

Techno Pharm

Mit APV-News
Nachrichten und Mitteilungen

03 · 2017

MAKING SCIENCE WORK

Computergestützte Monitoringsysteme

Datenmanagement bei raumluftechnischen Pharmaanlagen

Innovative Füllmengenkontrolle

100 %-Inline-Messung bei Pulverinhalatoren

Prozessanalytische Technologie

Einsatz beim Upgrading eines Mischcontainers

Partikelanalyse von Proteinlösungen

Kontrolle hochviskoser Flüssigkeiten in der Pharmaproduktion

Energieeintrag durch optische Strahlungsquellen

Auswirkungen auf Produkte in der parenteralen Produktion

TERMINE 136

FOKUS: MESSEN/STEUERN/REGELN

Rehbaum, Hubertus 138
A Case Study to Introduce Process Analytical Technologies in Pharmaceutical Manufacturing

Seyfang, Karlheinz 144
Füllmengenkontrolle mit Durchblick

Suresh, Sandra 152
Partikelanalyse von Proteinlösungen
Analyse von hochviskosen Flüssigkeiten in der Pharmaproduktion

Schicht, Hans; Röcker, Rainer 158
Monitoring raumluftechnischer Anlagen

AUTOMATION

Krumbein, Felix; Posset, Tobias 164
Ermittlung des Energieeintrags durch optische Strahlungsquellen
Ein Konzept für Arzneimittel in der parenteralen Produktion – Teil 1

IT

von Plate, Moritz; Kirschnik, Frank 170
Gewissheit über die Zukunft von Maschinen
Zustandsbasierte Prognosen zeigen Status von Anlagen

MESSE

Letzner, Hans-Hermann 176
Rückblick auf die interpack 2017

SPEKTRUM 183

PANORAMA 185

PRODUKTE 187

IMPRESSUM 190

APVnews

Nachrichten und Mitteilungen von der Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.
(Ausgabe 03/17, nach S. 190)

Beiratsgremium

Konstantin Clevermann, Dortmund · Prof. Dr. Jürgen Hannemann, Biberach · Dr. Udo Janske, Darmstadt · Prof. Dr. Gerd Kutz, Detmold · Heinz Kudernatsch, Nürnberg · Hans Ulrich Peterreit, Darmstadt · Dr. Elke Sternberger-Rützel, Freiberg a.N. · Dr. Mike Schäfers, Eschweiler · Dr. Frank Stieneker, Hofheim · Roland Szymoniak, Frankfurt am Main · Dr. Jochen Thies, Warendorf · Dipl.-Ing. Frank Wilde, Basel · Prof. Dr.-Ing. Dominik Rabus, Forchtenberg · Dipl.-Ing. Frank Lehmann, Allschwil (Schweiz)

Partikelanalyse von Proteinlösungen

Analyse von hochviskosen Flüssigkeiten in der Pharmaproduktion

Sandra Suresh • PAMAS Partikelmess- und Analysesysteme GmbH, Rutesheim

Korrespondenz: Sandra Suresh, Marketing Manager, PAMAS Partikelmess- und Analysesysteme GmbH, Dieselstraße 10, 71277 Rutesheim; **e-mail:** sandra.suresh@pamas.de

Zusammenfassung

Pharmazeutische Flüssigkeiten werden in der Regel nach der Pharmakopöe USP 788 auf Partikel geprüft. Die Norm erlaubt die Reinheitskontrolle per Lichtabschattungspartikelzähler und per Mikroskop. Da sich die Flüssigkeiten, die in der pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen, in ihrer Konsistenz und Beschaffenheit unterscheiden, werden Hersteller von Messinstrumenten vor neue Herausforderungen gestellt. Die Geräte müssen so konzipiert sein, dass sie Flüssigkeiten von unterschiedlicher Viskosität und unterschiedlichem Verschmutzungsgrad analysieren können. Speziell im pharmazeutischen Bereich muss auch das vorhandene Probenvolumen bei der Auswahl eines geeigneten Analysegeräts berücksichtigt werden. Am Beispiel von Proteinlösungen wird hier aufgezeigt, welche besonderen Merkmale ein automatischer Partikelzähler aufweisen muss, um präzise Messergebnisse über den Partikelgehalt der Flüssigkeit liefern zu können.

