HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Entwicklung einer Raman-spektroskopischen Methode zur kontinuierlichen inline Gehaltsbestimmung und Charakterisierung eines Feuchtgranulierprozesses

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Harting
aus Bückeburg

Düsseldorf, Februar 2019

aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Kleinebudde

2. Prof. Dr. Jörg Breitkreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 2019

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Research Paper

J. Harting, P. Kleinebudde (2018). *Development of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 125, 169-181.

Der Entwurf für die Studie mit den ausgewählten Arzneistoffen wurde von Julia Harting erstellt und in Diskussion mit Peter Kleinebudde ausgearbeitet. Alle praktischen Versuche wurden von Julia Harting durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit Peter Kleinebudde diskutiert. Das Manuskript wurde von Julia Harting selbstständig verfasst und von Peter Kleinebudde korrigiert. An der Ausarbeitung der Konstruktion waren Klaus Knop und Stefan Stich beteiligt und die Fertigung wurde von der Feinmechanik der Universität Düsseldorf durchgeführt.

J. Harting, P. Kleinebudde (2019). *Optimisation of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation and its application for process characterisation.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 137, 77-85.

Der Entwurf für die Studie und die Ideen für die Optimierung der Konstruktion wurden von Julia Harting erstellt und in Diskussion mit Peter Kleinebudde ausgearbeitet. An der Ausarbeitung der überarbeiteten Konstruktion war Klaus Knop beteiligt. Gefertigt wurde die Konstruktion von der Feinmechanik der Universität Düsseldorf. Alle praktischen Versuche wurden von Julia Harting durchgeführt und ausgewertet, wobei Björn Fischer an der Identifizierung und Zuordnung der Peaks des Lichtes beteiligt war. Das Manuskript wurde von Julia Harting selbstständig verfasst und von Peter Kleinebudde korrigiert.

Vorträge

J. Harting, P. Kleinebudde (2017): *Development of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation*. 11th Annual PSSRC Meeting, Graz, Österreich.

J. Harting, P. Kleinebudde (2018): *Anwendung der Raman-Spektroskopie zur Charakterisierung eines kontinuierlichen Feuchtgranulierprozesses in einem Zweischneckengranulierer*. Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppe Agglomeration und Schüttguttechnik, Neuss, Deutschland.

J. Harting, P. Kleinebudde (2018): *Optimisation of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw granulation*. 12th Annual PSSRC Meeting, Leuven, Belgien.

Poster

J. Harting, P. Kleinebudde (2018): *Robustness testing of a developed PLS model for continuous API quantification during twin-screw wet granulation by Raman spectroscopy*. 11th PBP World Meeting, Granada, Spanien.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen I

Abkürzungsverzeichnis VII

1 Einleitung 1

1.1 Kontinuierliche Produktion in der pharmazeutischen Industrie 1

1.1.1 Hintergrund 1

1.1.2 Vorteile und Herausforderungen der kontinuierlichen Produktion 2

1.2 Zweischneckengranulation zur kontinuierlichen Feuchtgranulation 4

1.2.1 Einleitung 4

1.2.2 Zweischneckengranulation 5

1.2.3 Kritische Qualitätsattribute kontinuierlich produzierter Granulate 8

1.3 Prozessanalytische Technologien 9

1.3.1 Definition von PAT 9

1.3.2 Implementierung von PAT-Werkzeugen 9

1.3.3 Schwierigkeiten und Herausforderungen bei der Implementierung von inline PAT-Werkzeugen 10

1.4 Raman-Spektroskopie 11

1.4.1 Grundlagen der Raman-Spektroskopie 11

1.4.2 Raman-Analysatoren 13

1.4.3 Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung von Arzneistoffen 13

1.5 Chemometrische Methoden zur Auswertung analytischer Daten 15

1.5.1 Definition und Hintergrund 15

1.5.2 Gute chemometrische Praxis 15

1.5.2.1 Datengewinnung und –aufbereitung 15

1.5.2.2 Ausreißeranalyse 16

1.5.2.3 Vorbehandlung der Spektren 16

1.5.2.4 Auswahl des spektralen Bereiches 17

1.5.3 Beurteilung und Validierung chemometrischer Methoden 18

1.5.3.1 Kalibrierung und Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells 18

1.5.3.2 Validierung gemäß regulatorisch geltender Rahmenvorschriften 18

1.5.3.3 Leistungsmerkmale für die Güte der Regression 19

1.5.3.4 Auswahl der Anzahl an Faktoren 19

1.6 Chemometrische Techniken 20

1.6.1 Hauptkomponentenanalyse 20

1.6.2 Regression der kleinsten Teilquadrate 21

1.6.3 Statistische Versuchsplanung 22

2 Ziele der Arbeit 25

3 Ergebnisse und Diskussion 27

3.1 Methodenentwicklung zur kontinuierlichen inline Gehaltsbestimmung 27

3.1.1 Einleitung 27

3.1.2 Externe Kalibrierung 27

3.1.3 Inline Messung 31

3.1.3.1 Messung im Zweischneckengranulierer 31

3.1.3.2 Messung am Auslass des Zweischneckengranulierers 34

3.1.4 Bestimmung des Probenvolumens 36

3.2 Erstellung von inline Kalibriermodellen 38

3.2.1 Einleitung 38

3.2.2 Ibuprofen 38

3.2.2.1 Datenübersicht 38

3.2.2.2 Erstellung eines Kalibriermodells 40

3.2.2.3 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells 41

3.2.2.4 Evaluierung der Robustheit des Modells 43

3.2.3 Diclofenac-Natrium 45

3.2.3.1 Datenübersicht 46

3.2.3.2 Erstellung eines Kalibriermodells 46

3.2.3.3 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells 48

3.2.4 Einfluss der Feuchte auf den vorhergesagten Gehalt 52

3.2.5 Zusammenfassung 53

3.3 Methodenoptimierung 55

3.3.1 Optimierung des Messaufbaus 55

3.3.2 Messungen im Dunkeln 56

3.3.2.1 Datenübersicht 56

3.3.2.2 Erstellung eines Kalibriermodells 57

3.3.2.3 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells ... 57
3.3.3 Messungen bei Raumlicht ... 59
3.3.3.1 Datenübersicht ... 59
3.3.3.2 Erstellung eines Kalibriermodells ... 60
3.3.3.3 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells ... 61
3.3.4 Messungen bei Tageslicht ... 62
3.3.5 Zusammenfassung ... 63
3.4 Modellerstellung für eine pharmazeutische Zubereitung ... 64
3.4.1 Einleitung ... 64
3.4.2 Auswahl der Formulierungsbestandteile ... 64
3.4.3 Datenübersicht ... 66
3.4.4 Erstellung eines Kalibriermodells ... 67
3.4.5 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells ... 68
3.4.6 Zusammenfassung ... 70
3.5 Methodenvalidierung ... 71
3.5.1 Einleitung und Zielsetzung ... 71
3.5.2 Spezifität ... 72
3.5.3 Linearität ... 73
3.5.4 Richtigkeit ... 75
3.5.5 Präzision ... 79
3.5.6 Robustheit ... 80
3.5.7 Zusammenfassung ... 82
3.6 Anwendung der erstellten Methoden zur Beurteilung der Mischeffizienz des Zweischneckengranulierers ... 84
3.6.1 Einleitung ... 84
3.6.2 Evaluierung des Mischverhaltens des Zweischneckengranulierers ... 86
3.6.3 Evaluierung des Mischverhaltens nach verschiedenen Abschnitten ... 89
3.6.4 Evaluierung des Mischverhaltens in Abhängigkeit verschiedener Prozessparameter ... 93
3.6.5 Zusammenfassung ... 97
4 Zusammenfassung ... 99
5 Summary ... 102

6 Experimenteller Teil ... 105

6.1 Materialien ... 105

6.1.1 Arzneistoffe ... 105

6.1.2 Hilfsstoffe ... 105

6.2 Methoden ... 106

6.2.1 Herstellungsmethoden ... 106

6.2.1.1 Sieben und Mischen ... 106

6.2.1.2 Dosieren ... 109

6.2.1.3 Feuchtgranulieren ... 109

6.2.1.4 Trocknen ... 116

6.2.1.5 Tablettieren ... 116

6.2.2 Analytische Methoden ... 116

6.2.2.1 Raman-Spektroskopie ... 116

6.2.2.2 UV-Vis-Spektroskopie ... 117

6.2.2.3 Feuchtemessungen ... 118

6.2.2.4 Bestimmung des Probenvolumens ... 118

6.2.2.5 Verweilzeitbestimmung ... 119

6.2.3 Methodenvalidierung ... 120

6.2.3.1 Spezifität ... 120

6.2.3.2 Linearität ... 120

6.2.3.3 Richtigkeit ... 121

6.2.3.4 Präzision ... 121

6.2.3.5 Robustheit ... 121

6.2.4 Datenanalyse ... 122

6.2.4.1 Datenvorbehandlungsmethoden ... 122

6.2.4.2 Modellerstellung ... 123

6.2.4.3 Gütemaße ... 123

6.2.4.4 Statistische Versuchsplanung ... 124

7 Anhang ... 127

8 Referenzen ... 129

9 Danksagung ... 135

10 Eidesstattliche Erklärung ... 137

Abkürzungsverzeichnis

A	Anzahl der Hauptkomponenten (Faktoren)
API	Active Pharmaceutical Ingredient (Arzneistoff)
AU	Arbitrary Unit (willkürliche Einheit)
AV	Acceptance Value (Akzeptanzwert)
BG	Bestimmungsgrenze
bzw.	beziehungsweise
CQA	Critical Quality Attribute (kritisches Qualitätsattribut)
d	Durchmesser
d.h.	das heißt
DModX	Distance to Model
DoE	Design of Experiments
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittel-Agentur)
engl.	englisch
etc.	et cetera
FDA	Food and Drug Administration
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose, Hypromellose
I_0	Intensität des Anregungslasers
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IR	Infrarot
min	Minute
MSS	Model Sum of Squares
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid
NG	Nachweisgrenze
NIPALS	Nonlinear Iterative Partial Least Squares
NIR	Nahinfrarot
p	Faktorladung (engl.: *loadings*)
PAT	Prozessanalytische Technologie
PCA	Principle Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PhAT	Pharmaceutical Area Testing
PLS	Partial Least Squares Regression
PRESS	Predictive Sum of Squares
Q^2	Vorhersagemaß

QbD	Quality-by-Design
R^2	Bestimmtheitsmaß
RMSE	Root Mean Square Error
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
RSS	Residual Sum of Squares
s	Sekunde
SEC	Standard Error of Calibration
SFL	Specific Feed Load
SNV	Standard Normal Variate
Stabw	Standardabweichung
TSG	Twin-screw granulation (Zweischneckengranulation)
TSS	Total Sum of Squares
t, u	Faktorwert (engl.: *scores*)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VIP	Variable Importance on Projection
w*	Wichtungsvektor

1 Einleitung

1.1 Kontinuierliche Produktion in der pharmazeutischen Industrie

1.1.1 Hintergrund

Derzeit findet ein Umdenken in der pharmazeutischen Industrie statt, das sich mit der Umstellung von der traditionellen ansatzweisen Herstellung auf kontinuierliche Produktionswege für Arzneiformen befasst. Bei der traditionellen, ansatzweisen Herstellung werden alle Materialien vor dem Prozessbeginn hinzugegeben und am Ende gemeinsam entnommen. Ein kontinuierlicher Prozess ist dadurch definiert, dass die Hinzugabe und Entnahme von Material simultan erfolgen. Neben der chargenweisen und kontinuierlichen Produktion wird weiter in die Semi-Chargenproduktion, bei der Materialien während des Prozesses hinzugegeben und am Ende gemeinsam entnommen werden und in die Semi-kontinuierliche Produktion, eine zeitlich begrenzte kontinuierliche Produktion, unterschieden [1].

Die amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl.: *Food and Drug Administration*, FDA) ermutigte die pharmazeutische Industrie bereits im Jahr 2004 in einer Initiative in neue, effektivere und effizientere Technologien für die Herstellung von Arzneimitteln zu investieren [2]. Im Gegensatz zur pharmazeutischen Industrie sind innovative Herstellungstechnologien, wie die kontinuierliche Produktion in Kombination mit neuartigen, leistungsfähigeren Analysenmethoden, in anderen Industriezweigen, wie der Chemie- oder Lebensmittelindustrie, bereits länger etabliert [3]. Obwohl in den letzten Jahren auch in der pharmazeutischen Industrie das Interesse, die Qualität der Produkte zu verbessern und die Effektivität von Prozessen zu steigern, gestiegen ist, bleibt sie dennoch bis heute einer Umstellung ihrer Produktionsprozesse gegenüber teilweise verschlossen. Ein ausschlaggebender Grund dafür sind die strikten Vorschriften der zuständigen Aufsichtsbehörden FDA, die für den U.S. amerikanischen Markt zuständig ist, und der für den europäischen Markt zuständigen Europäischen Arzneimittel-Agentur (engl.: *European Medicines Agency,* EMA). Die regulatorischen Vorschriften der beiden Behörden sollen vor allem die Qualität der zugelassenen und vermarkteten Arzneimittel sicherstellen. So sind bestehende Produktionsprozesse für zugelassene Produkte nicht einfach umstellbar. Eine Veränderung des Produktionsprozesses im Zulassungsdossier würde bedeuten, dass der Prozess neu validiert und die unveränderte Qualität des Produktes neu nachgewiesen werden müssten. Dies würde einen hohen zeitlichen, aber auch finanziellen Aufwand für die Unternehmen bedeuten, die deshalb nicht gewillt sind, gut laufende Prozesse umzustellen. Zudem ist die vorhandene Ausstattung in den meisten Unternehmen auf eine chargenweise

Produktion ausgelegt und es müssten zunächst Investitionen für die Anschaffung neuer Maschinen getätigt werden [4]. Dennoch wird derzeit das Bestreben, die chargenweise Herstellung auf eine innovative, kontinuierliche Herstellung umzustellen, immer größer. Dieses Bestreben wird weiterhin besonders durch die FDA gefördert, die erstmals im Jahr 2012 ihre Vorstellungen zur kontinuierlichen Produktion veröffentlichte [1] und im Jahr 2016 nochmals ihren Standpunkt in einem gegenwärtigen Dokument verdeutlichte [5].

Das Bestreben der FDA kontinuierliche Herstellungsprozesse zu fördern, beruht vor allem auf der Tatsache, dass durch kontinuierliche Prozesse, die mithilfe innovativer *inline* Analysemethoden überwacht werden, eine gleichmäßigere Produktqualität gewährleistet werden kann. Zudem können diese innovativen analytischen Werkzeuge zu einem besseren Prozessverständnis beitragen. Diesen Gedanken greift auch das *Quality-by-Design*- (QbD-) Konzept auf, das dafür steht, dass die Qualität eines Produktes bereits durch den Herstellungsprozess gesichert wird [2, 6]. Prozesse werden dabei kontinuierlich mittels geeigneter Methoden überwacht und die Ergebnisse mit den vorher festgelegten Qualitätsmerkmalen abgeglichen. Die kontinuierliche Produktion bietet die Möglichkeit, ein verbessertes Prozessverständnis in Kombination mit innovativen Kontrollstrategien für eine gesteigerte Produktqualität zu nutzen [7].
Die Einführung des QbD-Konzeptes in der pharmazeutischen Industrie ist ebenfalls Ziel mehrerer Richtlinien der International Conference for Hamonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [8-10].

Bisher gibt es auf dem Arzneimittelmarkt jedoch nur wenige kontinuierlich hergestellte feste Darreichungsformen. Das erste im Jahr 2015 zugelassene Präparat war das ORKAMBI™ der Firma Vertex zur Behandlung der zystischen Fibrose, gefolgt vom im Jahr 2016 zugelassenem Prezista® der Firma Janssen zur HIV-Therapie. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass in den nächsten Jahren immer mehr kontinuierlich produzierte Arzneimittel zugelassen werden.

1.1.2 Vorteile und Herausforderungen der kontinuierlichen Produktion

Die kontinuierliche Produktion bietet einige Vorteile gegenüber der traditionellen, chargenweisen Herstellung [11, 12]. So weisen kontinuierliche Prozesse aufgrund der geringeren Anzahl benötigter Verfahrensschritte eine höhere Effizienz auf und zudem auch kürzere Prozesszeiten. Dadurch, dass keine weitere manuelle Bedienung mehr nötig ist, wird die Sicherheit sowohl für die Mitarbeiter als auch für das Produkt erhöht [1]. Weiter werden für die kontinuierliche Produktion nicht länger große Herstellungsmaschinen benötigt, da nur geringe Mengen an Material im kontinuierlichen Prozess gefördert werden müssen, was

die Umweltbilanz verbessert. Auch können Maschinen sowohl für die Entwicklung, als auch für die spätere Herstellung genutzt werden. Dadurch werden die Entwicklungszeiten für neue Produkte maßgeblich verkürzt, da mögliche Probleme bei der Übertragung vom Labor- auf den Produktionsmaßstab vermieden werden können [7]. Neben diesen vor allem wirtschaftlichen Vorteilen bieten sich, wie bereits erwähnt, auch Vorteile in Bezug auf die Qualität des Produktes. Ein kontinuierlicher Prozess muss konsequent überwacht und kontrolliert werden, was zu einer besseren Qualitätssicherung des gefertigten Produktes beiträgt, da nicht nur ein kleiner Teil der produzierten Charge am Ende kontrolliert wird, sondern kontinuierlich ein Großteil des produzierten Produktes überwacht wird. Dadurch erhofft man sich Produkte mit einer hohen gleichbleibenden Qualität und geringere Verluste durch Produkte, die nicht den Spezifikationen entsprechen. Zudem findet die Qualitätssicherung in Echtzeit statt, was auch die Möglichkeit einer Echtzeitfreigabe des Produktes ohne Verluste in Aussicht stellt [11].

Neben den genannten Vorteilen gibt es jedoch auch noch einige Herausforderungen und Schwierigkeiten, die es zu überwinden gilt [11]. Zunächst einmal muss nicht nur in der pharmazeutischen Industrie, sondern auch an Universitäten und Behörden ein Umdenken stattfinden. Die an den genannten Stellen tätigen Personen müssen bereit sein, sich auf diese Umstellung einzulassen und sich mit den neuen Techniken auseinanderzusetzen, um gleichbleibende Produktqualitäten gewährleisten zu können. Des Weiteren muss ein kontinuierlicher Prozess als ein Ganzes betrachtet werden und nicht mehr als einzelne Teilschritte in einer Fertigungslinie, was ein hohes Prozessverständnis erfordert. Voraussetzung dafür ist eine entsprechende Schulung des Personals. Außerdem sollte die Zusammenarbeit von Fachkräften mit verschiedenen Expertisen gestärkt werden.
Eine weitere regulatorische Hürde war die Definition einer Charge. Laut FDA ist eine Charge „[…] eine bestimmte Menge eines Arzneimittels […], die innerhalb bestimmter Grenzen einheitliche Eigenschaften und eine einheitliche Qualität aufweist und die in einem Fertigungsschritt innerhalb desselben Fertigungszyklus hergestellt wurde“ [13]. Es wurde häufig in Frage gestellt, ob diese Definition auch für eine kontinuierliche Herstellung gültig ist [4]. Die FDA hat in ihren Vorstellungen zur kontinuierlichen Produktion jedoch klargestellt, dass diese Definition auch für kontinuierliche Prozesse gilt. Das Arzneimittelgesetz definiert eine Charge als „[…] die jeweils aus derselben Ausgangsmenge in einem einheitlichen Herstellungsvorgang oder bei einem kontinuierlichen Herstellungsverfahren in einem bestimmten Zeitraum erzeugte Menge eines Arzneimittels“ [14] und schließt so die kontinuierliche Herstellung ebenfalls in die Definition ein. Dabei

kann eine Charge über eine bestimmte Produktionszeit oder über die Menge an verarbeitetem Material oder produziertem Produkt bestimmt werden. Die jeweilige Definition muss vor Beginn der Herstellung festgelegt werden [5]. Dennoch muss auch hier für jede produzierte und freigegebene Einheit des Produktes bekannt sein, welche Charge der Arznei- und Hilfsstoffe verwendet und zu welchem Zeitpunkt es gefertigt wurde, um bei eventuellen Problemen das entsprechende Produkt zurückrufen zu können. Auch hierfür sind ein hohes Prozessverständnis und außerdem festgelegte Kontroll-Strategien Voraussetzung. Vor allem die Verweilzeiten der Materialien in allen Teilen der Fertigungslinie müssen genau bekannt sein. Zudem muss bekannt sein, ab wann sich ein Herstellungsprozess im Gleichgewicht befindet, um zu entscheiden, wieviel Produkt nach dem Start, Herunterfahren oder einer Störung des Prozesses verworfen werden muss. Wird eine lange Zeit zur Einstellung des Gleichgewichtes benötigt, muss viel Material verworfen werden, was einen weiteren Nachteil darstellen würde [15]. Ein weiteres Problem stellt bis heute die Reinigung kontinuierlicher Prozessanlagen dar. Es gibt noch viele offene Fragen bezüglich der Reinigung und der Reinigungsvalidierung. Alle Ausrüstungsgegenstände müssen vor einer neuen Herstellung gesäubert werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Bisher ist aber ungeklärt, wie die bestehenden Vorschriften auf kontinuierliche Prozesse, bei denen die Anlagen in den meisten Fällen für ein Produkt reserviert sind, übertragen werden sollen [16]. Auch die Frage wie oft eine Anlage im Dauerbetrieb gereinigt werden muss, ist noch ungeklärt. Zusätzlich wird die für die Reinigung benötigte Zeit verlängert, da am Ende eines Produktionszyklus alle Maschinen gleichzeitig gereinigt werden müssen und die Reinigung eines Teils der Maschinen nicht wie üblich parallel zu anderen Herstellungsschritten erfolgen kann. Bei langen Produktionszeiten könnte es außerdem zum Verschleiß von Ausrüstungsgegenständen kommen, sodass auch während einer kontinuierlichen Produktion immer wieder Produktionsstopps zur Wartung der Maschinen notwendig werden könnten.

1.2 Zweischneckengranulation zur kontinuierlichen Feuchtgranulation

1.2.1 Einleitung

Die Feuchtgranulation ist eine der wichtigsten und am häufigsten angewendeten Methoden in der Herstellung fester Darreichungsformen [17]. Beim Feuchtgranulieren werden dem Pulver Flüssigkeiten zugesetzt, die eine Agglomeration der Primärpartikel bewirken. Die zugesetzten Flüssigkeiten müssen anschließend durch Trocknung entfernt werden. Durch das Granulieren wird eine Kornvergrößerung erreicht, was die Eigenschaften des Haufwerks maßgeblich verändert und dadurch einige Vorteile bietet. So kann durch eine Granulation ein besseres Fließverhalten erreicht und einer Entmischung entgegengewirkt werden.

Granulate sind außerdem staubfrei bzw. –arm, was besonders bei hochpotenten Wirkstoffen wünschenswert ist. Durch eine höhere Schüttdichte kann weiter das Lagervolumen verringert werden. Auch die Eigenschaften nachfolgend produzierter Tabletten können durch das Granulierverfahren auf die gewünschte Weise beeinflusst werden [18]. Die am häufigsten eingesetzten Feuchtgranulierprozesse sind die Wirbelschicht- und Mischergranulation [19].

Aufgrund der im vorherigen Kapitel beschriebenen Vorteile besteht großes Interesse an innovativen Granulierverfahren, die automatisiert und kontinuierlich betrieben werden können. In den letzten Jahren wurden verschiedene Techniken zur kontinuierlichen Granulation vorgestellt [15]. Dabei beruhten die meisten Methoden auf einer kontinuierlichen Wirbelschichtgranulation oder auf der Extrusion. Während die Prozesszeiten für die Wirbelschichtgranulation aufgrund einer parallel stattfindenden Trocknung relativ lang sind, ist die extrusionsbasierte Feuchtgranulation durch kurze Verweilzeiten gekennzeichnet, was für einen kontinuierlichen Prozess vorteilhaft ist [20].

Bereits Ende der 1980er Jahre veröffentlichte Lindberg et al. erste Studien zur kontinuierlichen Granulation in einem Zweischneckenextruder [21, 22]. Zu Beginn der 2000er wurde der Prozess von Keleb et al. [23, 24] und Ghebre-Sellassie et al. [25], welche 2002 ein Patent für die Anwendung eines Zweischneckengranulierers in einem kontinuierlichen Granulationsprozess erhielten, weiter untersucht. Aufgrund des steigenden Interesses an kontinuierlichen Herstellungsmethoden wurde der Prozess in den letzten Jahren von vielen weiteren Forschungsgruppen intensiv untersucht, sodass es heute bereits ein bekanntes System zur kontinuierlichen Fertigung fester Darreichungsformen der Firma GEA auf dem Markt gibt, in welchem ein Zweischneckengranulierer für den Granulationsschritt eingesetzt wird [26].

1.2.2 Zweischneckengranulation

Für die Zweischneckengranulation (engl.: *twin-screw granulation*, TSG) wird ein gleichsinnig drehender Zweischneckenextruder eingesetzt. Der Zweischneckengranulator besteht aus zwei ineinander verzahnten, gleichsinnig rotierenden Schnecken, die in ein geschlossenes Schneckengehäuse eingebettet sind und die Materialien entlang des Granulierers transportieren, vermischen und verdichten. Ursprünglich stammen Zweischneckenextruder aus der Plastik- und Lebensmittelindustrie, wo auch gegensätzlich rotierende Extruder eingesetzt werden [27]. Für pharmazeutische Formulierungen wurden bisher jedoch nur gleichsinnig rotierende Extruder untersucht. Der größte Unterschied zum Extrusionsprozess ist die fehlende Düsenplatte am Ende des Extruders. Dadurch wird das

Material am Ende des Granulierers nicht weiter verdichtet und fällt frei heraus. Der TSG Prozess ist aufgrund vieler einstellbarer Parameter und Möglichkeiten des Aufbaus durch eine hohe Flexibilität ausgezeichnet [28, 29]. Die zu variierenden Parameter sollen im Folgenden kurz dargestellt und erläutert werden.

Aufbau der Maschine

Ein Zweischneckengranulierer ist definiert durch den Durchmesser der Schnecken und das Verhältnis der Länge des Granulierers zum Durchmesser der Schnecken. In dieser Arbeit wurde ein Extruder (Abbildung 1) mit einem Verhältnis der Länge zum Durchmesser von 40 und Schnecken mit einem Durchmesser von 16 mm verwendet. Der Granulierer hatte somit eine Länge von 640 mm. Für eine Granulation der meisten Pulver sind Verhältnisse von 12-20 ausreichend, wohingegen in der Plastik- und Lebensmittelindustrie die Verhältnisse bei 30-50 liegen [29]. Der Spalt zwischen Schnecken und -gehäuse ist gering, wodurch für das Pulver/ Granulat nur ein eng begrenzter Platz zur Verfügung steht. Der vorhandene Platz wird durch den inneren und äußeren Durchmesser der Schneckenelemente bestimmt. Das Schneckengehäuse des Granulierers besteht normalerweise aus einer Serie von einzelnen, kurzen Zonen. Der in dieser Arbeit verwendete Granulierer ist in zehn Zonen gleicher Länge unterteilt, die einzeln gekühlt oder beheizt werden können. In jede dieser Zonen können weiter individuelle Ports eingebracht werden, die das Dosieren der Pulver und der Granulierflüssigkeiten erlauben und außerdem auch das Einbringen von PAT-Werkzeugen ermöglichen.

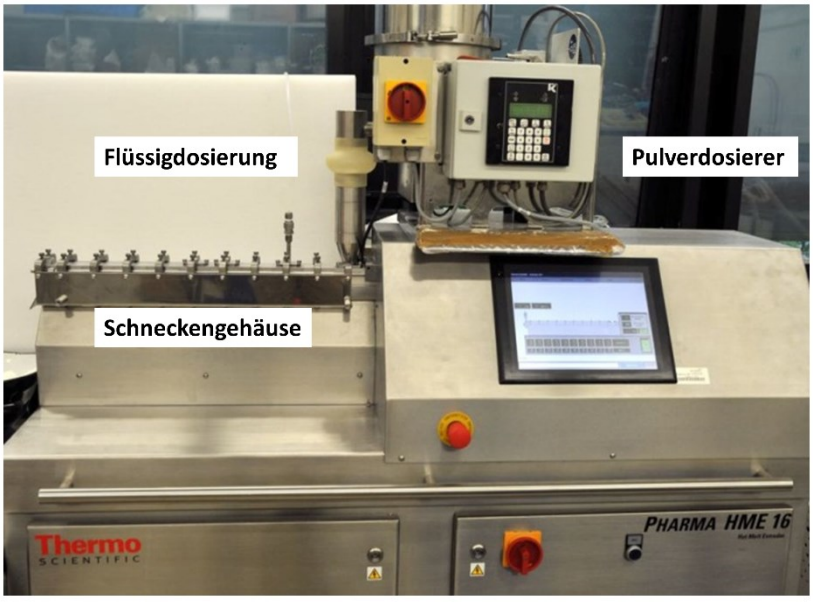

Abbildung 1: Thermo Fisher Pharma HME 16 Extruder mit Pulver- und Flüssigdosierung.

Schneckenkonfiguration

Die Schnecken werden bei den meisten Granulierern individuell aus einzelnen Bausteinen zusammengesetzt. Dazu stehen verschiedene Typen von Schneckenelementen zur Verfügung. Der erste und letzte Teil der Schnecke bestehen üblicherweise aus Förderelementen, die das Material in den Granulierer fördern bzw. am Ende heraustransportieren und dabei nur minimale Scherkräfte auf das Pulver ausüben. Förderelemente stehen in verschiedenen Ganghöhen zur Verfügung, die sich in der pro Umdrehung geförderten Masse unterscheiden. Die Agglomeration und Verdichtung des Materials finden hauptsächlich in den Knetzonen statt. Die Knetzonen werden aus einzelnen Knetelementen zusammengesetzt. Dabei kann der Winkel zwischen den einzelnen Elementen variiert werden. Der Eintrag von Scherenergie ist in den Knetzonen höher als in Bereichen mit Förderelementen, dafür besitzen sie eine deutlich geringere Förderkapazität. Zusätzlich gibt es noch distributive Mischelemente, die sowohl eine gewisse Förderkapazität besitzen, als auch den Eintrag von Scherenergie ermöglichen [29]. Diese Elemente werden häufig hinter einer Knetzone eingebracht, um die Partikelgrößenverteilung anzupassen und große Agglomerate zu zerstören [30]. Eine Standardschneckenkonfiguration besteht üblicherweise aus zwei Knetblöcken mit im 60° Winkel installierten Knetelementen, die durch Förderelemente voneinander getrennt werden [31].

Prozessparameter

Verschiedene Prozessparameter sind individuell einstellbar, wodurch Granulate mit unterschiedlichen Eigenschaften produziert werden können. Die kritischen Prozessparameter sollten dabei während der Granulation unbedingt überwacht werden. Eine einstellbare Größe ist die Schneckendrehzahl, üblicherweise angegeben in Umdrehungen pro Minute (UpM). Der in dieser Arbeit verwendete Granulierer hat eine maximale Schneckendrehzahl von 1000 UpM, wobei für den TSG-Prozess üblicherweise nur Schneckendrehzahlen zwischen 200 und 400 UpM verwendet werden. Höhere Schneckendrehzahlen führen zu einem schnelleren Transport des Materials durch den Granulierer und, bei gleichbleibender Pulverdosierrate, zu einem geringeren Füllgrad. Die Schneckendrehzahl hat jedoch kaum einen Einfluss auf die Eigenschaften der produzierten Granulate [32, 33].

Ein weiterer einstellbarer Parameter ist die Temperatur in den verschiedenen Zonen des Schneckengehäuses. Einige Studien beschreiben den Einfluss der Temperatur des Schneckengehäuses auf die Granulatgrößenverteilung und die Form der produzierten Granulate [34, 35]. Weiter gibt es eine Studie von Schmidt et al. [36], die sich mit einer

Trocknung direkt im Granulierer durch Aufheizen bestimmter Zonen des Schneckengehäuses beschäftigt hat. Dafür wurde das Pulver in den ersten Zonen granuliert und vorgeheizt und das produzierte Granulat für die Trocknung im Schneckengehäuse in einer zweiten Zone deutlich aufgeheizt. Durch dieses Vorgehen war eine direkte Trocknung im Granulierer möglich.

Der letzte einstellbare Parameter ist der Durchsatz. Der gesamte Materialdurchsatz setzt sich aus dem Durchsatz des Feststoffes und dem Durchsatz der Granulierflüssigkeit zusammen. Das Verhältnis der Menge der Flüssigkeit zur Feststoffmenge (engl.: *liquid to solid ratio,* Feuchte) ist eine charakteristische Größe und abhängig von den Eigenschaften der verwendeten Materialien und den gewünschten Granulateigenschaften. Das Pulver wird üblicherweise in die erste Zone des Granulierers dosiert und die Flüssigkeit unmittelbar danach. Der Durchsatz beeinflusst zusammen mit der Schneckendrehzahl den Füllgrad des Granulierers. In verschiedenen Studien wurde der Einfluss des Füllgrades auf die Eigenschaften der Granulate nachgewiesen [37, 38]. So konnten Gorringe et al. [38] zeigen, dass die Granulatgrößenverteilungen bei gleichbleibendem Füllgrad unabhängig von der Schneckendrehzahl und der geförderten Masse sehr ähnlich waren. Weiter wird auch die Verweilzeitverteilung durch den Durchsatz beeinflusst. Die Verweilzeit bestimmt, wie lange die Materialien im Granulierer verbleiben und hat somit Einfluss auf die Verteilung der Flüssigkeit im Pulverbett, die Durchmischung mehrerer Pulverkomponenten und die Agglomeration [39].

1.2.3 Kritische Qualitätsattribute kontinuierlich produzierter Granulate

Während der kontinuierlichen Feuchtgranulation sollten verschiedene kritische Qualitätsattribute (engl.: *critical quality attributes*, CQAs) kontrolliert werden. Zu den zu kontrollierenden Qualitätsmerkmalen von Granulaten zählen die Feuchte, die Granulatgrößenverteilung und die Form der einzelnen Granulatkörner. Wenn ein Arznei- oder Hilfsstoff in mehreren polymorphen oder pseudopolymorphen Formen vorliegen kann, sollte auch der Zustand nach der Granulation überprüft werden [40]. Neben diesen Granulateigenschaften sollte aber auch die Homogenität der Mischung überprüft werden, da die Homogenität des Granulates auch einen Einfluss auf die Gleichförmigkeit des Gehaltes nachfolgend produzierter Tabletten hat und so auch Zwischenprodukte einer Gleichförmigkeit des Gehaltes entsprechen müssen [41].

1.3 Prozessanalytische Technologien

1.3.1 Definition von PAT

Die Prozessanalytische Technologie (engl.: *Process Analytical Technology*, PAT) ist nach ihrer Definition ein multidisziplinäres und interdisziplinäres Thema, das in vielen Industriezweigen heutzutage immer mehr an Bedeutung gewinnt. Besonders im Bereich der kontinuierlichen Produktion haben PAT-Werkzeuge einen hohen Stellenwert. Die FDA erließ 2004 eine PAT-Richtlinie für die pharmazeutische Industrie und Forschung [42], in der PAT als ein eigenständiges Konzept mit regulatorischen Anforderungen eingeführt wurde. In der genannten Richtlinie ist PAT wie folgt definiert: „Ein System für Design, Analyse und Regelung des Herstellungsprozesses anhand zeitnaher Messungen (d.h. während des Prozesses) kritischer Qualitäts- und Leistungsattribute von Ausgangsmaterialien und Zwischenprodukten und Prozessen mit dem Ziel, die finale Produktqualität zu gewährleisten.“ [42]. Somit ist PAT ein komplexes System aus geeigneten Werkzeugen und multivariaten Methoden sowohl zur Qualitätskontrolle von Ausgangsmaterialien und Zwischenprodukten als auch zur Prozesskontrolle, -regelung und -optimierung. Das Ziel der Einführung von PAT ist die stetige Verbesserung der Produktqualität und der Effizienz von Herstellungsprozessen [43]. PAT-Werkzeuge sollten somit sowohl bereits in der Entwicklung neuer Prozesse als auch zur Analyse laufender Prozesse eingesetzt werden, um das Prozessverständnis kontinuierlich zu verbessern. Das Konzept der PAT sorgte damit ebenfalls für ein Umdenken in der pharmazeutischen Industrie und steht im Einklang mit dem QbD-Konzept und der kontinuierlichen Herstellung.

1.3.2 Implementierung von PAT-Werkzeugen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, PAT-Werkzeuge in einen Prozess zu implementieren. Diese Möglichkeiten können eingeteilt werden in *offline*, *atline*, *online* und *inline* Messungen. Für *offline* Messungen werden die Proben aus dem Prozess entfernt und zu einem räumlich abgetrennten Labor gebracht, in dem die Analyse der Proben stattfindet. Nachteilig an einer *offline* Methode sind der hohe Zeitaufwand und die Zerstörung der Probe. Dennoch können hiermit bisher die genauesten Ergebnisse erzielt werden. Bei der *atline* Methode werden Proben ebenfalls aus dem Prozess entfernt, die Analyse findet aber in räumlicher Nähe zum Produktionsort statt. Für die *online* Messung werden Proben automatisch und kontinuierlich aus dem Prozessfluss gezogen und nach der Vermessung wieder dem Produktfluss zugeführt. Bei der *inline* Messung wird die Probe direkt im Produktfluss gemessen. Die Messung darf dabei keinen Einfluss auf den Prozess haben. Der

große Vorteil einer *inline* Messung ist die Möglichkeit einer Echtzeit-Analyse, was nicht nur eine Kontrolle, sondern weiter auch eine direkte Prozessregelung erlaubt. Schwierigkeiten bestehen hierbei jedoch in der Bereitstellung repräsentativer Proben und einer aufwendigen Kalibrierung [43]. Die erhobenen, oft multivariaten Daten erfordern weiter den Einsatz multivariater Datenanalysemethoden zur Auswertung der komplexen Informationen. Zur *inline* Messung stehen verschiedene als PAT-Werkzeuge geeignete spektroskopische Methoden zur Verfügung [43, 44]. Die größte Bedeutung hat dabei in den letzten Jahren die Nahinfrarot- (NIR-) Spektroskopie gewonnen, die zahlreich als PAT-Werkzeug untersucht und eingesetzt wurde [40, 45-47]. Aber auch die Raman-Spektroskopie ist ein vielversprechendes PAT-Werkzeug zur *inline* Überwachung kontinuierlicher Prozesse [48] und als analytische Methode im Europäischen Arzneibuch aufgeführt [49].

1.3.3 Schwierigkeiten und Herausforderungen bei der Implementierung von inline PAT-Werkzeugen

Die Implementierung von *inline* PAT-Werkzeugen bereitet häufig einige Schwierigkeiten. Viele Probleme bei der Implementierung von PAT-Werkzeugen in kontinuierliche Prozesse treten bei der Probennahme auf. Das am häufigsten auftretende Problem ist die Verschmutzung (engl.: *fouling*) von Messsonden durch das Produkt selbst oder durch während der Produktion auftretender Stäube [40, 50, 51]. Weiter sollte genau untersucht werden, an welcher Stelle die Messsonde am besten in den Prozess eingebracht wird. Die Sonde darf den Produktfluss nicht stören oder sogar blockieren, trotzdem sollte aber im kontinuierlich bewegten Produktfluss gemessen werden, um aussagekräftige Daten zu generieren. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass das vermessene Probenvolumen häufig nicht exakt definiert werden kann [40], aber dennoch regulatorische Vorgaben betreffend der Probengröße eingehalten werden müssen [41]. Auch die Entwicklung multivariater Kalibriermodelle für on-/inline eingesetzte spektroskopische Methoden kann erhebliche Schwierigkeiten verursachen. Die spektroskopischen Messungen sind nicht nur sensitiv für den zu analysierenden Stoff, sondern werden ebenfalls durch Fluktuationen und Variationen verschiedener Prozessvariablen wie der Temperatur, Bewegungsdynamiken, der Packungsdichte des Materials und anderen Umgebungsbedingungen beeinflusst. Diese Einflüsse können die Spektren in einem nicht-linearen Verhalten beeinflussen und damit die Güte der Kalibriermodelle herabsetzen. Deshalb müssen solche Daten mit hoher Sorgfalt ausgewertet werden. Um eine robuste Kalibrierung zu erhalten, dürfen nur die relevanten chemischen Informationen extrahiert werden [52].

1.4 Raman-Spektroskopie

1.4.1 Grundlagen der Raman-Spektroskopie

Der Raman-Effekt wurde 1923 von A. Smekal vorhergesagt [53] und 1928 von C.V. Raman erstmals experimentell nachgewiesen [54]. Er beschreibt einen unelastischen Streueffekt von Licht an Atomen oder Molekülen. Dabei findet eine Energieübertragung zwischen dem einfallenden Licht und den Zielmolekülen statt [55].

Bei der Raman-Spektroskopie werden Proben mit monochromatischem Laserlicht bestrahlt. Treffen die elektromagnetischen Wellen auf die Probe, werden sie gestreut. Der größte Teil des einfallenden Lichtes wird dabei von den Probenmolekülen mit der gleichen Frequenz gestreut. Dies ist der elastisch gestreute Anteil, der als Rayleigh-Streuung bezeichnet wird. Nur ein geringer Anteil des einfallenden Lichtes wird unelastisch gestreut, wobei die Frequenz des gestreuten Lichtes gegenüber der Frequenz des einfallenden Lichtes verschoben wird. Diese unelastische Streuung wird als Raman-Effekt bezeichnet. Das gestreute Licht kann dabei eine höhere oder niedrigere Frequenz als das einfallende Licht haben. Hat das gestreute Licht eine niedrige Frequenz als das einfallende Licht spricht man von der Stokes-Strahlung, befindet sich die Energie des gestreuten Lichtes auf einem höheren Niveau spricht man von Anti-Stokes-Strahlung. Diese Energieübertragung bewirkt eine Verschiebung der Wellenlänge des gestreuten Lichtes, die als Raman-Verschiebung bezeichnet wird. Finden die Raman-Messungen bei Raumtemperatur statt, wird man überwiegend Stokes-Strahlung beobachten. Für analytische Zwecke wird folglich überwiegend das intensivere Stokes-Spektrum verwendet.

Die Voraussetzung für eine Raman-Aktivität ist die Polarisierbarkeit des Materials. Viele Arzneistoffe enthalten aromatische Gruppen oder konjugierte Doppelbindungen, die aufgrund ihres delokalisierten Elektronensystems stark polarisierbar sind, und besitzen deshalb eine hohe Raman-Aktivität. Viele in der Pharmazie eingesetzte Hilfsstoffe sind hingegen nicht aromatisch und deshalb weniger Raman-aktiv, weshalb die Arzneistoffbanden meist deutlich intensiver sind als die der Hilfsstoffe. Dies macht die Raman-Spektroskopie besonders sensitiv für die Arzneistoffe in pharmazeutischen Formulierungen [56]. Des Weiteren zeigt Wasser eine sehr geringe Raman-Aktivität. Somit ist die Raman-Spektroskopie auch ein geeignetes PAT-Werkzeug für alle Herstellungsprozesse, in denen Wasser zum Einsatz kommt.

Die Raman-Spektroskopie bietet weiter viele Vorteile gegenüber anderen analytischen Methoden, was ihren Einsatz als PAT-Werkzeug so attraktiv macht. So wird keine

Probenvorbereitung benötigt, die Messung ist sehr schnell und Proben können unabhängig von ihrem Zustand (gasförmig, fest, flüssig, halbfest, etc.) vermessen werden. Außerdem ist das Raman-Spektrum für eine Substanz charakteristisch. Des Weiteren sind auch kontaktfreie Messungen möglich und die Probe wird in der Regel während der Messung nicht zerstört. Zudem erlaubt die Verbindung der Raman-Sonden über Glasfaserkabel mit den Spektrometern einen leichten Einbau in den jeweiligen Prozess. Mit der Raman-Spektroskopie können auch unterschiedliche polymorphe oder pseudopolymorphe Formen erfasst werden [57-59]. Ein Vorteil gegenüber der NIR-Spektroskopie ist weiter, dass Raman-Spektren aufgrund schärferer Peaks leichter zu interpretieren und auszuwerten sind [60].

Neben den genannten Vorteilen gibt es aber auch ein paar Schwierigkeiten beim Einsatz der Raman-Spektroskopie als PAT-Werkzeug [45, 55]. So wird die Raman-Messung beispielsweise stark durch elektromagnetische Wellen im sichtbaren Bereich (im Folgenden Licht genannt) beeinflusst, was eine entsprechende Abdunkelung des Messraums erfordert. Weiter können auch Veränderungen in den Einstellungen des Instrumentes oder variierende Umgebungsbedingungen einen Einfluss auf die Raman-Intensität und somit auf das Messergebnis haben. Zudem zeigt der zugrundeliegende Raman-Effekt eine sehr schwache Signalintensität. Bei in den Prozess implementierten Sonden wird zudem nur das Licht detektiert, das in der gleichen Richtung streut, aus der das einfallende Licht kommt, was die Intensität der erhaltenen Spektren weiter abschwächt und eine Analyse erschweren kann. Auch können andere Phänomene wie Absorption oder Fluoreszenz die Raman-Messung beeinträchtigen. Ein ebenfalls häufig diskutiertes Problem der Raman-Messung ist die Erwärmung der Proben durch das eingestrahlte Laserlicht und die daraus folgende Zerstörung der Probe. Eine Erwärmung tritt allerdings nur auf, wenn die Absorptionsbanden der Probe im Anregungswellenlängenbereich des Lasers liegen [61] und wenn eine längere Belichtung der Probe stattfindet. Aufgrund sehr kurzer Verweilzeiten der Probe im Messfenster bei kontinuierlichen Messungen im Prozessfluss spielt dieses Problem hierbei kaum eine Rolle. Ein weiteres, bedeutenderes Problem ist die Untersuchung einer angemessenen Probengröße. Häufig kann mithilfe der Raman-Spektroskopie aufgrund der geringen Eindringtiefe des Lasers [62] nur ein zu kleiner Teil der Probe vermessen werden [63]. Aus diesem Grund hat Kaiser Optical eine Sonde mit einem größeren Laserspot-Durchmesser entwickelt. Die PhAT- (engl.: *Pharmaceutical Area Testing*) Sonde hat einen Spot-Durchmesser von 6 mm und erlaubt so die Vermessung eines größeren Probenvolumens [64].

