*, New York: Marcel Dekker, 2002, S. 1299-1325.
- [28] Liu, Jinsong: Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: Technologies and applications in freeze-drying development. *Pharm. Dev. Techol.* 11 (2006), S. 3-27.
- [29] Nail, S. L.; Gatlin, L. A.: Freeze-drying: Principles and practices. In: Avis, K. E.; Lieberman, H. A.; Lachman, L.: *pharmaceutical dosage form: Parenteral Medications.* New York: Marcel Dekker, 1993.
- [30] Searles, J. A.: Freezing and annealing phenomena in lyophilisation. In: Rey, L.; May, J. C.: *Freeze-drying/lyophilisation of pharmaceutical and biological products. Drugs and the pharmaceutical sciences.* New York: Marcel Dekker (2004), S. 109-145.

- 
- [31] Searles, J. A.; Carpenter, J. F.; Randolph, T. W.: The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilisation for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J. Pharm. Sci.* 90 (2001), 860-871.
- [32] Rambhatla, S.; Ramot, R.; Pikal, M.J.: The impact of the freezing stage on lyophilization: Effects of nucleation temperature and pore size. *Proc. University of Connecticut, School of Pharmacy, Storrs, CT, USA* (2003).
- [33] Rambhatla, S.; Ramot, R.; Bhugra, C.; Pikal, M.: Heat and Mass transfer scale-up issues during freeze drying: Control and characterization of the degree of supercooling II. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* (2004), S. 1-9.
- [34] Kramer, M.; Sennhenn, B.; Lee, G.: Freeze-drying using vacuum induced surface freezing. *J. Pharm. Sci.* 91 (2002), S. 433-443.
- [35] Searles, J. A.; Carpenter, J.F.; Randolph, T. W.: Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determination of  $T_g'$  in pharmaceutical lyophilisation. *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) S. 872-887.
- [36] Jiang, S.; Nail, S.L.: Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998), S. 249-257.
- [37] Wang, W.: Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. of Pharmaceutics* 203 (2000), S. 1-60.
- [38] Chang, B.S; Randall, C. S: Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilisation. *Cryobiology* 29 (1992), S.632-656.
- [39] Franks, F.: Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998), S. 221-229.
- [40] Hatley, RHM; Franks, F.; Brown, S.; Sandhu, G.; Gray, M.: Stabilization of a pharmaceutical drug substance by freeze-drying; a case study. *Drug Stability* 1 (1996), S. 73-85.
- [41] Franks, F.: Freeze drying from empiricism of predictability. *Cryo-Letters* 11 (1990), S. 93-110.
- [42] Pikal, M. J.; Shah, S.: The collapse temperature in freeze drying, Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *Int. J. Pharm.* 62 (1990), S. 165-186.
- [43] Fonseca, F.; Passot, S.; Cunin, O.; Marin, M.: Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media. *Biotechnol. Prog.* 20 (2004), S. 229-238.
- [44] Nail, S. L.: Physical and chemical stability considerations in the development and stress testing of freeze-dried pharmaceuticals. In: Baertschi, S. W.: *Pharmaceutical stress testing: Predicting drug degradation*. Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group 2005, S. 261-291

- [45] Williams, N. A.; Dean, T.: Vials breakage by frozen mannitol solutions: correlation with thermal characteristics and effect of stereoisomerism, additives, and vial configuration. *J. Parenter. Sci. Technol.* 45 (1991), S. 94-100.
- [46] Carpenter, J. F.; Pikal, M. J.; Chang, B. S.; Randolph, T. W.: Rational design of stable lyophilized protein formulations, some practical advice. *Pharm. Res* 14 (1997), S. 969-975.
- [47] Hawe, A.; Frieß, W.: Impact of freezing procedure and annealing on the physico-chemical properties and the formation of mannitol hydrate in mannitol-sucrose-NaCl formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64 (2006), S. 316-325.
- [48] Lu, X.; Pikal, M. J.: Freeze drying of Mannitol-Trehalose- Sodium Chloride-based Formulations, the impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharm. Dev. Technol.* 9 (2004) S. 85-95.
