

**Untersuchungen an lyophilisierten Arzneistoffen am Beispiel
von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz
(Prednisolut® 100 mg N)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Sven Claußen

geb. am: 09.03.1971 in Jena

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. R. H. H. Neubert, Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich
Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Prof. Dr. rer. nat. habil. M. Dittgen, Schering AG / SBU G&A / Strategic Business
Development

Prof. Dr. rer. nat. habil. K. Mäder, Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich
Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Halle (Saale), 27.02.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006514

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006514>]

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CMC - kritische Mizellbildungskonzentration

CPA - Kryoprotektiva

CZE - Kapillarelektrophorese

D - Diffusionskoeffizienten

DLS - dynamische Laserbeugung

DSC - Differential Scanning Calorimetrie

DMSO - Dimethylsulfoxid

DTG - Differenzierte Thermo-Gravimetrie-Kurve

EOF - elektroosmotischer Fluss

ESEM - Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie

FT-IR - Fourier-Transformations Infrarot-Spektroskopie

HPLC - Hochleistungsflüssigchromatographie

K - Kelvin

mAU - Rausch

MFCS - maximally freeze-concentrated solution

M - molar

m/V - Masse pro Volumen

pH - pH-Wert

R - Korrelationskoeffizient

REM - Rasterelektronenmikroskopie

R.S.D. (A) - relative Standardabweichung über die Fläche

R.S.D. (T) - relative Standardabweichung der Zeit

T_e - eutektische Temperatur

T_f - Gefrierpunkt

Abkürzungsverzeichnis

T_g - Glasübergangstemperatur der MFCS

TG - Thermogravimetrie

μ_e - Ionenmobilität

μ_{EOF} - elektroosmotische Mobilität

XRPD - Röntgendiffraktometrie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG.....	6
2	THEORETISCHER TEIL.....	12
2.1	Gefriertrocknung	12
2.1.1	Einfrieren.....	13
2.1.2	Haupttrocknung.....	19
2.1.3	Nachtrocknung.....	21
2.2	Methoden zur Charakterisierung von Lyophilisaten	22
2.2.1	Röntgendiffraktometrie.....	22
2.2.2	Differential Scanning Calorimetrie and Thermogravimetrie gekoppelt mit Online-Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie.....	23
2.2.3	Wasserbestimmung nach Karl-Fischer	24
2.2.4	Auflicht-, Rasterelektronenmikroskopie und Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie.....	25
2.2.5	Phototensiometrie und Kapillarelektrophorese.....	26
2.2.6	Dynamische Lichtstreuung.....	27
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Charakterisierung der Lyophilisate von Prednisolut® 100 mg N, Urbason® solubile forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica durch Röntgendiffraktometrie.....	30
3.2	Analyse des Lyophilisates von Prednisolut® 100 mg N durch Differential Scanning Calorimetrie and Thermogravimetrie gekoppelt mit Online-Fourier- Transformations-Infrarot-Spektroskopie.....	32
3.3	Einflussgröße Puffer und Restfeuchte auf die Glasübergangstemperatur von Glucocorticoidester-Lyophilisaten	41
3.4	Untersuchung der Morphologie des Lyophilisates von Prednisolut® 100 mg N durch Auflicht-, Rasterelektronenmikroskopie sowie durch Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie.....	47
3.5	Untersuchungen zur Mizellbildung.....	55
3.5.1	Ermittlung der kritischen Mizellbildungskonzentrationen der rekonstituierten Lösungen von Prednisolut® 100 mg N, Urbason® soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica durch Phototensiometrie und Kapillarelektrophorese	55
3.5.2	Kapillarelektrophoretische Quantifizierung des Wirkstoffgehaltes rekonstituierter wässriger Lösungen von Prednisolut® 100 mg N, Urbason® solubile forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica sowie der Wirkstoffe im Blutplasma.....	60

3.5.3	Charakterisierung der Mizellen rekonstituierter wässriger Lösungen von Prednisolut® 100 mg N, Urbason® soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica durch dynamische Lichtstreuung.....	69
3.5.4	Charakterisierung der mizellaren wässrigen Lösung von Prednisolut® 100 mg N durch dynamische Lichtstreuung in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke	75
4	ZUSAMMENFASSUNG UND BEWERTUNG.....	83
5	MATERIALEN UND METHODEN	87
5.1	Angaben zu den untersuchten Arzneimitteln.....	87
5.1.1	Prednisolut® 100 mg N.....	87
5.1.2	Urbason® soluble forte 1000	88
5.1.3	Hydrocortison 100-Rotexmedica	89
5.2	Angaben zur Herstellung der untersuchten Prednisolut®-Lyophilisate	90
5.2.1	Gefriertrocknung	90
5.3	Methoden zur Charakterisierung der untersuchten Lyophilisate	93
5.3.1	Röntgendiffraktometrie.....	93
5.3.2	Differential Scanning Calorimetrie.....	94
5.3.3	Thermogravimetrie gekoppelt mit Online-Fourier-Transformations Infrarot-Spektroskopie	95
5.3.4	Wasserbestimmung nach Karl-Fischer	96
5.3.5	Auflichtmikroskopie	97
5.3.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	97
5.3.7	Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie	98
5.3.8	Phototensiometrie	98
5.3.9	Kapillarelektrophorese	99
5.3.10	Dynamische Lichtstreuung.....	100
6	PUBLIKATIONEN.....	103
7	LITERATUR.....	104

1 Einleitung und Zielstellung

Die Lyophilisierung ist bei pharmazeutischen Produkten eine anerkannte Methode, um instabile Wirkstoffe in anwendungs- und lagerungsfähige Formen, wie sterile Injektionsformen oder Tabletten zu überführen. [1]. Das Ziel dieses Verfahrens besteht in der schonenden Entfernung von Wasser aus Lösungen von Wirkstoffen und Stoffgemischen.

Der zur Herstellung von Lyophilisaten durchzuführende Prozess besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten:

- Einfrieren der Wirkstofflösung unter Atmosphärendruck,
- Haupttrocknung unter Vakuumbedingungen, wobei das Lösungsmittel Wasser durch Sublimation entfernt wird
- Sekundärtrocknung unter Vakuumbedingungen, in der der Restwassergehalt durch Desorption auf ein Minimum reduziert wird.

Dabei wird der Wassergehalt soweit reduziert, dass bakterielles Wachstum ausgeschlossen wird oder chemische Reaktionen, wie z. B. eine Hydrolyse nicht mehr stattfinden können bzw. auf ein Minimum reduziert werden. Die Abfüllung der Wirkstofflösung unter Inertgas oder die Begasung des Lyophilisates, z. B. mit Stickstoff, üben dabei zusätzlich eine schützende Funktion gegen Redoxreaktionen aus. Zum Schutz von lichtempfindlichen Wirkstoffen ist die Verwendung von Braunglas als Primärpackmittel notwendig.

Das Einfrieren der Wirkstofflösung stellt den wichtigsten Prozessschritt dar. Die dabei erzeugte physiko-chemische Struktur des Wirkstoffes im gefrorenen Produkt entscheidet, unter welchen Bedingungen eine Gefriertrocknung durchgeführt werden kann. Die Auswirkungen von Einfriereschwindigkeiten, verwendeten Hilfsstoffen (Strukturbildner und CPA) und Schichtdicken haben einen entscheidenden Einfluss

Einleitung und Zielstellung

auf die Art, Qualität und Stabilität des entstehenden Lyophilisates [2, 3]. Zusätze anorganischer Salze dienen der Einstellung der Isotonie und Puffersubstanzen zur Stabilisierung des pH-Wertes des Lyophilisates bzw. der rekonstituierten gebrauchsfertigen Arzneimittellösung. CPA wie Dextran oder Glycerol unterstützen eine schonende Lyophilisierung und Gerüstsubstanzen wie Mannitol werden erforderlicherfalls zugegeben, um dem Lyophilisat eine Struktur zu geben [4]. Der Feststoffanteil dieser Zusätze liegt dabei im Bereich von 2 % bis maximal 30 % [5, 6, 7].

Das Hauptziel der Gefriertrocknung, ein lagerfähiges, stabiles und nach der Rekonstitution unverändertes Ausgangsprodukt zu erhalten, hängt aber auch entscheidend von der Haupt- und Nachrocknung sowie weiterhin von den Lagerungsbedingungen des gefriergetrockneten Produktes im Primärpackmittel ab [8, 9, 10].

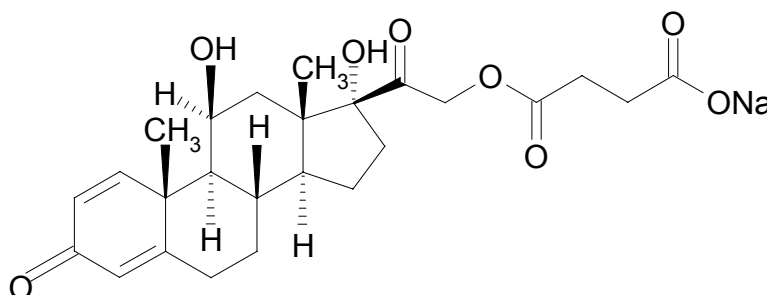
Die Gefriertrocknung erlangte die erste großtechnische Bedeutung während des 2. Weltkrieges zur stabilen Lagerung von Penicillinen und Blutplasma in den USA [11, 12]. Flosdorf beschrieb 1949 den Beginn des industriellen Einsatzes der Gefriertrocknung zur Herstellung von haltbarem Blutplasma und Penicillin [13].

Im Rahmen der Entwicklung und industriellen Herstellung von Lyophilisaten müssen eine Reihe von Daten hinsichtlich des Verhaltens und der Stabilität des arzneilich wirksamen Bestandteils beim Lyophilisierungsprozess untersucht und beachtet werden [14, 15, 16]. Die speziellen physikalischen Bedingungen des Gefriertrocknungsprozesses bestimmen neben den o.g. Zusätzen im Wesentlichen die Eigenschaften des Produktes hinsichtlich seiner Bildung von Eutektika und amorphen Gläsern. Dass auch Arzneistoffe Glaszustände bilden können, wurde bei thermomikroskopischen Untersuchungen festgestellt [17, 18, 19, 20]. Dabei hat der

Einleitung und Zielstellung

Lyophilisierungsprozess auf die Umwandlungstemperaturen von Kristallstrukturen einen entscheidenden Einfluss [21, 22]. Hancock untersuchte die Molekülmobilität von amorphen pharmazeutischen Stoffen unterhalb und oberhalb ihrer Glasumwandlungstemperatur im Hinblick auf Voraussagen über deren Stabilität [23, 24]. Bei amorphen Produkten muss auch in der Nachtrocknung die Temperatur dosiert angehoben werden, um sicherzustellen, dass die mit abnehmendem Wassergehalt ansteigende Glasübergangstemperatur nicht überschritten wird und damit zum Strukturverlust des Lyophilisatkuchens führt.

Neben dem wissenschaftlichen Interesse war das Ziel der Arbeit die physikochemische und optisch morphologische Charakterisierung des bei der Jenapharm GmbH & Co. KG entwickelten lyophilisierten Glucocorticoidester-Arzneimittels Prednisolut® 100 mg N. Die Struktur von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz ist nachfolgend dargestellt:



Im Rahmen der frühen Entwicklungsphase und späteren Herstellungsverifizierung von solchen lyophilisierten Arzneiformen sind diese Untersuchungen zur Charakterisierung des Lyophilisates von entscheidender Bedeutung zur Erhaltung und Sicherung konstanter Arzneimittelqualität.

Die Festlegung solcher Rahmenbedingungen des Herstellungsprozesses ist auch die grundsätzliche Voraussetzung zur Sicherung einer ausreichend langen Stabilität des

Einleitung und Zielstellung

Fertigarzneimittels, insbesondere bei der Rekonstitution des hergestellten Lyophilisates zur gebrauchsfertigen Injektionslösung.

Zur Erreichung dieses Zieles war die Selektion der aussagefähigsten physikochemischen Methoden, die möglichst auch in den wichtigsten Arzneibüchern zitiert werden, sowie geeigneter optischer Verfahren erforderlich.

Mit diesen Methoden sollten folgende arzneimittelsqualitätsbestimmende Parameter charakterisiert und beschrieben werden:

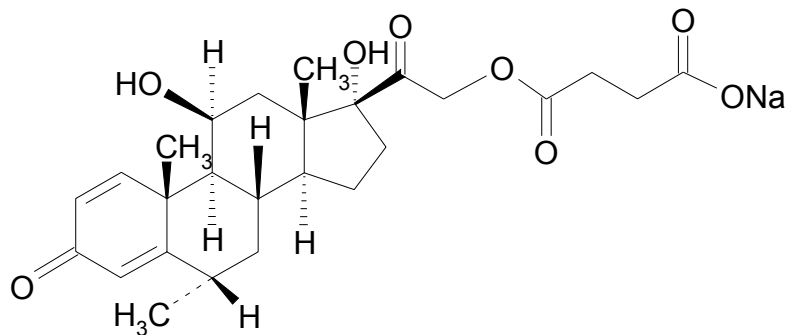
- Innere Struktur des Lyophilisatkuchens bei produktionstechnischer Herstellung mittels Röntgendiffraktometrie, Differential Scanning Calorimetrie und Thermogravimetrie
- Einfluss der Pufferkonzentration und der Restfeuchte auf die strukturelle Qualität des Lyophilisatkuchens, untersucht mit Differential Scanning Calorimetrie, Thermogravimetrie und Restfeuchtebestimmung (Wasser) nach Karl-Fischer
- Morphologische Beschreibung des Lyophilisatkuchens bei produktionstechnischer Herstellung mittels Auflichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie
- Mikroskopische Untersuchung des simulierten Einfriervorganges der zu lyophilisierenden Prednisolut[®]-Lösung mittels Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie
- Beschreibung der Struktur des Prednisolon-21-hydrogensuccinates in gepufferten wässrigen Lösungen vor dem Lyophilisieren und nach Rekonstitution des Lyophilisatkuchens zur gebrauchsfertigen Injektionslösung einschließlich quantitativer Bestimmungen (auch im Blutplasma) mittels Phototensiometrie, Kapillarelektrophorese und dynamischer Lichtstreuung.

Prednisolut[®] 100 mg N ist ein steriles Lyophilisat des Natriumsalzes von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, das nach Rekonstitution mit dem beigefügten Lösungsmittel

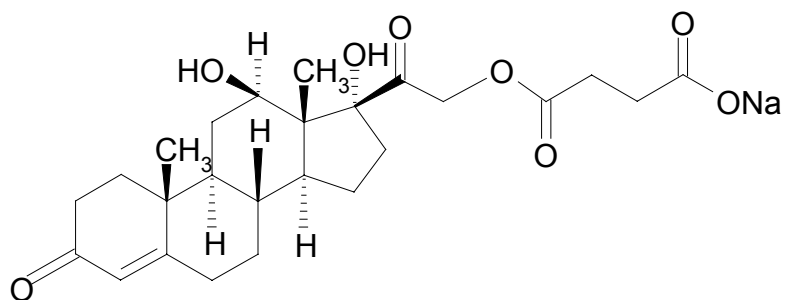
Einleitung und Zielstellung

Wasser für Injektionszwecke für die intravenöse, intramuskuläre und intraarterielle Anwendung zugelassen ist. Das Arzneimittel ist insbesondere indiziert zur systemischen Glucocorticoidtherapie bei Notfällen (z. B. Schockzustände, schwere allergische Reaktionen) und zur Initialtherapie entzündlicher Erkrankungen [25]. Das gefriergetrocknete Pulver zur Herstellung von Injektionslösungen wird mit dem Lösungsmittel Wasser für Injektionszwecke in Durchstechflaschen in Verkehr gebracht. Die Injektionslösung wird frisch zubereitet und ist frei von Konservierungsstoffen [26].

Als Referenzproben dieser Untersuchungen wurden die industriell hergestellten Lyophilisate folgender Wirkstoffe eingesetzt:



Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Wirkstoff von Urbason® soluble forte 1000)



Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Wirkstoff von Hydrocortison 100-Rotexmedica)

Einleitung und Zielstellung

Die Referenzproben haben eine ähnliche Formulierung (keine Gerüstbildner) und stammen aus der gleichen Stoffgruppe der gefriergetrockneten Glucocorticoidester.

2 Theoretischer Teil

2.1 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung ist ein geeignetes Verfahren zur Herstellung von Arzneistoffzubereitungen, wenn andere Trocknungs- oder Stabilisierungsmethoden nicht anwendbar sind. Da die Gefriertrocknung jedoch technologisch sehr aufwendig und kostenintensiv ist, sollte eine Abwägung des Aufwandes gegenüber alternativen Verfahren getroffen werden.

Bei der Herstellung von Lyophilisaten im pharmazeutischen Bereich können aufgrund der spezifischen Anforderung der Wirkstoffe unterschiedliche Wege gewählt werden. Meist werden Wirkstofflösungen, die später als Injektabilia eingesetzt werden, direkt in der Primärverpackung (Ampulle, Durchstech- oder Infusionsflasche) getrocknet. Vor der Anwendung wird ein Rekonstitutionsmedium wie Wasser für Injektionszwecke oder isotonische Natriumchloridlösung zugegeben. Weitere pharmazeutische Anwendungen sind Gefriertrocknungen in Doppelkammerfertigspritzen oder in Tablettenblister [21]. Auch die „Bulkware“-Gefriertrocknung von Wirkstoffen, Wirkstoffgemischen bzw. wirkstoffhaltigen Zwischenprodukten auf dafür speziell gefertigten Platten, Tellern oder Schalen wird als pharmazeutisch genutzte Technologie angewandt. Das Lyophilisat wird danach weiterverarbeitet.

Eine fortlaufende Gefriertrocknung ist in kontinuierlich arbeitenden Trocknungstunneln möglich: Dabei wird die zu lyophilisierende Wirkstofflösung auf gekühlten Bändern eingefroren oder in ein Kühlmedium eingetropft. Im erstarrten Zustand wird die eingefrorene Wirkstofflösung in einen evakuierbaren Trocknungstunnel überführt, in dem dann die Gefriertrocknung erfolgt. Dies ermöglicht einen besonders hohen Produktdurchsatz. Der Nachteil liegt in der

aufwendigen Weiterverarbeitung unter den extremen Trocknungsbedingungen, speziell bei der Einwaage und hat daher im pharmazeutischen Bereich geringere Bedeutung [17, 27].

2.1.1 Einfrieren

Beim ersten Schritt des Einfrierens wird die zu lyophilisierende Wirkstofflösung in den festen Aggregatzustand überführt. Dabei handelt es sich meist um Lösungen aus komplexen Mehrstoffsystemen bestehend aus Wirkstoff und Hilfsstoffen in Wasser als Lösungsmittel.

Da das Wassermolekül durch ein ausgeprägtes Dipolmoment gekennzeichnet ist, kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und einer geordneten Struktur. Wasser kann in verschiedenen Kristallgitterstrukturen existieren (Abb. 1). Kristallines Wasser besteht aus regelmäßig angeordneten Sauerstoff- und Wasserstoffatomen in einem hexagonalen Kristallgitter, das unter verschiedenen Bedingungen ausgebildet werden kann [17, 28].

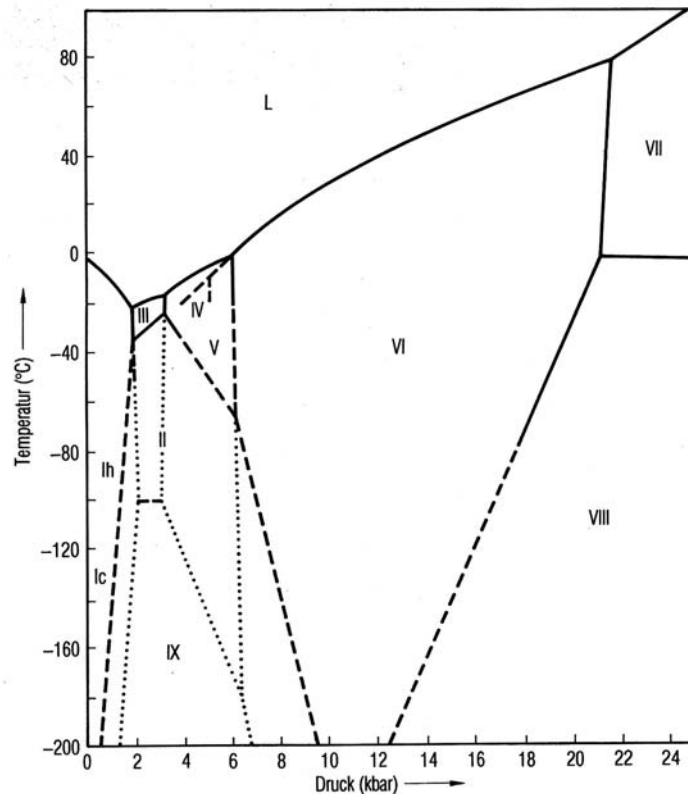


Abb. 1: Phasendiagramm des Wassers mit den verschiedenen Modifikationen von Eis in Abhängigkeit vom Druck (L=flüssiges Wasser, Ih=hexagonales Eis, II bis IX=Kristallformen von Eis), [17]

Beginnt die Eisbildung in reinem Wasser (Gefrierpunkt 0 °C), sind keine Kristallisationskeime sondern nur sogenannte Molekülcluster vorhanden, die je nach Größe und Form in Abhängigkeit von der herrschenden Temperatur als Kristallisationskeime dienen (homogene Keimbildung). Die Zahl und Größe der Cluster im Wasser nimmt mit sinkender Temperatur zum Gefrierpunkt ab.

Da ein Kristallisationskeim an seinen Ecken schneller wächst, als an seinen Innenstellen, bilden sich Eissterne von charakteristischem Erscheinungsbild, die im Zuge des Wachstums immer mehr einer Verzweigung unterliegen. Größe und Struktur eines solchen Eissterns sind abhängig von der Abkühlgeschwindigkeit und Unterkühlung [17, 28], (Abb. 2).

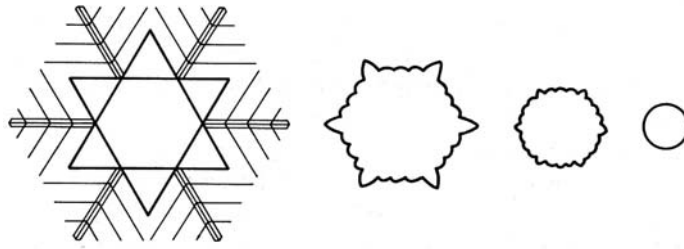


Abb. 2: Wachstum von Eiskristallen in Wasser bei von links nach rechts zunehmender Unterkühlung

Die Eisbildung in einer Wirkstoff- bzw. Wirkstoffgemischlösung zeigt dagegen ein anderes Kristallisationsverhalten. In der Lösung befinden sich Partikel, die als Kristallisationskeime fungieren (heterogene Keimbildung) und die Eiskristallbildung erleichtern. Zuerst tritt eine Keimbildung auf, infolge derer Kristalle in der Flüssigkeit wachsen. Eine wässrige Lösung muss nicht am tatsächlichen Gefrierpunkt gefrieren, sondern lässt sich auch deutlich unter den Gefrierpunkt unterkühlen. Die Unterkühlung von reinen Lösungen beruht auf dem Fehlen von Kristallisationskeimen. In der Praxis ist immer mit der Anwesenheit einer Verunreinigung zu rechnen, an deren Oberfläche eine heterogene Keimbildung ausgelöst wird. Das Ausmaß der auftretenden Unterkühlung wird von der Art und Menge der gelösten Substanzen beeinflusst, so dass Lösungen unterschiedlich stark unterkühlt werden können [29]. An partikelfreien Lösungen, wie sie für die parenterale Applikation nach dem Arzneibuch gefordert werden [4], können Unterkühlungen bis zu 15 K unter die eutektische Temperatur beobachtet werden. Die Folge einer plötzlich einsetzenden Kristallisation sind schnell ablaufende Einfriervorgänge [23].

Beim Einfrieren zeigen Lösungen mit gut kristallisierenden Inhaltsstoffen ein eutektisches Einfrierverhalten: Zuerst wird Wasser als Eis auskristallisiert und die verbleibende gesättigte Lösung wird aufgrund des weiteren Auskristallisierens von Eis immer mehr aufkonzentriert [28, 30]. Man spricht dabei von der sogenannten

„Gefrierkonzentration“. Durch diese Aufkonzentrierung sinkt auch der Gefrierpunkt der verbleibenden Lösung. Beim Erreichen der maximal gefrierkonzentrierten Lösung (MFCS) kristallisieren Wasser und gelöste Substanzen nach Überschreiten der Löslichkeitsgrenze an der eutektischen Temperatur (T_e) gleichzeitig nebeneinander aus [29, 31].

In Abbildung 3 ist beispielhaft das Einfrierverhalten einer Natriumchloridlösung auf einer -50 °C kalten Stellplatte dargestellt.

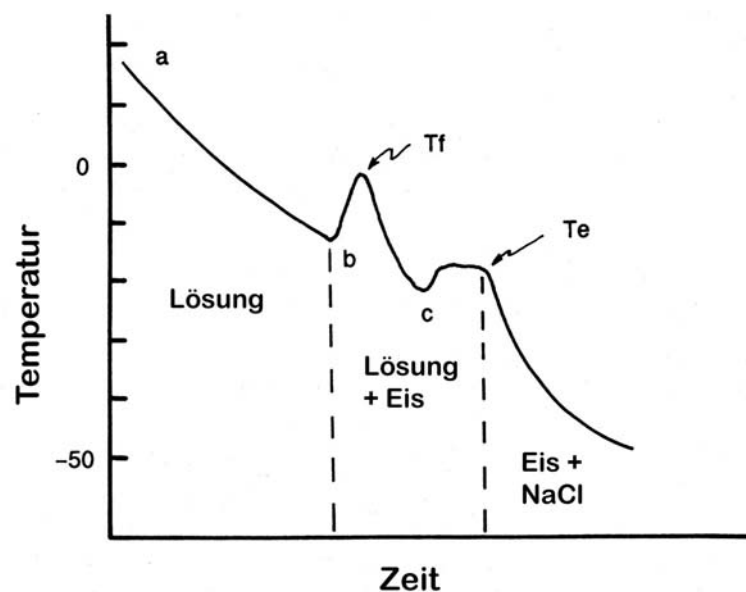


Abb. 3: Temperaturverlauf einer wässrigen Natriumchloridlösung beim Einfrieren

[17]

Aus Abbildung 3 ist zu erkennen, dass eine Unterkühlung um etwa 10 °C unter den Gefrierpunkt (T_f) erfolgt, erst dann beginnt am Punkt b Wasser als Eis auszukristallisieren. Die dabei frei werdende Kristallisationsenergie führt zu einem leichten Temperaturanstieg in der Probe. Das System, bestehend aus Eis und konzentrierter Lösung, kühlt sich nun weiter ab bis eine gesättigte Natriumchloridlösung entstanden ist. Von Punkt c an kristallisieren Natriumchlorid und Wasser gleichzeitig nebeneinander aus. Die frei werdende Kristallisationsenergie

führt wieder zu einem Temperaturplateau bis die Probe vollständig erstarrt ist und im festen Aggregatzustand vorliegt. T_e liegt in diesem Fall bei $-21,2\text{ °C}$ [29].

Chemische Stoffe wie Polyhydroxyverbindungen neigen dagegen zur Übersättigung. Sie erstarren als amorphes Glas, anstatt am eutektischen Punkt auszukristallisieren. Beim Einfrieren und der damit verbundenen Gefrierkonzentration bildet sich aufgrund der Übersättigung eine viskose Lösung, in der Diffusionsvorgänge, die für eine Kristallisation notwendig sind, sehr schwer möglich sind [32]. Deshalb kristallisiert dieses System, obwohl es thermodynamisch instabil ist, nicht aus, sondern erstarrt kinetisch als unterkühlte Flüssigkeit ohne vollständige Phasentrennung der Komponenten. Als Folge der ausbleibenden Kristallisation entstehen hohe Anteile an eingeschlossenem „ungefrorenem“ Wasser in der Glasphase. Ein solches Einfrierverhalten für Polyhydroxyverbindungen ist am Beispiel der Saccharose in Abbildung 4 dargestellt [29].

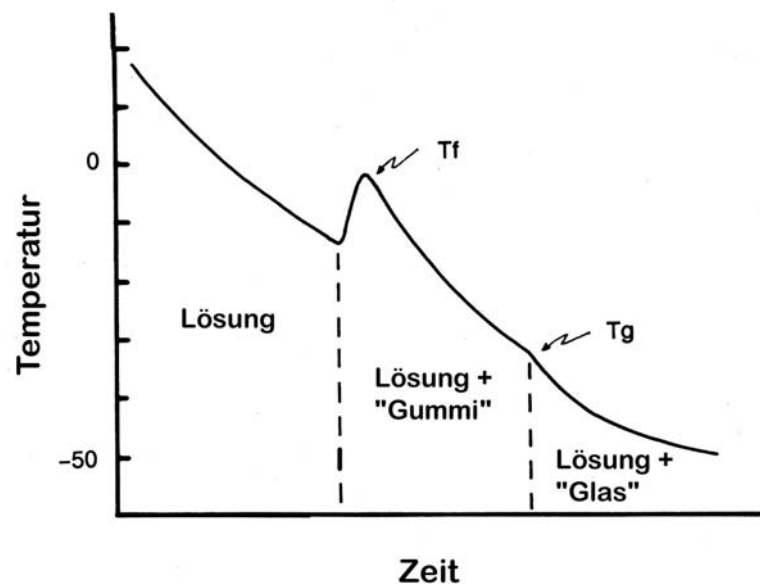


Abb. 4: Temperaturverlauf einer wässrigen Saccharoselösung beim Einfrieren als Beispiel für eine Glasbildung [29]

Die Saccharoselösung friert nach anfänglicher Unterkühlung am Punkt T_f ein, wobei die freiwerdende Kristallisationsenergie des Wassers zum kurzzeitigen Temperaturanstieg führt. Es bilden sich Eis und eine immer konzentrierter werdende Saccharoselösung. Im Verlauf der Konzentrierung nimmt die Viskosität der Lösung immer weiter zu, bis sich ein viskoelastischer „Gummizustand“ bildet. Zuletzt erstarrt dieses „gummi-elastische“ System als festes amorphes Glas. Es bildet sich ein „Glaszustand“ aus. Dieser Punkt T_g ist die Glasübergangstemperatur, die einen bestimmten Gehalt an „ungefrorenem“ Wasser aufweist [17, 33, 34].