1.4.2 Raman-Analysatoren

Es stehen verschiedene Arten von Spektrometern zur Aufnahme von Raman-Spektren zur Verfügung. Jeder Raman-Analysator besteht dabei aus einer Basiseinheit und einem optischen System, welche über ein Glasfaserkabel miteinander verbunden sind. Die Basiseinheit enthält einen Laser als monochromatische Lichtquelle, einen Detektor, einen Filter, um die Rayleigh-Strahlung zu entfernen, und einen Spektrographen, um das gestreute Licht nach Wellenlängen zu separieren. Ferner ist die Basiseinheit mit einem Computer verbunden und enthält ein System zur Kommunikation der Analysenergebnisse [55].

Abbildung 2: RXN2-Raman-Analysator. http://www.kosi.com/na_en/products/raman-spectroscopy/raman-analyzers/raman-rxn2-analyzer.php#

Abbildung 2 zeigt den in dieser Arbeit verwendeten Raman-Analysator mit den oben beschriebenen Bauteilen.

1.4.3 Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung von Arzneistoffen

Die Raman-Spektroskopie ist für quantitative Analysen geeignet, da die Menge des gestreuten Lichtes direkt proportional zur Analytkonzentration in der Probe ist, unter der Voraussetzung, dass alle anderen Versuchs- und Umgebungsbedingungen konstant gehalten werden. Die Intensität der Raman-Streuung ist nach folgender Formel definiert [65]:

$$I_R = I_0 \beta D K \qquad \textit{Gleichung 1}$$

wobei I_R die Intensität des Raman-Signals, I_0 die Leistung des Lasers, D die Anzahl der Moleküle pro cm^2, β der Raman-Streuquerschnitt und K ein geometrischer Faktor sind. Gleichung 1 zeigt auch, dass das Raman-Signal direkt proportional zur Laserleistung ist und der relativ schwache Raman-Effekt so durch eine entsprechende Laserleistung ausgeglichen werden kann.

Seit 1990 wurden einige quantitative Methoden basierend auf der Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung von Arzneistoffen publiziert. So gab es einige Studien zur Quantifizierung verschiedener Arzneistoffe in Tabletten [66-69]. Auch konnte die Raman-Spektroskopie bereits erfolgreich zur Endpunktbestimmung von chargenweisen Mischprozessen eingesetzt werden, wobei hier keine Quantifizierung des Arzneistoffes stattfand [48]. Des Weiteren wurde die Raman-Spektroskopie erfolgreich als PAT-Werkzeug zur Bestimmung des Endpunktes eines Überzugsprozesses in einen Trommelcoater implementiert [70] und auch eine Quantifizierung des Arzneistoffgehaltes in einem aktiven Filmüberzug war möglich [71-73]. Jedoch zeigten Fonteyne et al. in einem Review von 2015, dass es bis zu diesem Zeitpunkt keine quantitativen *inline* Anwendungen der Raman-Spektroskopie für die kontinuierliche Produktion von festen Arzneiformen gab [40]. Die erste quantitative Methode basierend auf der Raman-Spektroskopie für eine Prozesskontrolle eines kontinuierlichen Mischprozesses wurde erst kürzlich von Nagy et al. [74] veröffentlicht. In dieser Studie wurde die erfolgreiche Implementierung der Raman-Spektroskopie in einen kontinuierlichen Misch- und Tablettierprozess für eine Echtzeitüberwachung des Arzneistoffgehaltes gezeigt. Die Raman-Sonde wurde dabei über einem Förderband installiert, sodass Raman-Spektren des bewegten Pulverbetts aufgenommen werden konnten. Weiter zeigten Nagy et al. in einer nachfolgenden Studie den erfolgreichen Einsatz der Raman-Spektroskopie zur *inline* Kontrolle des Schmiermittelzusatzes in einer kontinuierlichen Tablettenproduktion [75]. Quantitative Anwendungen der Raman-Spektroskopie wurden in den letzten Jahren ebenfalls im Bereich der Schmelzextrusion publiziert. Saerens et al. entwickelten und validierten verschiedene Modelle zur Quantifizierung eines Arzneistoffes in der Schmelze, welche auf *inline* aufgenommenen Raman-Spektren basierten. Die Raman-Sonde wurde dafür in der Düse befestigt. Die entwickelten Modelle zeigten eine gute Richtigkeit und Präzision [57, 76]. Auch Netchacovitch et al. beschrieben eine zuverlässige Raman-Methode zur *inline* Arzneistoffquantifizierung in einem Schmelzextrusionsprozess [77]. Während der Zweischneckengranulation wurde die Raman-Spektroskopie bisher allerdings nur zur Bestimmung des polymorphen Zustandes von Arzneistoffen eingesetzt [26, 59]. Die erfolgreiche Anwendung der Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung von Arzneistoffen während der Schmelzextrusion verspricht jedoch auch eine erfolgreiche Implementierung in den Zweischneckengranulierprozess [78].

1.5 Chemometrische Methoden zur Auswertung analytischer Daten

1.5.1 Definition und Hintergrund

„Die Chemometrie im eigentlichen Sinne ist definiert als die chemische Disziplin, die mathematische und statistische Methoden anwendet, um (a) optimale Messverfahren und -experimente zu entwerfen und auszuwählen und (b) aus den analytischen Daten das Maximum an chemischen Informationen zu gewinnen“ [79]. Chemometrische Verfahren können qualitativer oder quantitativer Art sein. Als mathematische Methoden werden überwiegend multivariate Datenanalysemethoden angewendet, die zu empirischen mathematischen Modellen führen. Mit diesen Modellen können die relevanten Informationen extrahiert werden und nachfolgend Eigenschaften vorhergesagt werden. Ziel der Modellierung ist es, den Einfluss von Störfaktoren zu minimieren und so die relevanten Informationen zu verstärken [80].

Chemometrische Methoden sind heute in vielen Bereichen nicht mehr wegzudenken. Sie verbessern maßgeblich die Prozess- und Qualitätskontrolle und haben aufgrund der QbD- und PAT-Initiativen auch in der Pharmazie an Bedeutung gewonnen [3].

1.5.2 Gute chemometrische Praxis

1.5.2.1 Datengewinnung und –aufbereitung

Für eine erfolgreiche Modellierung ist eine sorgfältige Auswahl der Probe [80] und damit der Datengewinnung unerlässlich (siehe 1.3.2). In dieser Arbeit wurden zur Datengewinnung verschiedene Granulationen durchgeführt und *inline* Raman-Spektren mithilfe verschiedener Messaufbauten aufgenommen. Die Messantworten, hier die gemessenen Intensitäten bei den verschiedenen Wellenzahlen, werden auch als unabhängige Variablen bezeichnet und bilden die X-Daten. Die abhängigen Variablen, in diesem Fall der Arzneistoffgehalt der Probe, bilden die Y-Daten. Die gewonnenen Daten werden üblicherweise in einer Datentabelle dargestellt, in der jede Probe einer Zeile entspricht und die Spalten die einzelnen Variablen darstellen. Die Y-Daten bilden ebenfalls eine Spalte der Datenmatrix [79]. Die Raman-Spektren verändern sich hier abhängig von der Arzneistoffkonzentration der Probe, dennoch werden sie als X-Daten bezeichnet, da diese Terminologie in der Spektroskopie und der multivariaten Datenanalyse üblich ist.

Vor der Erstellung der chemometrischen Modelle wurden die Rohdaten zunächst aufgearbeitet. Dies ist unerlässlich, um verlässliche Modelle zu erhalten. Die Aufarbeitung der Daten umfasste die Ausreißeranalyse, die Datenvorbehandlung und die Auswahl eines geeigneten spektralen Bereiches.

1.5.2.2 Ausreißeranalyse

Als Ausreißer bezeichnet man extreme Werte einer Variablen, die durch das Modell nicht korrekt beschrieben werden können. Ausreißer können durch Messfehler und systembedingte Schwankungen entstehen [80]. Ausreißer, die durch Messfehler provoziert wurden, sollten aus dem Modell ausgeschlossen werden, um eine Verzerrung des Modells zu vermeiden. Der Einschluss systembedingter Schwankungen in das Modell ist jedoch notwendig, um robuste Modelle zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden der DModX-Test (engl.: *Distance to Model in X-Space*) und der Hotellings-T^2-Test im Programm SIMCA durchgeführt, um die Daten auf Ausreißer zu untersuchen [81]. Es wurden jedoch in keinem Fall Ausreißer ausgeschlossen, da in keinem Fall ein Messfehler vorlag und somit angenommen wurde, dass die Ausreißer durch systembedingte Schwankungen erzeugt wurden.

1.5.2.3 Vorbehandlung der Spektren

Um die Extraktion der Informationen zu verbessern, werden die gewonnenen Daten in der Regel vorbehandelt. In den aufgenommenen Spektren können verschiedene systembedingte Störsignale auftreten. Diese können durch das Spektrometer selbst, aber auch durch die Probe verursacht werden. So beeinflussen verschiedene Teilchengrößen [45] und unterschiedliche Packungsdichten der Probe die Raman-Spektren [82]. Weiter können auch Messungen an verschiedenen Tagen die Spektren beeinflussen [55]. Durch eine Vorbehandlung der Daten können ein Rauschen unterdrückt und Verschiebungen der Basislinie ausgeglichen werden [83]. Die jeweilige Vorbehandlungsmethode wird durch die Art der Daten, die Probe und den Zweck des Modells bestimmt. Weiter spielt auch die Erfahrung des Anwenders bei der Auswahl der Methode eine große Rolle, da es keine allgemeingültigen Vorgaben zu den zu verwendenden Vorbehandlungsmethoden gibt. Es besteht auch die Möglichkeit, verschiedene Vorbehandlungsmethoden zu kombinieren [79]. Jedoch kann die Verwendung zu vieler Vorbehandlungsmethoden auch nachteilig sein, wenn dadurch zu viele Informationen ausgeschlossen werden. Für diese Arbeit wurden verschiedene Vorbehandlungsmethoden getestet und empirisch die geeignetsten ermittelt, die im Folgenden erläutert werden sollen. Mit diesen Methoden wurden alle Raman-Spektren vor der Modellierung bearbeitet.

Zunächst wurden die Daten mittenzentriert, wodurch eine einfachere Interpretation ermöglicht wurde. Bei einer Mittenzentrierung wird für jede Spalte in der Datentabelle der Mittelwert berechnet und von jedem Messwert der Spalte subtrahiert [83].

Die mittenzentrierten Spektren wurden weiter standardisiert, um Streueffekte zu minimieren. Die Streuung hängt von physikalischen Eigenschaften der Probe ab und durch eine inhomogene Verteilung der Streuzentren in der Probe können Unterschiede in den Spektren entstehen. Die Weglänge des Lichtes wird dabei vor allem durch die Teilchengröße beeinflusst. In dieser Arbeit wurden Granulate mit einer breiten Granulatgrößenverteilung vermessen, wodurch die chemische Information in den Spektren möglicherweise durch physikalische Streueffekte überdeckt wurde. Bei der Standardisierung (engl.: *Standard Normal Variate transformation*, SNV) werden für jedes einzelne Spektrum die Standardabweichung und der Mittelwert berechnet und die gemessenen Intensitäten bei jeder Wellenlänge korrigiert, indem von der jeweiligen Intensität der Mittelwert subtrahiert wird und der erhaltene Wert danach durch die Standardabweichung dividiert wird [83]. Diese Methode für die Datenvorbehandlung von Raman-Spektren ist die in der Literatur am meisten verwendete [45, 76].

1.5.2.4 Auswahl des spektralen Bereiches

Für eine Modellerstellung wird nicht immer der gesamte verfügbare spektrale Bereich benötigt. Die Auswertung des gesamten Bereiches ohne vorherige Analyse kann sogar nachteilig sein, wenn z.B. Bereiche, die überwiegend Rauschen enthalten, in die Auswertung einbezogen werden. Deshalb müssen vor der Modellierung geeignete Bereiche bestimmt werden. Geeignet sind in der Regel die Bereiche, in denen sich die Raman-Peaks in den Spektren der verschiedenen Proben deutlich unterscheiden. Da hier Arzneistoffe mithilfe der Raman-Spektroskopie quantifiziert werden sollten, wurden für die Modellerstellung vor allem Bereiche ausgesucht, die charakteristische Peaks der Arznei- und Hilfsstoffe enthielten. Bereiche, die nicht mit einer Konzentrationszunahme korreliert werden konnten, wurden entfernt. Die geeigneten Bereiche wurden dabei händisch ausgewählt, indem zunächst das gesamte Spektrum ausgewertet wurde und danach getestet wurde, welche Bereiche eine Verbesserung bzw. Verschlechterung des Modells bewirken. Zur Unterstützung der Auswahl geeigneter Bereiche wurde ein Plot im Programm SIMCA genutzt, welcher die Bedeutung der Variablen für das Modell abbildet (engl.: *Variable importance in projection*, VIP). Der VIP-Plot beschreibt welche X-Variablen die X-Daten gut beschreiben und welche Variablen außerdem gut mit den Y-Daten korrelieren. Der VIP-Plot fasst somit den gesamten Beitrag einer X-Variable zum PLS Modell zusammen [84].

1.5.3 Beurteilung und Validierung chemometrischer Methoden

1.5.3.1 Kalibrierung und Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells

Die Erstellung von Kalibriermodellen kann in mehrere Teilschritte unterteilt werden. Dazu werden in der Literatur unterschiedliche Vorgehensweisen beschrieben und verschiedene Begriffe verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Datensatz mit bekannten Arzneistoffkonzentrationen zur Erstellung eines Kalibriermodells aufgenommen. Dieses Modell wurde mittels der beschriebenen Datenvorbehandlungsmethoden und einer Eingrenzung des spektralen Bereiches soweit optimiert, dass die Vorhersagefehler die kleinstmöglichen Werte annahmen. Das erstellte Modell wurde mittels einer internen Validierung unter Verwendung des gleichen Datensatzes wie für die Kalibrierung optimiert. Als Methode wurde dafür die Kreuzvalidierung (engl.: *cross validation*, CV) verwendet. Dabei wird der Datensatz unterteilt und aus einem Teil das Modell erstellt und der andere Teil vorhergesagt.

Die Leistungsfähigkeit des erstellten Modells wurde dann mit einer unabhängigen Prüfgruppe mit ebenfalls bekannten Arzneistoffkonzentrationen, die sich aber von den für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationen unterschieden, bewertet. Für den unabhängigen Datensatz wurde die Arzneistoffkonzentration über das Kalibriermodell vorhergesagt und die Güte des Modells anhand von Gütemaßen beurteilt.

1.5.3.2 Validierung gemäß regulatorisch geltender Rahmenvorschriften

Für die Validierung chemometrischer Methoden gelten die gleichen regulatorischen Vorschriften wie für die Validierung anderer analytischer Methoden. Aufgrund des speziellen Charakters chemometrischer Methoden müssen jedoch zusätzliche Aspekte bei der Validierung berücksichtigt werden. Es müssen sowohl die Leistungsfähigkeit des Modells als auch die der analytischen Methode selbst beurteilt werden. Für quantitative Modelle sollten folgende Parameter validiert werden: Spezifität, Linearität, Messbereich, Richtigkeit, Präzision und Robustheit. Für die Validierung wird ein unabhängiger Probendatensatz, der nicht Teil der Modellerstellung ist, benötigt, welcher den gesamten kalibrierten Bereich abdecken sollte. Die über das Modell vorhergesagten Werte werden dann zur Beurteilung mit Referenzwerten verglichen [79].

Neben der Validierung gemäß regulatorischer Vorschriften bezeichnet die Validierung in der Chemometrie einen Berechnungsschritt zur Optimierung von Kalibriermodellen, der in Kapitel 1.5.3.1 beschrieben ist.

1.5.3.3 Leistungsmerkmale für die Güte der Regression

Zur Beurteilung der Güte der Regression wurden zunächst das Bestimmtheitsmaß (R^2Y), der Standardfehler der Kalibrierung (engl.: *Standard Error of Calibration*, SEC) und das Vorhersagemaß (Q^2Y) betrachtet. Das R^2 ist dimensionslos und ist eine Kennzahl zur Beurteilung der Anpassungsgüte einer Regression. Es können Werte zwischen null und eins angenommen werden, wobei das R^2 für eine gute Regression spektroskopischer Daten mindestens 0,99 betragen sollte. Der SEC beschreibt ebenfalls wie gut sich die Kalibrierung den Daten anpasst. Er besitzt die gleiche Einheit wie die abhängigen Variablen, wird hier folglich wie der Arzneistoffgehalt in Prozent angegeben, und sollte möglichst klein sein. Q^2 beschreibt die Vorhersagegenauigkeit des Modells und sollte für ein gutes Modell mindestens 0,98 betragen. Das Q^2 wird über die Kreuzvalidierung berechnet.

Weiter wurde der mittlere Vorhersagefehler, die Wurzel des mittleren, quadratischen Fehlers (engl.: *Root Mean Square Error*, RMSE), berechnet. Die Endung C (engl.: *calibration*, Kalibrierung) zeigt an, dass hier der mittlere Vorhersagefehler der Kalibrierung betrachtet wird, die Endung CV (engl.: *cross validation*, Kreuzvalidierung) steht für den mittleren Vorhersagefehler der (Kreuz-)validierung und die Endung P (engl.: *prediction*, Vorhersage) bezeichnet den mittleren Vorhersagefehler für die unabhängige Prüfgruppe. Der RMSEP spiegelt die Messunsicherheit zukünftiger Vorhersagen wieder. Die Fehler werden jeweils in der gleichen Einheit wie der Arzneistoffgehalt (Prozent) angegeben und wurden über die Software SIMCA berechnet [79, 81].

Die erstellten Modelle sollten zur Vorhersage des Arzneistoffgehaltes in einem Granulat eingesetzt werden. Deshalb wurde zur Bewertung der Modelle ebenfalls ein relativer Fehler in Bezug auf einen Referenzwert, berechnet aus der Einwaage der Pulvermischungen, berechnet. Für eine akzeptable Vorhersagegenauigkeit sollte der relative Fehler unter 10 % liegen.

1.5.3.4 Auswahl der Anzahl an Faktoren

Ein kritischer und bedeutender Schritt in der Erstellung von Regressionsmodellen ist die Auswahl der Anzahl an Faktoren. Bei zu wenigen Faktoren werden die Variationen in den spektralen Daten nicht entsprechend beschrieben (engl.: *underfitting*, Unteranpassung), was zu einer schlechteren Kalibrierung und Vorhersage führt. Zu viele Faktoren hingegen führen zu einer Überanpassung (engl.: *overfitting*). Bei einer Überanpassung werden Variationen in den Daten miterfasst, die nicht mit der abhängigen Variablen in Zusammenhang stehen, was in einer Instabilität der Kalibrierung und somit einer Abnahme der Vorhersagegenauigkeit

resultiert, obwohl der Modellfehler sehr klein ist. Die optimale Anzahl an Faktoren kann mithilfe der in Kapitel 1.5.3.3 beschriebenen Gütemaße bestimmt werden. Die optimale Anzahl an Faktoren stellt dabei einen Kompromiss dar und sollte so gewählt werden, dass die Vorhersagefehler minimal sind oder, wenn kein Optimum vorliegt, sodass keine signifikante Abnahme des Fehlers beim Hinzufügen weiterer Faktoren mehr stattfindet. Die Anzahl an Faktoren kann auch anhand des Q^2Y ermittelt werden. Wird dieses nicht mehr signifikant verbessert mit dem Hinzufügen weiterer Faktoren wird wahrscheinlich nur noch Rauschen in das Modell aufgenommen [79].

1.6 Chemometrische Techniken

Zur Auswertung und Interpretation der beschriebenen großen Datentabelle werden aufgrund der hohen Komplexität spezielle Methoden benötigt. Im Allgemeinen werden dazu Projektionstechniken wie die Hauptkomponentenanalyse (engl.: *Principle Component Analysis*, PCA) oder, für eine multivariate Regression, die Regression der kleinsten Teilquadrate (engl.: *Partial Least Squares Regression*, PLSR allgemein bekannt als PLS) empfohlen, die nachfolgend genauer erläutert werden sollen.

1.6.1 Hauptkomponentenanalyse

Die PCA dient der Visualisierung der größten Abweichung in den Daten, um Muster oder Gruppierungen in den Daten aufzudecken. Ziel des Verfahrens ist eine Informationsverdichtung. Dafür werden die Ausgangsdaten durch Zerlegung in latente Variablen (auch als Faktoren oder Hauptkomponenten bezeichnet) verdichtet. Dabei findet eine lineare Datenprojektion statt. Die Faktoren stellen somit lineare Kombinationen der ursprünglichen Variablen dar. Ausgangspunkt dieser Zerlegung ist die Datenmatrix X mit N Objekten und M Variablen pro Objekt. Mathematisch ist die PCA die Lösung eines Eigenwertproblems und es gibt verschiedene Verfahren dieses Eigenwertproblem zu lösen. In der Software SIMCA ist der NIPALS (engl.: *Non-linear Iterative Partial Least Square*) - Algorithmus hinterlegt. Das Prinzip besteht darin, in den Ausgangsdaten die Richtung der größten Varianz zu identifizieren. Der erste Faktor liegt dabei immer in dieser Richtung der größten Varianz. Der zweite Faktor liegt orthogonal zum ersten Faktor, usw. Weiter sind die Faktoren nach ihrem Informationsgehalt klassifiziert, so enthält der erste Faktor immer die größte Information, der zweite die zweitgrößte, usw. Es werden solange weitere Faktoren hinzugefügt, bis die Varianz in den Daten adäquat erklärt ist. Das Ergebnis ist die Darstellung der Ausgangsdaten in einem neuen Koordinatensystem. Die Ursprungsdaten werden in den neuen Faktorraum transformiert.

Die PCA kann anhand der Gleichung 2 beschrieben werden.

$$X = TP^T + E \qquad \textit{Gleichung 2}$$

Abbildung 3 zeigt weiter eine graphische Darstellung der Zerlegung der Ausgangsmatrix X während der PCA. Die berechneten Koordinaten im neuen Faktorraum werden als Faktorwerte (engl.: *scores*, u, im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Faktorwerte *scores* genannt) bezeichnet und bilden die Gewichtsmatrix T, die die gleiche Anzahl an Zeilen hat wie die Originalmatrix, während die Anzahl an Spalten A der Zahl der verwendeten Faktoren entspricht. Die Faktoren werden in der Faktorenmatrix P zusammengefasst. Die Elemente der Spalten der Faktorenmatrix werden als Faktorladungen (engl.: *loadings*, p, im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Faktorladungen *loadings* genannt) bezeichnet. Hier bildet jeder Faktor A eine Zeile und die Spalten stellen die Ausgangsvariablen dar. Der Exponent T zeigt an, dass die Matrix transformiert wurde. Die Residuenmatrix E enthält den Anteil der Daten, der nicht vom Modell erklärt wird. Dadurch, dass die Anzahl an berechneten Faktoren meist deutlich kleiner ist als die der Ausgangsvariablen kommt es zu einer Datenreduktion und damit zu einer Strukturierung und Veranschaulichung der Datensätze [79, 83].

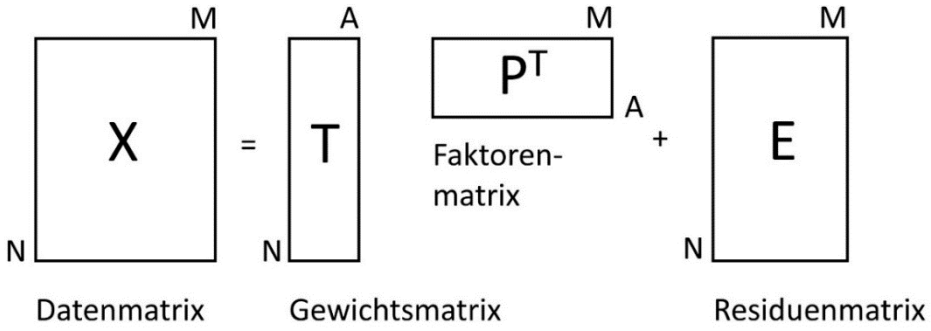

Abbildung 3: Graphische Darstellung der PCA nach W. Kessler [83].

1.6.2 Regression der kleinsten Teilquadrate

Die PLS ist der am meisten verwendete Algorithmus in der multivariaten Regression spektraler Daten. Die PLS setzt zwei Datenmatrizes X (Raman-Spektren) und Y (Arzneistoffgehalt) zueinander in Beziehung und bestimmt ihren Zusammenhang. Dies findet unabhängig von einer Kollinearität in den Daten statt. Ausgangspunkt ist auch hier die Datenmatrix X mit N Objekten (Anzahl der Raman-Spektren) und M Variablen (Spektrenwerten). Zu jedem Objekt wird eine Zielgröße K gemessen (Arzneistoffkonzentration), die den Vektor Y bildet. Bei der PLS wird sowohl mit den X-

Daten, als auch mit den Y-Daten eine PCA durchgeführt, wobei die PCA der X-Daten Informationen aus den Y-Daten erhält und umgekehrt. So wird für „die wichtigen Faktoren die Information gesammelt, die ein Maximum an Abweichung in X beschreibt, während sie bestmöglich mit Y korreliert“ [79]. Die Berechnung der Hauptkomponenten erfolgt iterativ, bis die Restvarianz minimal ist. Während die Matrix Y in die Faktorenmatrix C und die Gewichtsmatrix U zerlegt wird, ergibt die Matrix X nicht nur die Faktorenmatrix P und die Gewichtsmatrix T, sondern auch eine weitere Gewichtsmatrix W. Diese Gewichtsmatrix W enthält die Informationen, die die X und Y Daten verbinden. Außerdem entstehen die Residuenmatrizes E für die X-Daten und F für die Y-Daten. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt und kann durch Gleichung 3 und Gleichung 4 beschrieben werden [79, 83].

$$X = TP^T + E \qquad \textit{Gleichung 3}$$

$$Y = UQ^T + F \qquad \textit{Gleichung 4}$$

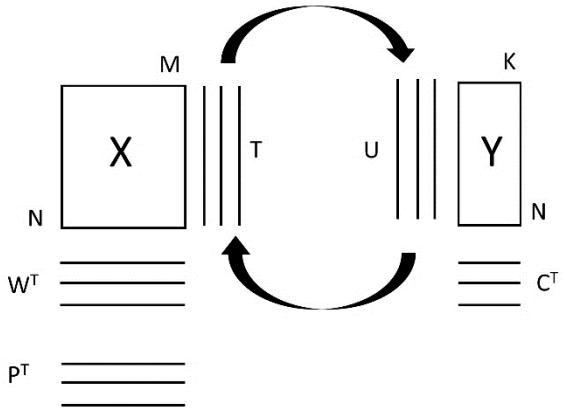

Abbildung 4: Grafische Darstellung der PLS nach W. Kessler [83].

Eine detaillierte Erläuterung der Methode findet sich in weiterführender Literatur [85, 86].

1.6.3 Statistische Versuchsplanung

Die statistische Versuchsplanung (engl.: *Design of Experiments*, DoE) ist eine Methode zur effizienten Planung und Auswertung von Versuchen, um mit möglichst wenig Versuchen maximale Informationen zu erhalten [87]. Es wird ein Zusammenhang zwischen Faktoren (z.B. Prozessparametern) und Zielgrößen (bestimmte Messwerte für Produktmerkmale) ermittelt. Als Ergebnis erhält man ein empirisches Modell, das den Zusammenhang quantitativ beschreibt [88].

In dieser Arbeit wurden statistische Versuchspläne eingesetzt, um die Robustheit der entwickelten Kalibriermodelle zu überprüfen, wie es in der Literatur empfohlen wird [76, 79, 89]. Weiter wurde ein Versuchsplan zur Untersuchung des Mischverhaltens des Zweischneckengranulierers in Abhängigkeit verschiedener Prozessparameter erstellt.

2 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die erstmalige Implementierung der Raman-Spektroskopie als PAT-Werkzeug zur kontinuierlichen *inline* Quantifizierung eines Arzneistoffes in einen Zweischneckengranulationsprozess.

Die Zweischneckengranulation ist eine kontinuierliche Granulationstechnik. Die kontinuierliche Herstellung gewinnt, aufgrund vielfältiger Vorteile, in der pharmazeutischen Industrie immer größeres Interesse, dennoch ist sie bisher nicht weit verbreitet. Dies liegt zum einen an regulatorischen Hürden, aber auch daran, dass bis heute angemessene *inline* Analysemethoden, die eine direkte Qualitätskontrolle der produzierten Granulate ermöglichen, fehlen. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die Raman-Spektroskopie als ein mögliches PAT-Werkzeug für die Qualitätskontrolle kontinuierlich produzierter Granulate evaluiert werden. Dazu musste zunächst eine Methode zur Implementierung der Raman-Sonde in den kontinuierlichen Prozess erarbeitet werden. Anschließend konnten aus den *inline* aufgenommenen Raman-Spektren multivariate PLS Modelle zur Vorhersage des Gehaltes entwickelt, hinsichtlich ihrer Güte bewertet und anschließend weiter optimiert werden. Für die Methodenentwicklung wurden zwei unterschiedliche Arzneistoffe verwendet.

Bisher waren Raman-Messungen nur in völliger Dunkelheit möglich, was die Anwendung der Raman-Spektroskopie im Prozessfluss erschwerte. Deshalb sollte in einem weiteren Teil untersucht werden, ob es möglich ist, Modelle von bei Raumlicht aufgenommenen Raman-Spektren zu erstellen und zur Vorhersage des Gehaltes zu nutzen. Abschließend sollte eine Methodenvalidierung der entwickelten Methode gemäß regulatorischer Vorschriften durchgeführt werden.

Weiter sollte die Mischeffizienz des Granulierers mithilfe der entwickelten Raman-spektroskopischen Methoden untersucht werden, um so das Prozessverständnis zu verbessern. Dazu wurden der Arzneistoff und der Hilfsstoff getrennt dosiert (*split feeding*) und der Gehalt der Mischung am Ende des Granulierprozesses *inline* gemessen. Weiter sollte die Raman-Spektroskopie zur Kalkulierung von Verweilzeiten eingesetzt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Methodenentwicklung zur kontinuierlichen inline Gehaltsbestimmung

3.1.1 Einleitung

Die FDA hat im Jahr 2004 eine PAT-Richtlinie veröffentlicht [42], in der sie die Notwendigkeit für die Entwicklung neuer, nicht invasiver und nicht zerstörender Analysemethoden für die *inline* Messung kritischer Qualitätsmerkmale ausdrückt. Neben der Partikelgröße, der Feuchte, den Fließeigenschaften und der nachfolgenden Tablettierbarkeit, zählt auch die Gleichförmigkeit des Gehaltes des produzierten Granulates zu den kritischen Qualitätsmerkmalen, da auch Zwischenprodukte Vorgaben zur Gleichförmigkeit des Gehaltes erfüllen müssen [41].

Da die Raman-Spektroskopie, wie eingangs erläutert, eine vielversprechende Methode für die *inline* Gehaltsbestimmung darstellt, wurden in dieser Arbeit mehrere Methoden zur Implementierung der Raman-Sonde in den kontinuierlichen Zweischneckengranulierprozess und so zur Aufnahme von *inline* Raman-Spektren entwickelt, da bisher keine quantitativen *inline* Methoden beschrieben waren [45]. Die Platzierung der Sonde im Prozess hat einen entscheidenden Einfluss auf die Güte der späteren Vorhersagemodelle und spielt daher eine große Rolle. In diesem Kapitel sollen Voruntersuchungen für die Implementierung und die verschiedenen Methoden zur Implementierung der Raman-Sonde in den Zweischneckengranulierprozess vorgestellt, erläutert und diskutiert werden. Während der Voruntersuchungen wurde die Eignung der Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung des ausgewählten Arzneistoffes in der Pulvermischung überprüft und ein externes Kalibriermodell erstellt.

3.1.2 Externe Kalibrierung

Viele Publikationen belegen die Eignung der Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung von Arzneistoffen in pharmazeutischen Produkten über einen großen Konzentrationsbereich [56]. Dennoch wurde die Eignung der Raman-Spektroskopie zur Gehaltsbestimmung des Arzneistoffes in der gewählten Pulvermischung zu Beginn dieser Arbeit zunächst *offline* überprüft. Dazu wurde ein externes Kalibriermodell mit *offline* aufgenommenen Raman-Spektren von verschiedenen Pulvermischungen entwickelt. Für diese Versuche wurde die MR-Sonde verwendet (siehe Kapitel 6.2.2.1). Weiter sollte das erstellte Kalibriermodell nachfolgend genutzt werden, um den Gehalt eines Granulates im Prozess mittels *inline* aufgenommener Raman-Spektren vorherzusagen. Die Nutzung eines externen Kalibriermodells für die Auswertung *inline* aufgenommener Raman-Spektren würde den

Aufwand für die Kalibrierung erheblich verringern und wäre deshalb äußerst wünschenswert. Vor der Vermessung der Pulvermischungen wurden zunächst Spektren der beiden verwendeten Stoffe, Ibuprofen und Laktose-Monohydrat, zur Identifizierung der Peaks aufgenommen (Abbildung 5). Charakteristische Ibuprofen-Peaks sind bei 415, 638, 746, 834, 959, 1008, 1182, 1208, 1576 und 1608 cm^{-1} zu erkennen, wobei die Peaks bei 834 und 1608 cm^{-1} die höchste Intensität aufweisen. Diese beiden Peaks können dem Aromaten zugeordnet werden und unterscheiden Ibuprofen damit am deutlichsten von dem Laktose-Monohydrat.

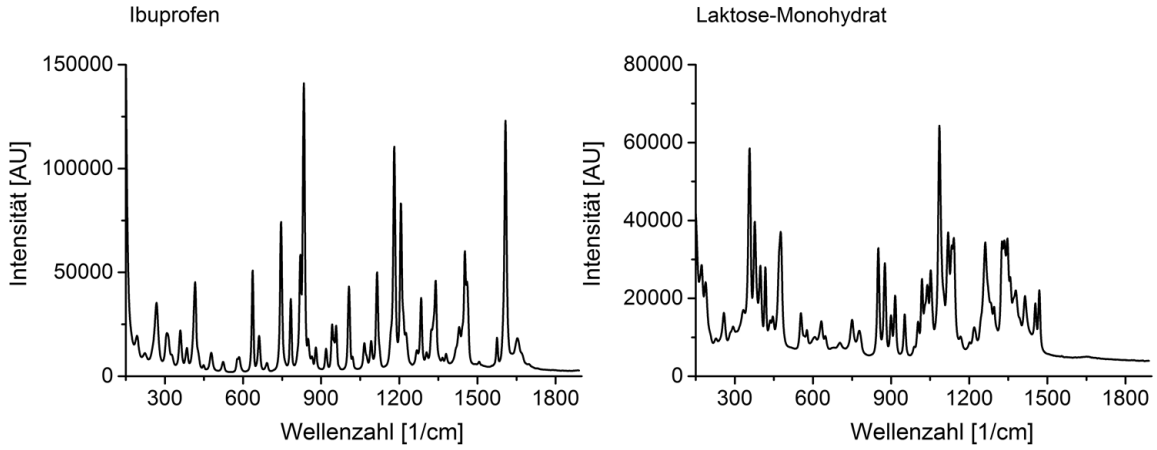

Abbildung 5: Offline aufgenommene, unbehandelte Raman-Spektren der Ausgangsstoffe Ibuprofen und Laktose-Monohydrat.

Für die Erstellung eines externen Kalibriermodells wurden Pulvermischungen mit einem Ibuprofen-Gehalt von 2,5 bis 50 % hergestellt (siehe Kapitel 6.2.1.1 Tabelle 17) und pro Pulvermischung wurden jeweils zehn Spektren an verschiedenen Stellen in der Mischung aufgenommen (Datensatz A). Es wurde somit ein großer Konzentrationsbereich abgedeckt, wodurch herausgefunden werden konnte, in welchem Bereich Konzentrationsunterschiede mittels Raman-Spektroskopie detektiert werden können, was für eine Einordnung der Sensitivität des Systems von Bedeutung war.

Anhand der aufgenommenen Raman-Spektren wurden verschiedene spektrale Filter und Datenvorbehandlungsmethoden getestet. Dabei konnte das beste Modell nach der Mittenzentrierung und der SNV-Transformation gebildet werden, welches beide gängige Methoden für die Vorbehandlung von Raman-Spektren sind (siehe Kapitel 1.5.2.3). Außerdem wurden Modelle sowohl mit den Einzelspektren, als auch mit gemittelten Spektren erstellt, wobei mit gemittelten Spektren bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die MR-Sonde nur einen Spot-Durchmesser von 2 mm hat, woraus sich eine vergleichsweise kleine vermessene Probenmenge ergibt. Dies führte

zu großen Schwankungen in den Einzelspektren, die durch eine Mittelwertbildung teilweise ausgeglichen werden konnten. Nachfolgend werden nur die Ergebnisse für die gemittelten Spektren dargestellt. Vor der Modellerstellung wurden die gemittelten Spektren zunächst genauer betrachtet.

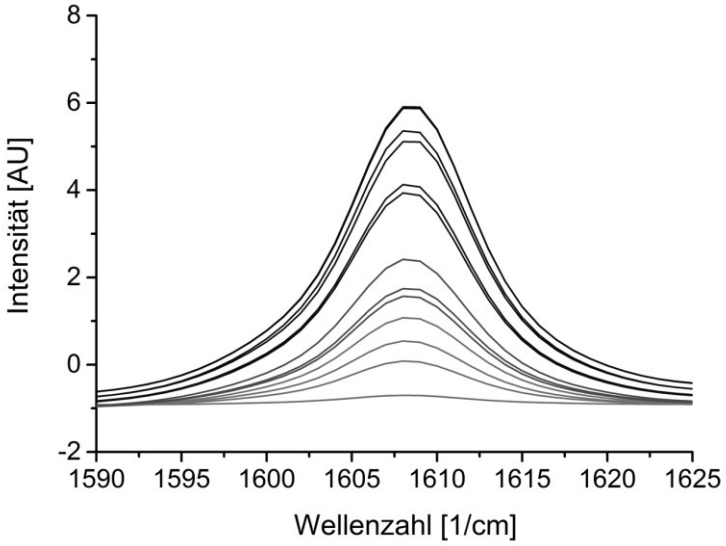

Abbildung 6: Charakteristischer Ibuprofen-Peak der standardisierten, gemittelten Spektren mit aufsteigender Konzentration von hellgrau (2,5%) zu dunkelgrau (50%).

Abbildung 6 zeigt einen charakteristischen Ibuprofen-Peak bei 1608 cm^{-1} der *offline* aufgenommenen, standardisierten und gemittelten Raman-Spektren. Die Intensität des Ibuprofen-Peaks steigt mit steigender Konzentration an, jedoch ist die Zunahme nicht für alle Konzentrationsstufen linear. Da die mathematische Beziehung zwischen der Fläche unter dem Raman-Spektrum proportional zu der Konzentration des Analyten ist, sollte auch die Intensität der Peaks linear zur Konzentration ansteigen. Somit ist hier zwar eine Unterscheidung der verschiedenen Proben gegeben, aber eine genaue Differenzierung zwischen den Konzentrationsstufen der Proben schwierig. Dennoch wurde mit den aufgenommenen und vorbearbeiteten Spektren ein PLS Kalibriermodell erstellt, indem die aufgenommenen Spektren gegen die Konzentration der Proben, berechnet aus der Einwaage, korreliert wurden. Dazu wurde der gesamte vermessene spektrale Bereich von 150 bis 1890 cm^{-1} berücksichtigt. Für das externe Kalibriermodell wurden drei Faktoren ausgewählt, da der RMSECV für drei Faktoren am niedrigsten war und weiter das Q^2 mit dem Hinzufügen eines vierten Faktors nicht signifikant verbessert werden konnte. Diese drei Faktoren beschrieben 99,4 % der Variationen in den Spektren. Das Modell zeigte ein R^2 von 0,998 und einen RMSECV von 1,47 % (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gütemaße des externen Kalibriermodells für den Datensatz A.

Anzahl Faktoren	R^2X	Eigenwert	R^2Y	Q^2	RMSECV [%]
1	0,936	12,2	0,977	0,970	2,64
2	0,992	0,726	0,980	0,973	2,49
3	***0,994***	***0,0318***	***0,998***	***0,993***	***1,47***
4	0,996	0,0233	0,999	0,993	1,58

In Abbildung 7 sind die PLS-*Scores* (a) der ersten beiden Fakoren und *Loadings* des ersten Faktors (b) dargestellt. Diese beiden Abbildungen zeigen, dass der erste Faktor die Variation in den Daten erfasste, die durch die unterschiedlichen Ibuprofen-Konzentrationen verursacht wurde. Der *Loading*-Plot zeigt negative und positive Peaks, wobei die positiven Peaks dem Spektrum von Ibuprofen und die negativen dem Laktose-Monohydrat Spektrum zugeordnet werden konnten (vergleiche Abbildung 5). Ein höherer *Score*-Wert zeigt somit eine höhere Ibuprofen-Konzentration an. Nicht alle Score-Werte sind im *Score*-Plot deutlich voneinander getrennt, was ebenfalls zeigt, dass nicht alle Konzentrationen deutlich unterschieden werden konnten.

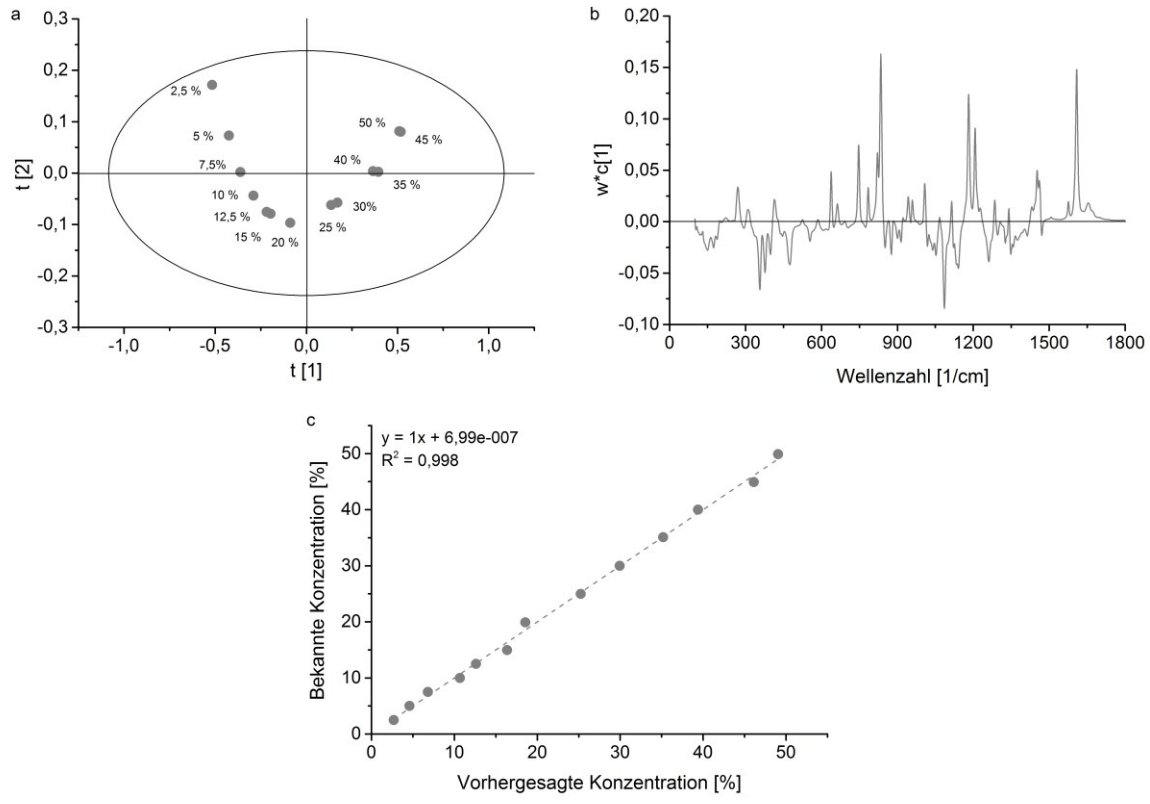

Abbildung 7: Ergebnisse des externen Kalibriermodells: (a) PLS-Scores, (b) Loadings und (c) Korrelation der bekannten gegen die vorhergesagten Konzentrationen .

Weiter zeigt Abbildung 7 c eine Korrelation zwischen den bekannten und vorhergesagten Ibuprofen-Konzentrationen. Die vorhergesagten Werte wurden dafür mittels der Kreuzvalidierung berechnet. Die Korrelation zeigt, dass die Vorhersage im mittleren Konzentrationsbereich (25 – 40 %) relativ präzise war und im Bereich der niedrigen und höheren Konzentrationen größere Schwankungen aufwies. Das Kalibriermodell war folglich nicht optimal und die Abbildung eines großen Konzentrationsbereiches in einem Modell schwierig, die Raman-Messung aber dennoch geeignet für eine Arzneistoffquantifizierung. Die nicht optimalen Ergebnisse wurden zum einem durch ein geringes vermessenes Probenvolumen und zum anderen durch die geringe Anzahl an Spektren pro Konzentrationsstufe verursacht. Rantanen et al. zeigten, dass das Probenvolumen die quantitativen Ergebnisse stark beeinflusste und durch höhere Laserspot-Durchmesser Inhomogenitäten in den Proben erheblich besser ausgeglichen werden konnten [90]. Das Modell hätte eventuell auch durch eine Eingrenzung des ausgewerteten spektralen Bereiches weiter verbessert werden können. Eine weitere Modelloptimierung hat in diesem Fall aber nicht stattgefunden, da vorerst nur gezeigt werden sollte, dass die Raman-Messung grundsätzlich zur Gehaltsbestimmung in der gewählten Pulvermischung geeignet ist und zunächst weiter überprüft werden sollte, ob eine Übertragung der Ergebnisse auf *inline* aufgenommene Daten möglich ist.

3.1.3 Inline Messung

3.1.3.1 Messung im Zweischneckengranulierer

Die externe Kalibrierung bestätigte die bereits bekannte Eignung der Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung von Arzneistoffen. Im nächsten Schritt sollte die Raman-Sonde in den Zweischneckengranulierprozess implementiert werden. Dafür wurde die MR-Sonde mittels eines speziell gefertigten Ports in das Schneckengehäuse eingebaut, sodass die Sonde einen Abstand von 1,6 mm von den Schneckenelementen hatte. Mithilfe dieses Ports konnte die Sonde in allen Zonen entlang des Schneckengehäuses implementiert werden.

Die in Versuchsreihe B *inline* aufgenommenen Raman-Spektren (Tabelle 24) waren jedoch nicht auswertbar, da sich während des Prozesses Granulat an der Sonde abgeschieden hat, was dazu führte, dass immer die gleiche Probe vermessen wurde und nicht kontinuierlich neues Material. Die Verunreinigung von Sonden im Prozessfluss ist ein bekanntes und weit verbreitetes Problem in der *inline* Prozessüberwachung. Die gängigste Lösung solch einer Verschmutzung vorzubeugen ist die Implementierung von Druckluft, die entweder kontinuierlich oder pulsartig den Sondenkopf reinigt [45].

