

PREGLED METOD ZA OPTIMIZACIJO PROCESA LIOFILIZACIJE IN VREDNOTENJE LIOFILIZATOV

OVERVIEW OF METHODS FOR OPTIMISING THE LYOPHILISATION PROCESS AND EVALUATION OF LYOPHILISATES

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Matija Pečnik, mag. farm.

doc. dr. Maja Bjelošević Žiberna, mag. ind. farm.

prof. dr. Rok Dreu, mag. farm.

izr. prof. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko tehnologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: pegi.ahlingrabnar@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Liofilizacija, oziroma sušenje z zamrzovanjem, je zaradi naraščajočega števila kompleksnih zdravilnih učinkovin pogosta metoda izdelave zlasti parenteralnih farmacevtskih oblik, obenem pa omogoča tudi izdelavo zdravil, ki so z vidika načina aplikacije pacientu prijaznejše, kot npr. peroralni liofilizati, kar je še zlasti pomembno pri zdravljenju otrok in starostnikov ter pri terapiji nekaterih psihiatričnih obolenj. Načelo vpeljave razvoja izdelkov z vgrajeno kakovostjo v proizvodnjo liofilizatov ustvarja potrebo po zanesljivih metodah vrednotenja kritičnih parametrov kakovosti končnega izdelka, procesnih spremenljivk in vhodnih materialov. Članek zajema pregled najpogostejših in inovativnih metod vrednotenja kritičnih lastnosti liofilizatov in medprocesnih lastnosti materialov za namen optimizacije procesnih pogojev in sestave formulacije.

KLJUČNE BESEDE:

liofilizacija, metode, predformulacija

ABSTRACT

Due to the increasing complexity of new active substances, lyophilisation or freeze-drying is a commonly used processing method especially for the production of parenteral dosage forms. It also enables the production of medicines that are adapted for the individual patient needs in terms of application, especially oral lyophilisates for children and elderly or patients with certain psychiatric disorders. The principle of Quality by Design in the development and production of lyophilisates creates the need for reliable methods to evaluate critical quality parameters of medicines and critical attributes of starting materials. This article reviews the most common and innovative methods for the evaluation of critical in-process material attributes and critical quality attributes used during optimisation of process parameters and formulation composition.

KEY WORDS:

lyophilisation, methods, preformulation



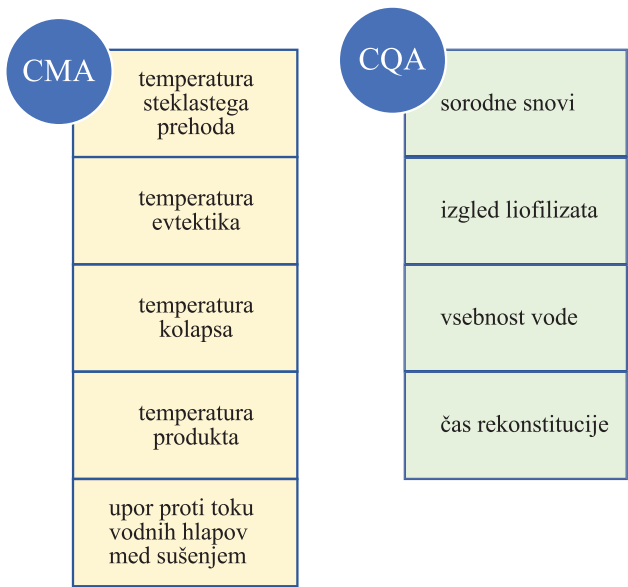
1 UVOD

Liofilizacija oz. sušenje z zamrzovanjem (angl. *freeze-drying*) je oblika sušenja, ki poteka pri nizkem tlaku in temperaturi in je sestavljena iz zamrzovanja, primarnega ter sekundarnega sušenja (1). Zaradi možnosti aseptične priprave izdelka se liofilizacija ob naraščajočem številu bioloških in podobnih bioloških zdravil za parenteralno aplikacijo vse bolj uveljavlja v farmacevtski industriji. Proces uporabljamo tudi za pripravo peroralnih farmacevtskih oblik (FO) s takojšnjim sproščanjem, saj porozna struktura z visoko specifično površino pospeši sproščanje ter poveča biološko uporabnost (BU) zdravilne učinkovine. To je še zlasti pomembno za bolnike, ki imajo težave s požiranjem ali zdravila nočejo pogoltniti, kot npr. starejši odrasli, otroci in psihiatrični bolniki (2). Ocenjeno je, da se bo vrednost trga liofiliziranih zdravil v obdobju od 2023 do 2033 povečala za 13 % (3).