1. Einleitung

Pharmazeutische Flüssigkeiten können sowohl mit einem Partikelzähler als auch mit einem Mikroskop analysiert werden. Da die mikroskopische Analyse einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand mit sich bringt und mitunter auch sehr subjektiv ist, wird die Methode der optischen Partikelzählung in der Praxis normalerweise bevorzugt. Optische Partikelzähler arbeiten mit Licht. Im Gerät befinden sich ein Sender, meist eine Laserdiode, und ein Empfänger, der das Signal detektiert (eine Fotodiode). Je nach Art der zugrunde liegenden Technik unterscheidet man Extinktionspartikelzähler, die auf dem Lichtblockadeprinzip basieren, von Partikelzählern, bei denen eine Lichtstreuung zum Einsatz kommt.

2. Methoden der optischen Partikelzählung

Extinktionspartikelzähler messen nach dem Abschattungsprinzip. Ab-

bildung 1 zeigt, wie der Laserstrahl der Laserdiode dabei die Messzelle des Sensors durchleuchtet und auf die Fotodiode fällt.

Beim Durchströmen der Messzelle verursachen die Partikel in der Flüssigkeit eine Abschattung und damit eine Schwächung des Laserstrahls. Es fällt also weniger Licht auf die Fotodiode und der Fotostrom sinkt. Durch die Sensorelektronik wird dieser Strom in Spannung umgewandelt und als Signal sichtbar gemacht. Größere Partikel schatten mehr Licht ab. Die Fläche des Schattens repräsentiert also die Größe des Partikels. Bei der Projektion des Schattens auf die Fotodiode wird die dritte Dimension des Partikels eliminiert.

Beleuchtete Partikel lenken das Licht aus seiner ursprünglichen Ausbreitungsrichtung ab und streuen es in verschiedene Richtungen. Ein *Streulichtsensor* macht sich dieses Prinzip zunutze und misst nur das gestreute Licht. Wie bei Extinktionspartikelzählern passieren die Partikel auf ihrem Durchflusspfad auch beim

Key Words

- Proteinlösungen
- Messtechnik
- Partikelmessung
- Reinheitskontrolle
- pharmazeutische Flüssigkeiten
- Verschmutzungsanalyse
- Partikelzähler
- USP 788

Streulichtsensor ein intensiv beleuchtetes Volumen in der Messzelle. Allerdings wird in diesem Fall nicht das abgeschattete Licht ausgewertet, sondern das gestreute Licht (Abb. 2). Das

Autor



Sandra Suresh

Nach Abschluss ihres Masterstudiums an der Universität Stuttgart war Sandra Suresh in den Redaktionen von Zeitschriftenverlagen und PR-Agenturen tätig. Seit April 2010 arbeitet sie in der Unternehmenskommunikation der PAMAS Partikelmess- und Analysesysteme GmbH in Rutesheim. Neben der Presse- und Öffentlichkeitsarbeit ist sie auch für das Verfassen des Newsletters, für die Pflege des Internetauftritts und für die Erstellung von Produktbroschüren zuständig.

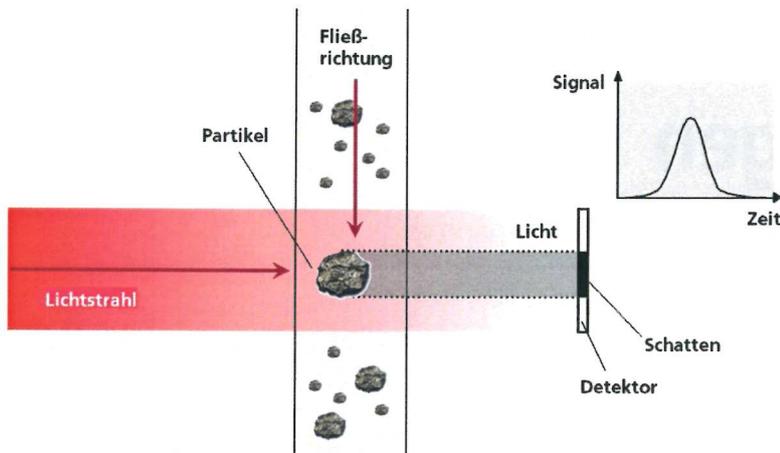


Abbildung 1: Die Grafik veranschaulicht das Prinzip der Lichtabschattung, auf dem Extinktionspartikelzählern basieren. Ein Partikel in der Sensormesszelle erzeugt einen Schatten auf der Fotodiode. Die Fläche des Schattens repräsentiert die Größe des Partikels (Quelle aller Abbildungen: PAMAS Partikelmess- und Analysesysteme GmbH).