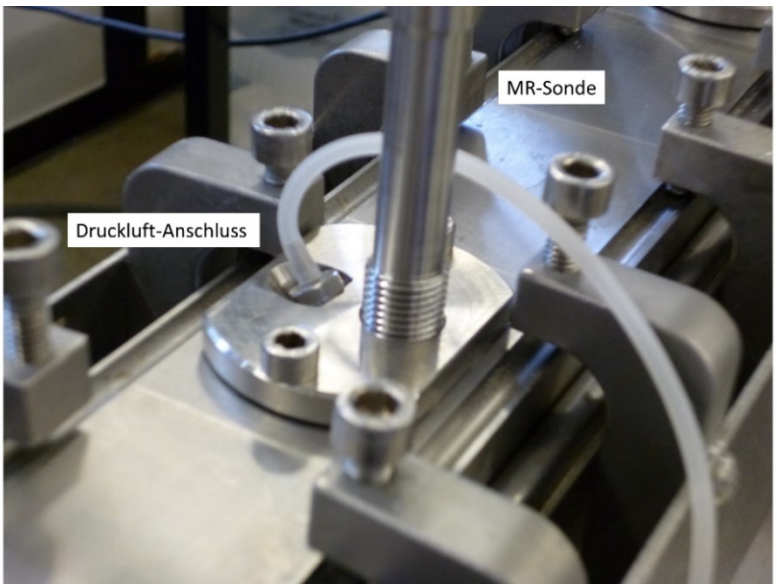

Abbildung 8: Im speziellen Port befestigte MR-Sonde mit zusätzlichem Druckluft-Anschluss.

In Versuchsreihe C wurde deshalb in den Port mit der Sonde zusätzlich ein Druckluft-Anschluss implementiert. Abbildung 8 zeigt den speziell gefertigten Port mit der Raman-Sonde und dem der Sonde gegenüberliegend angebrachten Anschluss für die Druckluft. Es wurde ein Druck zwischen 0,5 und 1 bar angelegt und bei verschiedenen Schneckendrehzahlen überprüft, ob die zugeführte Druckluft ausreichte, um die Sonde freizuhalten. Weiter wurde untersucht, ob es ausreicht die Druckluft pulsartig zuzuschalten oder ob ein kontinuierlicher Luftstrom nötig ist. Dabei hat sich gezeigt, dass ein kontinuierlicher Luftstrom nötig war, um die Sonde dauerhaft frei von Granulat zu halten, da sich nach dem Ausschalten der Druckluft sehr schnell neues Produkt vor der Sonde abgelagert hat.

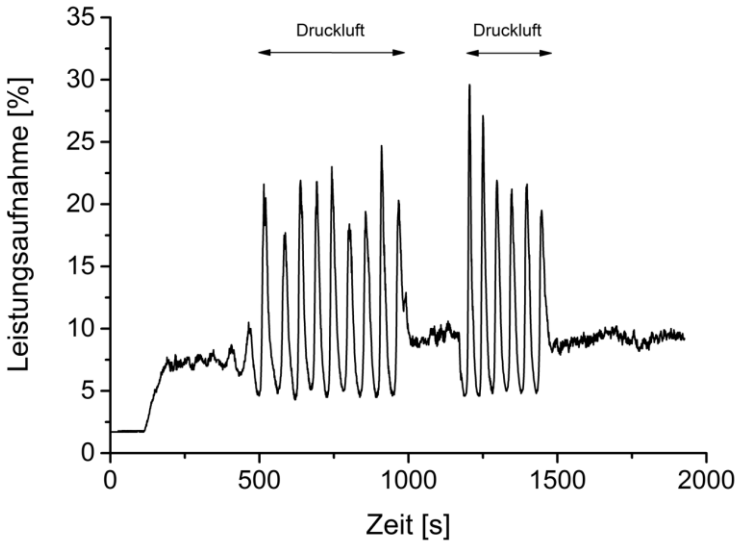

Abbildung 9: Periodische Schwankungen der Leistungsaufnahme des Granulierers bei eingeschalteter Druckluft.

Mit der kontinuierlichen Druckluft war es möglich, für Schneckendrehzahlen von 125 und 150 UpM die Sonde freizuhalten, jedoch sind durch die in den Prozess eingeleitete Luft periodische Schwankungen in der Leistungsaufnahme des Granulierers aufgetreten, wie in Abbildung 9 gezeigt.

Um die Ursache dieser periodischen Schwankungen genauer zu untersuchen, wurde eine Fourieranalyse in Microsoft Excel 2016 mit einer Abtastrate von 1 Hz durchgeführt. Überprüft wurde ein Zusammenhang mit der Schneckendrehzahl, der Pulver- und der Flüssigdosierrate. Die periodischen Schwankungen der Leistungsaufnahme mit einer Frequenz von 0,0285 s^{-1} konnten jedoch keiner anderen Frequenz im Prozess zugeordnet werden. Es war nicht möglich, einen Zusammenhang mit der Druckluft weiter zu untersuchen, da von der Druckluft keine Daten aufgezeichnet wurden. Da diese Schwankungen wie in Abbildung 9 ersichtlich jedoch nur in Zusammenhang mit der Druckluft aufgetreten sind, ist ein Zusammenhang mit der eingebrachten Druckluft wahrscheinlich.

Ein weiteres, größeres Problem war, dass in den aufgenommenen Raman-Spektren keine Signale des Arznei- oder Hilfsstoffes identifiziert werden konnten. Abbildung 10 zeigt einen Vergleich der Spektren des leeren und gefüllten Extruders mit einem *offline* aufgenommenem Spektrum der Ibuprofen-Laktose-Mischung. Dieser Vergleich zeigt, dass sich die Spektren des leeren und gefüllten Granulierers kaum unterschieden. Im gefüllten Zustand wurde lediglich das Signal des Schneckenmaterials ein wenig vermindert. Auch mit entsprechenden Datenvorbehandlungsmethoden konnten keine Signale der Mischung extrahiert werden, die für eine Modellbildung hätten genutzt werden können. Aufgrund der Druckluft wurde das Granulat vermutlich so aufgewirbelt, dass nicht genügend Material vor der Raman-Sonde war, um adäquate Spektren aufzunehmen.

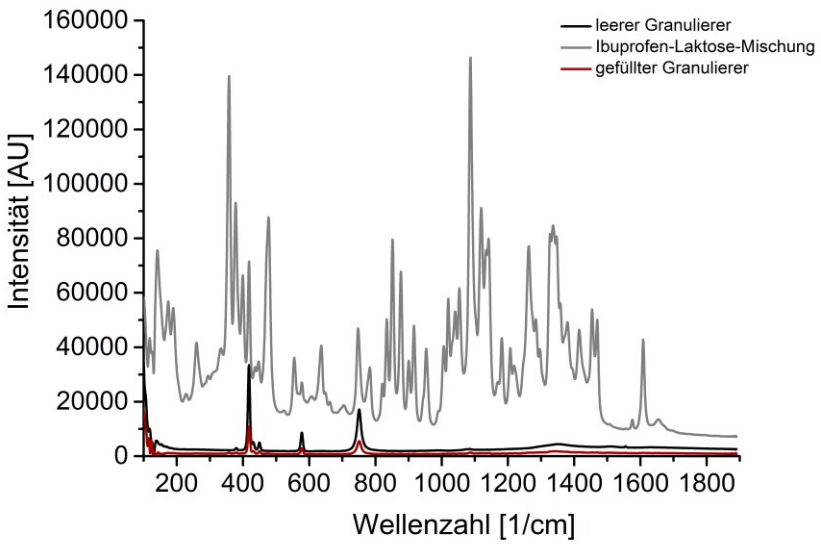

Abbildung 10: Vergleich aufgenommener Raman-Spektren des leeren und gefüllten Granulierers und der Ibuprofen-Laktose-Monohydrat-Mischung.

Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt „Placebo-Elemente“ anstatt der üblichen Schneckenelemente an der Stelle, an der die Sonde eingebaut war, verwendet. Als Placebo-Elemente wurden Teflon-Hülsen verwendet, die nur eine geringe Raman-Aktivität zeigten. Diese Elemente führten allerdings zu weiteren Schwierigkeiten im Prozess, da das Granulat an den entsprechenden Stellen nicht mehr angemessen gefördert werden konnte, was zu einer Verstopfung des Granulierers führte. Die Aufnahme von Raman-Spektren im Schneckengehäuse des Zweischneckengranulieres war somit nicht möglich, weshalb an dieser Stelle auch nicht weiter überprüft werden konnte, ob das erstellte externe Kalibriermodell zur Auswertung *inline* aufgenommener Raman-Spektren geeignet gewesen wäre, wobei von den *inline* aufgenommenen Spektren der verstopften Sonde kein richtiger Gehalt vorhergesagt werden konnte.

3.1.3.2 Messung am Auslass des Zweischneckengranulierers*

Aufgrund der im Abschnitt 3.1.3.1 beschriebenen Probleme, die eine *inline* Prozessüberwachung im Granulierer unmöglich machten, wurde die Raman-Sonde im nächsten Schritt am Auslass des Zweischneckengranulieres platziert. Dies ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

* Teile der in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse wurden in „Development of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation“ publiziert.

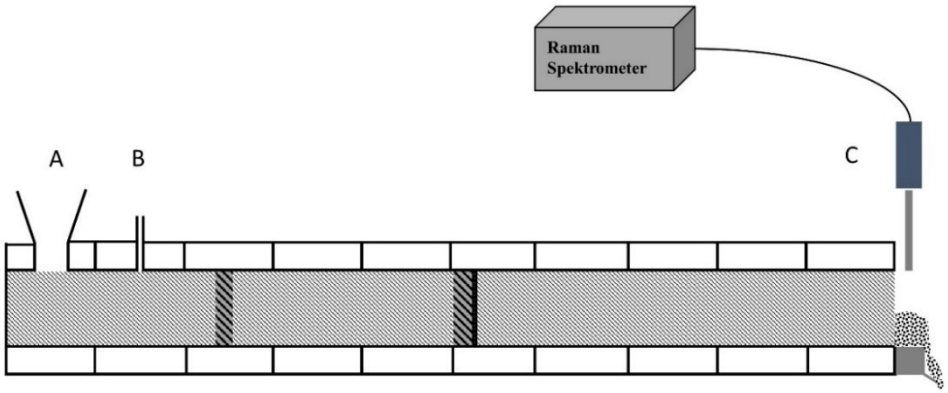

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit der Raman-Sonde am Auslass des Zweischneckengranulierers. A: Pulverdosierung B: Flüssigzugabe C: Raman-Sonde

Anstatt der MR-Sonde wurde nachfolgend die PhAT-Sonde verwendet, da diese einen größeren Laserspot-Durchmesser besitzt und somit ein größeres Probenvolumen erfasst werden konnte, was zu einer stabileren Kalibrierung führen sollte. Da der Abstand der Sonde zur Granulatoberfläche einen Einfluss auf die Intensität des aufgenommenen Raman-Spektrums hat und die Messung weiter durch Licht gestört wird, wurde eine Konstruktion für die Implementierung der Raman-Sonde benötigt, die einen reproduzierbaren Aufbau gewährleistete und möglichst lichtabschirmend war, um reproduzierbare und stabile Messungen zu garantieren.

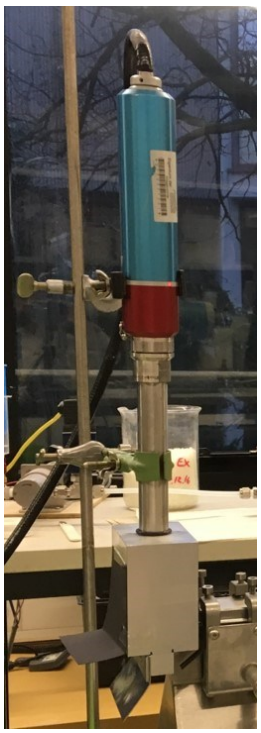

Abbildung 12: Konstruktion zur Implementierung der PhAT-Sonde in den kontinuierlichen Prozess.

Dafür wurde die in Abbildung 12 dargestellte Konstruktion entworfen und von der Feinmechanik der Universität Düsseldorf gefertigt. Die Konstruktion wurde direkt vor dem Auslass des Granulierers platziert, sodass die produzierten Granulate durch die Konstruktion und somit unter der Raman-Sonde hergeleitet wurden, bevor sie frei herausfielen. Das Granulat wurde in der Konstruktion über einen 2 cm breiten Block geleitet. Dadurch entstand ein kontinuierlicher Granulatfluss, durch den sichergestellt war, dass sich immer genügend Granulat unter der Raman-Sonde befand. Die Konstruktion war so gefertigt, dass der Laserspot der Raman-Sonde in der Mitte des Granulatflusses auf die Granulatoberfläche auftraf, um sicherzustellen, dass bewegtes Granulat vermessen wurde. Die Sonde selbst hatte dabei keinen Kontakt zum Granulat, sodass der kontinuierliche Fluss nicht beeinflusst und weiter eine Verschmutzung der Sonde vermieden wurden. Die Vorderseite der Konstruktion wurde, wie in Abbildung 12 ersichtlich, mit schwarzer Pappe abgeklebt, um einfallendes Licht weiter zu verringern. Mit diesem Messaufbau war es möglich, auswertbare *inline* Raman-Spektren des kontinuierlich produzierten Granulates aufzunehmen.

Für die Auswertung der *inline* aufgenommenen Raman-Spektren wurde zunächst ein externes Kalibriermodell aus dem aus offline Messungen bestehenden Datensatz E (Tabelle 18) erstellt. Um möglichst robuste Kalibrierungen zu erhalten, wurden fortan Einzelspektren ausgewertet. Für das Modell wurden zwei Faktoren ausgewählt, die 99,1 % der spektralen Variation beschrieben. Das Modell zeigte ein R^2 von 0,982 und einen RMSECV von 1,99 %. Eine Auswertung der *inline* aufgenommenen Raman-Spektren über das Model war jedoch nicht möglich. Schon die Intensitäten der erhaltenen Raman-Spektren für die *offline* und *inline* vermessenen Proben unterschieden sich trotz gleicher Belichtungszeiten aufgrund der unterschiedlichen Bewegungsdynamiken deutlich. Eine aufwendigere *inline* Kalibrierung konnte folglich nicht vermieden werden.

3.1.4 Bestimmung des Probenvolumens*

Die FDA legt in ihrem Entwurf einer Leitlinie zu Pulvermischungen und Einzeldosen fest, dass die vermessene Probenmasse nicht größer sein sollte als das Dreifache der Einzeldosis [41]. Für spektroskopische Methoden bedeutet dies, dass die Belichtungszeit entsprechend angepasst werden muss. In dieser Arbeit sollte zunächst nur eine Methode zur *inline* Raman-Spektroskopie entwickelt und ein konzeptioneller Beweis der Eignung der Methode erbracht werden, dennoch wurde die vermessene Probenmasse für die beiden verwendeten Modellarzneistoffe Ibuprofen und Diclofenac-Natrium annäherungsweise berechnet, da das

* Teile der in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse wurden in „Development of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation“ publiziert.

Probenvolumen auch einen großen Einfluss auf die Qualität der quantitativen Messung hat. Während einer Belichtungszeit von 5 s wurden ungefähr 170 mg Granulat vermessen, was je nach Konzentrationslevel einer Menge von 8,5 bis 85 mg Ibuprofen entsprach. Entsprechend betrug die vermessene Masse für eine Belichtungszeit von 2 s circa 70 mg in denen je nach Konzentration 3,5 bis 35 mg Diclofenac-Natrium enthalten waren. Damit war das vermessene Probenvolumen ausreichend für eine stabile Kalibrierung. Weiter lagen die vermessenen Massen deutlich unter der Einzeldosis der beiden Modellarzneistoffe und die gewählten Belichtungszeiten wären angemessen für eine Bestimmung der Gleichförmigkeit des Gehaltes.

3.2 Erstellung von inline Kalibriermodellen*

3.2.1 Einleitung

Mit dem in Kapitel 3.1.3.2 beschriebenen Versuchsaufbau wurden *inline* Raman-Spektren von Granulaten aufgenommen, die entweder Ibuprofen oder Diclofenac-Natrium als Arzneistoff enthielten. In den Versuchsreihen F1 und F2 wurde Ibuprofen als Arzneistoff verwendet und in den Versuchsreihen H1 und H2 Diclofenac-Natrium (Kapitel 6.2.1.3 Tabelle 24). Beide Arzneistoffe sind aufgrund ihrer aromatischen Gruppen stark Raman-aktiv und zeigen charakteristische, ausgeprägte Peaks. Für beide Arzneistoffe sollten im Folgenden Kalibriermodelle aus *inline* aufgenommenen Raman-Spektren erstellt werden, um zu überprüfen, ob es möglich ist eine *inline* Gehaltsbestimmung mittels Raman-Spektroskopie durchzuführen. Es wurden jeweils zwei Versuchsreihen durchgeführt (F1 und F2, H1 und H2). Die Datensätze F1 und H1 wurden zur Erstellung der PLS-Kalibriermodelle verwendet und die Datensätze F2 und H2 wurden anschließend über die erstellten Modelle vorhergesagt, um die Güte der erstellten Kalibriermodelle zu beurteilen. Für die Versuche wurde ein Konzentrationsbereich des Arzneistoffes zwischen 5 und 50 % gewählt (Kapitel 6.2.1.1 Tabelle 19 und Tabelle 20). Für eine Qualitätskontrolle wäre ein so großer Konzentrationsbereich nicht notwendig, jedoch sollte hier zunächst die prinzipielle Eignung der Raman-Spektroskopie als PAT-Werkzeug zur *inline* Gehaltsbestimmung geprüft werden. Um einen möglichst guten Überblick zu bekommen, wurde deshalb ein großer Konzentrationsbereich ausgewählt. Für Ibuprofen wurde ein weiterer Datensatz G mithilfe eines statistischen Versuchsplans aufgenommen, um die Robustheit der Methode und des erstellten Kalibriermodells zu überprüfen. Alle Raman-Messungen der nachfolgenden Ergebnisse wurden im Dunkeln durchgeführt.

3.2.2 Ibuprofen

3.2.2.1 Datenübersicht

Vor der Modellierung wurden die aufgenommenen Raman-Spektren mittels SNV-Transformation vorbehandelt, um den Einfluss unterschiedlicher Partikelgrößen in der Probe auf die Intensität des Spektrums zu eliminieren. Außerdem wurden die Daten mittenzentriert. Wie bereits in Kapitel 3.1.2 erwähnt, sind die Fläche unter dem Raman-Spektrum und die Konzentration des Analyten proportional zueinander, weshalb auch die Intensität der Arzneistoff-Peaks proportional zur Konzentration ansteigen sollte.

* Teile der in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse wurden in „Development of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation“ publiziert.

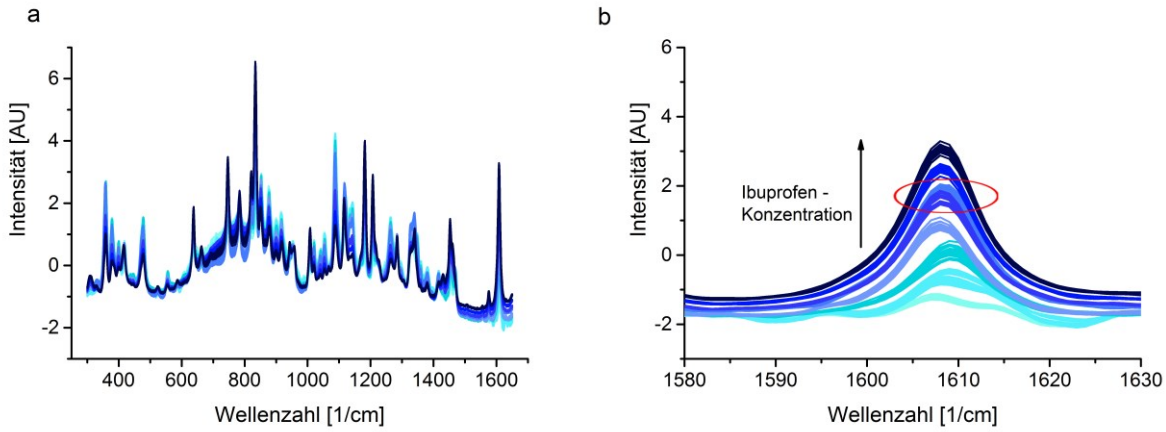

Abbildung 13:(a) Inline aufgenommene und standardisierte Raman-Spektren des Datensatzes F1. (b) Vergrößerung eines charakteristischen Ibuprofen-Peaks. Ibuprofen-Konzentrationen steigen von hellblau zu dunkelblau an.

Um zu überprüfen, ob für die *inline* aufgenommenen Raman-Spektren ein linearer Zusammenhang bestand, wurden zunächst die vorbehandelten Spektren genauer betrachtet. Abbildung 13 zeigt die vorbearbeiteten Raman-Spektren des Datensatzes F1 mit steigender Ibuprofen-Konzentration von hellblau zu dunkelblau. Die Vergrößerung eines charakteristischen Ibuprofen-Peaks bei 1608 cm^{-1} in Abbildung 13 b zeigt einen annähernd linearen Anstieg der Intensität mit steigender Ibuprofen-Konzentration mit Ausnahme der 25 und 30 % Mischung (gekennzeichnet durch den roten Kreis), was eine erfolgreiche Kalibrierung versprach. Vor der Modellierung wurde der Datensatz auf Ausreißer überprüft und die Datenpunkte der 25 % Mischung wurden vom DModX-Test als Ausreißer identifiziert. Da jedoch während der Granulation keine Probleme oder Fehler aufgetreten sind und auch in den aufgezeichneten Prozessdaten keine Veränderungen gegenüber den anderen Mischungen feststellbar waren, wurden die Datenpunkte nicht aus dem Datensatz entfernt. Weiter ist eine Verschiebung der Peak-Maxima ab den Spektren der 20 % Konzentrationsstufe zu erkennen. Diese Verschiebung wurde vermutlich durch Veränderungen im Versuchsaufbau und der Umgebung verursacht, da die Mischungen an verschiedenen Tagen granuliert wurden und die Raman-Messung sehr empfindlich auf Unterschiede in den Umgebungsbedingungen reagiert [55].

Für die Erstellung des Kalibriermodells wurde nicht der gesamte abgebildete spektrale Bereich verwendet. Zunächst wurden die Bereiche unter 300 cm^{-1} und über 1650 cm^{-1} abgeschnitten, da hier keine relevanten Peaks der untersuchten Probe mehr lagen. Weiter wurden Bereiche extrahiert, die wichtige Informationen für das Modell enthielten. Dies waren Bereiche in denen Veränderungen zu sehen waren, die durch die unterschiedlichen Arzneistoffkonzentrationen verursacht wurden. So wurde der Bereich von 300 bis 650 cm^{-1}

und von 1000 bis 1650 cm^{-1} verwendet. Der Bereich dazwischen wurde nicht in die Modellbildung einbezogen, da in diesem Bereich große Variationen in den Spektren sichtbar waren, die nicht mit der Arzneistoffkonzentration korreliert werden konnten. Jedoch konnte der Grund für diese Variationen nicht eindeutig identifiziert werden. Möglich ist auch hier ein Zusammenhang mit unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.

3.2.2.2 Erstellung eines Kalibriermodells

Für die Erstellung eines PLS Kalibriermodells wurden alle aufgenommenen und vorbearbeiteten Spektren gegen die aus der Einwaage berechneten Arzneistoffkonzentrationen korreliert. Für das Modell wurde ein Faktor gewählt, da der RMSEP für einen Faktor am niedrigsten und somit die Vorhersagegenauigkeit am größten war. Mit einem Faktor konnten 89,9 % der Variation in den spektralen Daten beschrieben werden, welche durch die unterschiedlichen Arzneistoffkonzentrationen erzeugt wurde. Dies wird vom t/u *Score*-Plot und den *Loadings* der ersten Komponente deutlich gezeigt. Der t/u-*Score*-Plot (Abbildung 14 a) zeigt eine gute Korrelation zwischen den Faktoren und der zugehörigen Zielgröße. Die *Scores* der 25 % Mischung liegen jedoch leicht abseits der Gerade, was eine Abweichung vom linearen Zusammenhang zwischen Faktoren und Zielgrößen indiziert. Diese Abweichung wurde bereits während der Auswertung der Spektren erwähnt. Die Variation in den zugehörigen Spektren konnte folglich nicht vollständig über das Modell erklärt werden. Im *Loading*-Plot (Abbildung 14 b) sind hauptsächlich positive Peaks zu erkennen, welche dem Spektrum des Ibuprofen zugeordnet werden konnten. Die negativen Peaks hingegen konnten dem Laktose-Monohydrat zugeordnet werden (vergleiche Abbildung 5). Somit werden auf der ersten Komponenten Ibuprofen und Laktose-Monohydrat voneinander getrennt.

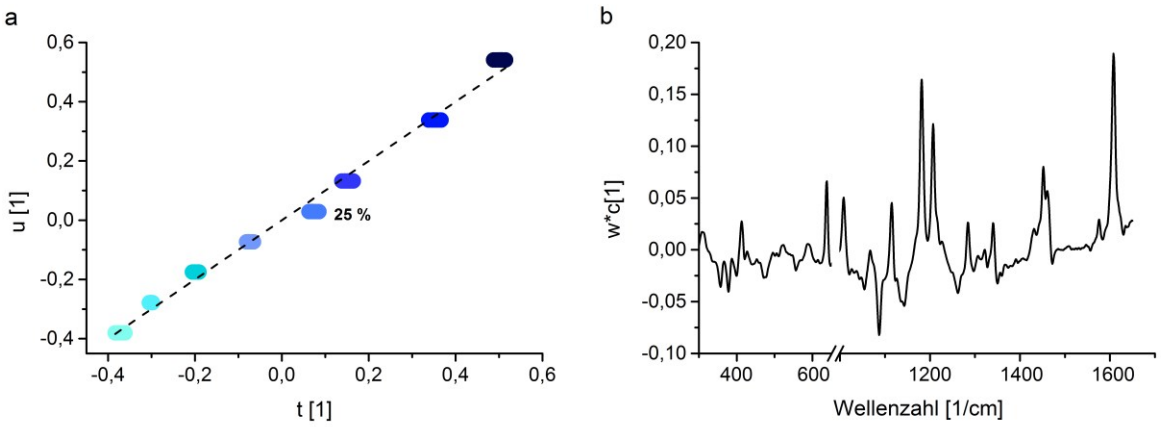

Abbildung 14: (a) PLS-Scores und (b) Loadings des ersten Faktors für den Datensatz F1.

Tabelle 2: Gütemaße des Kalibriermodells des Datensatzes F1.

Anzahl Faktoren	R^2X	Eigenwert	R^2Y	Q^2	RMSECV [%]	SEC [%]	RMSEP [%]
1	***0,899***	***150***	***0,993***	***0,993***	***1,24***	***1,25***	***0,59***
2	0,944	7,46	0,996	0,996	0,90	0,90	1,46

Das erstellte Kalibriermodell hatte einen SEC von 1,25 %, ein R^2 von 0,993 und ein Q^2 von 0,993, was den Vorgaben zur Güte von Kalibriermodellen aus spektralen Daten entsprach (Tabelle 2). Weiter wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet, die bei 4,2 und 12,5 % lagen. Der über die Kreuzvalidierung berechnete mittlerer Vorhersagefehler lag bei 1,24 %. Somit war es möglich mit den *inline* aufgenommenen Raman-Spektren ein angemessenes Kalibriermodell zu erstellen.

3.2.2.3 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells

Die Leistungsfähigkeit des erstellten Kalibriermodells wurde mit dem unabhängigen Datensatz F2 überprüft. Für den Datensatz F2 wurden Mischungen mit bekannten Ibuprofen-Konzentrationen, die sich von den für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationsstufen unterschieden (Tabelle 19), an einem anderen Tag granuliert und der Gehalt der Mischungen aus den aufgenommenen Raman-Spektren über das Kalibriermodell vorhergesagt. Die aus der Einwaage bekannten Ibuprofen-Konzentrationen wurden gegen die vorhergesagten Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 15), was eine gute Korrelation mit einem R^2 von 0,996 ergab.

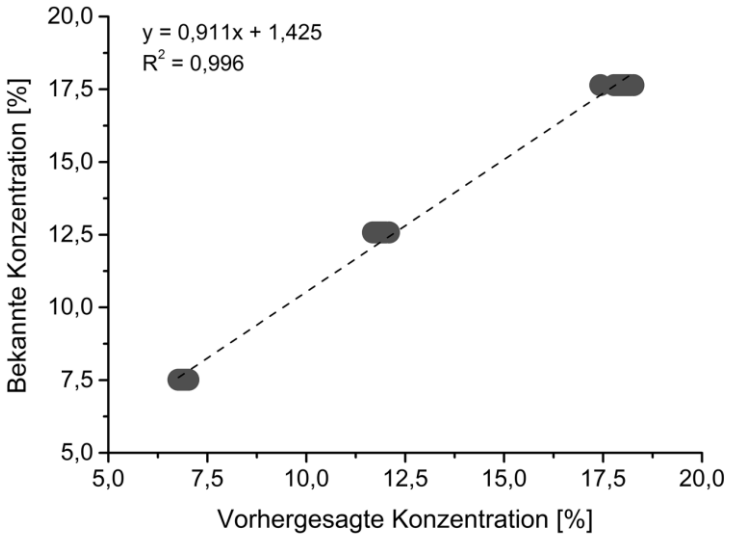

Abbildung 15: Korrelation der bekannten gegen die vorhergesagten Konzentrationen für den Datensatz F2.

Weiter hatte das Modell einen akzeptablen mittleren Vorhersagefehler von 0,59 %. Dennoch zeigte die Korrelation einen y-Achsenabschnitt von 1,4 %, was auf einen systematischen Fehler im Modell hindeutete.

Um die vorhergesagten Konzentrationen besser einordnen zu können, wurden Referenzmessungen mittels UV-Spektroskopie durchgeführt, indem die getrockneten Granulate in 0,1 M NaOH-Lösung aufgelöst wurden, und die beiden Analysenergebnisse verglichen. Die Proben für die UV-Messung wurden zu festgelegten Zeitpunkten während der Granulation gesammelt und konnten so zeitlich den einzelnen Raman-Spektren zugeordnet werden. Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass exakt die gleiche Probe vermessen wurde. Abbildung 16 zeigt eine Auftragung der aus den beiden analytischen Methoden berechneten Konzentrationen gegen die Prozesszeit.

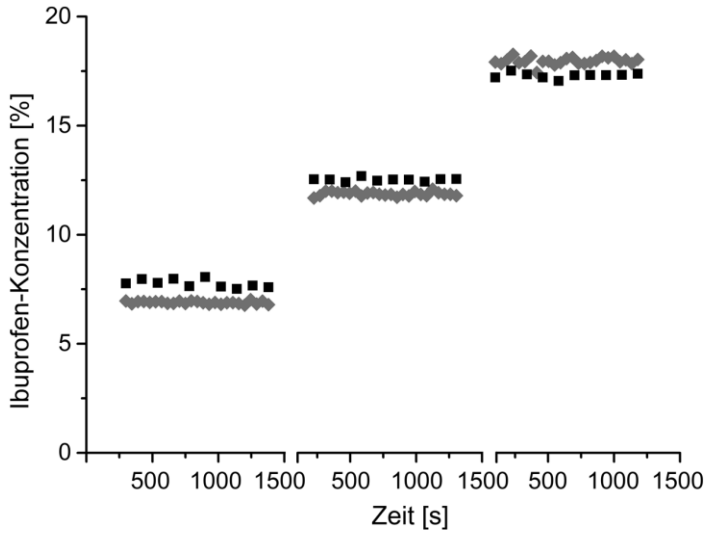

Abbildung 16: Vergleich der vorhergesagten Konzentrationen (Raman, grau) mit den Referenzwerten (UV, schwarz) in Abhängigkeit von der Prozesszeit für den Datensatz F2.

Der Vergleich mit der Referenzmessung hat gezeigt, dass die Vorhersage die Konzentrationen für die 7,5 und die 12,5 % Mischung unterschätzte und für die 17,5 % Mischung überschätzte. Dennoch war die absolute Abweichung für alle Datenpunkte kleiner als 1 % und der relative Fehler bezogen auf den Referenzwert berechnet aus der Einwaage unter 10 %. Aus Abbildung 16 wird ersichtlich, dass die Abweichung des vorhergesagten Wertes vom Referenzwert für die niedrigere Konzentration höher war als für die höheren Konzentrationen. Dies liegt vermutlich daran, dass der Raman-Effekt ein schwacher Streueffekt ist und die Sensitivität für geringere Konzentrationen deshalb nicht ausreichend ist. Für die vorgestellte Methode wurde eine Bestimmungsgrenze von 12,5 % berechnet. Dies bedeutet, dass Konzentrationen unter dieser Grenze nicht mit ausreichender Richtigkeit

und Präzision vorhergesagt werden können.

Die Raman-Spektroskopie ist somit als PAT-Werkzeug für eine *inline* Gehaltsbestimmung geeignet. Der mittlere Vorhersagefehler war mit 0,59 % annehmbar und die Abweichung der vorhergesagten Werte vom Referenzwert war ebenfalls akzeptabel. In anderen Studien wurden Vorhersagefehler in ähnlichen Größenordnungen beschrieben. So beobachteten Nagy et al. in einem kontinuierlichen Mischprozess einen RMSEP von 0,84 % [74]. Für die Schmelzextrusion wurde von Saerens et al. ebenfalls eine quantitative Methode basierend auf der Raman-Spektroskopie beschrieben, welche einen mittleren Vorhersagefehler von 0,59 % zeigte [57].

3.2.2.4 Evaluierung der Robustheit des Modells

Um die Robustheit des erstellten Kalibriermodells gegen Schwankungen in den Prozessparametern zu überprüfen, wurde ein vollfaktorieller Versuchsplan mit zwei Faktoren auf drei Stufen erstellt. Es wurden die Einflüsse des Füllgrades des Granulierers und der Schneckendrehzahl auf die Vorhersagegenauigkeit des Modells untersucht. Zur Quantifizierung der Einflüsse wurde eine relative Abweichung des vorhergesagten Wertes von einem anerkanntem Referenzwert, bestimmt mithilfe der UV-Spektroskopie, berechnet. Dafür wurden die aus der Raman- und UV-Messung erhaltenen Mittelwerte verwendet. Des Weiteren wurde die absolute Standardabweichung der über das Modell vorhergesagten Arzneistoffkonzentration berechnet. Die variierten Faktoren und zugehörigen Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3:Variierte Faktoren und resultierende Zielgrößen des 3^2 Versuchsplans (Versuch G).

Versuch	Füllgrad [g]	Schneckendrehzahl [min^{-1}]	Feuchte	Relative Abweichung [%]	Absolute Standardabweichung [%]
G1	0,134	150	0,075	-4,95	0,38
G2	0,200	150	0,075	-2,73	0,41
G3	0,267	150	0,075	-4,02	0,34
G4	0,134	300	0,075	-0,64	0,31
G5	0,200	300	0,075	-8,12	0,23
G6	0,267	300	0,075	-5,35	0,27
G7	0,134	450	0,075	-4,46	0,35
G8	0,200	450	0,075	-5,10	0,34
G9	0,267	450	0,075	-6,52	0,29
G10	0,200	300	0,075	-2,85	0,28
G11	0,200	300	0,075	-4,46	0,24
G12	0,200	300	0,075	-1,66	0,27

Es konnte keine Beziehung zwischen den Faktoren Füllgrad und Schneckendrehzahl und der Zielgröße bestimmt werden, weshalb die Auswertung für die relative Abweichung in einem schlechten Modell resultierte (Q^2 = -0,02). Die variierten Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße (Effekt-Plot siehe Anhang, Abbildung 53). Auch für die absolute Standardabweichung der Arzneistoffkonzentration konnte kein gutes Modell gebildet werden (Q^2 = 0,17). Mit Ausnahme des quadratischen Faktors der Schneckendrehzahl zeigten die variierten Faktoren keinen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße (Effekt-Plot siehe Anhang, Abbildung 53). Das erstellte Kalibriermodell war somit robust gegen Schwankungen im Füllgrad und der Schneckendrehzahl in dem variierten Bereich. Abbildung 17 zeigt einen Vergleich der vorhergesagten Werte mit den Referenzwerten und mit aus den aufgezeichneten Dosierraten der beiden Dosierer berechneten Konzentrationen (Dosierer-Daten) und bestätigt ebenfalls, dass die Vorhersage für alle Einzelversuche unabhängig von den eingestellten Prozessparametern angemessen war. Die schwarzen Pfeile zeigen den Beginn eines neuen Einzelversuches an. Die relative Abweichung der vorhergesagten Werte von den Referenzwerten war unter 10 % für alle Experimente. Jedoch ist zu erkennen, dass die vorhergesagten Konzentrationen zu Beginn

niedriger waren als am Ende des Prozesses. Dies hängt möglichweise mit der Laserleistung zusammen, die aufgrund einer zu kurzen Aufwärmphase zu Beginn noch nicht vollständig genutzt werden konnte.

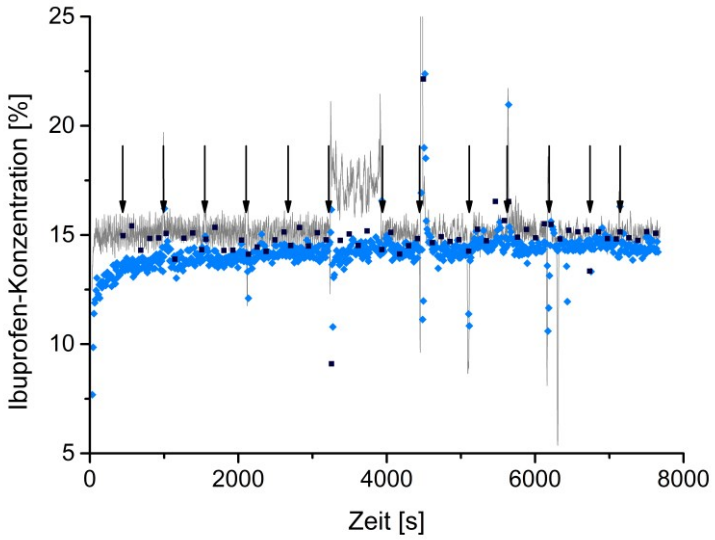

Abbildung 17: Vergleich der Ibuprofen-Konzentrationen der verschiedenen Analysenmethoden für den Datensatz G. hellblaue Raute:Raman-Messung; dunkelblaues Quadrat: UV-Messung; graue Linie: Dosierer-Daten.

3.2.3 Diclofenac-Natrium

Um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren, wurde Diclofenac-Natrium als ein zweiter Modellarzneistoff ausgewählt. Da Diclofenac-Natrium eine höhere Raman-Aktivität besitzt, musste die Belichtungszeit verkürzt werden, was zu einem geringeren vermessenen Probevolumen führte. Abbildung 18 zeigt das Spektrum des Diclofenac-Natriums. Diclofenac-Natrium zeigt charakteristische Peaks bei 441, 1046, 1578 und 1605 cm^{-1}.

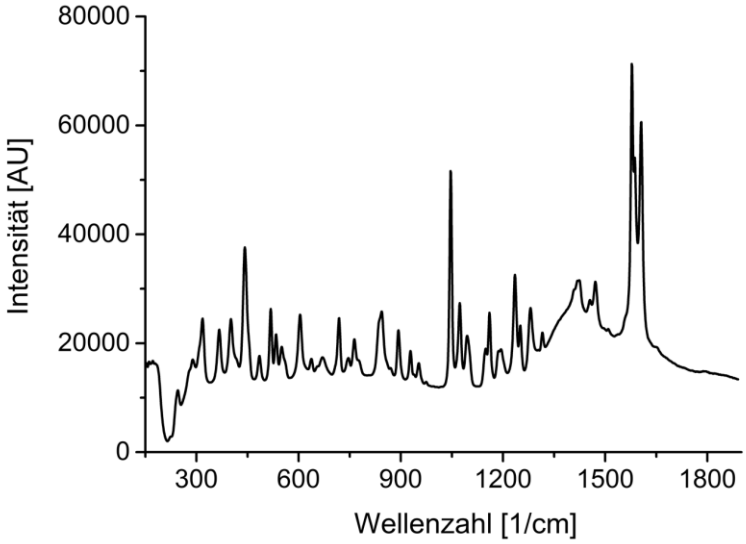

Abbildung 18: Offline aufgenommenes, unbehandeltes Raman-Spektrum des Diclofenac-Natriums.

3.2.3.1 Datenübersicht

Zunächst wurden, wie bereits für Ibuprofen beschrieben, die vorbehandelten Raman-Spektren evaluiert. Die Daten wurden auf die gleiche Weise mittels SNV-Transformation und Mittenzentrierung vorbehandelt. Abbildung 19 a zeigt die vorbehandelten, *inline* aufgenommenen Raman-Spektren für einen spektralen Bereich von 300 bis 1650 cm^{-1}. In Abbildung 19 b ist die Vergrößerung zweier charakteristischer Diclofenac-Peaks zu erkennen. Auch hier waren deutliche Unterschiede in der Intensität der Peaks in Abhängigkeit von der Arzneistoffkonzentration sichtbar, welche annähernd linear waren. Für die Erstellung des Kalibriermodells wurde der spektrale Bereich ebenfalls eingegrenzt. Es wurde der Bereich zwischen 300 und 620 cm^{-1} und zwischen 1000 und 1650 cm^{-1} verwendet. Der Bereich dazwischen wurde hier ebenfalls nicht in das Modell integriert, da in diesem Bereich offensichtlich andere Einflüsse als die Arzneistoffkonzentration die Intensität der Peaks beeinflussten. Die Bereiche unter 300 cm^{-1} und über 1650 cm^{-1} wurden entfernt, da hier keine relevanten Informationen enthalten waren.

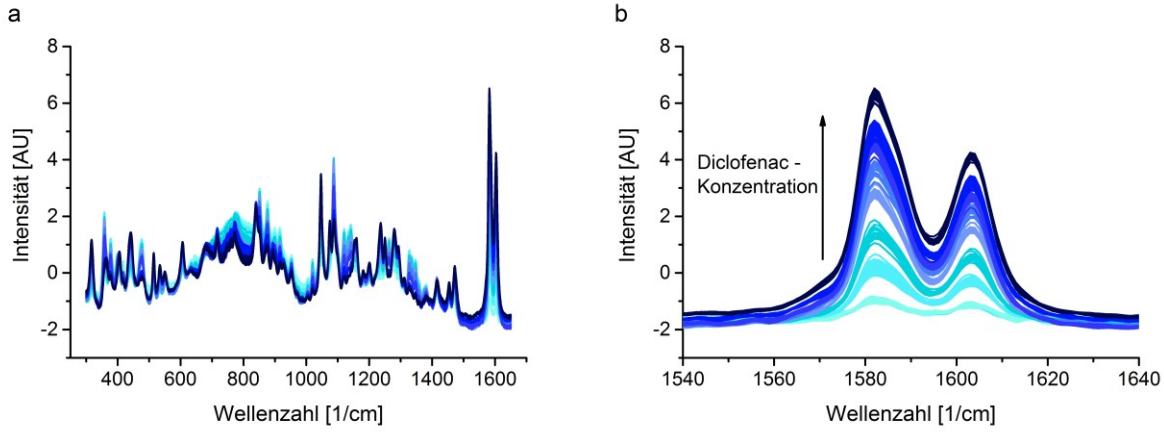

Abbildung 19: (a) Inline aufgenommene und standardisierte Raman-Spektren des Datensatzes H1. (b) Vergrößerung charakteristischer Diclofenac-Peaks. Diclofenac-Konzentrationen steigen von hellblau zu dunkelblau an.

3.2.3.2 Erstellung eines Kalibriermodells

Der ausgewählte spektrale Bereich der vorbehandelten Spektren wurde gegen die bekannten Diclofenac-Konzentrationen korreliert, um ein PLS Kalibriermodell zu erstellen. Es wurden drei Faktoren ausgewählt, da mit drei Faktoren der niedrigste mittlere Vorhersagefehler erreicht werden konnte. Somit waren hier mehr Faktoren notwendig, um die Variation in den Daten adäquat zu beschreiben, als für das Ibuprofen Kalibriermodell, für das nur ein Faktor verwendet wurde.

Tabelle 4: Gütemaße des Kalibriermodells für den Datensatz H1.

Anzahl Faktoren	R^2X	Eigenwert	R^2Y	Q^2	RMSECV [%]	SEC [%]	RMSEP [%]
1	0,922	147	0,962	0,962	2,77	2,79	2,19
2	0,980	9,32	0,988	0,988	1,58	1,59	1,92
3	***0,989***	***1,37***	***0,997***	***0,997***	***0,81***	***0,82***	***1,50***
4	0,993	0,75	0,998	0,997	0,70	0,71	2,36

Der erste Faktor beschrieb 92,2 % der Variation in den Spektren und der *Score*- und *Loading*-Plot (Abbildung 20) zeigten, dass dies die Variation in den Daten war, die durch die unterschiedlichen Konzentrationsstufen verursacht wurde. Im *Score*-Plot war eine klare Trennung zwischen den *Score*-Werten der einzelnen Mischungen erkennbar. Im *Loading*-Plot waren, wie auch für Ibuprofen beobachtet, positive und negative Peaks erkennbar, die jeweils dem Diclofenac-Natrium (vergleiche Abbildung 18) und dem Laktose-Monohydrat-Spektrum (vergleiche Abbildung 5) zugeordnet werden konnten. Somit trennte auch hier die erste Komponente Diclofenac-Natrium und Laktose-Monohydrat voneinander. Die *Loading*-Plots der anderen beiden Faktoren stellten ein Mittelwertspektrum dar und beschrieben so andere Variationen in den Daten, waren aber für eine robuste Kalibrierung dennoch notwendig. Bei betrachten des *Score*-Plots wurde außerdem deutlich, dass die *Scores* der niedrigen Konzentrationen deutlich mehr streuten und einige *Scores* der 5 % Mischung sogar außerhalb des 95 % Konfidenzintervalls lagen. Diese schlechtere Sensitivität für geringere Konzentrationen wurde bereits für Ibuprofen diskutiert.