Izvajanje dobre proizvodne prakse in načela razvoja izdelka z vgrajeno kakovostjo (angl. *Quality by Design*; QbD) prispevata k izdelavi kakovostnih zdravil ob razumevanju in nadzoru procesa. Načela QbD obsegajo kritične parametre

kakovosti (angl. *critical quality attributes*; CQA) oz. fizikalne, kemijske, biološke ter mikrobiološke lastnosti liofilizatov, ki s postavitvijo specifikacij opredeljujejo kakovost končnega izdelka. Pristop hkrati vključuje opredelitev kritičnih lastnosti vhodnih materialov (angl. *critical material attributes*; CMA) ter kritičnih procesnih spremenljivk. Slednje so opredeljene kot procesne spremenljivke, ki morajo biti znotraj predpisanih mej za ohranitev CQA končnega izdelka (4, 5). V nadaljevanju so predstavljene metode za vrednotenje najpomembnejših medprocesnih CMA in CQA v proizvodnji liofilizatov (slika 1), ki omogočajo vpeljavo načela QbD. Čeprav so sorodne snovi, vezane na kemijsko vrednotenje vsebnosti nečistot in razgradnih produktov zdravilne učinkovine, pomemben del CQA, je njihova obravnava izvzeta iz obsega pričujočega članka. Širitev nabora metod za vrednotenje liofilizatov prispeva k razvoju novih CQA ter poglobljenega razumevanja njihove vzročne povezanosti s procesnimi spremenljivkami, kar je ključno za smotrno optimizacijo in načrtovanje procesa liofilizacije.

2 METODE VREDNOTENJA IZGLEDA LIOFILIZATOV



Slika 1: Nabor kritičnih lastnosti vhodnih materialov (CMA) med liofilizacijo in kritičnih parametrov kakovosti (CQA) liofilizata (5).
Figure 1: Overview of critical material attributes (CMA) during lyophilisation and critical quality attributes (CQA) of lyophilisate (5).

Izgled liofilizata oz. liofilizacijske pogače uvrščamo med CQA, saj je lahko pokazatelj neustrezne sestave formulacije ali neustreznih procesnih pogojev, prav tako pa vpliva na zaupanje v kakovost zdravila s strani končnega uporabnika. Regulatorne agencije sprejemljiv izgled liofilizata opredeljujejo kot liofilizacijsko pogačo »primernege« videza, homogene obarvanosti in strukture z volumnom, enakim volumnu tekočine ob polnitvi, pri čemer natančnejši kriteriji niso podani. Za prenos liofilizacijskega procesa na proizvodno skalo je potreben celosten pristop k vrednotenju strukture liofilizata, pri čemer se pojavi potreba po kvalitativnih ter kvantitativnih metodah vrednotenja izgleda liofilizacijske pogače z neinvazivno ter nedestruktivno naravo oz. z možnostjo izvedbe meritev v primarni ovojnini (preglednica 1) (6, 7).

2.1 VIZUALNA OCENA

Vizualna ocena liofilizacijske pogače je hitra in nedestruktivna metoda za oceno makroskopskega izgleda liofilizacijske pogače (vdrine, razpoke, kolaps itd.) skozi osvetljeno vialo pred temnim ozadjem. Omejitev te metode je nezmožnost dokumentiranja napak v videzu liofilizacijske po-

Preglednica 1: Pregled metod vrednotenja izgleda liofilizacijske pogače s pristopi zajema slik in analize (7).
Table 1: An overview of imaging and image analysis techniques for cake appearance evaluation (7).

Metoda	Vrednotenje zunanjega videza	Vrednotenje notranje strukture	Notranja mikroskopska struktura / morfologija por	Kvantitativni podatki	Analiza vzorca po celotnem volumnu	Čas meritve / zahtevnost
Vizualna ocena	da	ne	ne	ne	ne	n.a.* /nizka
Tridimenzionalno lasersko slikanje	da	ne	ne	da	ne	3 min /nizka
Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)	ne	ne	da	ne	ne	n.a.*/srednja
Računalniška mikrotomografija (μ-CT)	da	da	da	da	da	1,5 h do 18 h / nizka do srednja

*n.a.: not applicable (časovnega intervala meritve ni mogoče opredeliti).

gače na mikroskopskem nivoju in v notranjosti. Subjektivna narava te metode lahko privede do različnih ocen izgleda liofilizacijske pogače med opazovalci in zajemanja slik različnih področij liofilizacijske pogače (6, 7).

2.2 TRIDIMENZIONALNO LASERSKO SLIKANJE

Z laserskim slikanjem kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo volumen liofilizacijske pogače. Slednjo namestimo na vrtljiv pladenj ter jo lasersko obsevamo med vrtenjem (slika 2). Lovljenje odbitih laserskih žarkov z optičnimi reflektorji

omogoča rekonstrukcijo volumna vzorca. Haeuser in sodelavci so primerjali, če z laserskim slikanjem izmerjeni volumen liofilizacijskih pogač z različnimi deleži dekstrana in saharoze sovpadajo s predhodno vizualno oceno izgleda liofilizacijskih pogač, kjer je višji delež dekstrana izboljšal izgled (7). Ugotovili so, da so meritve volumna liofilizacijskih pogač skladne z vizualnimi ocenami, kar kaže na primernost metode za kvantitativno vrednotenje izgleda liofilizacijske pogače na osnovi volumna. Metoda je objektivnejša v primerjavi z vizualno oceno in uporabna pri optimiziranju formulacije ter procesnih spremenljivk. Omejitev metode je destruktivnost, saj zahteva izpostavitve vzorca atmosferi,



Slika 2: Postopek tridimenzionalnega laserskega slikanja liofilizata. Povzeto po (7). Slika je bila izdelana s programom Biorender.
Figure 2: Procedure for three-dimensional laser imaging of lyophilisates. Adapted from (7). Created in Biorender.

kar lahko vpliva na njegov volumen zaradi skrčenja ali deformacije ob prenosu iz vial pred samo analizo (7).