- [49] Pikal, M.J.: Freeze-drying of protein: process, formulation, and stability. In: Cleland, J. I.; Langer, R., Eds.: *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*. ACS symposium Series 567, Washington, DC, 1994, S. 120-133.
- [50] Presser, I.: *Innovative Online Messverfahren zur Optimierung von Gefriertrocknungsprozessen*. Ludwig-Maximilians-Universität München. Dissertation, 2003.
- [51] Brülls, M.; Rasmuson, A.: Heat transfer in vial lyophilisation. *Int. J. Pharm.* 246 (2002), S. 1-16.
- [52] Pikal, M. J.; Roy, M. L.; Shah, S.: Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: Role of the Vial. *J. Pharm. Sci.* 73 (1984), S. 1224-1237.
- [53] Tang X. and Pikal M.J.: Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. *Pharm. Res.* 21, (2004), No. 2, S. 191-200.
- [54] Pikal, M. J.: Use of laboratory data in freeze drying process design: Heat and mass transfer coefficients and the computr simulation of freeze drying. *J. Parenter. Sci. Technol.* 6 (1985), S. 115-138
- [55] Mackenzie, A. P.: Basic principles of freeze-drying for pharmaceuticals. *Bulletin of parent. Drug Assoc.* 20 (1966), S.101-129.
- [56] 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. *Int. J. Pharm.* 60 (1990), S. 203-217.
- [57] Zimmermann, I.: Galenik oder wie aus einem Wirkstoff ein Arzneimittel wird (I). *Chemie in unserer Zeit* 23 (1989), S. 114-120.
- [58] Bauer, K.H.; Frömming, K.H.; Führer, C.: *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. 8 Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2006.
- [59] Jennings, T.A.: *Lyophilisation: Introduction and basic principles*. Denver, Colorado, USA: Interpharm Press/ CRC, 1999, S. 204.

- [60] Liao, X.; Krishnamurthy, R.; Suryanarayanan, R.: Influence of the active pharmaceutical ingredient concentration on the physical state of Mannitol-implications in freeze-drying. *Pharmaceutical Research* 22 (2005), S. 1978-1985.
- [61] Kim, A.I.; Akers M.J.; Nail S.L.: The physical state of Mannitol after freeze-drying- effect of Mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallization cosolute. *J. Pharm. Sci.* 87 (1998), Nr. 8, S. 931-935.
- [62] Schneid, S.; Riegger, X.; Gieseler, H.: Influence of common excipients on the crystalline modification of freeze-dried Mannitol. *Pharm. Tech.* (2008), S.178-184.
- [63] Hawe, A.; Frieß, W.: Physico-chemical lyophilisation behavior of mannitol, human serum albumin formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 28 (2006), S. 224-232.
- [64] Liao, X.; Krishnamurthy, R.; Suryanarayanan, R.: Influence of processing conditions on the physical state of mannitol-implications in freeze-drying. *Pharm. Res.* 24 (2007), S. 370-376.
- [65] Telang, C.; Yu, L.; Suryanarayanan R.: Effective Inhibition of Mannitol Crystallisation in Frozen Solution by Sodium Chloride. *Pharm. Res.* 20 (2003), S. 660-667.
- [66] Yu, L.; Milton N.; Groleau E.G.; Mishra D.S.; Vansickle R.E.: Existence of a Mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications. *J. Pharm. Sci.* 88 (1999), Nr. 2, S. 196-198.
- [67] Johnson, R. E.; Kirchhoff, C. F.; Gaud, H. T.: Mannitol-Sucrose mixtures-versatile Formulations for protein lyophilization. *J. Pharm. Sci.* 91 (2002), S. 914-922.
- [68] Jachwicz, R.; Nürnberg, E.: Enhanced release of oxazepam from tablets containing solid dispersions. *Int. J. Pharm.* 159 (1997), S. 149-158.
- [69] Betageri, G.V.; Markarla, K.R.: Enhancement of dissolution of glyburide by solid dispersion and lyophilization techniques. *Int. J. Pharm.* 126 (1995), S. 155-160.