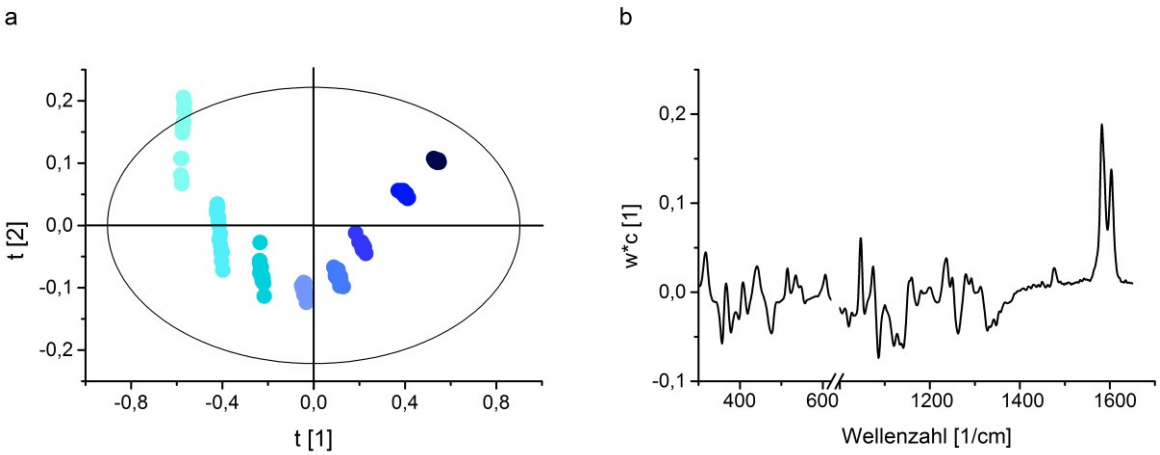

Abbildung 20: (a) PLS-Scores mit ansteigender Diclofenac-Natrium-Konzentration von hellblau zu dunkelblau und (b) Loadings des Datensatzes H1.

Das erstellte Modell hatte einen SEC von 0,82 %, ein R^2 von 0,997 und ein Q^2 von 0,997. Die Nachweisgrenze lag bei 2,7 % und die Bestimmungsgrenze bei 8,1 %. Weiter wurde über die Kreuzvalidierung ein mittlerer Vorhersagefehler von 0,81 % bestimmt (Tabelle 4). Demnach konnte auch für Diclofenac-Natrium ein Kalibriermodell mit angemessenen Fehlern erstellt werden, was die vorherigen Ergebnisse bestätigte.

3.2.3.3 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells

Mit dem Datensatz H2 wurde die Leistungsfähigkeit des Kalibriermodells überprüft. Dabei wurde wie bereits für Ibuprofen in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben vorgegangen. Die Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells resultierte in einem RMSEP von 1,5 %. Die Korrelation der bekannten Konzentrationen gegen die vorhergesagten Konzentrationen (Abbildung 21) ergab ein R^2 von 0,994 und einen y-Achsenabschnitt von 1,92 %, was auch hier auf einen systematischen Fehler hindeutete.

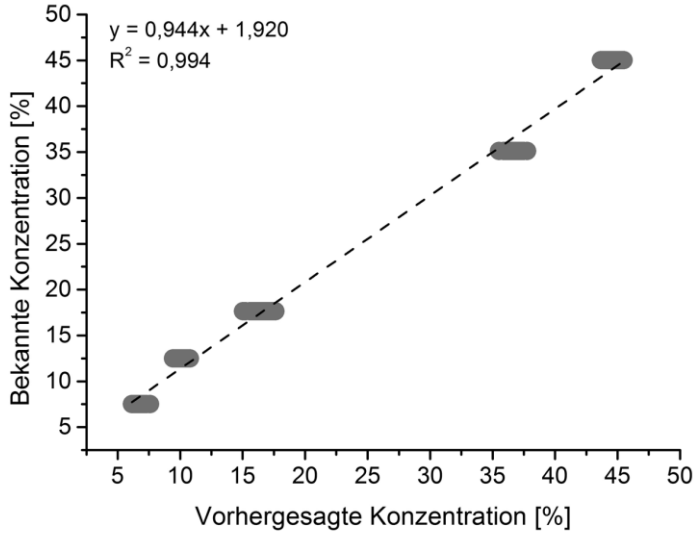

Abbildung 21: Korrelation der bekannten gegen die vorhergesagten Konzentrationen für den Datensatz H2.

Die vorhergesagten Werte wurden weiter mit Referenzwerten, die mithilfe der UV-Spektroskopie erhoben wurden, verglichen. Dazu wurden die berechneten Konzentrationen gegen die Prozesszeit der jeweiligen Probennahme aufgetragen (Abbildung 22). Der Vergleich zeigte, dass die Vorhersagegenauigkeit im unteren und oberen Konzentrationsbereich angemessen war, die vorhergesagten Konzentrationen im mittleren Konzentrationsbereich jedoch teilweise erheblich von den Referenzwerten abwichen.

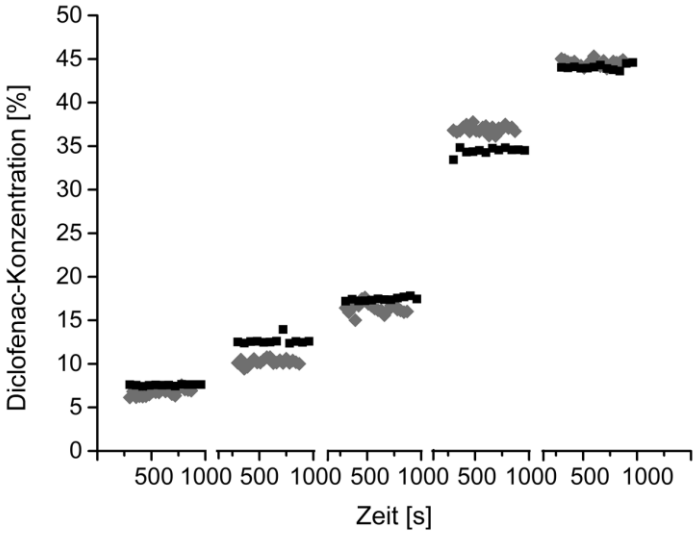

Abbildung 22: Vergleich der vorhergesagten Werte (Raman, grau) mit den Referenzmessung (UV, schwarz) in Abhängigkeit von der Prozesszeit für den Datensatz H2.

Der Gehalt der 7,5 %, 12,5 % und 17,5 % Mischung wurde unterschätzt, während der Gehalt für die 35 % Mischung überschätzt wurde und die Vorhersage für die 45 % Mischung gut mit den Referenzwerten korrelierte. Die absolute Abweichung vom Referenzwert lag für die 7,5, 17,5 und 45 % Mischung bei 1 %, für die anderen beiden Mischungen bei 2 %. Die berechneten Abweichungen waren damit größer als die für das Ibuprofen-Modell berechneten Abweichungen. Folglich waren auch die relativen Fehler größer und lagen teilweise deutlich über 10 %. Auffällig war, dass auch hier der Gehalt zunächst unterschätzt und später überschätzt wurde. Da die Konzentrationen aber immer aufsteigend von der niedrigsten zur höchsten Konzentrationsstufe vermessen wurden, um eine Verschleppung des Arzneistoffes zu vermeiden, war auch hier ein Zusammenhang mit der Laserleistung nicht auszuschließen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Vorhersagegenauigkeit des Diclofenac-Modells deutlich schlechter als die des Ibuprofen-Modells war. Der mittlere Vorhersagefehler war fast dreimal so hoch, was sich deutlich in den vorhergesagten Werten wiederspiegelte. Die schlechtere Vorhersagegenauigkeit hatte verschiedene Gründe als Ursache. Zum einen war das Probenvolumen aufgrund der kürzeren Belichtungszeit deutlich geringer (wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben). Durch das geringere Probenvolumen wurden möglicherweise Inhomogenitäten der Probe miterfasst, was zu größeren Unterschieden in den Raman-Spektren und so zu einer instabileren Kalibrierung führte. Eine instabile Kalibrierung beeinflusst nachfolgend auch die Vorhersagegenauigkeit für unabhängige Datensätze. Des Weiteren wurden die Mischungen mit unterschiedlichen Feuchten granuliert. Für die

höheren Konzentrationen wurde eine größere Menge Wasser benötigt, um angemessene Granulate zu erzeugen, da mit der Ausgangsfeuchte kein Granulat gebildet werden konnte. Weitere Versuche haben jedoch gezeigt, dass die Feuchte einen erheblichen Einfluss auf die Raman-Spektren hat (siehe 3.2.4). Die Intensität der Peaks wird beeinflusst, was Fehler in der Vorhersage erzeugt. Weiter lässt eine genaue Betrachtung der Spektren vermuten, dass das Signal für die höheren Konzentrationen bereits teilweise gesättigt war, da das Signal nicht mehr linear zur Konzentration anstieg. Auch der t/u-*Score*-Plot der ersten Hauptkomponente (Abbildung 23) bestätigt, dass die Daten einen nichtlinearen Zusammenhang zeigten. Der t/u-Plot zeigt, wie gut die X- und Y-Daten miteinander korrelieren und ein nicht-lineares Verhalten lässt sich an der kurvenförmigen Anordnung der Daten erkennen. Verschiedene Transformationen zur Linearisierung der Daten haben jedoch nicht zu einer Optimierung des Modells geführt. Möglicherweise wären nicht-lineare Modelle zur Vorhersage des Gehaltes besser geeignet gewesen. Nicht-lineare Modelle wurden an dieser Stelle jedoch nicht weiter untersucht, da die Modellbildung für eine breite Anwendbarkeit möglichst einfach gehalten werden sollte.

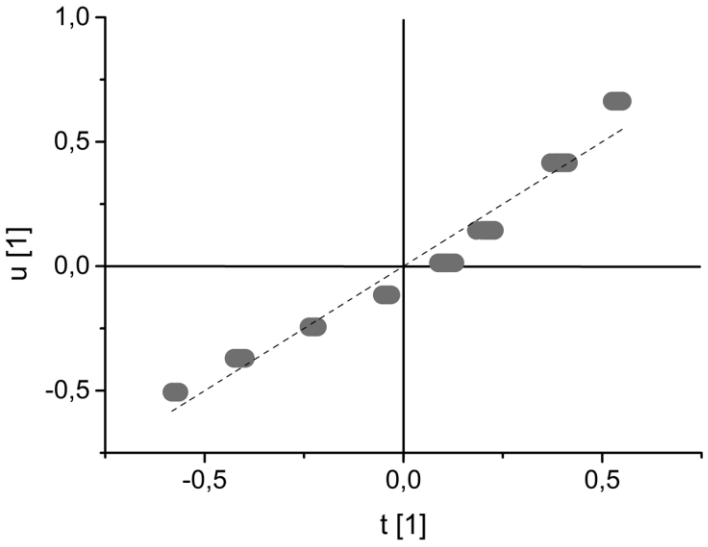

Abbildung 23: t/u-Score-Plot des ersten Faktors des Datensatzes H1.

Aus den oben genannten Gründen wurde ein zweites Kalibriermodell entwickelt, für das nur die Konzentrationen von 5 bis 25 % des Datensatzes H1 verwendet wurden, da für diese ein linearer Zusammenhang bestand. Weiter wurden diese Mischungen mit der gleichen Feuchte und am selben Tag granuliert.

Für dieses Kalibriermodell wurden zwei Faktoren gewählt, da der mittlere Vorhersagefehler für zwei Faktoren ein Minimum zeigte. Daraus ergaben sich ein SEC von 0,36 % und ein mittlerer Vorhersagefehler von 0,60 % (Tabelle 5).

Tabelle 5: Gütemaße des zweiten Kalibriermodells des Datensatzes H1.

Anzahl Faktoren	R^2X	Eigenwert	R^2Y	Q^2	RMSECV [%]	SEC [%]	RMSEP [%]
1	0,924	92,40	0,992	0,992	0,63	0,64	0,84
2	***0,976***	***5,21***	***0,997***	***0,997***	***0,36***	***0,36***	***0,60***
3	0,982	0,66	0,998	0,998	0,28	0,28	1,08

Die Korrelation der bekannten gegen die vorhergesagten Konzentrationen ergab ein R^2 von 0,998 und einen deutlich kleineren y-Achsenabschnitt von 0,82 % (Abbildung 24). Folglich war die Vorhersagegenauigkeit des zweiten Modells deutlich besser als die des ersten Modells, welches den kompletten Datensatz H1 umfasste.

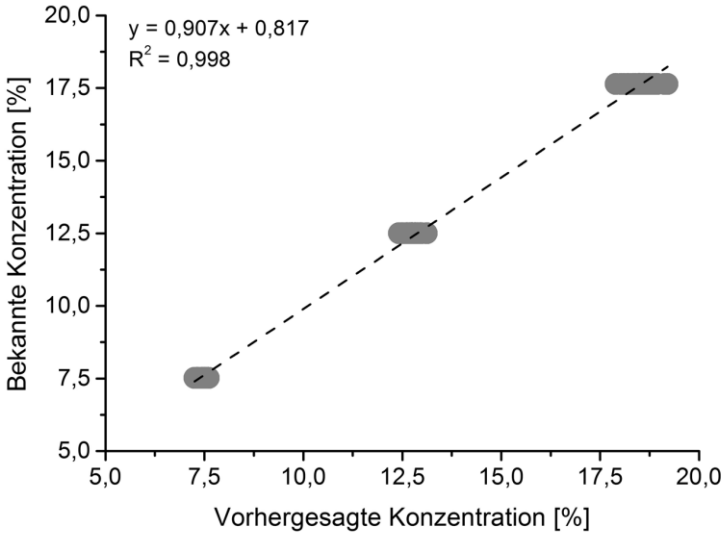

Abbildung 24: Korrelation der bekannten gegen die vorhergesagten Konzentrationen für einen Teil des Datensatzes H2.

Der Vergleich mit der Referenzmessung hat gezeigt, dass die Vorhersage im unteren Konzentrationsbereich genauer war und gut mit den Referenzwerten korrelierte, während der Gehalt der 17,5 % Mischung überschätzt wurde (Abbildung 25).

Durch die Eingrenzung des Konzentrationsbereiches konnten so Gütemaße in der gleichen Größenordnung wie für das Ibuprofen-Modell erreicht werden. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Entwicklung eines Kalibriermodells ein wichtiger Schritt ist und nicht für jede Formulierung auf die gleiche Weise durchgeführt werden kann. Abhängig von der Raman-Aktivität und der Prozesszierbarkeit der Formulierungskomponenten können unterschiedlich große Konzentrationsbereiche in einem Kalibriermodell abgebildet werden.

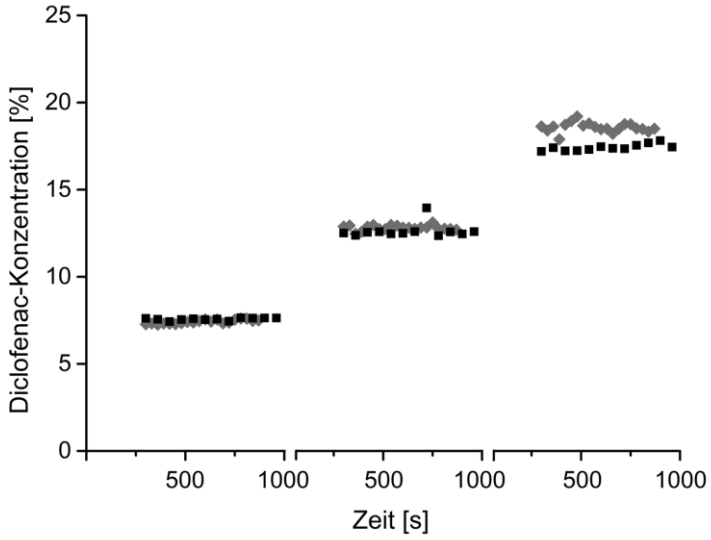

Abbildung 25: Vergleich der vorhergesagten Werte (Raman, grau) mit den Referenzwerten (UV, schwarz) in Abhängigkeit von der Prozesszeit für einen Teil des Datensatzes H2.

Die für Ibuprofen gefundenen Ergebnisse konnten dennoch mit einem zweiten Arzneistoff bestätigt werden.

3.2.4 Einfluss der Feuchte auf den vorhergesagten Gehalt

An der 10 % Mischung des Datensatzes F1 soll beispielhaft der Einfluss der Feuchte auf die Intensität der Raman-Peaks gezeigt werden. Die in Abbildung 25 gezeigten, standardisierten Spektren wurden von der gleichen Mischung bei zwei unterschiedlichen Feuchten aufgenommen. Die Intensitäten der beiden Spektren unterschieden sich deutlich, je nach der während der Granulation eingestellten Feuchte. Dabei nahm bei einer höheren Feuchte die Intensität der Laktose-Peaks deutlich mehr ab als die Intensität der Ibuprofen-Peaks. Daraus folgten auch Unterschiede im vorhergesagten Gehalt. So wurde der mittlere Gehalt bei einer höheren Feuchte um ca. 0,5 % höher vorhergesagt. Dies kann anhand veränderter Oberflächenphänomenen begründet werden, da bei einer höheren Feuchte mehr Laktose-Monohydrat in der Granulierflüssigkeit gelöst wird. Dadurch ändert sich auch der Brechungsindex der Probe, der wiederum Einfluss auf die Intensität der Raman-Banden hat [45]. Außerdem wird durch den veränderten Brechungsindex auch das vermessene Probenvolumen verändert. Ein erstelltes Kalibriermodell ist folglich immer nur für eine gegebene Feuchte gültig, wobei geringere Schwankungen der Feuchte, wie sie im Prozess auftreten können, tolerierbar sind und die Daten nur minimal beeinflussen (siehe 3.5.6).

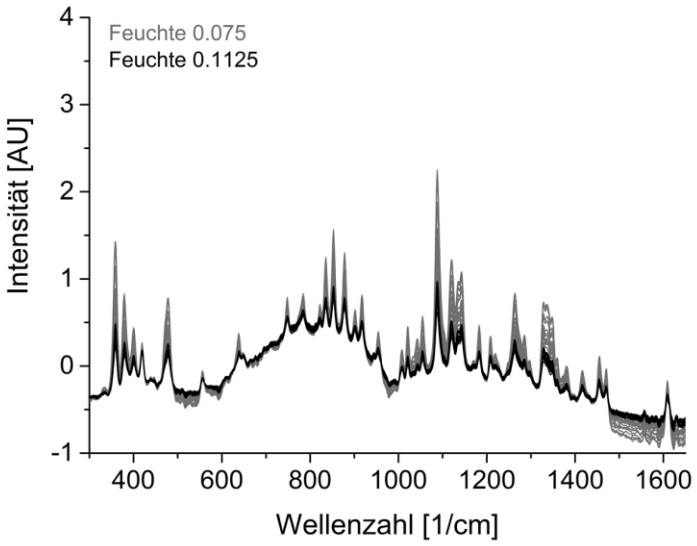

Abbildung 26: Einfluss der Feuchte auf die Intensität der Raman-Peaks.

3.2.5 Zusammenfassung

Es konnte erstmals erfolgreich eine Methode zur *inline* Gehaltsbestimmung von kontinuierlich produzierten Granulaten basierend auf der Raman-Spektroskopie entwickelt werden. Die Methode wurde für zwei Arzneistoffe überprüft und zeigte für Ibuprofen angemessene Vorhersagefehler, während für Diclofenac-Natrium eine Anpassung des kalibrierten Bereiches notwendig war, um angemessene Ergebnisse zu erzielen. Die erhaltenen mittleren Vorhersagefehler lagen in der gleichen Größenordnung wie auch in anderen Studien beobachtet. Somit war die Implementierung der Raman-Spektroskopie in den Zweischneckengranulierprozess erfolgreich. Der schwierigste Schritt war hierbei der Einbau der Sonde in den kontinuierlichen Prozess. Bei der Schmelzextrusion konnte eine Raman-Sonde direkt in der Düse am Ende des Extruders befestigt werden. So wurde die Schmelze direkt vor dem Verlassen des Extruders vermessen. Die Schmelze ist normalerweise homogen und füllt die Düse komplett aus, sodass während der Messung keine Unterschiede im Abstand zwischen Raman-Sonde und Probe entstehen. Bei der Zweischneckengranulation wird keine Düse am Ende des Granulierers verwendet, weshalb für den Einbau der Sonde eine spezielle Konstruktion angefertigt werden musste. So konnten zwar Raman-Spektren von einem konstanten Granulatfluss aufgenommen werden, aber eine gleichmäßige Oberfläche war dabei nicht gewährleistet, da das Granulat den Granulierer teilweise stoßartig verlässt. Diese Schwankungen im Messabstand verursachen Schwankungen in der Intensität der Raman-Peaks und können somit auch die quantitativen Ergebnisse beeinflussen. Es ist jedoch kaum möglich diesen Einfluss zu quantifizieren, weshalb Raman-Sonden an Stellen in den Prozess eingebaut werden sollten, in denen die

geringsten Schwankungen erwartet werden [45]. Bei der beschriebenen Anordnung sollten die Schwankungen durch die Konstruktion so gering wie möglich gehalten werden. Das Granulat wurde über einen Block geleitet, auf dem es sich nach Verlassen des Granulierers etwas aufstaute und sich dadurch immer eine weitestgehend gleichmäßige Menge auf dem Block befand. Des Weiteren reduzierte dies auch Schwankungen in der Packungsdichte des Granulates, sodass das effektive Probenvolumen annähernd gleich gewesen sein sollte. Weiter können *inline* aufgenommene Raman-Spektren durch Unterschiede in der Bewegungsdynamik beeinflusst werden [47], was ebenfalls durch einen gleichmäßigen Produktfluss minimiert werden kann. Die Konstruktion zeigte dennoch einige Schwächen. So war die Raman-Sonde nicht genügend von äußeren Lichteinflüssen abgeschirmt, was ebenfalls wieder die quantitativen Ergebnisse beeinflusst haben kann. Außerdem war es schwierig, die Konstruktion immer gleich zusammenzubauen, sodass ein reproduzierbarer Einbau der Raman-Sonde in den Prozess nicht gewährleistet war. Mit der richtigen Datenvorbehandlung war es dennoch möglich, die meisten dieser Einflüsse zu eliminieren oder wenigstens zu minimieren. Trotzdem sollte die Konstruktion hinsichtlich der Stabilität überarbeitet werden, da der Einbau der Sonde einen großen Einfluss auf die erhaltenen Raman-Spektren und die Güte der daraus erstellten Vorhersagemodelle hat.

3.3 Methodenoptimierung*

3.3.1 Optimierung des Messaufbaus

In Kapitel 3.2.5 wurden einige Defizite der entwickelten Konstruktion beschrieben. Das folgende Kapitel zeigt, wie die genannten Defizite zum größten Teil behoben wurden. Die Konstruktion wurde hinsichtlich der Stabilität und Abdunkelung optimiert, um die Vorhersagegenauigkeit zu erhöhen. Weiter sollte eine Messung bei Licht ermöglicht werden, da es bisher nur möglich war Raman-Messungen im Dunkeln durchzuführen, was den Anwendungskomfort erheblich eingeschränkt hat. Um die Stabilität zu erhöhen, wurde der Boden der Konstruktion vergrößert. Weiter konnten der Boden und der Aufsatz für die Befestigung der Sonde nun mittels Schrauben fest miteinander verbunden werden. Damit wurde sichergestellt, dass die Sonde immer exakt gleich eingebaut war, was die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse erhöhte. Weiter wurde der Einbauwinkel von 90° auf 60° geändert, um das Streulicht zu minimieren und so das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Die Innenwände der Konstruktion wurden außerdem mattschwarz lackiert, um Lichtreflexionen im Inneren der Messkammer zu vermindern. Um die Abdunkelung zu erhöhen, wurde die Konstruktion komplett geschlossen mit Ausnahme einer kleinen Öffnung, durch die die Granulate herausfallen konnten.

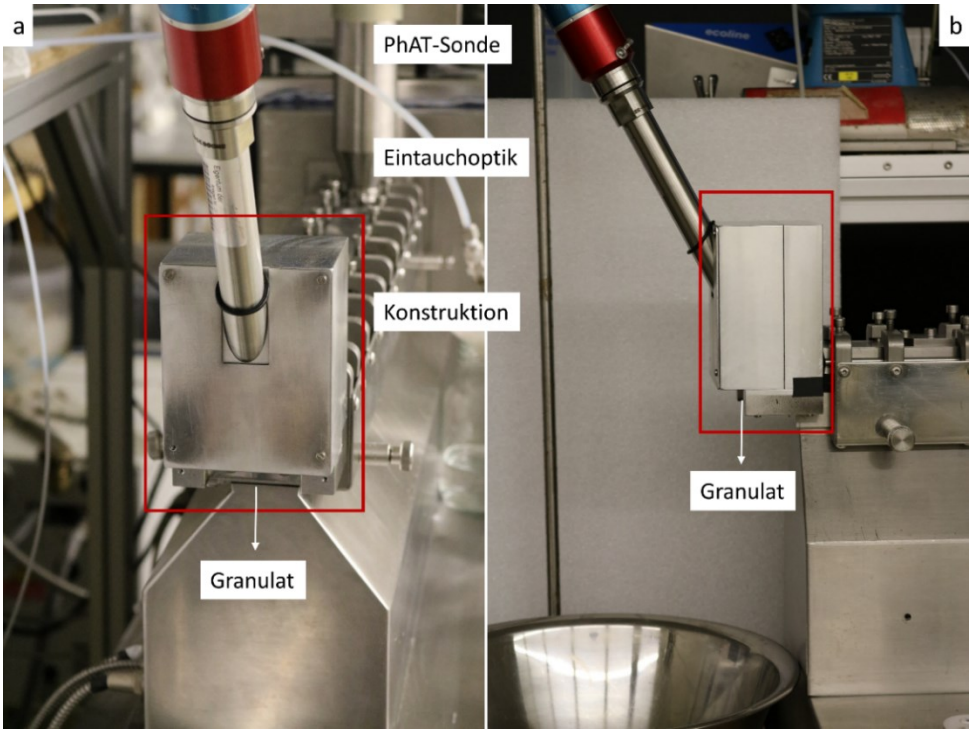

Abbildung 27: Optimierte Konstruktion zur Befestigung der Raman-Sonde am Auslass des Granulierers (a) in frontaler Ansicht und (b) von der Seite.

* Teile der in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse wurden in „Optimisation of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation and its application for process characterisation“ publiziert.

Die optimierte Konstruktion ist in Abbildung 27 in frontaler Ansicht (a) und in Seitenansicht (b) dargestellt. Mit dieser optimierten Konstruktion wurden zwei neue Kalibriermodelle mit Diclofenac-Natrium als Modellarzneistoff erstellt. Für das erste Modell (Datensatz I1 und I2) wurden die Raman-Messungen, wie bisher, im Dunkeln durchgeführt und für das zweite Modell (Datensatz J1 und J2) bei eingeschaltetem Raumlicht (Licht der Leuchtstoffröhren). Damit sollte überprüft werden, ob es möglich ist auch mit bei Raumlicht aufgenommenen Raman-Spektren Modelle zu erstellen. Das langfristige Ziel ist es die Raman-Spektroskopie als PAT-Werkzeug in eine vollständige kontinuierliche Fertigungslinie einzubauen, wo ein kompletter Lichtausschluss schwer realisierbar sein könnte. Die Datensätze I1 und J1 wurden zur Erstellung der PLS Kalibriermodelle verwendet, im Folgenden bezeichnet als dunkles und helles Modell, und die Datensätze I2 und J2 wurden anschließend vorhergesagt. Die beiden Modelle wurden nachfolgend mit dem zweiten in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Modell verglichen. In diesem Teil wurden nur Mischungen mit Konzentrationen von 5 bis 25 % Diclofenac-Natrium vermessen (Kapitel 6.2.1.1 Tabelle 21), da für höhere Konzentrationen eine höhere Feuchte zum Granulieren notwendig war und dies einen erheblichen Einfluss auf die Raman-Spektren hatte, wie in Kapitel 3.2.4 bereits diskutiert wurde.

3.3.2 Messungen im Dunkeln

3.3.2.1 Datenübersicht

Abbildung 28 zeigt die *inline* aufgenommenen und vorbehandelten Raman-Spektren der Kalibrierproben des Datensatzes I1. Alle Spektren wurden SNV transformiert und mittenzentriert.

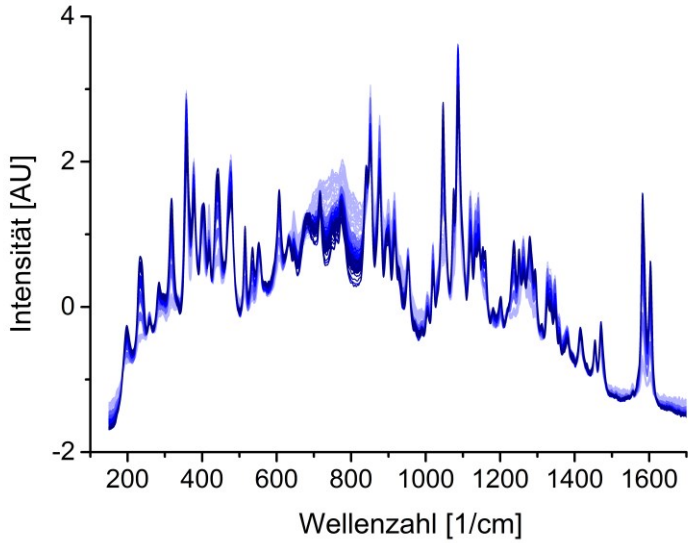

Abbildung 28: Inline aufgenommene und standardisierte Raman-Spektren des Datensatzes I1. Diclofenac-Natrium-Konzentrationen steigen von hellblau zu dunkelblau an.

Es war ein linearer Anstieg der charakteristischen Diclofenac-Peaks bei 1046 cm^{-1} und von 1578 bis 1605 cm^{-1} zu erkennen, was eine erfolgreiche Modellbildung versprach. Für die Modellbildung wurde auch hier der spektrale Bereich zwischen 620 und 1000 cm^{-1} ausgelassen, da in diesem Bereich wieder große Variationen in den Spektren sichtbar waren, die nicht mit der Arzneistoffkonzentration korreliert werden konnten. Zusätzlich wurde ein Peak bei 420 cm^{-1} entfernt, da dieser durch den Hintergrund verursacht wurde. Im Vergleich mit den vorher aufgenommenen Raman-Spektren fiel auf, dass sich die Intensitätsverhältnisse der Banden verändert hatten. Dies hing wahrscheinlich mit der Änderung des Einbauwinkels zusammen.

3.3.2.2 Erstellung eines Kalibriermodells

Bei der Erstellung des PLS Modells wurde genauso vorgegangen, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben.

Tabelle 6: Gütemaße des Kalibriermodells des Datensatzes I1.

Anzahl Faktoren	**R^2X**	**R^2Y**	**Q^2**	**RMSEC [%]**	**SEC [%]**	**RMSEP [%]**
1	0,890	0,997	0,997	0,37	0,38	0,35
2	***0,975***	***0,998***	***0,998***	***0,34***	***0,34***	***0,31***
3	0,983	0,998	0,998	0,31	0,31	0,42

Für das Modell wurden zwei Faktoren ausgewählt, da das Q^2 durch Hinzufügen eines dritten Faktors nicht signifikant verbessert werden konnte und auch der RMSEP für zwei Faktoren am niedrigsten war. Das erstellte Modell hatte einen SEC von 0,34 %, ein R^2 von 0,998 und ein Q^2 von 0,998. Die berechneten Gütemaße (Tabelle 6) waren somit mit den Gütemaßen des ersten Modells vergleichbar. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen bei 1,1 und 3,4 %. Diese Grenzen lagen somit ebenfalls in der gleichen Größenordnung.

3.3.2.3 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells

Um die Leistungsfähigkeit des Modells zu beurteilen, wurden die Konzentrationen für den Datensatz I2 vorhergesagt.

Vor den Versuchen wurden ab diesem Zeitpunkt immer in einer statischen Messung Testspektren der gleichen Probe aufgenommen (Abbildung 29), um zu bestimmen wie sich die Signalintensität an verschiedenen Versuchstagen verhält. In den vorangegangenen Versuchen wurden tagesabhängige Schwankungen beobachtet, weshalb ab diesem Zeitpunkt

kontrolliert wurde, ob die Schwankungen durch den Prozess oder durch die Raman-Messung selbst ausgelöst wurden.

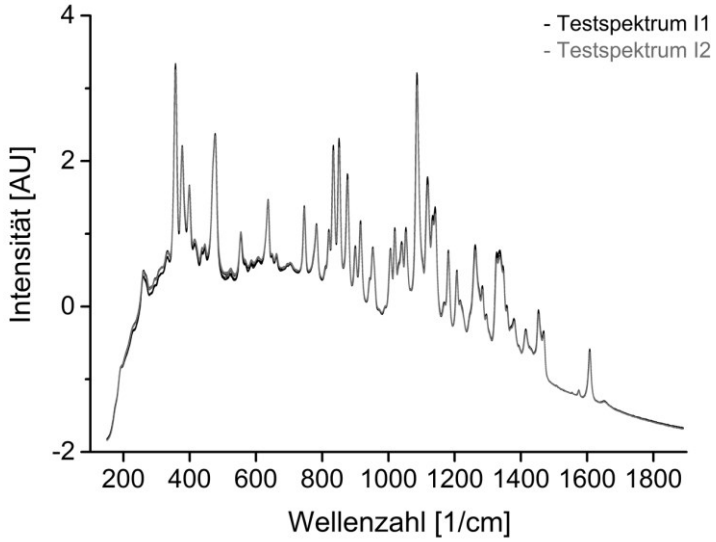

Abbildung 29: Testspektren der Versuche I1 und I2

Der Vergleich der Spektren zeigt, dass die Intensität sich an den unterschiedlichen Versuchstagen leicht unterschied. Folglich zeigt die Raman-Messung, wie vermutet, eine Tagesabhängigkeit. Der Unterschied an den charakteristischen Diclofenac-Peaks war jedoch marginal und sollte die Vorhersage deshalb nicht signifikant beeinflussen.

In Abbildung 30 sind die bekannten gegen die über das Modell vorhergesagten Konzentrationen für den Datensatz I2 aufgetragen.

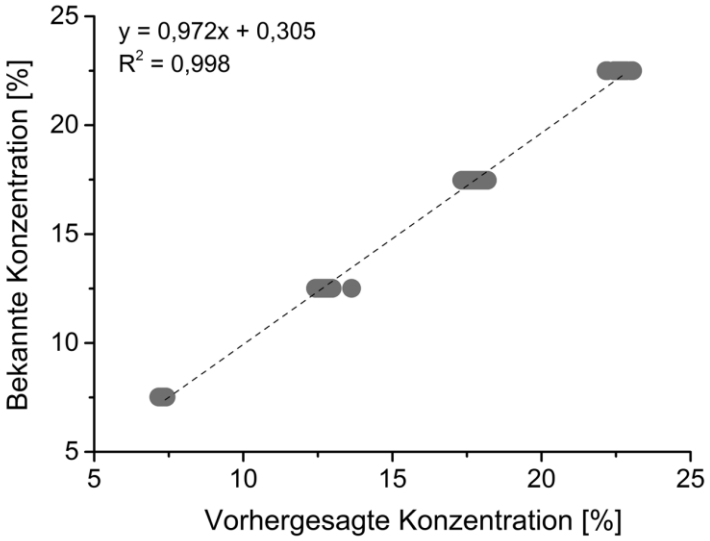

Abbildung 30: Korrelation der bekannten gegen die vorhergesagten Konzentrationen für den Datensatz I2.

Die Abbildung zeigt eine gute Korrelation zwischen den Konzentrationen, es wurde ein R^2 von 0,998 erreicht. Weiter lagen die Steigung nahe eins und der y-Achsenabschnitt bei 0,305 %. Der y-Achsenabschnitt konnte folglich deutlich verringert werden, für das erste Modell lag er bei 0,817 %. Das deutete bereits daraufhin, dass die Vorhersagegenauigkeit verbessert werden konnte und somit lag der mittlere Vorhersagefehler mit 0,31 % deutlich unter dem vorherigen Fehler von 0,60 %. Die vorhergesagten Werte wurden für eine bessere Einschätzung ebenfalls mit Referenzwerten, erhalten über die UV-Spektroskopie, verglichen. Dafür wurden die über die beiden Analysemethoden erhaltenen Konzentrationen gegen die Prozesszeit aufgetragen (Abbildung 31). Der Vergleich zeigt, dass die vorhergesagten Werte gut mit den Referenzwerten korrelieren, was die gute Vorhersagegenauigkeit des Modells weiter unterstreicht. Für die 7,5 % Mischung wurde der Gehalt vom Kalibriermodell leicht unterschätzt und für die 17,5 % Mischung leicht überschätzt. Die absolute Abweichung war, mit einer Ausnahme, für alle Datenpunkte unter 0,8 % und der relative Fehler, ebenfalls mit einer Ausnahme, kleiner als 5 %. Folglich konnte die Vorhersagegenauigkeit, vor allem im unteren Konzentrationsbereich, stark verbessert werden.

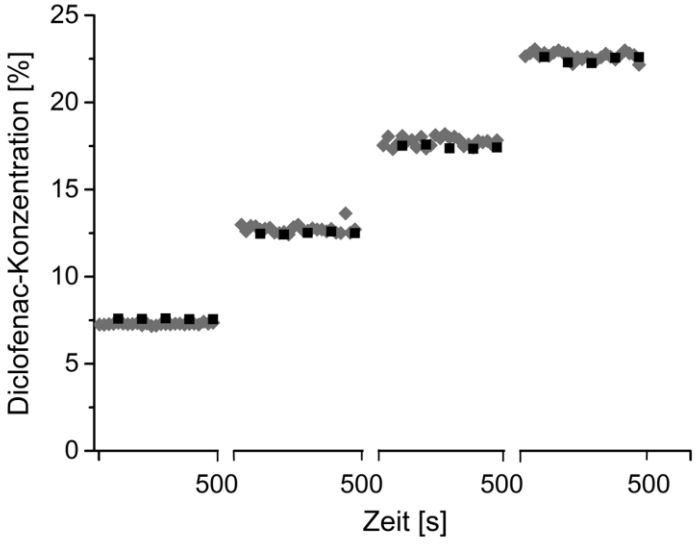

Abbildung 31: Vergleich der vorhergesagten Werte (Raman, grau) mit den Referenzwerten (UV, schwarz)in Abhängigkeit von der Prozesszeit für den Datensatz I2.

3.3.3 Messungen bei Raumlicht

3.3.3.1 Datenübersicht

Für den Datensatz J1 wurden die gleichen Messungen bei eingeschaltetem Raumlicht (Licht der Leuchtstoffröhren) nochmals wiederholt. Auch hier wurden zunächst die vorbearbeiteten Spektren genauer betrachtet. In den aufgenommenen Raman-Spektren waren zusätzliche

Peaks erkennbar (Abbildung 32, mit roten Pfeilen gekennzeichnet). Um diese Peaks zuordnen zu können, wurde ein Spektrum des Hintergrundes aufgenommen und mit Spektrallinien verschiedener Materialien verglichen [91]. Die gekennzeichneten Peaks konnten auf diese Weise Argon und Krypton zugeordnet werden, welche in den verwendeten Kaltlichtröhren enthalten sind. Somit war es nicht möglich die Raman-Sonde komplett von einfallendem Licht abzuschirmen. Jedoch war es auch nicht möglich, die Konstruktion weiter zu verschließen, da die Granulate die Konstruktion sonst nicht hätten durchlaufen können. Die Peaks des Argons und Kryptons bei 418 cm^{-1}, 535 cm^{-1}, 644 cm^{-1}, 694 cm^{-1}, 1350 cm^{-1} und 1544 cm^{-1} wurden deshalb vor der Modellbildung entfernt, ebenso der spektrale Bereich von 620 bis 1000 cm^{-1}. Außerdem wurden die Bereiche unter 300 cm^{-1} und über 1650 cm^{-1} nicht in die Auswertung miteinbezogen.

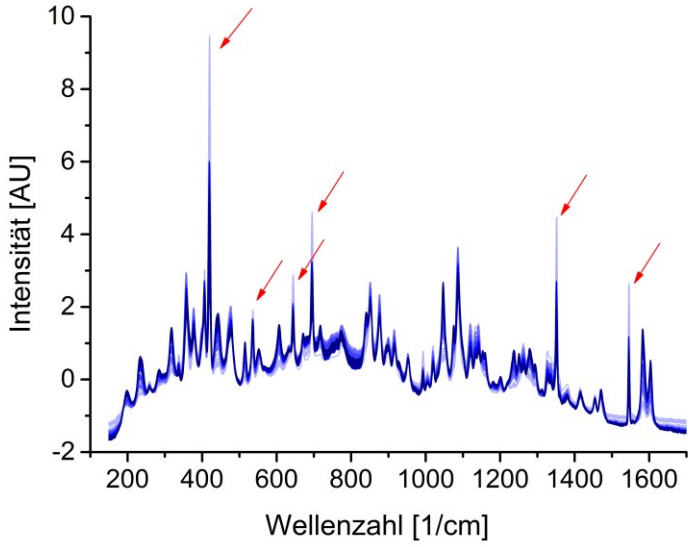

Abbildung 32: Inline aufgenommene und standardisierte Spektren des Datensatzes J1. Diclofenac-Natrium-Konzentrationen steigen von hellblau zu dunkelblau an.

3.3.3.2 Erstellung eines Kalibriermodells

Für die Erstellung des Kalibriermodells wurde in diesem Fall nur ein Faktor benötigt, der 92,3 % der Variation in den Spektren beschrieb und Diclofenac-Natrium und Laktose-Monohydrat voneinander trennte.

Tabelle 7: Gütemaße des Kalibriermodells des Datensatzes J1.

Anzahl Faktoren	R^2X	R^2Y	Q^2	RMSEC [%]	SEC [%]	RMSEP [%]
1	**0,923**	**0,998**	**0,998**	**0,30**	**0,31**	**0,29**
2	0,957	0,999	0,998	0,27	0,27	0,35

Auch hier lagen die Gütemaße in derselben Größenordnung (Tabelle 7) wie die Gütemaße des ersten Kalibriermodells. Das Modell hatte einen SEC von 0,31 %, ein R^2 von 0,998 und ein Q^2 von 0,998. Weiter wurden eine Nachweis- und Bestimmungsgrenze von 1,0 und 3,0 % ermittelt.

Wurden die Peaks des Lichtes vor der Erstellung des Modells nicht entfernt, waren drei Faktoren notwendig, um die Variabilität in den Daten zu beschreiben und das Modell hatte einen höheren SEC von 0,49 %. Durch das einfallende Licht wurden folglich größere Variationen in den Daten erzeugt, die sich nicht-linear verhielten und die Vorhersage der Konzentration störend beeinflussten.

3.3.3.3 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells

Die Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells resultierte in einem mittleren Vorhersagefehler von 0,29 %. Die Peaks des Lichtes konnten somit ohne weiteren Einfluss auf die Vorhersagegenauigkeit aus dem Modell ausgeschlossen werden.

Die Korrelation der bekannten und vorhergesagten Konzentrationen (Abbildung 33) war auch hier gut, die Steigung war nahe eins und der y-Achsenabschnitt mit 0,120 % sogar kleiner als der des dunklen Modells.

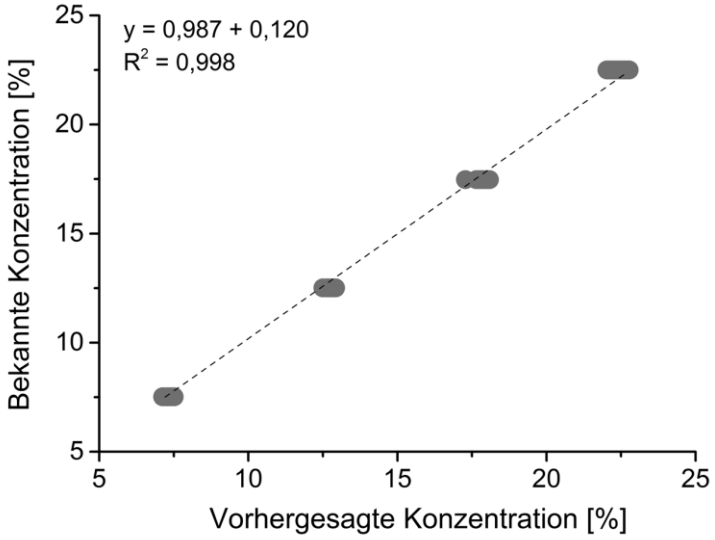

Abbildung 33: Korrelation der bekannten gegen die vorhergesagten Konzentrationen für den Datensatz J2.

Die gute Vorhersagegenauigkeit konnte ebenfalls mit der Referenzmessung belegt werden. Für den Vergleich mit den Referenzwerten wurden die jeweiligen Analysenergebnisse gegen die Prozesszeit aufgetragen (Abbildung 34).

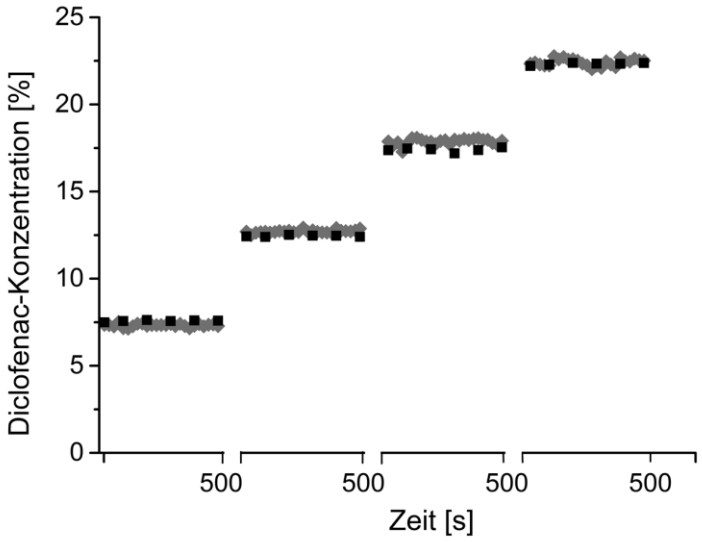

Abbildung 34: Vergleich der vorhergesagten Konzentrationen (Raman, grau) mit den Referenzwerten (UV, schwarz) in Abhängigkeit von der Prozesszeit für den Datensatz J2.

Es wurde lediglich der Gehalt für die 17,5 % Mischung leicht überschätzt. Die absoluten Abweichungen der vorhergesagten Konzentrationen von den Referenzwerten waren für alle Datenpunkte unter 0,7 % und der relative Fehler lag unter 6 %, was die gute Vorhersagegenauigkeit belegte.

3.3.4 Messungen bei Tageslicht

Eine Messung bei Tageslicht war aufgrund von negativen Peaks im gesamten spektralen Bereich, wie in Abbildung 35 ersichtlich, nicht möglich. Es konnten keine relevanten Bereiche für eine Modellbildung extrahiert werden.