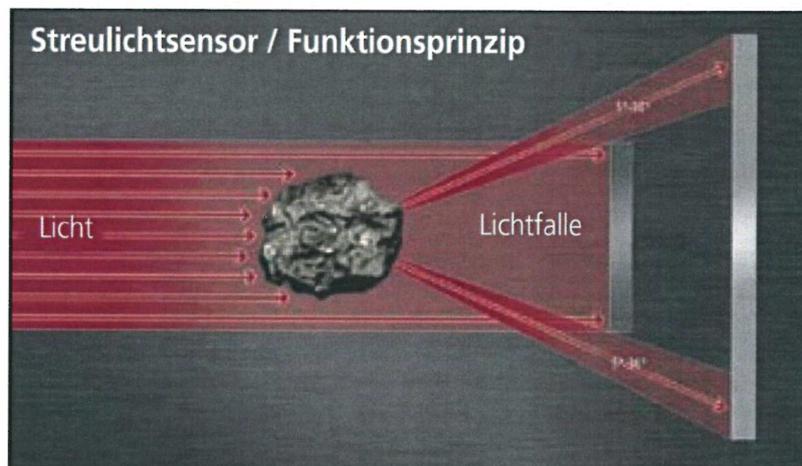


Abbildung 2: Streulichtsensoren messen nur das Licht, das von Partikeln gestreut wird. Eine Lichtfalle verhindert, dass nicht gestreutes Licht vom Sensor erfasst wird.

nicht abgelenkte bzw. nicht gestreute Licht, das die Messzelle ohne Partikel durchstrahlt, wird von einer Lichtfalle absorbiert. Falls sich keine Partikel in der Messzelle befinden, wird das Licht also vollständig von der Lichtfalle absorbiert.

Partikelzähler, die nach dem Streulichtprinzip arbeiten, erfassen das von den Partikeln gestreute Licht und werten es messtechnisch aus. Dabei wird die Intensität des Streulichts als Maß für die Partikelgröße interpretiert. Für die Zuordnung in Größenklassen werden die Streulichtimpulse entsprechend ihrer Höhe klassiert und als Zählereignisse in

entsprechende Klassen aufsummiert. Die Anzahl der gezählten Streulichtimpulse entspricht also dem quantitativen Partikelgehalt bzw. der Anzahl der Partikel. Wie beim Extinktionsverfahren kann der Partikelzähler diese Angaben wiederum in die Partikelkonzentration pro ml umrechnen, falls die Durchflussrate durch den Sensor (Volumen pro Messdauer) bekannt ist.

3. Grenzen der optischen Partikelmessung

Im pharmazeutischen Bereich werden üblicherweise Lichtabschat-

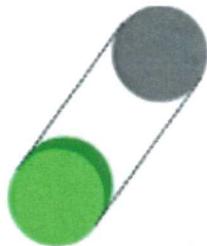
tungspartikelzähler verwendet, da der Einsatz von Streulichtsensoren gemäß der Pharmakopöe USP 788 [1] nicht zulässig ist. Die Zuordnung des Sensorsignals zur Partikelgröße wird bei der Kalibrierung bestimmt. Dabei wird das elektrische Signal in einen Partikeldurchmesser übersetzt. Für Anwendungen im pharmazeutischen Bereich werden die Sensoren gemäß USP 788 mit monodispersen Latexpartikeln in den Größenklassen 10 µm, 15 µm und 25 µm kalibriert, wobei jeder Partikelgröße ein entsprechender Spannungswert zugeordnet wird. Aus diesen einzelnen Spannungswerten wird dann die Kalibrierkurve erstellt. Nach erfolgter Kalibrierung gibt die Höhe des Sensorsignals Aufschluss über die Partikelgröße.