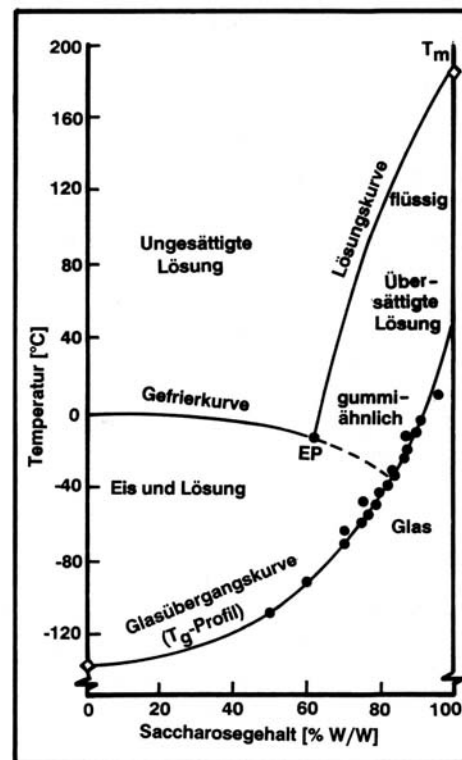


Abb. 5: Zustandsdiagramm einer wässrigen Saccharoselösung als Beispiel für Gummi- und Glasbildung [29]

Abbildung 5 zeigt ein sogenanntes „Zustandsdiagramm“ einer Saccharoselösung, welches die kinetisch metastabilen Zustände in Abhängigkeit vom Wassergehalt darstellt. Die Gefrierkurve beginnt bei 0 °C und führt über den eutektischen Punkt EP in den Bereich einer übersättigten Lösung, die bei Erreichen von T_g als Glas erstarrt.

Die Glasübergangskurve stellt eine Isoviskositätskurve dar, an der die Viskosität von der Saccharose/Wasser-Lösung den Wert von ca. 10^{14} Pas erreicht.

Dass auch Zusätze anorganischer Salze den Lyophilisationsprozess wesentlich beeinflussen, ist hinreichend bekannt. Mit der Aufkonzentrierung einer gepufferten Wirkstofflösung verschiebt sich der pH-Wert der Lösung durch die unterschiedliche Löslichkeit von Puffersalzen und führt somit zu einem zeitlich versetzten Auskristallisieren mit der Folge einer pH-Wert-Verschiebung. So ändert sich beispielsweise der pH-Wert eines Phosphatpuffers von pH 7,0 beim Einfrieren auf pH 3,5, da das Dinatriumhydrogenphosphat eine geringere Löslichkeit als das Mononatriumdihydrogenphosphat hat und daher zuerst auskristallisiert [35].

2.1.2 Haupttrocknung

In der Phase der Haupttrocknung wird das Eis mittels Sublimation direkt vom festen in den gasförmigen Aggregatzustand überführt. Dies ist nur möglich, weil Eis unter 0 °C einen ausreichenden, wenn auch geringen Dampfdruck besitzt.

Dazu muss das Phasendiagramm von Wasser betrachtet werden. In einem Punkt, dem Tripelpunkt, laufen alle Linien der Phasengrenzen zusammen. Der Tripelpunkt von reinem Wasser liegt bei $T = 273,16\text{ K}$ (0 °C) und $6,11\text{ mbar}$. Bei Drücken kleiner $6,11\text{ mbar}$ existiert zwischen dem Bereich „Fest“ und „Gasförmig“ nicht mehr der Bereich „Flüssig“. Somit kann das Wasser bei einem Druck kleiner $6,11\text{ mbar}$ vom festen in den gasförmigen Zustand übergehen, d.h. sublimieren (Abb. 6).

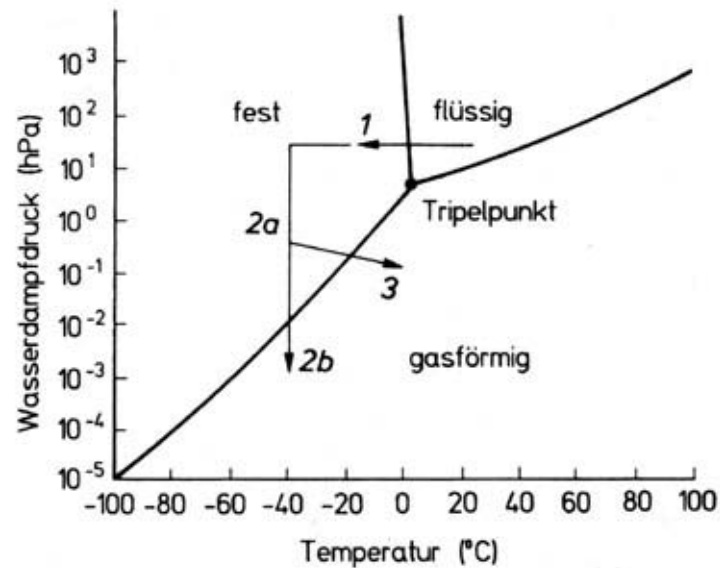


Abb. 6: Graphische Darstellung der Gefriertrocknung im Phasendiagramm des Wassers in Abhängigkeit von Druck und Temperatur, 1 Einfrieren, 2a und 2b Primärtrocknung im Vakuum, 3 Sekundärtrocknung durch Temperaturerhöhung [31]

Da es sich bei der Lyophilisierung um ein offenes System handelt, dem ständig Wasserdampf entzogen wird, ist eine vollständige Überführung des gefrorenen Lösungsmittels Wasser in Wasserdampf möglich [17].

Durch Anlegen von Vakuum kleiner 6,11 mbar wird die Sublimation erleichtert, da die Anwesenheit von Gasen den Partialdampfdruck des gefrorenen Wassers herabsetzt.

Der Gesamtdruck p_{Gesamt} des Systems setzt sich additiv aus den Partialdampfdrücken der beteiligten Gaskomponenten, hier von Eis (p_{Eis}) und Luft (p_{Luft}), zusammen (Gl. 1) [36].

$$p_{Gesamt} = p_{Eis} + p_{Luft} \quad \text{Gleichung 1}$$

Beschleunigt wird die Gefriertrocknung durch eine Temperaturerhöhung des Lyophilisates, da der Dampfdruck des gefrorenen Wassers mit der Temperatur

exponentiell zunimmt [4]. Dies wird durch die Clausius-Clapeyronsche Gleichung (Gl. 2) beschrieben [18].

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

Gleichung 2

Dabei sind p_1 und p_2 die Partialdampfdrücke, die bei den Temperaturen T_1 und T_2 vorliegen, R ist die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur und ΔH die molare Verdampfungswärme. Durch die Sublimation des gefrorenen Wassers wird ständig Energie verbraucht, welche über die Temperatur des Lyophilisatgutes nachgeliefert werden muss. Diese Energiedifferenz muss durch die Plattentemperatur, auf der das Lyophilisatgut steht, ausgeglichen werden. Dabei stellt sich ein „pseudo stabiler Zustand“ ein, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die Sublimationsrate von der zugeführten Wärmemenge abhängig ist (Gl. 3) [36].

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

Gleichung 3

Die Sublimation der Wassermenge dm pro Zeit dt wird durch die verbrauchte Wärmeenergie dQ charakterisiert. Die Sublimationsenergie ist H_s , die Sublimationsrate ist dm/dt .

2.1.3 Nachtrocknung

Als Nachtrocknung wird der Vorgang bezeichnet, bei dem das noch in der Matrix gebundene Restwasser entfernt wird. In kristallinen Matrices kann es als Hydrat-, Kristall- oder an der Oberfläche adsorptiv gebundenes Wasser vorliegen, in amorphen Matrices wie dem Glaszustand ist es in der amorphen Masse des Lyophilisates eingeschlossen.

Im Falle einer kristallinen Matrix erfolgt anfangs die Desorption und Verdampfung von Wasser an der Kristalloberfläche. Kristall- und Hydratwasser bleiben zunächst in der Matrix präsent.

Bei amorphen Lyophilisaten, die bis zu 40 % Wasser einschließen können, findet eine Diffusion des Wassers aus der Glasphase an die Oberfläche statt. Dieser langsame Prozess führt dazu, dass die Nachrocknung von amorphen Lyophilisaten oftmals der geschwindigkeitsbestimmende Prozessschritt in der Gefriertrocknung ist [16, 37].

2.2 Methoden zur Charakterisierung von Lyophilisaten

2.2.1 Röntgendiffraktometrie

Die Kristallgitterzustände in den zu untersuchenden Lyophilisatkuchen können mittels Röntgendiffraktometrie als einer kristallographischen Untersuchungsmethode zur Identifizierung einer Kristallmodifikation und zur Bestimmung des Kristallinitätsgrades charakterisiert werden [38, 39, 40, 41].

Substanzen im festen Aggregatzustand werden im Allgemeinen als Festkörper bezeichnet. Sie können dabei entweder kristallin oder amorph vorliegen.

Beim Kristall liegt ein Festkörper mit langreichweitiger Symmetrie vor. Seine Bausteine (Atome und Atomgruppen) sind räumlich periodisch angeordnet.

Eine amorphe Substanz weist im Nahbereich zwar auch eine gewisse Ordnung auf, es fehlt ihr aber die räumliche Periodizität über viele Atomabstände. Beispiele für amorphe Festkörper mit nah- bis mittelreichweitiger Ordnung sind Gläser, Keramiken, Kunststoffe und metallische Gläser [42]. Mit Hilfe der Röntgen- oder Neutronenbeugung kann die Fernordnung bestimmt werden [43]. Diese Analysenmethode der Röntgendiffraktometrie ist somit zur Untersuchung des Kristallinitätsgrades von teilkristallinen, kristallinen und amorphen Festkörpern gut

geeignet. Da diese Beugungsmethode lokal begrenzte Phänomene aber nicht erfasst, können keine Erkenntnisse über die Nahordnung amorpher Festkörper gewonnen werden.

2.2.2 Differential Scanning Calorimetrie and Thermogravimetrie gekoppelt mit Online-Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

Zu den wichtigsten Methoden der Arzneistoffcharakterisierung in der Pharmazie zählen die auch in den Arzneibüchern beschriebenen Thermoanalysen [4, 44]. Zu diesen Methoden zählen:

- Differential Scanning Calorimetrie
- Thermogravimetrie

Untersucht werden temperaturabhängige Eigenschaften von Stoffen.

Die Differential Scanning Calorimetrie ist eine thermoanalytische Methode, mit deren Hilfe Veränderungen im Zustand der Materie als Funktion der Temperatur erkennbar sind. Sie wird in pharmazeutischen Industrie für Untersuchungen in der frühen Entwicklungsphase von Arzneiformen wie den Lyophilisaten häufig angewendet. [45, 46, 47].

Die Thermogravimetrie ist als Methode zur Untersuchung komplexer Substanzgemische in vielen Bereichen zur Stoffcharakterisierung seit Jahren etabliert. Bei thermischer Zersetzung von Proben dampfen die freigesetzten Komponenten unter Gewichtsverlust der Probe ab. Aussagen zur Zusammensetzung der freigesetzten gasförmigen Komponenten sind mittels Thermogravimetrie allein jedoch nicht möglich. Eine Kopplung mit Online-Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie ermöglicht eine qualitative und quantitative Bestimmung [48]. Das Gewichts-Zeit-Diagramm gibt daher charakteristische Hinweise auf die Zersetzung der Analysenprobe. Die Infrarot-Spektroskopie gilt als klassische

molekülspektroskopische Methode. Sie gibt aufgrund der Wechselwirkung von Infrarotstrahlung mit den molekularen Dipolmomenten der untersuchten Probe ein für die Substanz spezifisches Infrarotspektrum. Eine Kombination beider analytischen Methoden liefert neben dem Gewichts-Temperatur-Diagramm auch die für die freigesetzten gasförmigen Substanzen charakteristische Infrarotspektren, so dass sowohl qualitative wie auch quantitative Aussagen zur thermischen Zersetzung und zum Abbaumechanismus möglich sind. Voraussetzung für eine derartige Kopplung ist jedoch der Einsatz eines hochempfindlichen und sehr schnellen Infrarotspektrometers, um sämtliche gasförmige Fraktionen erfassen zu können.

2.2.3 Wasserbestimmung nach Karl-Fischer

Mit der in der Ph. Eur [4] beschriebenen Methode der Wasserbestimmung nach Karl-Fischer sind auch geringe Wassermengen messbar, da sowohl freies als auch gebundenes Wasser wie das Kristallwasser von Hydraten erfasst wird. Diese Methode wird dann angewandt, wenn eine Bestimmung über den Trockenverlust nicht möglich oder zu ungenau ist, wie im Falle der Restfeuchtebestimmung im Lyophilisat.

Bei der Wasserbestimmung nach Karl-Fischer wird Wasser in Anwesenheit von Schwefeldioxid, Methanol und einer geeigneten Base durch Zugabe von Jod stöchiometrisch umgesetzt (Bunsen-Reaktion). Das Wasser entstammt dabei der untersuchenden Substanz, d.h. in diesen Fällen dem in wasserfreiem Methanol gelösten Lyophilisatkuchen. Bei der praktischen Durchführung der Karl-Fischer-Titration ist zu beachten, dass alle Reagenzien vor Luftfeuchtigkeit zu schützen sind. Da Lyophilisate sehr hygroskopisch sind, würden die Lyophilisatkuchen unmittelbar nach dem Öffnen der Durchstechflasche Feuchtigkeit aus der Umgebungsluft

aufnehmen und die Analyse würde damit verfälscht. Aus diesem Grund sind die Flaschen vor der Messung auf geeignete Weise luftdicht zu verschließen.

2.2.4 Auflicht-, Rasterelektronenmikroskopie und Environmental Scanning

Elektronen Mikroskopie

Moderne mikroskopische Abbildungstechniken gewinnen in der Forschung an Bedeutung [49]. Bei der mikroskopischen Charakterisierung von Proben ist es besonders wichtig, dass diese möglichst nahe ihres "natürlichen" Zustands untersucht werden.

Die topographische räumliche Abbildung einer Oberfläche liefert Informationen über die Form, Struktur und Oberflächenbeschaffenheit der zu untersuchenden Materie.

Mit der Auflichtmikroskopie kann die Morphologie von Lyophilisaten durch Erfassung der Struktur von Poren und Kavitäten untersucht werden.

Höher auflösende Bilder liefert die Rasterelektronenmikroskopie, bei der Sekundär- und Rückstreuielektronen zur Erzeugung des Bildes genutzt werden [50, 51].

Neben der hohen Auflösung zeichnet sich die Rasterelektronenmikroskopie (REM) dadurch aus, dass eine ca. 100fach größere Schärfentiefe als in der Lichtmikroskopie erreicht wird [52, 53]. Je nach Abbildungsmodus können die Topographie der Oberfläche oder qualitativ die Veränderungen der chemischen Struktur der Kristalle sichtbar gemacht werden. Um Elektronen des Strahls abführen zu können, muss die Probe jedoch durch Goldbedampfung an der Oberfläche elektrisch leitfähig gemacht werden [54].

Eine direkte hoch auflösende Oberflächenabbildung von naturbelassenen, feuchten sowie nichtleitenden Proben ermöglicht die Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie (ESEM). Diese besonders für Objekte aus dem medizinisch-biologischen Bereich vorteilhaften Abbildungsbedingungen werden dadurch erreicht, dass der

Probenraum des Mikroskops nicht ins Hochvakuum evakuiert werden muss, sondern unter einer Gasatmosphäre im Druckbereich von 0,1 bis 10 Torr gearbeitet werden kann.

2.2.5 Phototensiometrie und Kapillarelektrophorese

Durch die statische Messung der Oberflächenspannung mit der Phototensiometrie können die physiko-chemischen Eigenschaften von Wirkstoff-Lösungen bestimmt werden. Sie ermöglicht die optische Erfassung der Tropfengeometrie und die Berechnung der Korrelation zur Oberflächenspannung.

Die Kapillarelektrophorese ist ein auch im Ph. Eur. beschriebenes elektrophoretisches Verfahren, bei dem die Trennung der geladenen Teilchen in mit Puffer gefüllten Kapillaren erfolgt [4]. Durch Anlegen von Hochspannung (0 - 30 kV) werden geladene Moleküle auf Grund unterschiedlicher Ladungszahl und Mobilität getrennt. Physiko-chemischen Eigenschaften, wie die Auflösungskonstanten [55, 56], Protein-Liganden Bindungskonstanten [57], kritische Mizellbildungskonzentrationen [58, 59, 60, 61] und thermodynamische Parameter wie Enthalpie und Entropieänderungen [62, 63] sind mit dieser Methode sehr gut messbar [64, 65, 66]. Die photometrische Detektion, meist im UV-Bereich, ist das dabei am häufigsten angewandte Prinzip in der Kapillarelektrophorese. Dazu wird die Quarzglaskapillare im Strahlengang justiert und dient selbst als Küvette. Zur Durchführung einer Trennung wird zunächst die Kapillare mit Puffer gefüllt. Anschließend wird eines der Puffergefäße gegen ein Probengefäß ausgetauscht. Die Probe wird hydrodynamisch durch Druckunterschiede oder elektrokinetisch durch kurzzeitiges Anlegen von Hochspannung in die Kapillare eingebracht. Die Probenzone ist üblicherweise nur wenige Millimeter lang. Zu Beginn der Trennung taucht das Kapillarende wieder in Puffer, so dass die elektrophoretische Trennung aus der injizierten Probenzone erfolgen kann. Bei pH-Werten über 2,5

entsteht ein elektroosmotischer Fluss (EOF). Die meisten Moleküle wandern dann nur in eine Richtung, selbst Anionen wandern in Richtung Kathode. Dadurch gelingt es, die meisten Probenmoleküle vom Kapillaranfang in Richtung Kathode durch die Detektionszelle wandern zu lassen. Negativ geladene Mizellen wandern durch den elektroosmotischer Fluss in Richtung Kathode, werden aber durch ihre Elektromigration in Richtung Anode gebremst.

2.2.6 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung ist eine Methode zur Bestimmung der Größe von Mizellen in wässrigen Lösungen. Gemessen wird die Intensität des Streulichtes eines Lasers, also einer kohärenten Lichtquelle, im rechten Winkel zu seiner Ausbreitungsrichtung. Diese Streulichtintensität $I_s(t)$ weist Fluktuationen auf, deren Ursache die Brownsche Bewegung der Teilchen ist. Durch Registrierung und Auswertung dieser Fluktuationen wird die mittlere Teilchengeschwindigkeit der untersuchten Mizellen und damit deren Größe berechnet.

Das Mess- und Auswertungsprinzip beruht auf folgenden mathematischen Zusammenhängen:

Die Geschwindigkeit der Brownschen Bewegung ist ein Maß für die Teilchengröße, sofern Viskosität und Temperatur des Lösungsmittels bekannt sind. Die Stokes-Einstein-Gleichung stellt einen Zusammenhang zwischen diesen Größen her. Diese Schwankungen enthalten Informationen über die Dynamik der Streupartikel. Um diese zu analysieren, wurde nach der Siegert-Gleichung die normierte Feld-Autokorrelationsfunktion $g^1(\tau)$ aus der Streuintensität abgeleitet [67, 68].

$$g^1(\tau) = \sqrt{1 - \frac{\langle I_s^*(t)I_s(t+\tau) \rangle}{\langle I_s^2 \rangle}}$$

Gleichung 4

Dabei sind $g^1(\tau)$ die Autokorrelationsfunktion der Intensität I und τ der zeitliche Abstand zwischen den Messpaaren.

Die Feld-Autokorrelationsfunktion $g^1(\tau)$ für monodisperse Lösungen kugelförmiger Teilchen ist

$$g^1(\tau) = e^{-q^2 D \tau}, \quad \text{Gleichung 5}$$

mit dem Streuwellenvektor $q = 4\pi n / \lambda \sin(\theta/2)$ und dem Diffusionskoeffizienten D der Teilchen [69]. Der Wellenvektor q ist abhängig von der Wellenlänge λ des einfallenden Lichts, der Brechungszahl der Lösung n und dem Streuwinkel θ . Im Fall wechselwirkungsfreier Bewegung monodisperser Teilchen ergibt die Funktion $\ln g^1(\tau)$ eine abfallende Gerade. Bei Wechselwirkungen zwischen den Teilchengrößenverteilungen weicht die Form von einer Geraden ab.

Bei polydispersen Systemen kolloidaler Teilchen muss die Gleichung 5 über eine willkürliche Verteilungsfunktion $G(D)$ integriert werden. Um das erste Moment D dieser Funktion und seine Standardabweichung δD zu erhalten, kann die sogenannte Kumulantenanalyse durchgeführt werden, indem der Logarithmus von g^1 durch ein Polynom zweiter Ordnung extrapoliert wird. Man bezeichnet dies als Kumulanten der Funktion $\ln g^1(\tau)$.

$$\ln g^1(\tau) = C - q^2 D \tau + \frac{1}{2} q^4 \delta D^2 \tau^2 \pm \dots \quad \text{Gleichung 6}$$

C ist ein experimenteller Parameter. Bei Teilchen, die im Vergleich zur Wellenlänge des einfallenden Laserlichts klein sind, ist der Diffusionskoeffizient nur von der Wechselwirkung zwischen den Teilchen (der interpartikulären Interaktion) abhängig. Er ist also eine Funktion der Konzentration c , die sich zu einer Reihe $D = D_0^*(1 \pm k_D^*c \pm \dots)$ entwickeln lässt. D_0 ist der freie Diffusionskoeffizient und k_D ein Interaktionsparameter [70]. Das Vorzeichen von k_D zeigt die Art der Kräfte zwischen

den Teilchen an: + = abstoßend; - = anziehend. Mit D_0 und δD können zwei Größenparameter berechnet werden [71].

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad ; \quad R_n = \frac{R_h}{1 + 3\left(\frac{\delta D^2}{D_0^2}\right)} \quad \text{Gleichung 7}$$

Dabei sind k_B ist die Boltzmann Konstante, T die absolute Temperatur, D die Diffusionskoeffizienten und η die Viskosität des Lösungsmittels. R_h ist der nach der bekannten Stokes-Einstein-Gleichung bestimmte hydrodynamische Radius der Mizelle. Die Diffusionskoeffizienten D_0 wachsen mit steigender Temperatur. Dieser Mizellgrößenparameter ist über die Stokes-Einstein-Beziehung mit einem abnehmenden hydrodynamischen Radius verknüpft. R_n ist das durch die Teilchen mit der höchsten Zahl pro Volumeneinheit beeinflusste Radius.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Lyophilisate von Prednisolut[®] 100 mg N, Urbason[®] soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica durch Röntgendiffraktometrie

Im Rahmen der Formulierungsentwicklung und industriellen Herstellung von Lyophilisaten spielen Verhalten und Stabilität des Wirkstoffes beim Lyophilisierungsprozess hinsichtlich der Stabilität des Fertigarzneimittels eine entscheidende Rolle [14, 72, 73, 74]. Die Annahme, dass die Lyophilisatkuchen der Glucocorticoidester vorwiegend amorph vorliegen, war mittels Röntgendiffraktometrie zu überprüfen bzw. zu bestätigen. Die spezifischen Bedingungen während der gesamten Gefriertrocknung bestimmen im Wesentlichen die Eigenschaften des Produktes hinsichtlich seiner Bildung von Eutektika und amorphen Gläsern [75]. In thermomikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Arzneistoffe Glaszustände bilden können und der Lyophilisierungsprozess auf die Umwandlungstemperaturen einen entscheidenden Einfluss hat [17, 76, 77, 78]. Die Glasumwandlungstemperatur von amorphen pharmazeutischen Stoffen spielt im Hinblick auf Voraussagen über deren Stabilität eine entscheidende Rolle. [23, 24].

Die Röntgendiffraktogramme der Lyophilisate von Prednisolut[®] 100 mg N und Urbason[®] soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica belegen, dass die Kristallstrukturen der Lyophilisatkuchen amorph sind (Abb. 7, Abb. 8).

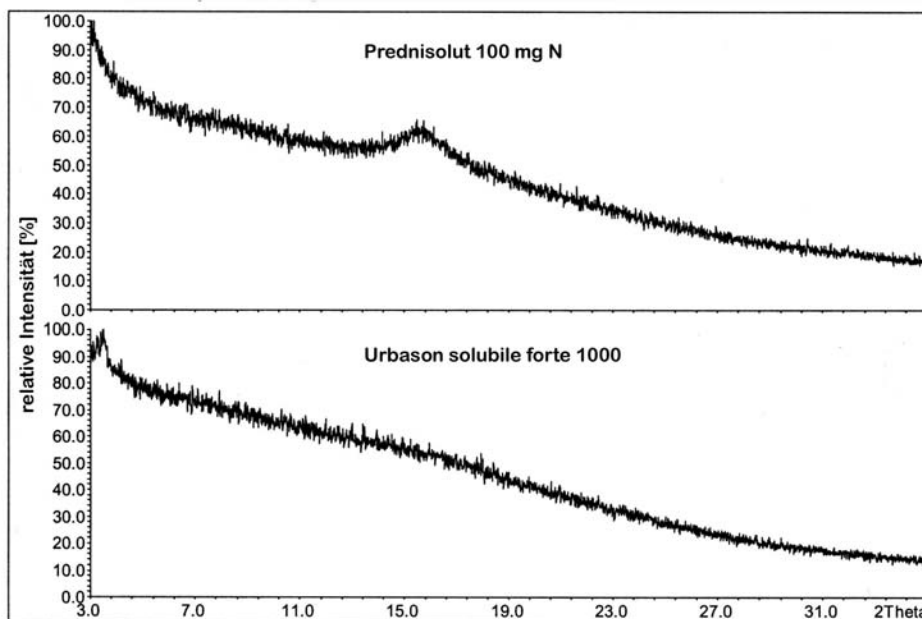


Abb. 7: Röntgendiffraktogramme des Lyophilisates von Prednisolut® 100 mg N und Urbason® soluble forte 1000

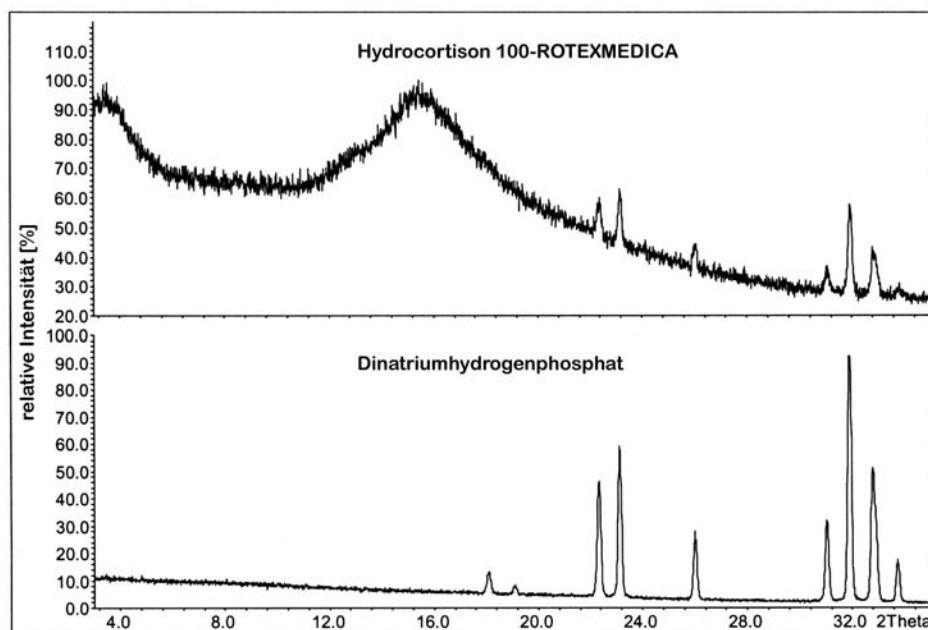


Abb. 8: Röntgendiffraktogramme des Lyophilisates von Hydrocortison 100-Rotexmedica und von Dinatriumhydrogenphosphat

Bei dem untersuchten Lyophilisat des Natriumsalzes des Hydrocortisonesters waren zusätzlich schwache Kristallreflexe des Phosphatpufferbestandteils

Dinatriumhydrogenphosphat erkennbar. Die Röntgendiffraktogramme bestätigen, dass die untersuchten Glucocorticoid-Lyophilisate eine amorphe Struktur besitzen.