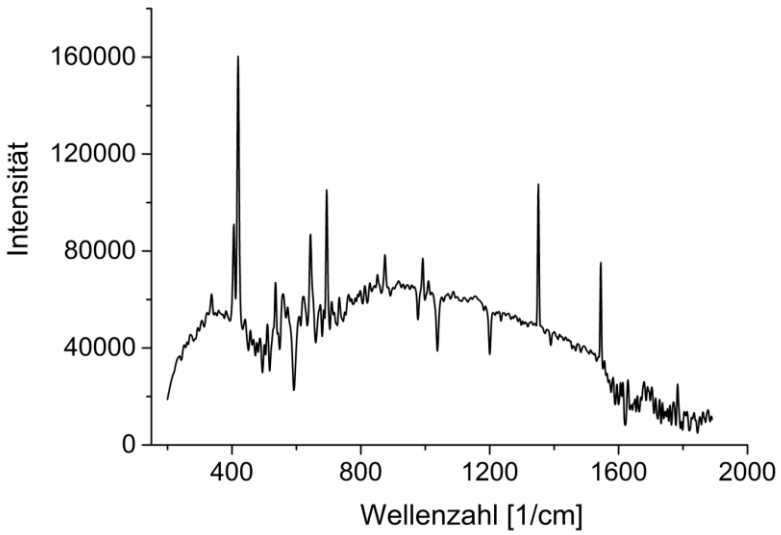

Abbildung 35: Bei Tageslicht in der Konstruktion aufgenommenes Raman-Spektrum eines 10 %igen Diclofenac-Granulates.

3.3.5 Zusammenfassung

Durch die Optimierung des Versuchsaufbaus zur Implementierung der Raman-Sonde konnten Kalibriermodelle für eine *inline* Arzneistoffquantifizierung mit einer deutlich verbesserten Vorhersagegenauigkeit erstellt werden. Es war außerdem möglich, Raman-Spektren bei Raumlicht aufzunehmen und auszuwerten, ohne dass dies die Vorhersagegenauigkeit beeinträchtigte. Dies ist vorteilhaft für die Implementierung der Raman-Spektroskopie als PAT-Werkzeug in einen kontinuierlichen Prozess, da nicht auf absolute Dunkelheit geachtet werden muss, was das Prozessdesign erheblich erleichtert und so eine breitere Anwendbarkeit erlaubt. Diese Versuche haben weiter gezeigt, dass die Art des Einbaus der Raman-Sonde in den Prozess maßgeblich für die Güte der nachfolgenden Kalibrierung ist. Es ist allgemein bekannt, dass der Einbau von Messinstrumenten in den Prozess eine große Herausforderung darstellt. Hier konnte die Konstruktion zum Einbau der Raman-Sonde durch mehrere Veränderungen erfolgreich optimiert werden.

3.4 Modellerstellung für eine pharmazeutische Zubereitung

3.4.1 Einleitung

Die bisher dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass die Raman-Spektroskopie erfolgreich zur *inline* Gehaltsbestimmung während der kontinuierlichen Granulation einer binären Mischung eingesetzt werden konnte. Damit wurde die prinzipielle Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie für diesen Zweck belegt. Pharmazeutische Formulierungen bestehen jedoch in der Regel nicht nur aus zwei Komponenten. Um die gewünschten Tabletten-, Zerfalls- und Freisetzungseigenschaften zu erzielen, werden verschiedene Hilfsstoffe benötigt. Für einfache nicht überzogene Tabletten werden neben einem Füllmittel in den meisten Fällen zumindest ein Bindemittel und ein Zerfallshilfsmittel benötigt, um Tabletten zu erzeugen, die eine angemessene Härte zeigen, gleichzeitig aber innerhalb von 15 min in Wasser zerfallen [92].

Mehrere Studien belegen bereits die Eignung der Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung von Arzneistoffen in Tabletten, wobei die Tabletten in einigen Fällen auch aus mehreren Komponenten zusammengesetzt waren [66, 69, 93]. Im Folgenden sollte auch für die entwickelte Methode überprüft werden, ob der Arzneistoff im Granulat ohne einen Verlust der Vorhersagegenauigkeit quantifiziert werden kann, wenn er in eine Matrix aus mehreren Hilfsstoffen eingebettet ist. Dafür wurden Mischungen hergestellt, die neben dem Arzneistoff Diclofenac-Natrium und dem Füllmittel Laktose-Monohydrat noch HPMC als Bindemittel und Natrium-Stärkeglykolat als Zerfallshilfsmittel enthielten. Diese Mischungen wurden mit den gleichen Prozesseinstellungen wie bisher granuliert und *inline* Raman-Spektren am Ende des Granulieres aufgenommen (Kapitel 6.2.1.1 Tabelle 22, Kapitel 6.2.1.3 Tabelle 24). Es wurden die Versuchsreihen L1, L2, M1 und M2 durchgeführt, wobei die Datensätze L1 und M1 zur Erstellung der PLS Kalibriermodelle verwendet wurden und die Datensätze L2 und M2 anschließend vorhergesagt wurden. Die Versuche L1 und L2 fanden im Dunkeln statt und M1 und M2 bei eingeschaltetem Raumlicht.

3.4.2 Auswahl der Formulierungsbestandteile

Für die Auswahl des Binde- und Zerfallshilfsmittels wurden *offline* Raman-Spektren verschiedener Hilfsstoffe aufgenommen (Abbildung 36). Die ausgewählten Hilfsstoffe zeigten alle mehr oder weniger ausgeprägte, charakteristische Peaks. Für die Formulierung wurden Na-Stärkeglykolat als Zerfallshilfsmittel und HPMC als Bindemittel ausgewählt, da diese die am stärksten ausgeprägten Peaks zeigten und somit ein eindeutiges Raman-Signal hatten. So konnte überprüft werden, ob die Signale der Hilfsstoffe in der Formulierung die

Signale des Diclofenac-Natriums überlagern und so die Vorhersage des Gehaltes beeinflussen. Die beiden Hilfsstoffe wurden in üblichen in der Literatur beschriebenen Konzentration eingesetzt. So betrug der Anteil des Na-Stärkeglykolats in der Mischung 5 % und der des HPMCs 3 % [92].

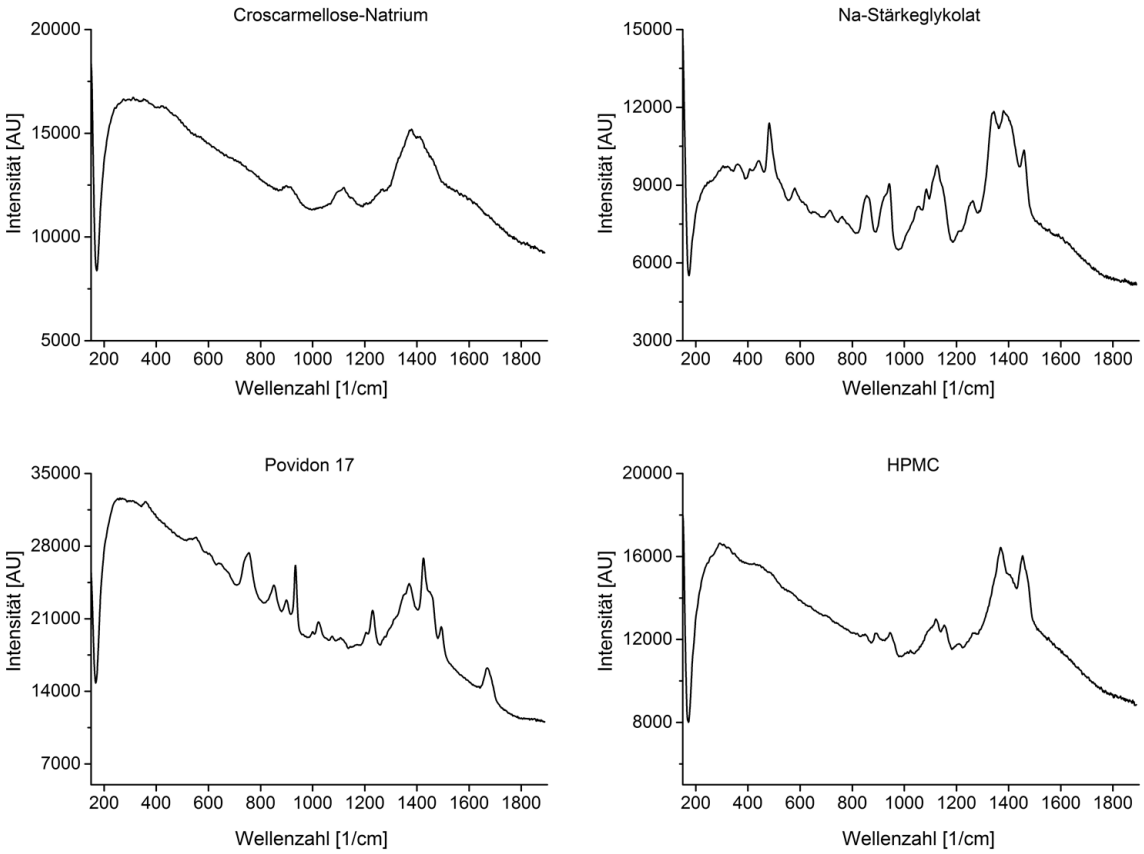

Abbildung 36: Offline aufgenommene Raman-Spektren verschiedener Hilfsstoffe.

3.4.3 Datenübersicht

Zunächst wurden die aufgenommenen und standardisierten Spektren der Kalibrierproben des Datensatzes L1 aufgetragen (Abbildung 37) und mit den Spektren des Datensatzes I1 verglichen (Abbildung 28).

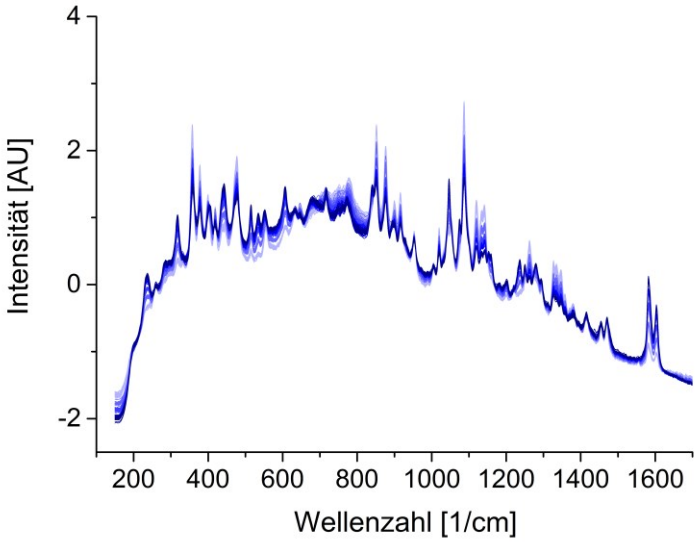

Abbildung 37: Inline aufgenommene und standardisierte Spektren des Datensatzes L1 mit aufsteigender Diclofenac-Natrium-Konzentration von hellblau zu dunkelblau.

Der Vergleich hat gezeigt, dass die Peaks der Hilfsstoffe im Raman-Spektrum nicht zu identifizieren waren. Dies lag vermutlich daran, dass die eingesetzten Konzentrationen gering waren und die Stoffe dadurch nicht sichtbar detektiert werden konnten. Trotzdem war ein Unterschied zwischen den Spektren zu erkennen. So war die Basislinie leicht verschoben und die Intensität der Diclofenac-Peaks war deutlich geringer. Die übrigen Matrixbestandteile schienen folglich trotzdem einen Einfluss auf das Spektrum zu haben. Die Vergrößerung eines charakteristischen Diclofenac-Peaks (Abbildung 38) zeigt ebenfalls, dass die Spektren der verschiedenen Mischungen sich in ihrer Intensität zwar deutlich unterschieden, die Intensitätsunterschiede aber sehr viel geringer im Vergleich zu vorherigen Messungen waren. Dennoch stieg die Intensität linear zur Konzentration an. Damit waren die Vorrausetzungen für eine erfolgreiche Kalibrierung erfüllt. Für die bei Raumlicht aufgenommenen Spektren wurden die gleichen Beobachtungen gemacht. Vor der Erstellung der Modelle wurde der spektrale Bereich eingegrenzt, wie bereits für die vorherigen Versuche beschrieben. Für die Auswertung der im Dunkeln aufgenommenen Spektren wurde der Bereich von 300 bis 620 cm^{-1} und von 1000 bis 1650 cm^{-1} verwendet. Weiter wurde ein Peak, der durch den Hintergrund verursacht wurde, bei 420 cm^{-1} herausgenommen. Für die im hellen aufgenommenen Spektren wurden zusätzlich die durch das Licht der Leuchtstoffröhren verursachten Peaks vor der Auswertung entfernt.

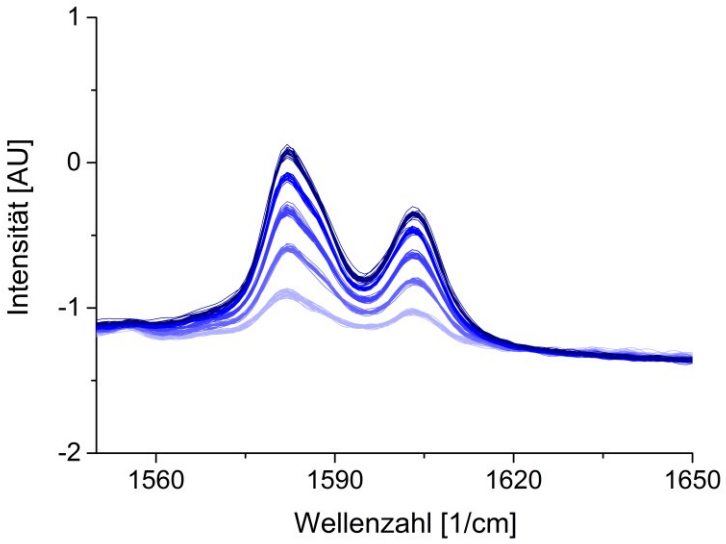

Abbildung 38: Vergrößerung charakteristischer Diclofenac-Natrium-Peaks mit ansteigender Konzentration von hellblau zu dunkelblau.

3.4.4 Erstellung eines Kalibriermodells

Die *inline* aufgenommenen und vorbehandelten Raman-Spektren wurden gegen die aus der Einwaage berechneten Arzneistoffkonzentrationen korreliert, um ein PLS Modell zu erstellen. Für das dunkle Modell wurden zwei Faktoren ausgewählt, die 97,5 % der spektralen Variation beschrieben. Das Modell hatte einen SEC von 0,33 %, ein R^2 von 0,998 und ein Q^2 von 0,998 (Tabelle 8).

Tabelle 8: Gütemaße des Kalibriermodells des Datensatzes L1.

Anzahl Faktoren	**R^2X**	**R^2Y**	**Q^2**	**RMSEC [%]**	**SEC [%]**	**RMSEP [%]**
1	0,969	0,983	0,983	0,92	0,92	1,18
2	***0,975***	***0,998***	***0,998***	***0,33***	***0,33***	***0,34***
3	0,978	0,999	0,999	0,18	0,20	0,48

Für das helle Kalibriermodell wurden in diesem Fall drei Faktoren benötigt, um die Daten angemessen beschreiben zu können und eine robuste Vorhersage zu gewährleisten. Die drei Faktoren beschrieben 97,1 % der spektralen Variation und das Modell hatte einen SEC von 0,23 %, ein R^2 von 0,999 und ein Q^2 von 0,999 (Tabelle 9).

Tabelle 9: Gütemaße des Kalibriermodells des Datensatzes M1.

Anzahl Faktoren	R^2X	R^2Y	Q^2	RMSEC [%]	SEC [%]	RMSEP [%]
1	0,959	0,986	0,986	0,83	0,84	0,86
2	0,967	0,995	0,995	0,49	0,51	0,37
3	***0,971***	***0,999***	***0,999***	***0,23***	***0,23***	***0,34***
4	0,977	0,999	0,999	0,16	0,21	0,17

Die Gütemaße lagen mit den drei Faktoren folglich in derselben Größenordnung wie zuvor, um die Variationen in den Spektren der binären Mischung zu beschreiben war jedoch nur ein Faktor nötig. Demnach schienen die Spektren mehr Informationen zu enthalten, die nicht von der ersten Komponente erfasst wurden. Der *Loading*-Plot des ersten Faktors zeigte positive und negative Peaks, wie auch für die anderen Modelle beschrieben. Damit erfolgte auf der ersten Komponente die Auftrennung von Diclofenac-Natrium und den übrigen Hilfsstoffen. Die *Loading*-Plots der anderen Komponenten zeigten überwiegend Rauschen, aber ebenfalls einige positive und negative Peaks, die dem Diclofenac-Natrium oder dem Laktose-Monohydrat zugeordnet werden konnten. Da der RMSEP aber für drei Komponenten deutlich besser war, schien diese Information für die Robustheit des Modells wichtig zu sein. Ein vierter Faktor wurde trotz des noch kleineren mittleren Vorhersagefehlers nicht hinzugefügt, da das Q^2 mit einer vierten Komponente nicht weiter signifikant verbessert wurde.

Der Einfluss des Lichtes konnte auch in diesem Fall ohne Verlust der Güte des Modells herausgerechnet werden.

Die erhaltenen Gütemaße zeigten weiter, dass für eine pharmazeutische Formulierung ebenfalls Kalibriermodelle erstellt werden konnten und die übrigen Matrixbestandteile soweit keine störenden Einflüsse zeigten.

3.4.5 Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Modelle wurden die unabhängigen Datensätze L2 und M2 verwendet.

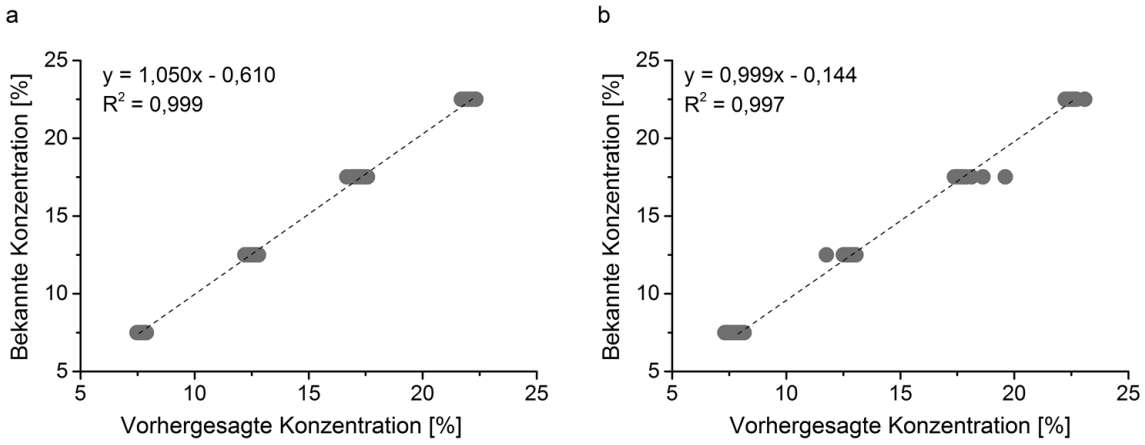

Abbildung 39: Korrelation der bekannten gegen die vorhergesagten Konzentrationen (a) für den Datensatz L2 und (b) für den Datensatz M2.

Die Korrelation der bekannten gegen die über das Modell vorhergesagten Konzentrationen war auch für die pharmazeutische Zubereitung gut. Für das dunkle Model ergab sich ein R^2 von 0,999 und für das helle Modell von 0,997. Für das dunkle Modell wurde jedoch ein größerer y-Achsenabschnitt von 0,610 beobachtet (Abbildung 39 a). Nichtsdestotrotz wurden die guten Vorhersagegenauigkeiten der Modelle auch hier durch die Referenzmessung belegt. Wie in Abbildung 40 gezeigt, korrelierten die vorhergesagten Konzentrationen beider Modelle gut mit den über die Referenzmessung erhaltenen Konzentrationen. Lediglich für die 22,5 % Mischung wurde der Gehalt von dem dunklen Modell leicht unterschätzt. Die absolute Abweichung lag für alle Datenpunkte unter 0,85 %, wobei die Abweichung für die 17,5 % Mischung am geringsten war. Der relative Fehler war für alle Datenpunkte unter 5 %. Von dem hellen Modell wurden Einzelwerte überschätzt, sodass der Fehler für diese Punkte größer als 5 % war, für alle übrigen Datenpunkte aber auch darunter lag. Mit Ausnahme der erwähnten Datenpunkte lag auch hier die absolute Abweichung unter 0,7 %. Für die erwähnten abweichenden Datenpunkte konnte keine Ursache in den aufgezeichneten Prozessdaten gefunden werden. Weiter wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für beide Modelle berechnet. Für das dunkle Modell wurde eine Nachweisgrenze von 1,1 % und eine Bestimmungsgrenze von 3,3 % gefunden. Für das helle Modell lag die Nachweisgrenze bei 0,8 % und die Bestimmungsgrenze bei 2,3 %.

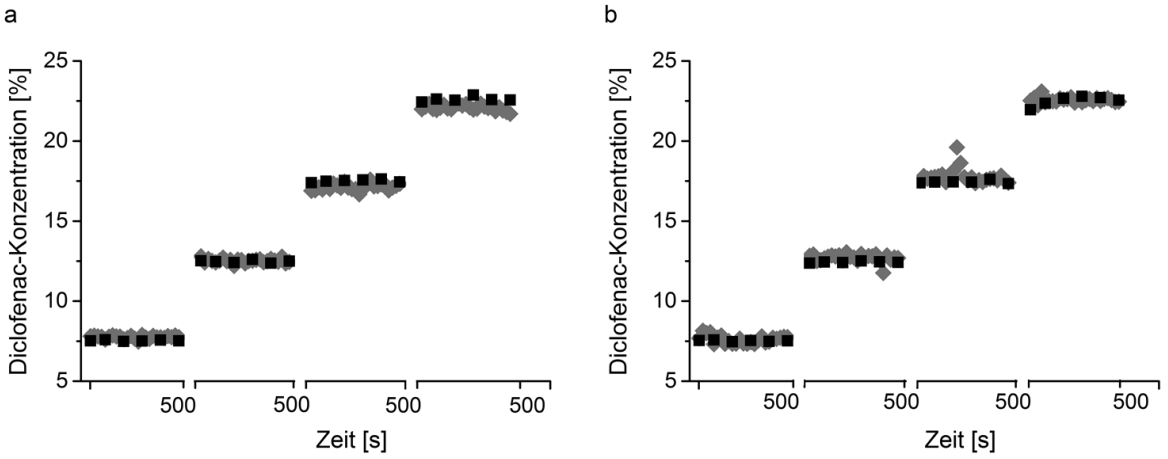

Abbildung 40: Vergleich der vorhergsagten Konzentrationen (Raman, grau) mit den Referenzwerten (UV, Schwarz) in Abhängigkeit von der Prozesszeit (a) für den Datensatz L2 und (b) für den Datensatz M2.

Die *offline* an den verschiedenen Versuchstagen aufgenommenen Testspektren (Abbildung 41) zeigten auch hier geringe Unterschiede in der Intensität der Peaks. Somit ist ein Fehler durch die Durchführung der Versuche an unterschiedlichen Tagen nicht auszuschließen.

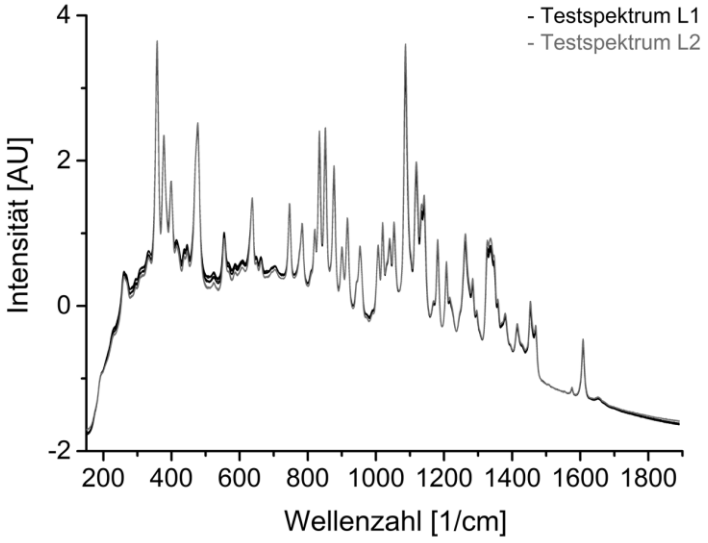

Abbildung 41: Testspektren der Versuche L1 und L2.

3.4.6 Zusammenfassung

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Raman-Spektroskopie ebenfalls als PAT-Werkzeug zur *inline* Quantifizierung eines Arzneistoffes in einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet ist. Die Güte der Kalibriermodelle wurde nicht durch die übrigen Formulierungsbestandteile beeinflusst. Weiter zeigten die Kalibriermodelle eine gute Vorhersagegenauigkeit, obwohl die Intensität der Arzneistoff-Peaks in den Raman-Spektren geringer war.

3.5 Methodenvalidierung

3.5.1 Einleitung und Zielsetzung

Ziel dieser Untersuchung war es, die entwickelte Raman-spektroskopische Methode zur *inline* Gehaltsbestimmung während eines Zweischneckengranulierprozesses in Übereinstimmung mit der ICH Guideline Q2 R1 [94] und der Arzneibuchmonographie Chemometrische Methoden zur Auswertung analytischer Daten [79] zu validieren. Die ICH Guideline wurde erstmals 1994 veröffentlicht, im Jahr 2005 überarbeitet (ICH Q2 R1) und stellt eine Leitlinie zur Validierung analytischer Methoden dar. Während der Validierung soll der objektive Nachweis erbracht werden, dass die analytische Methode für den beabsichtigten Gebrauch geeignet ist. Die Leitlinie wurde jedoch nicht für spektroskopische Methoden und die für die Auswertung solcher Daten benötigten multivariaten Regressionsmethoden verfasst. Deshalb wurde die Arzneibuchmonographie dazu gezogen, die aufgrund des speziellen Charakters chemometrischer Methoden auf zusätzliche Aspekte hinweist, die berücksichtigt werden sollten. In diesem Fall muss einerseits die analytische Methode selbst überprüft werden, zusätzlich muss aber auch eine Evaluierung des verwendeten Auswertemodells stattfinden. Das PLS Modell wurde bereits in Versuchsreihen (3.4.5) mit externen Datensätzen evaluiert, sodass nun die analytische Methode validiert werden konnte. Dennoch hängt das Ergebnis der analytischen Methode auch immer vom zur Auswertung verwendeten Kalibriermodell ab.

Es wurden die Validierungselemente Spezifität, Linearität, Richtigkeit, Präzision und Robustheit überprüft. Untersucht wurde die Methode über einen Bereich von 5 bis 25 % Arzneistoffgehalt im Granulat. Dieser Bereich wurde aufgrund der vorherigen Ergebnisse und der Dosierung von Diclofenac-Natrium festgelegt. Auf dem Markt befindliche schnellfreisetzende Diclofenac-Tabletten enthalten 25 mg Arzneistoff [95]. So können aus einem Granulat mit 10 bis 15 % Arzneistoff entsprechende Tabletten hergestellt werden.

Für die Überprüfung der Parameter Spezifität, Linearität, Richtigkeit und Präzision wurden die Datensätze N1-N3 und O1-O3 an drei verschiedenen Tagen aufgenommen (Kapitel 6.2.1.1 Tabelle 23 und Kapitel 6.2.1.3 Tabelle 24). Die Datensätze N1-N3 wurden mit dem aus dem Datensatz L1 erstellten Kalibriermodell vorhergesagt. Alle Messungen dafür wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Datensätze O1-O3 wurden mithilfe des aus dem Datensatz M1 erstellten Kalibriermodells vorhergesagt. Diese Datensätze wurden bei eingeschaltetem Raumlicht generiert. Es wurden jeweils sechs Konzentrationsstufen vermessen und pro Konzentrationsstufe 25 *inline* Spektren während der Granulation aufgenommen. Untersucht wurde die in Kapitel 3.3 beschriebene Methode. Die Robustheit

der Methode wurde mithilfe eines statistischen Versuchsplans (Datensatz P) überprüft.

Als Referenzmethode wurde die UV-Spektroskopie verwendet. Diese Methode wurde vorab nicht validiert. Die UV-Spektroskopie zur Quantifizierung von Diclofenac-Natrium in Wasser ist in der Literatur bereits ausreichend beschrieben [96, 97]. Es wurde lediglich die Linearität an verschiedenen Tagen überprüft. Die Überprüfung der Linearität von Diclofenac-Natrium in Wasser resultierte an allen Tagen in einem R^2 von 0,9999 und einem y-Achsenabschnitt kleiner als 0,002. Somit war die Linearität über den untersuchten Konzentrationsbereich gegeben.

3.5.2 Spezifität

Zunächst wurde die Spezifität überprüft, um sicherzustellen, dass die quantifizierte Probe bezogen auf den kalibrierten Raum keinen Ausreißer darstellt. Dies wurde anhand des Hotellings-T^2-Tests auf zwei Signifikanzniveaus überprüft. Mit diesem Test können Ausreißer identifiziert werden. Ein Ausreißer ist ein Wert, der vom Modell nicht adäquat beschrieben werden kann und somit ist für einen Ausreißer auch die Spezifität nicht gegeben.

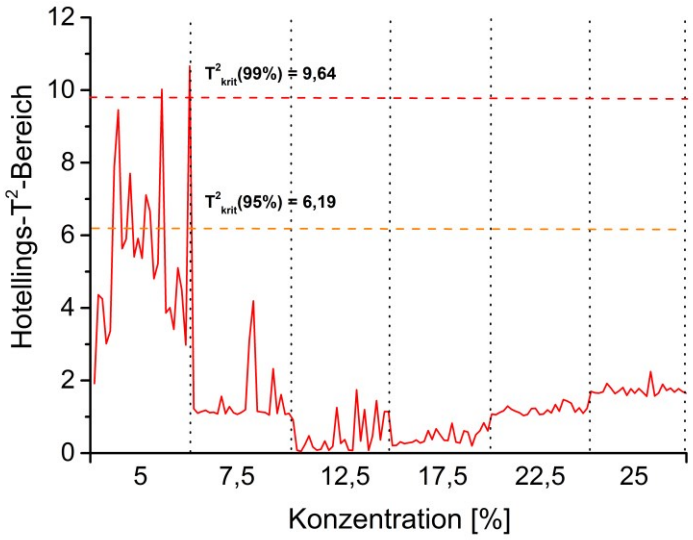

Abbildung 42: Ergebnis des Hotellings-T^2-Tests für den Datensatz N1.

Abbildung 42 zeigt als ein Beispiel das Testergebnis für den Datensatz N1, der im Dunkeln aufgenommen wurde. Alle anderen Testergebnisse für die Messungen im Dunkeln entsprachen diesem Ergebnis. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Konzentrationsstufen aufgetragen, wobei für jede Konzentration 25 Messungen durchgeführt wurden, und die Ordinate zeigt die T^2-Werte der Variablen. Von der 5 % Mischung wurden einige Proben als moderate Ausreißer detektiert, wohingegen für alle anderen Proben die Spezifität gegeben war. Dieses Ergebnis war aufgrund der

vorhergegangen Ergebnisse nicht überraschend. Wie bereits vorher diskutiert, ist der Raman-Effekt ein schwacher Streueffekt und damit ist die Sensitivität für niedrige Analytkonzentrationen nur eingeschränkt gegeben. Dies erschwert folglich die Quantifizierung und sorgt für größere Schwankungen in den Analysenergebnissen, die hier als Ausreißer detektiert wurden. Eine Belichtungszeit von 2 s war demnach zu gering für eine Arzneistoffkonzentration von 5 % und hätte in diesem Fall angepasst werden müssen.

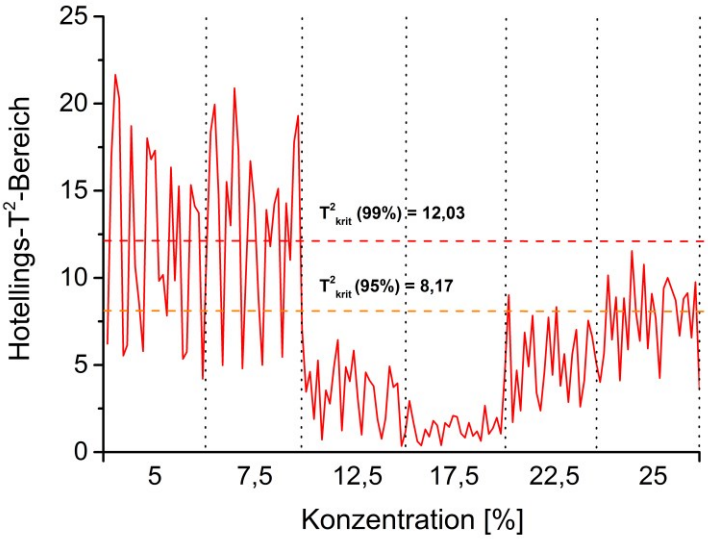

Abbildung 43:Ergebnis des Hotellings-T^2-Test für den Datensatz O2.

Abbildung 43 zeigt beispielhaft ein Ergebnis für den Hotellings-T^2-Test für den bei Raumlicht aufgenommenen Datensatz O2. Hier überschritten Proben der 5 und der 7,5 % Mischung die Grenzwerte und wurden als Ausreißer detektiert. Außerdem überschritten auch einige Proben der höheren Konzentrationen die Grenze des Signifikanzniveaus $\alpha = 0{,}05$. Dies waren jedoch moderate Ausreißer die vermutlich durch prozessbedingte Schwankungen verursacht wurden. Somit kann angenommen werden, dass die Spezifität gegeben war.

3.5.3 Linearität

Die Linearität der analytischen Methode wurde an drei verschiedenen Tagen überprüft. Dazu wurden die Konzentrationen im Granulat über die *inline* aufgenommenen Raman-Spektren mithilfe des jeweiligen Kalibriermodells vorhergesagt. Aus den erhaltenen Einzelwerten wurde für jeden Datensatz N1-N3 und O1-O3 für jede Konzentrationsstufe der mittlere vorhergesagte Gehalt berechnet. Dieser mittlere vorhergesagte Wert wurde dann gegen den dazugehörigen, gemittelten Referenzwert aufgetragen

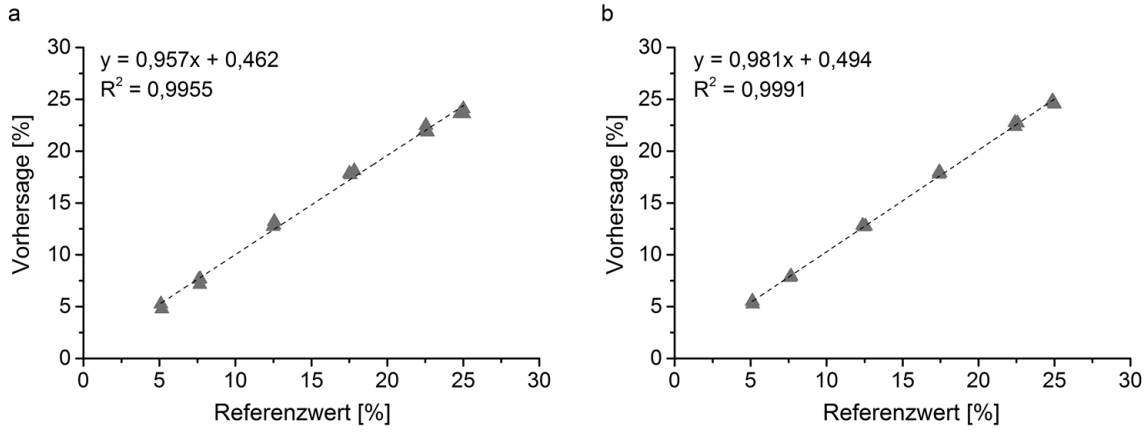

Abbildung 44: Ergebnisse der Linearitätsuntersuchung (a) für das dunkle Modell und (b) für das helle Modell. (n = 3)

Die Korrelation der Vorhersage gegen die Referenzwerte ist in Abbildung 44 gezeigt. Die Linearität wurde anhand des resultierenden R^2, der Steigung und des y-Achsenabschnittes bewertet. Für das dunkle Modell lagen die vorhergesagten Werte der 5 und 7,5 % Mischung unterhalb der Kalibriergerade, die der 12,5 und 17,5 % Mischung darüber und die der 22,5 und 25 % Mischung wieder leicht darunter. Die Konzentrationen wurden vom Modell folglich immer leicht unter- oder überschätzt. Daraus resultierte, dass die Steigung mit 0,957 leicht von dem optimalen Wert von eins abwich und auch der Koordinatenursprung nicht eingeschlossen wurde. Das R^2 der Korrelation lag bei 0,9955, was akzeptabel war, jedoch nicht dem nach der ICH Leitlinie geforderten Sollwert von 0,999 entsprach. Die Linearität war folglich nicht gegeben und es wäre eine Anpassung der Methode erforderlich, um die Ergebnisse zu verbessern. Dazu sollte zunächst die Belichtungszeit erhöht werden, da dies zu einem höheren Probenvolumen und somit zu einer stabileren Kalibrierung und genaueren Vorhersagen führt.

Für das helle Modell lagen die vorhergesagten Konzentrationen besser auf der berechneten Kalibriergeraden. Daraus resultierte auch ein höheres R^2 von 0,9991 und eine Steigung näher an eins. Jedoch wurde auch hier der Koordinatenursprung nicht eingeschlossen. Die Abweichung vom Ursprung ist mit 0,49 % ähnlich groß wie die für das dunkle Modell berechnete Abweichung, was auf einen systematischen Fehler in der Messung hindeutet. Solche Abweichungen wurden bereits in vorherigen Versuchsreihen beobachtet, jedoch konnten keine Ursachen für diese Abweichungen gefunden werden. Dennoch wurden für das helle Modell alle Vorgaben erfüllt und die Linearität damit erfolgreich nachgewiesen. Trotzdem sollte auch hier die Abweichung im y-Achsenabschnitt mit weiteren Datensätzen kontrolliert werden, um einen eventuellen systematischen Fehler ausfindig zu machen und zu eliminieren.

3.5.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit der analytischen Methode wurde überprüft, indem die von dem erstellten Kalibriermodell vorhergesagten Werte mit den Referenzwerten, von denen angenommen wurde, dass sie richtig waren, verglichen wurden. Dafür wurde für jede Konzentrationsstufe der Datensätze N1-N3 und O1-O3 die Wiederfindung in Bezug zum Referenzwert berechnet. Als Akzeptanzlimits wurden 95 % als unterer Grenzwert und 105 % als oberer Grenzwert festgelegt.

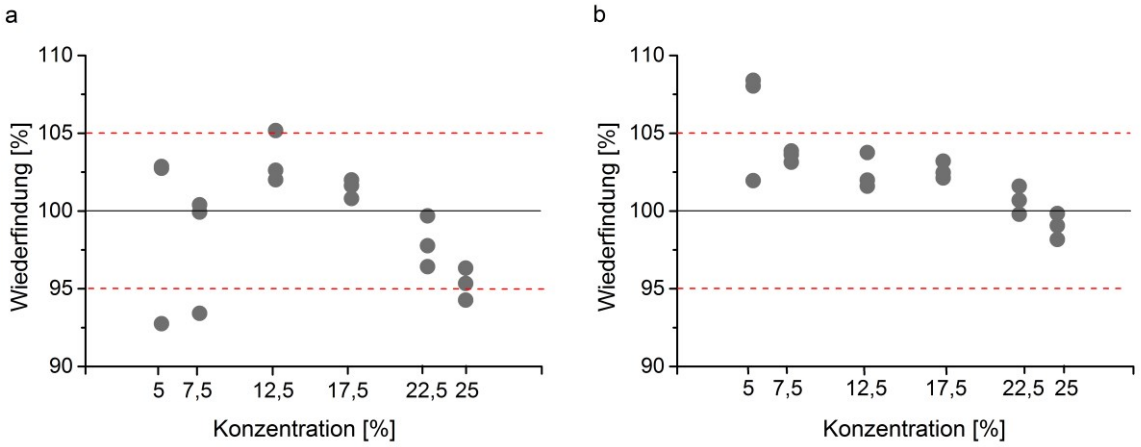

Abbildung 45: Ergebnisse der Richtigkeitsuntersuchung (a) für das dunkle Modell und (b) für das helle Modell.

In Abbildung 45 ist die berechnete Wiederfindung gegen die jeweilige Konzentrationsstufe aufgetragen. Abbildung 45 a zeigt die Ergebnisse für das dunkle Modell. Hier überschritten einige Einzelwerte die gesetzten Akzeptanzgrenzen, während im Mittel für alle Konzentrationen die Bedingungen erfüllt waren. Für die 5 und 7,5 % Stufe gibt es jeweils einen deutlichen Ausreißer, während die andern beiden Messpunkte sehr nahe beieinanderliegen. Beide Ausreißer stammen aus dem Datensatz N2. Die auch hier vor der Messung aufgenommenen Testspektren zeigten, dass die Intensität der Spektren sich an den unterschiedlichen Prozesstagen leicht unterschied. An dem Tag lag die Intensität unterhalb der Intensität die am Kalibriertag gemessen wurde. Dadurch wird der Gehalt möglicherweise unterschätzt. Allerdings spiegelte sich dies in den anderen Konzentrationsstufen nicht wieder. Auch in den aufgezeichneten Prozessdaten waren keine Unterschiede zwischen den Tagen feststellbar, mit denen die Intensitätsunterschiede in den Raman-Spektren und somit die falsche Vorhersage hätten erklärt werden können. Weiter ist auffällig, dass ab der 12,5 % Stufe die Wiederfindung mit zunehmendem Arzneistoffgehalt abnimmt. Dieser Trend ist auch in den berechneten Wiederfindungen für das helle Modell (Abbildung 45 b) zu erkennen. Allerdings gibt es für diesen Trend keine offensichtliche Erklärung. Eine mögliche

Erklärung ist, dass sich der Brechungsindex über die Konzentrationen verändert hat, da alle Konzentrationen mit der gleichen Feuchte granuliert wurden, sich aber abhängig von der Konzentration unterschiedliche Mengen des Arznei- und Hilfsstoffes in der Granulierflüssigkeit gelöst haben könnten. Dadurch könnten sich Oberflächeneigenschaften verändert haben, welche wiederrum die Intensität der Raman-Spektren beeinflussen. Die Unterschätzung des Gehalts im oberen Konzentrationsbereich war bereits während der Evaluierung der Güte des Modells für das dunkle Modell erkennbar (Abbildung 40). Möglicherweise hat dieser Trend auch mit einer Abnahme der Laserintensität über die Zeit zu tun. Die Konzentrationen wurden aufsteigend von der kleinsten zur höchsten Konzentration vermessen, zwischen den einzelnen Messungen wurde der Granulierer komplett gereinigt, der Laser der Raman-Sonde aber nicht ausgeschaltet. Die beschriebenen Versuche sollten deshalb randomisiert wiederholt werden, um prozessbedingte Einflüsse ausschließen zu können.

Die Ergebnisse für das helle Modell waren trotzdem vielversprechend, da nur für die 5 % Mischung die Wiederfindungen für die Datensätze O1 und O3 außerhalb der gewählten Grenzen lagen und somit für alle höheren Konzentrationen die Richtigkeit gegeben war.

Weiter wurde zur Beurteilung der Richtigkeit noch der relative Fehler in Bezug zum Referenzwert berechnet. Dieser lag für alle Datenpunkte unter 10 % und war damit akzeptabel.

Wie bereits in der Auswertung der Linearität erwähnt, wird auch hier angenommen, dass die Richtigkeit der Methode durch eine Erhöhung der Belichtungszeit verbessert werden kann.

Tabelle 10 zeigt nochmals alle berechneten Werte für die Richtigkeitsuntersuchung für das dunkle Modell und Tabelle 11 für das helle Modell.

Tabelle 10: Ergebnisse der Richtigkeitsuntersuchung für das dunkle Modell.

Probe	Tag	Referenz-wert [%]	Mittlerer vorhergesagter Gehalt [%]	Rel. Fehler [%]	Wiederfindung [%]	Mittlere Wieder-findung [%]	Stabw [%]
5,00	1	5,10	5,24	2,75	102,75	99,45	5,80
	2	5,16	4,79	-7,25	92,75		
	3	5,10	5,24	2,86	102,86		
7,50	1	7,60	7,63	0,39	100,39	97,91	3,90
	2	7,65	7,15	-6,58	93,42		
	3	7,67	7,67	-0,07	99,93		
12,50	1	12,56	13,21	5,18	105,18	103,27	1,68
	2	12,54	12,87	2,62	102,62		
	3	12,48	12,73	2,01	102,01		
17,50	1	17,83	18,12	1,63	101,63	101,48	0,61
	2	17,51	17,86	2,00	102,00		
	3	17,58	17,72	0,80	100,80		
22,50	1	22,54	22,47	-0,31	99,69	97,95	1,65
	2	22,49	21,98	-2,24	97,76		
	3	22,65	21,83	-3,59	96,41		
25,00	1	25,00	24,08	-3,68	96,32	95,31	1,03
	2	24,78	23,62	-4,67	95,33		
	3	25,04	23,60	-5,73	94,27		

Tabelle 11: Ergebnisse der Richtigkeitsuntersuchung für das helle Modell.

Probe	Tag	Referenz-wert [%]	Mittlerer vorhergesagter Gehalt [%]	Rel. Fehler [%]	Wiederfindung [%]	Mittlere Wieder-findung [%]	Stabw [%]
5	1	5,11	5,54	8,40	108,40	106,13	3,63
	2	5,14	5,24	1,94	101,94		
	3	5,10	5,51	8,03	108,03		
7,5	1	7,58	7,82	3,13	103,13	103,54	0,37
	2	7,64	7,92	3,63	103,63		
	3	7,66	7,95	3,86	103,86		
12,5	1	12,56	12,76	1,59	101,59	102,44	1,15
	2	12,46	12,70	1,98	101,98		
	3	12,37	12,84	3,76	103,76		
17,5	1	17,48	17,91	2,47	102,47	102,60	0,55
	2	17,42	17,98	3,20	103,20		
	3	17,41	17,77	2,12	102,12		
22,5	1	22,57	22,72	0,68	100,68	100,69	0,90
	2	22,40	22,76	1,59	101,59		
	3	22,43	22,38	-0,21	99,79		
25	1	24,95	24,71	-0,95	99,05	99,02	0,83
	2	24,87	24,82	-0,17	99,83		
	3	25,00	24,54	-1,83	98,17		

Die Leistungsfähigkeit der Kalibriermodelle wurde bereits in den Kapiteln 3.3.2.3 und 3.3.3.3 untersucht. Zur Bewertung der Güte des Modells kann der RMSEP herangezogen werden. Für den Datensatz N1 wurde ein RMSEP von 0,57 %, für den Datensatz N2 von 0,69 % und für den Datensatz N3 von 0,66 % erhalten. Der Vorhersagefehler war somit größer als in der Evaluierung des Modells beobachtet. Dies ist damit erklärbar, dass mehr Konzentrationsstufen in den Datensatz miteingeschlossen wurden. Die berechneten Fehler waren akzeptabel, unterschieden sich aber für die einzelnen Datensätze deutlich. Eine genauere Betrachtung der an den einzelnen Tagen aufgenommenen Spektren hat gezeigt, dass sich auch die Spektren für die gleiche Probenzusammensetzung unterschieden. Somit war die Messung zum Teil nicht reproduzierbar und es resultierten unterschiedlich gute Vorhersagen für die an verschiedenen Tagen aufgenommenen Datensätze. Dies ist für eine Methode zur Qualitätskontrolle inakzeptabel, weshalb dringend weitere Studien zur

Reproduzierbarkeit der Messung durchgeführt werden sollten.