An ihre Grenzen stößt die automatische Partikelzählung, wenn sich zu viele Partikel pro ml in der Flüssigkeit befinden. Man spricht in diesem Fall von Koinzidenz. Eine zu hohe Partikelkonzentration erhöht den Koinzidenzfehler. Im Koinzidenzfall fließen 2 oder mehrere kleine Partikel gleichzeitig durch das beleuchtete Volumen der Sensorzelle. Der Lichtstrahl, der auf die Partikel fällt, wirft dann mehr als einen Schatten auf den Detektor. Die Schatten können sich auch überlagern. Dadurch werden mehrere kleinere Partikelschatten als ein größeres Partikel ausgewertet. Bei einer Partikelverteilung in mehreren Kanälen bzw. Größenklassen zeigt das Messergebnis daher mehr größere Partikel und weniger kleinere Partikel an. Eine steigende Koinzidenz führt daher zu falschen Messwerten. Je stärker die Verschmutzung der Flüssigkeit (also je mehr Partikel sich in der Probe befinden), desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Koinzidenzfällen. Die Messgenauigkeit von Partikelsensoren ist daher in Abhängigkeit vom Koinzidenzfehler angegeben. Die Maximalkonzentration des Partikelsensors gibt an, für welche Partikelanzahl pro ml eine bestimmte, durch Koinzidenz bedingte

Partikelform



Maximale Projektion



Minimale Projektion

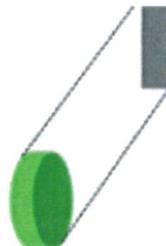


Abbildung 3: Die Partikelform hat Einfluss auf das Messergebnis. Je nachdem, in welcher Ausrichtung die Partikel durch die Messzelle fließen, wird auf die Fotodiode ein Schatten unterschiedlicher Größe projiziert.

Fehlerquote bei der Partikelzählung zu erwarten ist.

Begrenzt wird die statistische Relevanz der Messergebnisse einer automatischen Partikelanalyse auch durch die Form der zu messenden Partikel. Die Partikelform hat Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Messungen. Bei nicht kugelförmigen Partikeln wird die Partikelgröße je nach Ausrichtung unterschiedlich bewertet. Falls die Partikelform von der Kugelform abweicht (etwa bei flachen oder faserförmigen Partikeln), kann die individuelle Ausrichtung der einzelnen Partikel zu Schwankungen der Messergebnisse führen. Denn wenn der Partikel mit maximaler Projektionsfläche zur Lichtquelle durch die Messzelle fließt, wird ein größerer Schatten auf die Fotodiode projiziert als bei minimaler Projektion (Abb. 3). In der Praxis tritt dieser Fall jedoch nur sehr selten auf, da sehr kleine Partikel naturgemäß meist kugelförmig sind.

4. Kriterien für die Sensorauswahl

Die Auswahl des geeigneten Partikelsensors erfolgt bei pharmazeutischen Anwendungen anhand der Partikelkonzentration, der vorhandenen Probenmenge sowie der Viskosität der Flüssigkeit.

Handelt es sich um Flüssigkeiten mit einer hohen Partikelkonzentration, sollte ein Sensor mit einer relativ kleinen Messzellenöffnung gewählt werden, um den Koinzidenzfehler zu reduzieren. Pharmazeutische Flüssigkeiten weisen i.d.R. jedoch ohnehin hohe Reinheit auf. Gemäß USP 788 sind z.B. für Behältervolumen von weniger bzw. genau 100 ml höchstens 6 000 Partikel pro Behälter für Partikelgrößen > 10 µm erlaubt. Von Partikeln, die größer als 25 µm sind, darf ein Behälter höchstens 600 Partikel enthalten. In Anbetracht der geringen Partikelkonzentration von pharmazeutischen Flüssigkeiten sind Standardsensoren mit einem Messzellendurchmesser von 0,5 mm für die Analyse am besten geeignet.

Das Kriterium der vorhandenen Probenmenge ist insbesondere bei kostspieligen Probenflüssigkeiten von Bedeutung. Wenn die vorhandene Probenmenge begrenzt ist, kommt es bei der Analyse darauf an, möglichst jeden Tropfen der Flüssigkeit für die Analyse nutzen zu können. Automatische Partikelzähler können zu diesem Zweck mit einer speziellen Vorrichtung für geringe Probenmengen ausgerüstet werden. Das Totvolumen wird bei dieser besonderen Art der Probenzuführung auf ein Minimum reduziert, so dass für die Partikelanalyse nur wenige ml Flüssigkeit benötigt werden.