3.2 Analyse des Lyophilisates von Prednisolut® 100 mg N durch Differential Scanning Calorimetrie and Thermogravimetrie gekoppelt mit Online-Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

Untersuchungen zur Kristallinität an Prednisolon und dessen Estern zeigte, dass die reinen Substanzen polymorph vorkommen [79, 80]. Maury untersuchte das thermische Verhalten von Prednisolon, Prednisolonacetat und Prednisolonmetasulfobenzoat und definierte den kristallinen Zustand als polymorph und pseudopolymorph [81].

Aus den Pharmakopöen USP/Ph. Eur. ist bekannt, dass sich Prednisolon ebenso wie seine Ester bei höherer Temperatur zersetzen. Die Zersetzungsprodukte hängen vom jeweiligen Ester ab und sind im Wesentlichen nicht bekannt. Die zum Teil in den untersuchten Lyophilisaten als Puffersubstanzen eingesetzten Phosphatsalze sind durch zahlreiche Wasserübergänge gekennzeichnet. [4, 82], [Tab. 1].

Substanz	thermische Umwandlung/ Zersetzung [°C]	Schmelzpunkt [°C]	vorkommende Modifikationen
Prednisolon	-	230	2 mit bis zu 6·H ₂ O
Prednisolon-21-hydrogensuccinat	-	208 - 210	-
Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz	-	-	-
NaHCO ₃	50	270	-
Na ₂ HPO ₄	240	95	-
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	95 zu 0·H ₂ O	95	-
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	48 zu 2·H ₂ O	198	-
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	34 zu 7·H ₂ O	35	2
Na ₃ PO ₄ ·12 H ₂ O	75	75	-
NaH ₂ PO ₄	-	200	-
NaH ₂ PO ₄ ·1 H ₂ O	100	100	-
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	-	~60	-

Tab.1: Literaturdaten zu thermischen Verhalten, Schmelzpunkt und Kristallmodifikationen von Prednisolon, Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz, Natriumhydrogencarbonat und verschiedenen Natriumphosphatsalzen [4, 82]

Beim Erwärmen auftretende chemische Reaktionen sind oft thermische Zersetzungen (Pyrolyse unter Gewichtsverlust) aber auch Abgabe von Kristallwasser. Dabei entstehen gasförmige Pyrolyseprodukte wie Kohlenmonoxid, Wasser und Stickstoffoxide.

Thermische Effekte zeichnen sich in der DSC-Kurve durch Abweichungen (Peaks) von der Basislinie der Kurve aus. Sie werden durch physikalische Umwandlungen wie Phasenumwandlungen oder chemische Reaktionen der Probe verursacht.

Das kinetische Phänomen des sogenannten Glasübergangs, einer unterkühlten Flüssigkeit in den glasig erstarrten Zustand, kann prinzipiell bei allen nichtkristallinen oder teilkristallinen Strukturen auftreten. Voraussetzung ist eine genügend weit reichende molekulare Unordnung in zumindest einer Dimension. Organische und andere schlecht kristallisierende Verbindungen können beim Abkühlen ein festes Glas bilden. Solche amorphe Proben können beim späteren Erwärmen über die Glastemperatur kristallisieren (Entglasung, Devitrifizierung und Kaltkristallisation) [83]. Beim Glasübergang amorpher Stoffe zu kristalliner Struktur nimmt die spezifische Wärme um 0,1 bis 0,5 Jg⁻¹ K⁻¹ zu, die DSC-Kurve verschiebt sich dabei in charakteristischer Weise in den endothermen Bereich [84].

Um mögliche Phasenumwandlungen des amorphen Glaszustandes sowie chemischen Reaktionen und Zersetzungen sicher zu analysieren, wurde das thermische Verhalten des Lyophilisatkuchens von Prednisolut[®] 100 mg N mit Hilfe der DSC und TG, gekoppelt mit FT-IR, untersucht.

Abbildung 9 zeigt das DSC-Thermogramm und TG-Analyse mit DTG-Kurve von Prednisolut[®] 100 mg N. [85].

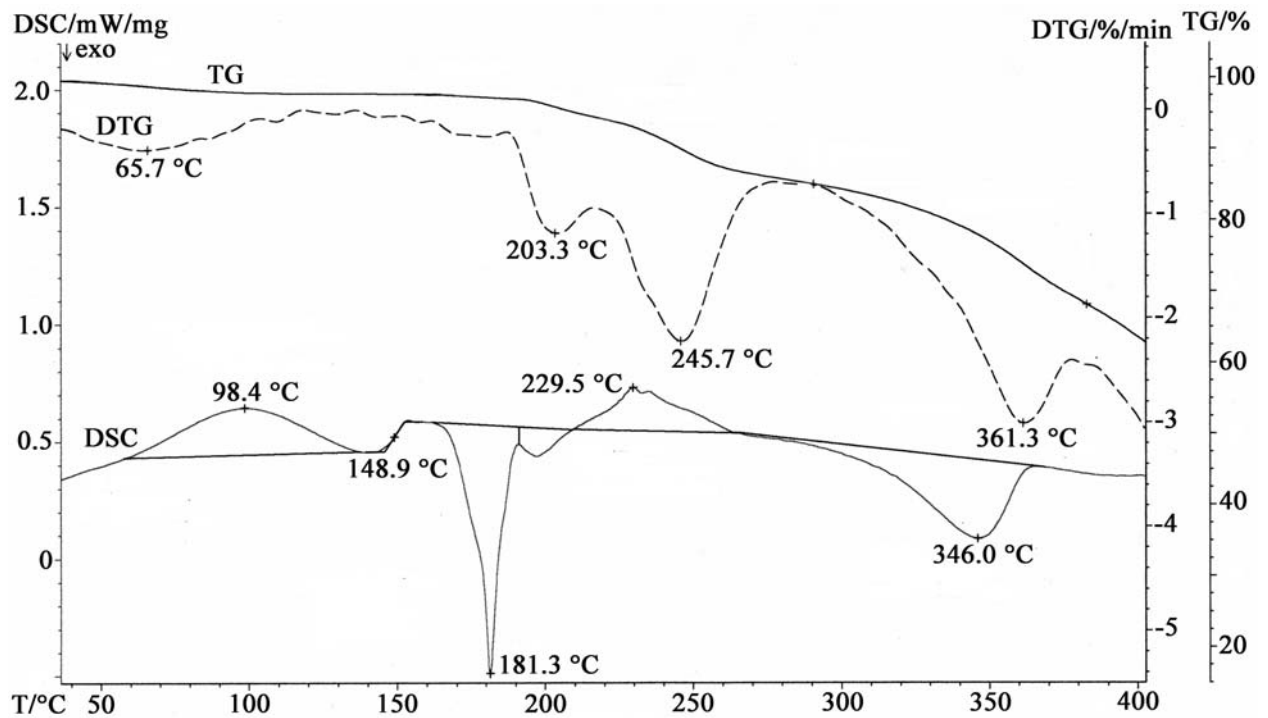


Abb. 9: Darstellung des DSC-Thermogramms gegen TG- und DTG-Kurve des Lyophilisatkuchens von Prednisolut® 100 mg N [61]

Die DTG-Kurve der thermogravimetrischen Messung zeigt vier große Masseverluststufen bei 65,7; 203,3; 245,7 und 361,3 °C (Abb. 9). Die im FT-IR detektierten Zersetzungsprodukte (Wasser, Kohlendioxid, Succinat-Anhydrit) korrelieren mit den thermogravimetrisch beobachteten Zersetzungen (Abb. 10 bis 13). Die in der Literatur genannten Schmelzpunkte der wasserfreien Formen von Dinatriumhydrogenphosphat ($T_p = \sim 95$ °C) und von Natriumdihydrogenphosphat ($T_p = \sim 200$ °C) konnten bei der DTG-Kurve des Lyophilisates von Prednisolut® 100 mg N nicht detektiert werden. Dieses zeigt, dass im untersuchten Lyophilisat keine kristallinen Puffersubstanzen vorliegen. Von Prednisolon-21-hydrogensuccinat als Säure ist bekannt, dass es einen scharfen Schmelzpunkt bei 208 - 210 °C hat. Ein solcher Schmelzpeak wurde im Lyophilisat nicht detektiert. Das beweist, dass sich Prednisolon-21-hydrogensuccinat im Herstellungsprozess quantitativ mit dem zur

Ansatzlösung zugefügten Natriumhydrogencarbonat zum Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz umgesetzt hat. In der DSC-Kurve des durch Röntgendiffraktometrie als amorph charakterisierten Lyophilisates ist zwischen 60 °C und 140 °C (max.: 98,4 °C) ein breiter endothermer Dehydrationspeak, verursacht durch die Freisetzung des eingeschlossenen Wassers, nachweisbar. Im weiteren DSC-Kurvenverlauf zeigte sich zunächst eine Glasumwandlung des Lyophilisatkuchens bei ca. 150 °C (148,9 °C, Abb. 9), gefolgt von einem exothermen Peak bei ungefähr 180 °C (181,3 °C, Abb. 9). Bei 229,5 °C wurde ein endothermer Peak detektiert. Bei weiterem Aufheizen der Substanz ist bei 346 °C ein exothermer Peak sichtbar, der einer Substanzpyrolyse zugeordnet wurde.

Nr.	Effekt	Temperaturbereich [°C]/Maximum [°C]	Größenordnung
1	endotherme Umwandlung (Feuchtepeak)	60 - 140/98,4	25 - 154 J/g
2	Glasübergangstemperatur	ca. 150/148,9	147 - 170 J/g
3	Relaxationspeak	ca. 150	0 - 1 J/g
4	exotherme Umwandlung	180/181,3	ca. 50 J/g
5	exotherme Umwandlung	200	0 - 80 J/g
6	endotherme Umwandlung	220 - 250/229,5	0 - 30 J/g
7	exotherme Umwandlung (Substanzpyrolyse)	340 - 360/346,0	40 - 60 J/g

Tab. 2: Detektierte Werte im DSC-Thermogramm des Lyophilisatkuchens von Prednisolut® 100 mg N (vergl. Abb. 9)

Um reversible Übergänge von irreversiblen Übergängen (Verflüchtigungen, Zersetzungen, chemische Reaktion) zu trennen, wurde zuerst mit einer niedrigen Heizrate gearbeitet. Zur Charakterisierung der spezifischen Peaks wurde die Heizrate entsprechend angepasst. Um Informationen zur Starttemperatur der Zersetzung, auftretende Zersetzungsstufen und dabei abgegebenen gasförmigen Komponenten

zu erhalten, wurde eine Probe im Temperaturbereich 26 °C bis 400 °C mit einer Heizrate von 10 K/min und einem N₂-Spülgasstrom von 20 ml/min untersucht. Für die simultane FT-IR-Messung wurde eine Auflösung von 4 cm⁻¹ im Spektralbereich 650 bis 5000 cm⁻¹ bei einer zeitlichen Auflösung von 15 s gewählt. Dieses Vorgehen gewährleistete die präzise Zuordnung der IR-spektroskopisch detektierten Gase zu den thermographisch gemessenen Zersetzungstufen. Die Gegenüberstellung der thermographischen Messung und der DSC-Messung zeigt deutlich die Masseverluststufen (Abb. 9), [85].

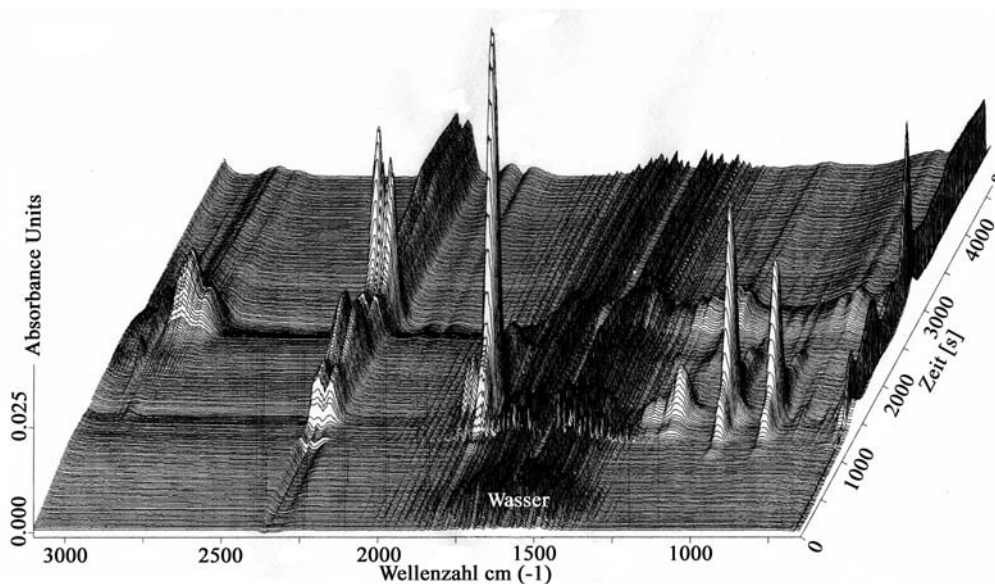


Abb.10: 3-dimensionale-FT-IR Wasserfalldarstellung [700 bis 3100 cm⁻¹] des Lyophilisatkuchens von Prednisolut[®] 100 mg N (Temperaturbereich von 60 - 400 °C), [85]

Durch eine 3 D-Darstellung, der sogenannten Wasserfalldarstellung, kann der zeitliche Verlauf und die Intensität einer Zersetzungreaktion in Abhängigkeit von der Zeit als dritte Dimension sehr gut demonstriert werden.

Ein solche Wasserfalldarstellung im Wellenzahlbereich 700 bis 3100 cm⁻¹ der gesamten FT-IR-Messung im Bereich von 1000 bis 4000 s zeigt die Abbildung 10. Die

für Wasser charakteristischen Banden (1300 bis 1750 cm^{-1}) deuten auf mindestens drei Stufen der Freisetzung von Wasser beim Erhitzen des Lyophilisates hin. Im zeitlichen Verlauf der Kohlendioxidbande bei ca. 2300 cm^{-1} waren ebenfalls drei, jedoch zeitlich verschobene Intensitätserhöhungen zu beobachten.

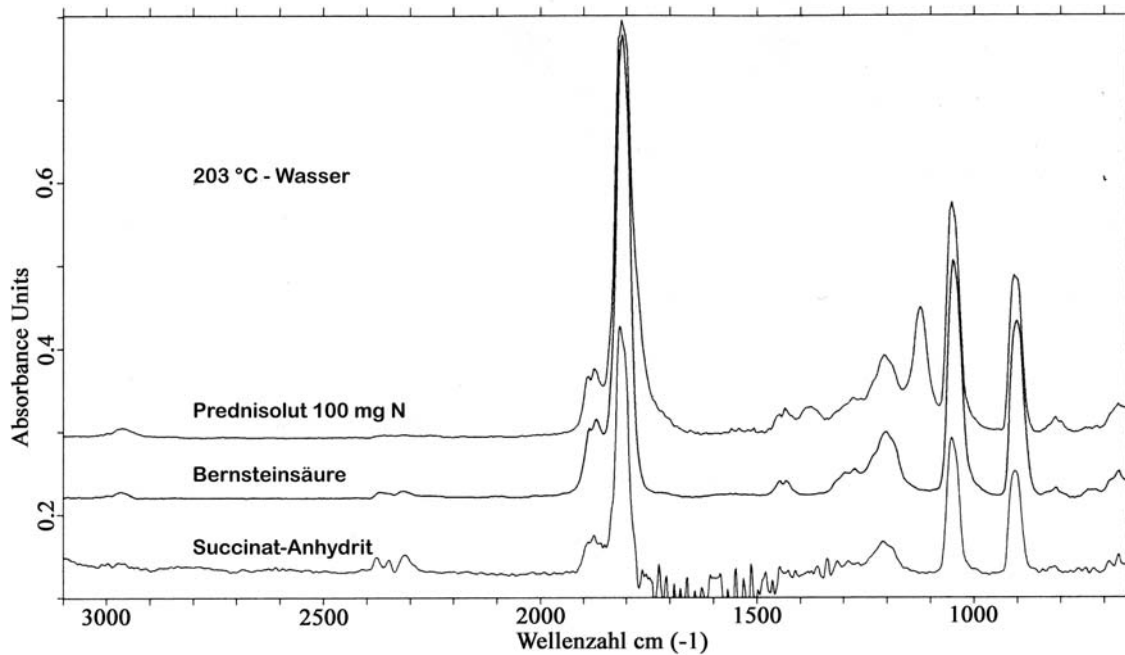


Abb. 11: Darstellung des FT-IR-Spektrum des Lyophilisatkuchens von Prednisolot® 100 mg N bei 203 °C sowie Vergleichsspektren von Bernsteinsäure und Succinat-Anhydrit nach Abzug der Wasserbanden [85]

Von dem Spektrenauszug bei 203 °C aus dem 3 D-Wasserfallspektrum wurde die Absorptionsbande von Wasser subtrahiert. Die erhaltenen Spektren wurden anschließend mit den Vergleichsspektren aus der Bibliothek der Netzsch - Gerätebau GmbH überprüft. Eine gute Übereinstimmung mit Bernsteinsäure und Succinat-Anhydrit ist erkennbar (Abb. 11).

Das bei 245 °C aufgenommene Spektrum (dritte Masseverluststufe bei $245,7\text{ °C}$ in Abb. 9) zeigt mit großer Wahrscheinlichkeit, dass die Gasphase zu diesem Zeitpunkt

größtenteils aus Succinat-Anhydrit und durch chemische Reaktion freigesetztem Kohlendioxid besteht (Abb. 12).

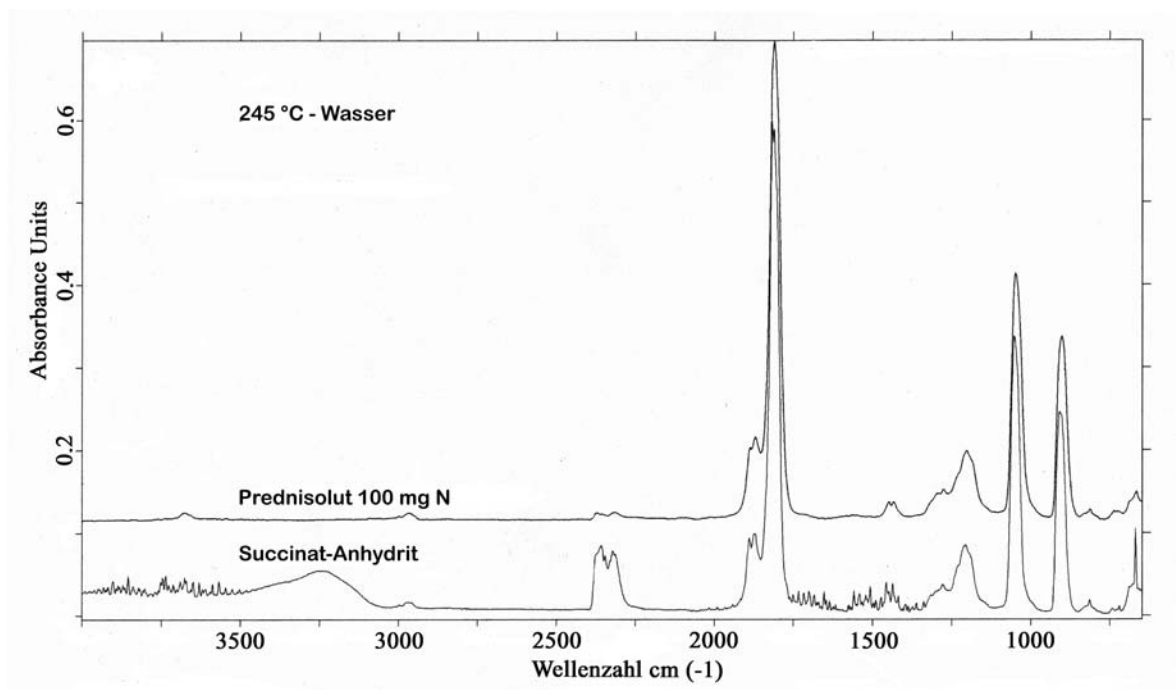


Abb. 12: Darstellung des FT-IR-Spektrum des Lyophilisatkuchens von Prednisolol[®] 100 mg N bei 245 °C sowie FT-IR-Spekten von Succinat-Anhydrit und Kohlendioxid unter Abzug der Wasserbanden [85]

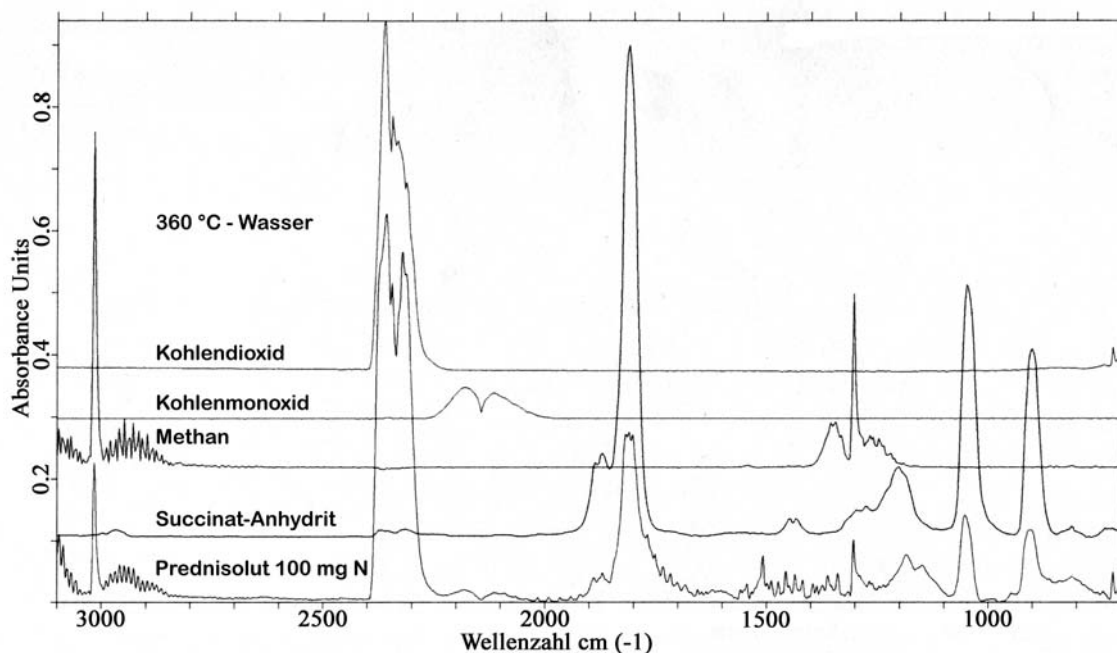


Abb. 13: Darstellung des FT-IR-Spektrums des Lyophilisatkuchens von Prednisolot® 100 mg N bei 360 °C sowie der FT-IR-Spektren von Methan, Kohlendioxid, Kohlenmonoxid und Succinat-Anhydrit unter Abzug der Wasserbanden [85]

In Abbildung 13 ist das aufgenommene Spektrum bei 360 °C (vierte Masseverluststufe bei 361,3 °C in Abb. 9) im Vergleich zu den Bibliotheksspektren von Methan, Kohlendioxid, Kohlenmonoxid und Succinat-Anhydrit dargestellt.

Die Ergebnisse der FT-IR-Spektrometrie bestätigen, dass das bei der Lyophilisierung entstandene Natriumsalz von Prednisolon-21-hydrogensuccinat bei Raumtemperatur im amorphen Glaszustand vorliegt. Es wurden keine weiteren Phasenumwandlungen gefunden. Die in den DSC-Messungen beschriebenen exothermen Peaks sind irreversible Zersetzungen der Bernsteinsäuregruppe von Prednisolon-21-hydrogensuccinat [85].

3.3 Einflussgröße Puffer und Restfeuchte auf die Glasübergangstemperatur von Glucocorticoidester-Lyophilisaten

Voraussetzung für das Auftreten von Glasübergängen ist immer das Vorhandensein eines hinreichenden Grades von Unordnung in der molekularen Struktur. Weichmacher wie organische Salze haben dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Temperatur des Glasübergangs [86]. Mit wachsendem Weichmachergehalt verschiebt sich der Glasübergang auf niedrigere Temperaturwerte. Durch Untersuchungen wurde bestätigt, dass Lösungsmittelrückstände, wie Wasser ebenfalls als Weichmacher wirken [87, 88].

Der Einfluss des in der Formulierung von Prednisolut® 100 mg N eingesetzten Phosphatpuffers auf die Restfeuchte im Lyophilisatkuchen und die Glasübergangstemperatur des Lyophilisatkuchens wurden untersucht. Dazu erfolgte die Überprüfung der Lyophilisatkuchen von Prednisolut® 100 mg N auf einen Zusammenhang von Restfeuchte und Glasübergangstemperatur. Durch gezielter Auswahl einiger unter validierten Bedingungen hergestellten Produktionschargen von Prednisolut® 100 mg N war es möglich zu untersuchen, ob eine Abhängigkeit zwischen der Glasübergangstemperatur und der Restfeuchte vorliegt [89, 90].

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Alter [Monate]	Wassergehalt [%] (Restfeuchte), (n = 10)	endotherme Umwandlung (Feuchtepeak) 60-140 °C in [J/g], (n = 10)	Glasübergangstemperatur [°C], (n = 10)	Relaxationspeak ca 150 °C [J/g], (n = 10)	exotherme Umwandlung ca 180 °C [J/g], (n = 10)	exotherme Umwandlung ca 200 °C [J/g], (n = 10)	endotherme Umwandlung ca 235 °C [J/g], (n = 10)	exotherme Umwandlung ca 350 °C [J/g], (n = 10)
24	1,49 ± 0,03	54,6 ± 1,5	150,3 ± 0,3	0 ± 0,0	-48,3 ± 2,5	-1,8 ± 0,2	31,1 ± 2,8	0 ± 0,0
24	1,49 ± 0,03	77,3 ± 1,1	149,5 ± 0,3	0 ± 0,0	-40,1 ± 1,5	0 ± 0,0	25,8 ± 3,2	0 ± 0,0
24	1,49 ± 0,04	52 ± 0,5	147,1 ± 0,2	0,25 ± 0,1	-57,9 ± 3,5	-2,2 ± 0,1	26,9 ± 1,7	0 ± 0,0
33	0,9 ± 0,03	25 ± 0,6	154,0 ± 0,2	0,13 ± 0,1	-32,7 ± 2,7	-3,3 ± 0,1	20,8 ± 1,6	0 ± 0,0
48	1,36 ± 0,04	89,3 ± 0,7	147,8 ± 0,3	0 ± 0,0	-43,1 ± 3,1	-13,4 ± 2,3	0 ± 0,0	36,2 ± 3,1
34	0,94 ± 0,02	85,4 ± 1,8	150,0 ± 0,8	0 ± 0,0	-48,5 ± 1,5	-1,5 ± 0,3	0 ± 0,0	45,6 ± 4,6
48	1,05 ± 0,03	111,9 ± 2,4	150,1 ± 0,7	0 ± 0,0	-46,3 ± 2,2	-20,4 ± 0,3	0 ± 0,0	43,1 ± 4,4
33	0,81 ± 0,02	70,5 ± 0,4	147,9 ± 0,4	0 ± 0,0	-44,0 ± 1,4	-4,2 ± 0,6	25,9 ± 1,9	0 ± 0,0
11	6,02 ± 0,02	97,3 ± 1,2	145,5 ± 0,5	0 ± 0,0	-50,3 ± 1,9	0 ± 0,0	25,3 ± 1,7	0 ± 0,0
4	0,65 ± 0,01	157,3 ± 1,3	148,6 ± 0,4	0 ± 0,0	-56,0 ± 2,9	-2,6 ± 0,7	8,7 ± 0,6	8,8 ± 0,7
6	2,45 ± 0,02	173,9 ± 1,9	130,0 ± 0,9	0 ± 0,0	-61,9 ± 4,0	0 ± 0,0	26,5 ± 2,0	0 ± 0,0
4	4,06 ± 0,03	120,9 ± 1,6	149,8 ± 0,5	0 ± 0,0	-56,2 ± 3,2	-1,7 ± 0,8	26,0 ± 2,1	0 ± 0,0

Tab 3: DSC-Effekte und Restfeuchten der Produktionschargen von Prednisolut[®] 100 mg N, (Wassergehalt [Restfeuchte] und

Glasübergangstemperaturen dick markiert)

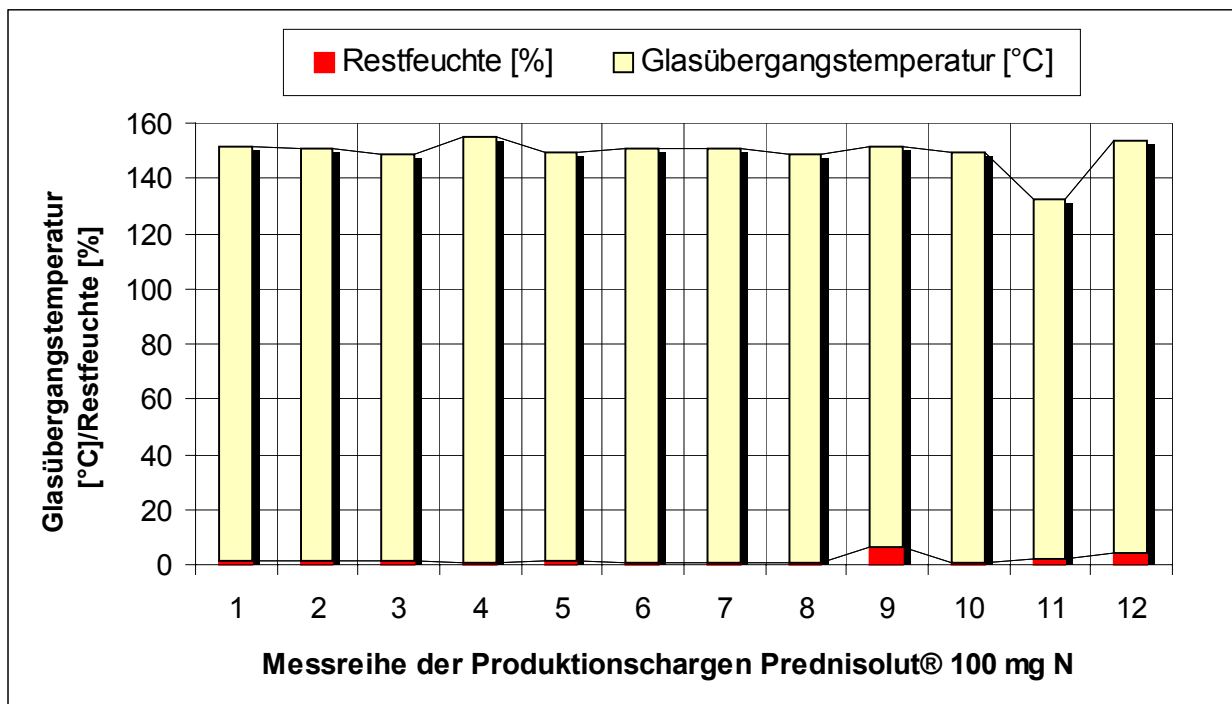


Abb. 14: Graphische Darstellung von gemessenen Glasübergangstemperaturen (gelb) und Wassergehalt [Restfeuchte (rot)] der Produktionschargen Prednisolot® 100 mg N

Bei Betrachtung der in der Abbildung 14 dargestellten Restfeuchtegehalte und Glasübergangstemperaturen der Produktionschargen war kein Zusammenhang zwischen beiden Größen erkennbar. Die Restfeuchte am Ende der Gefriertrocknung beeinflusst aber den Feuchtepeak (Tab. 3).