Die Vorhersagefehler für die Datensätze O1 bis O3 waren deutlich kleiner. Für den Datensatz O1 wurde ein RMSEP von 0,43 %, für den Datensatz O2 von 0,38 % und für den Datensatz O3 von 0,44 % gefunden. Das helle Modell hatte somit eine bessere Vorhersagegenauigkeit. Außerdem war die Variabilität zwischen den Tagen geringer.

Das zugrundeliegende Modell zur Auswertung der analytischen Daten hat somit einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis und durch eine entsprechende Modellbildung, durch die nur die relevanten chemischen Informationen extrahiert werden, können tagesabhängige Schwankungen herausgerechnet werden.

3.5.5 Präzision

Die Wiederholpräzision wurde mithilfe der über das Modell erhaltenen Standardabweichung untersucht. Die Standardabweichungen der vorhergesagten Konzentrationen lagen für das dunkle Model zwischen 0,08 und 0,30 %. Damit waren die Schwankungen an einem Prozesstag relativ klein. Für die höheren Konzentrationen schwankte der über das Modell vorhergesagte Gehalt dabei mehr als für die niedrigeren Konzentrationen. Erwartet wurde hingegen eher, dass die Messwerte für die niedrigere Konzentration mehr schwanken, da hier die Spezifität nicht gegeben war. Die größeren Schwankungen wurden jedoch auch in der Referenzmessung wiedergefunden und waren damit wahrscheinlich eher durch die Mischung selbst bedingt als durch die analytische Methode. Die berechneten relativen Standardabweichungen lagen zwischen 0,48 und 2,61 %. Für die Vergleichspräzision wurden absolute Standardabweichungen zwischen 0,20 und 0,33 % berechnet, was in relativen Standardabweichungen zwischen 1,14 und 5,11 % resultierte. Damit schwankt für die meisten Datenpunkte die Messung zwischen den Tagen mehr als an einem Tag, was zu erwarten war. Die gefundenen relativen Standardabweichungen lagen unter 10 % und waren damit akzeptabel. Somit war eine angemessene Präzision der Methode gegeben.

Für das helle Modell lagen die absoluten Standardabweichungen für die Vergleichspräzision zwischen 0,13 und 0,40 %, also etwas höher als für das dunkle Modell. Hier waren die berechneten Standardabweichungen für die niedrigen Konzentrationen höher, wie erwartet. Die Berechnung der relativen Standardabweichung resultierte in Werten zwischen 0,58 und 7,24 %. Die für die verschiedenen Tage berechnete absolute Standardabweichung lag zwischen 0,07 und 0,21 % und die relative Standardabweichung zwischen 0,52 und 3,06 %. Somit entsprachen die erhaltenen Standardabweichungen denen des dunklen Modells. Folglich war die Präzision auch hier gegeben.

Bei der Untersuchung der Vergleichspräzision wurde auf die Durchführung durch einen zweiten Bediener verzichtet, da die Raman-Sonde in der optimierten Konstruktion fest eingebaut werden konnte und so keine Unterschiede im Messaufbau durch unterschiedliche Bediener möglich waren.

3.5.6 Robustheit

Während der Evaluierung der Robustheit sollte der Einfluss von Prozessparametern auf die Richtigkeit und Präzision der analytischen Methode und somit auf die Vorhersagegenauigkeit des Kalibriermodells untersucht werden. Dabei sollten alle relevanten Prozessparameter erfasst werden. Hier erfolgte die Evaluierung der Robustheit deshalb über die Methode der statistischen Versuchsplanung. Dafür wurde eine physikalische Mischung mit 15 % Diclofenac-Natrium nach einem 2^{3-1} teilfaktoriellen Versuchsplan granuliert. Als relevante Faktoren wurden die Feuchte, die Schneckendrehzahl und der Füllgrad ausgewählt. Die Feuchte wurde untersucht, da in vorherigen Versuchen ein Einfluss der Feuchte auf die Intensität der Raman-Banden und somit auf die Quantifizierung beobachtet wurde. Die Schneckendrehzahl und der Füllgrad haben einen Einfluss auf die Geschwindigkeit, mit der das Granulat die Strecke unter der Raman-Sonde passiert und somit auf die Bewegungskinetik, die wiederrum auch einen Einfluss auf das Raman-Spektrum hat. Weiter verändert sich damit auch das vermessene Probenvolumen. Die Parameter wurden in einem Bereich variiert, der die im Prozess auftretenden Schwankungen großzügig abdeckte. Ein Einfluss der Temperatur wurde nicht untersucht, obwohl die Raman-Messung auch eine Temperaturabhängigkeit zeigt, da die Temperatur im Prozess konstant auf 30 °C gehalten wurde. Als Zielgröße wurde der mittlere vorhergesagte Gehalt für die Bewertung der Richtigkeit und die absolute Standardabweichung für die Bewertung der Präzision berechnet. Ein ideales Ergebnis für eine Robustheitsstudie wäre ein Q^2 nahe null, da in diesem Fall keine Beziehung zwischen den Faktoren und Zielgrößen besteht und somit die Vorhersage des Gehaltes unabhängig von den Prozessparametern wäre. Die Robustheitsstudie wurde zweimal durchgeführt, einmal für das dunkle und einmal für das helle Modell (Datensatz P1 und P2).

Tabelle 12: Eingestellte Faktoren und resultierende Zielgrößen der Robustheitsstudie für das dunkle Modell.

Versuch	Füllgrad [g]	Schneckendrehzahl [min^{-1}]	Feuchte	Mittlerer vorhergesagter Gehalt [%]	Absolute Stabw [%]
P1	0,234	120	0,125	16,05	0,32
P2	0,300	120	0,105	16,30	0,19
P3	0,234	180	0,105	16,29	0,18
P4	0,300	180	0,125	16,02	0,26
P5	0,267	150	0,115	15,99	0,17
P6	0,267	150	0,115	15,96	0,20
P7	0,267	150	0,115	16,26	0,17

Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der Robustheitsstudie für das dunkle Modell. Die Auswertung des Versuchsplans resultierte für den mittleren Gehalt in einem Modell mit einem Q^2 von 0,22 und einem R^2 von 0,49. Keiner der veränderten Parameter zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße (siehe Effekt-Plot im Anhang, Abbildung 54 a). Somit war das erstellte Kalibriermodell robust gegenüber den untersuchten Prozessparametern in den gewählten Grenzen und der Gehalt konnte unabhängig von diesen Parametern korrekt vorhergesagt werden. Es fiel jedoch auf, dass der vorhergesagte Gehalt ungefähr 1 % über dem bekannten Gehalt lag und somit ein systematischer Fehler vorgelegen haben muss. Auch die Auswertung der Standardabweichung resultierte lediglich in einem mittelmäßigen Modell mit einem Q^2 von 0,21 und einem R^2 von 0,67. Auch hier zeigte keiner der variierten Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße und damit auf die Präzision (siehe Effekt-Plot im Anhang, Abbildung 54 b). Dennoch zeigte die Feuchte den größten Einfluss auf die Zielgrößen. Die absolute Standardabweichung stieg um 0,04 % mit steigender Feuchte und der mittlere vorhergesagte Gehalt wurde durch eine höhere Feuchte kleiner. Auch vorherige Versuche hatten einen Einfluss der Feuchte auf die Raman-Spektren bestätigt. Die Feuchte beeinflusst die Intensität der gemessenen Raman-Peaks und eine höhere Feuchte scheint zu größeren Intensitätsschwankungen zu führen, was sich in größeren Schwankungen im vorhergesagten Gehalt wiederspiegelt. Die hier eingestellten Feuchten schienen direkt an der Grenze von akzeptablen Schwankungen zu liegen und können toleriert werden. Dennoch ist die Feuchte der kritischste Prozessparameter und hat den größten Einfluss auf den vorhergesagten Gehalt.

Tabelle 13: Eingestellte Faktoren und resultierende Zielgrößen der Robustheitsstudie für das helle Modell.

Versuch	Füllgrad [g]	Schneckendrehzahl [min^{-1}]	Feuchte	Mittlerer vorhergesagter Gehalt [%]	Absolute Stabw [%]
P1	0,234	120	0,125	15,15	0,22
P2	0,300	120	0,105	15,14	0,19
P3	0,234	180	0,105	15,23	0,19
P4	0,300	180	0,125	15,17	0,32
P5	0,267	150	0,115	15,19	0,15
P6	0,267	150	0,115	15,10	0,17
P7	0,267	150	0,115	15,37	0,23

Für das helle Modell ergaben sich sehr ähnliche Ergebnisse, die in Tabelle 13 zusammengefasst sind. Das Modell für den mittleren vorhergesagten Gehalt resultierte in einem Q^2 von -0,05 und einem R^2 von 0,10. Auch hier konnten keine Parameter bestimmt werden, die die Zielgröße signifikant beeinflussten (siehe Effekt-Plot im Anhang, Abbildung 55 a). Somit ist auch dieses Modell bezogen auf die Richtigkeit robust gegenüber den untersuchten Schwankungen. Das Modell für die absolute Standardabweichung resultierte in einem Q^2 von -0,02 und einem R^2 von 0,62. Auch in diesem Fall hatte keiner der gewählten Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die berechnete Standardabweichung und somit auf die Präzision (Effekt-Plot siehe Anhang, Abbildung 55 b). Weiter lag der mittlere vorhergesagte Gehalt hier näher am Sollwert und es wurde keine systematische Abweichung, wie für das dunkle Modell beschrieben, beobachtet.

3.5.7 Zusammenfassung

Für das helle Modell wurden die Untersuchungen zur Validierung mit Ausnahme für eine Arzneistoffkonzentration von 5 % in allen Punkten erfolgreich durchgeführt. Für das dunkle Modell entsprachen die Linearität und Richtigkeit nicht den gegebenen Anforderungen. Dieses Ergebnis zeigt, dass vor allem die Vorbehandlung der Daten und die Modellerstellung ausschlaggebend für die erhaltene Vorhersage sind, da für beide Modelle Spektren in der gleichen Weise von Proben mit gleicher Zusammensetzung aufgenommen wurden. Die analytische Methode ist demnach grundsätzlich geeignet und durch ein Anpassen der Belichtungszeit und durch eine Optimierung des Vorhersagemodells sollte ein Bestehen der

Validierung möglich sein. Durch eine Erhöhung der Belichtungszeit wird das Probenvolumen vergrößert, was zu einer stabileren Kalibrierung führt. Die hier gewählte Belichtungszeit war vergleichsweise gering und das vermessene Probenvolumen lag deutlich unterhalb einer Einzeldosis, weshalb die Belichtungszeit noch erhöht werden könnte. Weiter wurde gezeigt, dass vor allem die Feuchte die erhaltenen Daten beeinflusst und damit der kritischste Parameter ist, obwohl Wasser selbst nur eine geringe bis keine Raman-Aktivität besitzt. Weiter beeinflussen vor allem unterschiedliche Umgebungsbedingungen die Raman-Messung, was zu tagesabhängigen Schwankungen in den erhaltenen Intensitäten führt. Diese Schwankungen sollten bei der Modellerstellung berücksichtigt werden.

Auch wenn die Überprüfung der Methode nicht in allen Punkten für beide Modelle erfolgreich durchgeführt wurde, machen die Ergebnisse trotzdem deutlich, dass die Raman-Spektroskopie erstmals erfolgreich in den Zweischneckengranulierprozess implementiert werden konnte. Für jeden Arzneistoff muss nun abhängig von seiner Raman-Aktivität, der daraus abgeleiteten nötigen Belichtungszeit und der Einzeldosis geprüft werden, ob die erstellte Methode anwendbar ist und zu angemessenen Ergebnissen führt.

3.6 Anwendung der erstellten Methoden zur Beurteilung der Mischeffizienz des Zweischneckengranulierers

3.6.1 Einleitung

Die entwickelten Methoden wurden während verschiedener *split feeding* Versuche angewendet, um die Mischeffizienz des Zweischneckengranulierers zu evaluieren. Dafür wurden der Arzneistoff und der Hilfsstoff oder eine Mischung der Hilfsstoffe getrennt voneinander mithilfe von zwei unabhängigen gravimetrischen Dosierern in den Zweischneckengranulierer dosiert. Die Komponenten wurden im Granulierer somit sowohl gemischt als auch granuliert. Für kontinuierliche Prozesse ist ein gutes Prozessverständnis von besonders hoher Bedeutung und mithilfe dieser Versuche sollte der Prozess weiter charakterisiert werden. Mithilfe der *inline* aufgenommenen Raman-Spektren konnte über den Arzneistoffgehalt die Güte der Mischung beurteilt werden.

Bisher wurden *split feeding* Applikationen kaum untersucht. Die meisten Versuche wurden mit vorgemischten Pulvern durchgeführt, um den Einfluss von Prozessparametern auf die Granulateigenschaften zu untersuchen [28]. Der erste Schritt in der Produktion fand folglich immer chargenweise statt. Um einen vollständigen kontinuierlichen Prozess zu erhalten, wäre es wünschenswert auf diese chargenweise Vormischung verzichten zu können. Des Weiteren wird durch den Einsatz des *split feedings* die Fertigungslinie verkürzt und eine Entmischung der vorgemischten Pulver während der Lagerung oder des Prozesses vermieden [28]. Trotz dieser Vorteile wurden *split feeding* Applikationen bis auf wenige Ausnahmen nicht genauer untersucht. Eine Untersuchung von Van Melkebeke et al., die eine kleine Menge Hydrochlorothiazid über einen zweiten Pulverdosierer in den Prozess gaben, zeigte eine sehr gute Mischeffizienz. Daraus folgerten sie, dass selbst für eine kleine Arzneistoffmenge auf eine Vormischung verzichtet werden kann [98]. Diese Ergebnisse sind sehr vielversprechend, dennoch sind weitere Experimente notwendig, um das Mischverhalten des Zweischneckengranulierers beurteilen zu können.

Um die Mischgüte zu beurteilen, wurden für chargenweise durchgeführte Prozesse meist Methoden, die keine Kalibrierung benötigten, angewendet [46, 48]. De Beer et al. erklärten dies damit, dass chargenweise Prozesse geschlossene Prozesse sind. Sofern also die richtige Menge Arzneistoff hinzugegeben wurde, enthält eine homogene Mischung die richtige Arzneistoffmenge [48]. Dennoch kann es z. B. durch Adhäsion an Gefäßwänden zu einer Verminderung des Arzneistoffgehaltes kommen, der in diesem Fall unbemerkt bleiben könnte, weshalb quantitative Methoden zu bevorzugen sind. Für kontinuierliche Prozesse sollten hingegen immer quantitative Methoden bevorzugt werden, da so eine präzisere

Kontrolle der Dosierung möglich ist. Weiter kann mittels einer quantitativen Methode nicht nur die Homogenität der Mischung beurteilt werden, sondern auch die Arzneistoffkonzentration in der Mischung bestimmt werden, was weiter auch die Untersuchung der Gleichförmigkeit des Gehaltes des produzierten Granulates erlaubt. Diese Vorteile der quantitativen Methoden für die Beurteilung der Mischgüte wurden ebenfalls von Nagy et al. [74] und Martinez et al. [47] beschrieben.

Zunächst wurden jeweils zwei Versuche mit dem Arzneistoff Ibuprofen (Datensatz Q1 und Q2) und mit dem Arzneistoff Diclofenac-Natrium (Datensatz R1 und R2) durchgeführt. Der Arzneistoffgehalt wurde während des Versuches verändert. Für die Granulation wurde die gesamte Länge des Granulierers genutzt und eine Standardschneckenkonfiguration verwendet. Bis auf eine Ausnahme wurden alle Messungen im Dunkeln durchgeführt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Mischgüte nach verschiedenen Abschnitten des Granulierers bestimmt. Dazu wurde die Länge des Schneckengehäuses verkürzt und die Schneckenkonfiguration entsprechend angepasst. Es wurde die Mischgüte nach drei verschiedenen Abschnitten in den Versuchen S1, S2 und S3 untersucht. Die Versuche wurden in U1, U2 und U3 nochmals wiederholt, hier wurde anstatt einer binären Mischung die in Kapitel 3.4 beschriebene pharmazeutische Zubereitung verwendet. Dazu wurden sämtliche Hilfsstoffe vorgemischt und getrennt vom Arzneistoff in den Granulierer dosiert.

Es ist allgemein bekannt, dass vor allem die Knetelemente für eine gute Durchmischung des Pulvers mit der Granulierflüssigkeit sorgen [99, 100]. In den Knetzonen wird die größte Scherenergie eingetragen und somit findet hier die größte Durchmischung statt. Verstraeten et al. zeigten, dass dabei ein Knetblock nicht für alle Formulierungen ausreichend war [101]. Da es jedoch noch keine Untersuchungen zum Einfluss der Knetzonen auf die Mischung verschiedener Pulverkomponenten gibt, sollte in diesem Abschnitt der Arbeit die Mischgüte nach verschiedenen Längen des Granulierers und somit nach einer unterschiedlichen Anzahl an Knetzonen untersucht werden. So wurde für die Versuche S1 und U1 die gesamte Länge des Granulierers ausgenutzt und eine Schneckenkonfiguration mit zwei Knetzonen verwendet. Für die Versuche S2 und U2 wurde die Länge auf 20 D verkürzt und die Schneckenkonfiguration enthielt nur eine Knetzone, während für S3 und U3 nur Förderelemente verwendet wurden.

Weiter wurde in mehreren Studien gezeigt, dass der Füllgrad des Schneckengehäuses den Granulierprozess und die Granulateigenschaften maßgeblich beeinflusst [37, 38, 102]. Der Füllgrad des Schneckengehäuses beeinflusst weiter auch den Fluss des Materials [39]. Somit wurde vermutet, dass auch der Füllgrad einen Einfluss auf die Mischfähigkeit des

Zweischneckengranulierers hat. Deshalb wurden in einem dritten Abschnitt mithilfe eines statistischen Versuchsplans (Datensätze T1-T3) der Einfluss des Füllgrades und weiter der Einfluss der Schneckendrehzahl auf die Mischgüte untersucht.

3.6.2 Evaluierung des Mischverhaltens des Zweischneckengranulierers*

Wie eingangs beschrieben wurde in diesem Teil der Arbeit die entwickelte Raman-Methode genutzt, um die Arzneistoffkonzentration im Granulat während eines kontinuierlichen *split feeding* Prozesses zu messen. Der jeweilige Arzneistoff und Laktose-Monohydrat wurden jeweils mit 0,2 % Aerosil versetzt und in zwei gravimetrische Dosierer überführt und so getrennt voneinander dosiert. Über die separat einstellbaren Dosierraten wurden verschiedene Arzneistoffkonzentrationen eingestellt, die gesamte dosierte Menge wurde dabei nicht verändert (Kapitel 6.2.1.3 Tabelle 25). *Inline* Raman-Spektren wurden mithilfe des in Kapitel 3.1.3.2 beschriebenen Aufbaus aufgenommen und über die in Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.3.2 beschriebenen Kalibriermodelle ausgewertet. Für jeden Arzneistoff wurden zwei unabhängige Prozesse mit jeweils unterschiedlichen eingestellten Arzneistoffkonzentrationen durchgeführt. Für die Datensätze Q1 und Q2 wurde Ibuprofen und für die Datensätze R1 und R2 Diclofenac-Natrium verwendet.

Die über das Modell vorhergesagten Arzneistoffkonzentrationen wurden gegen die Prozesszeit aufgetragen (Abbildung 46). Des Weiteren wurden die Daten der beiden Dosierer mit Hilfe eines LabView Programms aufgezeichnet. Aus diesen Daten konnte ebenfalls eine resultierende Arzneistoffkonzentration berechnet werden. Um die Menge der Daten zu reduzieren wurde hier ein gleitender Mittelwert über 10 s gebildet. Die berechneten Konzentrationen wurden mit durch eine UV-Messung erhobenen Referenzwerten verglichen.

* Teile der in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse wurden in „Development of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation“ publiziert.

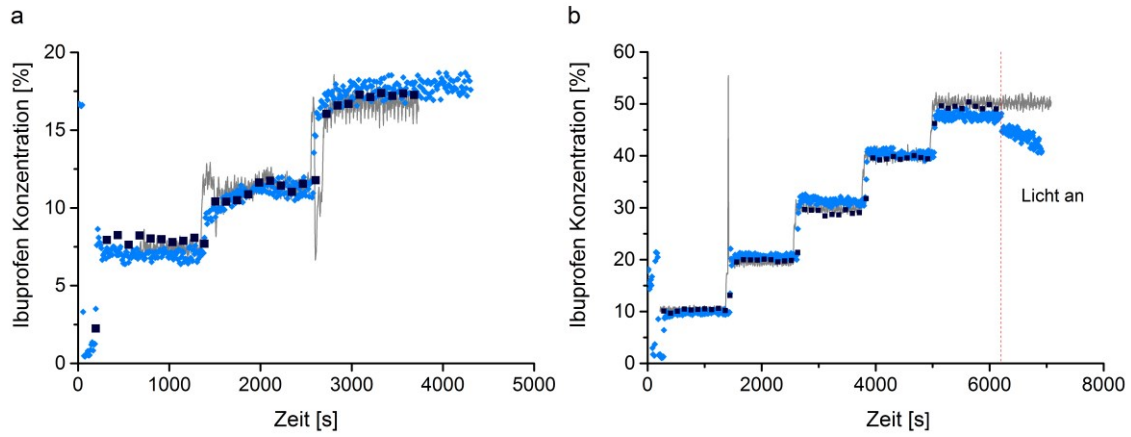

Abbildung 46: Kontinuierliche Quantifizierung des Arzneistoffes während eines split feeding Prozesses. (a) Ibuprofen-Konzentrationen der verschiedenen Methoden für Q1. (b) Ibuprofen-Konzentrationen der verschiedenen Methoden für Q2. hellblaue Raute: Raman-Messung; dunkelblaue Quadrate: UV-Messung; graue Linie: Dosierer-Daten.

Für die Diclofenac-Natrium Versuche wurden die Ergebnisse ebenfalls entsprechend gewonnen und dargestellt (Abbildung 47).

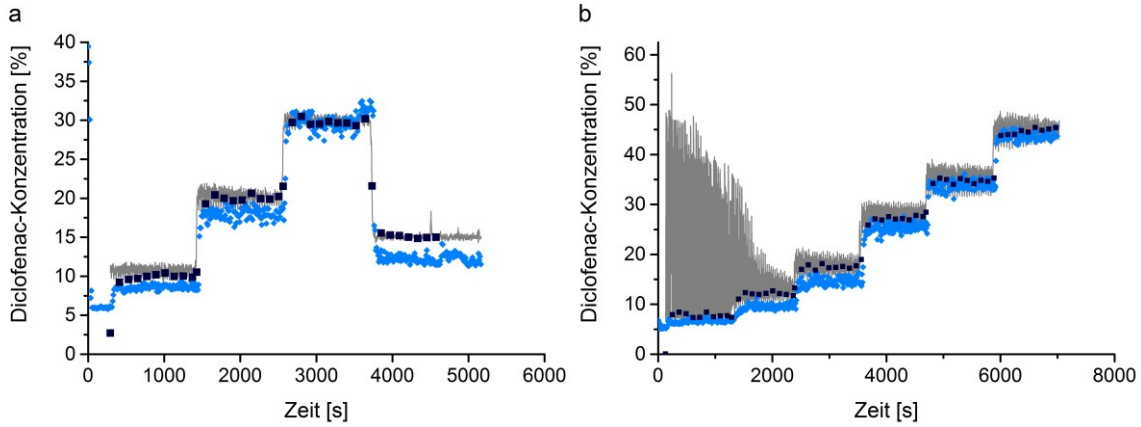

Abbildung 47: Kontinuierliche Quantifizierung des Arzneistoffes während eines split feeding Prozesses. (a) Diclofenac-Konzentrationen der verschiedenen Methoden für R2. (b) Diclofenac-Konzentrationen der verschiedenen Methoden für R1. hellblaue Raute: Raman-Messung; dunkelblaue Quadrate: UV-Messung; graue Linie: Dosierer-Daten.

Die Referenzwerte stimmten gut mit den aus den aufgezeichneten Dosierraten berechneten Konzentrationen überein und auch die Raman-Messungen passten in den meisten Fällen zu diesen Werten. Dies sprach für eine gute Mischeffizienz des Zweischneckengranulieres für die gewählte Schneckenkonfiguration und die gewählten Prozesseinstellungen. Des Weiteren belegten die deutlich erkennbaren Sprünge nach Änderung der Arzneistoffkonzentration die gute Mischfähigkeit. Aufgrund dieser Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass für eine einfache binäre Mischung im untersuchten Konzentrationsbereich auf eine Vormischung verzichtet werden kann. Diese Ergebnisse

stimmen mit den bereits erwähnten Ergebnissen von Van Melkebeke et al. überein [98]. Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um die erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen. Das Mischverhalten des Zweischneckengranulierers in Abhängigkeit verschiedener Prozessparameter sollte für ein besseres Prozessverständnis weiter systematisch untersucht werden.

Aus den durchgeführten Versuchen konnte weiter eine Reaktionszeit des Granulierers berechnet werden. Dies ist die Zeit, die der Granulierer nach einer Umstellung der Dosierrate braucht, um wieder Granulate mit einer homogenen Arzneistoffverteilung zu produzieren. Dafür wurde die Zeit bis zum Erreichen von 95 % des jeweiligen Plateaus berechnet. Die berechneten Reaktionszeiten lagen zwischen 20 und 50 s, je nach Unterschied zwischen der alten und neuen Konzentration. Das bedeutet, dass nach einer Umstellung der Dosierrate wieder sehr schnell ein Gleichgewichtszustand erreicht werden konnte, was für einen kontinuierlichen Prozess von großer Bedeutung ist, um so wenig Produkt wie möglich zu verlieren.

Die erhobenen Daten wurden des Weiteren genutzt, um die Vorhersagegenauigkeit der erstellten Kalibriermodelle weiter zu evaluieren. Für das Ibuprofen-Modell war die Abweichung der vorhergesagten Konzentrationen von den Referenzwerten unter 1 % und somit akzeptabel. Im Versuch Q1 wurde die Ibuprofen-Konzentration für die kleinste eingestellte Konzentration von 7,5 % unterschätzt, während sie für die höchste Konzentration von 17,5 % leicht überschätzt wurde und für die 12,5 % Konzentration gut zur Referenzmessung passte. Die in den ersten Minuten dargestellten hohen vorhergesagten Konzentrationen sind Fehlmessungen, da zu Beginn kein Granulat vor der Raman-Sonde war und so nur der Hintergrund vermessen wurde. Weiter wurde in den ersten drei Minuten nur Laktose-Monohydrat granuliert. Die Ausreißer, die in den Dosiererdaten sichtbar sind, sind durch das Umstellen der Dosierrate bedingt. Durch das Umstellen werden am Dosierer Vibrationen erzeugt, welche das ausgelesene Signal stören. Im Versuch Q2 wurden weitere Konzentrationen untersucht. Hier war die Vorhersage gut für Konzentrationen von 10, 20 und 40 %, während der Gehalt für die 30 % Mischung überschätzt und für die 50 % Mischung unterschätzt wurde. Der Grund dafür könnte eine Übersättigung des Signals gewesen sein. Ab Sekunde 6215 fällt die vorhergesagte Ibuprofen-Konzentration deutlich ab. An diesem Zeitpunkt wurde das Licht im Labor eingeschaltet. Diese Ergebnisse zeigen somit deutlich die Lichtempfindlichkeit der Raman-Messung. Die *split feeding* Versuche bestätigten die Anwendbarkeit der entwickelten Methode, zeigten jedoch auch, dass die entwickelte Raman-Methode, wie bereits vorher erwähnt, Limitationen bei Konzentrationen

unter 10 % und bei hohen Konzentrationen aufwies. Dennoch werden die vorherigen Ergebnisse bestätigt, die eine erfolgreiche Vorhersage des Ibuprofen-Gehaltes mittels des erstellten Kalibriermodells zeigten. Für Diclofenac-Natrium war die Vorhersagegenauigkeit akzeptabel für höhere Konzentrationen und zeigte deutliche Ungenauigkeiten für die niedrigeren Konzentrationen. Das erstellte Modell unterschätzte die Diclofenac-Konzentration für Konzentrationen von 7,5, 12,5, 17,5 und 27,5 % deutlich. Auch im Versuch R2 wurde der Gehalt für die 10, 15 und 20 % Konzentrationen deutlich unterschätzt. Für Konzentrationen von 30, 35 und 45 % war die Vorhersage angemessen. Diese Beobachtungen entsprachen den vorherigen Ergebnissen. Die ausgelesenen Daten der Dosierer waren in Versuch R1 für die ersten 35 min nicht auswertbar. Das Signal der Datenübertragung wurde offensichtlich gestört, was zu den großen Schwankungen führte.

3.6.3 Evaluierung des Mischverhaltens nach verschiedenen Abschnitten*

Um das Prozessverständnis zu verbessern und mehr Wissen über das Mischverhalten zu generieren, wurde die Mischeffizienz des Zweischneckengranulierers nach verschiedenen Abschnitten des Granulierers untersucht. Da *inline* Raman-Spektren nicht direkt in den verschiedenen Zonen des Schneckengehäuses aufgenommen werden konnten (siehe 3.1.3.1), wurden die Dosierer an verschiedenen Stellen entlang des Schneckengehäuses platziert und die Schneckenkonfiguration entsprechend angepasst, um die verschiedenen Abschnitte zu simulieren und den Einfluss der Knetzonen auf die Mischgüte zu untersuchen. Die Eigenschaften der Granulate wurden in dieser Studie hingegen nicht weiter untersucht. Für Versuch S1 wurde die gesamte Länge des Granulieres ausgenutzt und eine Standardschneckenkonfiguration mit zwei Knetblöcken verwendet (Abbildung 48 a). In Versuch S2 wurde die Länge auf 20 D verkürzt und die Schneckenkonfiguration enthielt entsprechend nur einen Knetblock (Abbildung 48 b), während für S3 ausschließlich Förderelemente verwendet wurden (Abbildung 48 c). Raman-Spektren wurden mit dem in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Messaufbau bei eingeschaltetem Raumlicht aufgenommen und die zugehörigen Arzneistoffkonzentrationen über das in Kapitel 3.3.3.2 beschriebene Kalibriermodell bestimmt.

* Teile der in diesem und dem nachfolgenden Abschnitt aufgeführten Ergebnisse wurden in „Optimisation of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation and its application for process characterisation “ publiziert.

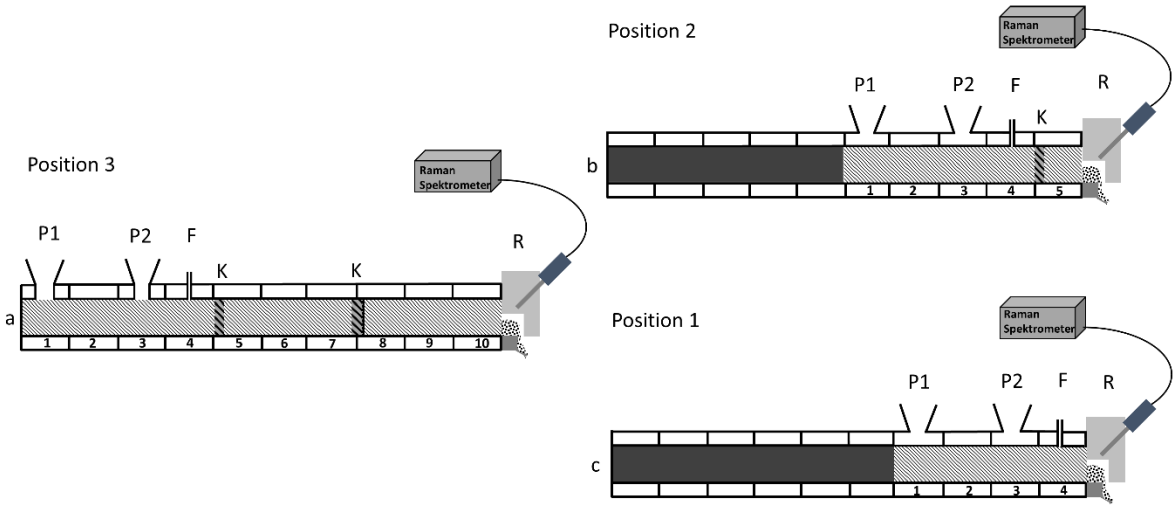

Abbildung 48: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der verschiedenen durchgeführten split feeding Versuche. P: Pulverdosierung, F: Flüssigdosierung, K: Knetzone, R: Raman-Sonde

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die vorhergesagten Konzentrationen und die Referenzwerte gegen die zugehörige Prozesszeit aufgetragen (Abbildung 49). Des Weiteren wurden die Daten der beiden Dosierer mithilfe eines LabView Programms aufgezeichnet. Aus diesen Daten konnte ebenfalls eine resultierende Arzneistoffkonzentration berechnet werden. Um die Menge der Daten zu reduzieren, wurde hier ein gleitender Mittelwert über 10 s gebildet.

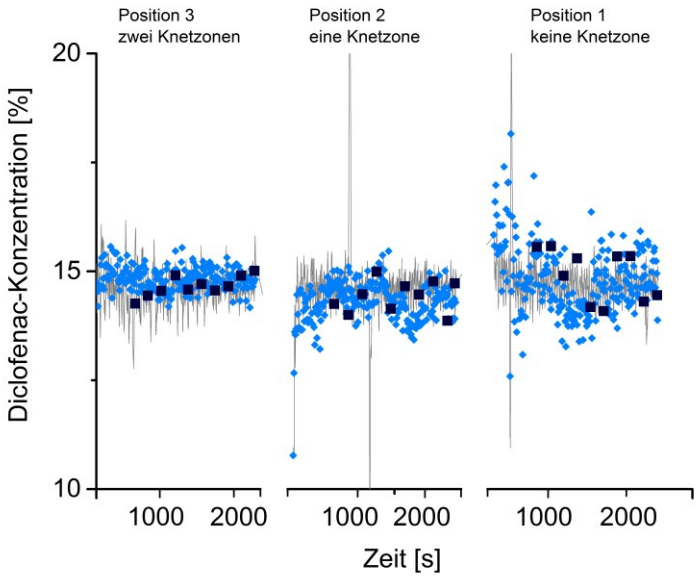

Abbildung 49: Diclofenac-Konzentration berechnet über die verschiedenen Analysenmethoden für S1 (Position 3), S2 (Position 2) und S3 (Position 1). Hellblaue Raute: Raman-Messung; dunkelblaues Quadrat: UV-Messung; graue Linie:Dosierer-Daten

Wie vorab vermutet, hatten die Knetelemente einen großen Einfluss auf die Gleichförmigkeit des Gehaltes der produzierten Granulate. Mit abnehmender Länge des Granulierers und abnehmender Anzahl an Knetblöcken wurden die Schwankungen der gemessenen Konzentrationen größer. Für das gesamte Schneckengehäuse und eine Schneckenkonfiguration mit zwei Knetblöcken wurden lediglich kleine Schwankungen der Konzentration und somit eine gute Mischfähigkeit beobachtet. Für eine verkürzte Länge von 20 D und einen Knetblock war die Mischfähigkeit noch weitgehend akzeptabel, während die gemessenen Konzentrationen deutlich streuten, wenn keine Knetzone verwendet wurde. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde die absolute Standardabweichung des Arzneistoffgehaltes als ein Parameter für die Qualität der Mischung berechnet (Tabelle 14). Zur Berechnung wurden die im Gleichgewichtszustand erhobenen Daten herangezogen. Am Anfang der Versuche S2 und S3 schwankten die vorhergesagten Konzentrationen deutlich mehr, jedoch wurden diese Schwankungen durch eine ungenaue Dosierung der Pulverdosierer verursacht und wurden deshalb nicht mit in die Berechnung einbezogen. Die berechneten absoluten Standardabweichungen bestätigten die Abnahme der Konzentrationsschwankungen in Abhängigkeit von der Anzahl an Knetzonen. Die absolute Standardabweichung war mit 0,25 % für zwei Knetzonen am niedrigsten und nahm mit 0,40 % für eine Knetzone und 0,62 % für eine Konfiguration ohne Knetzonen stetig zu. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls durch die Referenzmessung bestätigt. Demnach sind die Knetzonen nicht nur für eine angemessene Verteilung der Granulierflüssigkeit, sondern auch für eine gute Durchmischung der verschiedenen festen Formulierungskomponenten während eines *split feeding* Prozesses von Bedeutung. Diese Erkenntnis ist wichtig für Prozesse, bei denen mehrere Arznei- oder Hilfsstoffe entlang des Granulierers dosiert werden sollen, da eine Dosierung in die gleiche Zone möglicherweise nicht praktikabel ist.

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der vorhergesagten Konzentrationen und der Referenzwerte für die drei untersuchten Abschnitte S1-S3. n = 162 (Raman); n = 10 (UV)

	Position 3 Zwei Knetzonen		Position 2 Eine Knetzone		Position 1 Keine Knetzone	
	Raman	UV	Raman	UV	Raman	UV
Mittelwert [%]	14,80	14,66	14,36	14,43	14,64	14,90
Absolute Stabw [%]	0,25	0,23	0,40	0,36	0,62	0,60

Die beschriebenen Versuche wurden ebenfalls mit der in Kapitel 3.4 verwendeten pharmazeutischen Zubereitung durchgeführt (Datensätze U1-U3). Dafür wurden die

Hilfsstoffe vorab gemischt und nachfolgend die Hilfsstoffmischung und der Arzneistoff getrennt voneinander dosiert. Das weitere Vorgehen entsprach den Versuchen S1-S3. Die aufgenommenen Raman-Spektren wurden mithilfe des in Kapitel 3.4.4 erstellten Kalibriermodells ausgewertet. Des Weiteren wurde hier die Verweilzeit für die einzelnen Positionen mit Hilfe des ExtruVis Systems bestimmt und die produzierten Granulate wurden nach erfolgter Trocknung auf einer Excenterpresse zu Tabletten verpresst und die Gleichförmigkeit des Gehaltes der Tabletten untersucht. Damit sollte überprüft werden, ob sich die in der Raman-Messung detektierten Schwankungen auch in den Tabletten wiederfinden. Dadurch konnte die Bedeutung der Schwankungen besser eingeordnet werden.

Die Versuche bestätigten die vorherigen Ergebnisse. Auch hier nahm die absolute Standardabweichung zu, wenn die Länge des Granulierers verkürzt und die Anzahl der Knetzonen verringert wurde (Abbildung 50 und Tabelle 15). Das Signal des Dosierers zeigte große Schwankungen während des Prozesses, was die weit ausschlagenden Diclofenac-Konzentrationen berechnet basierend auf den Dosiererdaten erklärt. Eine Überprüfung des Dosierers hat jedoch gezeigt, dass die richtige Menge Pulver dosiert wurde und auch die Ergebnisse der Raman- und UV-Messung bestätigten, dass die Menge dem Sollwert entsprach. Deshalb ist davon auszugehen, dass das Signal der Datenübertragung gestört wurde, weshalb die Daten nicht zuverlässig waren.

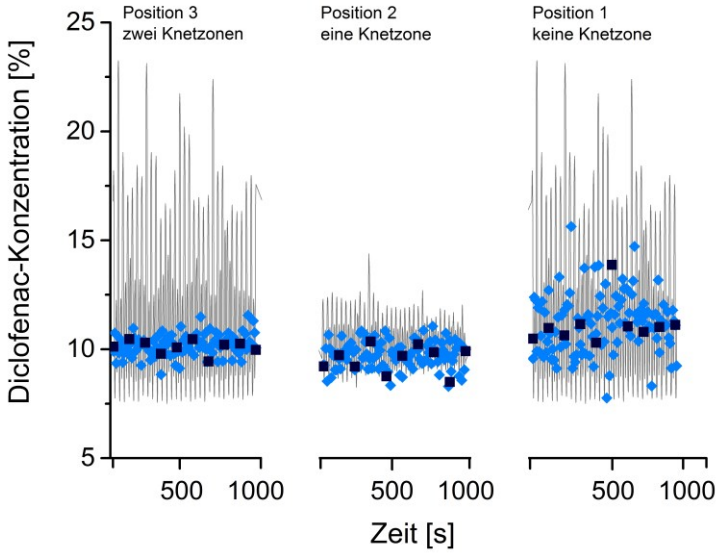

Abbildung 50: Diclofenac-Konzentrationen der verschiedenen Analysenmethoden für die Versuche U1-U3. Hellblaue Raute: Raman-Messung; dunkelblaues Quadrat: UV-Messung; graue Linie: Dosierer-Daten

Die größeren Konzentrationsschwankungen konnten auch in den hergestellten Tabletten wiedergefunden werden. Zwar entsprachen alle Tabletten aus den drei verschiedenen

Granulaten den Anforderungen des Arzneibuches an die Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen [103], dennoch wurden für die Granulate, die mit nur einer oder keiner Knetzone produziert wurden, größere AV-Werte bestimmt. So lag der AV-Wert für Position 3 bei 2,26, für Position 2 bei 5,20 und für Position 1 bei 10,61 (Tabelle 15).

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass der vorhergesagte Gehalt für Position 2 im Mittel bei 9,74 %, also leicht unter dem eingestellten Wert von 10 %, lag und der mittlere Gehalt der Tabletten nachfolgend mit 97,28 % bestimmt wurde, während der mittlere vorhergesagte Gehalt für Position 1 bei 11,17 % lag und der mittlere Gehalt der Tabletten 107,79 % betrug. Dies zeigt deutlich die Anwendbarkeit der Raman-Messung zur Kontrolle des Granulierprozesses und zur Vorhersage des Gehaltes in den nachfolgend produzierten Tabletten.

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der vorhergesagten Konzentrationen und der Referenzwerte für die drei untersuchten Abschnitte U1-U3. n = 109 (Raman); n = 10 (UV) AV-Werte für die Tabletten aus den drei unterschiedlichen Granulaten. n = 10

		Position 3		Position 2		Position 1	
		Zwei Knetzonen		Eine Knetzone		Keine Knetzone	
		Raman	UV	Raman	UV	Raman	UV
Granulat	Mittelwert [%]	10,17	10,11	9,74	9,54	11,17	11,14
	Absolute Stabw [%]	0,48	0,31	0,60	0,61	1,33	1,00
Tablette	AV-Wert	2,26		5,20		10,61	
	Mittlerer Gehalt [%]	100,56		97,28		107,79	
	Absolute Stabw [%]	0,94		1,66		1,84	

Die berechnete mittlere Verweilzeit unterschied sich für die drei untersuchten Positionen deutlich. Für Position 3 wurde eine mittlere Verweilzeit von 42,4 s, für Position 2 von 23,1 s und für Position 1 von 17,6 s bestimmt. Mit einer Reduzierung der Länge des Granulierers und der Abnahme an Knetzonen stand somit auch weniger Zeit für die Durchmischung und Agglomeration der Formulierungskomponenten zur Verfügung.

3.6.4 Evaluierung des Mischverhaltens in Abhängigkeit verschiedener Prozessparameter

Bisher wurden alle Versuche zur Mischeffizienz mit gleichbleibenden Prozessparametern durchgeführt. Um den Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Mischeffizienz

systematisch zu untersuchen, wurde für jeden im vorherigen Kapitel beschriebenen Abschnitt ein vollfaktorieller 3^2 statistischer Versuchsplan mit drei Wiederholungen des Zentralpunktes erstellt (Datensätze T1 bis T3, Kapitel 6.2.4.4 Tabelle 28). Damit sollten die Einflüsse des Füllgrads und der Schneckengeschwindigkeit auf die Qualität der Mischung untersucht werden. Um die Auswertung möglichst einfach zu halten, wurde der *specific feed load* (SFL), der von Kolter et al. eingeführt wurde [104], als Surrogatparameter für den Füllgrad verwendet, da Meier et al. gezeigt haben, dass der SFL mit dem volumetrischen Füllgrad korreliert [37]. Als Zielgröße für die Qualität der Mischung wurde, wie bereits vorher beschrieben, die absolute Standardabweichung berechnet. Für die Berechnung wurden die im Gleichgewichtszustand erhobenen Daten verwendet. Außerdem wurde ein relativer Fehler bezogen auf den Referenzwert berechnet, um zu zeigen, dass der vorhergesagte Wert unabhängig von den Prozessparametern richtig war. Da der relative Fehler für alle Granulationen unter 10 % war, können die vorhergesagten Werte als richtig angenommen werden. Für jeden untersuchten Abschnitt wurden die vorhergesagten Werte und die Referenzwerte gegen die Prozesszeit aufgetragen (Abbildung 51). Die Pfeile zeigen dabei an, wann die Prozessbedingungen verändert wurden.