2.3 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Vrstična elektronska mikroskopija (angl. *scanning electron microscopy*; SEM) je najpogosteje uporabljena slikovna tehnika za določanje mikrostrukture in morfologije liofilizacijskih pogač (7). Z elektronskimi mikroskopi lahko dosežemo tudi do 1.000.000-kratno povečavo in visoko ločljivost (okrog 1 nm) (8). Detekcija odbitih oz. emitiranih sekundarnih elektronov omogoča tudi prikaz strukture liofilizata. Prednosti SEM so razmeroma enostavna priprava vzorca, kratek čas meritve, enostavna interpretacija slike in že omenjena visoka ločljivost tehnike. Glavne omejitve metode so majhna masa vzorca za analizo in slaba reprezentativnost celotne strukture liofilizacijske pogače, kar kompenziramo z več meritvami z dna, sredine in vrha

vzorca. Metoda je destruktivna, saj z vzorčenjem vplivamo na izvirno mikrostrukturo liofilizata (9). Vpliv atmosfere med prenosom vzorca v SEM mikroskop lahko zmanjšamo z delom v nadzorovani atmosferi, npr. v dušikovi komori, v prostorih z nizko relativno vlažnostjo.

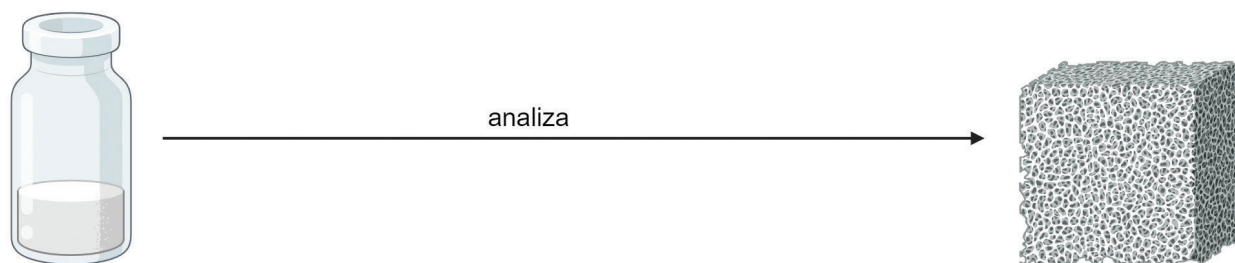
2.4 RAČUNALNIŠKA MIKROTOMOGRAFIJA

Računalniška mikrotomografija (angl. *micro-computed tomography*; μ -CT) je inovativna radiografska tehnika za vrednotenje strukture vzorcev po celotnem volumnu vzorca z ločljivostjo do 1 μ m. Razlikujemo med dvema načinoma vrednotenja izgleda liofilizacijske pogače, in sicer pri invazivnem pristopu liofilizacijsko pogačo v nadzorovani atmosferi odstranimo iz vial in jo analiziramo v plastičnem vsebniku z nižjo gostoto, kar omogoča kvalitativno analizo vzorca, medtem ko pri neinvazivnem pristopu uporabimo višje energije žarkov za prodiranje skozi stekleno

Invazivni postopek analize



Neinvazivni postopek analize



Slika 3: Shemi invazivnega in neinvazivnega postopka računalniške mikrotomografije. Povzeto po (7). Slika je bila izdelana s programom Biorender.

Figure 3: Schematic presentation of invasive and non-invasive micro-computed tomography procedure. Adapted from (7). Created in Biorender.

vialo (slika 3). Neinvazivni μ -CT je kvalitativno primerljiv z invazivnim pristopom, a ima omejitve pri kvantitativnem vrednotenju zaradi vpliva stekla (7). Med meritvijo z rentgenskimi žarki obsevamo vrteč se vzorec ter lovimo izhodne rentgenske žarke. Na detektorju nastanejo dvodimenzionalne slike z značilnim kontrastom zaradi razlik v intenziteti izhodnega rentgenskega žarka med področji z različno gostoto materiala. Metoda je sposobna ločiti področja z nakopičenim kolapsiranim materialom z višjim kontrastom ter ovrednotiti homogenost (7). Z μ -CT lahko določimo volumen liofilizacijske pogače ob hkratnem vrednotenju razpok in praznin v notranjosti liofilizacijske pogače, ki jih s tridimenzionalnim laserskim slikanjem ne zaznamo. Visokoločljivostni μ -CT omogoča koreliranje oblike por in celokupne poroznosti liofilizacijske pogače z uporabo proti toku vodnih hlapov med sušenjem, kar omogoča oceno hitrosti sublimacije in trajanja primarnega sušenja. V primerjavi s SEM dobimo sliko celotne liofilizacijske pogače ob minimalnem poseganju v osnovno strukturo, vendar slabše ločljivosti (7, 10).