Zur Untersuchung des Puffer-Wirkstoff-Verhältnisses wurden DSC-Thermogramme der Chargen von Prednisolot® 10 mg N (Wirkstoff: 10 mg Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz), Prednisolot® 100 mg N (Wirkstoff: 100 mg Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz), Prednisolot® 500 mg (Wirkstoff: 500 mg Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz) und Prednisolot® 1000 mg (Wirkstoff: 1000 mg Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz) aufgenommen. Um auch den Einfluss der Pufferkonzentration zu prüfen, wurden zusätzlich 5 Formulierungen mit unterschiedlichem Phosphatpufferanteil auf der Basisrezeptur

von Prednisolut[®] 1000 mg, im Labormaßstab hergestellt und auch von diesen die DSC-Thermogramme gemessen [Tab. 4, Tab. 5].

Bestandteile	Prednisolut [®] 10 mg N	Prednisolut [®] 100 mg N	Prednisolut [®] 500 mg	Prednisolut [®] 1000 mg
Prednisolon-21-hydrogensuccinat	10,48 mg	104,78 mg	523,88 mg	1047,75 mg
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,19 mg	11,35 mg	16,70 mg	23,75 mg
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1,03 mg	9,81 mg	14,43 mg	20,52 mg

Tab.4: Zusammensetzung im Verkehr befindlicher Prednisolut[®]-Arzneimittel unterschiedlicher Stärke

Bestandteile	Prednisolut [®] 1000 mg mit				
	10 % Puffer	1 % Puffer	0,1 % Puffer	0,01 % Puffer	0,001 % Puffer
Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natrium	104,78 mg	104,78 mg	104,78 mg	104,78 mg	104,78 mg
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2,38 mg	0,24 mg	0,02 mg	0,0024 mg	0,00024 mg
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2,05 mg	0,21 mg	0,02 mg	0,0021 mg	0,00021 mg

Tab.5: Zusammensetzung der Modellformulierungen von Prednisolut[®] 1000 mg mit unterschiedlicher Pufferkonzentration

	Prednisolut® 10 mg N	Prednisolut® 100 mg N	Prednisolut® 500 mg	Prednisolut® 1000 mg	
Glasübergangs- temperatur [°C], (n=10)	148,6 ± 0,7	148,4 ± 0,4	156,9 ± 0,5	164,2 ± 0,6	
	Prednisolut® 1000 mg mit				
	10 % Puffer	1 % Puffer	0,1 % Puffer	0,01 % Puffer	0,001 % Puffer
Glasübergangs- temperatur [°C], (n=10)	169,0 ± 0,2	170,0 ± 0,3	169,8 ± 0,5	169,9 ± 0,5	169,8 ± 0,3

Tab. 6: Gemessene Glasübergangstemperaturen der Modellformulierungen bei unterschiedlichen Puffer-Wirkstoffverhältnissen im Lyophilisat von Prednisolut® 1000 mg sowie in den Lyophilisatkuchen der Produktionschargen von Prednisolut® 1000 mg, Prednisolut® 500 mg, Prednisolut® 100 mg N und Prednisolut® 10 mg N

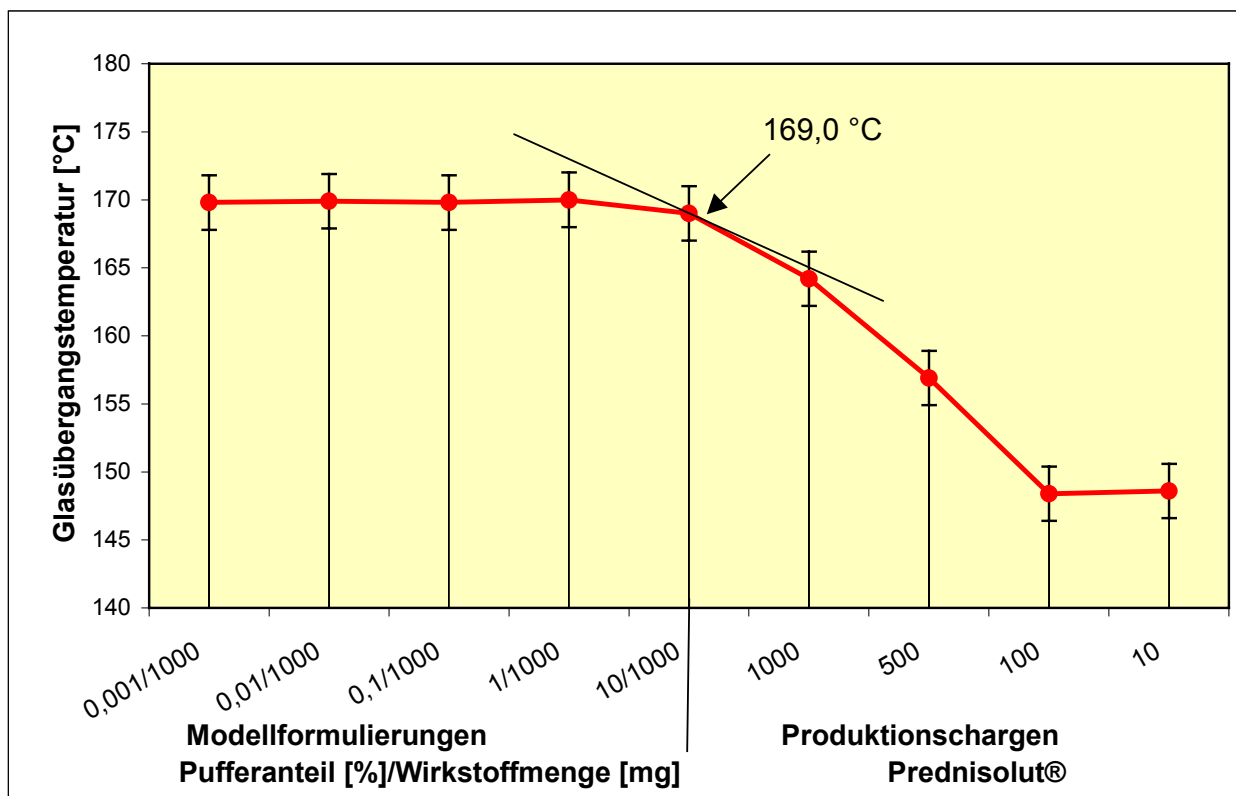


Abb. 15: Graphische Darstellung der gemessenen Glasübergangstemperaturen der Modellformulierungen von Prednisolut® bei unterschiedlichen Puffer-Wirkstoff-Verhältnissen im Lyophilisat von Prednisolut® 1000 mg sowie von Prednisolut® 1000 mg, Prednisolut® 500 mg, Prednisolut® 100 mg N und Prednisolut® 10 mg N

Abbildung 15 stellt graphisch die ermittelten Glasübergangstemperaturen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Pufferanteilen der Formulierungen dar. Die Phosphatpuffermenge führt ab einem bestimmten Puffer-Wirkstoff-Verhältnis zu niedrigeren Glasübergangstemperaturen. Dieses Ergebnis belegt, dass bei entsprechenden Massenverhältnissen der Puffer die Funktion eines Weichmachers im Lyophilisat ausübt. In den Termini der Polymerchemie können damit Puffersubstanzen als Weichmacher angesehen werden.

Die Lyophilisate haben Glasübergangstemperaturen von ≤ 170 °C (Tab. 6, Abb. 15). Die Lyophilisate mit unterschiedlichen Puffer-Wirkstoff-Verhältnissen der Modellformulierungen von Prednisolut[®] 1000 mg sowie von Prednisolut[®] 1000 mg, Prednisolut[®] 500 mg, Prednisolut[®] 100 mg N und Prednisolut[®] 10 mg N wurden nach Note for Guidance on Stability Testing: Stability Testing of new Drugs Substances and Products (CPMP/ICH/2736/99) [91] bei Klima 2 (30 °C \pm 2 K, 60 % \pm 5 % rel. Feuchtigkeit) über einen Zeitraum von 1 Jahr gelagert. Es zeigten sich bei allen untersuchten Formulierungen keine Veränderungen der Restfeuchten und der Glasübergangstemperaturen und damit der Struktur des Lyophilisatkuchens.

Die relativ hohe Glasübergangstemperatur kann ein wesentlicher Grund dafür sein, dass die geprüften Lyophilisate im Laufe der Lagerzeit nicht unter Strukturverlust des Lyophilisatkuchens vom Glaszustand in den viskoelastischen „Gummizustand“ übergehen.

3.4 Untersuchung der Morphologie des Lyophilisates von Prednisolut[®] 100 mg N durch Auflicht-, Rasterelektronenmikroskopie sowie durch Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie

Für die Untersuchung am Lyophilisatkuchen von Prednisolut[®] 100 mg N waren sowohl die Auflicht- und Rasterelektronenmikroskopie geeignet. Dawson und Hockley haben die morphologischen Unterschiede bei unterschiedlichen Einfrier-geschwindigkeiten von Trehalose- und Mannitollösungen damit demonstriert [17, 92].

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen des Lyophilisates von Prednisolut[®] 100 mg N musste die Oberfläche mit einer leitfähigen Schicht versehen werden. Zu diesem Zweck wurden die Proben mit Gold bedampft.

Die nachfolgenden Abbildungen 16 und 17 zeigen die Lyophilisatstruktur in der Auflichtmikroskopie. In den Abbildungen 18 bis 20 wird die Lyophilisatstruktur mit der Rasterelektronenmikroskopie demonstriert.

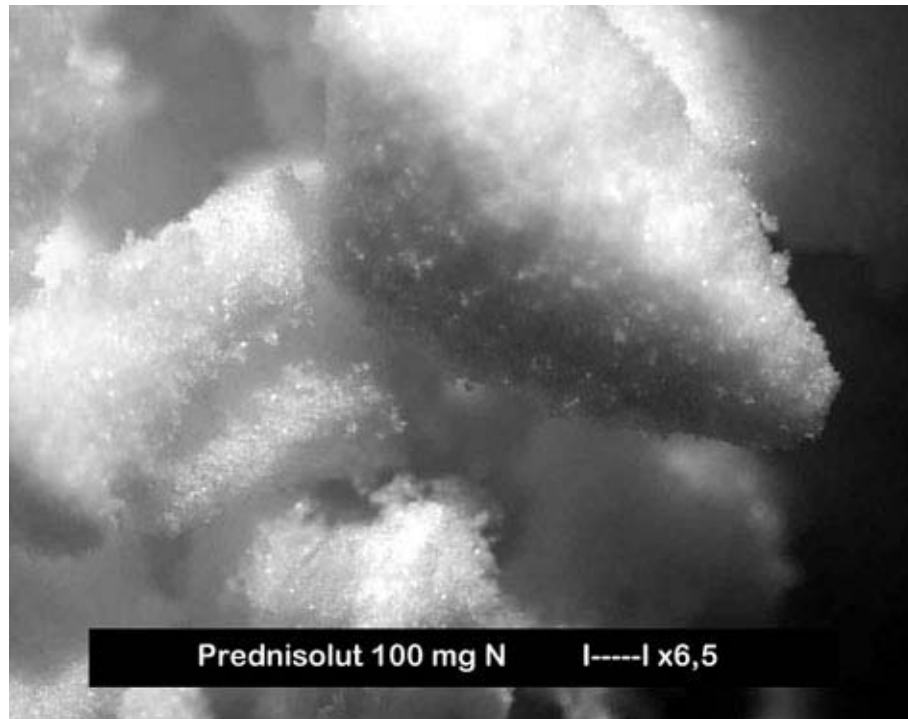


Abb.16: Lichtmikroskopische Aufnahme 1, Prednisolot[®] 100 mg N vom Lyophilisatkuchen - (Vergrößerung: 6,5fach)

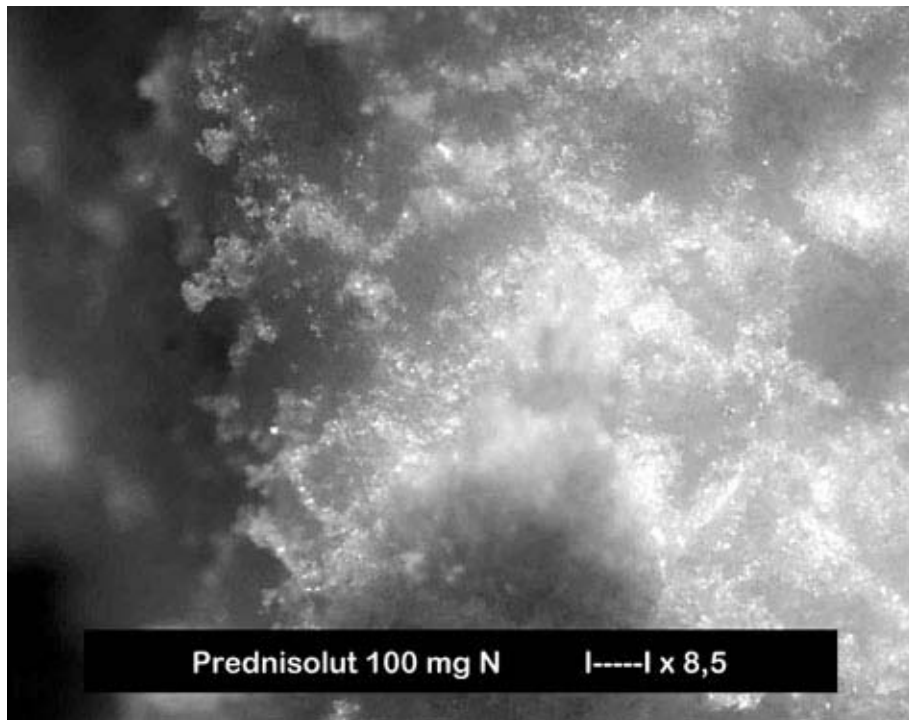


Abb.17: Lichtmikroskopische Aufnahme 2, Prednisolot® 100 mg N vom Lyophilisatkuchen - (Vergrößerung: 8,5fach)

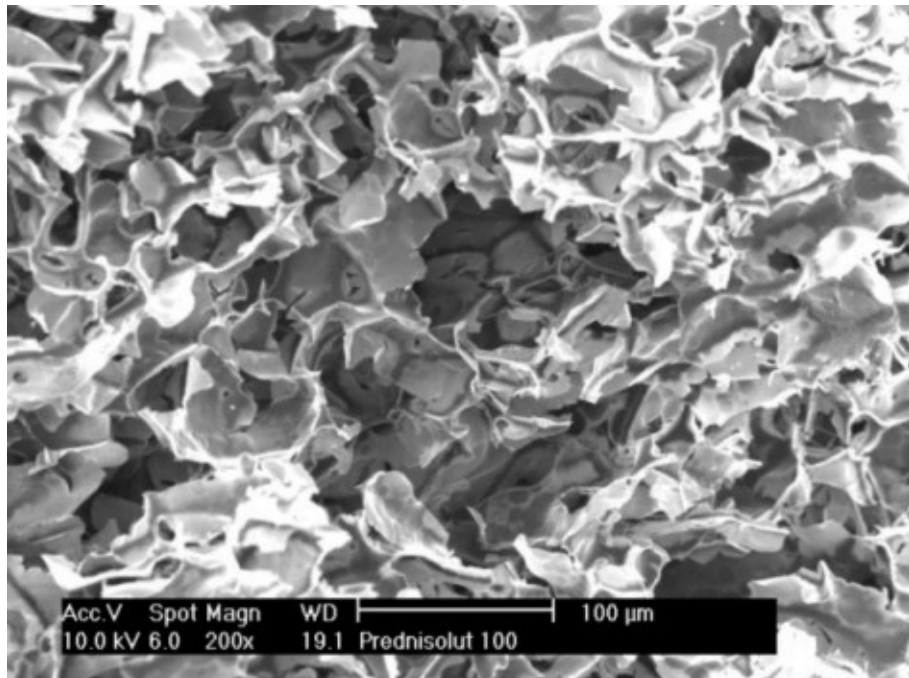


Abb.18: REM-Aufnahme 1, Prednisolot® 100 mg N vom Lyophilisatkuchen - (Vergrößerung: 200fach)

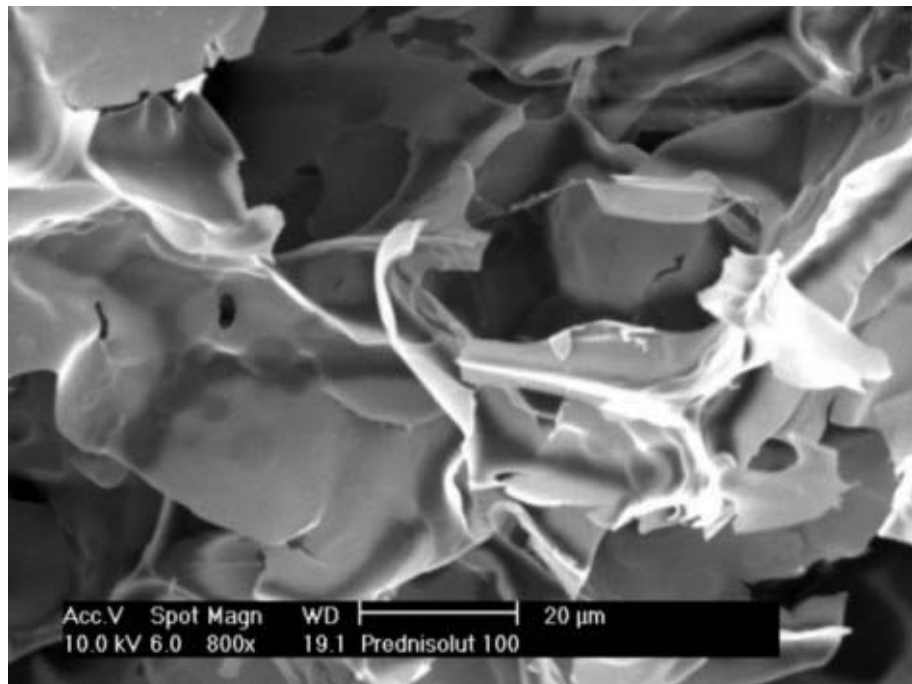


Abb.19: REM-Aufnahme 2, Prednisolot[®] 100 mg N vom Lyophilisatkuchen -
(Vergrößerung: 800fach)

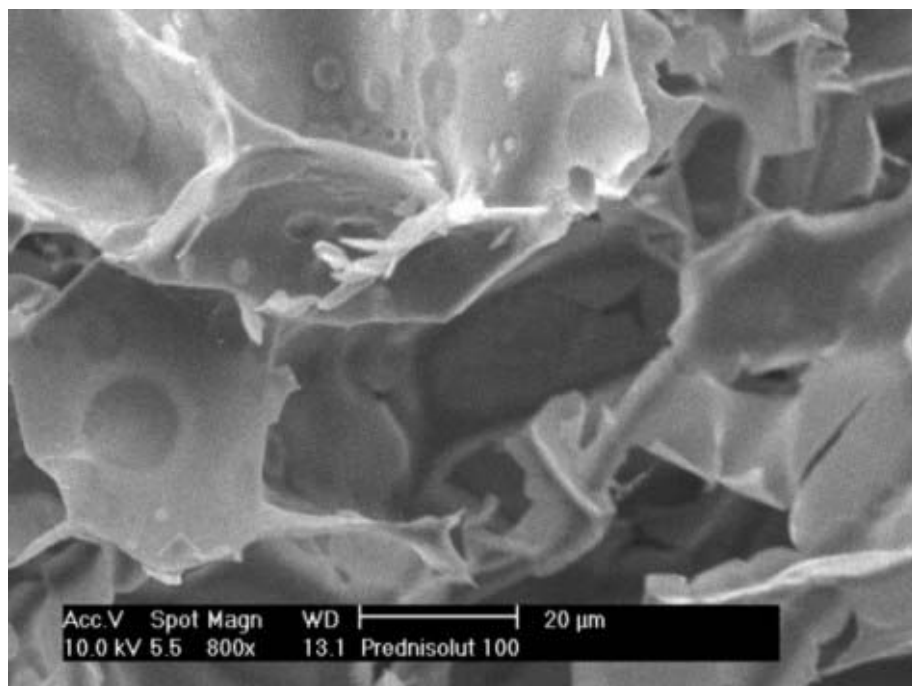


Abb.20: REM-Aufnahme 3, Prednisolot[®] 100 mg N vom Lyophilisatkuchen -
(Vergrößerung: 800fach)

Im Ergebnis der Gefriertrocknung entsteht eine Oberflächenausprägung wie sie in der lichtmikroskopischen Abbildungen 16 und 17 dargestellt sind. Erkennbar ist eine raue Oberflächenschicht.

Die REM-Aufnahmen 18 bis 20 zeigen, dass in der Hochauflösung diese Oberfläche von feinen Spalten und Plättchen mit teilweise bis zu 100 µm Länge durchzogen ist. Diese Struktur bildet sich während der Aufkonzentrierung der Lösung bei der letztendlich die maximal gefrierkonzentrierte Lösung erstarrt. Die spaltartigen Öffnungen in der Oberfläche gehören zu schmalen, kaminartigen Kavitäten, die weit in den Lyophilisatkuchen hineinragen und diesen in vertikaler Richtung durchziehen.

Es ist davon auszugehen, dass diese Kaminporen mit meist glatten Wandungen ein in großen Teilen zusammenhängendes Gerüst bildet (Abb. 18), das während einer sehr langsamen, geordneten Eiskristallisation gewachsen ist und entsprechend grosslumige Kanäle („ice ghosts“) hinterlässt (Abb. 20). Das Innere des Lyophilisatkuchens ist durch eine Porenstruktur in Form eines grobmaschigen Netzwerks gekennzeichnet, das Hohlräume mit einer Ausdehnung von wenigen Mikrometern bis etwa 100 µm umfasst.

Alle untersuchten Lyophilisat-Proben von Prednisolot[®] 100 mg N haben die Form einer intakten amorphen Plättchenstruktur. Die Restfeuchten dieser Prednisolot[®]-Stärken liegen um 2 % und die Glasübergangstemperaturen bei ungefähr 150 °C (Tab. 3, Tab. 6, Abb. 14 bis 15). Alle gezeigten Abbildungen sind dabei immer unter dem Gesichtspunkt zu betrachten, dass die Einfriergeschwindigkeit einen entscheidenden Einfluss auf die Lyophilisatstruktur hat und zu Wanderung der Puffersubstanzen führen kann, die sich in Folge auch in den Restfeuchtgehalt widerspiegelt. Im Falle von Prednisolot[®] 100 mg N wird die Lösung bei - 45 °C über eine Dauer von 3 h 30 min eingefroren.

Eine versuchsweise Simulation des Einfrierprozessschrittes ist mit der Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie (ESEM) untersucht worden. Die Aufnahmetechnik ermöglicht rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Oberflächen ohne vorhergehende Probenmodifizierung bei partieller Simulation des Einfrierschrittes [93, 94, 95]. Durch Absenken der Temperatur im Probenraum auf 4 - 5 °C kann eine Luftfeuchtigkeit von 100 % eingestellt werden, die das Austrocknen der Proben sicher verhindert. Aufgrund der Streuung der Elektronen an den Molekülen des Arbeitsgases in der Probenkammer wird zur Aufnahme des Bildsignals in der ESEM der Entladungsstrom einer unselbständigen Gasentladung zwischen Probe und Detektor benutzt, der durch die Sekundärelektronen der Probe induziert wird (Townsend Entladung) [96]. Auf das Bedampfen der Proben mit Gold kann verzichtet werden, da die Ladungen auf dem Objekt von den Wassermolekülen im Probenraum abgeführt werden [97, 98, 99]. Die ESEM ermöglicht die Abbildung halbfester, fester und teilweise sogar flüssiger Objekte [100, 101], wie im untersuchten Produkt.

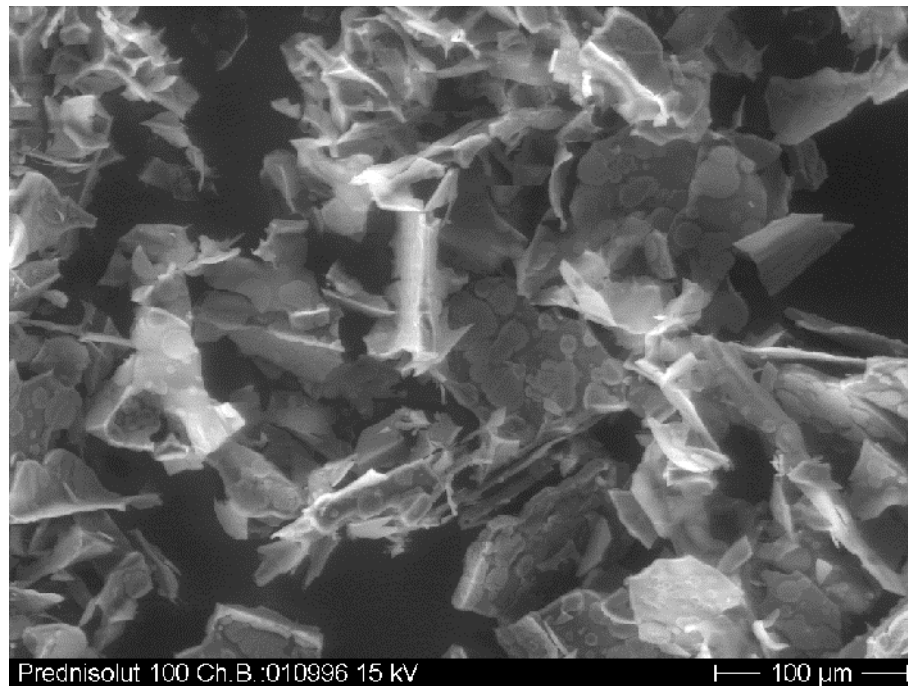


Abb.21: ESEM-Aufnahme 1, Prednisolot[®] 100 mg N vom Lyophilisatkuchen -
(Versuchsende: -10 °C)

Abbildung 21 zeigt in der ESEM-Aufnahme die poröse Struktur des Lyophilisatkuchens von Prednisolot[®] 100 mg N. Diese Struktur der lyophilisierten Lösung zeichnet sich aus einem lockeren Nadelfilz von Blättchen aus, die ein netzwerkartiges Gerüst mit Hohlräumen bilden. Eine Simulation der Einfrierphase und der gebildeten Lyophilisatstruktur ist in den Abbildungen 22 und 23 zu sehen. An der Oberfläche der gefrorenen zu lyophilisierenden wässrigen Lösung bildet sich eine plattenartige Struktur aus, die im weiteren Verlauf des Einfrierens und der Trocknung aufreißt. Die rombusartigen kristallinen Strukturen in Abbildung 22 stammen wahrscheinlich vom auskristallisiertem Phosphatpuffer und sind im "normal gefriergetrockneten" Prednisolot[®] 100 mg N nicht zu finden.