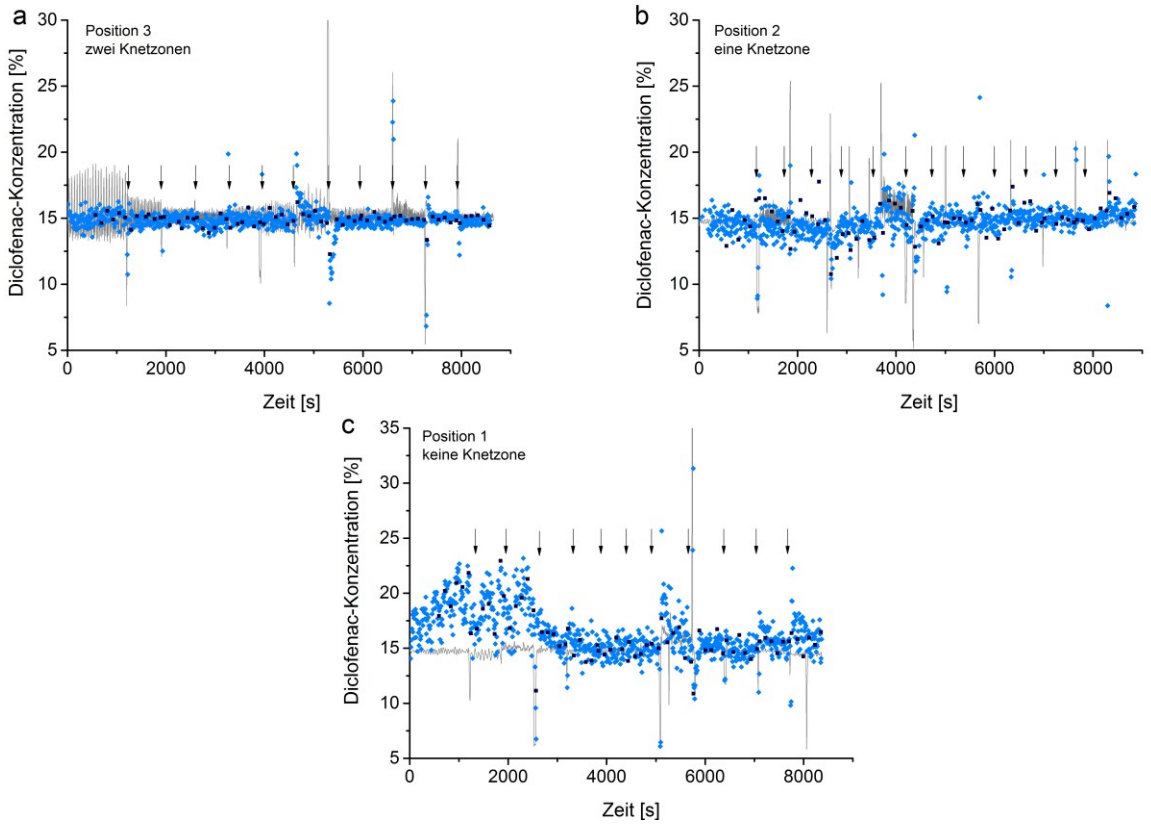

Abbildung 51: Diclofenac-Konzentrationen der verschiedenen Analysenmethoden für die Evaluierung der Abhängigkeit von verschiedenen Prozessparametern (a) T1 (b) T2 (c) T3. Hellblaue Raute: Raman-Messung; dunkelblaues Quadrat: UV-Messung; graue Linie:Dosierer-Daten

In Abbildung 51 c sind in den ersten 3000 s große Schwankungen erkennbar, welche vermutlich durch ein ungenaues Dosieren des verwendeten gravimetrischen Dosierers verursacht wurden, obwohl dieses nicht im Signal des Dosierers wiedergefunden werden konnte. Deshalb sollten diese Messwerte mit Vorsicht betrachtet werden. Der Vergleich der drei Abbildungen a bis c in Abbildung 51 zeigt deutlich, was bereits zuvor diskutiert wurde: Die Schwankungen der gemessenen Arzneistoffkonzentration nehmen mit abnehmender Länge des Granulierers und abnehmender Anzahl an Knetzonen zu. Dies zeigte sich auch in den berechneten Standardabweichungen, welche von Position 1 zu Position 3 für alle durchgeführten Experimente (außer N 10) abnahmen (Tabelle 16). Trotzdem resultierte die Auswertung des statistischen Versuchsplans in einem schlechten Modell, da die Beziehung zwischen den Faktoren und Zielgrößen schwach war. Die höchste Streuung konnte für den geringsten Füllgrad und die geringste Schneckendrehzahl und die geringste Streuung für höhere Füllgrade und Schneckendrehzahlen beobachtet werden. Trotzdem wurde die Qualität der Mischung für Position 3 nur minimal durch den Füllgrad beeinflusst. Für die anderen beiden Positionen beeinflusste die Schneckendrehzahl die Qualität der Mischung leicht (Effekt-Plots siehe Anhang, Abbildung 56). Diese Beobachtungen konnten jedoch nicht durch die Referenzwerte bestätigt werden. Die absolute Standardabweichung der UV-Werte wurde nicht signifikant durch den Füllgrad oder die Schneckendrehzahl beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass die Streuung nicht aufgrund einer besseren Durchmischung abnahm, sondern dadurch, dass ein höheres Probenvolumen vermessen wurde. Weiterführende Studien haben gezeigt, dass das vermessene Probenvolumen ebenfalls mit einem höheren Füllgrad und einer höheren Schneckendrehzahl zunimmt, da die Granulate den Granulierer mit einer höheren Geschwindigkeit verlassen und somit mehr Granulat pro Zeiteinheit die Raman-Sonde passiert. Demnach beeinflussen die Prozessparameter Füllgrad und Schneckendrehzahl die Qualität der Mischung in einem geringeren Ausmaß als die Länge des Granulierers und die Anzahl an Knetzonen. Weiter zeigten einige Granulate eine große Streuung des Arzneistoffgehaltes (Stabw $\geq$ 0,94 %), was sich in nachfolgend produzierten Tabletten widerspiegeln könnte und so zu einer schlechten Gleichförmigkeit des Gehaltes in den einzeldosierten Arzneiformen führen würde. Eine durchgehend gute Qualität der Mischung konnte nur erreicht werden, wenn die ganze Länge des Granulierers genutzt wurde und zwei Knetzonen verwendet wurden. Für *split feeding* Applikation ist eine Länge des Granulierers von 12-20 D, wie sie häufig für die Granulation verwendet wird, somit eventuell nicht ausreichend.

Tabelle 16: Eingestellte Faktoren und resultierende Zielgrößen für den Datensatz T1 – T3 (n = 60 (Raman); n = 6 (UV)).

	Faktoren		Raman			UV		
Versuch	SFL [g]	Schnecken-drehzahl [1/min]	Absolute Standard-abweichung [%] Position 3	Absolute Standard-abweichung [%] Position 2	Absolute Standard-abweichung [%] Position 1	Absolute Standard-abweichung [%] Position 3	Absolute Standard-abweichung [%] Position 2	Absolute Standard-abweichung [%] Position 1
N 1	0,134	150	0,51	1,35	2,19	0,48	1,32	1,57
N 2	0,20	150	0,44	1,01	2,08	0,13	0,99	1,49
N 3	0,267	150	0,19	0,80	1,47	0,55	1,28	0,83
N 4	0,134	300	0,44	0,67	1,94	0,22	1,65	2,55
N 5	0,20	300	0,29	0,62	1,64	0,34	1,26	1,44
N 6	0,267	300	0,33	0,51	0,83	0,18	0,96	0,62
N 7	0,134	450	0,33	0,64	0,84	0,34	0,97	0,70
N 8	0,20	450	0,41	0,61	1,24	0,27	0,53	0,81
N 9	0,267	450	0,17	0,32	0,57	0,32	1,08	1,07
N 10	0,20	300	0,38	1,09	0,93	0,39	1,00	0,48
N 11	0,20	300	0,28	0,98	1,06	0,58	0,38	1,19
N 12	0,20	300	0,35	0,46	0,78	0,14	0,57	0,53

3.6.5 Zusammenfassung

Die verschiedenen *split feeding* Untersuchungen haben allesamt gezeigt, dass der Zweischneckengranulierer eine gute Mischeffizienz besitzt und mehrere Formulierungskomponenten somit gleichzeitigt gemischt und granuliert werden können. Lediglich das Dosieren von Arznei- oder Hilfsstoffen ganz am Ende des Dosierers könnte aufgrund der fehlenden Strecke zu einer ungenügenden Durchmischung führen. Außerdem sind Knetzonen für eine angemessene Qualität der Mischung zwingend notwendig. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche Rolle die Länge des Granulierers spielt und ob auch eine kürzere Schnecke mit zwei Knetzonen zu akzeptablen Ergebnissen führt. Diese Erkenntnisse sind wichtig für die Entwicklung vollständig kontinuierlicher Prozesslinien, bei denen auf eine chargenweise Vormischung verzichtet werden soll.

4 Zusammenfassung

Derzeit findet ein Umdenken in der pharmazeutischen Industrie statt, das sich mit der Umstellung der traditionellen ansatzweisen Herstellung auf kontinuierliche Produktionswege für Arzneiformen befasst. Für diese innovativen Herstellungstechnologien werden dringend neue *inline* Analysenmethoden benötigt, die eine schnelle und nicht zerstörende Qualitätskontrolle der produzierten Güter erlauben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Raman-Spektroskopie als ein mögliches PAT-Werkzeug zur *inline* Gehaltsbestimmung von Arzneistoffen während der Zweischneckengranulation untersucht. Damit wurde einerseits die Eignung Raman-spektroskopischer Methoden zur *inline* Qualitätskontrolle evaluiert und außerdem der Zweischneckengranulierprozess mithilfe der entwickelten Methoden in Bezug auf seine Mischeffizienz charakterisiert.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung des ausgewählten Arzneistoffes in einer Pulvermischung untersucht. Es konnte ein externes Kalibriermodell erstellt werden, das jedoch noch erhebliche Ungenauigkeiten zeigte. Dennoch konnte die Eignung der Raman-Spektroskopie zur Quantifizierung von Arzneistoffen bestätigt werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollten weiter auf eine *inline* Messung übertragen werden. Dazu sollte die MR-Sonde des Raman-Spektrometers mittels eines speziellen Ports in das Schneckengehäuse des Zweischneckengranulierers eingebaut werden. Die Implementierung der Raman-Sonde in den Prozess bereitete jedoch erhebliche Schwierigkeiten und war aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Zunächst wurde die Sonde durch das Granulat verschmutzt, weshalb nachfolgend ein Druckluft-Anschluss zur Reinigung der Sonde implementiert wurde. Dies führte jedoch zu weiteren Problemen. Aus diesen Gründen wurde die Messung nachfolgend am Ende des Granulierers durchgeführt, wozu die Raman-Sonde in einer selbst entwickelten Konstruktion direkt hinter dem Auslass des Granulierers befestigt wurde. Anstatt der MR-Sonde wurde nachfolgend die PhAT-Sonde verwendet, da diese einen größeren Laserspot-Durchmesser hat, was aufgrund des größeren vermessenen Probenvolumens zu einer stabileren Kalibrierung führen sollte. Mit dem neuen Messaufbau war es möglich, auswertbare *inline* Raman-Spektren aufzunehmen.

In weiteren Versuchsreihen wurden mit der entwickelten Messmethode *inline* Raman-Spektren für zwei verschiedene Arzneistoffe aufgenommen und für beide Arzneistoffe konnten PLS Kalibriermodelle erstellt werden, die angemessene Vorhersagefehler zeigten. Jedoch erwies sich die Modellerstellung für Diclofenac-Natrium schwieriger als für Ibuprofen. Während dieser Versuche zeigte sich, dass vor allem die während der Granulation

eingestellte Feuchte einen Einfluss auf die Intensität der aufgenommenen Raman-Spektren hatte. Außerdem war die Raman-Messung lichtempfindlich. Die Modelle hatten zwar angemessene Vorhersagefehler, jedoch wären die Fehler für eine Bestimmung der Gleichförmigkeit des Gehalts der produzierten Granulate noch zu hoch. Weiter zeigte auch die entwickelte Konstruktion zur Implementierung der Raman-Sonde einige Schwächen.

So wurde im Folgenden versucht, die Konstruktion weiter zu optimieren, um so eine bessere Vorhersagegenauigkeit zu erreichen. Dazu wurde zum einen die Stabilität der Konstruktion erhöht, um einen reproduzierbaren Aufbau zu gewährleisten und zum anderen der Einbauwinkel der Raman-Sonde verändert, um das Signal-Rausch Verhältnis zu verbessern. Weiter sollte in diesem Teil untersucht werden, ob mit dieser optimierten Konstruktion zumindest eine Messung bei Raumlicht möglich ist. Dazu wurden verschiedene Datensätze im Dunkeln und bei Raumlicht aufgenommen und aus den Daten PLS Modelle erstellt, welche anschließend verglichen wurden. Ein Vergleich mit den ersten Modellen hat gezeigt, dass die Vorhersagefehler erheblich verbessert werden konnten und außerdem eine Messung bei Raumlicht ohne Verluste in der Genauigkeit der Vorhersage möglich war. Die Art des Einbaus der Raman-Sonde in den Prozess beeinflusste folglich maßgeblich die erhaltenen Ergebnisse und ist somit ein kritischer Schritt bei der Implementierung von PAT-Werkzeugen.

Um zu zeigen, dass die Raman-Methode auch für pharmazeutische Zubereitung anwendbar ist, wurden die vorherigen Versuche mit physikalischen Mischungen, die neben dem Arzneistoff Diclofenac-Natrium und dem Füllstoff Laktose-Monohydrat auch noch ein Binde- und Zerfallshilfsmittel enthielten, wiederholt. Die weiteren Matrixbestandteile hatten keinen Einfluss auf die Quantifizierung des Arzneistoffes.

Die vorherigen Versuche bestätigten die erstmalige und erfolgreiche Implementierung der Raman-Spektroskopie in den Zweischneckengranulierprozess. Um die Entwicklung der Methode vollständig abzuschließen, sollte weiter eine Validierung der Methode nach gültigen Rahmenvorschriften durchgeführt werden. Dabei müssen sowohl die analytische Methode, als auch das Vorhersagemodell validiert werden. Es wurden nicht alle Validierungsparameter erfüllt, jedoch waren die Ergebnisse vielversprechend und es wird angenommen, dass durch kleine Veränderungen der analytischen Methode, u.a. einer Erhöhung der Belichtungszeit, eine vollständige Erfüllung aller Validierungsparameter erreicht werden kann. Weiter könnte das Vorhersagemodell durch weitere Eingrenzungen des spektralen Bereiches möglicherweise nochmals optimiert werden.

Die Anwendbarkeit der entwickelten Methoden und Modelle wurde während mehrerer *split*

feeding Prozesse bestätigt. Weiter wurde auch die Mischeffizienz des Granulierers mithilfe der Raman-Spektroskopie untersucht. Alle Versuche belegten die gute Mischeffizienz des Zweischneckengranulierers. Zudem konnte gezeigt werden, dass vor allem die Knetzonen einen erheblichen Einfluss auf die Qualität der Mischung hatten, Prozessparameter wie der Füllgrad und die Schneckendrehzahl die Mischgüte hingegen nur minimal beeinflussten. Diese Ergebnisse sind vielversprechend und belegen, dass für einfache Mischungen auf Vormischungen verzichtet werden kann und so Fertigungslinien möglicherweise verkürzt werden können.

Die Raman-Spektroskopie ist ein vielversprechendes PAT-Werkzeug für eine *inline* Qualitätskontrolle. Der Arzneistoffgehalt produzierter Granulate konnte mittels der Raman-Spektroskopie *inline* bestimmt werden. Dennoch sind weitere Optimierungen der Methode für einen Einsatz zur prozessanalytischen Qualitätskontrolle nötig, um die Vorhersagefehler zu minimieren und so Analysenergebnisse erhalten zu können, die mit *offline* gewonnenen Ergebnissen der Qualitätskontrolle vergleichbar sind.

5 Summary

Currently, a change in thinking is taking place in the pharmaceutical industry. The traditionally batch-wise production of pharmaceuticals should be switched to a more effective continuous production. So there is also a high demand on new non-destructive and fast inline analysis methods for a continuous process control of the new manufacturing technologies. Therefore, in this work Raman spectroscopy was evaluated as a PAT tool for a continuous API quantification during twin-screw wet granulation. In a second part the mixing efficiency of the twin-screw granulator was evaluated using the developed Raman method.

First, the suitability of Raman spectroscopy for an API quantification in the selected powder mixture was investigated. It was possible to built an external PLS calibration model, which however showed considerable inaccuracies. But nevertheless it was possible to quantify the API using Raman spectroscopy. This offline result should be further transmitted to an inline measurement. Therefore, a MR probe was implemented in the twin-screw granulator by a particular port. But an inline measurement was not possible because of several problems with this installation. Hence, the Raman probe, now a PhAT probe, was attached in a own created construction directly in front of the granulator outlet. The PhAT probe had a greater laser spot size, which resulted in a higher sampling volume and thus, in a more robust calibration. With this new measurement setup inline Raman spectra of the granules could be collected and evaluated.

With this developed method inline Raman spectra of granules containing ibuprofen or diclofenac-sodium were collected and for both APIs PLS calibration models were built. The developed models showed appropriate predictive errors. However, the model building for diclofenac was more complicated than for ibuprofen. During these experiments it was shown that the liquid to solid ratio had a great impact on the resulting Raman spectra. Furthermore, light disturbed the Raman measurement. Besides these problems the construction itself had still some limitations. Because of this the predictive error was still too high for a content uniformity testing.

Thus, the construction for the implementation of the Raman probe was optimised to increase the predictive performance. The construction was optimised regarding its stability to ensure a reproducible measurement setup. Further, the installation angle of the probe was changed from 90 to 60 degrees to improve the signal to noise ratio. The construction was also optimised regarding the light transmission to allow a measurement in interior light. Different PLS models were built with spectra collected in the dark or in interior light and compared

among each other and with the first developed calibration model. This comparison proved that the predictive performance could be clearly increased and a measurement in interior light was possible without a loss in the predictive performance. Consequently, the implementation of the Raman probe in the process stream has a great impact on the following results and is a critical step in the development of new PAT tools.

For all experiments up to now only binary mixtures were investigated. To prove that the developed method is also feasible for pharmaceutical formulations, the previous experiments were rerun. The results showed that an additional binder and disintegrant had no influence on the model building and the predictive performance.

An inline Raman spectroscopic method for continuous API quantification during twin-screw wet granulation was developed successfully. To complete the development of the spectroscopic method a validation was performed regarding the ICH validation guideline in cooperation with the European pharmacopoeia monograph 5.21. Not all validation parameters were passed, nevertheless the results were promising and it was assumed that with small changes of the analytical method better results could be achieved and the validation would be passed.

Further, the applicability of the developed method and built models was proven during different split feeding applications. The developed method was used to evaluate the mixing ability of the twin-screw granulator and all performed experiments proved the high mixing efficiency of the twin-screw granulator. Especially the kneading zones had a great impact on the quality of the mixture, while the fill-level and the screw speed were only of minor influence. Thus, it can be concluded that a pre-blending step is not necessary for simple mixtures.

The results of the present work showed that Raman spectroscopy is a promising PAT tool for a continuous inline API quantification during twin-screw wet granulation. Nevertheless, the developed method and models have to be further optimised for an inline content uniformity testing.

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien

6.1.1 Arzneistoffe

Arzneistoff	Handelsprodukt	Charge	Hersteller	Versuchsreihe
Ibuprofen	Ibuprofen 50 Ph. Eur. / USP / JP	IB1Y0082	BASF	A-G Q
Diclofenac-Natrium	Diclofenac Sodium Ph. Eur.	PDFS190190	Unique Chemicals	H-K R-T
Diclofenac-Natrium	Diclofenca Sodium Ph. Eur.	RDS/1807/0136A	Amoli Organics	L-P U

6.1.2 Hilfsstoffe

Hilfsstoff	Handelsname	Hersteller	Versuchsreihe
Laktose-Monohydrat	Granulac® 200	Meggle	A-U
Hochdisperses Siliziumdioxid	Aerosil® 200 VV Pharma	Evonik	F-U
Natriumhydroxid (NaOH)	Sodium hydroxide Pellets p.A.	AppliChem	Methoden
Demineralisiertes Wasser	Ph. Eur.		Methoden
Natriumstärkeglykolat	Explotab®	JRS	L-P U
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	Pharmacoat® 603	ShinEtsu	L-P U
Amaranth	Amaranth 85 E 123	BASF	Methoden
Magnesiumstearat	-	Welding GmbH	Zur Tablettierung

6.2 Methoden

6.2.1 Herstellungsmethoden

6.2.1.1 Sieben und Mischen

Die verwendeten Arzneistoffe und das Aerosil® wurden vor der Verarbeitung durch ein 315 µm Sieb gegeben. Die Herstellung der physikalischen Mischungen für die externe Kalibrierung erfolgte durch 20-minütiges Mischen in einem Turbula®-Mischer (T2C, W.A. Bachofen, Schweiz). Die Ansatzgröße betrug 10 g. Für die Granulation wurden Ansätze zwischen 1,5 und 2,5 kg eingewogen und die physikalischen Mischungen durch Mischen in einem Freifallmischer (Labormischer LM 40, L.B. Bohle, Deutschland) hergestellt. Es wurde jeweils 20 min bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 25-30 U/min gemischt. Vor den *split feeding* Versuchen (Q-U) wurden Laktose-Monohydrat und die Arzneistoffe ebenfalls mit 0,2 % Aerosil® versetzt und 20 min gemischt.

Die genauen Zusammensetzungen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten physikalischen Mischungen können den folgenden Tabellen entnommen werden.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Proben für die externe Kalibrierung der MR-Sonde.

Versuchsreihe	Kalibrierprobe	Ibuprofen [%; m/m]	Laktose-Monohydrat [%; m/m]
A	1	2,5	97,5
	2	5	95
	3	7,5	92,5
	4	10	90
	5	12,5	87,5
	6	15	85
	7	20	80
	8	25	75
	9	30	70
	10	35	65
	11	40	60
	12	45	55
	13	50	50

Tabelle 18: Zusammensetzung der Proben für die externe Kalibrierung der PhAT-Sonde.

Versuchsreihe	Kalibrierprobe	Ibuprofen [%; m/m]	Laktose-Monohydrat [%; m/m]
E	1	2,5	97,5
	2	5	95
	3	7,5	92,5
	4	10	90
	5	12,5	87,5
	6	15	85
	7	20	80
	8	25	75
	9	30	70
	10	35	65

Tabelle 19: Zusammensetzung der Proben für die Erstellung eines inline Kalibriermodells für Ibuprofen.

Versuchsreihe	Probe	Ibuprofen [%; m/m]	Laktose-Monohydrat [%; m/m]	Aerosil® [%, m/m]
F1	Kalibrierprobe			
	1	5	94,8	0,2
	2	10	89,8	0,2
	3	15	84,8	0,2
	4	20	79,8	0,2
	5	25	74,8	0,2
	6	30	69,8	0,2
	7	40	59,8	0,2
	8	50	49,8	0,2
F2	Testprobe			
	1	7,5	92,3	0,2
	2	12,5	87,3	0,2
	3	17,5	82,3	0,2

Tabelle 20: Zusammensetzung der Proben für die Erstellung eines inline Kalibriermodells für Diclofenac-Natrium.

Versuchsreihe	Probe	Diclofenac-Natrium [%; m/m]	Laktose-Monohydrat [%; m/m]	Aerosil® [%, m/m]
H1	Kalibrierprobe			
	1	5	94,8	0,2
	2	10	89,8	0,2
	3	15	84,8	0,2
	4	20	79,8	0,2
	5	25	74,8	0,2
	6	30	69,8	0,2
	7	40	59,8	0,2
	8	50	49,8	0,2
H2	Testprobe			
	1	7,5	92,3	0,2
	2	12,5	87,3	0,2
	3	17,5	82,3	0,2
	4	35	64,8	0,2
	5	45	54,8	0,2

Tabelle 21: Zusammensetzung der Proben für die Erstellung eines optimierten Kalibriermodells.

Versuchsreihe	Probe	Diclofenac-Natrium [%; m/m]	Laktose-Monohydrat [%; m/m]	Aerosil® [%, m/m]
I1, J1, K	Kalibrierprobe			
	1	5	94,8	0,2
	2	10	89,8	0,2
	3	15	84,8	0,2
	4	20	79,8	0,2
	5	25	74,8	0,2
I2, J2	Testprobe			
	1	7,5	92,3	0,2
	2	12,5	87,3	0,2
	3	17,5	82,3	0,2
	4	22,5	77,3	0,2

Tabelle 22: Proben für die Modellerstellung für eine pharmazeutische Zubereitung.

Versuchsreihe	Probe	Diclofenac-Natrium [%; m/m]	Laktose-Monohydrat [%; m/m]	Natrium - Stärkeglykolat [%; m/m]	HPMC [%; m/m]	Aerosil® [%, m/m]
L1, M1	Kalibrierprobe					
	1	5	86,8	5	3	0,2
	2	10	81,8	5	3	0,2
	3	15	76,8	5	3	0,2
	4	20	71,8	5	3	0,2
	5	25	66,8	5	3	0,2
L2, M2	Testprobe					
	1	7,5	84,3	5	3	0,2
	2	12,5	79,3	5	3	0,2
	3	17,5	74,3	5	3	0,2
	4	22,5	69,3	5	3	0,2

Tabelle 23: Zusammensetzung der Proben für die Untersuchungen zur Validierung.

Versuchsreihe	Probe	Diclofenac-Natrium [%; m/m]	Laktose-Monohydrat [%; m/m]	Na-Stärkeglykolat [%; m/m]	HPMC [%; m/m]	Aerosil® [%, m/m]
N1 – N3	1	5	86,8	5	3	0,2
O1 – O3	2	7,5	84,3	5	3	0,2
	3	12,5	79,3	5	3	0,2
	4	17,5	74,3	5	3	0,2
	5	22,5	69,3	5	3	0,2
	6	25	66,8	5	3	0,2

6.2.1.2 Dosieren

Die physikalischen Mischungen wurden manuell in einen gravimetrischen Dosierer (K-CL-24-KT 20, K-Tron, Schweiz) überführt. Der Dosierer wurde vor jedem Versuch intern kalibriert. Für die *split feeding* Versuche wurde ein zweiter Dosierer (K-CL-KT20, K-Tron, Schweiz) verwendet.

6.2.1.3 Feuchtgranulieren

Alle Feuchtgranulationen wurden mit einem Pharma 16 Zweischneckengranulierer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Der Zweischneckengranulierer hat einen Schneckendurchmesser von 16 mm und eine Länge von 40 x D. Als Granulierflüssigkeit wurde bei allen Versuchen demineralisiertes Wasser verwendet, das

über eine Mikrozahnringpumpe (MZP 7205, HNP-Mikrosysteme, Schwerin, Deutschland) mittels einer Kapillare mit einem inneren Durchmesser von 0,12 mm dosiert wurde. Die jeweiligen Prozessparameter sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Die Temperatur des Schneckengehäuses betrug für alle Versuche 30 °C. Weiter wurde immer eine Standard-Schneckenkonfiguration verwendet, die sich für die verschiedenen Versuche leicht unterschied.

Schneckenkonfigurationen:

Versuchsreihe B und C: 4 D Förderelemente (hohe Ganghöhe) – 12 D Förderelemente (normale Ganghöhe) – 6 (1,5 D) Knetelemente 60° - 22,5 D Förderelemente (normale Ganghöhe).

Versuchsreihe F und H: 1 Knetelement - 4 D Förderelemente (hohe Ganghöhe) – 6 D Förderelemente (normale Ganghöhe) – 5 (1,25 D) Knetelemente 60° - 10 D Förderelemente (normale Ganghöhe) – 6 (1,5 D) Knetelemente 60° - 1 D distributives Mischelement – 16 D Förderelemente (normale Ganghöhe).

Versuchsreihe I und J: 1 Knetelement - 4 D Förderelemente (hohe Ganghöhe) – 4 D Förderelemente (normale Ganghöhe) – 5 (1,25 D) Knetelemente 60° - 10 D Förderelemente (normale Ganghöhe) – 6 (1,5 D) Knetelemente 60° - 1 D distributives Mischelement – 18 D Förderelemente (normale Ganghöhe).

Versuchsreihen L, M, N und O: 1 Knetelement - 4 D Förderelemente (hohe Ganghöhe) – 6 D Förderelemente (normale Ganghöhe) – 5 (1,25 D) Knetelemente 60° - 10 D Förderelemente (normale Ganghöhe) – 6 (1,5 D) Knetelemente 60° - 17 D Förderelemente (normale Ganghöhe).

Für die *split feeding* Versuche wurde der Granulierer mit einem zweiten gravimetrischen Dosierer ausgestattet. Laktose-Monohydrat wurde immer zuerst in den Granulierer dosiert und der jeweilige Arzneistoff zwei Zonen dahinter. Die Dosierraten der beiden Dosierer wurden so justiert, dass jeweils die gewünschte Arzneistoffkonzentration erreicht wurde. Die Schneckenkonfiguration wurde für die s*plit feeding* Versuche folgendermaßen angepasst: 1 Knetelement - 4 D Förderelemente (hohe Ganghöhe) - 12 D Förderelemente (normale Ganghöhe) - 5 Knetelemente 60° (1,25 D) - 10 Förderelemente - 6 Knetelemente 60° (1,5 D) - 1 D distributibves Mischelement - 10 D Förderelemente. Für die Versuche S2 und U2 wurde die Länge des Granulieres verkürzt und folgende Schneckenkonfiguration verwendet: 1 Knetelement - 4 D Förderelemente (hohe Ganghöhe) - 12 D Förderelemente (normale Ganghöhe) - 5 Knetelemente 60° (1,25 D) - 2 D Förderelemente. Für die Versuche S3 und

U3 wurde die Länge des Granulierers um weitere 4 D verkürzt und eine Schnecke mit ausschließlich Förderelementen verwendet.

Die genauen Prozesseinstellungen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche können Tabelle 24 und Tabelle 25 entnommen werden. Alle Prozessdaten wurden mithilfe des Programms Labview (Labview 2009 SP 1, National Instruments, Texas, USA) aufgezeichnet.

Tabelle 24: Prozessparameter der Granulation und der Raman-Messung für die Granulationen der physikalischen Mischungen.

		Prozessparameter der Granulation					Einstellungen der Raman-Messung			
Ver-suchs-reihe	AS	Schnecken-drehzahl [1/min]	Temp. [°C]	Pulverdosierrate [g/min]	Flüssigdosierrate [g/min]	Feuchte	Belichtungs-zeit [s]	Intervall [s]	Anzahl Spektren pro Konzentrationslevel	Licht
A	Ibuprofen	externe Kalibrierung MR-Sonde					5 bis 10	–	10	Dunkel
B		150	30	40	3	0,075	15	60	20	
C		100	30	40	3	0,075	15	60	20	
		125	30	40	3	0,075	15	60	20	
		150	30	40	3	0,075	15	60	20	
D		statische Messung					15	60	10	
E		externe Kalibrierung PhAT-Sonde					5	–	10	
F1		150	30	40	3	0,075	5	45	20	
F2										
G		siehe Kapitel 6.2.4.4								
H1	Diclofenac-Natrium	150	30	40	3 – 7,2	0,075 - 0,18	2	30	20	
H2										
I1		150	30	40	4,6	0,115	2	20	25	
I2										
J1		150	30	40	4,6	0,115	2	20	25	Hell
J2										

K										Tages-licht
L1		150	30	40	4,6	0,115	2	20	25	Dunkel
L2										
M1		150	30	40	4,6	0,115	2	20	25	Hell
M2										
N1		150	30	40	4,6	0,115	2	20	25	Dunkel
N2										
N3										
O1										Hell
O2										
O3										
P		siehe Kapitel 6.2.3.5					2	10	60	Hell/ Dunkel

Tabelle 25: Prozessparameter der Granulation und Raman-Messungen für die split feeding Versuche.

		Prozessparameter der Granulation						Einstellungen der Raman-Messung			
Ver-suchs-reihe	AS	Schnecken-drehzahl [1/min]	Temp. [°C]	Pulverdosier-rate HS [g/min]	Pulverdosier-rate AS [g/min]	Flüssigdosier-rate [g/min]	Feuchte	Belichtungs-zeit [s]	Intervall [s]	Anzahl Spektren	Licht
Q1	Ibuprofen	150	30	37	3	3	0,075	5	10	120	Dunkel
				35	5						
				33	7						
Q2				32	8						
				28	12						
				24	16						
				20	20						
R1	Diclofenac-Natrium	150	30	37	3	3	0,075	2	10	120	
				35	5						
				33	7						
				29	11						
				26	14	5,6	0,14	2	10		
				22	18	6,8	0,17				
R2				36	4	3	0,075				
				32	8						
				28	12	5,2	0,13				

				34	6	3	0,075				
S1		150	30	34	6	4,6	0,115	2	10	162	Hell
S2											
S3											
T		siehe Kapitel 6.2.4.4									
U1		150	30	36	4	4,6	0,115	2	10	109	Hell
U2											
U3											

.

6.2.1.4 Trocknen

Alle Proben für die UV-Vis Messungen wurden 48 Stunden bei 40 °C in einem Umlufttrockenschrank (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) getrocknet. Die Granulate zum Verpressen wurden 24 Stunden bei 40 °C im Umlufttrockenschrank getrocknet.

6.2.1.5 Tablettieren

Aus den produzierten Granulaten der Versuche U1 – U3 wurden Tabletten auf einer Excenter-Tablettenpresse (Korsch EK 0, Korsch, Deutschland) hergestellt. Dazu wurde ein biplaner Stempelsatz mit einem Durchmesser von 10 mm genutzt. Es wurden ein Tablettengewicht von 252,5 mg und ein Pressdruck von 11 kN eingestellt. Vor der Tablettierung wurden die Granulate mit 1 % Magnesiumstearat versetzt und 5 Minuten in einem Röhnradmischer gemischt.

6.2.2 Analytische Methoden

6.2.2.1 Raman-Spektroskopie

Raman-Spektren wurden mithilfe eines RXN2™ Analyser und der dazugehörigen Software iC Raman™ (Kaiser Optical Systems, Ann Arbor, USA) aufgenommen. Dieses Raman-Spektrometer verfügt über zwei verschiedene Sonden, die sich in ihrem Laserspot-Durchmesser und ihrem Arbeitsabstand unterscheiden. Für die Versuche A-D wurde die MR-Sonde verwendet und für alle weiteren Versuche die PhAT-Sonde. Die Versuche A und E fanden *offline* statt. Für Versuch A wurde die MR-Sonde verbunden mit einer Eintauchoptik verwendet, die direkt in die Pulvermischungen eingetaucht wurde. Bei Versuch E wurden Raman-Spektren mit Hilfe der PhAT-Sonde aufgenommen, die mit einem Verlängerungsrohr ausgestattet war, sodass die Spektren mit einem Arbeitsabstand von 25 cm von der Pulveroberfläche aufgenommen werden konnten.

Für die Implementierung der Sonde in den kontinuierlichen Feuchtgranulierprozess wurde die PhAT-Sonde mit einer Tauchsonde verbunden und in einer selbst gefertigten Konstruktion befestigt, sodass Raman-Spektren mit einem Arbeitsabstand von 25 cm aufgenommen werden konnten, ohne den Produktfluss zu beeinflussen. Die MR-Sonde verbunden mit einer Eintauchoptik wurde direkt über einen speziell gefertigten Port in das Schneckengehäuse eingebaut. Da der Einbau der Sonde maßgeblich für die erhaltenen Ergebnisse verantwortlich war, wird der genaue Aufbau im Ergebnisteil besprochen.

Der Anregungslaser des Raman-Spektrometers hatte eine Wellenlänge von 785 nm und die

Laserleistung betrug 400 mW. Die Belichtungszeit betrug während der *inline* Messungen für Ibuprofen 5 s und für Diclofenac-Natrium 2 s. Die Belichtungszeit bezeichnet dabei die Zeitspanne, während der die Probe mit Laserlicht bestrahlt und ein Spektrum aufgenommen wird. Die Spektren wurden zwischen 150 und 1890 cm^{-1} mit einem Intervall von 1 cm^{-1} aufgenommen. Bei jeder Messung fand eine Filterung der kosmischen Strahlung statt. Außerdem wurde ein Dunkelstromabgleich durchgeführt.

Es wurden zwischen 10 und 25 Spektren pro Versuch und Konzentration aufgenommen. Ein Spektrum wurde alle 10 bis 60 s aufgenommen. Die Versuche wurden mit Ausnahme der Versuche J, K, M, O und S, T und U im Dunkeln durchgeführt. Die jeweiligen Belichtungszeiten, Intervalle und Anzahlen der aufgenommen Spektren pro Mischung können Tabelle 24 und Tabelle 25 entnommen werden. Inline Raman-Spektren wurden für die Modellerstellung immer im Gleichgewichtszustand aufgenommen. Ein Gleichgewichtszustand war erreicht, wenn die Leistungsaufnahme des Granulierers auf einem konstanten Niveau blieb. Die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichtszustandes betrug je nach Prozessparametern 5 bis 10 min.

6.2.2.2 UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektroskopie wurde als Referenzmethode genutzt, um die vorhergesagten Konzentrationen zu verifizieren. Dafür wurden während der Granulationen Proben zu festgesetzten Zeitpunkten gesammelt. Für die Messung wurden die getrockneten Ibuprofen-Granulate in 0,1 M NaOH-Lösung gelöst und die Diclofenac-Granulate in demineralisiertem Wasser. Die Einwaage lag zwischen 40 und 100 mg, orientiert an dem während der Raman-Messung vermessenen Probenvolumen. Manche Proben mussten vor der Vermessung verdünnt werden und die Proben der Zubereitung wurden vorab durch einen Polypropylenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, um nicht lösliche Bestandteile abzutrennen. Die Absorption wurde für Ibuprofen bei einer Wellenlänge von 265 nm und für Diclofenac-Natrium bei einer Wellenlänge von 250 nm gemessen. Für die Berechnung der Konzentration wurde jeweils eine Kalibriergerade aufgenommen. Für Ibuprofen wurde eine Stammlösung mit 100 mg Ibuprofen in 100 ml 0,1 M NaOH angesetzt und daraus eine Verdünnungsreihe von 0,05 – 0,35 mg/ml erstellt. Für Diclofenac-Natrium wurde ebenfalls eine Stammlösung mit 100 mg Diclofenac in 100 ml demineralisiertem Wasser erstellt. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 0,01 mg/ml – 0,07 mg/ml erstellt. Die erhaltenen Kalibriergeraden sind in Abbildung 52 dargestellt.

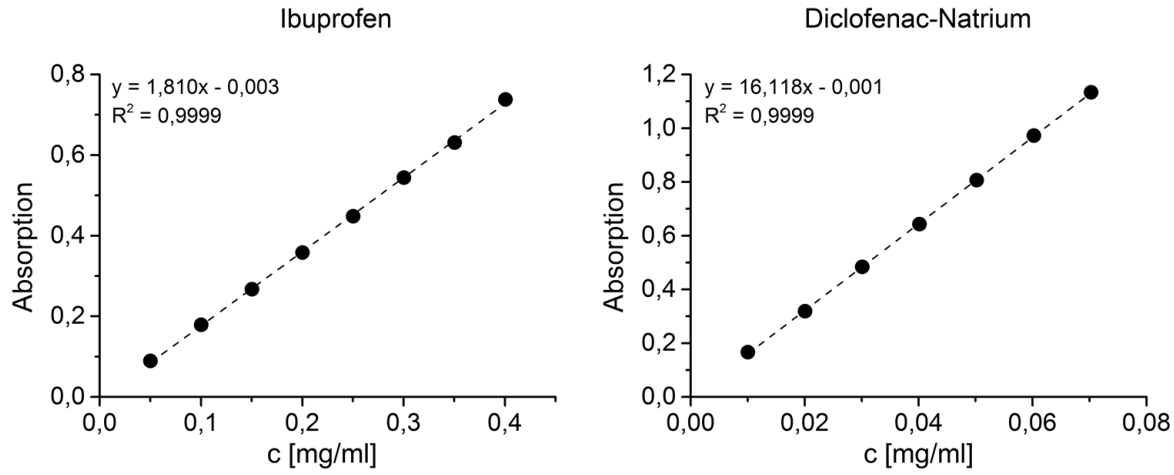

Abbildung 52: UV-Absorption gegen die Konzentration (a) für Ibuprofen bei 265 nm und (b) für Diclofenac-Natrium bei 250 nm. n = 3

Weiter wurden die pH-Werte der unterschiedlich konzentrierten Lösungen bestimmt, um sicherzustellen, dass die UV-Messung nicht durch eine Verschiebung des pH-Wertes aufgrund des sauren Charakters der Arzneistoffe beeinflusst wurde. Da die gemessenen pH-Werte für die jeweiligen Lösungen gleich waren, hatte der pH-Wert keinen Einfluss auf die Gehaltsbestimmung per UV-Messung.

6.2.2.3 Feuchtemessungen

Die Restfeuchte der getrockneten Granulate wurde mittels einer IR-Waage (MA 100, Sartorius, Göttingen, Deutschland) bestimmt. Für die Ibuprofen-Granulate wurde die Restfeuchte bei 60 °C und für die Diclofenac-Granulate bei 105 °C bestimmt. Der Endpunkt der Messung wurde vollautomatisch ermittelt. Die Feuchte der Granulate wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Feuchte\ [\%] = \frac{m_{H2O}}{m_{Trocken}} * 100 \qquad \textit{Gleichung 5}$$

Die Feuchte der Granulate wurde nach der Trocknung bestimmt und wenn nötig die eingewogene Masse für die UV-Messung für die Berechnung der Konzentration nach Gleichung 6 korrigiert:

$$m_{Trocken} = \frac{m_{Feucht}}{(Feuchte/100 + 1)} \qquad \textit{Gleichung 6}$$

6.2.2.4 Bestimmung des Probenvolumens

Die während der Raman-Messung vermessene Probenmasse wurde geschätzt, indem die geometrische Form eines Zylinders zugrunde gelegt wurde. Somit wurde zunächst das

Probenvolumen nach Gleichung 7 berechnet. Als Eindringtiefe (*h*) des Lasers wurden 500 µm angenommen. Die Eindringtiefe des Lasers beruht auf der Art des Materials und der Packungsdichte der Probe. Normalerweise kann die Eindringtiefe nicht als ein konkreter Grenzwert ausgedrückt werden, da die Amplitude des einfallenden Lichtes in der Probe exponentiell abnimmt [62, 105]. Hier wurde jedoch ein konkreter Wert gewählt, um die Berechnung so einfach wie möglich zu halten. Der Radius (*r*) ergab sich aus dem Durchmesser des Laser-Spots und betrug 3 mm. Die Masse wurde darauf nach Gleichung 8 berechnet. Dafür wurde eine Dichte (ρ) von 0,5 g/cm^3 angenommen. Um die während einer gegeben Belichtungszeit (*t*) vermessene Probenmasse zu berechnen, wurde die Geschwindigkeit (*v*) des Granulats unter der Sonde mithilfe einer Videokamera und eines farbigen Markers bestimmt. Die Strecke die passiert werden musste (*d*), korrelierte mit dem Durchmesser des Laser-Spots. Daraus konnte die Probenmasse nach Gleichung 9 berechnet werden.

$$V = \pi * r^2 * h \qquad \textit{Gleichung 7}$$

$$m = \rho * V \qquad \textit{Gleichung 8}$$

$$Probenmasse\ [mg] = \frac{m\ [mg] * v\ \left[\frac{cm}{s}\right] * t\ [s]}{d\ [cm]} \qquad \textit{Gleichung 9}$$

6.2.2.5 Verweilzeitbestimmung

Die mittlere Verweilzeit wurde *inline* mithilfe des ExtruVis3-Systems (ExtruVis, Deutschland) bestimmt. Das Messprinzip beruhte hierbei auf der dynamischen Bildanalyse. Das System besteht aus einer hochauflösenden Kamera (USB-CAM-052H, Phytec, Deutschland) und einem LED Ringlicht (Phytec, Deutschland). Die aufgenommenen Bilder wurden mit der dazugehörigen ExtruVis3 Software ausgewertet. Die Kamera und das LED Ringlicht wurden so angebracht, dass der Auslass des Granulierers optimal fokussiert war. Die Messungen wurden alle im Gleichgewichtszustand durchgeführt.

Der rote Farbstoff Amaranth wurde als Marker pulsartig in den Port für die Pulverdosierung hinzugegeben (1% des Durchsatzes pro Sekunde). Dadurch entstand kurzzeitig ein rot gefärbtes Granulat. Vom Kamerasystem wurde ein rotes, grünes und blaues Differenzsignal aufgenommen, wobei in diesem Fall das rote Differenzsignal ausgewertet wurde.

Die erhaltene Zeitfunktion wurde durch die Software korrigiert und die Verweilzeit (*E*) nach folgender Formel berechnet:

$$E\ (t) = \frac{c\ (t)}{\int_{t1}^{t\ out} c\ (t)dt} \qquad \textit{Gleichung 10}$$

Weiter wurde die mittlere Verweilzeit (MRT) nach Gleichung 11 berechnet,

$$MRT = \left(\frac{\int_{t1}^{tout} tcdt}{\int_{t1}^{tout} cdt}\right) \qquad \textit{Gleichung 11}$$

wobei *t1* der Zeitpunkt der ersten Detektion des Markers, *tout* der Zeitpunkt an dem der Marker aus dem System austritt und *c (t)* die Markerkonzentration sind.

6.2.3 Methodenvalidierung

Für die Methodenvalidierung wurden Datensets an drei verschiedenen Tagen aufgenommen. Es wurden Mischungen mit sechs unterschiedlichen Konzentrationsstufen verwendet (Tabelle 23). Pro Konzentrationsstufe wurden 25 Spektren im Dunkeln (T1 - T3) und 25 Spektren bei Raumlicht (U1 – U3) aufgenommen. Für die Referenzmessung wurden jeweils sechs Proben pro Konzentration gesammelt und die zugehörige Konzentration mithilfe der UV-Spektroskopie bestimmt.

6.2.3.1 Spezifität

Um die Spezifität der Methode nachzuweisen, wurde im Programm SIMCA eine Ausreißeranalyse mit dem Hotellings T^2-Test durchgeführt. Damit wurde sichergestellt, dass die Probe, die quantifiziert wird, keinen Ausreißer darstellt. Der Hotellings T^2-Test ist eine Verallgemeinerung der Studentschen-t-Verteilung [106]. Somit kann geprüft werden, ob sich die erhaltenen Ergebnisse zufällig unterscheiden oder nicht. Der Test wurde auf zwei Signifikanzniveaus $\alpha = 0{,}01$ und 0,05 durchgeführt.

6.2.3.2 Linearität

Für die Untersuchung der Linearität wurde zunächst die mittlere vorhergesagte Konzentration aus den 25 Einzelspektren für jede Konzentrationsstufe berechnet und anschließend gegen die mittleren Konzentrationen aus der Referenzmessung korreliert. Bewertet wurde die Linearität anhand des Korrelationskoeffizienten, der Steigung und des Achsenabschnittes.

6.2.3.3 Richtigkeit

Die Richtigkeit ist definiert als die Übereinstimmung zwischen dem gefundenen, vorhergesagten Wert und einem anerkannten Referenzwert. Der Referenzwert wurde über die UV-Spektroskopie ermittelt. Die Richtigkeit der Methode wurde überprüft, indem die Wiederfindungsrate in Bezug auf den Referenzwert und der relative Fehler berechnet wurden. Dabei ist $\hat{y}_i$ der über das Modell vorhergesagte Gehalt und y_i der über die Referenzmethode berechnete Gehalt.

$$Wiederfindung = \frac{\hat{y}_i}{y_i} * 100\ \% \qquad \textit{Gleichung 12}$$

$$Relativer\ Fehler = \frac{(\hat{y}_i - y_i)}{y_i} * 100\ \% \qquad \textit{Gleichung 13}$$

6.2.3.4 Präzision

Die Präzision der Methode wurde über die durch das Modell erhaltene Standardabweichung validiert. Dabei wurde die Wiederholpräzision über die Aufnahme mehrerer Spektren der gleichen Probe am gleichen Tag validiert. Für die Vergleichspräzision wurden Spektren der Proben an mehreren Tagen aufgenommen. Allerdings wurde hier auf die Messung der gleichen Probe durch eine andere Person verzichtet, da die Raman-Sonde fest in die selbst gefertigte Konstruktion eingebaut werden konnte und so keine Veränderungen im Messaufbau möglich waren.