Die Viskosität der zu analysierenden Flüssigkeit muss bei der Auswahl des geeigneten Messsystems ebenfalls berücksichtigt werden. Während niederviskose Flüssigkeiten ohne Druckzufuhr durch den Sensor geleitet werden können, ist bei höherviskosen Flüssigkeiten eine zusätzliche Druckunterstützung notwendig. Partikelzähler werden zu diesem Zweck mit einem Druckbehälter ausgestattet. Hierbei handelt es sich um eine Probenkammer, in der sowohl ein Überdruck als auch ein Vakuum erzeugt werden können. Überdruck wird gebildet, um höherviskose Flüssigkeiten für die Messung durch den Sensor befördern zu können. Die Vakuumfunktion wird verwendet, um Gasblasen aus der Probenflüssigkeit zu entfernen.

5. Partikelanalyse von Proteinlösungen

Vor Herausforderungen werden Hersteller von Partikelzählsystemen gestellt, wenn mehrere Kriterien gleichzeitig erfüllt werden müssen. Ein solcher Fall tritt ein, wenn z.B. Proteinlösungen analysiert werden sollen. Bei Proteinen handelt es sich um organische Eiweißmoleküle mit einer hohen Dichte. Da die Dichte die Viskosität bedingt, haben Proteinlösungen für gewöhnlich eine höhere Viskosität. Neben der hohen Viskosität spielt bei Proteinlösungen auch die geringe Probenmenge eine Rolle. In der Praxis sind oftmals nur wenige ml der teuren Flüssigkeit vorhanden.

Wenn viele Anforderungen gleichzeitig erfüllt werden müssen, wird es für den Anwender schwierig, ein geeignetes Partikelzählsystem für seinen spezifischen Anwendungsbereich zu finden. So gibt es z.B. eine Vielzahl an Partikelzählsystemen für kleine Probenmengen sowie eine große Auswahl an Analysesystemen für höherviskose Probenflüssigkeiten, aber für die Kombination von höherviskosen Probenflüssigkeiten in geringen Probenmengen existieren auf dem Markt kaum geeignete Produkte.