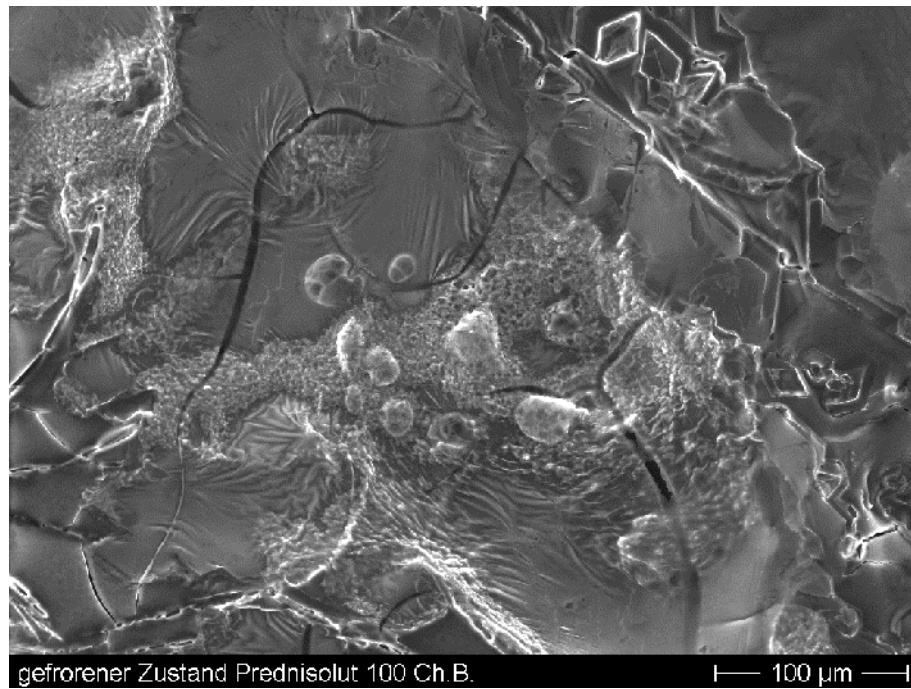


Abb.22: ESEM-Aufnahme 2 der gefrorenen zu lyophilisierenden wässrigen Lösung von Prednisolut[®] 100 mg N (bei ca. 0 °C)

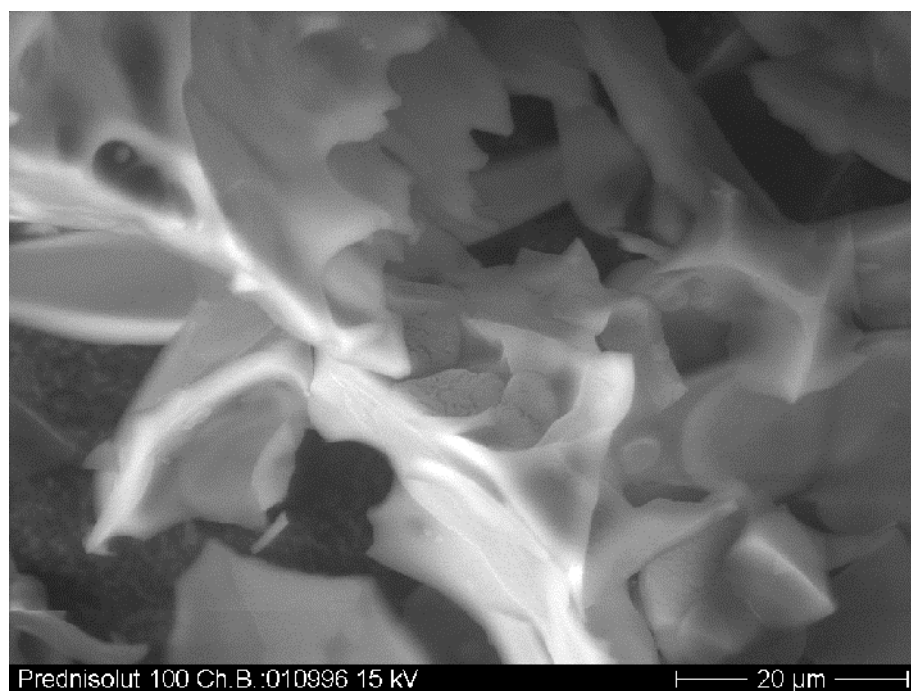


Abb.23: ESEM-Aufnahme 3 der gefrorenen zu lyophilisierenden wässrigen Lösung von Prednisolut[®] 100 mg N (bei ca -5 °C)

Es entsteht keine Matrix mit geschlossenen Poren, sondern nur ein lockeres Gerüst mit Hohlräumen (Abb. 23), die miteinander in Verbindung stehen. Der Durchmesser der horizontal durchgeschnittenen Hohlräume („ice ghosts“), die von diesem Netzwerk umschlossen werden, beträgt nach optischer Abmessung etwa 80 - 100 μm . Die in der Simulation des Einfrierens aus der Lösung erzielte Struktur (Abb. 23) ist in Art und Ausprägung vergleichbar mit der im Elektronenmikroskop gefundenen Form (Abb. 19).

3.5 Untersuchungen zur Mizellbildung

3.5.1 Ermittlung der kritischen Mizellbildungskonzentrationen der rekonstituierten Lösungen von Prednisolut[®] 100 mg N, Urbason[®] soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica durch Phototensiometrie und Kapillarelektrophorese

Bei der Bildung von Mizellen nimmt im Normalfall die Aggregationszahl mit sinkendem pH-Wert bzw. steigender Ionenstärke und sinkender Temperatur zu. Eine weitere Besonderheit, die mit dem Mizellbildungsprozess zusammenhängt, ist die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC). Unterhalb der CMC liegen nur Monomere vor, oberhalb der CMC besteht überhaupt erst eine mizellare Phase.

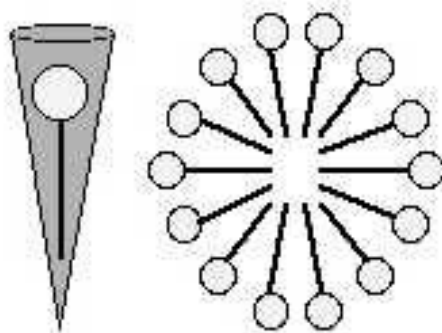


Abb. 24: Schematische Darstellung der Mizelle (rechts), Monomer (links)

Die Bildung von Mizellen muss als ein dynamischer Prozess betrachtet werden, in der Monomere und Mizellen parallel vorliegen [14, 31].

Die Charakterisierung der postulierten Mizellbildungen in der zu lyophilisierenden wässrigen Lösung bzw. rekonstituierten Lösung ist von besonderer Bedeutung für die pharmazeutische Qualität des Lyophilisatkuchens. Mizellen als supramolekulare Teilchen in der Größe von einigen Nanometern besitzen amphiphilen Charakter. Sie setzen sich aus Molekülen zusammen, die aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil bestehen, wobei der hydrophile Teil aus ionischen oder nichtionischen polaren Gruppen gebildet werden kann [102]. Die Mizellenform und -größe hängt dabei entscheidend vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Temperatur der Lösung ab [103].

Durch die Kapillarelektrophorese können die Substratmoleküle S aufgrund der verschiedenen Affinitäten von den Mizellen getrennt werden und somit die kritische Mizellbildungskonzentration bestimmt werden (Abb. 25).

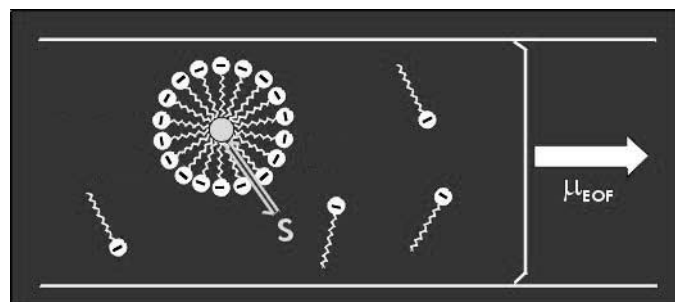


Abb. 25: Schematische Darstellung der Trennung in der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (μ_{EOF} = elektroosmotische Mobilität)

In der Literatur sind Untersuchungen zu kritischen Mizellbildungskonzentrationen wässriger rekonstituierter Lösungen von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Prednisolut[®] 100 mg N), Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Urbason[®] soluble forte 1000) und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat,

Natriumsalz (Hydrocortison 100-Rotexmedica) sowie deren Bestimmungsmethoden nicht veröffentlicht.

Mit den nachfolgend durchgeführten kapillarelektrophoretischen Analysen wurden daher zunächst die kritischen Mizellbildungskonzentrationen (CMC) mittels Phototensiometrie durch die Messung der Oberflächenspannung als Funktion der Konzentration ermittelt.

Die mit dem Phototensiometer bestimmten kritischen Mizellbildungskonzentrationen der wässrigen Lösungen von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Prednisolut[®] 100 mg N), Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Urbason[®] soluble forte 1000) und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Hydrocortison 100-Rotexmedica) sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Arzneimittel	CMC [%] (m/V), (n = 20)
Prednisolut [®] 100 mg N	3,80 ± 0,02
Urbason [®] soluble forte 1000	4,40 ± 0,03
Hydrocortison 100-Rotexmedica	4,50 ± 0,03

Tab. 7: Ermittelte kritischen Mizellbildungskonzentrationen mittels Phototensiometer in Phosphatpuffer bei pH 7,2

Die Messung mit der Kapillarelektrophorese bestätigte die mittels Phototensiometrie ermittelten Werte der kritischen Mizellbildungskonzentrationen. Bei pH 7,2 besitzen die gelösten Substanzen eine negative elektrophoretische Mobilität und wandern in die Richtung der Kathode.

Mittels Kapillarelektrophorese wurde die CMC bestimmt, indem der elektrischen Strom bei unterschiedlichen Konzentrationen der Natriumsalze der Glucocorticoidester-Lösungen (0 - 10 % m/V) und bei einer Temperatur von 25 °C gemessen wurde.

DMSO wurde als interner Standard (Marker) für die Ermittlung der elektroosmotischen Mobilität μ_{EOF} verwendet. Die Probenlösungen der Glucocorticoidestersalze (100 $\mu\text{g/ml}$) wurden mit einem Druck von 50 mbar für 5 s eingespritzt (hydrodynamische Einspritzung). Tabelle 8 zeigt die ermittelten Werte der CMC und die Ionenmobilitäten mit der CZE.

Die ermittelten kritischen Mizellbildungskonzentrationen liegen dicht beieinander und dürften auf die relativ ähnliche chemische Struktur der Glucocorticoidester zurückzuführen sein.

Arzneimittel	CMC [%] (m/V), (n = 12)	$\mu_e=10^{-5} \text{ s}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1}$
Prednisolut [®] 100 mg N	3,84	-17,56
Urbason [®] soluble forte 1000	4,44	-18,69
Hydrocortison 100-Rotexmedica	4,38	-21,60

Tab. 8: Ermittelte kritischen Mizellbildungskonzentrationen und Ionenmobilitäten μ_e mittels Kapillarelektrophorese in Phosphatpuffer bei pH 7,2

Da alle Substanzen ähnliche chemische Strukturen aufweisen, waren eng beieinander liegende CMC-Werte zu erwarten. Abbildungen 26, 27 und 28 zeigen graphisch den gemessenen Rausch in Abhängigkeit von der Konzentration der gemessenen Wirkstoffe.

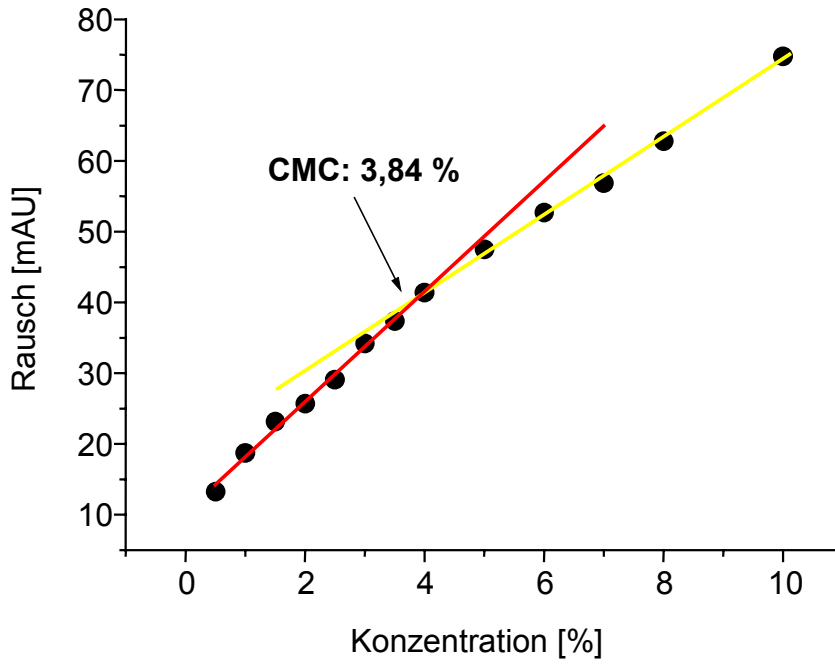


Abb. 26: Graphische Darstellung des Rausches gegen die Konzentration der rekonstituierten Lösung von Prednisolut® 100 mg N zur Ermittlung der CMC

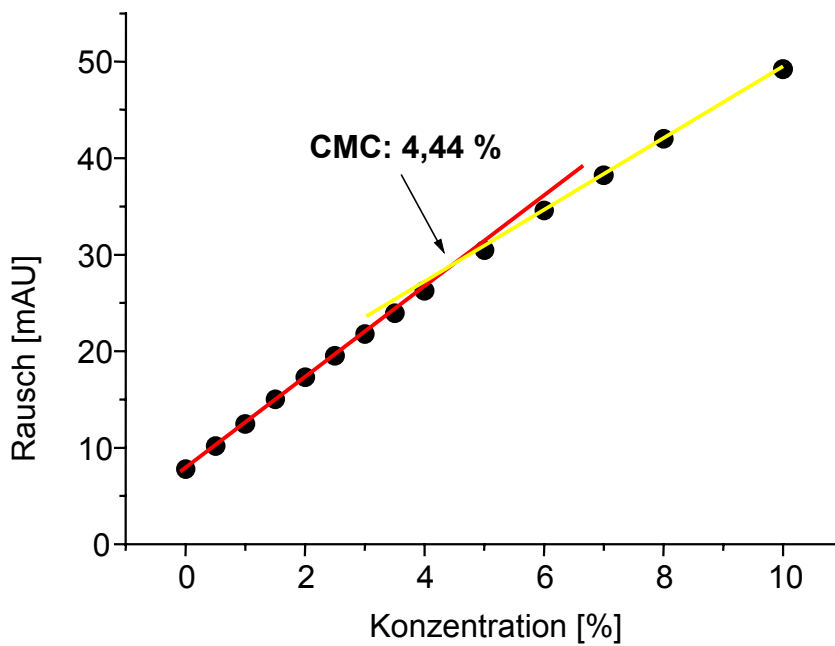


Abb. 27: Graphische Darstellung des Rausches gegen die Konzentration der rekonstituierten Lösung von Urbason® soluble forte 1000 zur Ermittlung der CMC

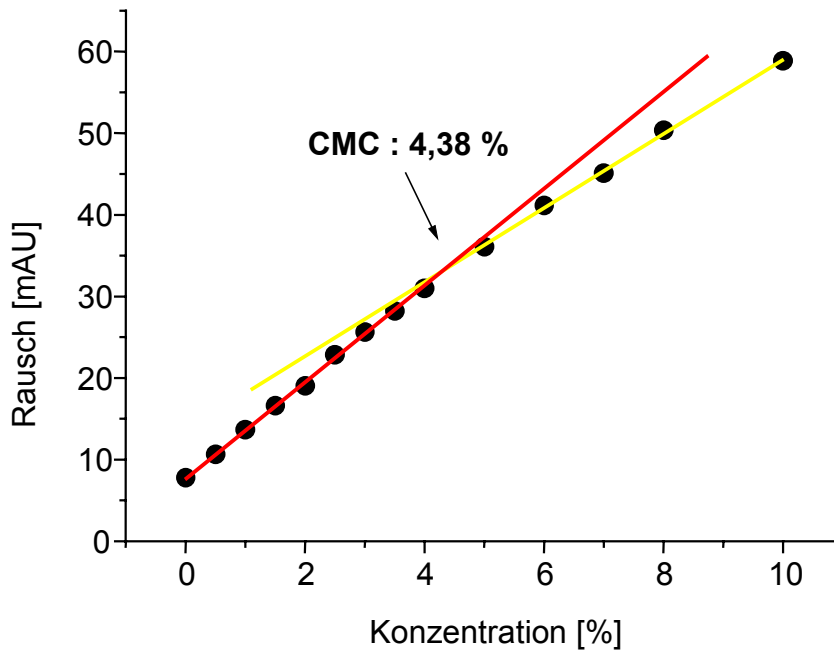


Abb. 28: Graphische Darstellung des Rausches gegen die Konzentration der rekonstituierten Lösung von Hydrocortison 100-Rotexmedica zur Ermittlung der CMC

Die mittels Phototensiometer gemessenen kritischen Mizellbildungskonzentrationen konnten mit der Kapillarelektrophorese-Methode für alle drei Glucocorticoidester bestätigt werden (Tab. 7, Tab. 8).

3.5.2 Kapillarelektrophoretische Quantifizierung des Wirkstoffgehaltes rekonstituierter wässriger Lösungen von Prednisolut® 100 mg N, Urbason® soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica sowie der Wirkstoffe im Blutplasma

Auf der Grundlage der Ergebnisse der CMC-Bestimmung (siehe Kapitel 3.5.1) wurde eine Methode zur Quantifizierung von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Prednisolut® 100 mg N), Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Urbason® soluble forte 1000) und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz

(Hydrocortison 100-Rotexmedica) in wässrigen Lösungen sowie im menschlichem Blutplasma erarbeitet.

Besonderer Wert wurde auf die Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Robustheit des Messverfahrens gelegt. Um diese Bestimmungsmethode als Alternative zur etablierten HPLC-Bestimmung nutzen zu können, ist die Anwendbarkeit an den zwei Medien Wasser und Blutplasma geprüft worden.

Zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden wurden entsprechende Verdünnungsreihen (Wasser: 5 bis 500 µg/ml, Blutplasma: 2,5 bis 500 µg/ml) genutzt. Diese dienten der Optimierung des Messverfahrens auf Standard- bzw. Bubble-Kapillare (Z-Zelle). Wiederfindungsrate und Nachweisgrenze wurden mit weiteren Verdünnungen überprüft. Um das bei der Messung störende Protein aus dem Blutplasma zu entfernen, erfolgte standardmäßig die Eiweißausfällung mit Acetonitril.

Aus den Tabellen 9 und 10 ist ersichtlich, dass die geprüften Konzentrationsbereiche für Wasser und Blutplasma linear verlaufen.

Arzneimittel (Kapillartyp)	a	b	R	SD, (n = 12) 5 bis 500 µg/ml
Prednisolut [®] 100 mg N (Standard)	0,7206	0,1572	0,9997	0,5989
Prednisolut [®] 100 mg N (Bubble)	0,8678	0,2832	0,9991	2,1084
Urbason [®] soluble forte 1000 (Standard)	0,1654	0,1614	0,9995	0,9526
Urbason [®] soluble forte 1000 (Bubble)	1,1233	0,2896	0,9995	1,5568
Hydrocortison 100- Rotexmedica (Standard)	0,3350	0,1752	0,9995	1,0052
Hydrocortison 100- Rotexmedica (Bubble)	0,8312	0,3218	0,9997	1,1854

Tab. 9: Nachweis der Linearität ($A = a + b C$, a;b = Geradenfunktionen) der Konzentrationen zum Rausch bei Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Prednisolut[®] 100 mg N), Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Urbason[®] soluble forte 1000) und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Hydrocortison 100-Rotexmedica) in wässriger Lösung, pH 7,4

Wirkstoff (Kapillartyp)	a	b	R	SD, (n = 12) 2,5 - 500 µg/ml
Prednisolon-21- hydrogensuccinat, Natriumsalz (Bubble)	4,3235	0,6282	0,9986	6,0071
Methylprednisolon-21- hydrogensuccinat, Natriumsalz 1000 (Bubble)	0,8198	0,5874	0,9995	3,1066
Hydrocortison-21- hydrogensuccinat, Natriumsalz (Bubble)	1,7174	0,5586	0,9997	2,6120

Tab. 10: Nachweis der Linearität ($A = a + b C$, $a; b =$ Geradenfunktionen) der Konzentrationen zum Rausch bei Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz, Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz in Blutplasma, pH 7,4

Die Detektionsempfindlichkeit der Kapillaren wurde überprüft. Die Bubblekapillare weist ein stärkeres Rauschverhalten auf und ist damit aufgrund der größeren Empfindlichkeit für Untersuchungen in niedrigerem Konzentrationsbereich besser geeignet. (Abb. 29).

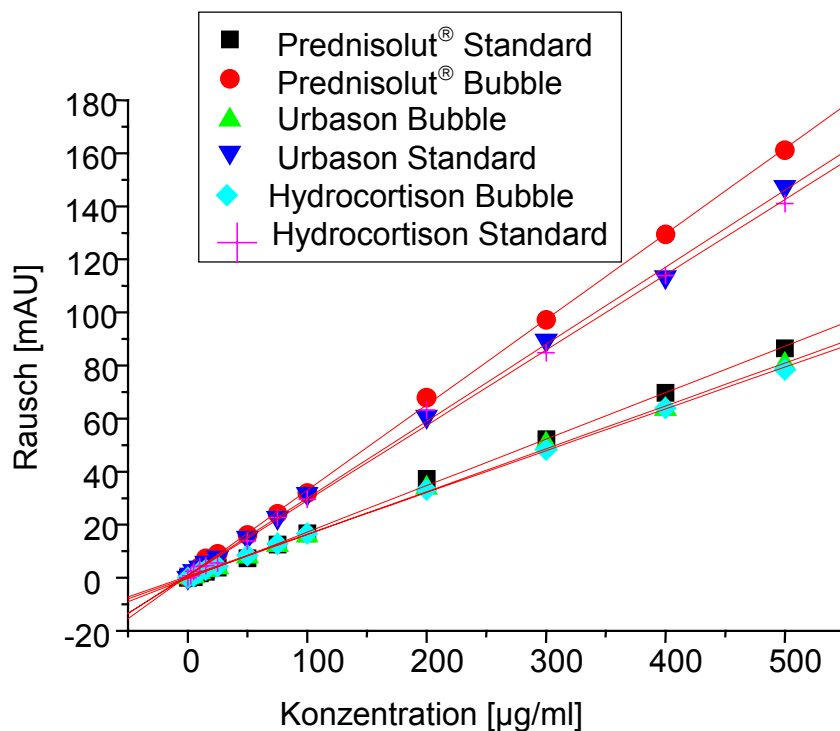


Abb. 29: Detektionsempfindlichkeit der Kapillaren (Kapillartyp: Standard vs. Bubble) von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Prednisolut® 100 mg N), Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Urbason® soluble forte 1000) und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Hydrocortison 100-Rotexmedica) in wässriger Lösung, pH 7,4

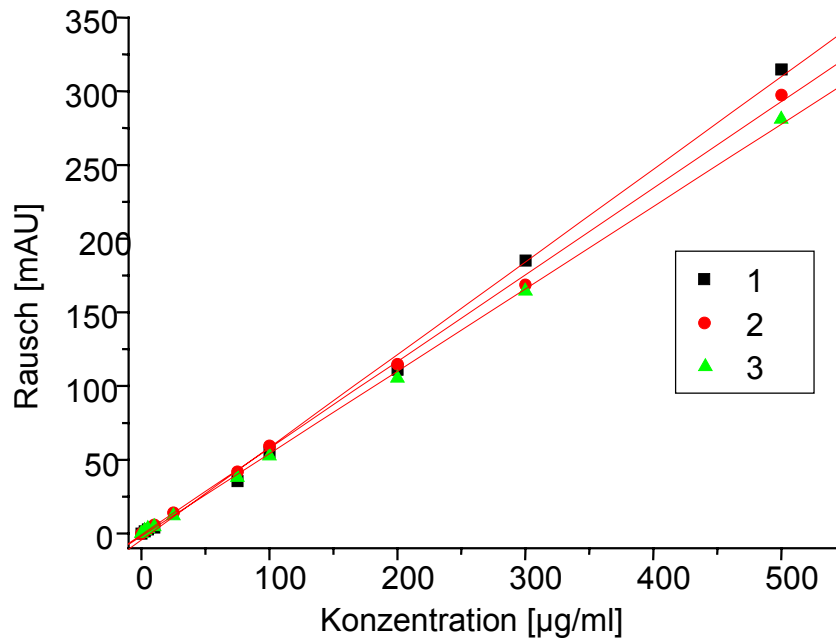


Abb. 30: Detektionsempfindlichkeit der Kapillaren (Kapillartyp: Bubble) für Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (1), Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (2) und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (3) in Blutplasma, pH 7,4

Die Abbildung 30 zeigt die Linearität der gemessenen Werte im Blutplasma mit der Bubble-Kapillare. Die Injektionszeit als Aufenthaltsdauer der Kapillare in der Probe weist für Blutplasma eine Linearität im Bereich von 5 - 15 Sekunden auf (Abb. 31). Um eine optimale Probenentnahme zu sichern, wurde eine Injektionszeit von 10 Sekunden gewählt. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen-Gesetzes konnte bis zu dem Messwert von 15 Sekunden nachgewiesen werden. Die Peaksymmetrie bei 10 Sekunden erwies sich als optimal. Bei 20 Sekunden kam es zu unsymmetrischen Peaks (Abb. 31).

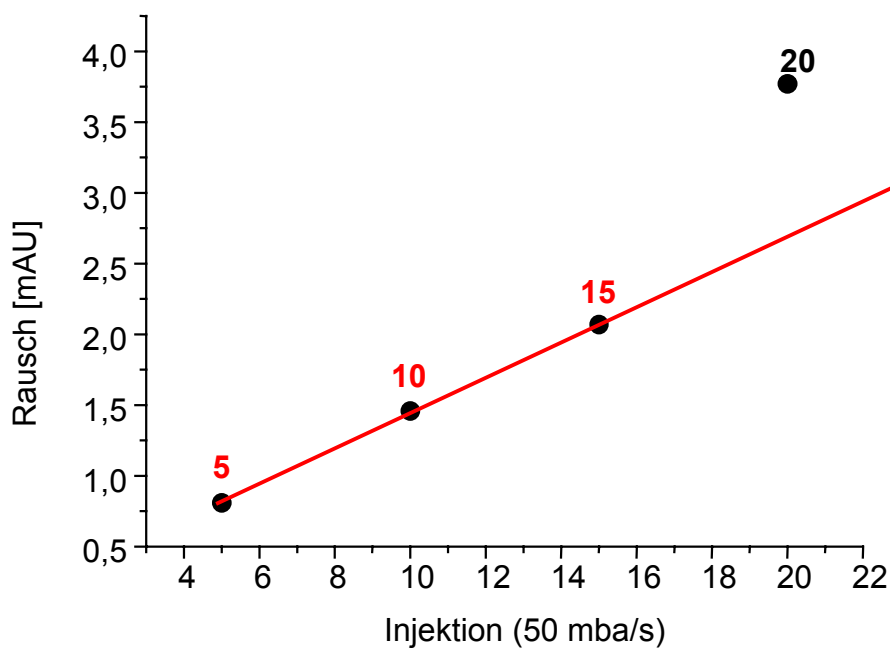


Abb. 31: Lineare Abhängigkeit der Peaks von der Konzentration (gemessen mit der Bubble-Kapillare) einer wässrigen Lösung von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Prednisolut[®] 100 mg N)

Mit der Bubble-Kapillare wird eine höhere Nachweisgrenze erreicht, wobei erwartungsgemäß für Wasser die Nachweisgrenze etwas niedriger liegt, als bei Blutplasmamessungen (Tab. 11, Tab.12).

Arzneimittel (Kapillartyp)	μ_e [cm ² V.s]	R.S.D. (T) [%] 5-500 $\mu\text{g/ml}$ (n = 5)	R.S.D. (A) [%] 5-500 $\mu\text{g/ml}$ (n = 5)	Detektions- grenze [$\mu\text{g/ml}$]
Prednisolut [®] 100 mg N (Standard)	-	-	-	0,82
Prednisolut [®] 100 mg N (Bubble)	-18,13 \pm 0,36e ⁻⁵	0,40 + 0,30	0,86 - 0,40	0,11
Urbason [®] soluble forte 1000 (Standard)	-	-	-	0,84
Urbason [®] soluble forte 1000 Bubble	-19,54 \pm 0,26e ⁻⁵	0,35 - 0,28	0,98 - 0,48	0,11
Hydrocortison 100- Rotexmedica (Standard)	-	-	-	0,98
Hydrocortison 100- Rotexmedica (Bubble)	-20,03 \pm 0,70e ⁻⁵	0,50 - 0,30	0,86 - 0,45	0,14

Tab. 11: Detektionsempfindlichkeit der Kapillaren (Kapillartyp: Standard vs. Bubble) für Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Prednisolut[®] 100 mg N), Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Urbason[®] soluble forte 1000) und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Hydrocortison 100-Rotexmedica) in wässriger Lösung, pH 7,4

Wirkstoff (Kapillartyp)	μ_e [cm ² V.s]	R.S.D. (T) [%] 5-500 μ g/ml (n = 3)	R.S.D. (A) [%] 5-500 μ g/ml (n = 3)	Detektionsgrenze [μ g/ml]
Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Bubble)	-15.51 \pm 0,14e ⁻¹⁵	1,55 - 2,43	1,60 - 1,10	1,00
Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Bubble)	-16.22 \pm 0,32e ⁻¹⁵	1,73 - 2,62	1,90 - 1,30	1,10
Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz (Bubble)	-16.65 \pm 0,29e ⁻¹⁵	1,85 - 2,40	1,80 - 1,10	1,30

Tab. 12: Detektionsempfindlichkeit der Kapillaren (Kapillartyp: Bubble) für Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz, Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz in Blutplasma, pH 7,4

Dabei stellt μ_e die Ionenmobilität, R.S.D. (T) die relative Standardabweichung der Zeit und R.S.D. (A) die relative Standardabweichung über die Fläche dar.