6.2.3.5 Robustheit

Die Evaluierung der Robustheit erfolgte über die Methode der statistischen Versuchsplanung. Die Faktoren Feuchte, Schneckendrehzahl und Füllgrad (Verhältnis Pulverdosierrate zu Schneckendrehzahl) wurden während des Versuches variiert, dabei wurden die Faktorstufen so gewählt, dass möglicherweise auftretende Schwankungen im Prozess abgedeckt waren. Als Zielgröße für die Bewertung der Richtigkeit wurde der mittlere über das Modell vorhergesagte Gehalt gewählt. Für die Evaluierung der Präzision wurde die erhaltene Streuung ausgewertet. Es wurde ein $2^{3-1} + 3$ teilfaktorieller Versuchsplan erstellt. Die durchgeführten Versuche können Tabelle 26 entnommen werden. Für jeden Einzelversuch wurden über 10 min alle 10 s Raman-Spektren mit einer Belichtungszeit von 2 s aufgenommen, was in einer Anzahl von 60 Spektren pro Einzelversuch resultierte. Zur Auswertung wurden die Daten im Gleichgewichtszustand herangezogen.

Tabelle 26: Während der Robustheitsstudie variierte Faktoren.

Versuch	Füllgrad [g]	Schneckendrehzahl [min^{-1}]	Feuchte	Resultierende Pulverdosierrate [g/min]	Resultierende Flüssigdosierrate [g/min]
P1	0,234	120	0,125	28	3,5
P2	0,300	120	0,105	36	3,78
P3	0,234	180	0,105	42	4,41
P4	0,300	180	0,125	54	6,75
P5	0,267	150	0,115	40	4,6
P6	0,267	150	0,115	40	4,6
P7	0,267	150	0,115	40	4,6

6.2.4 Datenanalyse

6.2.4.1 Datenvorbehandlungsmethoden

Die aufgenommenen Raman-Spektren wurden vor der Modellerstellung mittenzentriert und standardisiert. Die Mittenzentrierung ermöglicht eine einfachere Interpretation und wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$X_{i,mittenzentriert} = X\ (orig)_i - \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} X\ (orig)_i \qquad \textit{Gleichung 14}$$

Dabei wird von jeder Variablen der Originaldatenmatrix X ein Mittelwert $\bar{X}$ berechnet und von jedem Ausgangswert in der jeweiligen Spalte abgezogen.

Es wurde weiter eine SNV-Transformation durchgeführt, um Streueffekte zu korrigieren, die durch unterschiedliche Partikelgrößen in den Proben hervorgerufen werden können. Bei der SNV-Transformation werden der Mittelwert und die Standardabweichung eines einzelnen Spektrums berechnet und die Intensität bei jeder Wellenzahl *i* wird nach folgender Gleichung korrigiert:

$$X_{i,SNV} = \frac{(X_i - \bar{X})}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \bar{X})^2}{n-1}}} \qquad \textit{Gleichung 15}$$

wobei X_i die Intensität bei der jeweiligen Wellenzahl, $\bar{X}$ die mittlere Intensität über alle gemessenen Wellenzahlen des Spektrums und n die Anzahl der Wellenzahlen sind [83].

6.2.4.2 Modellerstellung

Zur Erstellung der Kalibriermodelle wurde die Regression der kleinsten Teilquadrate (PLSR, *Partial Least Squares Regression,* allgemein PLS*)* im Programm SIMCA (Version 13.0.3, Sartorius Stedim Biotech, Schweden) durchgeführt. Nach der Vorbehandlung wurden die aufgenommenen Raman-Spektren gegen den bekannten Arzneistoffgehalt korreliert. Der Arzneistoffgehalt wurde dafür aus der Einwaage berechnet, da angenommen wurde, dass die hergestellten Mischungen homogen waren und sich während des Prozesses nicht entmischt haben. Für die verschiedenen Modelle wurden unterschiedliche spektrale Bereiche ausgewertet (siehe Ergebnisteil). Die Anzahl der Faktoren wurde so gewählt, dass der Kalibrier- und Vorhersagefehler des Modells minimal waren. Somit wurde die optimale Anzahl an Faktoren während der Evaluierung der Leistungsfähigkeit des Modells gewählt. Um die Leistungsfähigkeit der Modelle zu überprüfen, wurden jeweils an einem anderen Tag Test-Sets mit verschiedenen Arzneistoffkonzentrationen aufgenommen.

6.2.4.3 Gütemaße

Um die Leistungsfähigkeit der Modelle zu bewerten, wurden verschiedene Gütemaße herangezogen [79, 81, 83]. Um die Qualität der Kalibrierung zu beurteilen, wurden das Bestimmtheitsmaß R^2, das Vorhersagemaß Q^2, der mittlere Vorhersagefehler der Kalibrierung (RMSEC) und der Standardfehler der Kalibrierung (SEC) berechnet. Um die Unsicherheit der zukünftigen Vorhersage zu berechnen, wurde weiter der mittlere Vorhersagefehler (RMSEP) für die Test-Sets berechnet.

Das R^2 beschreibt die Anpassungsgüte der Regression, anhand derer bewertet werden kann, wie gut die Messwerte zu einem Modell passen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Arzneistoffkonzentration *y* gegen die zugehörigen Spektren (X-Daten) korreliert. Aus den einzelnen Arzneistoffkonzentrationen kann ein arithmetischer Mittelwert $\bar{y}$ gebildet werden. Die vom Modell vorhergesagte Arzneistoffkonzentration wird mit $\hat{y}$ bezeichnet. Aus diesen Werten lassen sich der Anteil der Gesamtvarianz (engl.: *total sum of squares*, TSS), der Anteil der erklärten Varianz (engl.: *model sum of squares*, MSS) und der Anteil der unerklärten Varianz (engl.: *residual sum of squares*, RSS) berechnen, aus welchen sich weiter das R^2 nach folgender Formel berechnen lässt:

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y})^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2} \qquad \textit{Gleichung 16}$$

Außerdem lässt sich die Fehlerquadratsumme (engl.: *predictive residual sum of squares*, PRESS) nach Gleichung 17 berechnen.

$$PRESS = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2 \qquad \textit{Gleichung 17}$$

PRESS kann weiter überführt werden in die dimensionslose Kennzahl Q^2 (Gleichung 18).

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{PRESS}{TSS} \qquad \textit{Gleichung 18}$$

PRESS und Q^2 werden über die Kreuzvalidierung bestimmt. Dabei wird ein Teil des Datensatzes aus der Kalibrierung ausgeschlossen und für diesen Teil eine Vorhersage gemacht. Dieses Vorgehen wird im Programm SIMCA siebenmal wiederholt.

Zur Beurteilung des Kalibriermodells wurde weiter der SEC nach folgender Formel berechnet:

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - p}} \qquad \textit{Gleichung 19}$$

wobei n die Anzahl der Proben, p die Anzahl der Parameter im zu berechnenden Modell, $\hat{y}_i$ den vorhergesagten Wert und y_i den Sollwert darstellt.

Die mittleren Vorhersagefehler wurden nach Gleichung 20 mit $\hat{y}_i$ als den vom Modell vorhergesagten Wert und y_i dem Sollwert berechnet. Der Sollwert wurde dafür aus der Einwaage bestimmt. Für den RMSEC wurde der vorhergesagte Wert mittels der Kreuzvalidierung für das Kalibrierset berechnet, während der vorhergesagte Wert für den RMSEP auf einem neuen Datenset beruhte.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \qquad \textit{Gleichung 20}$$

Weiter wurden die Nachweis (NG) - und Bestimmungsgrenzen (BG) basierend auf der ICH Q2 R1 Leitlinie [94] zur Validierung mithilfe der Standardabweichung und der Steigung nach folgenden Formeln berechnet:

$$NG = 3{,}3 * \frac{SEC}{m} \qquad \textit{Gleichung 21}$$

$$BG = 3 * NG \qquad \textit{Gleichung 22}$$

6.2.4.4 Statistische Versuchsplanung

Zur Überprüfung der Robustheit der erstellten Kalibriermodelle zur Vorhersage des Arzneistoffgehaltes und zur Evaluierung der Mischeffizienz des Zweischneckengranulierers

wurden statistische Versuchspläne verwendet. Die statistischen Versuchspläne wurden mit dem Programm Modde 12.0 (Sartorius Stedim Biotech, Schweden) erstellt und ausgewertet. Alle Einzelversuche wurden randomisiert abgearbeitet und auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ ausgewertet. Die Modelle wurden, wenn angebracht, mittels der Rückwärtsregression optimiert, um die beste Vorhersagequalität zu erreichen.

Um die Robustheit des in Versuch F erstellten Modells zu überprüfen wurde ein 3^2 vollfaktorieller Versuchsplan mit drei Wiederholungen des Zentralpunktes erstellt. Die Faktoren Füllgrad und Schneckendrehzahl wurden variiert und der Effekt der Variation auf die Vorhersagegenauigkeit des erstellten Kalibriermodells untersucht. Als Zielgröße wurde die relative Abweichung des vorhergesagten Gehaltes vom Referenzwert berechnet. Die durchgeführten Einzelversuche können Tabelle 27 entnommen werden. Vor der Erstellung des Versuchsplans wurden Vorversuche durchgeführt, um die maximalen und minimalen Einstellungen festzulegen. Das Schneckengehäuse wurde für alle Versuche gleichmäßig auf 30 °C temperiert.

Tabelle 27: Statistischer Versuchsplan mit den Einzelversuchen für die Robustheitsuntersuchung des Ibuprofen-Modells.

Versuch	Füllgrad [g]	Schnecken-drehzahl [min^{-1}]	Feuchte	Resultierende Pulverdosier-rate 1 [g/min]	Resultierende Pulverdosier-rate 2 [g/min]	Resultierende Flüssigdosier-rate [g/min]
G1	0,134	150	0,075	17	3	1,5
G2	0,200	150	0,075	25,5	4,5	2,25
G3	0,267	150	0,075	34	6	3
G4	0,134	300	0,075	34	6	3
G5	0,200	300	0,075	51	9	4,5
G6	0,267	300	0,075	68	12	6
G7	0,134	450	0,075	51	9	4,5
G8	0,200	450	0,075	76,5	13,5	6,75
G9	0,267	450	0,075	102	18	9
G10	0,200	300	0,075	51	9	4,5
G11	0,200	300	0,075	51	9	4,5
G12	0,200	300	0,075	51	9	4,5

In den Versuchen T1 bis T3 wurden der Einfluss des Füllgrades und der Schneckendrehzahl auf die Mischeffizienz des Zweischneckengranulierers untersucht. Dafür wurde ebenfalls ein 3^2 vollfaktorieller Versuchsplan mit drei Wiederholungen des Zentralpunktes erstellt. Die verwendeten Faktoren, Faktorstufen und Zielgrößen waren dieselben wie zuvor beschrieben.

Die Einzelversuche können Tabelle 28 entnommen werden.

Tabelle 28: Statistischer Versuchsplan mit den Einzelversuchen für die Versuche T1 bis T3.

Versuch	Füllgrad [g]	Schnecken-drehzahl [min^{-1}]	Feuchte	Resultierende Pulverdosier-rate 1 [g/min]	Resultierende Pulverdosier-rate 2 [g/min]	Resultierende Flüssigdosier-rate [g/min]
1	0,134	150	0,115	17	3	1,5
2	0,200	150	0,115	25,5	4,5	2,25
3	0,267	150	0,115	34	6	3
4	0,134	300	0,115	34	6	3
5	0,200	300	0,115	51	9	4,5
6	0,267	300	0,115	68	12	6
7	0,134	450	0,115	51	9	4,5
8	0,200	450	0,115	76,5	13,5	6,75
9	0,267	450	0,115	102	18	9
10	0,200	300	0,115	51	9	4,5
11	0,200	300	0,115	51	9	4,5
12	0,200	300	0,115	51	9	4,5

Außerdem wurde ein statistischer Versuchsplan für die Validierung der Robustheit erstellt, dieser wird in Kapitel 6.2.3.5 beschrieben.

7 Anhang

Die nachfolgenden Darstellungen zeigen die Effekt-Plots der durchgeführten statistischen Versuchspläne.

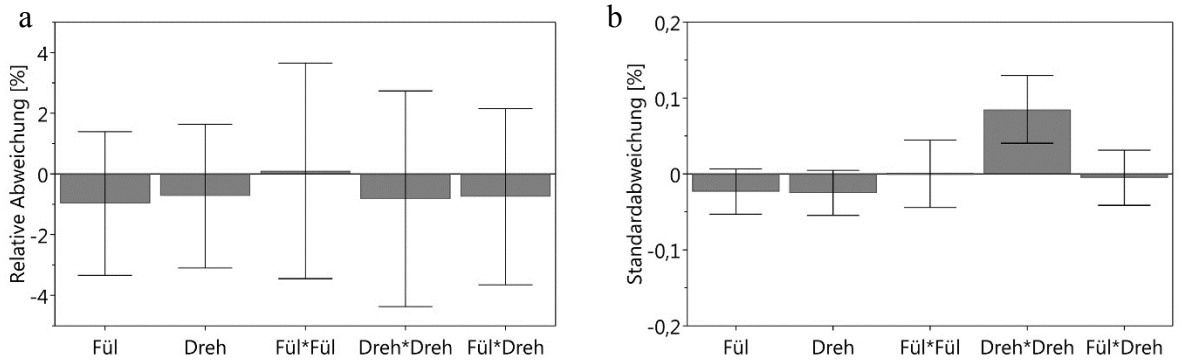

Abbildung 53: Effekt-Plot (a) für die relative Abweichung und (b) für die absolute Standardabweichung des Datensatzes G. Fül: Füllgrad, Dreh: Schneckendrehzahl

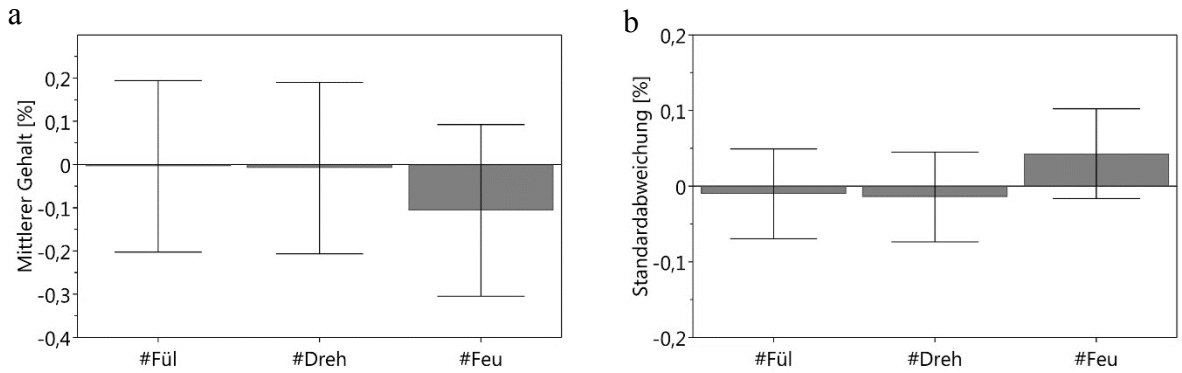

Abbildung 54: Effekt-Plot (a) für den mittleren Gehalt und (b) für die absolute Standardabweichung resultierend aus der Robustheitsuntersuchung des dunklen Modells. Fül: Füllgrad, Dreh: Schneckendrehzahl, Feu: Feuchte

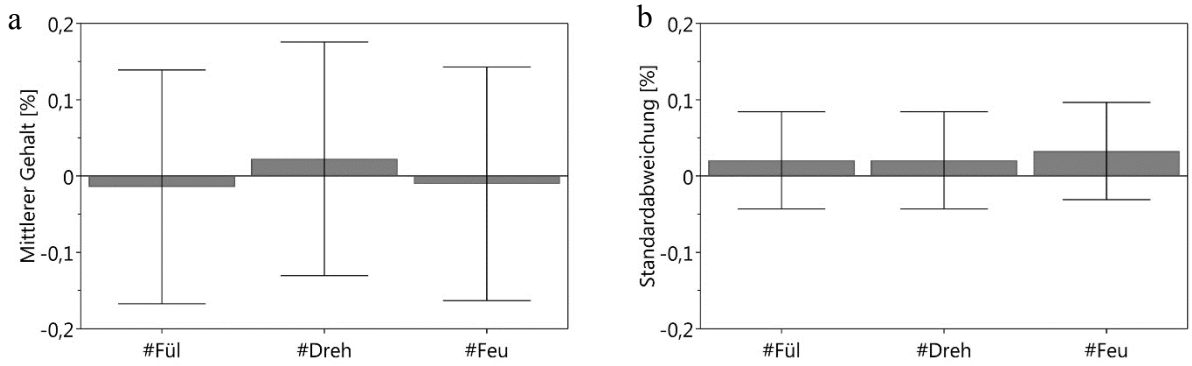

Abbildung 55: Effekt-Plot (a) für den mittleren Gehalt und (b) für die absolute Standardabweichung resultierend aus der Robustheitsuntersuchung des hellen Modells. Fül: Füllgrad, Dreh: Schneckendrehzahl, Feu: Feuchte

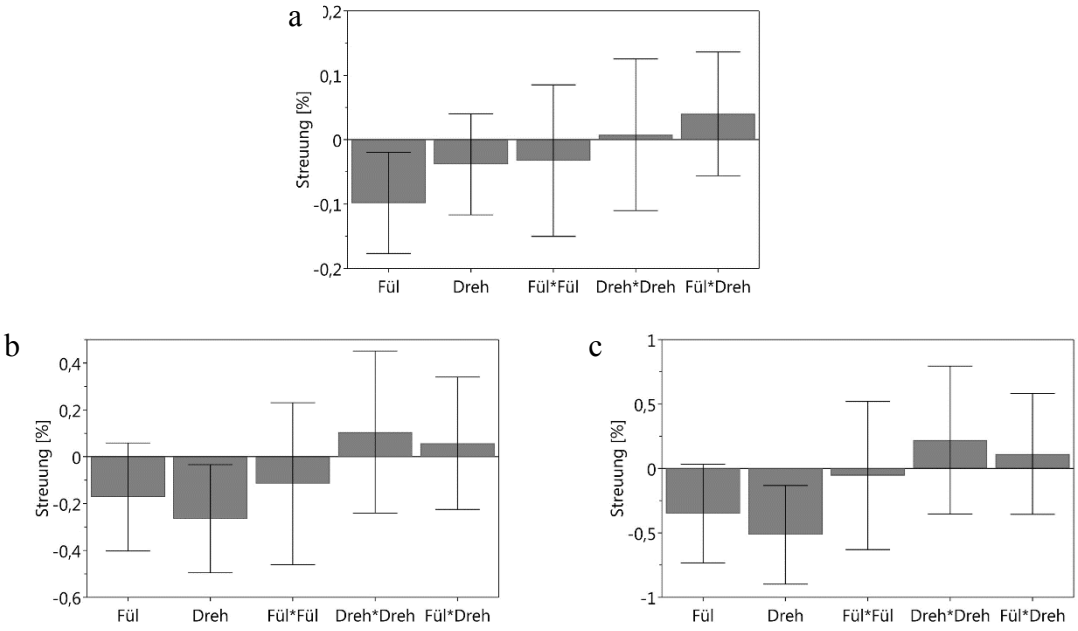

Abbildung 56: Effekt-Plots des Mischversuchs (a) für Position 3 (b) für Position 2 und (c) für Position 1. Fül: Füllgrad, Dreh: Schneckendrehzahl

8 Referenzen

[1] S. Chatterjee, FDA perspective on continuous manufacturing, IFPAC Annual Meeting, Baltimore, Vereinigte Staaten von Amerika, 2012.

[2] Food and Drug Administration, Pharmaceutical CGMPs for the 21St Century - A risk-based approach, 2004.

[3] J. Rantanen, J. Khinast, The future of pharmaceutical manufacturing sciences, J. Pharm. Sci. 104 (2015) 3612-3638.

[4] P. Poechlauer, J. Manley, R. Broxterman, B. Gregertsen, M. Ridemark, Continuous processing in the manufacture of Active Pharmaceutical Ingredients and finished dosage forms: an industry perspective, Org. Process Res. Dev. 16 (2012) 1586-1590.

[5] S.L. Lee, Current FDA perspective for continuous manufacturing, 2nd International Symposium on Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals, Cambridge, Vereinigte Staaten von Amerika, 2016.

[6] L.X. Yu, Pharmaceutical Quality by Design: product and process development, understanding, and control, Pharm. Res. 25 (2008) 781-791.

[7] S.L. Lee, T.F. O'Connor, X. Yang, C.N. Cruz, S. Chatterjee, R.D. Madurawe, C.M.V. Moore, L.X. Yu, J. Woodcock, Modernizing pharmaceutical manufacturing: from batch to continuous production, J. Pharm. Innov. 10 (2015) 191-199..

[8] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Pharmaceutical Development (Q8), 2009.

[9] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Quality Risk Management (Q9), 2005.

[10] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Pharmaceutical Quality System (Q10), 2008.

[11] S. Byrn, M. Futran, H. Thomas, E. Jayjock, N. Maron, R.F. Meyer, A.S. Myerson, M.P. Thien, B.L. Trout, Achieving continuous manufacturing for final dosage formation: challenges and how to meet them, J. Pharm. Sci. 104 (2015) 792-802.

[12] J. Khinast, M. Bresciani, Continuous Manufacturing: Definitions and Engineering Principles, in: P. Kleinebudde, J. Khinast, J. Rantanen (Hrsg.), Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals, John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, Vereinigte Staaten von Amerika, 2017.

[13] Food and Drug Administration, CFR - Code of Federal Regulations Title 21, Sec. 210.3 Definitions.

[14] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz – AMG), § 4 (16), 1976.

[15] C. Vervaet, J.P. Remon, Continuous granulation in the pharmaceutical industry, Chem. Eng. Sci. 60 (2005) 3949-3957.

[16] P. Lopolito, E. Rivera, Cleaning validation in continuous manufacturing, Pharm. Technol. 40 (2016) 34-42.

[17] S. Shanmugam, Granulation techniques and technologies: recent progresses, Bioimpacts 5 (2015) 55-63.

[18] P. Serno, P. Kleinebudde, K. Knop, Granulieren - Grundlagen, Verfahren, Formulierungen, Editio Cantor Verlag, Aulendorf, Deutschland, 2007.

[19] A. Faure, P. York, R.C. Rowe, Process control and scale-up of pharmaceutical wet granulation processes: a review, Eur. J. Pharm. Biopharm 52 (2001) 269-277.

[20] J. Vercruysse, M. Toiviainen, M. Fonteyne, N. Helkimo, J. Ketolainen, M. Juuti, U. Delaet, I. Van Assche, J.P. Remon, C. Vervaet, T. De Beer, Visualization and understanding of the granulation liquid mixing and distribution during continuous twin screw granulation using NIR chemical imaging, Eur. J. Pharm. Biopharm. 86 (2014) 383-392.

[21] N.O. Lindberg, C. Tufvesson, L. Olbjer, Extrusion of an effervescent granulation with a twin screw extruder, Baker Perkins MPF 50 D, Drug Dev. Ind. Pharm. 13 (1987) 1891-1913.

[22] N.O. Lindberg, C. Tufvesson, P. Holm, L. Olbjer, Extrusion of an effervescent

granulation with a twin screw extruder, Baker Perkins MPF 50 D. Influence on intragranular porosity and liquid saturation, Drug Dev. Ind. Pharm. 14 (1988) 1791-1798.

[23] E.I. Keleb, A. Vermeire, C. Vervaet, J.P. Remon, Continuous twin screw extrusion for the wet granulation of lactose, Int. J. Pharm. 239 (2002) 69-80.

[24] E.I. Keleb, A. Vermeire, C. Vervaet, J.P. Remon, Twin screw granulation as a simple and efficient tool for continuous wet granulation, Int. J. Pharm. 273 (2004) 183-194.

[25] I. Ghebre-Sellassie, M.J. Mollan, N. Pathak, M. Lodaya, M. Fessehaie, Continuous production of pharmaceutical granulation, Patent EA00004777B1, Warner-Lambert Co LLC, Vereinigte Staaten von Amerika, 2002.

[26] M. Fonteyne, J. Vercruysse, D.C. Diaz, D. Gildemyn, C. Vervaet, J.P. Remon, T. De Beer, Real-time assessment of critical quality attributes of a continuous granulation process, Pharm. Dev. Technol. 18 (2013) 85-97.

[27] M. Maniruzzaman, J. Boateng, M. Snowden, D. Douroumis, A review of hot-melt extrusion: process technology to pharmaceutical products, ISRN Pharmaceutics Volume 2012, Article ID 436763, 9 pages.

[28] T.C. Seem, N.A. Rowson, A. Ingram, Z. Huang, S. Yu, M. de Matas, I. Gabbott, G.K. Reynolds, Twin screw granulation — A literature review, Powder Technol. 276 (2015) 89-102.

[29] M.R. Thompson, Twin screw granulation – review of current progress, Drug Dev. Ind. Pharm. 41 (2015) 1223-1231.

[30] M.R. Thompson, J. Sun, Wet granulation in a twin-screw extruder: Implications of screw design, J. Pharm. Sci. 99 (2010) 2090-2103.

[31] A. Kumar, J. Dhondt, J. Vercruysse, F. De Leersnyder, V. Vanhoorne, C. Vervaet, J.P. Remon, K.V. Gernaey, T. De Beer, I. Nopens, Development of a process map: A step towards a regime map for steady-state high shear wet twin screw granulation, Powder Technol. 300 (2016) 73-82.

[32] J. Vercruysse, D. Cordoba Diaz, E. Peeters, M. Fonteyne, U. Delaet, I. Van Assche, T. De Beer, J.P. Remon, C. Vervaet, Continuous twin screw granulation: influence of process variables on granule and tablet quality, Eur. J. Pharm. Biopharm. 82 (2012) 205-211.

[33] R.M. Dhenge, R.S. Fyles, J.J. Cartwright, D.G. Doughty, M.J. Hounslow, A.D. Salman, Twin screw wet granulation: Granule properties, Chem. Ing. J. 164 (2010) 322-329.

[34] V. Vanhoorne, B. Vanbillemont, J. Vercruysse, F. De Leersnyder, P. Gomes, T.D. Beer, J.P. Remon, C. Vervaet, Development of a controlled release formulation by continuous twin screw granulation: Influence of process and formulation parameters, Int. J. Pharm. 505 (2016) 61-68.

[35] Y. Liu, M. R. Thompson, K.P. O'Donnell, N.S. Grasman, Effect of temperature on the wetting behavior of hydroxypropyl methylcellulose in a twin-screw granulator, Powder Technol. 302 (2016) 63-74.

[36] A. Schmidt, H. de Waard, P. Kleinebudde, M. Krumme, Continuous single-step wet granulation with integrated in-barrel-drying, Pharm. Res. 35 (2018).

[37] R. Meier, K.-P. Moll, M. Krumme, P. Kleinebudde, Impact of fill-level in twin-screw granulation on critical quality attributes of granules and tablets, Eur. J. Pharm. Biopharm. 115 (2017) 102-112.

[38] L.J. Gorringe, G.S. Kee, M.F. Saleh, N.H. Fa, R.G. Elkes, Use of the channel fill level in defining a design space for twin screw wet granulation, Int. J. Pharm. 519 (2017) 165-177.

[39] A. Kumar, J. Vercruysse, M. Toiviainen, P.E. Panouillot, M. Juuti, V. Vanhoorne, C. Vervaet, J.P. Remon, K.V. Gernaey, T. De Beer, I. Nopens, Mixing and transport during pharmaceutical twin-screw wet granulation: experimental analysis via

chemical imaging, Eur. J. Pharm. Biopharm. 87 (2014) 279-289.
[40] M. Fonteyne, J. Vercruysse, F. De Leersnyder, B. Van Snick, C. Vervaet, J.P. Remon, T. De Beer, Process Analytical Technology for continuous manufacturing of solid-dosage forms, Trends Anal. Chem. 67 (2015) 159-166.
[41] Food and Drug Administration, Guidance for Industry (Draft), Powder Blends and Dosage Units - In-Process Blend and Dosage Unit Inspection (Sampling and Evaluation) for Content Uniformity, 2004.
[42] Food and Drug Administration, Guidance for Industry, PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance, 2004.
[43] S. Laske, A. Paudel, O. Scheibelhofer, S. Sacher, T. Hoermann, J. Khinast, A. Kelly, J. Rantanen, O. Korhonen, F. Stauffer, F. De Leersnyder, T. De Beer, J. Mantanus, P.-F. Chavez, B. Thoorens, P. Ghiotti, M. Schubert, P. Tajarobi, G. Haeffler, S. Lakio, M. Fransson, A. Sparen, S. Abrahmsen-Alami, S. Folestad, A. Funke, I. Backx, B. Kavsek, F. Kjell, M. Michaelis, T. Page, J. Palmer, A. Schaepman, S. Sekulic, S. Hammond, B. Braun, B. Colegrove, A review of PAT strategies in secondary solid oral dosage manufacturing of small molecules, J. Pharm. Sci. 106 (2017) 667-712.
[44] R.W. Kessler, W. Kessler, E. Zikulnig-Rusch, A critical summary of spectroscopic techniques and their robustness in industrial PAT applications, CIT 88 (2016) 710-721.
[45] T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, C. Vervaet, Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes, Int. J. Pharm. 417 (2011) 32-47.
[46] M. Fonteyne, J. Vercruysse, F. De Leersnyder, R. Besseling, A. Gerich, W. Oostra, J.P. Remon, C. Vervaet, T. De Beer, Blend uniformity evaluation during continuous mixing in a twin screw granulator by in-line NIR using a moving F-Test, Anal. Chim. Acta, 935 (2016) 213-223.
[47] L. Martinez, A. Peinado, L. Liesum, G. Betz, Use of near-infrared spectroscopy to quantify drug content on a continuous blending process: influence of mass flow and rotation speed variations, Eur. J. Pharm. Biopharm. 84 (2013) 606-615.
[48] T.R. De Beer, C. Bodson, B. Dejaegher, B. Walczak, P. Vercruysse, A. Burggraeve, A. Lemos, L. Delattre, Y.V. Heyden, J.P. Remon, C. Vervaet, W.R. Baeyens, Raman spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for the in-line monitoring and understanding of a powder blending process, J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 772-779.
[49] Raman-Spektroskopie 2.2.48, in: Europäisches Arzneibuch, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Deutschland, 9. Grundwerk, 2017.
[50] O. Scheibelhofer, R. Hohl, S. Salar-Behzadi, D. Haack, K. Koch, P. Kerschhaggl, S. Sacher, J.C. Menezes, J.G. Khinast, Automatic correction for window fouling of Near Infrared probes in fluidised systems, J. Near Infrared Spec. 22 (2014) 229-238.
[51] K.R. Goode, K. Asteriadou, P.T. Robbins, P.J. Fryer, Fouling and cleaning studies in the food and beverage industry classified by cleaning type, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 12 (2013) 121-143.
[52] Z. Chen, D. Lovett, J. Morris, Process analytical technologies and real time process control a review of some spectroscopic issues and challenges, J. Process Contr. 21 (2011) 1467-1482.
[53] A. Smekal, Zur Quantentheorie der Dispersion, Naturwissenschaften 11 (1923) 873-875.
[54] C.V. Raman, A new radiation [Reproduced from Indian J. Phys. 2 (1928), 387–398], Curr. Sci. 74 (1998) 382-386.
[55] N.L. Jestel, Raman Spectroscopy, in: K.A. Bakeev (Hrgs.) Process Analytical

Technology - Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries, John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, Vereinigte Staaten von Amerika, 2010.

[56] C.J. Strachan, T. Rades, K.C. Gordon, J. Rantanen, Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids, J. Pharm. Pharmacol. 59 (2007) 179-192.

[57] L. Saerens, L. Dierickx, B. Lenain, C. Vervaet, J.P. Remon, T.D. Beer, Raman spectroscopy for the in-line polymer-drug quantification and solid state characterization during a pharmaceutical hot-melt extrusion process, Eur. J. Pharm. Biopharm. 77 (2011) 158-163.

[58] M.E. Auer, U.J. Griesser, J. Sawatzki, Qualitative and quantitative study of polymorphic forms in drug formulations by near infrared FT-Raman spectroscopy, J. Mol. Struct. 661-662 (2003) 307-317.

[59] M. Fonteyne, S. Soares, J. Vercruysse, E. Peeters, A. Burggraeve, C. Vervaet, J.P. Remon, N. Sandler, T. De Beer, Prediction of quality attributes of continuously produced granules using complementary pat tools, Eur. J. Pharm. Biopharm. 82 (2012) 429-436.

[60] T. Vankeirsbilck, A. Vercauteren, W. Baeyens, G. Van der Weken, F. Verpoort, G. Vergote, J.P. Remon, Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis, TrAC Trends Anal. Chem. 21 (2002) 869-877.

[61] I.W. Levin, E.N. Lewis, Fourier transform Raman spectroscopy of biological materials, Anal. Chem. 62 (1990) 1101A-1111A.

[62] J. Rantanen, Process analytical applications of Raman spectroscopy, J. Pharm. Pharmacol. 59 (2007) 171-177.

[63] H. Wikström, I.R. Lewis, L.S. Taylor, Comparison of sampling techniques for in-line monitoring using Raman spectroscopy, Appl. Spectrosc. 59 (2005) 934-941.

[64] M. Kim, H. Chung, Y. Woo, M. Kemper, New reliable Raman collection system using the wide area illumination (WAI) scheme combined with the synchronous intensity correction standard for the analysis of pharmaceutical tablets, Anal. Chim. Acta 579 (2006) 209-216.

[65] R.L. McCreery, Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, Vereinigte Staaten von Amerika, 2005.

[66] M.C. Davies, J.S. Binns, C.D. Melia, P.J. Hendra, D. Bourgeois, S.P. Church, P.J. Stephenson, FT Raman spectroscopy of drugs in polymers, Int. J. Pharm. 66 (1990) 223-232.

[67] C.G. Kontoyannis, Quantitative determination of CaCO3 and glycine in antacid tablets by Laser Raman Spectroscopy, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 73-76.

[68] A.O. Izolani, M.T. de Moraes, C. Tellez-Soto, Fourier transform Raman spectroscopy of drugs: Quantitative analysis of 1-phenyl-2,3-dimethyl-5-pyrazolone-4-methylaminomethane sodium sulfonate: (Dipyrone), J. Raman Spectrosc. 34 (2003) 837-843.

[69] S.G. Skoulika, C.A. Georgiou, Rapid quantitative determination of Ciprofloxacin in pharmaceuticals by use of solid-state FT-Raman spectroscopy, Appl. Spectrosc. 55 (2001) 1259-1265.

[70] S. Barimani, P. Kleinebudde, Evaluation of in-line Raman data for end-point determination of a coating process: Comparison of Science-Based Calibration, PLS-regression and univariate data analysis, Eur. J. Pharm. Biopharm. 119 (2017) 28-35.

[71] J. Müller, K. Knop, J. Thies, C. Uerpmann, P. Kleinebudde, Feasibility of Raman spectroscopy as PAT tool in active coating, Drug Dev. Ind. Pharm. 36 (2010) 234-243.

[72] J. Müller, K. Knop, M. Wirges, P. Kleinebudde, Validation of Raman spectroscopic procedures in agreement with ICH guideline Q2 with considering the transfer to real

time monitoring of an active coating process, J. Pharm. Biomed. Anal. 53 (2010) 884-894.

[73] M. Wirges, A. Funke, P. Serno, K. Knop, P. Kleinebudde, Development and in-line validation of a Process Analytical Technology to facilitate the scale up of coating processes, J. Pharm. Biomed. Anal. 78-79 (2013) 57-64.

[74] B. Nagy, A. Farkas, M. Gyurkes, S. Komaromy-Hiller, B. Demuth, B. Szabo, D. Nusser, E. Borbas, G. Marosi, Z.K. Nagy, In-line Raman spectroscopic monitoring and feedback control of a continuous twin-screw pharmaceutical powder blending and tableting process, Int. J. Pharm. 530 (2017) 21-29.

[75] B. Nagy, A. Farkas, K. Magyar, B. Démuth, Z.K. Nagy, G. Marosi, Spectroscopic characterization of tablet properties in a continuous powder blending and tableting process, Eur. J. Pharm. Sci. 123 (2018) 10-19.

[76] L. Saerens, N. Segher, C. Vervaet, J.P. Remon, T. De Beer, Validation of an in-line Raman spectroscopic method for continuous active pharmaceutical ingredient quantification during pharmaceutical hot-melt extrusion, Anal. Chim. Acta 806 (2014) 180-187.

[77] L. Netchacovitch, J. Thiry, C. De Bleye, E. Dumont, J. Cailletaud, P.Y. Sacre, B. Evrard, P. Hubert, E. Ziemons, Global approach for the validation of an in-line Raman spectroscopic method to determine the API content in real-time during a hot-melt extrusion process, Talanta 171 (2017) 45-52.

[78] B. Nagy, A. Farkas, E. Borbás, P. Vass, Z.K. Nagy, G. Marosi, Raman spectroscopy for Process Analytical Technologies of pharmaceutical secondary manufacturing, AAPS PharmSciTech 20 (2018).

[79] Chemometrische Methoden zur Auswertung analytischer Daten 5.21, in: Europäisches Arzneibuch, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Deutschland, 9. Grundwerk, 2017.

[80] K. Danzer, H. Hobert, C. Fischbacher, K.-U. Jagemann, Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen, Springer Verlag Berlin Heildelberg, Deutschland, 2001.

[81] L. Eriksson, T. Byrne, E. Johansson, J. Trygg, C. Vikström, Multi- and Megavariate Data Analysis - Basic Principles and Applications, MKS Umetrics AB, Malmö, Schweden, 2013.

[82] M.J. Pelletier, Quantitative analysis using Raman spectrometry, Appl. Spectrosc. 57 (2003) 20A-42A.

[83] W. Kessler, Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik, Wiley VCH Verlag, Weinheim, Deutschland, 2007.

[84] Umetrics MVA FAQ, SIMCA - P and Multivariate Analysis - Frequently Asked Questions Version 1.01, unter: https://umetrics.com/sites/default/files/kb/multivariate_faq.pdf (abgerufen 16.01.2019).

[85] S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, Chemom. Intell. Lab. Syst. 58 (2001) 109-130.

[86] P. Geladi, B.R. Kowalski, Partial least-squares regression: a tutorial, Anal. Chim. Acta 185 (1986) 1-17.

[87] K. Siebertz, D. van Bebber, T. Hochkirchen, Statistische Versuchsplanung, 2. Auflage, Springer Vieweg, Wiesbaden, Deutschland, 2017.

[88] W. Kleppmann, Versuchplanung: Produkte und Prozesse optimieren, 9. Auflage, Carl Hanser Verlag, München, Deutschland, 2016.

[89] Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2001) 723-753.

[90] J. Rantanen, H. Wikström, F.E. Rhea, L.S. Taylor, Improved understanding of factors contributing to quantification of anhydrate/hydrate powder mixtures, Appl.

Spectrosc. 59 (2005) 942-951.
[91] Nationale Institute of Standards and Technology (NIST), Strong lines, unter: https://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/element_name.htm (abgerufen am 14.02.2019).
[92] W.A. Ritschel, A. Brauer-Brandl, Die Tablette: Handbuch der Entwicklung, Herstellung und Qualitätssicherung, Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Aulendorf, Deutschland, 2002.
[93] J. Johansson, S. Pettersson, S. Folestad, Characterization of different laser irradiation methods for quantitative Raman tablet assessment, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 510-516.
[94] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), (2005).
[95] Diclofenac-Natrium, Gelbe Liste, unter: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Diclofenac-natrium_24294 (abgerufen: 5.02.2019).
[96] R. Bucci, A.D. Magrì, A.L. Magrì, Determination of diclofenac salts in pharmaceutical formulations, Fresenius J. Anal. Chem. 362 (1998) 577-582.
[97] Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 8.2, Diclofenac-Natrium, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2015.
[98] B. Van Melkebeke, C. Vervaet, J.P. Remon, Validation of a continuous granulation process using a twin-screw extruder, Int. J. Pharm. 356 (2008) 224-230.
[99] M.F. Saleh, R.M. Dhenge, J.J. Cartwright, M.J. Hounslow, A.D. Salman, Twin screw wet granulation: Binder delivery, Int. J. Pharm. 487 (2015) 124-134.
[100] A. Kumar, M. Alakarjula, V. Vanhoorne, M. Toiviainen, F. De Leersnyder, J. Vercruysse, M. Juuti, J. Ketolainen, C. Vervaet, J.P. Remon, K.V. Gernaey, T. De Beer, I. Nopens, Linking granulation performance with residence time and granulation liquid distributions in twin-screw granulation: An experimental investigation, Eur. J. Pharm. Sci. 90 (2016) 25-37.
[101] M. Verstraeten, D. Van Hauwermeiren, K. Lee, N. Turnbull, D. Wilsdon, M. am Ende, P. Doshi, C. Vervaet, D. Brouckaert, S.T.F.C. Mortier, I. Nopens, T.D. Beer, In-depth experimental analysis of pharmaceutical twin-screw wet granulation in view of detailed process understanding, Int. J. Pharm. 529 (2017) 678-693.
[102] S. Lute, R. Dhenge, A. Salman, Twin screw granulation: An investigation of the effect of barrel fill level, Pharmaceutics, 10 (2018).
[103] Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen 2.9.40, in: Europäisches Arzneibuch, 9. Grundwerk, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Deutschland, 2017.
[104] K. Kolter, M. Karl, A. Gryczke, Hot-melt extrusion with BASF pharma polymers, Pharma Ingredients & Services, BASF SE, 2012.
[105] R.P. Feynman, R.B. Leighton, M. Sands, Refractive index of dense materials, in: The Feynmann Lectures on Physics, 32-11, 1966.
[106] H. Hotelling, The Generalization of Student's Ratio, Ann. Math. Statist. 2 (1931) 360-378.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Kleinebudde, für die Aufnahme am Institut und die mir gegebene Möglichkeit, an einem aktuellen und interessanten Dissertationsthema zu arbeiten. Weiter möchte ich mich für Ihre gute Betreuung, Ihre Unterstützung bei jeglichen Problemen und Fragen und dafür, dass sie sich immer Zeit genommen und mich stets motiviert haben, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Breitkreutz danke ich für die Übernahme des Koreferats, die vielen Anregungen bezüglich meiner Arbeit und außerdem für seine stetige Hilfsbereitschaft und seinen Einsatz für das gesamte Institut.

Beiden Professoren möchte ich weiter für die Möglichkeit, zahlreiche nationale und internationale Konferenzen besuchen zu dürfen, die einen Blick über die eigene Arbeit hinaus ermöglicht haben und aus denen sich außerdem wichtige Anregungen für diese Arbeit ergeben haben, danken.

Dr. Klaus Knop danke ich für seine immerwährende Hilfsbereitschaft, vor allem für seine Hilfe bei der Anfertigung der Konstruktion und seine Hilfe beim Aufbau der *split feeding* Versuche, für die vielen fachlichen Ratschläge, sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit und vorangegangener Publikationen.

Stefan Stich und der Feinmechanik der Universität Düsseldorf danke ich für die Hilfe bei der Entwicklung und Anfertigung der Konstruktion und für die vielen kleinen Reparaturarbeiten, die immer so schnell wie möglich durchgeführt wurden.

Vincent Lenhart danke ich für die Hilfe beim Tablettieren und seine immerwährende sofortige Hilfsbereitschaft bei den vielen kleinen technischen Problemen im Alltag.

Bei Dr. Björn Fischer möchte ich mich für seine Hilfe bei Problemen mit der Raman-Sonde, sowie für seine Hilfe beim Zuordnen der Lichtpeaks bedanken.

Lisa Man möchte ich für Ihre Hilfe bei jeglichem „Papierkram“ und vielen organisatorischen Sachen danken.

Auch Dorothee Eikeler, Karin Matthee, Annemarie Schmitz und Dorothee Hetkämper-Flockert möchte ich für die vielen kleinen Hilfen danken, die einem die Arbeit erleichtert haben.

Bei Holger Grohganz bedanke ich mich für die fachliche Diskussion während des PSSRC Meetings in Graz, die meine Arbeit einen großen Schritt weitergebracht hat.

Meinem Bürokollegen Dr. Robin Meier danke ich für die liebe Aufnahme, durch die ich

mich direkt dazugehörig gefühlt habe, die vielen Hilfen zu Beginn der Promotion, sein immer offenes Ohr und seine stete Hilfe bei Problemen mit dem Extruder auch nach Beendigung seiner Promotion. Meiner Bürokollegin Dr. Carolin Korte danke ich für die großartige Freundschaft, die endlosen Gespräche, die Unterstützung in schwierigen Zeiten und die stetigen Aufmunterungen und Ermutigungen, diese Arbeit weiter zu machen, auch wenn es gerade nicht lief. Außerdem danke ich dir für all die schönen gemeinsamen Momente auch außerhalb des Institutes. Es war eine wunderschöne Zeit mit Dir!

Auch Svenja Schneider, Annika Wilms und Juliana Kotthoff möchte ich herzlich für ihre uneingeschränkte Freundschaft, ihre Unterstützung und für all die schönen gemeinsamen Momente danken.

Weiter danke ich Kira Tromp, Isabell Speer, Hanna Ponsar und Svenja Niese für die schöne Zeit am Institut, die vielen fachlichen und weniger fachlichen Diskussionen in den Kaffeepausen und für die wundervollen Abende und Unternehmungen außerhalb des Institutes.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich für eine großartige Zeit, die vielen schönen gemeinsamen Erinnerungen, die gegenseitige Unterstützung und die super Arbeitsatmosphäre am Institut bedanken. Ihr habt die Zeit hier unvergesslich gemacht!

Mein ganz besonderer Dank gilt aber meiner lieben Mama, meinem lieben Papa und Niklas. Ihr habt mich auf meinem Weg stets begleitet, mich in allen Entscheidungen immer liebevoll unterstützt, mich in schwierigen Zeiten aufgefangen und aufgemuntert, wenn es nicht so lief und vor allem ermutigt, diese Arbeit zu Ende zu bringen. Dafür und für euer uneingeschränktes Vertrauen in mich bin ich euch sehr dankbar!

Julia Harting, Düsseldorf, Februar 2018

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde noch bei keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Julia Harting