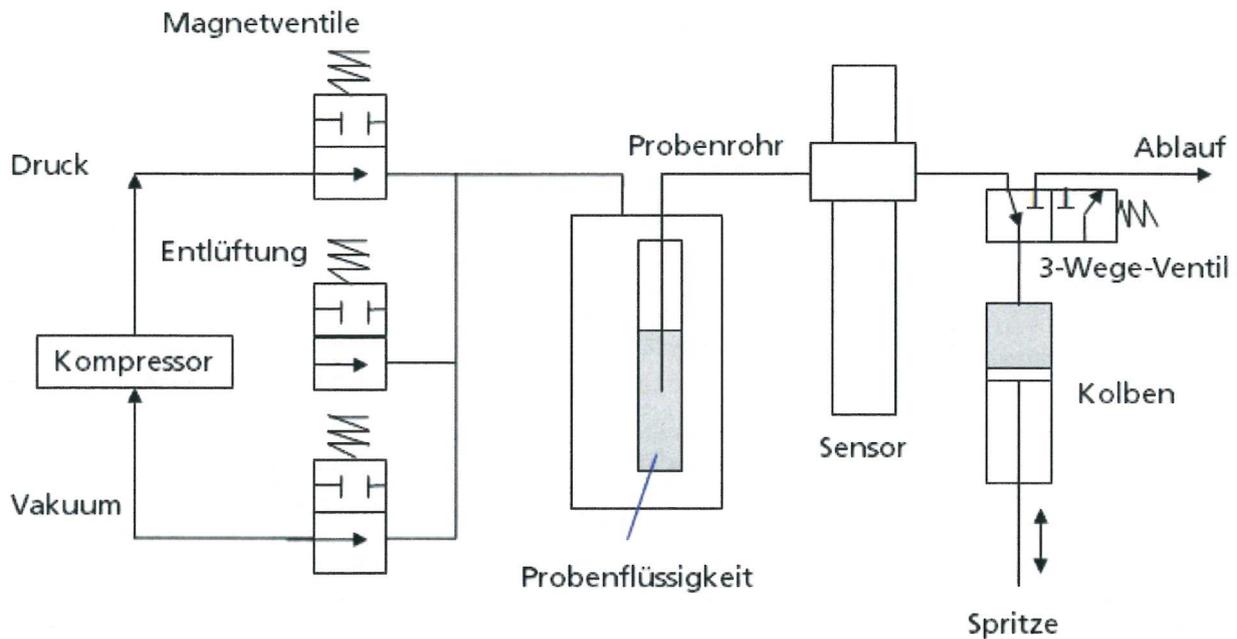


Abbildung 4: Das Schema veranschaulicht einen Messvorgang mit einem druckunterstützten Partikelzähler. Mit der integrierten Spritze (rechts im Schema) wird eine konstant gleichbleibende Durchflussrate erzeugt.

Dass eine automatische Partikelanalyse höherviskoser Flüssigkeiten ohne Druckunterstützung nicht möglich ist, wurde im Jahr 2014 in einer Studie des Arzneimittelherstellers Coriolis Pharma [2] nachgewiesen. Bei einer Vergleichsmessung fand ein Forschungsteam des Unternehmens heraus, dass zu wenige Partikel gezählt werden, wenn bei höherviskosen Probenflüssigkeiten ohne Druck gemessen wird. Als Ursache für die Fehlmessungen wurden in der Studie Luftblasen identifiziert, die als Folge von Unterdruck bei der Probenzufuhr von zähfließenden Probenflüssigkeiten entstehen. Wegen der eingeschlossenen Luft fließt dabei weniger Flüssigkeit durch den Partikelzähler und es werden weniger Partikel gezählt. Im Umkehrschluss wiesen die Forscher auch nach, dass präzise Messergebnisse von höherviskosen Proteinlösungen mit einer geeigneten Druckunterstützung realisiert werden können.

Im Rahmen der Studie verglich die Forschungsgruppe Lichtabschattungs- und Partikelzähler, die mit und ohne Druckfunktion ausgestattet wa-

ren. Die Partikel wurden im kalibrierten Messbereich zwischen 1 und 200 μm gezählt und in Größenklassen eingeteilt. Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau eines Partikelzählers, der mit einer Druckunterstützung ausgestattet wurde. Der Kompressor (links im Bild) baut Druck auf und befördert die Probenflüssigkeit durch den Sensor. Darüber hinaus verfügt der Kompressor über eine Vakuumfunktion, mit der die Probe vor der Messung entgast werden kann, um Luftblasen zu entfernen. Bei Partikelzählern ohne Pumpe erfolgt die Probenzufuhr drucklos. Drucklose und druckunterstützte Partikelzähler sind mit einer Spritze (rechts im Bild) ausgestattet, die für eine konstant gleichbleibende Durchflussrate und für ein exaktes Messvolumen sorgt.

Um die These zur Partikelanalyse von höherviskosen Probenflüssigkeiten zu bestätigen, analysierte das Forschungsteam von Coriolis Pharma Proteinlösungen unterschiedlicher Viskosität mit und ohne Druckunterstützung. Nach Erfassung des Blindwerts wurde den Proteinlösungen eine zuvor be-

stimmte, bekannte Partikelmenge von monodispersen Latexpartikeln mit einer Größe von 2 μm beigemischt, so dass sich eine Partikelkonzentration von 80 000 Partikeln pro ml ergab. Die Partikelkonzentration wurde rechnerisch und mit einer Probe von Reinstwasser nachgewiesen. Die Messergebnisse von druckunterstützten und drucklosen Messungen wurden anschließend miteinander verglichen.