Die relative Standardabweichung liegt unter 2 %. Damit ist die Methode robust. Die Nachweisgrenze in beiden Medien lag bei 2,5 μ g/ml (Abb. 32). Ein Vergleich der Elektropherogramme zeigte identische Peaks in Bezug auf Fläche/Zeit bei einer Konzentration von 100 μ g/ml.

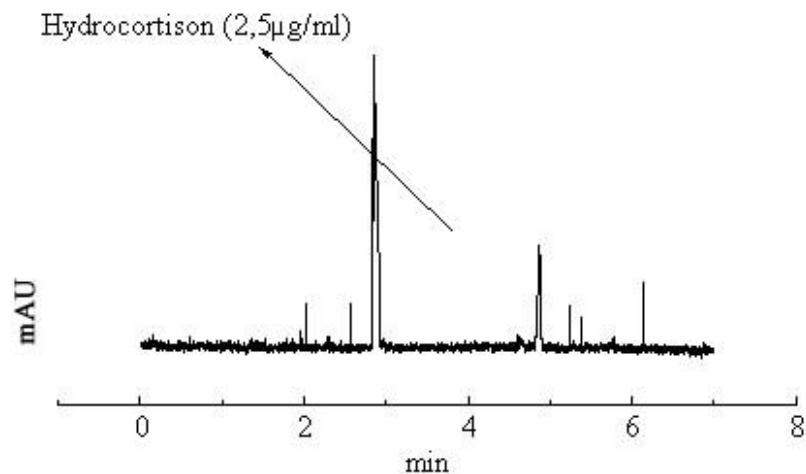


Abb. 32: Beispielhafte graphische Darstellung der Nachweisgrenze von Hydrocortison-21-hydrogensuccinat in Blutplasma, pH 7,4 (Bubble-Kapillare; 2,5 µg/ml)

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Kapillarelektrophorese aufgrund der mizellbildenden Eigenschaften der Glucocorticoidester in den untersuchten Lösungen zur Konzentrationsbestimmung in den Medien Wasser und Blutplasma geeignet ist. Diese Bestimmungsmethode, alternativ zur etablierten HPLC-Methode anwendbar, ergibt gut reproduzierbare Messwerte.

3.5.3 Charakterisierung der Mizellen rekonstituierter wässriger Lösungen von Prednisolut® 100 mg N, Urbason® soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica durch dynamische Lichtstreuung

Die Struktur gefriergetrockneter Glucocorticoide, wie die untersuchten Ester, ist durch verschiedene Kristallformen, amorphes Vorkommen und Solvate gekennzeichnet, die entscheidend für ihre physikalische und chemische Stabilität sind [104, 105]. Dabei spielt die Art der einzufrierenden Lösung oder des feuchten Ausgangsmaterials eine maßgebliche Rolle.

In diesen Lösungen kommen die chemisch oder biologisch aktiven Substanzen meist in geringen Konzentrationen vor, so dass meistens kryoprotektive Substanzen (CPA) wie Mannitol zum Schutz der Wirkstoffe und zum Aufbau eines Lyophilisatgerüsts zugesetzt werden müssen [6, 9].

Neben den rekonstituierten wässrigen Lösungen von Prednisolut® 100 mg N wurden auch die rekonstituierten wässrigen Lösungen von Urbason® soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica in die qualitativen und quantitative Untersuchung zur Mizellbildung einbezogen.

In der Literatur finden sich zahlreiche Ergebnisse zur Mizellbildung von Gallensalzen wie dem Natriumglycodeoxychololat (Abb. 33). Sie sind strukturell ähnlich aufgebaut wie die untersuchten Glucocorticoidester (Abb. 34), [18]. Aufgrund dieser komplexen Steran-Ring-Struktur lag die Vorstellung nahe, dass auch die wässrigen Lösungen der untersuchten Lyophilisate Mizellen bilden würden und damit mizellare Lösungen im Gefrierschritt eingefroren werden, die die amorphe Struktur des Lyophilisatkuchens verursachen.

Das in der Abbildung 33 gezeigte Gallensalz besitzt wie die Glucocorticoidester in der Seitenkette des D-Ringes (Position 17) als ionische Gruppe eine Carboxylfunktion, deren Natriumion in wässrigen Lösungen dissoziiert.

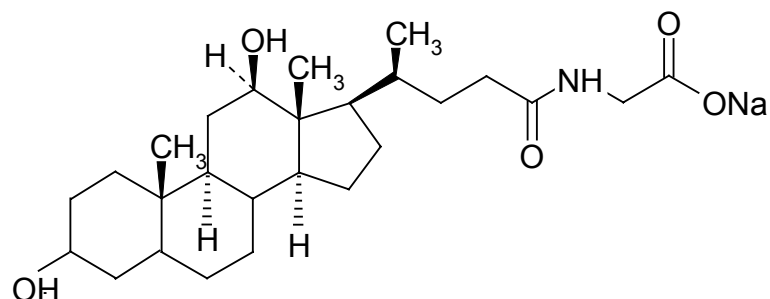
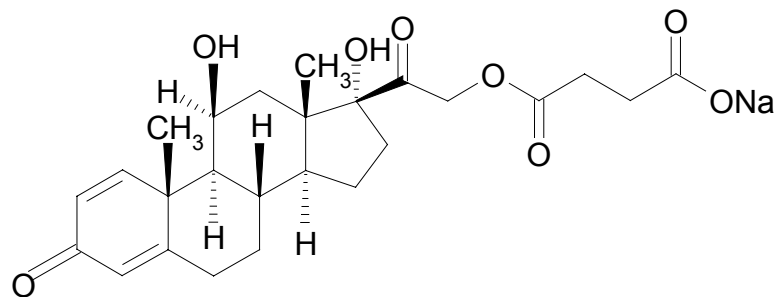


Abb. 33: Strukturformel von Natriumglycodeoxychololat, Natriumsalz, (C₂₆H₄₂NO₅Na)

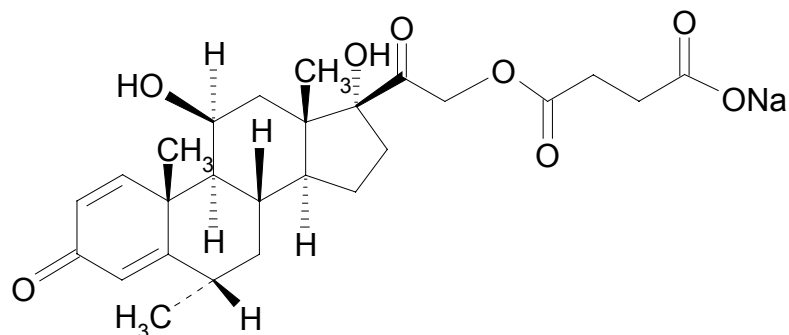
Ergebnisse

Die in Abbildung 34 dargestellten Glucocorticoidester-Wirkstoffe lassen diese strukturellen Ähnlichkeiten zum Gallensalz erkennen (Abb. 32). Die geprüften Estersalze besitzen als ionische Gruppe die Bernsteinsäuregruppe, deren Natriumion in wässrigen Medien dissoziiert. Der hydrophobe Steran-Molekül-Teil hat ebenso wie der der Gallensalze ein cis/trans/trans verknüpftes Steranringgerüst. Strukturelle Differenzen im Steranring-System der untersuchten Glucocorticoidester betreffen die Ringe A und B. Im Vergleich zu Prednisolon-21-hydrogensuccinat besitzt

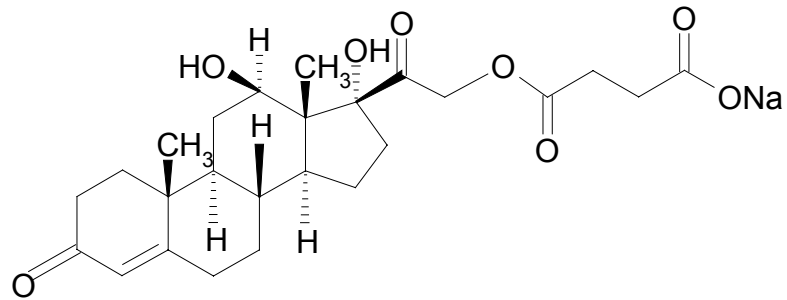
- Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat eine zusätzliche Methylgruppe in C6-Position
- Hydrocortison-21-hydrogensuccinat keine Doppelbindung zwischen den Positionen C1 und C2.



Strukturformel von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz, ($C_{25}H_{31}O_8Na$),
(Wirkstoff von Prednisolut[®] 100 mg N)



Strukturformel von Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz,
($C_{26}H_{33}O_8Na$), (Wirkstoff von Urbason[®] solubile forte 1000)



Strukturformel von Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz, ($C_{25}H_{33}O_8Na$)
(Wirkstoff von Hydrocortison 100-Rotexmedica)

Abb. 34: Strukturformeln von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz,
Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz und
Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz

Um den mittleren Radius der Mizellen in den rekonstituierten Lösungen der untersuchten Glucocorticoidester berechnen zu können, musste der Diffusionskoeffizient bestimmt werden.

Die mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen Diffusionskoeffizienten D der Glucocorticoidester bei den gewählten verschiedenen Konzentrationen sind in Abbildung 35 graphisch dargestellt. Die auf Konzentration 0 extrapolierten Kurven ergeben den jeweiligen freien Diffusionskoeffizienten D_0 .

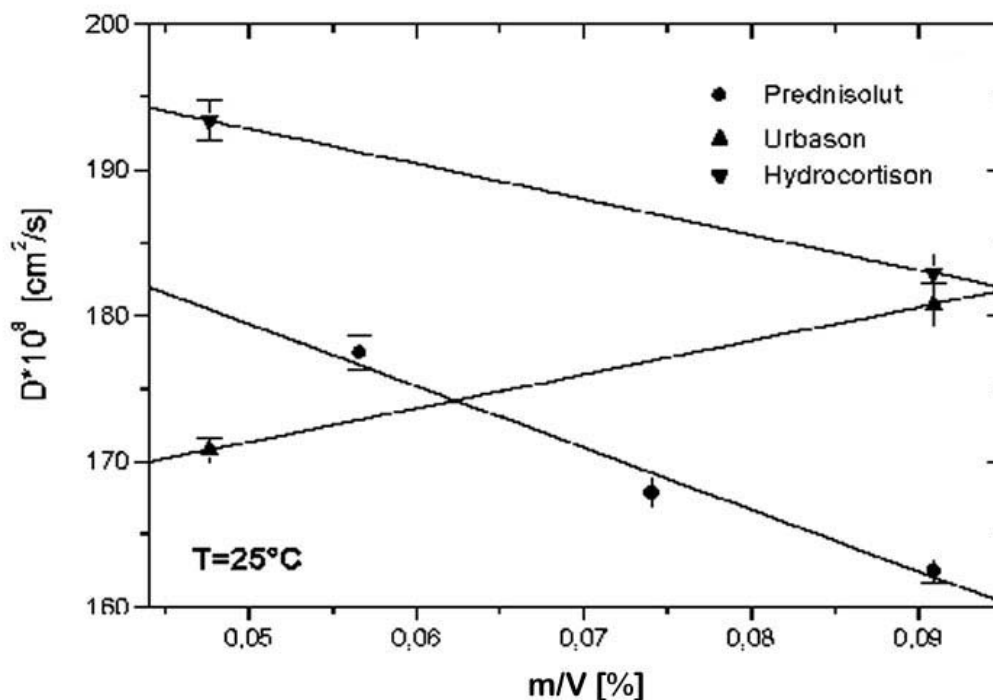


Abb. 35: Graphische Darstellung der mit dynamischer Lichtstreuung gemessenen Diffusionskoeffizienten D von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen der rekonstituierten Lösungen

Tabelle 13 zeigt die errechneten freien Diffusionskoeffizienten D_0 sowie die auf Basis der Gleichung 7 (siehe Kapitel 2.2.6) ermittelten hydrodynamischen Radien R_h der Mizellen. Damit liegen Radien der Mizellen in der Größenordnung einfacher Gallensalze, bei etwa 1 nm [106, 107].

Arzneimittel	D_0 [10^{-8} cm ² /s]	R_h [nm]
Prednisolut [®] 100 mg N	200,64 ± 5,20	1,22 ± 0,04
Urbason [®] soluble forte 1000	159,76 ± 3,52	1,53 ± 0,03
Hydrocortison 100- Rotexmedica	204,92 ± 8,39	1,19 ± 0,05

Tab.13: Berechnete Diffusionskoeffizienten D_0 und hydrodynamische Radien R_h der Mizellen von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat

Die Unterschiede der hydrodynamischen Radien R_h sollten in den bereits diskutierten Differenzen der chemischen Molekülstruktur zu suchen sein.

Die Hydrogensuccinate von Prednisolon und Hydrocortison haben ungefähr die gleiche Mizell-Partikelgröße. Die zusätzliche Methylgruppe im Ring B in Position C 6 von Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat erhöht die Lipophilie des Sterangerüsts und kann somit die Ursache für die größeren Mizellen sein.

Ein interessantes Ergebnis ist der Anstieg der Diffusionskoeffizienten-Kurven in Abhängigkeit zur Konzentration bei Prednisolon-21-hydrogensuccinat und Hydrocortison-21-hydrogensuccinat und der Abfall der Kurve bei Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat (Abb. 35).

Positive Anstiegswerte weisen auf abstoßende Interaktionen hin, negative auf anziehende Interaktionen.

Infolge der Coulombschen Wechselwirkung wäre eine Abstoßungskraft geladener Teilchen zu erwarten. Dieses Verhalten ist bei Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat festzustellen. Andererseits sind Anziehungskräfte durch Wasserstoffbrückenbindungen in den Positionen der Hydroxylgruppen möglich. Es ist wahrscheinlich, dass diese Wasserstoffbrückenbindungen nur bei kleinen Mizellen als

Anziehungskräfte zwischen den Teilchen wirken und die Abstoßungskräfte überwinden können. Aufgrund theoretischer Überlegungen ist vorstellbar, dass die Hydroxylgruppen zusammen mit Ionengruppen auf den Mizellenoberflächen lokalisiert sind. Bei etwas größeren, wie den durch Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat gebildeten Mizellen befinden sich die Hydroxylgruppen innerhalb der Mizellen und wirken als intrapartikuläre Kräfte (Wasserstoffbrückenbindungen). Die Oberflächen sind meist von Ionenkopfguppen der Bernsteinsäuregruppe besetzt, die eine interpartikuläre Abstoßung bewirken.

3.5.4 Charakterisierung der mizellaren wässrigen Lösung von Prednisolut® 100 mg N durch dynamische Lichtstreuung in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke

Aufgrund der komplexen chemischen Struktur von Prednisolon-21-hydrogensuccinat, die sich auch im Verhältnis von hydrophober zu hydrophiler Mizelloberfläche darstellt, ist das Mizellbildungsverhalten insbesondere beim Einfriervorgang als äußerst komplex zu bewerten. Die tatsächliche Aggregationszahl wird dabei durch die entsprechenden Bedingungen im Lösungsmittel bestimmt.

Die Ionenstärke des Lösungsmittels bestimmt den Grad der Abschirmung der Mizelloberflächenladung und damit den Grad elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Mizellen.

In der Phase des Einfrierens bei der Lyophilisation kommt es im Allgemeinen zur Erhöhung der Konzentrationen in der Lösung und der pH-Wert der Lösungsphase verändert sich.

Das trifft auch auf Phosphat- und Bicarbonatpuffer sowie Puffer mit Aminosäuren zu. Die Ursache dieser sogenannten Gefrierkonzentration liegt in den unterschiedlichen Löslichkeiten von Puffersalzen und dem zeitlich versetzten Auskristallisieren beim

Einfrieren [21, 108]. So verschiebt sich etwa der pH-Wert eines Phosphatpuffers von pH 7,0 beim Einfrieren auf pH 3,5, da das Dinatriumhydrogenphosphat eine geringere Löslichkeit hat als das Mononatriumhydrogenphosphat und daher zuerst auskristallisiert [109].

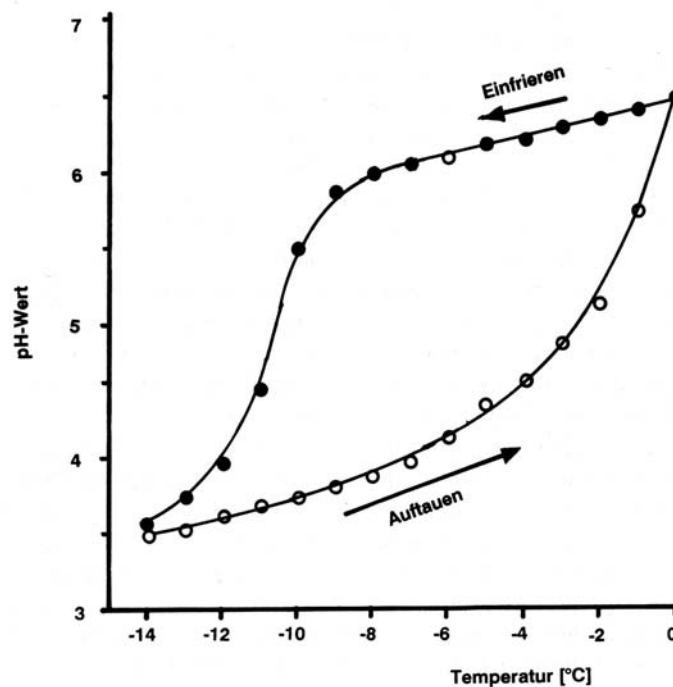


Abb. 36: Auswirkung der Gefrierkonzentration auf den pH-Wert eines Zitronensäure-Phosphatpuffer enthaltenden Systems [21]

Das Beispiel eines Zitronensäure-Phosphatpuffer-Gemisches zeigt, dass der pH-Wert während des Gefrierens von pH 6,5 auf pH 3,5 absinkt (Abb. 36). Beim Auftauen wird der ursprüngliche pH-Wert wieder erreicht. In kolloidalen Systemen und Polymerlösungen führt diese, mit dem Einfrieren einhergehende Konzentrierung der Lösung meistens zum Auftreten unerwünschter Folgeerscheinungen, wie dem Kollabieren der Lyophilisatkuchen-Struktur. Der Einfluss des pH-Wertes im Lösungsmittel auf das Mizellverhalten der untersuchten Wirkstoffe in wässrigen Systemen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

Im Bereich des im Fertigarzneimittel Prednisolut® 100 mg N enthaltenen Phosphatpuffers wurden entsprechend der Abbildung 37 die Ionenstärke bzw. Molarität der Phosphatpuffer-Lösung variiert, um den Effekt der Änderung von pH-Wert und Ionenstärke auf die Mizellbildung in wässrigen Lösungen von Prednisolut® 100 mg N zu untersuchen. Das Verhalten der Mizellbildung während des Einfrierens ist so bis zu einem gewissen Grade simulierbar.

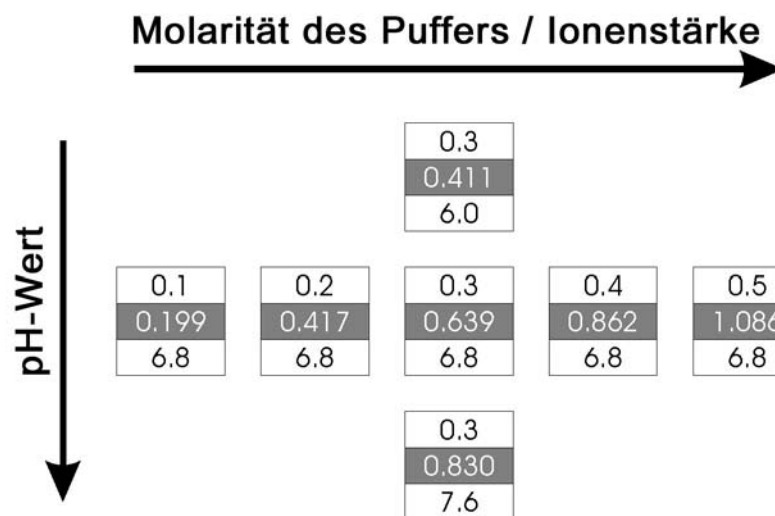


Abb. 37: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - Puffer der mizellaren Lösungen, obere Zahl (Molarität), mittlere Zahl (Ionenstärke) und untere Zahl (pH-Wert)

Die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D_0 von der Konzentration wurde für die verschiedenen Molaritäten/Ionenstärken ermittelt. Die graphische Darstellung ist in Abbildung 38 zu sehen.

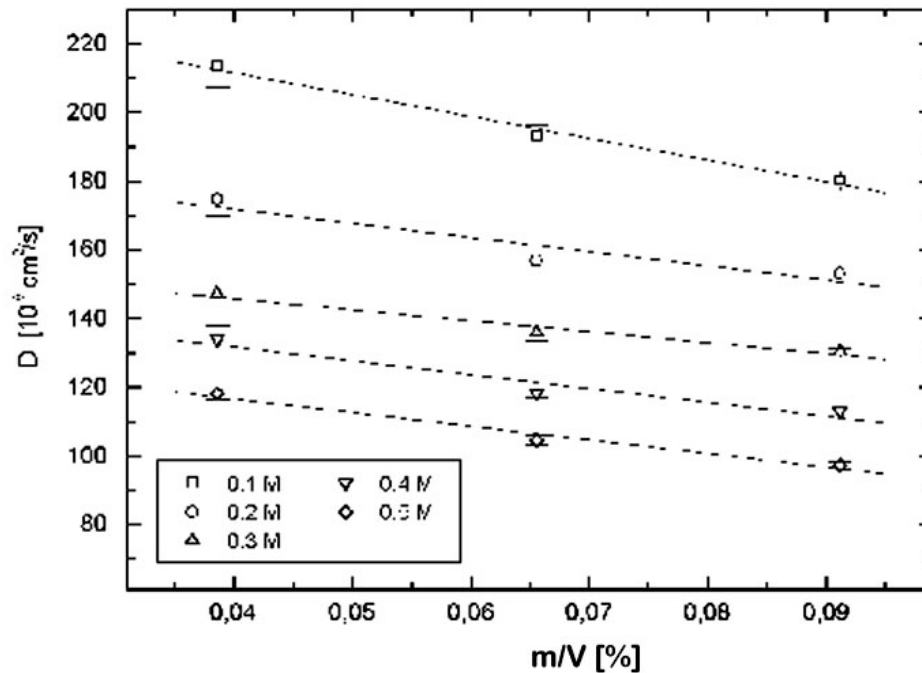


Abb. 38: Graphische Darstellung des Diffusionskoeffizienten D von Mizellen des Prednisolon-21- in Abhängigkeit von der Molarität der Pufferlösung, (linear angepasst)

Aus Abbildung 38 ist ersichtlich, dass die ermittelten Werte für den Diffusionskoeffizienten D mit steigender Molarität des Puffers abnehmen. Dieses Ergebnis weist auf eine steigende Größe und zunehmende Aggregationszahl der Mizellen hin. Diese Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Wirkstoffkonzentration ergibt über alle gemessenen molaren Konzentrationen ein ähnliches Bild. Der beinahe konstante negative Anstieg ist auf die Anziehungskräfte zwischen den Mizellen zurückzuführen.

Es ist davon auszugehen, dass mit höher konzentrierten Puffern die Stärke der Wechselwirkung zwischen den Ionenmizellen von einer Abstoßungs- (Coulombsche Wechselwirkung) zu einer Anziehungskraft (van-der-Waalssche Wechselwirkung)

geändert werden kann. Dieses Verhalten wurde bei einfachen Tensiden [110, 111] sowie bei Gallensalzen nachgewiesen [112].

Bei den untersuchten Pufferkonzentrationen wirken noch von Anziehungskräfte zwischen den Mizellen. Die extrapolierten freien Diffusionskoeffizienten D_0 sowie die abgeleiteten Radien R_h , R_n sind im oberen Teil von Tabelle 13 zu sehen.

$c_{\text{Puffer}} \text{ [M]}$	pH-Wert	$D_0 \text{ [} 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}],$ $n = 6$	$\delta D/D_0,$ $n = 6$	$R_h \text{ [nm]},$ $n = 6$	$R_n \text{ [nm]},$ $n = 6$
0,1	6,8	$237,0 \pm 4,7$	$0,25 \pm 0,12$	$1,03 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,15$
0,2	6,8	$188,4 \pm 10,3$	$0,29 \pm 0,07$	$1,30 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,16$
0,3	6,8	$158,6 \pm 4,0$	$0,27 \pm 0,08$	$1,54 \pm 0,04$	$1,26 \pm 0,17$
0,4	6,8	$147,9 \pm 7,6$	$0,27 \pm 0,06$	$1,65 \pm 0,08$	$1,35 \pm 0,18$
0,5	6,8	$132,4 \pm 4,3$	$0,26 \pm 0,08$	$1,84 \pm 0,06$	$1,54 \pm 0,20$
0,3	6,0	$176,3 \pm 7,2$	$0,23 \pm 0,05$	$1,38 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,12$
0,3	6,8	$158,6 \pm 4,0$	$0,27 \pm 0,08$	$1,54 \pm 0,04$	$1,26 \pm 0,17$
0,3	7,6	$184,6 \pm 14,6$	$0,24 \pm 0,10$	$1,32 \pm 0,10$	$1,12 \pm 0,23$

Tab. 13: Zusammenstellung der ermittelten freien Diffusionskoeffizienten D_0 , des Polydispersitätsindex $\delta D/D_0$, des hydrodynamischen Mizellradius R_h , des mittleren Mizellradius R_n in Abhängigkeit von der Molarität und des pH-Wertes des Puffers am Beispiel von Prednisolon-21-hydrogensuccinat

Diese Ergebnisse zeigen sehr anschaulich, dass sich der mittlere Mizellradius mit steigender Pufferkonzentration erhöht.

Die Zusammenhänge zwischen dem ermittelten freien Diffusionskoeffizienten D_0 , dem hydrodynamischen Mizellradius R_h und dem mittleren Mizellradius R_n in Abhängigkeit von der Molarität des Puffers sind in Abbildung 39 dargestellt.

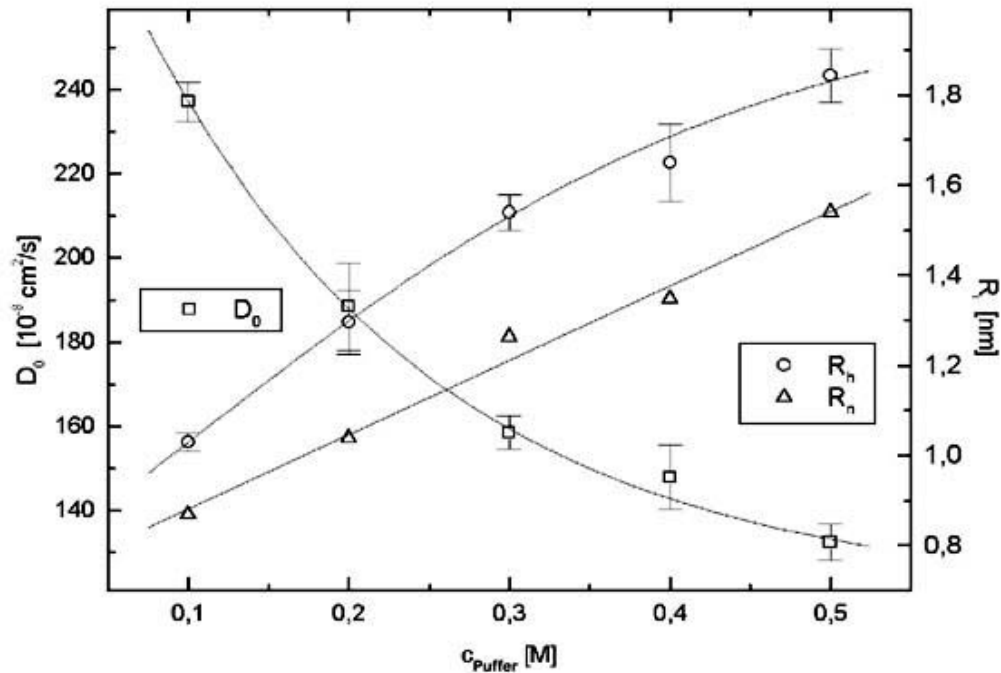


Abb. 39: Graphische Darstellung der ermittelten freien Diffusionskoeffizienten D_0 , des hydrodynamischen Mizellradius R_h und des mittleren Mizellradius R_n in Abhängigkeit von der Molarität M des Puffers bei 25 °C

Sowohl D_0 -Werte als auch R_h -Werte wurden mit verschiedenen asymptotischen Funktionen angepasst, um die Parameter für die Pufferkonzentrationen null und unendlich zu erhalten. Dabei ergeben sich die Werte für $D_0(c_{\text{Puffer}} = 0) = 3,22 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, $D_0(c_{\text{Puffer}} = \infty) = 1,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, $R_h(c_{\text{Puffer}} = 0) = 0,76 \text{ nm}$ and $R_h(c_{\text{Puffer}} = \infty) = 2,03 \text{ nm}$.