2.5 ANALIZA TEKSTURE VZORCA

Analiza teksture vzorca je široko uporabljena tehnika za vrednotenje mehanskih lastnosti trdnih FO, ki omogoča kvantitativno vrednotenje krhkosti in elastičnosti liofilizatov (11). Metoda je enostavna in robustna ter razlikuje med liofilizacijskimi pogačami v odvisnosti od njihove sestave in pogojev shranjevanja. Čeprav ne omogoča slikovne analize liofilizacijskih pogač, izmerjene mehanske lastnosti vzorca dobro korelirajo s strukturnimi lastnostmi in izgledom liofilizacijske pogače. Omogoča oceno robustnosti liofilizacijske pogače z vidika distribucije končnega izdelka, kar je še zlasti pomembno zaradi mehanskih stresov med transportom. Hackl in sodelavci so metodo za vrednotenje mehanskih lastnosti liofilizatov poimenovali penetracijski test (angl. *probe penetration test*) (11). Med tovrstno meritvijo cilindrično sondo pomikamo z izbrano hitrostjo (npr. 0,01 mm/s) do določene globine liofilizacijske pogače (npr. 3 mm), ki se nahaja v primarni ovojnini (slika 4). Pri tem merimo silo v odvisnosti od globine penetracije sonde oz. časa ter na podlagi dobljenih rezultatov razlikujemo med različnimi vrstami deformacije vzorca. Večja sila je potrebna pri strukturno trših vzorcih in večji globini penetracije. Prednost penetracijskega testa je večja točnost rezultatov v primerjavi z drugimi metodami, npr. termomehانيčno analizo, zaradi minimalne manipulacije vzorca, ki ga analiziramo znotraj vial. Hackl in sodelavci so z opisanim pristopom uspeli opredeliti mehansko trdnost liofilizacijskih

pogač, ki je sorazmerna z maksimalnim stresom oz. maksimalno silo potrebno za prodiranje sonde v liofilizacijsko pogačo. S tem so razlikovali med krhkimi liofilizacijskimi pogačami manitola, z maksimalnim stresom 0,02 N/mm² in robustnimi liofilizacijskimi pogačami želatine z maksimalnim stresom do 1,96 N/mm² (11).

3 METODE ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE V LIOFILIZATU

Vsebnost vode je eden izmed najpomembnejših CQA, saj voda deluje kot mehčalo liofilizata, reaktant, medij in katalizator razgradnih poti učinkovine ter kot taka vpliva na stabilnost vzorca med shranjevanjem. Metode, ki omogo-



Slika 4: Analiza teksture liofilizata (vir: arhiv avtorjev).

Figure 4: Texture analysis of lyophilisates (photo taken by the authors).



čajo določanje vsebnosti vode, so pomembne za optimizacijo sestave formulacije in izbiro procesnih pogojev liofilizacije (5, 8).

3.1 KARL-FISCHERJEVA TITRACIJA

Karl-Fischerjeva (KF) titracija je analizna metoda za določanje vsebnosti vode, ki temelji na kemijski reakciji med jodom in vodo (8).

Karl-Fischerjeva reakcija:



Prednost titracije KF je visoka selektivnost, saj jod reagira zgolj z molekulami vode. KF titracija omogoča hitro analizo – rezultat v dveh minutah, visoko točnost in natančnost ter določanje v širokem območju vsebnosti vode. Vzorce z višjo vsebnostjo vode lahko titriramo volumetrično, medtem ko se za nižje vsebnosti vode (npr. pod 50–100 ppm) priporoča kulometrični pristop meritve. Pri volumetričnem načinu titrant dodajamo z bireto, medtem ko pri kulometričnem načinu titrant nastaja elektrokemijsko v notranjosti merilne komore iz jodida (I^-) (12). Po dodatku joda v preiskovano raztopino ta reagira z vodo, pri čemer je količina vode v preiskovani raztopini liofilizata v organskem topilu določena iz toka, ki je potreben za tvorbo joda iz jodida, ali volumna porabljenega titranta. Pričakovane vsebnosti vode končnih liofilizatov so običajno med 1 in 2 % celokupne mase, pri čemer so končne vsebnosti vode odvisne od stabilnosti posamezne formulacije in vrste uporabljene zdravilne učinkovine (8, 12).