- [70] Cavallari, C.; Luppi, B.; Di Pietra, A.M.; Rodriguez, L.; Fini, A.: Enhanced release of Indomethacin from PVP/Stearic acid microcapsules prepared coupling co-freeze-drying and ultrasound assisted spray-congealing process. *Pharm. Res* 24 (2007), S. 521-529.
- [71] Chang, B.S.; Randall, C.S.: Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* 29 (1992), S. 632-656.
- [72] Chang, B.S.; Beauvais, R.M.; Dong, A.; Carpenter, J.F.: Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* 331 (1996), S. 249-258.
- [73] Chatterjee, K.; Shalaev, E.; Suryanarayanan, R.: Partially crystalline systems in lyophilisation- II. Withstanding collapse at high primary drying temperature and impact on protein activity recovery. *J. Pharm. Sci.* 94, (2005), S. 809-820.
- [74] Rambhatla, S.; Pikal, M.J.: Heat and mass transfer issues in freeze-drying process development. In Costantino, H. R.; Pikal, M.J.: *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. USA: AAPS Press, (2004), S. 75-111.

- [75] Fox, T.G.: Second order transition temperatures and related properties of polystyrene, I. influence of molecular weight. *J. Appl. Phys.* 21 (1950), S. 581-591.
- [76] Carpenter, J.F.; Pikal, M.J.; Chang, B.S.; Randolph, T.W.: Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharm. Res* 14 (1997), S. 969-975.
- [77] Hateley, R.H.: Glass fragility and the stability of pharmaceutical preparations-excipient selection. *Pharm. Dev. Technol.* 2 (1997), S. 257-264.
- [78] Fitzpatrick, S.; Saklatvala, R.: Understanding the physical stability of freeze dried dosage forms from the glass transition temperature of the amorphous components. *J. Pharm. Sci.* 92 (2003), S. 2495-2501.
- [79] Gerecke, M.: Chemical structure and properties of Midazolam compared with other Benzodiazepines. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 16 (1983), S. 11-16.
- [80] Pieri, L.: Preclinical pharmacology of Midazolam. *Br. J. Clin. Pharmacol* 16 (1983), S.17-27.
- [81] Carstens, G; Langer-Sobczyk,J.; Mana, D.: Prämedikation bei ambulanten Eingriffen an Kindern. *Krankenhauspharmazie* 11 (1990), S. 11-14.
- [82] Kommentar zur Ph.Eur.4.05; 0330, Gelatine. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 19. Lfg. 2005
- [83] Fiedler, H.P.: Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete. Aulendorf: Editio Cantor Verlag, 1996.
- [84] Babel, W.: Gelatine in pharmaceutical applications. *Pharmaceutical manufacturing and packing source* (2000), S. 3-8.
- [85] Meister, E.; Klerner, S.; Gieseler, H.: Gefriertrocknungsmikroskopie. *DAZ*, (2006), Nr. 24, S. 44-49.
- [86] Andersin, R.; Tammilehto, S.: Photochemical decomposition of midazolam- IV. study of pH-dependent stability by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharam.* 123 (1995), S. 229-235.
- [87] Beyer, C.; Maasz, J.: Röntgendiffraktometrie in der Pharmazie. *Pharmazie in unserer Zeit* 16 (1987), S. 12-29.
- [88] Cordes,D.: Erzeugung von Kristallgitterdefekten zur Verbesserung der Lösungsigenschaften schwerlöslicher Wirkstoffe. Universität Kiel, Dissertation, 1997.
- [89] O’Braien, F. E. M.: The control of humidity by saturated salt solution. *J. Sci. Instrum.* 25 (1948), S. 73-76.
- [90] Zimmermann, I.: Galenik oder wie aus einem Wirkstoff ein Arzneimittel wird (II). *Chemie in unserer Zeit* 23 (1989), S. 114-120.