Die wahrscheinlich lineare Abhängigkeit des mittleren Mizellradius R_n von der Pufferkonzentration ist nicht leicht zu erklären. Mathematisch gesehen kann der konstante Nenner von Gleichung 7 (siehe Kapitel 2.2.6.) zusammen mit dem Anstieg des hydrodynamischen Radius R_h das asymptotische Verhalten aufwiegen.

Ein fast lineares Verhalten zeigt die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D bis zur Pufferkonzentration von 0,3 M (Abb. 40).

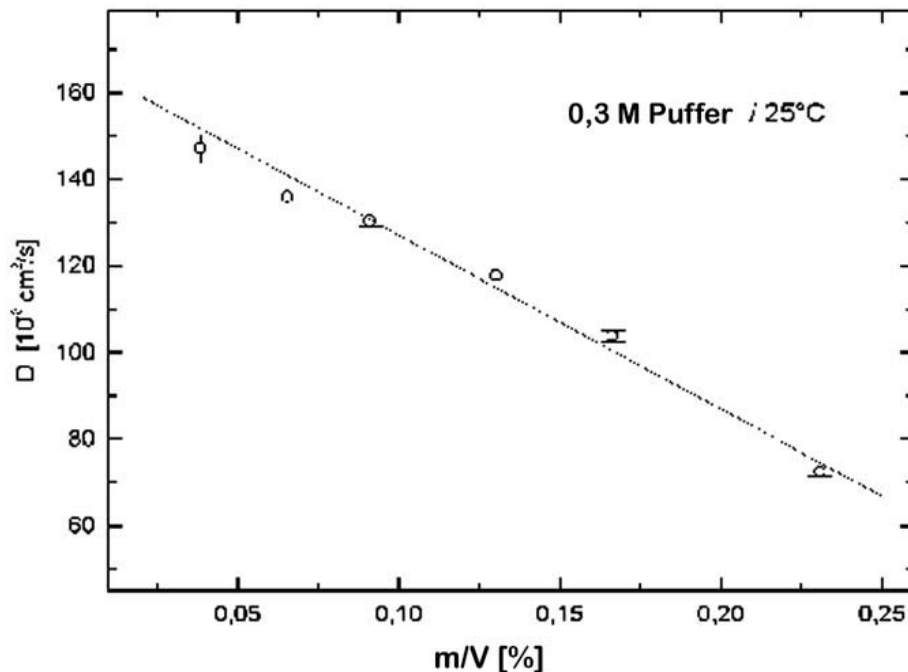


Abb. 40: Graphische Darstellung der linearen Regression des Diffusionskoeffizienten D von Mizellen in Abhängigkeit von der Konzentration von Prednisolon-21-hydrogensuccinat in 0,3 M Phosphat-Pufferlösung

Unter der Voraussetzung, dass die Art der Wechselwirkung zwischen den Mizellen für alle Konzentrationen von Prednisolon-21-hydrogensuccinat vergleichbar ist, ergibt sich aus dieser Linearität, dass sich die Mizellgröße bei zunehmender Mizell-dichte nicht verändert. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis auf das Verhalten von wässrigen Ansatz-Lösungen bei der Herstellung von Prednisolut® 100 mg N während des Gefrierens: Der mittlere Mizellradius bleibt konstant, die Mizell-dichte erhöht sich mit abnehmenden Wassergehalt.

Das gleiche Mizellverhalten wie in Abbildung 40 wurde für die pH-Werte 6,0; 6,8 und 7,6 gemessen.

Diese extrapolierten Mizellparameter sind im unteren Teil der Tabelle 13 aufgeführt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass während des Einfrierens die Mizelldichte wächst, der mittlere Mizellradius und damit deren -größe annähernd gleich bleibt. Sie erstarren letztendlich in einer Grenzflächenstruktur und bilden so in ein Gerüst.

4 Zusammenfassung und Bewertung

Mit den durchgeführten physiko-chemischen und morphologischen Untersuchungen konnten wichtige Parameter zur Qualitätsbeschreibung des lyophilisierten Glucocorticoidester-Arzneimittels Prednisolut® 100 mg N gewonnen werden. Aspekte waren dabei sowohl Einflussgrößen im Gefriertrocknungsprozess als auch Qualitätsanforderungen für die Rekonstitution zur gebrauchsfertigen Injektionslösung. Im Ergebnis der röntgendiffraktometrischen Untersuchungen konnte der Nachweis erbracht werden, dass sowohl die Lyophilisatkuchen von Prednisolut® 100 mg N als auch die Lyophilisatkuchen von Urbason® soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica amorphe Struktur besitzen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass im Herstellungsprozess von Prednisolut® 100 mg N eine vollständige Umsetzung von Prednisolon-21-hydrogensuccinat mit dem zugesetzten Natriumhydrogencarbonat zum Salz erfolgt und somit der arzneilich wirksame Bestandteil Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz im Lyophilisat vorliegt.

Die thermogravimetrischen Messungen bei nachfolgender FT-IR Kopplung zeigten, dass die Veränderungen im Lyophilisatkuchen, beobachtet in der DSC-Aufheizmessungskurve, neben den erwarteten Freisetzungen des gebundenen Restwassers, chemische Zersetzungen der Bernsteinsäuregruppe bzw. Pyrolyseerscheinungen des Natriumsalzes von Prednisolon-21-hydrogensuccinat sind.

Unter besonderer Berücksichtigung der Gruppe lyophilisierter Glucocorticoidester wurde speziell der Einfluss der Phosphatpufferstärke und der Restfeuchte auf die Morphologie des Lyophilisatkuchens untersucht.

Zusammenfassung und Bewertung

Es konnte am Beispiel von Modellformulierungen von Prednisolut[®] gezeigt werden, dass neben der Restfeuchte vor allem das zur Einstellung der Isotonie und Stabilisierung des pH-Wertes erforderliche Puffersystem einen entscheidenden Einfluss auf den Glasübergang des als amorph charakterisierten Lyophilisatkuchens hat.

Vergleichend wurden die industriell hergestellten Glucocorticoidester-Lyophilisate Urbason[®] soluble forte 1000 und Hydrocortison 100-Rotexmedica in diese Untersuchungsreihe einbezogen.

Morphologische Untersuchungen am Lyophilisatkuchen von Prednisolut[®] 100 mg N mittels Auflicht- und Rasterelektronenmikroskopie belegen das Vorliegen einer amorphen Blättchenstruktur mit rauer Oberfläche und spaltartigen Öffnungen mit schmalen kaminartigen Kavitäten. Um die Ausbildung dieser amorphen Strukturen näher zu untersuchen, wurde der Einfriervorgang im Environmental Scanning Elektronen Mikroskop unter Absenkung der Temperatur der zu lyophilisierenden Prednisolut[®]-Lösung auf bis zu -10 °C simuliert.

Die zu beobachtende Porenstruktur des Lyophilisates in Form eines grobmaschigen Netzwerks umfasst Hohlräume mit einer Ausdehnung von wenigen Mikrometern bis etwa 100 µm.

In weiterführenden Untersuchungen mit rekonstituierten Lösungen mittels Phototensiometrie, Kapillarelektrophorese bzw. dynamische Lichtstreuung konnte die Mizellbildung der Salze der Glucocorticoidester in der Lösung bewiesen werden. Durch die kapillarelektrophoretischen Analysen wurden die gemessenen Werte der mit der Phototensiometrie erhaltenen kritischen Mizellbildungskonzentrationen der geprüften Glucocorticoidester in wässriger Lösung bestätigt. Die Messung mittels Kapillarelektrophorese ergab folgende kritische Mizellbildungskonzentrationen:

Prednisolut® 100 mg N	3,84 [%] (m/V)
Urbason® soluble forte 1000	4,44 [%] (m/V)
Hydrocortison 100-Rotexmedica	4,38 [%] (m/V)

Auf Basis der oben genannten Messmethodik der Kapillarelektrophorese zur Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration in wässriger Lösung wurde eine Methode entwickelt, die Konzentrationen der Succinatester-Prodrugs von Prednisolon, Methylprednisolon und Hydrocortison im Blutplasma zu bestimmen. Die Robustheit dieser Methode wurde nachgewiesen.

Zur Klärung der Mizellgröße wurden dynamische Laserstreuexperimente durchgeführt, mit deren Hilfe über die Berechnung der Diffusionskoeffizienten, die hydrodynamischen Mizellradien bestimmt werden konnten. Die erhaltenen Durchmesser der Mizellen liegen in der Größenordnung von 2 - 3 nm und damit in der Größenordnung einfacher Gallensalze.

Die Abhängigkeiten der mizellaren Parameter Größe und Anzahl von den Lösungsbedingungen Ionenstärke, Wirkstoffkonzentration und pH-Wert wurden aufgeklärt und diskutiert. Die Mizellgröße bleibt bei sinkendem pH-Wert bzw. steigender Ionenstärke konstant, die Mizelldichte nimmt mit abnehmenden Wassergehalt zu.

Diese Ergebnisse beschreiben die Vorgänge in wässrigen Ansatz-Lösungen bei der Herstellung von Prednisolut® 100 mg N während des Gefriervorganges.

Beim Einfrieren nimmt die Mizelldichte zu. Letztendlich erstarrt, wie durch die Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie nachgewiesen, die gefrorene Lösung in einer Grenzflächenstruktur, die gleichzeitig gerüstbildend ist.

Zusammenfassung und Bewertung

Es konnte gezeigt, dass der mizellare Charakter der Wirkstofflösung ab einer bestimmten Konzentration die physiko-chemische Ursache für die problemlose Lyophilisierbarkeit und leichte Rekonstitution zur anwendungsbereiten Injektionslösung ist.

Die nachgewiesene Lösungsstruktur der Mizellen von Glucocorticoidestersalzen belegt, dass ein Zusatz von gerüstbildenden Substanzen zur Erzielung der gewünschten Qualität und Stabilität des Lyophilisatkuchens nicht erforderlich ist. Mit dem vorgeschlagenen Methodenspektrum kann schon in der frühen Phase ein entwicklungstechnischer Ansatz zur pharmazeutischen Präformulierung konzipiert werden.

Konventionell hergestellte Lyophilisate wurden bisher im Laborversuch mehr oder weniger zufällig entwickelt. Mit dem Hintergrund dieses Ideenansatzes ist wesentlicher Entwicklungsaufwand vermeidbar.

Diese methodische Vorgehensweise ist geeignet, um im Screening von Lyophilisat-Formulierungen das Erfordernis des Zusatzes von Gerüstbildnern zu prüfen und gegebenenfalls auszuschließen.

5 Materialien und Methoden

5.1 Angaben zu den untersuchten Arzneimitteln

5.1.1 Prednisolut® 100 mg N

Prednisolut® 100 mg N, Ch.B.: 010996 (Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena), [113]

Darreichungsform:

Durchstechflasche mit Pulver (Lyophilisat) zur Herstellung einer Injektionslösung mit Lösungsmittel (Wasser für Injektionszwecke)

Arzneilich wirksamer Bestandteil:

1 Durchstechflasche enthält 104,775 mg Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz entsprechend 100 mg Prednisolon-21-hydrogensuccinat entsprechend 78,26 mg Prednisolon.

IUPAC Name:

11 β , 17-Dihydroxy-21-hydroxysuccinyloxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione

Sonstige Bestandteile:

Natriumhydrogencarbonat, CAS-nr.: 144-55-8

Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat, CAS-nr.: 10140-65-5

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat CAS-nr.: 13742-35-0

Spezifikation:

Prednisolon-21-hydrogensuccinat: USP

Natriumhydrogencarbonat: Ph. Eur.

Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat: Ph. Eur.

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat: Ph. Eur.

Primär-Verpackung:

Durchstechflasche 6R, entsprechend DIN-ISO 8362-1, Fiolax-Klarglas der hydrolytischen Klasse I; Injektionsstopfen 20 mm, FM 357/1; Aluminium-Lochkappe mit Kunststoffscheibe (Snap Cap) weiß, Code 02/KK2046, nach DIN-ISO 8362-7

5.1.2 Urbason® soluble forte 1000

Urbason® soluble forte 1000, Ch.B.: H 101 (Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden) [112}

Darreichungsform:

Durchstechflasche mit Pulver (Lyophilisat) zur Herstellung einer Injektionslösung mit Lösungsmittel (Wasser für Injektionszwecke)

Arzneilich wirksamer Bestandteil:

1 Durchstechflasche enthält 1325,92 mg Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz entsprechend 1000 mg Hydrocortison.

IUPAC Name:

11 β , 17-Dihydroxy-6 α -methyl-21-oxidosuccinyloxy-4-pregnadiene-3,20-dione

Sonstige Bestandteile (deklariert in der Gebrauchsinformation)

Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat, CAS-nr.: 10140-65-5

Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat CAS-nr.: 13742-35-0

Spezifikation:

Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat: Ph. Eur.

Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat: Ph. Eur.

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat: Ph. Eur.

Primär-Verpackung:

Durchstechflasche 20R, entsprechend DIN-ISO 8362-1, Fiolax-Klarglas der hydrolytischen Klasse I; Injektionsstopfen 20 mm, FM 357/1; Aluminium-Lochkappe mit Kunststoffscheibe (Snap Cap) blau, Code 14, nach DIN-ISO 8362-7

5.1.3 Hydrocortison 100-Rotexmedica

Hydrocortison 100-Rotexmedica, Ch.B.:90115 (Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Trittau), [112]

Darreichungsform:

Durchstechflasche mit Pulver (Lyophilisat) zur Herstellung einer Injektionslösung mit Lösungsmittel (Wasser für Injektionszwecke)

Arzneilich wirksamer Bestandteil:

1 Durchstechflasche enthält 133,70 mg Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz entsprechend 100 mg Hydrocortison.

IUPAC Name:

11 β , 17-Dihydroxy-21-hydroxysuccinyloxy-4-pregnene-3,20-dione

Sonstige Bestandteile:

Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat, CAS-nr.: 10140-65-5

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat CAS-nr.: 13742-35-0

Spezifikation:

Hydrocortison-21-hydrogensuccinat: Ph. Eur.

Natriummonohydrogenphosphat: Ph. Eur.

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat: Ph. Eur.

Primär-Verpackung:

Durchstechflasche 6R, entsprechend DIN-ISO 8362-1, Fiolax-Klarglas der hydrolytischen Klasse I; Injektionsstopfen 20 mm, FM 357/1; Aluminium-Lochkappe mit Kunststoffscheibe (Snap Cap) weiß, Code 02/KK2046, nach DIN-ISO 8362-7

5.2 Angaben zur Herstellung der untersuchten Prednisolut[®]-Lyophilisate

5.2.1 Gefriertrocknung

Herstellung Prednisolut[®] 100 mg N, Ch.B.: 010996:

Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, Rosslau

Herstellung:

Die Angaben zur Herstellung von Prednisolut[®] 100 mg N unterliegen dem Eigentum der Jenapharm GmbH & Co.KG und können im dem öffentlichen Exemplar nicht abgedruckt werden.

Herstellung Modellformulierungen:

Die Modellformulierungen zur Evaluierung des Glasüberganges vom Anteil des Puffers wurden im Labormaßstab in einer Christ ALPHA 2-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) mit integrierter Stellflächentemperierung nach dem Verfahren A (Gefrieren und Trocknen innerhalb der Eiskondensationskammer) hergestellt.

Primär-Verpackung:

Durchstechflasche 6R, entsprechend DIN-ISO 8362-1, Fiolax-Klarglas der hydrolytischen Klasse I; Injektionsstopfen 20 mm, FM 357/1; Aluminium-Lochkappe mit Kunststoffscheibe (Snap Cap) weiß, Code 02/KK2046, nach DIN-ISO 8362-7

Herstellung:

Materialien und Methoden

Die Herstellung der Rezepturlösungen erfolgte bei Raumtemperatur (18 bis 22 °C). Die Rezepturmenge Wasser für Injektionszwecke wurde im Ansatzgefäß vorgelegt, dann wurden die Rezepturmengen der Puffer Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat und Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat dem Wasser hinzugefügt und unter Rühren gelöst. Der potentiometrische pH-Wert der Lösung lag bei $\text{pH } 6,8 \pm 0,2$.

Anschließend wurde die Rezepturmenge Natriumhydrogencarbonat dazugegeben.

Die Zugabe des Prednisolon-21-hydrogensuccinates erfolgte unter Rühren nach dem Lösen des Natriumhydrogencarbonats. 30 min wurde bis zur Klarheit der Lösung nachgerührt.

Danach wurde der pH-Wert nochmals potentiometrisch überprüft. Er lag im Bereich von pH 6,5 bis 7,0. Die fertige Lösung wurde vor der Gefriertrocknung durch Cellulosenitratfilter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mit einer Porengröße 0,45 μm gefiltert. Die filtrierte Rezepturlösung wurde unter aseptischen Bedingungen (Reinheitsklasse A EG-GMP-Richtlinie) in vorbereitete 6R-Durchstechflaschen (farblos, Behälterklasse 1) und Aufsetzen eines GF-Stopfens in GT-Stellung (halbaufgestzt) abgefüllt.

Die Durchstechflaschen und Stopfen wurden zuvor in der Spülmaschine mit Wasser für Injektionszwecke gereinigt. Die Standzeit der Lösung vom Ansatz bis zum Beginn der Lyophilisierung betrug max. 4 Stunden.

Temperaturprogramm:

- Einfrieren: - 45 C; Dauer: 3 h 30 min
- Haupttrocknung: - 25 °C bis 0 °C (Verlauf); Druck: 0,1 mbar; Dauer: 34 h
- Nachtrocknung: Endtemperatur: 25 °C; Druck: 0,001 mbar; Dauer: 4 h 30 min

Gesamtdauer: 42 h

Nach Beendigung der Lyophilisierung wurden die Flaschen entnommen und zugebördelt.

Die Bestimmung des Restwassergehalts erfolgte mit der Methode nach Karl-Fischer.

Beteiligte Institution:

Jenapharm GmbH & Co. KG, 07745 Jena

5.3 Methoden zur Charakterisierung der untersuchten Lyophilisate

5.3.1 Röntgendiffraktometrie

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die Datenaufnahme erfolgte im Transmissionsmodus auf dem Pulverdiffraktometer URD 63 (Freiberger Präzisionsmechanik GmbH, Freiberg) unter der Verwendung von Germanium-monochromatisierter CuK (α_1) Strahlung (0,15418 nm) mit einem Nickelfilter zur Unterdrückung der beta-Anteile.

Die Kupferanode wurde mit 40 kV und 30 mA betrieben. Die Messung erfolgte mit einem linear ortsempfindlichen Detektor mit einer Auflösung von $0,08^\circ$ im Bereich 3° bis 35° (Schrittweite $0,1^\circ$, 60 s/Schritt). Alle Winkelangaben beziehen sich auf 2θ . Die Lyophilisate wurden vorsichtig in einem Achatmörser zerdrückt. Die Proben wurden zwischen zwei Polyacetatfolien eingeschlossen. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der Software URD.

Beteiligte Institution:

Martin-Luther-Universität Halle, IWZ Materialwissenschaften, Halle

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die Datenaufnahme erfolgte im Transmissionsmodus auf dem Stoe Pulverdiffraktometer STADI P (Stoe & Cie GmbH, Darmstadt) unter der Verwendung von Germanium-monochromatisierter CuK (α_1) Strahlung (1,5406 Å). Die Kupferanode wurde mit 40 kV und 39 mA betrieben. Die Messung erfolgte mit einem linear ortsempfindlichen Detektor mit einer Auflösung von 0,08° im Bereich 3° bis 35° (Schrittweite 0,5°, 60 s/Schritt). Die Lyophilisate wurden vorsichtig in einem Achatmörser zerdrückt. Die Proben wurden zwischen zwei Polyacetatfolien eingeschlossen. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der Software Stoe WinX (Version 1.07).

Beteiligte Institution:

Schering AG, Chemische Entwicklung, Berlin

5.3.2 Differential Scanning Calorimetrie

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die DSC-Untersuchungen wurden mit einer Heizrate von 5 K/min und 10 K/min an einem Mettler Toledo DSC 822e (Mettler-Toledo GmbH, Giessen) bei geschlossenem und gelochtem Aluminiumtiegel unter Luftatmosphäre durchgeführt.

Die zu untersuchenden Substanzen (Substanzgewicht lag zwischen 1,0 mg und 20,0 mg) wurden zuvor mittels einer Mikrowaage 4503 (Sartorius AG, Göttingen) in tarierte Aluminiumtiegel 50 µl (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) eingewogen. Die Tiegel wurden anschließend mit einem Deckel (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) und einer Universalverschlußpresse (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) verschlossen und in die Messzelle gebracht.

Beteiligte Institution:

Jenapharm GmbH & Co. KG, 07745 Jena

Die DSC-Untersuchungen wurden mit einer Heizrate von 5 K/min und 10 K/Min an einem Mettler Toledo DSC 822e (Mettler-Toledo GmbH, Giessen) bei geschlossenem und gelochtem Aluminiumtiegel unter Luftatmosphäre durchgeführt.

Die zu untersuchenden Substanzen (Substanzgewicht lag zwischen 1,7 mg und 11,0 mg) wurden zuvor mittels einer Mikrowaage 4503 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) in tarierte Aluminiumtiegel 50 µl (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) eingewogen. Die Tiegel wurden anschließend mit einem Deckel (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) und einer Universalverschußpresse (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) verschlossen und in die Messzelle gebracht. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der Software Setaram SETSOFT (Version 1.40).

Beteiligte Institution:

Schering AG, Chemische Entwicklung, Berlin

5.3.3 Thermogravimetrie gekoppelt mit Online-Fourier-Transformations

Infrarot-Spektroskopie

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die Proben wurden in Aluminiumoxidtiegel in der Netzsch TG 209, gekoppelt mit dem FT-IR Spektroskop Vector 22 (Bruker Optik GmbH, Leipzig) nach folgendem Temperaturprogramm gemessen: 25 bis 800 °C, Heizrate: 10 K/min, Stickstoffatmosphäre: 20 ml/min. Für die simultane FT-IR-Messung wurde eine Auflösung von 4 cm⁻¹, im Spektralbereich 650 bis 5000 cm⁻¹ bei einer zeitlichen Auflösung von 15 s gewählt. Durch die elektronische Triggerung beider Analysensysteme wurden gleiche

Start- und Endzeiten erreicht. Dies gewährleistet die präzise Zuordnung der IR-spektroskopisch detektierten Gase zu den thermogravimetrisch gemessenen Zersetzungsstufen.

Beteiligte Institution:

NETZSCH Gerätebau GmbH, Selb/Bayern

5.3.4 Wasserbestimmung nach Karl-Fischer

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die Bestimmung der Restfeuchte in Prednisolol Durchstechflaschen erfolgte mittels Karl-Fischer-Titration, Methode A, Ph. Eur. 2.5.12 mit dem TitroLine alpha plus (Schott-Geräte GmbH, Mainz). Zu Beginn jeder Messreihe wurde der Titer der Maßlösung (HYDRANAL Composite 1 - Lösung, Riedel de Haën, Art. Nr. 34827) und der Blindwert (Wassergehaltes von Methanol) bestimmt. Im Vorlagegefäß befand sich Methanol zur Analyse (Merck, Art. Nr. 1.06012.1006).

Die Durchstechflaschen wurden geöffnet und sofort mit 2 Lagen Parafilm (Parafilm[®], American National Can Company, Neenah, USA) luftdicht verschlossen.

Eine 5,0 ml Spritze (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurde zunächst mit Methanol vorgespült. Unmittelbar danach wurden 2,0 ml Methanol mit der Spritze durch eine Lage des Parafilms (zweite Lage anheben) in die Durchstechflasche gespritzt und die Durchstechflasche mit der zweiten Lage wieder verschlossen. Das Lyophilisat wurde durch leichtes Schwenken gelöst. Eine 1,0 ml Spritze (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurde mit Methanol vorgespült. Unmittelbar danach wurden 1,0 ml der Lösung mit der Spritze aus der Durchstechflasche entnommen, in das Vorlagegefäß gegeben und die Titration gestartet.

Es wurden von jeder Charge mindestens 3 Durchstechflaschen geprüft.

Beteiligte Institution:

Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena

5.3.5 Auflichtmikroskopie

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Stereomikroskop Stemi 2000-C (Carl Zeiss, Jena) im Bereich von 6,5facher bis 50facher Vergrößerung durchgeführt.

Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der Software KS 300 (Version 3.00).

Beteiligte Institution:

Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena

5.3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Philips XI 40, letzte Blende: 50 µm (Deutsche Philips GmbH, Berlin) mit Filament-Wolframhaarnadelkathode unter Vakuum: 5×10^6 mbar durchgeführt. Die Proben wurden mit dem Emiteon K 550 (Deutsche Philips GmbH, Berlin), Bedampfung (Gold), 2 min bei 20 mA, 15 bis 20 nm Schichtdicke vorbereitet.

Die Fotoausgabe betrug 120 ns pro Linie, 968 Linien pro Bild bei einer Auflösung von 712 x 484 Pixel. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der Software Philips XI-Control-SM 5.01 (Version 5.01).

Beteiligte Institution:

Fraunhofer Gesellschaft - Institut für Angewandte Optik und Feinmechanik, Jena

5.3.7 Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Philips XI 30 FEG, letzte Blende: 50 µm (Deutsche Philips GmbH, Berlin) unter Vakuum: 3,6 Torr, Wasserdampfatosphäre durchgeführt.

Eine spezielle Probenvorbereitung war nicht erforderlich.

Die Fotos wurden bei einer Auflösung von 750x1200 Pixel aufgenommen.

Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der Software Philips XI-Control-SM 5.01 (Version 5.00).

Beteiligte Institution:

Martin-Luther-Universität Halle, IWZ Materialwissenschaften, Halle

5.3.8 Phototensiometrie

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die Untersuchungen der Oberflächenspannungen wurden mit einem Kontaktwinkelmessgerät G 10, (Krüss GmbH, Hamburg) mit integriertem Videomesssystem DSA 1 durchgeführt. Die Nadeldurchmesser betragen für Wasser: 0,480 mm und für die Messungen der Puffer- und Probelösungen 1,471 mm. Die Messtemperaturen betrug 20 °C. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der Software DSA 1 Version (Version 1.50 e).

Beteiligte Institution:

Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena

5.3.9 Kapillarelektrophorese

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur:

Die Kapillarelektrophorese wurde mit einem Hewlett Packard Model G1600A (Waldbronn, Deutschland) ^{3D} CE System bei einer Wellenlänge von 200 nm durchgeführt.

Die verwendete Standardkapillare besaß eine Länge von 48,5 cm und einen Innendurchmesser von 50 µm. Der Kapillarabstand zum Detektor betrug 40,0 cm. Als zweite Kapillare wurde die Bubble-Kapillare mit einer Länge von 64,5 cm und ebenfalls 50 µm im Innendurchmesser verwendet. Die angelegte Spannung betrug 30 kV.

Die verwendeten wässrigen Standardlösungen betragen 0 bis 10 % (m/V). Die Proben wurden durch Cellulosenitratfilter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mit einer Porengröße 0,45 µm gefiltert. Die Kapillare wurde jeweils zwischen 2 Messungen 3 min mit 0,1 M NaOH und 3 min mit dem entsprechenden Puffer gespült. Die Messtemperatur betrug 25 °C. Der pH-Wert betrug 7,2.

Die Blutplasmaproben wurden mit Acetonitril im Verhältnis 1 : 3 zur Proteinausfällung versetzt und kurz geschüttelt, 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert, dekantiert und über ein Membranfilter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mit einer Porengröße 0,22 µm in das Probengefäß titriert. Anschließend erfolgte die Überführung der Proben in das Probenkarussell und die direkte Vermessung.

Beteiligte Institution:

Martin-Luther-Universität Halle, Halle, Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

5.3.10 Dynamische Lichtstreuung

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur 1:

Zur Messung wurden zunächst eine Pufferlösung aus 108,6 mM NaHCO₃, 35,5 mM Na₂HPO₄ und 35,5 mM NaH₂PO₄ hergestellt, deren pH-Wert 7,0 betrug. In 10,0 ml dieser Pufferlösung wurden folgende Lyophilisat-Mengen gelöst: 600, 800 und 1000 mg Prednisolut[®] 100 mg N bzw. 500 mg und 1000 mg Urbason[®] soluble forte 1000, Hydrocortison 100-Rotexmedica. Die entstandenen Lösungen wurden durch Cellulosenitratfilter, Porosität: 0,2 µm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in staubfreie Probenküvetten (Hellma GmbH & Co. KG, Müllhem/Baden) (Ø=10 mm Kat. Nr. 540.111-QS) gepresst. Die Proben wurden 15 bis 60 min bei Raumtemperatur gehalten und unmittelbar danach gemessen, um eine eventuelle Degeneration der Wirkstoffmoleküle zu verhindern. Die DLS-Messungen erfolgten bei 25 °C mit einem ALV-Lichtstreuungsgoniometer (ALV-GmbH, Langen) mit frequenzverdoppeltem 200 mW - Nd:YAG-Laser DPSS-200 (532 nm Wellenlänge), einem single-mode Faser/PMT Detektionssystem und einem multiple tau Digitalkorrelator ALV 5000 mit einer Probenahmezeit von 12,5 ns. Die Lichtstreuapparatur besteht in einer handelsüblichen Ausrüstung für gleichzeitige statische und dynamische Experimente. Die Autokorrelationsfunktion jeder Probe wurde bei fünf Winkeln von 50 bis 70° in 5° - Schritten gemessen. Jede Kurve wurde durch einen exponentiellen Fit analysiert und von den resultierenden Diffusionskoeffizienten wurde wegen der Unabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten kleiner Teilchen vom Streuwinkel der Durchschnitt ermittelt. Eine Abhängigkeit vom Streuwinkel wurde tatsächlich nicht festgestellt. Die Messung der Brechzahl n erfolgte bei allen Proben mit dem Abbe-Refraktometer ABBEMAT (Dr. Kernchen GmbH, Seelze) bei 25,0 °C ± 0,2 K.