3.2 BLIŽNJA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA

Vodne molekule absorbirajo bližnjo infrardečo (angl. *near-infrared*; NIR) svetlobo z valovno dolžino med 780 in 2500 nm. Gre za hitro, neinvazivno in nedestruktivno metodo, saj meritev traja le nekaj sekund skozi primarno ovojnino, npr. vialo (8). Vzorec lahko nato uporabimo za nadaljnje analize, npr. vrednotenje sorodnih snovi, kar je koristno pri optimizaciji porabe vzorca. Spektroskopija NIR je uporabna kot procesno analizna tehnologija za nadzor vsebnosti vode v seriji izdelka z možnostjo merjenja na mestu izvajanja procesa oz. za določanje končne točke sušenja z merjenjem znotraj procesa, v primeru vgradnje sonde v notranjost liofilizatorja (14). Večjo točnost

rezultatov zagotovimo s kalibracijo relativne metode spektroskopije NIR z absolutno metodo titracije KF, ki arbitrarno vrednost absorpcije vode poveže z maso vode v vzorcu. Spremembe ovojnine, sestave formulacije in volumna polnitve zahtevajo ponovno multivariantno kalibracijo analizne metode. Kljub oviram se je metoda v industriji izkazala za uspešno pri določevanju razlik v vsebnosti vode znotraj in med serijami (15). Preskar in sodelavci so potrdili uporabnost principa spektroskopije NIR za kvantitativno določanje vsebnosti vode v liofilizatu z merjenjem na mestu izvajanja procesa (14).

4 TERMOANALIZNE METODE

Termoanalizne metode so pomembne pri zasnovi liofilizacijskega cikla, saj omogočajo določanje kritičnih temperatur procesa (T_g^{*1} , T_{eu}^{*2} in T_c^{*3}), pri katerih prihaja do skrčenja oz. porušnja strukture med sušenjem. Trenutno v farmacevtski industriji med termoanaliznimi metodami prevladuje diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. *differential scanning calorimetry*; DSC). Zaradi možnosti simulacije liofilizacijskega cikla so pomembne tudi mikroskopske metode s posnemanjem procesa liofilizacije na nivoju nekaj μL vzorca (8).

4.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Z DSC lahko kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo termične pojave, kot so kristalizacija, steklasti prehodi, taljenje ipd. Merimo razliko v toplotnem toku med vzorčnim in praznim referenčnim lončkom ob segrevanju oz. ohlajanju v odvisnosti od časa oz. temperature (16). Metoda je primerna za analizo suhe liofilizacijske pogače, kjer vzorec segrevamo za določanje stopnje kristalnosti ter T_g^{*4} . Ključ-

¹ Temperatura steklastega prehoda maksimalno koncentrirane raztopine. Pomembna za amorfne liofilizacijske pogače.

² Temperatura tališča evtektika. Pomembna za kristalne liofilizacijske pogače.

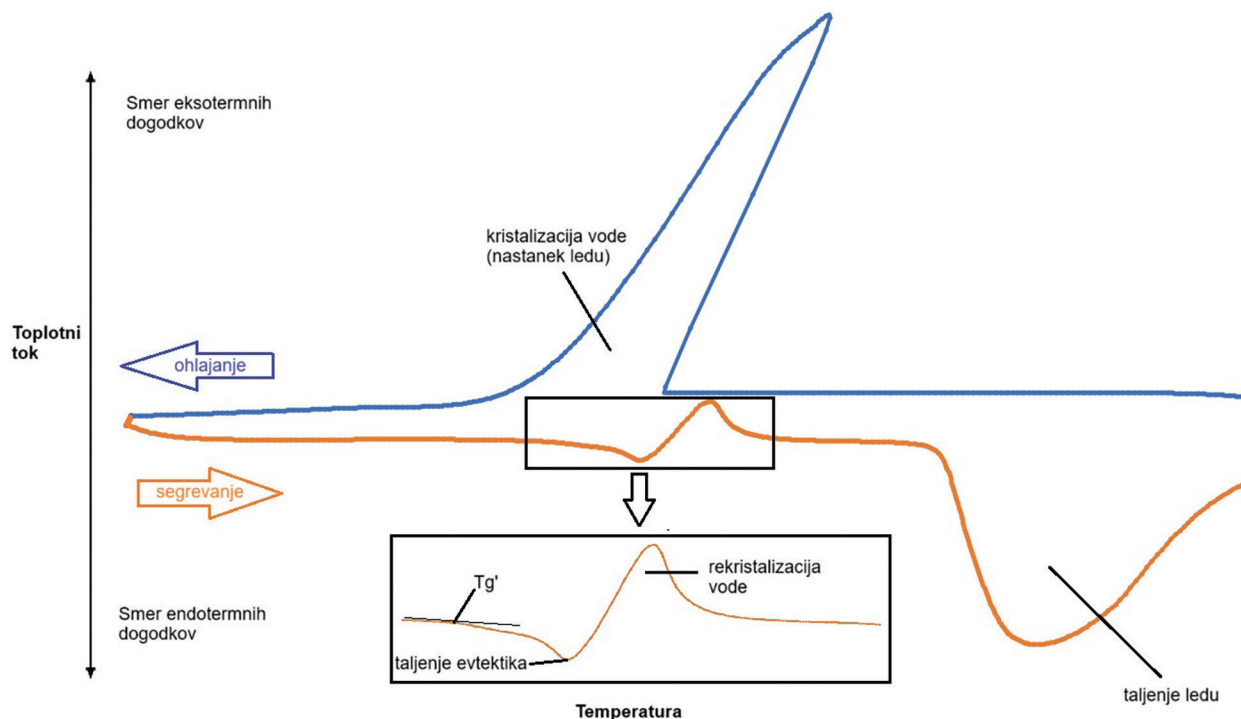
³ Temperatura kolapsa oz. razpada strukture med primarnim sušenjem, običajno določena z mikroskopijo z zamrzovanjem in sušenjem.