- [91] Gallo, B.; Alonso, R.M.; Vicente F; Vire J-C.; Patriarche G.J.: Photometric flow injection determination of psychotropic drugs: Brotizolam and Midazolam. *Analytical letters* 21 (1988), S. 1211-1220.
- [92] Andersin Ritta: Solubility and acid –base behaviour of midazolam in media of different pH, studied by ultraviolet spectrophotometry with multicomponent software. *J. Pharm. Biomed Anal.* 9 (1991), Nr. 6, S. 451-455.
- [93] Zimmermann I.: Determination of pK<sub>a</sub> Values from solubility data. *Int. J. of Pharmaceutics* 13 (1983), S. 57-65.
- [94] Zimmermann I.: Determination of overlapping pK<sub>a</sub> values from solubility data. *Int. J. of Pharmaceutics* 31 (1986), S. 69-74.
- [95] Clarke's Isolation and Identification of drugs. (2nd edn), London: the Pharmaceutical Press (1986), S. 785.
- [96] Walser, A.; Benjamin, L.E.; Flynn, T.; Mason, C.; Schwartz, R.; and Fryer, R.I.: Quinazolines and 1,4-benzodiazepines: 84. Synthesis and reaction of imidazol [1,5a][1,4] benzodiazepines. *J.Org. Chem.* 43 (1978), S. 936-944.
- [97] Bhatt-Mehta, V.; Johnson, C.E; Kostoff, L.; Rosen, D.A: Stability of midazolam hydrochloride in extemporaneously prepared flavored gelatin. *Am. J. Hosp. Pharm.* 50 (1993), S. 472-475.
- [98] Steedman, SL; Koonce, J.R.; Wynn, J.E.; Brahen NH: Stability of midazolam hydrochloride in a flavored, dye-free oral solution. *Am. J. Hosp. Pharm* 49 (1992), S. 615-618.
- [99] Her, L.M.; Nail, S.L.: Measurement of glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes by differential scanning calorimetry. *Pharm. Res.* 11 (1994), 54-59.
- [100] Chandrasekhar, R.; Hassan, Z.; Alhusban, F.; Smith, A.M.; Mohammed, A.R.: The role of formulation excipients in the development of lyophilised fast-disintegrating tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009), S. 119-129.
- [101] Liu Jinsong: Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states. *Pharm. Dev. Technol* 11 (2006), S. 3-28.
- [102] Chitra Telang: Lian Yu, and Raj Suryamarayanan. Effective Inhibition of Mannitol Crystallisation in Frozen Solution by Sodium Chloride. *Pharm. Res.* 20 (2003), Nr. 4, S. 660-667.
- [103] Kramer M.: Innovatives Einfrierverfahren zur Minimierung der Prozesszeit von Gefriertrocknungszyklen. Universität Erlangen, Dissertation, 1999.
- [104] R. K. Cavatur; N. M. Vemuri; A. Pyne; Z. Chrzan; D. Toledo-Velasquez; and R. Suryanarayanan: Crystallisation behaviour of Mannitol in frozen aqueous solution. *Pharm. Res.* 19 (2002), Nr. 6, S. 894-900.
- [105] Charng, D.S.; Randall, C.S.: Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilisation. *Cryobiology* 29 (1992), S. 632-656.

- [106] Qun Lu; G. Zografi: Properties of citric acid at the glass transition. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997), Nr. 12, S. 1374-1378.
- [107] Beirowski, J.; Passos, A.P.; Inghelbrecht, S.; Arien, T.; Van Asche, I; Gieseler, H.: Impact of steric stabilizer concentration on trehalose in freeze drying of nanosuspensions. AAPS National Biotechnology conference, Seattle (WA), USA, 2009.
- [108] Meister, E.; Gieseler, H.: Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding class transition data. *J.Pharm. Sci.* 98 (2009), S. 3072-3087.
- [109] Colandene, J.D.; Maldonado, L.M.; Creagh, A.T.; Vrettos, J.S.; Coad, K.G.; Spitznagel, T.M.: Lyophilization cycle development for a high-concentration monoclonal antibody formulation lacking a crystalline bulking agent. *J. Pharm. Sci.* 96 (2007), S. 1598-1608.