Kurzbeschreibung der Analysenprozedur 2:

Die nachfolgenden DLS-Messungen von Prednisolut® 100 mg N erfolgten bei 25 °C mit einem ALV-Lichtstreuungsgoniometer (ALV-GmbH, Langen). Es wurde ein grüner Nd: YAG-Laser DPSS-200 (532 nm) von Coherent mit 200 mW Leistung benutzt. Die thermostatierte Probenküvette wurde auf einen motorbetriebenen Präzisionsgoniometer ($\pm 0.01^\circ$) gegeben. Dadurch konnte der Photomultiplierdetektor von 20° bis zu 150° Streuwinkel bewegt werden. Die Brechzahl n von allen Proben wurde mit dem Abbe-Refraktometer Abbemat (Dr. Kernchen GmbH, Seelze) bei $25,0^\circ\text{C} \pm 0,2\text{K}$ gemessen.

Für jede Probe wurden die Intensitätszeit-Korrelationsfunktionen $\langle I_s^*(t)I_s(t+\tau) \rangle / \langle I_s^2 \rangle$ mit einem multiple tau Digitalkorrelator ALV - 5000E mit schneller Option (Probenahmezeit 12,5 ns) für fünf Winkel ($\theta = 50^\circ$ bis 70° , $\Delta\theta = 5^\circ$) aufgezeichnet. Die Korrelationsfunktionen wurden getrennt unter Verwendung von Gleichung 4 und 5 analysiert. So wurden der mittlere Diffusionskoeffizient D und seine Standardabweichung δD erhalten. Eine Winkelabhängigkeit wurde nicht beobachtet. Daher wurden die Resultate über die fünf Winkel gemittelt und auf Konzentration Null extrapoliert. Die hydrodynamischen und gemittelten Radien wurden entsprechend Gleichung 7 (siehe Kapitel 2.2.6) abgeleitet.

Um die gewünschten Molaritäten und pH-Werte erhalten, wurden sieben $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Pufferlösungen unter Verwendung von bidestilliertem Wasser hergestellt. In jeder dieser Pufferlösung wurden 240 mg, 420 mg und 1000 mg des Lyophilisates von Prednisolut® 100 mg N gelöst, um eine 4-, 7- und 10%ige Lösung zu erhalten.

Für die Pufferlösung 0,3 M/pH-Wert 6,8 erfolgte zusätzlich die Herstellung einer 15-, 20- und 30%igen Lösung, um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit zu messen.

Materialien und Methoden

Die entstandenen Lösungen wurden durch Cellulosenitratfilter, Porosität: 0,2 µm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in staubfreie Probenküvetten von (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim/Baden) (Kat. Nr. 540.111-QS) gepresst. Die Proben wurden 15 bis 60 min bei Raumtemperatur gehalten und unmittelbar danach gemessen, um eine Degeneration der Wirkstoffmoleküle zu verhindern.

Beteiligte Institution:

Martin-Luther-Universität Halle, IWZ Materialwissenschaften, Halle

6 Publikationen

Claussen S., Boese M., Dittgen M., X-ray diffraction, differential scanning calorimetry and thermogravimetry combined with infrared analysis of freeze-dried prednisolone hemisuccinate, *Die Pharmazie*, 56, 2001, 475 - 476

Mrestani Y., Claussen S., Neubert R., Determination of CMC of sodium glucocorticoides hemisuccinates by CE, *J. Pharm. and Biom. Anal.*, 30, 2002, 869 - 873

Claussen S., Janich M., Neubert R., Light scattering investigations on freeze-dried glucocorticoids in aqueous solution, *Int. J. Pharm.*, 252, 2003, 267 - 270

Mrestani, Y., Claussen, S., Reinhard R., Sodium glucocorticoides hemisuccinates analysis in biological media using capillary zone electrophoresis with bubble cell, eingereicht an *Chromatographia*

Janich M., Claussen S., Neubert R., Investigations of micellar solutions of Prednisolut[®] by Dynamic Light Scattering, *Eur. J. Pharm.*, akzeptiert

Claussen S., Janich M., Neubert R., Light scattering investigations on freeze-dried glucocorticoids in aqueous solution, APV: International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2004

7 Literatur

- 1 Nuijen B., Bouma M., Talsma H., Manada C., Jimeno J. M., Lopez-Lazaro L., Bult A., Beijnen J. H., Development of a lyophilized parenteral pharmaceutical formulation of the investigational polypeptide marine anticancer agent kahalalide, *Drug Dev Ind. Pharm*, 27, 2001, 767 - 780
- 2 Pikal, M. J., Shah S., The collapse temperature in freeze-drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy state, *Int. J. Pharm.* 62, 1990, 165 - 186
- 3 Carpenter J. F.; Prestrelski S. J., Arakawa T. W., Separation of freezing- and drying- induced denaturation of lyophilized proteins using stress - spezifc stabilization, *Arch. Biochem. Biophys.*, 303, 1993, 456 - 464
- 4 Europäische Arzneibuch-Kommission: Europäisches Arzneibuch 1997 (3. Ausgabe), Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, Govi Verlag, Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, 1997
- 5 Eickhoff B., Lyophilisierung und Gefriertrocknung, *BioTechniques* 1-2, 2003, 41 - 43
- 6 Jennings T. A., Lyophilization: introduction and basic principles, Plenum Press Denver, 1999
- 7 Azita S., Zografi G., Non-Isothermal and isothermal crystallization of sucrose from the amorphous state, *Pharm. Res.*, 11, 1994
- 8 Willemer H., Spallek M., Heinz J., Auchter-Krummel P., Walther M., Pharmaceutical packaging development Group, Schott Glas Freezing and freeze-

- drying of pharmaceuticals in tubing glass vials, vials with quartz coated surfaces and resin vials PDA, Plenum Press Basel, 1998
- 9 Sadikoglu H., Crosser O. K., Optimal control of the primary and secondary drying stages of bulk solution freeze drying in trays, *Drying Technology*, 16, 1998, 399 - 431
 - 10 Franks F., Hatley R., Mathias S. F, Materials science and the production of shelf-stable biologicals, *Pharm. Techn. Intern.*, 1991, 24 - 34
 - 11 Snowman J. W., Sterile pharmaceutical manufacturing, 1 Ed., Groves M. J., Olsen W. P., Anisfeld M. H., Interpharm press, Prairie View, 1990, 79 ff
 - 12 Mumenthaler M., Sprüh - Gefriertrocknung bei Atmosphärendruck: Möglichkeiten und Grenzen in der Pharmazeutischen Technologie und in der Lebensmitteltechnologie", Dissertation Universität Basel, 1990
 - 13 Flosdorf E. W., Freeze - Drying, Reinhold Pub. Corp, New York 1949
 - 14 List P. H., Arzneiformenlehre (4. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1985, 282 - 288
 - 15 Franks F., Auffret T., Freeze-drying of pharmaceuticals and biologicals, Plenum Press Amersfoort, 1998
 - 16 Kruss, B., Prozessparameter und ihre Auswirkungen auf die Produktqualität, APV - Tagung Würzburg, 1992
 - 17 Oetjen G. W., Gefriertrocknen (1. Auflage), VCH-Verlag Weinheim, 1997
 - 18 Pikal, M. J.; Shah, S., The collapse temperature in freeze-drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy state, *Int. J. Pharm.*, 62, 1990, 165 - 186

- 19 Williams N. A., Polli G. P., The lyophilization of pharmaceuticals: A Literature Review *Journal of Parenteral Science & Technology*, 38, 1984
- 20 Williams N. A., Lee Y., Polli G. P., Jennings T. A., The effects of cooling rate on solid phase transitions and associated vial breakage occurring in frozen mannitol solutions, *J. Parent. Sci. Tech.*, 40, 1986, 135 - 141
- 21 Essig D., Oschmann R., Lyophilisation, Wissenschaft. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1993
- 22 Gatlin L. A., Kinetics of a phase transition in a frozen solution, *Develop. biol. Standart.*, 74, 1991, 93 - 104
- 23 Hancock B. C., Shamblin S. L., Zografi G., Molecular Mobility of Pharmaceutical Solids Below the Glass Transition Temperature, *Pharm. Res.*, 12, 1995, 799 - 806
- 24 Hancock B. C., Zografi G., Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical Systems, *J. Pharm. Sci.*, 86, 1997, 1 - 12
- 25 Mutschler E., Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2001
- 26 Fachinformation Prednisolut[®] 100 mg N, Jenapharm GmbH & Co. KG, 2003
- 27 Rey L. R., Basic Aspects and future trends in the freeze-drying of pharmaceuticals, *Develop. biol. Standart.*, 74, 1991, 3 - 8
- 28 MacKenzie A. P., Basic Principles of freeze-drying for pharmaceuticals, *Bulletin of the parenteral drug association*, 20, 1966, 101 - 129
- 29 Nail Steven L., Gatlin Larry A., Freeze drying: Principles and practice, K. Avis, H. Lieberman, L. Lachman, *Pharmaceutical Dosage Forms 2*, Dekker Inc. New York, 1993, 163 - 234

-
- 30 Louis R., Fundamental aspects of lyophilization: Researches and development in Freeze-drying, ed. by Rey L, Plenum Press Paris, 1964
 - 31 Bauer K. H., Frömming K. - H., Führer C., Pharmazeutische Technologie, (3. Auflage), G. Thieme Verlag Stuttgart, 1991, 123 - 128
 - 32 Levine H., Slade L., Principles of „Cryostabilisation“ Technology from structure/property relationships of carbohydrate/water systems - A Review, Cryo - Letters 9, 1988, 21 - 63
 - 33 Meredith P., Donald A. M., Payne R. S., Freeze-Drying: in situ observations using cryovironmental scanning electron microscopy and differential scanning microscopy, J. Pharm. Sci., 85, 1996, 631 - 637
 - 34 MacKenzie A. P., Collaps during freeze-drying-qualitative and quantitative aspects: Freeze-drying and advanced food technology, ed. by Goldblith S. A., Rey L., Rothmayr W. W., Academic Press London, 1975, 227 - 307
 - 35 Pikal M. J., Freeze-drying of Proteins: Process, formulation, and stability: Formulation and delivery of proteins and peptides, ed. by Cleland J. L., Langer R., ACS Symposium Series 567, 1994, 120 - 133
 - 36 Stricker H., Physikalische Pharmazie (3. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1987, 283 – 285, 365 - 367
 - 37 Liapis A. I., Pikal M. J., Bruttini, Research and development needs and opportunities in freeze- drying, Drying Technology, 14, 1996, 1265 - 1300
 - 38 Kenneth D., Harris M., Tremayne M., Benson M., Neue Fortschritte bei Strukturbestimmungen durch Röntgen-Pulverdiffraktometrie, Angew. Chem. 113, 2001, 1674 - 1700

-
- 39 Rius J., XLENS, a direct methods program based on the modulus sum function: Its application to powder data, *Powder Diffr.*, 14, 1999, 267 -273,
- 40 Dunitz J. D., *X-ray analysis and the structures of organic molecules*, VHCA Basel, 1995
- 41 Cavatur R. K., Suryanarayanan R., Characterization of phase transitions during freeze-drying by in situ X-ray powder diffractometry, *Pharm. Dev. Tech.*, übermittelt
- 42 Tanninen V., Yliruusi P, X-ray powder diffraction profile fitting in quantitative determination of two polymorphs from their powder mixture, *Int. J. Pharm.*, 81, 1992, 169 - 177
- 43 Suryanarayanan R., *Powder X-ray diffractometry: In Physical characterization of pharmaceutical solids*, Dekker Inc. New York, 1995
- 44 *The Japanese Pharmacopoeia, The English Version, 14. Edition*, Society of Japanese Phamacopoeia, 2001
- 45 Hatley R. H. M., The effective use of differential scanning calorimetry in the optimisation of freeze-drying processes and formulations, *Develop. biol. Standart.*, 74, 1991, 105 - 122
- 46 Te Booy M. P. W. M.; De Ruiter R. A.; De Meere A. L. J., Evaluation of the physical stability of Freeze-dried sucrose - containing formulations by differntial scanning calorimetry, *Pharm. Res.*, 9, 1992, 109 - 114
- 47 Balasubramaniam A., Panpalia G. M., Drug adjuvant interaction study using DSC supported by isothermal method, *Drug Dev Ind. Pharm.*, 27, 2001, 475 - 800
- 48 Krishnan K., Ferraro J. R., *In Fourier transform infrared spectroscopy*, 4, Academic Press New York, 1982

-
- 49 Goldstein J. I., Newbury D. E., Echlin P., Joy D. C., Fiori C., Lifshin E., Scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis, Plenum Press New York, 1981
- 50 Joy et al., Electron channeling pattern in the Scanning electron microscope, J. Appl. Phys. 53, 1982, 439 - 461
- 51 Meredith P., Athene M. D., Robin S. Payne, Freeze-drying: In situ observations using cryovironmental scanning electron microscopy and differential scanning microscopy, J. Pharm. Sci., 85, 1996, 631 - 637
- 52 Reichelt R., Kohl H., Ein halbes Jahrhundert Elektronenmikroskopie in Münster: Abbildung und Analyse von Mikro- und Nanostrukturen, . Forschungsjournal der Westfälischen Wilhelms-Universität 1, 2001, 6 - 15
- 53 Fruhstorfer B., Mohles V., Reichelt R., Nembach E., Quantitative characterization of second phase particles by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM), Phil. Mag. 82, 2002, 2575 - 2589
- 54 Flegler, Heckmann, Klomprens, Elektronenmikroskopie, Spektrum Akademischer Verlag Berlin und Heidelberg, 1993
- 55 Mrestani Y., Neubert R., Munk A., Wiese M., Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary electrophoresis. J. Chrom. A, 803, 1998, 273 - 278
- 56 Ishihama Y., Oda Y., Asakawa N., Microscale determination of dissociation constants of multivalent pharmaceuticals by capillary electrophoresis. J. Pharm. Sci. 83, 1994, 1500 - 1507
- 57 Kraak J. C., Busch J. C., Poppe H., Study of protein-drug binding using capillary zone electrophoresis, J. Chrom. A., 608, 1992, 257 - 264

-
- 58 Mrestani Y., Neubert R., Rüttinger H., Characterization of interaction between cephalosporins and charged surfactants using capillary zone electrophoresis. *J. Chrom. A.*, 802, 1998, 89 - 93
- 59 Mrestani Y., Janich M., Rüttinger H. H., Neubert R., Measurement of thermodynamic quantities of micellar solubilization by micellar electrokinetic chromatography with glycodeoxycholic acid., *J. Chrom. A.*, 873, 2000, 237 - 246
- 60 Schwarz M., Neubert R., Dongowski G., Characterization of interactions between bile salts and drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography, Part I. *Pharm. Res.*, 13, 1996, 1174 - 1180
- 61 Brezesinski G., Mögel H. J., Grenzflächen und Kolloide, Freiberg/Halle, 1993
- 62 Mrestani Y., Neubert, R. Characterization of cephalosporin transfer between aqueous and colloidal phases by micellar electrokinetic chromatography, *J. Chrom. A.*, 871, 2000, 439 - 448
- 63 Mrestani Y., Neubert R., Characterization of micellar solubilization of antibiotics using micellar electrokinetic chromatography, *Pharm. Biomed. Anal.*, 26, 2001, 883 - 889
- 64 Engelhardt H., Beck W., Schmitt T., Kapillarelektrophoretische Methoden und Möglichkeiten, Vieweg-Verlag, 1994
- 65 Mrestani Y., Neubert R., Munk A., Wiese M., Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary electrophoresis, *J. Chrom. A.*, 803, 273 - 278, 1998
- 66 Kraak J. C., Busch J. C., Poppe H., Study of protein-drug binding using capillary zone electrophoresis, *J. Chrom.* 608, 1992, 257 - 264

-
- 67 Berne B.J., Pecora R., *The Dynamic Light Scattering*, Wiley, Plenum Press New York, 1976
- 68 Janich M., 1998, Ph. D., Thesis, Martin-Luther-University Halle - Wittenberg
- 69 Koppel, D.E., Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The method of cumulants, *J. Chem. Phys.* 57, 1972, 4814 - 4820
- 70 Corti M., Degiongio E., Giglio M., *Light Scattering in Fluids and Macromolecular Solutions*, Plenum New York 1980, 71 - 80
- 71 Selser J. C., Yeh Y., A light scattering method of measuring membrane vesicle number- averaged size and size dispersion, *Biophys. J.*, 16, 1976, 847 - 848
- 72 Franks F., Freeze drying: from empiricism to predictability, *Cryo-Letters*, 11, 1990, 93 - 110
- 73 Burger A., Griesser U. J., Polymorphic drug substances of the European Pharmacopeia. 4, Identification and characterization of 11 crystal forms of succinylsulfathiazole, *Sci. Pharm.*, 57, 1989, 293 - 305
- 74 York P., Solid-state properties of powders in the formulation and processing of solid dosage forms, *Int. J. Pharm.*, 14, 1983, 1 - 28
- 75 Dawson P. J., Hockley D. J., Scanning electron microscopy of Freeze-dried preparations: Relationship of morphology to freeze-drying Parameters, *Develop. biol. Standart.*, 74, 1991, 185 - 192
- 76 Brittain H. G., Bogdanowich S. J., Bugay D. E., DeVincendis J., Lewen G., Newman A. W., Physical characterization of pharmaceutical solids, *Pharm. Res.*, 8, 1991, 963 - 973
- 77 Williams N. A., Polli G. P., The lyophilization of pharmaceuticals: A Literature review, *J. of Par. Sci. & Tech.*, 38, 1984, 48

-
- 78 Wells J. I., Pharmaceutical preformulation: The physicochemical properties of drug substances, Halsted Press, New York, 1988
- 79 Stephen R., Paul A. Sutton, Brian Tobias, James Frye, and Peter Main, The crystal structure, solid-state NMR spectra, and oxygen reactivity of five crystal forms of prednisolone butyl acetate, J. Am. Chem. Soc. 110, 1988, 1609 - 1614
- 80 Gander B., Kloeti F., Christen P., Stability of prednisolone and prednisolone acetate in various vehicles used in semi-solid topical preparations, J. Clin. Pharm. Thera. 15, 1990, 325 - 329
- 81 De Maury G., Chauvet A., Terol A., Masse J. Thermochim. Acta, 97, 1986, 127 - 142
- 82 United States Pharmacopeial Convention, inc. USP 24, NF 19, National Publishing, Philadelphia, PA, 2000
- 83 Martini A., Kume S., Crivillente M., Artico, R., Use of subambient differential scanning calorimetry to monitor the frozen-state behavior of blends of excipients for freeze-drying, J. Pharm. Sci. Technol. 51, 1997, 62 - 67
- 84 Pabon C. V., Frutos P., Lastres J. L., Frutos G., Application of differential scanning calorimetry and X-ray powder diffraction to the solid-state study of metoclopramide, J. Pharm. Biomed. Anal. 15, 131 - 138
- 85 Netzsch - Gerätebau GmbH, TG-FT-IR-Messungen an Prednisolut[®] 100 mg N, 1999
- 86 Bottom R., The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterization of a drug molecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies, Int. J. Pharm., 192, 1999, 47 - 53

- 87 Pikal M. J., Freeze-drying of proteins: Process, formulation and stability: Formulation and delivery of proteins and peptides, ed. by Cleland J. L., Langer, R. ACS Symposium Series 567, 1994, 120 - 133
- 88 Bruno C., Hancock G., Zografi, The Relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids, Pharm. Res., 11, 1994, 471 - 477
- 89 Jenapharm GmbH Co. KG: Prednisolut[®] 100 mg N - Herstellung am Produktionsstandort Dessau-Tornau, 1997
- 90 Jenapharm GmbH Co. KG, Herstellungsvorschrift Prednisolut[®] 100 mg N (Injektionsflasche mit Lyophilisat), 2001
- 91 The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, International Conference on Harmonization Note for Guidance on Stability Testing of New Drug Substances and Products CPMP/ICH/2736/99
- 92 Dawson P. J. Hockley D. J., Scanning electron microscopy of Freeze-dried preparations: Relationship of morphology to Freeze-drying parameters, Develop. biol. Standart., 74, 1991, 185 - 192
- 93 Höche H. R., Röder A., Heyroth F., Environmental scanning electron microscopy (ESEM) an wasserhaltigen Objekten und Biomaterialien, Sci. hal. 9, 2001, 7 - 8
- 94 Fütting M., Katzer D., Neubert R., Rietz R., Picker K. M., Charakterisierung von pharmazeutischen Grund- und Hilfsstoffen mittels ESEM-Technik., Dt. Apotheker-Ztg., eingereicht
- 95 Schröder M. W., Fütting M., Schenzel K., Diepenbrock, W. Characterization of plant fibres by means of NIR FT Raman spectroscopy and enviromental scanning

-
- electron microscopy (ESEM), XVII. Internat. Conference on Raman Spectroscopy ICORS 2000, 1032
- 96 Heyroth F., Gerloff R., Scanning electron microscopic determination of the particle size distribution of an agglomerating phase in a metallic melt, Zeitschrift für Metallkunde 87, 1996, 684 - 690
- 97 Reimer, L. Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden. (2. Auflage), Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1967
- 98 Danilatos G. D., Theory of the gaseous detector device in the environmental scanning electron microscope. Adv. elec. electron phys. 78, 1990, 1 - 102
- 99 Höche H. R., Röder A., Heyroth F., Environmental scanning electron microscopy (ESEM) an wasserhaltigen Objekten und Biomaterialien, Sci. hal. 9, 2001, 7 - 8
- 100 Fütting M., Schnarr H., Becker M., Environmental scanning electron microscopy in archeology, Fraunhofer Inst. of Mechanics of Materials, State Museum of Prehistory, 06114 Halle-Saale, Germany
- 101 Haberland E. J., Berghaus A., Fütting M., Bethge I., Grellmann W., Material parameters and ESEM -characterization of Functional ENT-Prostheses during ongoing degradation: Grellmann W., Seidler S. (Eds.), Deformation and fracture behaviour of polymers, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 451 - 460
- 102 Degiorgio V., Corti M., Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions, (Elsevier, Amsterdam), 1985
- 103 Neubert R., Hildebrand A., Janich M., Mrestani Y., Plätzer M., Stabile physiologische Mischmizellen-eine zukunftssträchtige Arzneiform, Pharm. Zeitung 44, 2000, 3691 - 3696

- 104 Kuhnert-Brandstätter M., Polymorphe und pseudopolymorphe Kristallformen von Steroidhormonen Pharm. Ind. 39, 1977, 377 - 383
- 105 Kuhnert-Brandstätter M., Linder R., Zur Hydratbildung bei Steroidhormonen Sci. Pharm. 41, 1973, 109 - 116
- 106 Janich M., Lange J., Graener H., Neubert R., J. Phys., Extended light scattering investigations on dihydroxy bile salt micelles in low-salt aqueous solutions, Chem. B, 102, 1998, 5957 - 5962
- 107 Nair P. P., Kritchevsky D., The Bile Acids, Plenum Press New York, 1971
- 108 Akers M. J., Milton N., Byrn S. R., Nail S. L., Glycine crystallization during freezing: The effects of salt form, pH and ionic strength, Pharm. Res., 12, 1995, 1457 - 1461
- 109 Pikal M. J., Freeze-drying of proteins: Process, formulation and Stability: Formulation and delivery of proteins and peptides, ed. by Cleland J. L, Langer R., ACS Symposium Series 567, 1994, 120 - 133
- 110 Brocca P., Cantu L. F., Corti M., Del Favero E., Thermal fluctuations of small vesicles: observation by dynamic light scattering, Prog. Colloid Polym. Sci., 2000, 181 - 185
- 111 Dorshow, R.; Briggs, J.; Bunton, C. A.; Nicoli, D. F., Electron Transfer in Inorganic, Organic, and Biological Systems, J. Phys. Chem. 1982, 86, 2388
- 112 Janich, M., Neubert, R., Lange, J., Strunz, P., Mizellbildung von Gallensalzen in Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke., BENSC Experimental Reports 1998. Hrsg.: Kirschbaum, Y., Möller, A., Michaelsen, R., Berichte des Hahn-Meitner-Institutes, HMI-B 559, Berlin, 1999

113 Arzneimittelinformationssystem (BfArM-AMIS), Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) Bonn, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) Bonn, Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Langen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. habil R. Neubert, Martin-Luther-Universität Halle/S., Fachbereich Pharmazie am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, und Herrn Prof. Dr. habil M. Dittgen, Schering AG Berlin / SBU G&A / Strategic Business Development, in der Abteilung Galenische Entwicklung der Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. habil R. Neubert und Herrn Prof. Dr. habil M. Dittgen bin ich zu besonderem Dank sowohl für die Überlassung des interessanten Themas also auch für die kreative Zusammenarbeit, die wertvollen Hinweise, angeregten Diskussionen und das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit verpflichtet. Die dabei eingeräumten Ideenfreiräume bei der Planung und Durchführung der Arbeiten in Verbindung mit der ständigen Bereitschaft zu kritischen Diskussionen der Ergebnisse haben wesentlich zum erfolgreichen Fortgang und Abschluss der Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. habil K. Mäder, Martin-Luther-Universität Halle/S., Fachbereich Pharmazie am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, für die Diskussion und Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Der Firma Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena, danke ich für die finanzielle und materielle Unterstützung. Dabei möchte ich mich insbesondere bei den Mitarbeitern der Abteilung Galenische Entwicklung, vor allem bei Frau Dr. S. Fricke und Herrn H. Gerecke wie auch bei dem Leiter der Pharmazeutisch-Chemischen Entwicklung Herrn Dr. P. Hösel und den Mitarbeitern der analytischen Abteilung für die gute Zusammenarbeit, alle Hilfestellungen und Ratschläge bedanken.

Ich danke auch Herrn Dr. Y. Mrestani, Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich Pharmazie am Institut für Pharmazie, Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Biopharmazie, sowohl für die Unterstützung bei der Durchführung der Kapillarelektrophorese-Messungen als auch für seine stetige Diskussionsbereitschaft und freundlichen Hilfe.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Janich, IWZ Materialwissenschaften Halle/S., für seine Bereitschaft zur Mitarbeit bei der Durchführung, Beratung und Auswertung der Laserstreuversuche sowie bei Herrn Dr. F. Heyroth, IWZ Materialwissenschaften Halle/S., für die ESEM-Messungen.

Herrn Prof. Dr. habil S. Wartewig, , Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich Pharmazie am Institut für Pharmazie, danke ich für die Überprüfung spektroskopischer Varianten und Lösungsansätze zu Beginn dieser Promotionsarbeit.

Bei Frau Dr. G. Winter, Schering AG Berlin, Bereich Chemische Entwicklung, möchte ich mich für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung sowie der kritischen Diskussion der Röntgenbeugungsversuche bedanken.

Herrn M. Reuter, Jenapharm GmbH Co. KG, Jena, danke ich für die Unterstützung bei der Formatierung des Manuskriptes dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 5 (2) b) der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe erstellt habe. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel und analytischen Methoden verwendet. Aus Publikationen und Werken entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde keiner weiteren Universität oder Hochschule vorgelegt.

Sven Claußen

Jena, den 27.10.2003

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sven Claußen
Geburtstag: 09.03.1971
Geburtsort: Jena
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Kronfeldstr. 6
07745 Jena

Schulbildung:

1977 - 1989 Schulbildung mit einjähriger wissenschaftlich-praktischer Arbeit (1989 bei Jenapharm zu einem Thema der Arzneimittelsynthese)

1989 Abitur

Berufsweg:

1989 - 1990 Arbeit in der Arzneimittelherstellung bei Jenapharm

Zivildienst:

1990 - 1991 Zivildienst im Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Studium:

1991 - 1998
WS 1991/92 - WS 1992/93 Biologie
SS 1993 - WS 1996/97 Pharmazie
1995 Erste Pharmazeutische Prüfung
1997 Zweite Pharmazeutische Prüfung
1998 Dritte Pharmazeutische Prüfung
1998 Approbation als Apotheker
1998 Diplom

Praktika:

Mai 1997 - Nov. 1997 Praktikum nach Approbationsordnung für Apotheker in der Dom-Apotheke Naumburg

Nov. 1997 - Juni 1998 Praktikum nach Approbationsordnung für Apotheker in der Jenapharm GmbH & Co. KG, Bereich: Pharmazeutische Entwicklung

Beruf:

Seit Nov. 1998 Doktorand in der Jenapharm GmbH & Co. KG, Bereich Pharmazeutische Entwicklung

Seit Nov. 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Jenapharm GmbH & Co. KG, Bereich Pharmazeutische Entwicklung (feste Formen)

Sprachausbildung:

Englisch: Sprachkundigenabschluß SPK II

Russisch: Sprachkundigenabschluß SPK I

Latein: Grundkurs I von 1989 - 1990 an der Volkshochschule