⁴ Temperatura steklastega prehoda suhe liofilizacijske pogače. Temperatura shranjevanja mora biti pod to temperaturo.

nega pomena za optimizacijo liofilizacijskega cikla je DSC analiza raztopine za liofilizacijo, saj omogoča določitev kritičnih temperatur (T_g' , T_{eu}) pri zasnovi liofilizacijskega cikla (slika 5). Med ohlajanjem se tekoč vzorec podhlajuje, dokler ne pride do nukleacije in kristalizacije manjšega deleža vode v led, čemur sledi koncentriranje topljencev v preostali raztopini do nasičenja. Ob nasičenosti raztopine topljencev lahko ta preide v steklasto stanje (T_g') oz. kristalizira v evtektik. Steklasti prehod je na termogramu viden v obliki stopničastega prehoda bazne linije zaradi spremembe toplotne kapacitete vzorca, medtem ko je tvorba evtektika vidna kot manjši eksotermni vrh. Med segrevanjem ponovno opazimo steklasti prehod raztopine topljencev (16). Zaznava T_g' je običajno povezana tudi s hitrostjo segrevanja oz. ohlajanja vzorca, zato se za točnejšo meritev priporočajo počasnejše hitrosti segrevanja in ohlajanja, in sicer 1–2 °C/min (17). V primeru evtektične zmesi prihaja do taljenja evtektika (endotermni dogodek), pri čemer maksimalno koncentrirana steklasta domena preide še en steklasti prehod zaradi sproščene vode. Talilni vrh evtektika je običajno zakrit z mnogo večjim talilnim vrhom ledu (8).

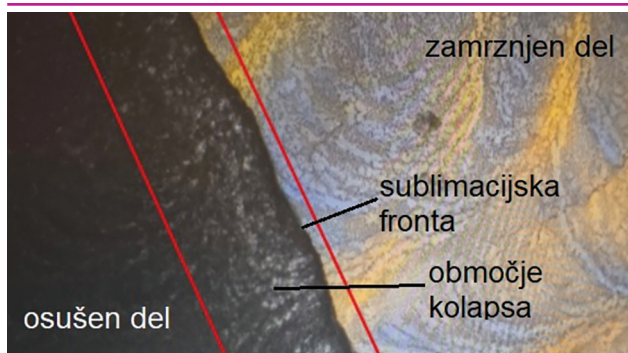
4.2 MIKROSKOPIJA Z ZAMRZOVANJEM IN SUŠENJEM

Mikroskopija z zamrzovanjem in sušenjem (angl. *freeze-drying microscopy*; FDM) omogoča simulacijo liofilizacijskega cikla na majhnem volumnu raztopine ob nadzoru temperature ter znižanem tlaku (8, 24). Z mikroskopsko povečavo lahko določimo temperaturo kolapsa (T_c) zamrznjene liofilizacijske pogače med primarnim sušenjem. Vrednosti so bolj reprezentativne v primerjavi z DSC in neodvisne od narave kolapsa (steklast prehod oz. taljenje evtektika). Ob dosegu kritične temperature (T_{onset}) se za sublimacijsko fronto pojavijo svetline, ki jim sledi pojav praznin in popolna izguba strukture (slika 6) (8, 24). Omejena mikroskopska metoda omogoča raziskovanje vpliva načina zamrzovanja na morfologijo kristalov ter oceno hitrosti sublimacije med primarnim sušenjem. Pri uporabi polarizirane svetlobe lahko zaradi dvolomnosti kristalov ločimo svetla kristalinična in temno obarvana amorfna območja, kar vpliva na stabilnost, rekonstitucijski čas in izgled končnega zdravila (8). Možne so razlike med T_c v liofilizatorju in med meritvijo FDM zaradi različnih pogojev in več-



Slika 5: Termogram liofilizacijske raztopine. Povzeto po (16).

Figure 5: Thermogram of lyophilisation solution. Adopted from (16).



Slika 6: Prikaz sublimacijske fronte na mikroskopu z zamrzovanjem in sušenjem (vir: arhiv avtorjev).

Figure 6: Sublimation front during freeze-drying microscopy (photo taken by the authors).

jega števila nečistot med meritvijo FDM, saj slednje delujejo kot nukleacijska jedra (18).

5 METODE DOLOČANJA KRISTALNOSTI

Kristalnost in specifična površina komponent (poglavje 6) vplivata na CQA liofilizata. Med slednje uvrščamo stabilnost med shranjevanjem in čas rekonstitucije pred aplikacijo zdravila.