Wie die Messergebnisse zeigten, waren beide Arten von Partikelzählern dazu in der Lage, den Partikelgehalt von 80 000 Partikeln pro ml in den niedrigviskosen Proben korrekt zu bestimmen. Drucklose und druckunterstützte Partikelzähler lieferten dabei ähnliche Werte wie bei der Testmessung mit Reinstwasser. Bei der Analyse von höherviskosen Flüssigkeiten deckte sich die gemessene Partikelkonzentration jedoch nicht mit der erwarteten Partikelanzahl. Drucklose Partikelzähler detektierten hier eine weit geringere Anzahl an Partikeln (z. B. 40 000 Partikel pro ml), während Partikelzähler mit Druckunterstützung auch höherviskose Proben fehlerfrei messen konnten.



Abbildung 5: Für die Analyse von Proteinlösungen werden Partikelzählsysteme mit einer kleineren Druckkammer ausgestattet. So können auch geringere Probenmengen höherer Viskosität unter Druck analysiert werden.

Die Studie zeigte, dass nur ein Partikelzähler mit Druckfunktion dazu in der Lage ist, höherviskose Proteinlösungen fehlerfrei zu messen. Die Partikelanalyse ohne Druckunterstützung führt zu fehlerhaften Messergebnissen, die von Luftblasen verursacht werden: Es werden zu wenige Partikel gezählt, weil anstelle der Probenflüssigkeit infolge des Unterdrucks Luft und keine Probenflüssigkeit in den Partikelzähler gelangt. In der Folge werden weniger Partikel gemessen als in der Probe tatsächlich vorhanden sind.

Um Fehlmessungen zu vermeiden, schlagen die Autoren der Studie 3 Lösungsansätze vor: Anstelle eines Lichtabschattungspartikelzählers könnten die Partikel etwa mit einem Mikroskop gemessen werden. Die mikroskopische Analyse ist nach USP 788 zwar zulässig, aber – wie eingangs erwähnt – sehr zeit- und arbeitsintensiv. Zudem ermöglicht sie keine objektive Auswertung. Eine alternative Methode zur Partikelbestimmung sehen die Autoren in der Verdünnung mit einem niedrigviskosen Lösungsmittel, wobei auch dieses Verfahren Nachteile mit sich bringt: Die Verdünnung beeinträchtigt die statistische Relevanz des Messergebnisses, indem sie die Partikelkonzentration und die Verteilung der Partikel verfälscht. Der statistische Verdünnungsfehler kann zwar korrigiert werden, indem der Messvorgang verlängert wird und mehr Probenflüssigkeit analysiert wird. Allerdings ist eine solche Verlängerung der Messung in der Praxis kaum realisierbar. Die automatische Partikelanalyse mit Druckunterstützung stellt nach Ansicht der Autoren die einzige Methode dar, um höherviskose Proteinlösungen fehlerfrei zu messen.

6. Schlussfolgerung

Um Fehlmessungen zu vermeiden, sollte das für die Partikelanalyse verwendete Messgerät so spezifisch wie möglich an die Art der Anwendung

und an die Beschaffenheit der Probe angepasst werden. Für die Analyse von höherviskosen Probenflüssigkeiten sollten Partikelzählgeräte idealerweise mit einer Druckkammer ausgestattet sein. Der Behälter wird für die Probenzuführung unter Druck gesetzt, so dass auch höherviskose Flüssigkeiten zum Sensor geleitet werden können, ohne Luftblasen zu bilden. Kostspielige Probenflüssigkeiten, von denen nur geringe Probenmengen zur Verfügung stehen, werden mit Hilfe einer speziellen Probenzufuhr zum Sensor geführt, so dass sich das Totvolumen auf ein Minimum reduziert. Proteinlösungen können nur mit speziell ausgestatteten Partikelzählern analysiert werden, weil bei dieser Anwendung neben der hohen Viskosität auch eine geringe Probenmenge berücksichtigt werden muss. Für die Partikelanalyse von Proteinlösungen eignen sich Analysegeräte mit einem kleinen Druckbehälter (Abb. 5).

Literatur

- [1] USP <788>: Particulate Matter in Injections. Erschienen in: The United States Pharmacopoeia USP, 37. Auflage. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2014.
- [2] Daniel Weinbuch, Wim Jiskoot, Andrea Hawe: "Light Obscuration Measurements of Highly Viscous Solutions: Sample Pressurization Overcomes Underestimation of Subvisible Particle Counts". Erschienen in: The AAPS Journal, Ausgabe 06/2014; DOI:10.1208/s12248-014-9629-0, Springer US, Juni 2014.