- [110] Passot, S.; Fonseca, F.; Alarcon-Lorca, M.; Rolland, D.; Marin, M.: Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005), S. 335-348.
- [111] Hancock B.C.; Zografi G.: The relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids. *Pharm. Res.* 11 (1994), Nr. 4, S. 471-477.
- [112] Mallindine, K.: Qualitative Determination of the extent of mannitol crystallisation in a freeze-dried tablet (Zydis). Cardinal Health pharmaceutical Development.
- [113] Webb, S.D.; Cleland J. L.; Carpenter J. F. ; Randolph T. W.: Effect of Annealing lyophilized and spray-lyophilized formulation of recombinant human interferon- $\gamma$ . *J. Pharm. Sci.* 92 (2003), S. 715-729.
- [114] Gieseler, H.: Product morphology and drying behavior delineated by a new freeze-drying microbalance. Universität Erlangen, Dissertation, 2004.
- [115] Odou.P.; Barthelemy, C.; Robert H.: Development of midazolam sublingual tablets: in vitro study. *Eur. J. Drug and Metab. Pharmacokinet.* 23 (1998), S. 87-91.
- [116] Zhang, J.; Suyi N.; Zhang H.; J.B. Streisand: Oral mucosal absorption of midazolam in dogs is strongly pH dependent. *J. Pharm. Sci.* 91 (2002), S. 980-982.
- [117] Roth C.; Ein Mikro-Waageverfahren zur Kontinuierlichen Bestimmung der Sublimationsgeschwindigkeit während der Gefriertrocknung. Universität Erlangen, Dissertation, 2000.
- [118] Bedienungsanleitung der Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4 mit Anlagensteuerung LDC-1M, Martin Christ GmbH, Osterode, Deutschland, 2005, S. 31.
- [119] Bohnacker, R.; Streil, F.; Schwizer, S.; Müller, I.: Bestimmung der Zerfallszeit von Schmelztabletten mit Hilfe der Texture Analyser-Methode. *Pharma. Industrie* 67 (2005), S. 327-335.

- 
- [120] Europäisches Arzneibuch. 5.Ausgabe, 8- Nachtrag, Grundwerk 2007, Deutscher Apotheker Verlag Amtliche deutsche Ausgabe, 2007.
- [121] Hao, J., Heng, P.W.S.: Buccal delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29 (2003), S. 821-832.
- [122] Loftsson, T.: Cyclodextrins and the Biopharmaceutics classification system of drugs: *J. of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 44 (2002), S. 63-67.
- [123] Hughes, L.: Tightening up buccal testing. *Manuf. Chem.* 74 (2003), S. 28-39.
- [124] Siewert, M.; Dressman, J.; Brown, C. K.; Shah V. P.: FIP/AAPS Guidelines to dissolution/in Vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 4, 2003.
- [125] Münzel, K.; Büchi, J.; Schultz, O.: *Galenisches Praktikum*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1959, S. 916-926.
- [126] Walters, E.: How are bitter and sweet tastes related?. *Trends in Food Science & Technology*, 7 (1996) S. 399-403.
- [127] Technical Data Sheet von Pfefferminz-aroma natuerlich. Symrise AG, 2008
- [128] Europäisches Arzneibuch. 6.Ausgabe (2,8,15), Grundwerk 2008, Deutscher Apotheker Verlag Amtliche deutsche Ausgabe, 2008.
- [129] Grimm, W.; Schepky, G.: *Stabilitätsprüfung in der Pharmazie*. Aulendorf: Editio Canor, 1980.
- [130] Hancock, Bruno C; Zografi, G.: The relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids. *Pharm. Res.* 11 (1994), Nr. 4.
- [131] Deutsche Arzneimittel-Codex. ABDA, 2004. M-135, Midazolamhydrochlorid.
- [132] N.M., D’Cruz; L.N. Bell: Thermal unfolding of gelatin in solids as affected by the glass transition. *J. Food Sci.* 70 (2005), S. 64-68.