5.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA

Rentgenska praškovna difrakcija (angl. *X-ray powder diffraction*) je uporabna metoda za določanje kristalnosti liofilizotov (8). Pri tej metodi je monokromatski rentgenski žarek usmerjen proti vzorcu, pri čemer je intenziteta difrakcijskega žarka odvisna od kota vpadnega žarka. Kristale v preiskovanem materialu opazimo kot značilne vrhove pri določenem vpadnem kotu, kar omogoča raziskovanje polimorfizma materiala (19). Metoda omogoča sledenje fizikalnim spremembam vzorca med shranjevanjem. Stopnja kristalnosti ogrinja je ključna pri proteinskih zdravilih učinkovinah, kjer na njihovo stabilnost tekom shranjevanja vpliva kristalizacija lio- in krioprotektantov. Cavatur in sodelavci so difraktometer opremili s hladilno mizico in vakuumom ter določali kristalnost raztopin z različnimi koncentracijami nafcilina *in situ* v odvisnosti od parametrov zamrzovanja. Ugotovili so, da je delež kristaliziranega nafcilina sorazme-

ren s časom temperiranja⁵ med zamrzovanjem ter neodvisen od koncentracije. Slednje omogoča optimizacijo procesnih pogojev za doseganje želenih oblik končnega liofilizata (20).

6 METODE DOLOČANJA SPECIFIČNE POVRŠINE IN GOSTOTE

6.1 BRUNAUER-EMMETT-TELLER

Plinsko adsorpcijo pogosto uporabljamo za določanje specifične površine liofilizotov. Pri metodi Brunauer-Emmett-Teller površino snovi ocenimo v področju reverzibilne plinske adsorpcijske izoterme tipa II, kjer se pri nizkih tlakih plinske molekule adsorbirajo na površino snovi v obliki monosloja (8). Med analizo v komoro z osušenim vzorčnim materialom dovajamo plin, običajno dušik pri temperaturi 77 K. Površino snovi izračunamo iz podatka o površini molekule plina. Wang in sodelavci so ugotovili, da potek procesa zamrzovanja pomembno vpliva na specifično površino liofilizirane formulacije z monoklonskim protitelesom. Rezultati študije kažejo, da običajno zamrzovanje do končne nastavljene temperature police in nižjimi temperaturami nukleacije vodi k večjim specifičnim površinam (1,4 m²/g) v primerjavi z zamrzovanjem z dodanim temperiranjem (0,8 m²/g) (25). Omejitev metode je njena primernost zgolj za neporozne materiale oz. materiale s premeri por večjimi od 2 nm. Na točnost določitve površine liofilizotov vplivajo hlapne snovi in adsorbirani plini oz. voda, zato moramo vzorec predhodno osušiti oz. razpliniti (21).

6.2 PLINSKA PIKNOMETRIJA

Metodo plinske piknometrije uporabljamo za določanje gostote in posredno prek volumna liofilizacijske pogače tudi poroznosti liofilizotov. Metoda deluje na osnovi prodiranja inertnega plina v vzorec in posledičnega znižanja tlaka v merilnih celicah, kar omogoča določanje točnega volumna vzorca. Običajno se zaradi majhnosti atomov in dobre prodornosti v vzorec uporablja helij (22). Plinska piknometrija pri vrednotenju liofilizotov ni pogosta, čeprav omogoča po-

⁵ Korak faze zamrzovanja (angl. *annealing*), namenjen doseganju kristalizacije sestavin formulacije pri višji temperaturi police (10–20 °C nad T_g).

sredno določitev prostega volumna in poroznosti liofilizacijske pogače. Prosti volumen je sorazmeren s površino medfaze, na kateri lahko prihaja do razgradnje bioloških zdravilnih učinkovin. Stange in sodelavci so piknometrično določili pravo gostoto intaktnih liofilizacijskih pogač iz manitola in saharoze za razliko od ustaljenih destruktivnih pristopov s stiskanjem in mletjem (23). Visoko povezanost por liofilizata so potrdili z meritvami μ -CT. Ugotovili so, da je za točno določitev gostote liofilizata potrebno večje število ciklov prepihanja (vsaj 60) za odstranitev hlapnih substanc. Gostote, določene z dušikom in žveplovim heksafluoridom, so primerljive, medtem ko gostote, določene s helijem, odstopajo zaradi absorpcije plina v notranjost liofilizacijske pogače. Dušik je primeren za plinsko piknometrijo liofilizatov, saj kljub slabši prodornosti omogoča koreliranje gostote z morfološki značilnostmi liofilizacijske pogače (23).

7 SKLEP

Vrednotenje liofilizatov z analiznega stališča predstavlja poseben izziv v primerjavi z vrednotenjem drugih trdnih farmacevtskih oblik. Pri analizi strukturnih značilnosti je kritična predpriprava vzorcev liofilizatov, ki morajo ohraniti informacije o izvorni strukturi liofilizata. Dodatno oviro predstavlja tudi visoka specifična površina in higroskopnost analiziranega materiala, ki zahtevata predpripravo vzorcev v nadzorovani atmosferi (npr. dušik, suha klima). Pomen procesa liofilizacije je neposredno povezan z razvojem bioloških zdravil, pri čemer mora biti proces ustrezno načrtovan. Skladno s tem se v zadnjih letih pospešuje razvoj analiznih metod za vrednotenje kritičnih lastnosti liofiliziranega produkta in neposredno spremljanje procesa.

8 IZJAVA

Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa (P1-0189), ki ga je sofinancirala Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije.

9 LITERATURA

1. Bjelošević M, Ahlin Grabnar P. Pomen liofilizacije v farmaciji. *Farm Vestn*. 2021;(72):159–66.
2. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res*. 2004 Feb;21(2):191–200.
3. Lyophilisation in Pharmaceutical Market Report 2023-2033 - Visiongain [Internet]. <https://www.visiongain.com/>. [cited 2024 Feb 24]. Available from: <https://www.visiongain.com/report/lyophilisation-market-2023/>
4. Pardeshi SR, Deshmukh NS, Telange DR, Nangare SN, Sonar YY, Lakade SH, et al. Process development and quality attributes for the freeze-drying process in pharmaceuticals, biopharmaceuticals and nanomedicine delivery: a state-of-the-art review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 2023 9:1. 2023 Nov 7;9(1):1–31.
5. Kawasaki H, Shimanouchi T, Kimura Y. Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. *J Chem*. 2019;2019.
6. Patel SM, Nail SL, Pikal MJ, Geidobler R, Winter G, Hawe A, et al. Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable? *J Pharm Sci*. 2017 Jul 1;106(7):1706–21.
7. Haeuser C, Goldbach P, Huwyler J, Friess W, Allmendinger A. Imaging Techniques to Characterize Cake Appearance of Freeze-Dried Products. *J Pharm Sci*. 2018 Nov 1;107(11):2810–22.
8. Liu J. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. *Pharm Dev Technol*. 2006 Feb;11(1):3–28.
9. Ul-Hamid A. A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy. A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy. Springer International Publishing; 2018.
10. Barigou M, Douaire M. X-ray micro-computed tomography for resolving food microstructures. *Food Microstructures: Microscopy, Measurement and Modelling*. 2013;246–72.
11. Hackl E V, Ermolina I. Using Texture Analysis Technique to Assess the Freeze-Dried Cakes in Vials. *J Pharm Sci*. 2016 Jul 1;105(7):2073–85.
12. De Caro CA, Aichert A, Walter CM. Efficient, precise and fast water determination by the Karl Fischer titration. *Food Control*. 2001 Oct 1;12(7):431–6.
13. Analytical Options for the Measurement of Residual Moisture Content in Lyophilized Biological Materials [Internet]. [cited 2024 Feb 25]. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/116129-Analytical-Options-for-the-Measurement-of-Residual-Moisture-Content-in-Lyophilized-Biological-Materials/>
14. Preskar M, Korasa K, Vrbanec T, Klement D, Vrečer F, Gašperlin M. Applicability of Raman and near-infrared spectroscopy in the monitoring of freeze-drying injectable ibuprofen. *Drug Dev Ind Pharm*. 2021;47(5):758–69.
15. Cen H, He Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci Technol*. 2007 Feb 1;18(2):72–83.
16. Wolkers WF, Oldenhof H, editors. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [cited 2024 Feb 24]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1257). Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2193-5>



17. Pansare SK, Patel SM. Practical Considerations for Determination of Glass Transition Temperature of a Maximally Freeze Concentrated Solution. *AAPS PharmSciTech*. 2016 Aug 1;17(4):805–19.
18. Meister E, Šašić S, Gieseler H. Freeze-dry microscopy: impact of nucleation temperature and excipient concentration on collapse temperature data. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(2):582–8.
19. Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. 2012.
20. Cavatur RK, Suryanarayanan R. Characterization of frozen aqueous solutions by low temperature X-ray powder diffractometry. *Pharm Res* [Internet]. 1998 [cited 2024 Feb 25];15(2):194–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9523303/>
21. Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquerol J, et al. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure and Applied Chemistry* [Internet]. 1985 Jan 1 [cited 2024 Feb 25];57(4):603–19. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac198557040603/html>
22. Accupyc - Micromeritics [Internet]. [cited 2024 Feb 25]. Available from: <https://www.micromeritics.com/accupyc/>
23. Stange U, Scherf-Clavel M, Gieseler H. Application of gas pycnometry for the density measurement of freeze-dried products. *J Pharm Sci* [Internet]. 2013 [cited 2024 Feb 25];102(11):4087–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24018750/>
24. Development of Freeze-dried Formulations Using Thermal Analysis and Microscopy [Internet]. [cited 2024 Feb 25]. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/36885-Development-of-Freeze-dried-Formulations-Using-Thermal-Analysis-and-Microscopy/>
25. Wang J, Searles J, Torres E, Tchessalov E, Young A. Impact of Annealing and Controlled Ice Nucleation on Properties of A Lyophilized 50 mg/ml MAB Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;111:2639–44